

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1. Ausgewählte Chemikalien und Substanzen

- ^{14}C -markierte Saccharose (Amersham, Buckinghamshire, UK)
- $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (Amersham-Pharmacia, Freiburg)
- Blockierungsreagenz (Roche Diagnostics, Mannheim)
- Complete™ Proteinase Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostics, Mannheim)
- DAPI (Sigma, St. Louis, USA)
- DNase, RNase-frei (Promega, Mannheim)
- Hefe t-RNA (Sigma, Taufkirchen)
- Heringssperma-DNA, geschert (Sigma, Taufkirchen)
- Hydromount™ Einbettmedium (BDH Merck, Poole, Großbritannien)
- NBT/X-Phosphat (Sigma, Taufkirchen)
- Proteinase K (Promega, Mannheim)
- RNAsin™ (Promega, Mannheim)
- Rotihistol™ (Roth, Karlsruhe)
- T3 Polymerase (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe)
- T7 Polymerase (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe)
- Taq-Polymerase (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe)
- Triton X-100 (Sigma, Taufkirchen)
- Trizol™ (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe)
- Tween™ 20 (Sigma, Taufkirchen)
- Weizenkeimagglutinin, Oregon 488-konjugiert (Molecular Probes, Eugene, USA)

Darüber hinaus wurden hier nicht aufgeführte Standardchemikalien eines für die jeweiligen Experimente angemessenen Reinheitsgrades von den Firmen Biorad (München), Fisher Scientific (Pittsburgh, USA), GibcoBRL (Grand Island, USA), Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) sowie Sigma (Taufkirchen) bezogen. Alle Zellkulturmedien und sämtliche Medienzusätze stammten von den Firmen GibcoBRL (Grand Island, USA) und Invitrogen (Carlsbad, USA); die verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen New England Biolabs, Frankfurt, und Fermentas, St. Leon-Rot, bezogen.

2.1.2. Pufferlösungen und komplexe Reagenzien

- Denhardts Reagenz, 50fach konzentriert: 1 % BSA, 1 % Ficoll, 1 % Polyvinylpyrrolidon in Aqua bidest
- Hybridisierungspuffer für radioaktive Hybridisierungen: 250 mM Phosphatpuffer (pH 7,2), 7% SDS, 1% BSA, 5 mM EDTA
- MOPS-Puffer, zehnfach konzentriert: 0,4 M MOPS, pH 7,0, 100 mM Natriumazetat, 10 mM EDTA, pH 8.0
- PBST-Puffer: 0,2 % Tween-20 in PBS
- Phosphatpuffer, 1 M: 0,33 M NaH₂PO₄, 0,67 M Na₂HPO₄ in Aqua bidest, pH 7,2
- SDS-PAGE-Auftragungspuffer: 25 mM Tris-HCl, pH 6,8, 1 % SDS, 0,05 % Bromphenolblau, 5 % Glycerol, 50 mM DTT
- TBST-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20
- Tris-Glycin-Puffer: 100 mM Tris-Base, 100 mM Glycin, pH 7,0
- TSA-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 140 mM NaCl, 0,025 % NaN₃
- Waschpuffer für radioaktive Hybridisierungen: 25 mM Phosphatpuffer, pH 7,2, 0,7% SDS

Darüber hinaus wurden Standardpufferlösungen für molekularbiologische Techniken gemäß Sambrook und Mitarbeitern verwendet (Sambrook *et al.*, 1989).

2.1.3. Kits

- Digoxigenin RNA Labeling Kit (Roche Diagnostics, Mannheim)
- DNeasy™ Tissue Kit (Quiagen, Hilden)
- ECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham-Pharmacia, Freiburg)
- ProLong™ antifade kit (Molecular Probes, Eugene, USA)
- Readiprime™ II Labeling Kit (Amersham-Pharmacia, Freiburg)
- RNeasy™ Kit (Quiagen, Chatsworth, USA)
- SuperScript™ II First-Strand Synthesis System (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe)

2.1.4. Antikörper

- anti- β -Casein 7781 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Prof. Margaret Neville, Denver, USA)
- anti-Digoxigenin, konjugiert an alkalische Phosphatase (Roche Diagnostics, Mannheim)
- anti-FLAG M2-Affinitätsgel (Sigma, Taufkirchen)
- anti-Occludin (Zymed, San Francisco, USA)
- anti-PKN H234 (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, USA)
- anti-ZO-1 (Chemicon, Temecula, USA)
- Ziegen-anti-Kaninchen IgG (Sigma, Taufkirchen)
- FITC- und Cy3-konjugierte Sekundärantikörper (Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA)

2.1.5. PCR-Primer

Die in der folgenden Übersicht aufgeführten Primer wurden von der Firma TiBMolBiol, Berlin, synthetisiert. Die Notierung erfolgt in 5'-3'-Richtung; in Klammern sind die jeweiligen Hybridisierungstemperaturen angegeben.

- | | | |
|-------------|-------------------------------|---------|
| ▪ FLAG.for | TGG ACT ACA AGG ACG ACG ACG | (66 °C) |
| ▪ PKN.rev | GCC GCC AAT ATC CGC TTC TCA C | (66 °C) |
| ▪ GAPDH.for | CCC CTT CAT TGA CCT CAA CTA C | (65 °C) |
| ▪ GAPDH.rev | TTG AAG TCG CAG GAG ACA ACC | (65 °C) |
| ▪ Aktin.for | ATT GAC AAT GGC TCC GGC ATG T | (66 °C) |
| ▪ Aktin.rev | AGT GGT CTC ATG GAT ACC ACA | (66 °C) |

2.1.6. Biologische Materialien

Als Versuchstiere wurden NMRI-Auszuchtmäuse verwendet, die von der Firma Harlan-Winkelmann, Borcheln, bezogen wurden. Eph4-Zellen wurden freundlicherweise von Frau Dr. Irene Fialka, Denver, USA, zur Verfügung gestellt.

2.1.7. Ausgewählte Geräte

- Bioanalyzer 2100 (Agilent, Palo Alto, USA)
- CCD-Kamera, gekühlt (Cooke, Tonawanda, USA)
- Diaphot TMD Mikroskop (Nikon, Melville, USA)
- EVOM G Voltohmmeter (World Precision Instruments, New Haven, USA)
- Fluoreszenzfilter (Chroma, Brattleboro, USA)
- Fokussiermotor (Intelligent Imaging Innovations, Denver, USA)
- Geldokumentationssystem (Intas, Göttingen)
- LS 6000 Flüssigszintillationsdetektor (Beckmann Instruments, Fullerton, USA)
- Phosphoscreens (Amersham-Pharmacia, Freiburg)
- Polytron (Bachofer, Reutlingen)
- Storm™ Phosphor Imager (Amersham-Pharmacia, Freiburg)
- T1 Thermocycler (Biometra, Göttingen)
- Trans-Blot Semi-Dry System (Biorad, München)

2.1.8. Ausgewählte Zusatzmaterialien

- Affymetrix Mu74Av2-Microarray-Chips (Affymetrix, Santa Clara, USA)
- BioMax Light-1 Film, 18 X 24 mm (Kodak, Rochester, USA)
- Hybond N Nylonmembran (Amersham-Pharmacia, Freiburg)
- Immun-Blot™ PVDF-Membran (Bio-Rad, München)
- NICK™ Columns (Amersham-Pharmacia, Freiburg)
- Transwell™-Zellkultureinsätze, Durchmesser 12mm, Porengröße 4 μ M (Corning Costar, Cambridge, USA)

2.1.9. Software

- Adobe Photoshop (Adobe Systems, Mountain View, USA)
- Affymetrix Microarray Suite (Affymetrix, Santa Clara, USA)
- GeneSpring (Silicon Genetics, Redwood City, USA)
- GraphPad InStat (GraphPad Software, San Diego, USA)
- Image Quant TL (Molecular Dynamics, Amersham-Pharmacia, Freiburg)
- SlideBook (Intelligent Imaging Innovations, Denver, USA)
- SlideWrite (Advanced Graphics Software, Encinitas, USA)

2.2. Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1. Allgemeine molekularbiologische Methoden

Standardtechniken der Molekularbiologie wie die elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren und Proteinen, Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen und die photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurden wie von Sambrook und Mitarbeitern beschrieben durchgeführt (Sambrook *et al.*, 1989). Die Zusammensetzung häufig verwendeter Pufferlösungen orientierte sich ebenfalls an dieser Referenz.

2.2.1.2. Isolierung von DNA aus Schwanzbiopsien

Die Isolierung von DNA aus Schwanzbiopsien der Versuchstiere erfolgte unter Verwendung des DNeasy™ Tissue Kits, wobei die Anweisungen des Herstellers befolgt wurden.

2.2.1.3. Polymerasenkettenreaktion

Alle PCR-Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von jeweils 25 µl mit einer Magnesiumkonzentration von 5 mmol/l sowie jeweils 50 µmol/l dATP, dTTP, dGTP und dCTP durchgeführt; die Konzentration der verwendeten Primer betrug jeweils 0,4 mmol/l. Jede Reaktion wurde unter Verwendung des vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffers mit 0,5 µl Taq-Polymerase durchgeführt, wobei ohne vorangegangene Konzentrationsbestimmung jeweils 1 µl der DNA-Matrize verwendet wurde. Nach einem initialen Denaturierungsschritt bei 94 °C erfolgten 25-30 Zyklen mit einer jeweils einminütigen Denaturierungsphase bei 94 °C, die von einer jeweils 45 sekundigen Hybridisierungsphase bei der jeweils primerspezifischen Hybridisierungstemperatur und einer einminütigen Extensionsphase bei 72 °C gefolgt waren. Abschließend erfolgte für 10 Minuten eine erneute Inkubation bei 72°C; nach Ende der Reaktion wurden die Proben bis zur elektrophoretischen Auftrennung und Dokumentation bei 4 °C gelagert.

2.2.1.4. Southern Blot Analyse

Zur Southern Blot Analyse erfolgte zunächst der Verdau von jeweils 25 µg genomischer DNA mit 3000 IE des Restriktionsenzym EcoRV für 12 Stunden; im Anschluss daran wurde die verdaute DNA durch Fällung mit Phenol und Chloroform präzipitiert und in 20 µl sterilem destillierten Wasser resuspendiert. Nach elektrophoretischer Auftrennung in einem

0,6 prozentigen Agarosegel erfolgte für zehn Minuten die Gel-Depurinisierung in 250 mM HCl gefolgt von zwei 20minütigen Denaturierungsschritten in 1,5 M NaOH-Lösung. Nach zwei 20 minütigen Inkubationsschritten in Neutralisierungslösung (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl, pH 7,2) erfolgte der DNA-Kapillartransfer auf eine Nylonmembranen; abschließend wurde eine UV-Bestrahlung zur kovalenten Bindung der DNA an die Membran durchgeführt.

Zur Detektion der Transgenintegration wurde das konstitutiv aktive PKN-Fragment als Sonde genutzt und unter Verwendung des Readiprime™ II Labelling-Kits mit $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP markiert sowie mit Hilfe von Sepharose-Säulen (Nick™ Columns) aufgereinigt.

Vor dem Beginn der Hybridisierung wurde die Nylon-Membran bei 65 °C 2 Stunden in Hybridisierungspuffer inkubiert; anschließend erfolgte nach fünfminütiger Denaturierung der radioaktiv markierten Sonde bei 95° und anschließender Lagerung auf Eis die Zugabe zum Hybridisierungspuffer und die Hybridisierung für 12 Stunden bei 65 °C. Abschließend wurde die Nylonmembran drei Mal für jeweils 20 Minuten bei 65 °C in Waschpuffer gewaschen.

Die Detektion der Hybridisierungssignale erfolgte mit Hilfe eines Phosphoscreens nach Exposition der Membran für sechs bis 48 Stunden unter Verwendung eines Storm™ Phosphor Imagers und der Software Image Quant TL.

2.2.1.5. RNA-Isolierung

Zur RNA-Isolierung aus Brustdrüsengewebe wurde zwischen 50 und 100 mg tiefgefrorenes Gewebe mit Hilfe eines Polytron homogenisiert. Anschließend erfolgte die RNA-Isolierung unter Verwendung des Trizol™-Reagenzes, wobei die Empfehlungen des Herstellers befolgt wurden. Alle bei der Arbeit mit RNA verwendeten Lösungen wurden auf Basis autoklavierten destillierten Wassers hergestellt, welches 0,1 % DEPC enthält.

Vor Verwendung in der RT-PCR erfolgte zur Entfernung eventuell kontaminierender genomischer DNA ein Verdau mit RNase-freier DNase, wobei erneut die Anweisungen des Herstellers beachtet wurden. Vor den Microarray-Hybridisierungen wurde die RNA weiterhin mit Hilfe des RNeasy® Kits nach Anweisungen des Herstellers aufgereinigt. Die Integrität der präparierten RNA wurde anschließend mit Hilfe des Bioanalyzer 2100 Systems überprüft und zusätzlich visuell nach elektrophoretischer Auftrennung im Formaldehyd-Agarosegel kontrolliert. Abweichend hiervon wurde für die RNA-Isolierung aus kultivierten EpH4-Zellen das RNeasy™ Kit verwendet, wobei die Anweisungen des Herstellers befolgt wurden.

2.2.1.6. Northern Blot Analyse

Für allen Northern Blot Analysen wurden zunächst jeweils 20 µg RNA elektrophoretisch bei 50 Volt für 5 Stunden aufgetrennt. Hierfür wurden Gele verwendet, die 1 % Agarose und 18 % Formaldehyd enthielten und in MOPS-Puffer hergestellt wurden. Als Laufpuffer wurde MOPS-Puffer unter Zusatz von 18 % Formaldehyd eingesetzt.

Die RNA Proben wurden vor der Auftrennung für 5 Minuten bei 65°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Nach Abschluss der elektrophoretischen Auftrennung erfolgte der Kapillartransfer auf Nylon-Membranen mit anschließender Fixierung durch UV-Bestrahlung. Die radioaktive Hybridisierung und Detektion der Signale erfolgte dann analog zur beschriebenen Southern Blot Hybridisierung.

2.2.1.7. RT-PCR

Zur cDNA-Synthese wurde das SuperscriptTMII-System gemäß Anweisungen des Herstellers genutzt. Zum Schutz vor Degradierung wurde den einzelnen Reaktionsansätzen dabei ein rekombinanter RNase-Inhibitor (RNasinTM) zugesetzt. Der Nachweis spezifischer Transkripte erfolgte dann in einem zweiten Schritt durch eine Polymerasekettenreaktion wie oben beschrieben. Eine erfolgreiche cDNA-Synthese wurde dabei durch Nachweis der ubiquitär exprimierten murinen β -Aktin- oder GAPDH-Transkripte überprüft; zum Ausschluss einer DNA-Kontamination erfolgte ebenfalls eine PCR von Proben, denen während der initialen cDNA-Synthese keine reverse Transkriptase zugesetzt wurde.

2.2.1.8. Microarray-Hybridisierungen

Die Durchführung der Microarray-Hybridisierungen auf Mu74Av2-Chips erfolgte durch die *Microarray core facility* des *University of Colorado Health Sciences Center*, Denver. Alle RNA-Extrakte wurden vor Verwendung in Microarray-Experimenten mit Hilfe des Bioanalyser 2100 Systems auf Integrität getestet und quantifiziert. Als Qualitätskontrollen wurden neben einer visuellen Beurteilung in allen Experimenten Hybridisierungskontrollen mitgeführt, die innerhalb eines bekannten Standardmusters mit spezifischen Sequenzen des verwendeten Chips reagieren. Nach Auslesen der Daten mit Hilfe der Software Affymetrix Microarray SuiteTM wurde die Rohdaten in die Software GeneSpringTM importiert und weiterführend analysiert.

2.2.1.9. Immunpräzipitation und Western Blot

Die Immunpräzipitation der konstitutiv aktiven Proteinkinase N erfolgte aus Proteinextrakten tiefgefrorenen Brustdrüsengewebes, das zunächst in einem in flüssigem Stickstoff gekühlten

Mörser zermahlen wurde. Anschließend erfolgte die Proteinextraktion durch eine einstündige Inkubation in TSA-Puffer bei 4 °C unter Zusatz von 0,5 Volumenprozent Triton X-100 sowie 1 mM PMSF. Zur Konservierung der Proteine wurde dem Extraktionspuffer ebenfalls eine Mischung weiterer Proteaseinhibitoren zugesetzt (Complete™ Protease Inhibitor Cocktail, 1 Tablette/50 ml). Nach Abschluss der Inkubation erfolgte eine 30minütige Zentrifugation bei 10000 g und die Abnahme des Überstands, dem 25 µl/ml des anti-FLAG M2-Affinitätsgels zugesetzt wurde, woran sich eine einstündige Inkubation bei 4 °C unter langsamer Rotation anschloss. Das Waschen der Sepharose-Partikel erfolgte dann zweimalig in TSA-Puffer unter Zusatz von 0,1 % Triton X-100 mit nachfolgender Abtrennung durch einminütige Zentrifugation bei 200 g. Nach zwei weiteren Waschschritten in TSA und einer 50 millimolaren Tris-HCl-Lösung (pH 6,8) wurde das Präzipitat in SDS-PAGE-Auftragspuffer gelöst, fünf Minuten bei 95 °C gekocht und durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt.

Zum Proteintransfer auf eine PVDF-Membran wurde das Trans-Blot Semi-Dry System nach Anweisungen des Herstellers verwendet; der erfolgreiche Proteintransfer wurde anschließend durch Färbung der Membran mit Ponceau-Rot überprüft.

Anschließend erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit einer fünfprozentigen Milchpulverlösung in TBST-Puffer für eine Stunde sowie die Inkubation mit einem polyklonalen Kaninchenantikörper gegen den C-Terminus der humanen Proteinkinase N (1 µg/ml in TBST). Nach drei zehninütigen Waschschritten in TBST wurde die Membran schließlich für 45 Minuten mit einem Ziegen-Sekundärantikörper gegen Kaninchen IgG (1:1000 in TBST) inkubiert und mehrfach in TBST gewaschen. Die Detektion erfolgte mit einem ECL-System nach Anweisungen des Herstellers.

2.2.2. Tierexperimentelle Methoden

2.2.2.1. Tierhaltung und Gewebeentnahme

Die Haltung der Versuchstiere erfolgte in der tierexperimentellen Einrichtung des Instituts für Pharmakologie der Charité, Campus Mitte, sowie im *Center for Laboratory Animal Care* des *University of Colorado Health Sciences Center*, Denver, USA, unter Standardbedingungen. Alle Experimente unter Verwendung von Versuchstieren wurden durch das Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin bzw. durch das *Internal Animal Care and Use Committee* der *University of Colorado* genehmigt. Die Tötung der Versuchstiere erfolgte durch zervikale Dislokation bzw. durch CO₂-Inhalation; anschließend erfolgte umgehend die Gewebeentnahme und die Fixierung in Formalin zur Anfertigung von

Paraffinschnitten. Gewebe für die RNA- und Proteinanalyse wurde sofort nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur weiteren Analyse bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert; die Fixierung für die elektronenmikroskopische Analyse erfolgte nach zunächst 12 stündiger Inkubation in 2 prozentiger Paraformaldehydlösung in Natriumcacodylatpuffer. Gewebe zur Anfertigung von Ganzorganpräparaten wurden umgehend nach Entnahme auf einen Objektträger aufgezogen.

2.2.2.2. Intraduktale Injektion

Zur Beurteilung der tight junction Permeabilität *in vivo* erfolgte die Injektion radioaktiv markierter Saccharose in den Milchgang der Versuchstiere am ersten Tag *post partum*. Hierzu wurden Glaskapillaren mit einem Durchmesser zwischen 60 und 75 μm verwendet, die durch Ausziehen von Glas-Mikropipetten über einem Bunsenbrenner und anschließender Nachbearbeitung an einer Mikroschmiede gewonnen wurden. Nach Anästhesierung durch intraperitoneale Injektion von 2-2-2-Tribromethanol in einer Dosierung zwischen 0,45 und 0,75 mg/g Körpergewicht erfolgte die Lagerung der Versuchstiere unter einem Operationsmikroskop und das Aufsuchen der äußeren Öffnung des Milchgangs sowie dessen Fixierung unter Verwendung einer Pinzette. Nach Einführen der Glaskapillare mit Hilfe eines Mikromanipulators wurden dann 40 μl einer Lösung ^{14}C -markierter Saccharose entsprechend einer Gesamtradioaktivität von 37 kBq in den Milchgang injiziert. Fünf Minuten nach Ende der Injektion erfolgte eine Blutentnahme aus der Schwanzvene und die Bestimmung der radioaktiven Zählausbeute mit Hilfe eines Flüssig-Szintillationsdetektors.

2.2.3. Histologische Methoden

2.2.3.1. Paraffineinbettung, HE-Färbung und Elektronenmikroskopie

Die Gewebeeinbettung in Paraffin sowie die Anfertigung von Paraffinschnitten mit nachfolgender HE-Färbung erfolgte durch die histologische Einrichtung des Instituts für Pathologie der Universitätsmedizin Berlin, Campus Mitte, bzw. das Department of Pathology des University of Colorado Health Sciences Center, Denver, USA. Für die immunhistochemischen Analysen sowie *in situ*-Hybridisierungen und TUNEL-Assays wurden eigenständig Schnitte paraffineingebetteten Gewebes mit einer Dicke von 5 μm angefertigt. Die Anfertigung elektronenmikroskopischer Aufnahmen erfolgte im Rahmen einer Kooperation durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Prof. Dr. S. Bachmann des Instituts für Anatomie der Charité Universitätsmedizin, Berlin.

2.2.3.2. Ganzorganpräparate

Auf Objektträger aufgezoogene Brustdrüsen wurden nach kurzem Antrocknen zunächst für mindestens eine Stunde in einer Lösung aus 60 % Ethanol, 30 % Chloroform und 10 % Essigsäure fixiert und anschließend 15 Minuten in 70 % Ethanol inkubiert. Nach fünf jeweils zweiminütigen Waschschritten in destilliertem Wasser erfolgte für 12 Stunden die Färbung in einer wässrigen Karminrot-Lösung. Diese wurde durch zwanzigminütiges Kochen von 2,5 g AlKSO_4 in 500 ml destillierten Wassers mit nachfolgendem Volumenausgleich auf erneut 500 ml sowie Zugabe eines Thymol-Kristalls hergestellt und lichtgeschützt bei 4 °C gelagert. Nach Abschluss der Färbung wurden die Präparate durch sukzessive Inkubation in 70 % und 96 % Ethanol entwässert und in Xylolersatz (Rotihistol®) entfettet und bis zur photographischen Dokumentation gelagert.

2.2.3.3. *In situ* Hybridisierung

Alle *in situ* Hybridisierungen wurden auf 5 µm dicken Paraffinschnitten formalinfixierten Gewebes durchgeführt. Diese Schnitte wurden zunächst für drei mal zehn Minuten in Xylol entparaffiniert und anschließend zur Entfernung des Xylols zwei Mal fünf Minuten in 100 % Ethanol gewaschen. Die Rehydrierung erfolgte durch jeweils einminütige Inkubation in Alkohollösungen absteigender Konzentration (95%, 90%, 80%, 70%, 50%, 30%), gefolgt von zwei jeweils 5 minütigen Waschschritten in PBS. Zur Nachfixierung wurden die Schnitte für 30 Minuten in einer 4 prozentigen Paraformaldehydlösung inkubiert und dann zwei Mal für jeweils 5 Minuten in PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Permeabilisierung des Gewebes durch eine zehnminütige Proteinase K-Behandlung (10 µg/ml in 20 mM Tris-HCl-Lösung unter Zusatz von 1 mmol/l EDTA, pH 7,2). Nach einem weiteren Waschschriff in PBS wurden die Schnitte ein zweites Mal nachfixiert, gewaschen, zweimalig jeweils zwei Minuten in 2 X SSC und schließlich für 30 Minuten in Tris-Glycin-Puffer inkubiert.

Zur Herstellung der transgenspezifischen SV-40-Sonden wurde der Vektor pBSK/SV40pA (Stuckas, 2003) mit den Restriktionsendonukleasen NotI (*sense*-Sonde) bzw. HindIII (*antisense*-Sonde) über Nacht linearisiert. Die Synthese digoxigenin-markierter Transkripte erfolgte dann mit dem *Digoxigenin RNA Labeling Kit* nach Anweisungen des Herstellers, wobei die RNA-Polymerasen T7 (*sense*) bzw T3 (*antisense*-Sonde) genutzt wurden. Nach Abschluss der *in-vitro*-Transkription und Fällung der Sonden mit 4 M LiCl erfolgte zur Verbesserung der Diffusion die alkalische Hydrolyse der Sonden durch 45 minütige Inkubation in Hydrolysepuffer A (10 mM DTT; 80 mM NaHCO_3 , 120 mM Na_2CO_3) bei 60°C, die durch Zugabe einer äquivalenten Menge Hydrolysepuffer B (10 mM DTT, 1 % Eisessig, 200 mM Natriumazetat) beendet wurde.

Abschließend erfolgte die erneute Lithiumchlorid-Fällung und Überprüfung der Sondenintegrität durch Elektrophorese im Agarosegel.

Vor Beginn der Hybridisierungsreaktion erfolgte eine mindestens vierstündige Prähybridisierung der Schnitte im Hybridisierungspuffer (50 % Formamid, 5 X SSC, 5 X Denhardts Reagenz, 200 µg/ml Hefe-tRNA, 100 µg/ml gescherte Heringssperma-DNA); nach Zugabe der entsprechenden Sonden in einer Konzentration von 375 ng/ml und Hitzedenaturierung erfolgte dann für 12 Stunden die Hybridisierung bei 72 °C.

Nach mehrfachem Spülen der Schnitte in 5 X SSC erfolgte eine fünfzehnminütige Waschphase in 5 X SSC bei 72 °C sowie ein einstündiger RNase Verdau unspezifisch gebundener RNA bei 37 °C (40 µg/ml RNase in einer Lösung aus 0,5 M NaCl, 10 mM Tris (pH 8,0), 1 mM EDTA und 10 mM DTT). Abschließend wurden die Schnitte erneut mehrfach in 5 X SSC gespült und bei 72 °C für eine Stunde in 0,2 X SSC stringent gewaschen.

Zur immunologischen Detektion der Hybridisierungssignale wurden die Gewebeschnitte zunächst für 5 Minuten in Puffer 1 (0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, pH 7,5) gespült; anschließend erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen durch einstündige Inkubation in Puffer 2 (1% Blockierungsreagenz gelöst in 0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, pH 7,5). Nach Applikation eines an alkalische Phosphatase gebundenen anti-Digoxigenin-Antikörpers (1:5000 in Puffer 2) für eine Stunde und zweimaligem 30 minütigem Waschen in Puffer 1 wurden die Schnitte für fünf Minuten in Puffer 3 (0,1 M Tris-HCl, pH 9,5, 0,1 M NaCl, 5 mM MgCl) äquilibriert; anschließend erfolgte unter Luftabschluss eine Farbreaktion unter Nutzung des chromogenen alkalische Phosphatase-Substrats NBT/X-Phosphat.

Nach Abschluss der Reaktion wurden die Gewebeschnitte in TE-Puffer gewaschen und zur Fotodokumentation in Hydromount™ eingebettet.

2.2.3.4. Immunhistochemie

Die immunhistochemische Darstellung des Milchproteins β -Caseins erfolgte an 5 µm dicken Paraffinschnitten formalinfixierten Gewebes. Die Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte erfolgte wie für die *in situ* Hybridisierung beschrieben; anschließend wurden die Antigene durch eine 20minütige Mikrowellenbehandlung bei 750 Watt in 10 mM Natriumzitat, pH 6,0, demaskiert. Nach drei jeweils fünfminütigen Waschschritten in Wasser und einem weiteren fünfminütigen Waschschriff in PBS wurden unspezifische Antikörperbindungsstellen durch Inkubation in PBS unter Zusatz von 5 % Ziegen Serum für 4 Stunden blockiert; anschließend erfolgte die Inkubation mit einem von Frau Prof. Margaret Neville, Denver, USA, zur Verfügung gestellten polyklonalen Kaninchenantikörper gegen das murine β -Casein-Protein

in einer Verdünnung von 1:100 in PBST, wobei die Antigen-Antikörper-Reaktion bei 4 °C über Nacht durchgeführt wurde. Nach drei zehnminütigen Waschschrritten in PBS wurden die Gewebeschnitte für 45 Minuten mit einem Cy3-konjugierten Ziegen-Sekundärantikörper gegen Kaninchen-IgG inkubiert, dem zur Visualisierung der Zellkerne DAPI in einer Konzentration von 0,6 µg/ml zugesetzt wurde. Weiterhin wurde zur Markierung der alveolären Lumina Weizenkeimagglutinin eingesetzt, das an das grüne Fluorophor Oregon Green 488 gekoppelt war. Nach fünf fünfminütigen Waschschrritten in PBS wurden die Gewebeschnitte mit Hilfe des ProLong™ *antifade* Kits eingebettet und bis zur Fotodokumentation unter Lichtabschluss bei 4 °C gelagert.

Die Dokumentation der immunhistochemischen Ergebnisse erfolgte mit einem Nikon Diaphot TMD Mikroskop, welches mit einer Xenon-Lampe, Fluoreszenzfiltern und einer gekühlten CCD-Kamera sowie einem elektronisch steuerbarem Fokussier-Motor ausgerüstet war. Zur Dokumentation und Bildbearbeitung wurde die Software Slide Book sowie der integrierte *no neighbors* Algorithmus zur elektronischen Dekonvolution verwendet.

Abweichend hiervon erfolgte die immunhistochemische Darstellung des tight junction assoziierten Proteins ZO-1 an 10 µM dicken Gefrierschnitten tiefgefrorenen Brustdrüsengewebes. Hier war eine Mikrowellenbehandlung zur Antigenmaskierung nicht notwendig; alle weiteren Schritte wurden analog zur Methodik für Paraffinschnitte durchgeführt.

2.2.4. Zellkulturtechniken

2.2.4.1. Allgemeine Zellkulturtechniken

EpH4-Zellen wurden in DMEM mit einer Glukosekonzentration von 4,5 g/l unter Zusatz von 5 % fötalem Kälberserum, 1 % Penicillin/Streptomycin und HEPES in einer Endkonzentration von 10 mmol/l bei 37 °C in einer fünfprozentigen CO₂-Atmosphäre kultiviert und nach Erreichen der Konfluenz etwa alle vier Tage passagiert. Zur Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands erfolgte die Kultivierung auf Transwell™-Zellkultureinsätzen; für einige immunhistochemische Experimente wurden EpH4-Zellen weiterhin auf beschichteten Deckgläsern in Zellkulturschalen kultiviert. Die tight junction Versiegelung wurde durch Supplementierung des Kulturmediums mit 5 µmol/l Hydrokortison induziert.

2.2.4.2. Transfektion

Zur Transfektion von EpH4-Zellen mit den Vektoren pRC/RSV und pRC/RSV-PKN (beide freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Yasuhiro Ohashi, Osaka) wurde das Lipofectamin™ plus-System nach Anweisungen des Herstellers verwendet. Zur Selektion stabil transfizierter Zellen erfolgte der Zusatz des Neomycin-Analogons G418 zum Kulturmedium in einer Konzentration von 300 µg/ml, die zum Absterben nicht-transfizierter Kontrollzellen innerhalb von 10 Tagen führte.

2.2.4.3. Messung des transepithelialen Widerstands

Die Messung des transepithelialen Widerstands erfolgte mit speziellen Stabelektroden und einem Voltohmmeter, wobei die Anweisungen des Herstellers befolgt wurden. Um Verfälschungen der Messwerte durch kurzfristige Temperaturschwankungen zu minimieren, wurden vor Beginn der Messung auf Transwell™-Zellkultureinsätzen kultivierte EpH4-Zellen für 20 Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt. Zur Ermittlung der transepithelialen Widerstände wurde bei allen Messungen der Widerstand, der über einem leeren Transwell™-Zellkultureinsatz ermittelt wurde, von den ermittelten Messwerten subtrahiert; die Angabe der Widerstände erfolgte dann jeweils in $\Omega \cdot \text{cm}^2$ Filtergrundfläche.

2.2.4.4. Immunfluoreszenz

Auf Deckgläsern oder in Transwell™-Zellkultureinsätzen kultivierte EpH4-Zellen wurden einmalig mit PBS gewaschen und anschließend für 10 Minuten in zweiprozentigem Paraformaldehyd fixiert. Nach drei zehnmütigen Waschschritten in PBS erfolgte für fünf Minuten die Permeabilisierung mit 2% Triton X-100 in PBS, gefolgt von einem weiteren Waschschriff in PBS. Nach Blockierung mit einer einprozentigen BSA-Lösung in PBS erfolgte die zweistündige Inkubation mit dem Primärantikörper bei Raumtemperatur; wobei jeweils eine 1:100 Verdünnung genutzt wurde. Nach drei fünfminütigen Waschschriffen in PBS erfolgte für 45 Minuten die Inkubation mit einem geeigneten fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:150, wobei die Sekundärantikörperlösung zur Kernfärbung zusätzlich mit DAPI in einer Konzentration von 0,6 µg/ml versetzt wurde. Nach 5 Waschschriffen in PBS erfolgten Einbettung, Lagerung und Dokumentation wie im Abschnitt 2.2.3.4. beschrieben.

2.3. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der GraphPad InStat-Software. Hierbei wurde für Datensätze, die gemäß dem Algorithmus nach Kolmogorov und Smirnov eine Normalverteilung zeigten, zur Ermittlung des Signifikanzniveaus ein zweiseitiger t-Test eingesetzt, der im Falle signifikant voneinander verschiedener Standardabweichungen durch den Korrekturalgorithmus nach Welch ergänzt wurde. Der Vergleich relativer Häufigkeiten erfolgte analog nach Arcus-Sinus-Transformation der Messwerte (Sachs, 2004). Datensätze, für die aufgrund zu geringer Größe keine Normalverteilung angenommen werden konnte, wurden mit Hilfe des nicht-parametrischen Mann-Whitney-Tests verglichen. Als Grenzwert für statistische Signifikanz wurde in jedem Fall ein p-Wert $<0,05$ gewählt.