

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Geräte

Agarosegel Elektrophorese Kammern	Biorad, München, Deutschland
Brutschrank	Heraeus, Berlin, Deutschland
Calculator Gene Quant II	Pharmacia Biotech, San Francisco, USA
Fluoreszenz-Imager FLA 3000	Fuji, Japan
GeneAmp PCR System 2400	Perkin Elmer, Weiterstadt, Deutschland
Heizblock	Grant, Berlin, Deutschland
Hybridisierungsöfen	Biometra OV5, Göttingen, Deutschland
Impedanz-Messgerät	D. Sorgenfrei, Berlin, Deutschland
Inkubator 1000, Uni max 1010	Heidolph
Luminometer LB9507	Berthold, Wildbad, Deutschland
Luminiszenzbild Analysator (LAS 1000)	Fuji, Japan
Power pac 300	Biorad, München, Deutschland
Speed Vac Uniequip	MS Laborgeräte, Heidelberg, Deutschland
Sequenziergerät ABI310	Perkin Elmer, Langen, Deutschland
Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Transilluminator (Quickstore)	MS Laborgeräte, Heidelberg, Deutschland
UV Crosslinker	Hoefer, Pharmacia, San Francisco, USA
Wasserbad SW21, TWB5	Julabo, Schilbach, Deutschland
Wippe WT12	Biometra
Zentrifuge Hermle Z233MK	Wehingen, Deutschland
Zentrifuge Eppendorf 5414 C	Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Beckman AvantiJ25	Palo Alto, CA, USA

3.1.2. Chemikalien

Advantage 2 Polymerase Mix	Clontech, Palo Alto, CA, USA
Agarose	Gibco BRL, Paisley, Scotland
Alkalische Phosphatase (CIP)	NEB, Frankfurt, Deutschland
Ampicillin	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
AmpliAq	Perkin Elmer, Weiterstadt, Deutschland
Anti Dioxigenin Alkalische Phosphatase	Boehringer, Mannheim, Deutschland
Bacto Agar	Difco, Frankreich
BigDye Terminator Sequencing Kit	PE Applied Biosystems, Foster City, USA
Bromphenolblau	LKB, Pharmacia, Schweden
BSA (100 x)	NEB, Frankfurt, Deutschland
CDP Star	Roche, Mannheim, Deutschland
Chloroform	Roth, Karlsruhe, Deutschland
dATP, dTTP, dCTP, dGTP	Perkin Elmer, Weiterstadt, Deutschland
Dimethylformamid	Merck, Darmstadt, Deutschland
DMSO	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
DTT	Sigma, Taufkirchen, Deutschland

Dual Luciferase Kit	Promega, Madison, USA
EDTA	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	J.T.Backer, Deventer, Holland
FKS	Biochrom, Berlin, Deutschland
Genome Walking Kit	Clontech, Palo alto, CA, USA
Glycerol	Serva, Heidelberg, Deutschland
Herring sperm DNA	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
High Pure Kit	Boehringer, Mannheim, Deutschland
Interferon γ	Peptrotech/Tebu, Berlin, Deutschland
IPTG	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Isopropanol	J.T. Backer, Deventer, Holland
Kanamycin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Klenow-Enzym	Promega, Mannheim, Deutschland
Ligations-Puffer	NEB, Frankfurt, Deutschland
Lipofectamin-Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Maleinsäure-Puffer	Boehringer, Mannheim, Deutschland
Molekulargewicht Standard λ /HindIII	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Molekulargewicht Standard 100 bp	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Molekulargewicht Standard LMDM	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Molekulargewicht Standard VII-DIG	Roche, Mannheim, Deutschland
Molekulargewicht Standard VII	Roche, Mannheim, Deutschland
Natronlauge	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Serva, Heidelberg, Deutschland
α - ³² P-dCTP (10 μ Ci/ μ l)	Amersham, Freiburg, Deutschland
PCR Puffer II	Perkin Elmer, Weiterstadt, Deutschland
Plus Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Random Prime Kit	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Restriktionsendonukleasen:	NEB, Frankfurt, Deutschland

Name	Erkennungssequenz
<i>Bam</i> H1	5' C/GATCC3' 3' CCTAG/G5'
<i>Bbs</i> I	5' GAAGAC (N2) / 3' 3' /CTTCTG (N6) 5'
<i>Bst</i> EII	5' G/GTNACC3' 3' CCANTG/G5'
<i>Dra</i> I	5' TTT/AAA3' 3' AAA/TTT5'
<i>Eco</i> RI	5' G/AATTC3' 3' CTAA/G5'
<i>Eco</i> RV	5' GAT/ATC3' 3' CTA/TAG5'
<i>Hind</i> III	5' A/AGCTT3' 3' TTCGA/A5'

<i>NcoI</i>	5' C/CATGG3' 3' GGTAC/C5'
<i>NheI</i>	5' G/CTAGC3' 3' CGATC/G5'
<i>NotI</i>	5' GC/GGCCGC3' 3' CGCCGG/CG5'
<i>PstI</i>	5' CTGCA/G3' 3' G/ACGTC5'
<i>PvuII</i>	5' CAG/ATG3' 3' GTC/TAC5'
<i>SacI</i>	5' GAGCT/C3' 3' C/TCGAG5'
<i>SalI</i>	5' G/TCGAC3' 3' CAGCT/G5'
<i>SalI</i>	5' AGT/ACT3' 3' TCA/TGA5'
<i>SgrAI</i>	5' CPuCCGGPyG/3' 3' GPyGGCC/PuC5'
<i>SmaI</i>	5' CCC/GGG3' 3' GGG/CCC5'
<i>SpeI</i>	5' A/CTAGT3' 3' TGATC/A5'
<i>StyI</i>	5' C/CAAGG3' 3' GGTTC/C5'
<i>SspI</i>	5' AAT/ATT3' 3' TTA/TAA5'
<i>XbaI</i>	5' T/CTAGA3' 3' AGATC/T5'
<i>XhoI</i>	5' C/TCGAG3' 3' GAGCT/C5'

Qiagen Plasmid Midi Kit (E)

Qiagen Plasmid Mini Kit

QIA Quick Gelextraktionskit 50

RPMI 1640

RNAzol

Salzsäure

SOC

SSC 20 x

Sucrose

TAE 50 x

T4 DNA Ligase

Tris

Triton X 100

Tumornekrosefaktor α

Tryptone Water

TSR-Lösung

Wasser

X-Gal

Primer

Qiagen, Hilden, Deutschland

Qiagen, Hilden, Deutschland

Qiagen, Hilden, Deutschland

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

WAK-Chemie, Steinbach, Deutschland

Merck, Darmstadt, Deutschland

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Serva, Heidelberg, Deutschland

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

NEB, Frankfurt, Deutschland

Merck, Darmstadt, Deutschland

Boehringer, Mannheim, Deutschland

Peprotech/Tebu, Berlin, Deutschland

Fluka, Steinheim, Schweiz

Applied Biosystems, Fostercity, CA, USA

Fluka, Steinheim, Schweiz

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Metabion, Martinsried, Deutschland

Nr.	Primer	Sequenz 5'-3'
1	AP1	GTAATACGACTCACTATAGGGC
2	AP2	ACTATAGGGCACGCGTGGT
3	hum CLDN1E	GAGCAACCTCAGCTTCTAGT
4	hum CLDN1C	ATGGATCGGCGCCATCGTCAGCA
5	hum CLDN1H	GAGGGAAACTACAGTCCCAGC
6	hum CLDN2A	AGCACAGGCATCACCCAGTG
7	hum CLDN2B	TCCAAGGGCCTCTGGATGG
8	mm CLDN3FOR	CCTCATCGTGGTGTCCAT
9	mm CLDN3REV	GGAGATGGGAGCTGGGTT
10	hum CLDN3G	ACTGGAGGGAGAGCTGGAGAGGAA
11	hum CLDN3H	GCGGGCGGCGACTG
12	hum CLDN3I	GGAGAGGAATTTGAGCTTAGTTAG
13	hum CLDN3K	GCCCTGCCTCCCACCTTCACC
14	hum CLDN3L	GAGAGGAATTTGAGCTTAGTTAGG
15	hum CLDN3M	GCTGGGGCCGGTGCCTTAG
16	hum CLDN4A	GATCATGGTCTTGGCCTTG
17	hum CLDN4B	CCACGATGATGCTGATGA
18	hum CLDN4 CPE-REV6	CTTGAATCCTACGGCCCCACAG
19	hum CLDN4 CPE-REV5	CTCTGCGAACGTTAAGTCCGTCCCC
20	T 7	GTAATACGACTCACTATAGGGC
21	GEM REV	TACTCAAGCTATGCATCCAACG
22	PGL3FOR	CTAGCAAATAGGCTGTCCC
23	PGL3REV	CTTTATGTTTTTGGCGTCTTCC
24	M13FOR	ACTGGCCGTCGTTTTAC
25	M13REV	AACAGCTATGACCATG

3.1.3. Materialien

Filme

Millicell-HA-Filter, 12 mm, 0,45 µm
 Hybridisierungs-Röhrchen
 15 ml PPN-Röhrchen
 50 ml PPN-Röhrchen
 Luminimeter-Röhrchen
 Mikrotiterplatte 96 Loch
 Nick-Säule
 Nylon-Membran
 Pipetten
 Reaktionsgefäße
 Reaktionsröhrchen (PCR)
 Sequenzier-Röhrchen mit Septum
 Standardtips 20, 10, 1000 µl
 Zellkulturflaschen 25 cm²
 Zell- und Gewebekulturschalen, 6 cm
 Zell-Schaber

Kodak-Company, Rochester USA

Millipore, Eschborn, Deutschland
 Biometra, Göttingen, Deutschland
 Greiner, Frickenhausen, Deutschland
 Nunc, Wiesbaden, Deutschland
 Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
 Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
 Amersham, Uppsala, Schweden
 Boehringer, Mannheim, Deutschland
 Eppendorf, Hamburg, Deutschland
 Plastibrand, Wertheim, Deutschland
 Perkin Elmer, Fostercity, CA, USA
 Applied Biosystems, Fostercity, CA, USA
 Eppendorf, Hamburg, Deutschland
 Nunc, Wiesbaden, Deutschland
 Nunc, Wiesbaden, Deutschland
 Coster, Bodenheim, Deutschland

3.1.4. Zelllinien

<i>E. coli</i> JM-109	Promega, Mannheim, Deutschland
<i>E. coli</i> DH5- α	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
<i>E. coli</i> TOP10F'	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
humane Colocarcinom-Zelllinie HT-29/B6	ATCC HTB-38, Subklon B6

3.1.5. Puffer und Lösungen

EtBr-Lösung:

10 mg	Ethidiumbromid
1 ml	H ₂ O

6xDNA Probenpuffer:

40 %	Sucrose
0,25 %	Bromphenolblau
5 mM	EDTA pH 8,0

1 x TAE :

40 mM	Tris-Acetat pH 8,3
1 mM	EDTA

20xSSC:

175 g	NaCl
88,2 g	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O
800 ml	H ₂ O
	ad pH 7,0-7,5 mit Zitronensäure _{konz.}
	ad 1 l mit H ₂ O

Maleinsäure-Puffer:

0,1 M	Maleinsäure
0,15 M	NaCl
	ad pH7,5 mit NaOH

Blockierungslösung:

15 ml	Blockierungsstammlösung
135 ml	Maleinsäurepuffer

Antikörper-Lösung:

5 μ l	Anti-Digoxigenin-AP (Boehringer #1093274, vorher 1 Minute bei 13000 rpm zentrifugieren)
50 ml	Blockierungslösung

Detektionpuffer:

0,1 M	Tris-Cl pH9,5
0,1 M	NaCl

Detektionslösung:

1	Vol	CDPstar (Boehringer#1759051)
99	Vol	Detektionspuffer

Waschpuffer:

997	ml	Maleinsäurepuffer
3	ml	Tween 20

Blockierungsstammlösung:

10	%	(w/v) Blockierungsreagenz in Maleinsäurepuffer
----	---	---

10x T4 DNA Ligasepuffer:

200	mM	Tris·Cl (pH7,6)
50	mM	MgCl ₂
50	mM	Dithiothreitol
500	µg/ml	BSA (optional)
5	mM	ATP

SOC:

100	ml	SOB (ohne MgSO ₄)
2	ml	1M Glukose

X-gal-Lösung:

20	mg	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactosid
1	ml	Dimethylformamid

1 M Glukose :

18	g	Glukose
90	ml	Wasser
ad 100 ml H ₂ O steril filtrieren		

IPTG-Lösung:

1	g	Isopropylthio-β-galactosid
---	---	----------------------------

Puffer P1 (Resuspensionspuffer):

50	mM	Tris·Cl, pH 8,0
10	mM	EDTA
100	µg/ml	RNase A

Puffer P2 (Lysepuffer):

200	mM	NaoH
1	%	SDS

Puffer P3 (Neutralisationspuffer)

3,0	M	K(OAc)pH 5,5
-----	---	--------------

Puffer QBT(Equilibrierungspuffer):

750	mM	NaCl
50	mM	Mops pH 7,0
15	%	Isopropanol
0,15	%	Triton X-100

Puffer QC (Waschpuffer):

1,0	M	NaCl
50	mM	Mops, pH 7,0
15	%	Isopropanol

Puffer QN (Elutionspuffer):

1,6	M	NaCl
50	mM	Mops, pH 7,0
15	%	Isopropanol

TE-Puffer:

10	mM	Tris·Cl, pH7,6
1	ml	EDTA, pH8,0

1M Tris-HCl, pH7,6:

121,1	g	Tris
800	ml	H ₂ O
60	ml	HCl

Lösung auf Raumtemperatur abkühlen lassen
ad pH 7,6 mit HCl
ad 1l H₂O
autoklavieren

0,5M EDTA, pH8.0:

186,1	g	Na ₂ EDTA·2H ₂ O
800	ml	H ₂ O

gut rühren
ad pH 8,0 mit NaOH (Pellets, ca. 20g)
ad 1 l H₂O
autoklavieren

PBS:

8	g	NaCl
0,2	g	KCl
1,44	g	Na ₂ Hpo ₄
0,24	g	KH ₂ po ₄
800	ml	H ₂ O

pH 7,4 mit HCl
ad 1 l H₂O

LB-medium, flüssig:

10	g/l	Bacto-Trypton
5	g/l	Bacto-Yeast extract
10	g/l	NaCl
100	µg/ml	Ampicillin

Die Zugabe von Ampicillin oder Kanamycin erfolgt nach dem Autoklavieren, wenn das Medium auf unter 55°C abgekühlt ist.

LB-medium, fest:

10	g/l	Bacto-Trypton
5	g/l	Bacto-Yeast extract
10	g/l	NaCl
		Agar
100	µg/ml	Ampicillin

Die Zugabe von Ampicillin oder Kanamycin erfolgt nach dem Autoklavieren, wenn das Medium auf unter 55°C abgekühlt ist.

Dual-Luciferase Reporter Assay System:

10	ml	Luciferase Assay Puffer II
1	vial	Luciferase Assay Substrat (Lyophilisiert)
10	ml	Stop und Glo Puffer
1	vial	Stop und Glo Substrat (Trocken)
250	µl	Stop und Glo Substrat Flüssig
30	ml	5X Passiv Lyse Puffer

3.2. Molekularbiologische Methoden**3.2.1. Genome Walking**

Beim Genome Walking wird genomische DNA zur Identifizierung von Promotoren unter Verwendung von Oligonukleotid-Primern amplifiziert. Dabei wird auf der einen Seite ein genspezifischer Primer verwendet, der aus der bekannten cDNA-Sequenz abgeleitet wird. Auf der anderen Seite wird ein Primer verwendet, der an einen Adaptor bindet, welcher an die Enden genomischer DNA-Fragmente ligiert ist. Das Genome Walking wurde hier mit Hilfe eines Kits der Fa. Clontech durchgeführt. Die humane genomische DNA ist in diesem Kit bereits mit fünf verschiedenen Restriktionsendonukleasen geschnitten (*EcoRV*, *Scal*, *DraI*, *PvuII*, *SspI*) und mit den Adaptorsequenzen ligiert:

Adaptorsequenz



Die humane genomische DNA wurde zweimal mittels PCR amplifiziert. Die erste PCR-Amplifikation erfolgte mit einem adaptorspezifischen und einem genspezifischen Primer.

1. PCR-Ansatz :

37,8	μl	Wasser
5	μl	10x Tth PCR Reaktionspuffer
2,2	μl	25 mM Mg(OAc) ₂
1	μl	10 mM dNTP
1	μl	adaptorspezifischer Primer (AP1, 10 μM)
1	μl	genspezifischer Primer (10 μM)
1	μl	50x Advantage Genomic Polymerase Mix
1	μl	humane genomische DNA

PCR-Programm:

7x:	94 °C	2 Sekunden
	72 °C	3 Minuten
32x:	94 °C	2 Sekunden
	67 °C	3 Minuten
	67 °C	4 Minuten
	4 °C	∞

Jeweils 5 μl der PCR-Produkte wurden auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen. Um die Spezifität der PCR-Amplifikation zu erhöhen, wurde mit einer Verdünnung aus dem ersten PCR-Ansatz eine zweite PCR (Nested PCR) durchgeführt. Die genspezifische und adaptorspezifische Primer liegen dabei innerhalb der Sequenz, die bei der ersten PCR amplifiziert wurde.

2. PCR-Ansatz :

37,8	μl	Wasser
5	μl	10 x Tth PCR Reaktionspuffer
1	μl	10 mM dNTP
2,2	μl	25 mM Mg(OAc) ₂
1	μl	nested adaptorspezifischer Primer (AP2, 10 μM)
1	μl	nested genspezifischer Primer (10 μM)
1	μl	50 x Advantage Genomic Polymerase Mix
1	μl	1:50 verdünnter 1. PCR-Ansatz

PCR-Programm:

5x	94 °C	2 Sekunden
	72 °C	3 Minuten
20x	94 °C	2 Sekunden
	67 °C	3 Minuten
	67 °C	4 Minuten
	4 °C	∞

Zur Kontrolle wurden jeweils 5 µl der Nested-PCR-Produkte auf ein 1,5% Agarosegel aufgetragen.

3.2.2. Herstellung von cDNA*RNA-Isolierung aus adhärennten Zellkulturen*

In Zellkulturflaschen mit einer Grundfläche von 25 cm² wurden HT-29/B6-Zellen bis zur Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden abtrypsiniert und einmal mit PBS gewaschen. Zu den Zellen wurden dann 1 bis 4 ml RNAzol gegeben. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden der Flasche abgelöst. Das Homogenisat wurde danach in ein Eppendorf-Röhrchen überführt und mit 100-200 µl Chloroform gemischt. Das Gemisch wurde für 15 Sekunden gevortext und für 15 Minuten bei 4 °C auf Eis inkubiert. Danach folgte eine Zentrifugation bei 4 °C für 15 Minuten mit 12000 g. Die wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt und mit 1 Volumen eiskaltem Isopropanol für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Die Mischung wurde dann für 15 Minuten bei 4 °C und 12000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, das Pellet wurde mit 1 ml eiskaltem 70% Ethanol gewaschen und für 10 Minuten bei 4 °C und 12000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder abgegossen. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet und in 50-100 µl Wasser resuspendiert. Die RNA wurde nach entsprechender Verdünnung (1:100) im Gene Quant quantifiziert und bei -80 °C aufbewahrt.

Reverse Transkription

Das Enzym Reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase. Sie dient der Replikation des retroviralen Genoms und wird beim Zusammenbau neuer Viruspartikel ins Innere eines Kapsids verpackt. In der molekularbiologischen Anwendung synthetisiert die Reverse Transkriptase ausgehend von einem Primer (Oligo dT) einen DNA-Strang komplementär zu einer RNA-Matrize. Zur

Herstellung von cDNA aus isolierter RNA wurde hier der Perkin Elmer RNA PCR Kit benutzt. Die RNA wurde aus HT-29/B6-Zellen isoliert.

RT -Ansatz :

4	µl	10x PCR Reaktionspuffer II
2	µl	RNasin (20U/µl)
16	µl	dNTP-Mix (2,5 mM each;)
1	µl	MuLV Reverse Transkriptase (50U/µl)
2	µl	Oligo d(T) (50 µM)
1	µg	Gesamt-RNA
ad 40	µl	Wasser

Programm:

Raumtemperatur	10 Minuten
45°C	15 Minuten
99°C	5 Minuten
5°C	5 Minuten

Wenn die Amplifikate nicht sofort weiter verwendet wurden, wurden sie bei -80 °C gelagert.

Amplifikation der cDNA mit genspezifischen Primern

Für die Erzeugung genspezifischer DNA-Fragmente wurde die cDNA mit Claudin-spezifischen Primern amplifiziert.

PCR-Ansatz :

2,5	µl	10x PCR Reaktionspuffer II
1,5	µl	25 mM MgCl ₂
1,4	µl	dNTP-Mix (jeweils 2,5 mM)
10 pmol		Forward Primer
10 pmol		Reverse Primer
3	µl	cDNA aus RT Schritt
0,2	µl	Ampli Taq (5U/µl)
ad 25	µl	Wasser

PCR-Programm:

95°C	5 Minuten
35 x 95°C	20 Sekunden
60°C	30 Sekunden
72°C	30 Sekunden
72°C	7 Minuten
4°C	∞

Zur Kontrolle der amplifizierten cDNA wurden 5 µl Reaktionsansatz neben λ /HindIII-Fragmenten und 100 bp DNA-Größenmarker auf einem 1,5% Agarosegel elektrophoretisch getrennt. Der Ansatz konnte bei -20 °C aufbewahrt werden.

3.2.3. Screening genomischer Bibliotheken

Zur Identifizierung von Claudin-spezifischen Promotoren wurden Filter verwendet, auf denen genomische Bibliotheken immobilisiert sind. Die Filter (Library RPCI1,3-5 Human PAC Nr. 704) wurden vom Ressourcenzentrum für Genomforschung (RZPD; Zehetner & Lehrach, 1994) bezogen.

Radioaktive Markierung der Sonde

Radioaktiv-markierte DNA-Sonden können nach Southern Blot Hybridisierung durch Autoradiographie nachgewiesen werden. Zur Markierung wurde $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP verwendet. Zunächst wurde ein Claudin-spezifisches DNA-Fragment mit Hilfe von Restriktionsenzymen aus dem Klonierungsvektor isoliert und durch Gelextraktion aufgereinigt. Die Reaktionsmischung wurde auf Eis hergestellt. Zu 3 µl Primer/Puffer-Lösung wurden 1,2 µl dNTP (Mischung aus A, G und T), 0,2 µl Klenow-Enzym und 1 µl $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (10 µCi/µl) gegeben. Die Substanzen wurden vorsichtig mit der Pipettenspitze gemischt und in einer Tischzentrifuge kurz zentrifugiert. 10 ng DNA-Fragment wurden mit Wasser auf 4,6 µl Volumen aufgefüllt. Die DNA-Suspension wurde 5 Minuten bei 95 °C denaturiert und anschließend 5 Minuten auf Eis abgekühlt. Der radioaktive Ansatz wurde zur DNA-Suspension gegeben und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 90 µl TE-Puffer zugegeben. Die Sonde wurde über eine NICK-Säule aufgereinigt. Nach Auftrag der gesamten Probe auf die Säule wurden 400 µl TE-Puffer zugegeben und der Durchfluss verworfen. Nach erneuter Zugabe von 400 µl TE-Puffer wurde der Durchfluss in einem frisches Eppendorf-Röhrchen gesammelt.

Prähybridisierung

Die Hybridisierungslösung (Quick-Hyb) wurde bei 60-65 °C im Hybridisierungssofen vorgewärmt. Die Glasröhren wurden mit wenig vorgewärmten Aqua bidest. gefüllt und einige Minuten im Ofen rotiert. Die RZPD-Filter wurden luftblasenfrei an die Wand gelegt und das Aqua bidest. ausgegossen. Danach wurde die Röhre mit 10 ml vorgewärmter Quick-Hyb Lösung gefüllt und für 10-15 Minuten im Ofen rotiert.

Hybridisierung

Die gereinigte radioaktive DNA-Probe sowie 100 µl herring sperm-DNA wurden 5 Minuten bei 95 °C denaturiert und dann auf Eis abgekühlt. Die denaturierte herring sperm-DNA und die denaturierte radioaktiv-markierte Sonde wurden nacheinander in die Hybridisierungslösung gegeben und gut vermischt. Die Hybridisierung wurde für 2 Stunden bei 60-65 °C im Hybridisierungsofen unter Rotieren durchgeführt.

Waschen

Anschließend wurden die Filter zweimal mit 2xSSC/1%SDS bei Raumtemperatur auf einer Wippe gewaschen. Danach wurden sie einmal für 30 Minuten bei 55-60 °C in 0,1-0,5%SSC/0,1%SDS gewaschen. Die Filter wurden abgetropft, in eine Transparentfolie eingewickelt und zusammen mit einer Bildplatte in eine Röntgenfilm-Kassette eingelegt. Die Auswertung der Bildplatte erfolgte nach 24 Stunden Belichtungsdauer im Fluro-Imager FLA 3000.

Zuordnung von Signalen

Die verwendeten RZPD-Filter haben eine Größe von 24x24 cm. Auf diesen Filtern sind Cosmid-Klone aufgetropft. Cosmide sind große Plasmide, die etwa 30000 bp große Fragmente aufnehmen können. Jeder Filter besteht aus einer Sammlung von aufgetropften Klonen, die in Blocks à 5x5 angeordnet sind. Auf jeden Filter sind 48x48 Blocks mit je 12 Klonen aufgebracht. Jeder Klon ist in einem Block doppelt vorhanden. Daher enthält jeder Filter rechnerisch 27648 Klone. Die Anordnung der Hybridisierungssignale im Block erlaubt eine eindeutige Zuordnung zu den Klonen. Eine Kontrolle über die Spezifität der Hybridisierung wird dadurch erleichtert, dass es nur 12 mögliche Anordnungen der doppelt aufgetropften Klone im Block gibt. Zur Ermittlung der richtigen Klone wurden die X-Y-Koordinaten von jedem positiven Signal lokalisiert. Die Anordnung der positiven Signalen zueinander innerhalb der Blocks wurde mit Hilfe einer Mustervorlage kontrolliert. Unter Berücksichtigung der Koordinaten und der Nummer des verwendeten Filters konnte beim Ressourcenzentrum der entsprechende Klon abgerufen werden. Die Klone, die im Vektor pCYPAC2 in *E. coli* DH10B-Zellen vorliegen, wurden amplifiziert und die Cosmid-DNA aufgereinigt. Aus den Cosmiden wurden durch Restriktionsverdau kleinere Fragmente hergestellt. Durch Southern Blot Analyse wurden mit Claudin-spezifischen Sonden Fragmente mit einer geeigneten Größe identifiziert. Nach Präparation der Fragmente wurden

diese in Klonierungsvektoren amplifiziert und sequenziert und nach Umklonierung in pGL3-Basic funktionell auf ihre Promotoraktivität überprüft.

3.2.4. Aufreinigung von DNA Fragmenten

Extraktion von DNA Fragmenten aus Agarosegelen

Mit Hilfe des Qiagen Gelextraktion Kit wurden DNA-Fragmente aus den Agarosegelen isoliert. Bei dieser Methode wurde die gewünschte DNA-Bande aus einem Agarosegel ausgeschnitten, das Gelstück in ein vorher gewogenes Eppendorf Röhrchen überführt und gewogen. Zu dem Gelstück gibt man 3 Vol QG-Puffer und inkubiert für 10 Minuten bei 50°C, wobei alle 3 Minuten die Suspension gemischt wurde. Es wurde 1 Vol (in Bezug auf das Gelstück) Isopropanol zugegeben und gemischt. Eine micro-spin-Säule wurde in ein Collection-Röhrchen eingehängt, mit maximal 800 µl der Suspension aufgefüllt und für 1 Minute bei 10000 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Die restliche Flüssigkeit wurde zum zweitenmal abzentrifugiert und verworfen. Auf die micro-spin-Säule wurden 750 µl Wasch-Puffer PE gegeben und für 1 Minute bei Raumtemperatur und 10000 g zentrifugiert. Die restliche Flüssigkeit wurde nochmals abzentrifugiert und verworfen. Auf die Säule wurden 30 µl Fluka-Wasser gegeben und für 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Die Säule wurde in neues Eppendorf-Röhrchen eingehängt und für 1 Minute bei Raumtemperatur und 10000 g abzentrifugiert. Das Eluat enthält die gereinigte DNA. Auf ein 0,7% Agarosegel wurden 5 µl gereinigte DNA mit LMDM-Marker zur Bestimmung der DNA-Konzentration aufgetragen.

Aufreinigung über High Pure Säulen

Zur Reinigung der DNA (z.B. zur Abtrennung von Primern und Nukleotiden nach der PCR) wurde die DNA-Suspension auf 100 µl mit Wasser aufgefüllt. Der Ansatz wurde mit 500 µl Bindungspuffer gemischt, auf die High Pure Säule aufgetragen und bei 14000 g für 30 Sekunden zentrifugiert. Auf die Säule wurden 500 µl Waschpuffer aufgetragen und für 30 Sekunden bei 14000 g zentrifugiert. Nach weiterer Zugabe von 200 µl Waschpuffer auf die Säule wurde erneut für 30 Sekunden bei Raumtemperatur und 14000 g zentrifugiert. Die DNA wurde mit 50 µl Wasser durch Zentrifugation für 1 Minute bei 14000 g eluiert. Zur Kontrolle wurden 5 µl der eluierten DNA auf ein 0,7% Agarosegel aufgetragen.

3.2.5. Ligation von DNA Fragmenten in Plasmide

Plasmid-Vektoren

Plasmidvektoren wurden zur Klonierung von DNA-Fragmenten verwendet. Es sind kleine, ringförmige, doppelsträngige DNA-Moleküle, die von größeren Plasmiden abstammen und in Bakterienzellen replizieren können. Mit Restriktionsendonukleasen wurden die Klonierungsvektoren geschnitten, so dass linearisierte Plasmid-DNAs entstehen. Viele Bakterienplasmide enthalten Antibiotika-Resistenz-Gene, um transformierte Zellen von nicht transformierten Zellen unterscheiden zu können. Bei der Transformation wurden die Agarplatten mit Ampicillin behandelt, so dass sich nur plasmidhaltige Kolonien vermehren können, da sie ein Ampicillin-Resistenzgen aufweisen.

Es wurden kommerziell erhältliche linearisierte Vektoren mit T Überhängen (pGEM-T), (pGEM-T-Easy) und (pCR2.1TOPO) oder durch Restriktionsverdau linearisierte Vektoren (pGL3-Basic) eingesetzt. Die einzufügenden DNA-Fragmente stammen entweder aus PCR Reaktionen (wobei überstehende AT entstehen) oder aus Restriktionsverdau. pGEM-T und pCR2.1-TOPO sind plasmidale Vektoren mit einem lacZ-Gen. Die Vektoren sind in der linearisierten Form im lacZ-Gen gespalten und besitzen überhängende 3'-T-Enden. Die 3'-T-Enden sind mit den durch die Polymerase bei der PCR-Reaktion gebildeten 5' überhängenden A-Enden der PCR-Fragmente kompatibel.

Ligation von Vektoren und Fremd-DNA

Es handelt sich hier um die enzymatische Verknüpfung von DNA-Molekülen mit Hilfe der DNA-Ligase. Durch diesen Prozess werden Vektor und Fremd-DNA miteinander verknüpft, indem die Bildung von Phosphordiesterbindungen zwischen benachbarten Nukleotiden katalysiert wird. Wenn der Plasmidvektor zwei identische kohäsive oder glatte Enden hat, integriert die Fremd-DNA in beiden möglichen Orientierungen relativ zum Vektor, wobei zwei verschiedene Produkte entstehen.

Ligationsansatz

1	µl	10x Ligation Puffer
10-100	ng	Vektor-DNA
10-100	ng	PCR-Produkt
1	µl	T4 DNA-Ligase
		auf 10 µl mit Wasser auffüllen

Der Ligationsansatz wurde entweder über Nacht bei 14-16 °C (glatte Enden) oder für 30 Minuten bei Raumtemperatur (überlappende Enden) inkubiert.

3.2.6. Transformation in kompetente Zellen

Kompetente Zellen sind *E. coli*-Bakterienstämme, die durch chemische Behandlung DNA Moleküle leicht aufnehmen können. In der Regel besitzen sie eine Transformationsrate von 10^7 - 10^8 Transformanden/ μg . Die kompetenten *E. coli*-Bakterienzellen wurden auf Eis vorsichtig aufgetaut. Zu je 50 μl Suspension mit kompetenten Zellen wurden 2 μl Ligationsansatz gegeben. Es folgte eine Inkubation für 30 Minuten auf Eis. Um die Zellen kompetenter zu machen, folgte ein Hitzeschock für 30 Sekunden bei 42 °C. Danach wurden die Zellen für 2 Minuten auf Eis gestellt. Die Suspension wurde bei Raumtemperatur mit 250 μl SOC-Medium vermischt und für 1 Stunde bei 37 °C und 225 rpm inkubiert. Agarplatten wurden mit 40 μl X-Gal und 4 μl IPTG behandelt und an der Luft getrocknet. Auf die Agarplatten wurden zwischen 50 oder 100 μl Ansatz ausplattiert. Nach Antibiotika- und gegebenenfalls weiß/blau-Selektion wurden resistente weiße Kolonien zur Amplifikation der Plasmide in Flüssigmedium überimpft.

3.2.7. Plasmid-Miniprep

Mit einer Bakterienkolonie wurden 4 ml LB-Medium (50-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin) angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. 1,5 ml der Bakterien suspension wurden in ein Eppendorf-Röhrchen überführt und für 1 Minute bei 5000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 300 μl P1-Puffer resuspendiert. Zu der Suspension wurden 300 μl P2-Puffer gegeben und für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Suspension für 15 Minuten bei 4 °C oder Raumtemperatur bei 14000 rpm zentrifugiert. 800 μl Überstand wurde mit 400 μl Isopropanol gemischt und bei Raumtemperatur und 14000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 500 μl 70% Ethanol gewaschen und für 5 Minuten bei 14000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Pellet wurde für 5-10 Minuten in der Speedvac getrocknet und in 50 μl Wasser resuspendiert. 2,5 μl der DNA-Suspension wurden auf ein 0,7% Agarosegel aufgetragen, der Rest wurde bei 4 °C gelagert.

3.2.8. Plasmid-Midiprep (endotoxinfrei)

100 ml LB-Medium (50-100 µg/ml Ampicillin oder Kanamycin) wurden mit 330 µl einer frischen Übernachtskultur angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm inkubiert. 3 mal 30 ml Bakterienkultur wurden in je ein Falcon-Röhrchen überführt und für 15 Minuten bei 7000 rpm, 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in je 3,3 ml P1-Puffer resuspendiert und gepoolt. Zu dieser Suspension wurden 10 ml P2-Puffer gegeben, vorsichtig vier- bis sechsmal invertiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 10 ml P3-Puffer wurden zu der Suspension pipettiert. Der gesamte Ansatz wurde in Cartridges mit Filter-Einsatz umgefüllt und für 10 Minuten inkubiert. Die Suspension wurde aus den Cartridges in ein neues Falcon Tube (ca. 25 ml) filtriert. Danach wurde das klare Lysat mit 2,5 ml ER-Puffer gemischt, vorsichtig vier- bis sechsmal invertiert und für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Die Qiagen Säule wurde mit 10 ml QBT-Puffer equilibriert. Die Suspension wurde über die Säule gegeben und diese anschließend zweimal mit je 30 ml QC-Puffer gewaschen. Die DNA wurde mit 15 ml QN-Puffer von der Säule in ein Greiner-Röhrchen eluiert. Nach Mischen mit von 10,5 ml Isopropanol wurde bei 15000 g, 4°C für 30 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 5 ml 70% Ethanol (Endotoxin-frei) gewaschen und bei 15000 g für 10 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde für 10-30 Minuten bei umgedrehtem Röhrchen an der Luft getrocknet und danach in 400 µl TE-Puffer resuspendiert. 100 ng der DNA wurden auf ein Agarosegel aufgetragen, der Rest wurde bei -20°C aufbewahrt.

3.2.9. Restriktionsverdau

Durch einen Restriktionsverdau werden enzymatisch DNA-Moleküle in definierte Abschnitte zerlegt. Dafür sind Restriktionsendonukleasen wie z.B. *EcoRI*, *HindIII* oder *EcoRV* notwendig. Die Restriktionsenzyme erkennen kurze, zumeist palindromische Nukleotid-Sequenzen, an denen sie den DNA-Strang schneiden. In der Regel schneidet 1 Einheit Restriktionsendonuklease 1 µg DNA in einer Stunde bei optimaler Temperatur zu 100%. Auf die Anzahl der Einheiten, die optimale Temperatur und den entsprechenden Puffer ist daher zu achten. Es ist wichtig, dass die Enzymkonzentration maximal 1/10 Volumen des Restriktionsansatzes beträgt, da die Enzyme mit 50% Glycerin gelagert werden und eine Glycerin-Konzentration von über 5% im Reaktionsansatz den Verdau hemmt.

Ansatz:

100-500	ng	DNA
0,5-1	µl	Enzym
1/10	Vol	10 x Reaktionspuffer mit H ₂ O auf 10-20 µl auffüllen

3.2.10. Polymerase I-Klenow-Reaktion

Um überstehende Enden in glatte Enden zu konvertieren, wurden nach dem Restriktionsverdau zu 18 µl Restriktionsansatz 1 µl Klenow-Enzym und 4 µl 2,5 mM dNTP gegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach folgte die Aufreinigung der DNA mit der High Pure-Methode oder über Gelextraktion.

3.2.11. Sequenzierung von DNA

Die Didesoxy- oder Kettenabbruch-Methode von F. Sanger (Sanger et al., 1977) wurde zur Bestimmung der Nukleotidsequenz eines DNA-Moleküls eingesetzt. Die Sequenzierung erfordert DNA-Primer, die an einer komplementären Sequenz binden und durch die DNA-Polymerase verlängert werden. Die Unterbrechung der komplementären Stränge wird durch den Einbau von Didesoxynukleotiden (ddNTP), die zu dem normalen Gemisch von dNTPs gegeben werden, mit einer definierten statistischen Häufigkeit gewährleistet. Didesoxynukleotide enthalten keine 3'-OH-Gruppe, so dass die DNA-Synthese unterbrochen wird, wo immer ein Didesoxynukleotid in die wachsende Kette eingebaut wird. Dabei entsteht ein Gemisch unterschiedlich großer DNA-Fragmente, die anschließend in einer Kapillargelelektrophorese voneinander getrennt werden. Die Detektion der mit unterschiedlichen Fluorophoren markierten Fragmente geschieht durch einen Laser. Das resultierende Elektropherogramm ist die Grundlage für die computergestützte Analyse der DNA Sequenz.

Sequenzreaktion:

2-4	µl	Premix
500	ng	Plasmid-DNA
10	pmol	Primer
		auf 10 µl mit H ₂ O auffüllen

PCR-Programm:

	96° C	5 Minuten
25x	96° C	10 Sekunden
	55° C	5 Sekunden

60° C	4 Minuten
4° C	∞

Anschließend wurde der Ansatz von überschüssigen Nukleotiden befreit. Dazu wurde zunächst eine Centriflex Säule 1 Minute bei 750 g zentrifugiert. Die Säule wurde dann in ein neues Eppendorf-Röhrchen gestellt. In die Mitte des Gelbetts der Säule gibt man 10 µl Reaktionsansatz und zentrifugiert es für 1 Minute bei 750 g. Das Eluat wurde in ein Sequencer-Gefäß gegeben und in der Speedvac für 15-20 Minuten getrocknet. 5 µl Restvolumen wurden mit 20 µl TSR resuspendiert und das Gefäß mit einem Septum verschlossen. Die Lösung wurde bei 96°C denaturiert und für 2-3 Minuten auf Eis abgekühlt. Zur Ermittlung der Sequenzfolge wurde der zuvor kurz zentrifugierte Reaktionsansatz in einem ABI 310 Sequencer prozessiert.

3.2.12. Glycerolstocks

Für die langfristige Aufbewahrung von Bakterienkulturen bei -80°C wurde dem Medium Glycerol zugesetzt, um eine Beschädigung der Bakterienzellen durch Eiskristalle zu verhindern. 850 µl Übernachtskultur wurden dazu mit 150 µl Glycerol im Cryo-Röhrchen gemischt und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.2.13. Agarosegel-Elektrophorese

Agarose wurde mit 1 x TAE / 0,5 µg/ml Ethidiumbromid durch Erhitzen aufgekocht, auf ca. 50°C abgekühlt und in ein Gelschiff gegossen. Die Vertiefungen zur Aufnahme der Proben wurden durch das Einsetzen eines Kamms gebildet. Nach dem Erstarren der Gelmasse wurde das Gelschiff in die Elektrophoresekammer gesetzt und diese mit 1 x TAE / 0,5 µg/ml Ethidiumbromid aufgefüllt. Die DNA wurde mit 1/6 Vol 6x DNA Probenpuffer gemischt und nach dem Ziehen des Kamms in die Vertiefungen geladen. Anschließend wurde eine Spannung von 1-5 V / cm angelegt. Durch die Wanderung des Bromphenolblau-Farbstoffs im Agarosegel konnte das Fortschreiten der Elektrophorese optisch kontrolliert werden.

3.2.14. Herstellung einer mit Digoxigenin markierten DNA-Sonde

Zur Herstellung einer Digoxigenin-markierten DNA-Sonde mittels PCR wurde der PCR DIG Probe Synthesis Kit verwendet.

PCR-Ansatz:

5	µl	10x Puffer mit MgCl ₂
5	µl	10x PCR DIG Mix
2,5	µl	je 10 mM Forward und Reverse Primer
100	pg	Plasmid DNA
0,75	µl	Polymerase (AmpliTaq)
ad 50	µl	Wasser

PCR-Programm :

95°C	7 Minuten
30 x 95°C	45 Sekunden
60°C	1 Minute
72°C	2 Minuten
72°C	7 Minuten
4°C	∞

Zur Kontrolle und Konzentrationsbestimmung wurden 5 µl der DIG-markierten Sonde mit LMDM-Marker auf einem 2%igen Agarosegel elektrophoretisch getrennt.

3.2.15. Southern Blot*Kapillar-Transfer*

Die DNA-Proben wurden auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen. Nach der UV-Visualisierung wurde das Agarosegel für 30 Minuten in 1,5 M NaCl / 0,5 M NaOH (Denaturierungslösung) bei Raumtemperatur vorsichtig geschwenkt. Die Lösung wurde abgesaugt und das Agarosegel mit destilliertem Wasser gespült. Das Agarosegel wurde für 30 Minuten in 1 M Tris-HCl pH 7,5 / 1,5 M NaCl (Neutralisationslösung) vorsichtig bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Nylonmembran wurde zurecht geschnitten, an der rechten oberen Ecke markiert, in destilliertem Wasser angefeuchtet und mit 20 x SSC equilibriert. Anschließend wurde die Membran auf das Gel gelegt wie nachfolgend beschrieben. Der Kapillartransfer erfolgte in 20 x SSC über Nacht.

Aufbau des Kapillartransfers:

Gewicht
Papierhandtücher
2xWhatmann 3MM
Nylonmembran
Gel (umgekehrt)
Parafilmmaske
2x Whatmann 3MM
Glas
Gestell
Wanne mit 20x SSC

Nach dem Transfer wurde die Nylonmembran mit 2 x SSC gewaschen. Um die DNA auf der Nylonmembran zu fixieren, wurde im UV-Crosslinker die DNA kovalent an die positiv geladene Nylonmembran durch Bestrahlung mit UV-Licht ($1200 \mu\text{J}/\text{cm}^2$) gebunden. Um die Effizienz des Transfer zu beurteilen, wurden die Nylonmembran und das Agarosegel unter UV-Licht kontrolliert. Die Nylonmembran wurde mit Aqua bidest. gewaschen und entweder direkt zur Hybridisierung eingesetzt oder bei Raumtemperatur getrocknet aufbewahrt.

Hybridisierung

In ein 50 ml Falcongefäß wurde mit Aqua bidest. angefeuchtete Nylonmembran überführt und mit 5 ml bei 65°C vorgewärmter Quick Hyb-Lösung für 15 Minuten bei 65°C prähybridisiert. 1-10 μl DIG-markierte Sonde wurden mit 50 μl herring sperm-DNA (10 mg/ml) gemischt, für 10 Minuten bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Die Sonde wurde mit 5 ml frischer QuickHyb-Lösung zur Membran gegeben und für 2 Stunden bei 68°C hybridisiert.

Anschließend wurde die Nylonmembran 2 mal je 5 Minuten bei Raumtemperatur mit 2xSSC / 0,1% SDS auf einer Wippe geschüttelt. Danach wurde die Membran 2 mal je 15 Minuten bei 65°C in 0,1-0,5xSSC / 0,1% SDS geschwenkt. Die Membran kann getrocknet und bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

Chemolumineszenz-Detektion

Zunächst wurde die getrocknete Membran kurz mit Aqua bidest. angefeuchtet und bei Raumtemperatur für 5 Minuten in 100 ml Waschpuffer geschwenkt. Danach wurde die Membran 1,5 Stunden bei Raumtemperatur in 100 ml Blockierlösung geschwenkt. Anschließend schwenkt man die Membran für 30 Minuten bei Raumtemperatur in 100 ml Antikörperlösung. Die Nylonmembran wurde 2 mal für 15 Minuten bei Raumtemperatur in 100 ml Waschpuffer und für 5 Minuten bei Raum-

temperatur in 20 ml Detektionspuffer geschüttelt. Die Membran wurde bei Raumtemperatur in der Dunkelheit in 2 ml Detektionslösung 5 Minuten lang umgedreht inkubiert und die entstandene Chemolumineszenz entweder im LAS-1000 detektiert oder nach Exposition eines Röntgenfilms für 15 s bis 15 Minuten nachgewiesen.

Blot strippen

Die Nylonmembran wurde zuerst in 2 mM NaOH / 0,1% SDS und dann in 0,2 mM NaOH / 0,1% SDS für jeweils 15 Minuten bei 37°C gewaschen .

3.3. Zellbiologische Arbeitsmethoden

3.3.1. Zellkultur

Die eukaryontischen Zelllinie HT-29/B6 wurde bei 37°C und 5% CO₂ in Begasungs-Brutschränken vermehrt. Zur Kultivierung der Zellen wurden sterile Kulturgefäße aus Plastik verwendet. Als Zellkulturmedium wurde RPMI1640 mit 10% FKS und 100 U/ml Penicillin / 100 µg/ml Streptomycin eingesetzt.

3.3.2. Passagieren von Zellen

Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin-Lösung versetzt. Um die Zellen von der Kulturflasche vollständig abzulösen, wurde die Kulturflasche für 15-30 Minuten (HT-29/B6) im Begasungs-Brutschrank bei 37°C inkubiert. Das vollständige Ablösen der Zellen wurde unter den Mikroskop kontrolliert. Die Zellen wurden in 10 ml RPMI1640 Medium mit 10% FKS aufgenommen. Das FKS inhibiert hierbei das Trypsin. Die Zellen wurden mit einer Pipette sorgfältig resuspendiert, verdünnt in einer neuen Kulturflasche wieder ausgesät und im Begasungs-Brutschrank bei 37°C / 5%CO₂ kultiviert.

3.3.3. Bestimmung der Zellzahl

Mit dem Haemozytometer erfolgte die Bestimmung der Zellzahl unter dem Mikroskop. Dabei wurden 10 µl Zellsuspension auf das Haemozytometer gegeben und die vier Eckquadranten ausgezählt. Die Zellzahl wurde anschließend mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{gezählte Zellen} \times 2500$$

Der Faktor 2500 bezieht sich auf das über den Eckquadranten befindliche Flüssigkeitsvolumen.

3.3.4. Transfektion eukaryontischer Zellen

Die Übertragung von reiner DNA in eine Zelllinie bezeichnet man als Transfektion. Es gibt mehrere Transfektionsmethoden (Mikroinjektion, Calciumphosphat-Präzipitation, Elektroporation, Liposomen, DEAE-Dextran). Lipofectamine besteht aus Liposomen, mit denen die DNA in Komplexe verpackt und in die Zelle transportiert wird. In der Zelle wird die DNA transkribiert und mRNA Moleküle werden zu Proteinen translatiert.

Transfektion mit LipofecteminPLUS

1-2 µg DNA, 12 µl Plusreagent und 200 µl Zellkulturmedium RPMI 1640 (ohne FKS, ohne Antibiotika) wurden gemischt und bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert. In einem zweiten Ansatz wurden 8 µl Lipofectamine zu 200 µl RPMI 1640 (ohne FKS, ohne Antibiotika) gegeben und ebenfalls bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert. Der erste und der zweite Ansatz wurden gemischt und bei Raumtemperatur erneut für 15 Minuten inkubiert.

6-Loch-Platten, die 24 Stunden zuvor mit 5×10^5 HT-29/B6-Zellen beschickt und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert worden sind, wurden 2-3 mal mit PBS gewaschen. Zu den Zellen wurden 1,6 ml RPMI 1640 (ohne FKS, ohne Antibiotika) und das Transfektionsgemisch gegeben. Der Ansatz wurde 4 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden 4 ml RPMI 1640 (mit 10% FKS / 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin) zum Ansatz gegeben und bei 37°C und 5% CO₂ für 24 Stunden inkubiert. Bei Behandlung mit Zytokinen wurden nach 4 Stunden 2500 U/ml TNF α oder 25 U/ml IFN γ zu den Zellen gegeben.

3.3.5. Reporteragen-Assay

Die transfizierten Zellen wurden nach Inkubation zweimal mit PBS gewaschen und mit 750 µl 1xPassiv-Lyse-Puffer für 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Zellen wurden mit der Pipettenspitze abgeschabt und in Eppendorf-Röhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde zweimal für je 10 Minuten in Stickstoff eingefroren und anschließend bei 37°C aufgetaut. Danach wurden die Zellen für 2

Minuten bei 14000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt, direkt zur Messung eingesetzt oder bei -80 °C eingefroren.

Als Reporter-Gen-Konstrukte wurden Vektoren eingesetzt, bei denen der zu untersuchende Promotor vor ein Luciferase-Gen aus *Photinus pyralis* (pGL3-Basic) kloniert wurde. Zur Standardisierung der Versuche wurde ein Coreporter-Konstrukt mit einem Luciferase-Gen aus *Renilla reniformis* (phRL-null) eingesetzt. Luciferase Assay Puffer sowie Stop-and-Glo-Reagenz aus dem Luciferase Reporter Assay System wurden nach der Vorschrift des Herstellers zubereitet und wie die Zellextrakte auf Raumtemperatur erwärmt. Zu 20 µl Zellextrakt wurden im Luminometer-Röhrchen 100 µl Luciferase Assay Reagenz injiziert und die Lichtreaktion luminometrisch vermessen. Nach 10 Sekunden wurden 100 µl Stop-and-Glo Reagenz in die Mischung injiziert und für weitere 10 Sekunden gemessen. Für jeden Zellextrakt wurden zwei Messungen durchgeführt.

Die Auswertung erfolgt nach Standardisierung durch Quotientenbildung aus dem luminometrisch bestimmten Wert für die *Photinus pyralis*- bzw. *Renilla reniformis*-Luciferase. Bei Behandlung mit Zytokinen wurde die Standardisierung innerhalb der Gruppe der gleichbehandelten Transfektionen durchgeführt, um eine Beeinflussung des Coreporters durch die Zytokine zu berücksichtigen. Dazu wurde aus den Werten für die *Renilla reniformis*-Luciferase durch Bildung des Mittelwertes und anschließender Quotientenbildung aus Mittelwert und Einzelwerten ein Faktor gebildet, mit dem die *Photinus pyralis*-Werte multipliziert wurden. Jede Transfektion wurde dreimal durchgeführt. Die Mittelwerte der drei Transfektionsansätze und die damit verbundenen Standard Errors of the Mean (S.E.M.) wurden statistisch mit dem Student's T-test auf die Signifikanz der Veränderungen überprüft. Als signifikant wurden Veränderungen mit einem $P < 0,05$ angesehen.

3.4. Elektrophysiologische Methoden

3.4.1. Messung des Transepithelialen Widerstandes

5×10^5 Zellen wurden auf runde Millicell HA-Filter (\varnothing 12 mm, Porengröße 0,45 µm) ausgesät. Je vier HA-Filter wurden zusammen in einer mit Medium gefüllten Kulturschale (\varnothing 6 cm) platziert. Die Kulturschalen wurden im Begasungsbrutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Die Messung des transepithelialen Wider-

standes (R^t) erfolgte mit der Methode, die von Kreusel et al. (1991) beschrieben wurde. Die Messung wurde in den Kulturschalen mit Hilfe von zwei festen Elektroden (STX-2, World Precision Instruments, USA), die mit einem Impedanz-Messgerät verbunden sind, durchgeführt (D. Sorgenfrei, Institut für Klinische Physiologie). Die Tiefe und Position der eingetauchten Elektroden in den Filtern erfolgte automatisch. Die Temperatur wurde bei der Messung bei 37°C konstant gehalten. Die Widerstandswerte wurden nach der Messung des Leerwertes (Medium) korrigiert. Die Elektroden wurden nach jeder Messung mit Alkohol desinfiziert. Die Zunahme der Widerstandswerte wurde zuerst nach 3 Tagen und danach täglich bis zum Erreichen des Plateaus (etwa am 7. Tag) verfolgt. Dann wurden die Zytokine (2500 U/ml TNF α und 25 U/ml IFN γ , einzeln oder in Kombination) zur basolateral gelegenen Seite der Filter gegeben. 24 h nach der Zugabe der Zytokine wurde der transepithelialen Widerstand erneut gemessen.