

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

- TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde UV-spektrometrisch bestimmt. Dabei entspricht eine OD_{260} von 1,0 einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ doppelsträngiger DNA bzw. 40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ RNA.

Der Quotient der Absorption bei 260 nm und 280 nm gibt Aufschluss über den Reinheitsgrad der Nukleinsäure. Reine Plasmid-DNA sollte einen Quotienten zwischen 1,8-1,9 aufweisen. Bei reiner RNA liegt der Quotient höher als 1,9.

3.1.2 Isolierung von Nukleinsäuren

3.1.2.1 Isolierung von RNA

Die Gesamt-RNA aus Zellkulturen wurde mit Hilfe des RNeasy Midi-Kits von Qiagen gemäß den Angaben des Herstellers isoliert. Die Menge und Reinheit der isolierten RNA wurden UV-spektrometrisch bestimmt (3.1.1).

Unmittelbar vor Gebrauch wurde jeweils 1 μg der RNA durch Gelelektrophorese überprüft. Anhand der Detektion diskreter 23S und 16S rRNA-Banden konnte eine Degradation der RNA ausgeschlossen werden.

3.1.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA

- LB-Medium: 1 % (w/v) Bacto-Tryptone; 5 % (w/v) Bacto-Yeast Extract; 86 mM NaCl
- LB-Amp-Medium: LB-Medium; 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin
- P1-Puffer (Resuspension-Puffer): 50 mM Tris/HCl pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase A
- P2-Puffer (Lyse-Puffer): 200 mM NaOH; 1 % (w/v) SDS
- P3-Puffer (Neutralisations-Puffer): 3 M Kaliumacetat pH 5,5
- TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA

Für die Isolierung von Plasmid-DNA wurde der *E. coli* Stamm DH5 α mit der gewünschten Plasmid-DNA transformiert. Die Anzucht der Bakterien erfolgte in LB-Amp-Medium. Entsprechend der Größe der angezogenen Bakterienkultur wurden entweder sogenannte „Mini“- , „Midi“- , oder „Maxi“-Präparationen durchgeführt.

„Mini“-Präparation:

Aus einer transformierten Bakterienkolonie wurden 2 ml LB-Medium in Gegenwart eines selektionierenden Antibiotikums angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln kultiviert. 1,5 ml der *E. coli*-Übernachtskultur wurden zentrifugiert (5 min, 2700 x g, RT) und das Bakterienpellet in 150 µl P1-Puffer resuspendiert. Durch nachfolgende Zugabe von 150 µl P2-Puffer wurden die Bakterien lysiert und anschließend das Lysat mit 150 µl P3-Puffer neutralisiert. Unlösliche Komponenten, wie bakterielle Zellfragmente, Proteine und DNA, wurden abzentrifugiert (10 min, 20800 x g, 4 °C) und die im Überstand befindliche Plasmid-DNA wurde mit Ethanol gefällt und gewaschen. Im Anschluss an eine weitere Zentrifugation (10 min, 20800 x g, 4 °C) wurde das Pellet für 5-10 min bei 42°C getrocknet und in 10-20 µl TE-Puffer resuspendiert. Die erhaltene Plasmid-DNA wurde nur für Restriktionsanalysen, DNA-Sequenzierungen und Transformationen in *E. coli* verwendet.

„Midi“- und „Maxi“-Präparationen:

Größere Mengen an gereinigter Plasmid-DNA wurden mit Hilfe der Plasmid-Midi- bzw. -Maxi Kits von Qiagen gemäß den Angaben des Herstellers isoliert. Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgt dabei über Anionenaustauscherchromatographie. Die Menge und Reinheit der isolierten DNA wurden UV-spektrometrisch bestimmt (3.1.1).

3.1.2.3 Isolierung chromosomaler DNA

- Kern-Lysepuffer: 100 mM Tris/HCl pH 8,0; 400 mM NaCl; 10 mM EDTA

Zur Reinigung von Gesamt-DNA aus Zellkulturen wurden die Zellen trypsinisiert (s. 3.2.2.2), von der Zellkulturschale gelöst und zweimal mit Dulbecco's-PBS gewaschen. Die Zellen wurden in 1 ml Kern-Lysepuffer resuspendiert und durch Zugabe von 50 µl 20 % (w/v) SDS lysiert. Danach wurde das Lysat mit 50 µl 0,1 % (w/v) Proteinase K versetzt und für mindestens zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Zugabe von 333 µl 5M NaCl-Lösung wurde der Ansatz kräftig mit einem Vortexschüttler gemischt. Anschließend erfolgte ein 30-minütiger Inkubationsschritt auf Eis sowie die Sedimentation der Peptide durch zweimalige Zentrifugation (15 min, 1700 x g, RT).

Der Überstand wurde mit 0,6 Volumenteilen Isopropanol versetzt und langsam gemischt. Die dabei fadenförmig ausfallende DNA konnte mit einer zu einem Häkchen geschmolzenen Pasteurpipette in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden. Im Anschluss wurde die genomische DNA mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, (nicht vollständig) getrocknet und in 100 µl sterilem Wasser gelöst.

Die Konzentration der DNA wurde UV-spektrometrisch bestimmt (3.1.1).

3.1.3 DNA-Modifikation mit Bisulfit

Die im folgenden beschriebene DNA-Modifikation mit Bisulfit erfolgte in Anlehnung an eine von Frommer et al. beschriebene Methode (Frommer et al., 1992).

Dazu wurden 5 µg chromosomale DNA mit Wasser auf 50 µl aufgefüllt, mit 3,5 µl 5 M NaOH-Lösung versetzt und während einer 15-minütigen Inkubation bei 37°C denaturiert. Zwischenzeitlich wurden eine 3,6 M Natriumbisulfit-Lösung sowie eine 50 mM Hydrochinon-Lösung zubereitet, indem die jeweiligen Substanzen durch vorsichtiges Schwenken und Inkubation bei 55°C gelöst wurden. Nach Zugabe von 224 µl Natriumbisulfit-Lösung sowie von 3 µl Hydrochinon-Lösung zu der denaturierten chromosomalen DNA wurde das Reaktionsgemisch mit Mineralöl überschichtet und bei 50°C für 40 Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch in drei nacheinander erfolgenden Dialyseschritten entsalzt: die erste Dialyse erfolgte gegen 5 mM Natriumacetat, pH 5,2/0,5 mM Hydrochinon; danach wurde gegen 0,5 mM Natriumacetat, pH 5,2 und zuletzt gegen Wasser dialysiert. Im Anschluß wurde die DNA in einer Speedvac weitgehend (auf ca. 5 µl) eingeeengt und in 200 µl Wasser resuspendiert. Nach Zugabe von 12 µl 5 M NaOH-Lösung und einer 15-minütigen Inkubation bei 37°C erfolgten eine Ammoniumacetat-/Ethanol-fällung. Die modifizierte DNA wurde in Wasser resuspendiert und bei -20°C gelagert oder unmittelbar als Template eine methylierungsspezifischen PCR (s. 3.1.5.1) eingesetzt.

3.1.4 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

- 1× TBE-Puffer: 90 mM Tris/HCl pH 8,0; 89 mM Borsäure; 2 mM EDTA
- 1× TAE-Puffer: 40 mM Tris/Essigsäure pH 8,5; 2 mM EDTA
- 6× DNA-Loading-Puffer: 10 mM Tris/HCl pH 8,0; 0,25 % (w/v) Bromphenolblau; 0,25 % (w/v) Xylencyanol FF; 30 % (v/v) Glycerin; 1 mM EDTA

Je nach Größe der zu trennenden DNA- bzw. RNA-Moleküle wurden Gele unterschiedlicher Agarosekonzentration gegossen. Die entsprechende Menge an Agarose (0,8-2,0 % (w/v)) wurde durch Aufkochen in TBE- bzw. TAE-Puffer gelöst, auf 50-60°C abgekühlt und nach Zugabe von Ethidiumbromid (0,1 µg/ml) in eine horizontale Gelkammer mit Kamm gegossen.

Die DNA-Proben wurden mit 6× DNA-Loading-Puffer versetzt und in die Geltaschen geladen. Die Größe der DNA-Fragmente wurde durch Vergleich mit einer parallel aufgetragenen 1 kb- oder 100 bp-DNA-Leiter überprüft.

Nach elektrophoretischer Auftrennung der Nukleinsäuren bei einer konstanten Spannung von 80 V wurde unter Anregung mit UV-Licht ($\lambda = 312 \text{ nm}$) die jeweiligen Ethidiumbromid-Nukleinsäure-Banden detektiert.

Bei präparativen Gelen wurde das gewünschte DNA-Fragment unter UV-Licht ausgeschnitten und anschließend gereinigt (3.1.6.2).

3.1.5 Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktionen

3.1.5.1 RT-PCR

Bei RT-PCR-Reaktionen wird zunächst mittels einer reversen Transkription aus einer vorliegenden RNA ein cDNA-Strang synthetisiert, der anschließend als Template für eine PCR eingesetzt wird.

Die RT-PCR wurde mit Hilfe des QIAGEN OneStep RT-PCR Kits gemäß den Angaben des Herstellers mit einem *Thermocycler Gene Amp PCR System 2400* der Firma PE Applied Biosystems durchgeführt. Die OneStep RT-PCR Reaktion ermöglicht, dass die Reverse Transkription und die sich anschließenden DNA-Synthesen in einem Reaktionsansatz erfolgen.

3.1.5.2 Quantitative RT-PCR

Die quantitative RT-PCR-Reaktion wurde mit dem QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit von Qiagen gemäß den Angaben des Herstellers mit dem *Real-Time Thermocycler LightCycler* der Firma Roche durchgeführt.

3.1.5.3 Methylierungsspezifische PCR (MS-PCR)

Die im folgenden beschriebene methylierungsspezifische PCR erfolgte in Anlehnung an eine von Herman et al. beschriebene Methode (Herman et al., 1996).

In einem Reaktionsgefäß (0,5 ml) wurden 100 ng bisulfitmodifizierte DNA (s. 3.1.3), 10 mmol Tris/HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, zwei zur DNA-Matrize komplementäre Oligonukleotide (Primer, je 10 pmol) und 1,25 µl dNTPs (je 2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP) mit MilliQ-Wasser auf 25 µl aufgefüllt. Nach einem 5-minütigen Denaturierungsschritt bei 96°C wurde die PCR-Reaktion durch Zugabe von 0,75 Units *Taq*-Polymerase gestartet. Die anschließende Amplifizierung erfolgte in einem *Thermocycler Gene Amp PCR System 2400* der Firma PE Applied Biosystems, wobei der PCR-Ansatz folgendem Temperaturzyklus 37 mal ausgesetzt wurde: 96°C für 20 sec; einer dem Primerpaar entsprechend geeignete Annealing-Temperatur für 30 sec; 72°C für 30 sec. Abschließend erfolgte ein 5-minütiger Elongationsschritt bei 72°C.

3.1.5.4 PCR mit *Pwo*-DNA-Polymerase

Sollten die PCR-Produkte anschließend in Expressionsvektoren kloniert werden, wurde stets die *Pwo*-DNA-Polymerase verwendet, die aufgrund ihrer Proofreading-Aktivität eine im Vergleich zu der *Taq*-DNA-Polymerase stark verringerte Fehlerrate aufweist.

Die DNA-Amplifikation erfolgte in einem *Thermocycler Gene Amp PCR System 2400* (Perkin Elmer).

3.1.6 Klonierung von DNA in Plasmide

3.1.6.1 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen kann DNA sequenzspezifisch gespalten werden. Die Reaktionsbedingungen für die jeweiligen Restriktionsendonukleasen wurden entsprechend der Angaben des Herstellers gewählt. Dabei wurden zwischen 1-2 µg DNA in einem Reaktionsvolumen von 10-20 µl mit 1-2 U des jeweiligen Enzyms gespalten. Anschließend wurde der Verdau durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert (3.1.4).

3.1.6.2 Reinigung von DNA-Fragmenten

Die Reinigung der DNA aus PCR-Ansätzen sowie die Elution von DNA aus TAE-Agarosegelen erfolgte mit dem „Gene Clean II Kit“ gemäß den Angaben des Herstellers.

3.1.6.3 Ligation

Ligationen von DNA-Fragmenten in Plasmide wurden mit Hilfe des „DNA Rapid Ligation Kits“ der Firma Roche gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.1.6.4 Klonierung von hTFF1 und hTFF3 in prokaryontischen Expressionsvektoren

Um hTFF1 und hTFF3 rekombinant in *E. coli* zu exprimieren, wurden die entsprechenden, kodierenden DNAs ohne das jeweilige endogene Signalpeptid in den prokaryontischen Expressionsvektor pRBI/DsbA2 kloniert. Zunächst wurde hTFF1 cDNA aus dem EST Klon IMAGp998H11349Q mittels einer PCR und hTFF3 cDNA aus SW480 RNA mittels einer RT-PCR amplifiziert. Hierbei wurden eine *StuI*- und eine *HindIII*-Schnittstelle über die Primer eingefügt (s. Tab. 2-3). Schließlich erfolgte die Insertion jeweils über die *StuI/HindIII*-Schnittstellen.

3.1.6.5 Herstellung von eukaryontischen Expressionsvektoren für hTFF3

Für die eukaryontische Expression von hTFF3 wurde zunächst der gesamte kodierende Bereich des *hTFF3*-Gens zusammen mit dem endogenen Signalpeptid aus Gesamt-RNA von SW480 Zellen amplifiziert. Dabei wurde über Primer (Tab. 2-3) die Schnittstellen *BamHI* und *EcoRI* eingeführt; anschließend wurde nach Restriktionsverdau das DNA-Insert über die entsprechenden Schnittstellen in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA6/V5-HisB ligiert.

Für die Konstruktion eines N-terminal FLAG-getagten hTFF3 Expressionsvektors wurde die hTFF3-cDNA ohne das endogene Signalpeptid aus hTFF3-pcDNA6/V5-

HisB mit Primern (Tab. 2-3) mittels PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde über die *HindIII*- und *EcoRI*-Schnittstelle in den pFLAG-CMV3-Vektor inseriert.

3.1.7 Sequenzierung von DNA

Für eine Sequenzierreaktion wurden 1 µg DNA, 10 pmol Primer und 4 µl BigDye Terminator Sequenzier-Mix mit H₂O auf 10 µl aufgefüllt. Die anschließende *Cycle Sequencing* PCR-Reaktion wurde in dem Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer) durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen der PCR waren dabei wie folgt: 1 min, 94°C, 25× (10 s, 96°C; 5 s, 55°C; 4 min, 60°C), 15°C.

Nicht eingebaute Didesoxynukleotide wurden durch Gelfiltrationssäulchen der Firma Edge BioSystems nach Angaben des Herstellers abgetrennt. Die Probe wurde anschließend über eine Speed-Vac für 12 min auf ca. 5 µl eingeeengt, mit 20 µl Template Suppression Reagenz versetzt und während eines 3-minütigen Inkubationsschritts bei 95°C denaturiert. Die Sequenzierung wurde auf einem ABI Prism Genetic Analyzers 310 der Firma Perkin Elmer Applied Biosystems durchgeführt.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Transformation von *E.coli*-Zellen

- LB-Medium: 1 % (w/v) Bacto-Tryptone, 5 % (w/v) Bacto-Yeast Extract, 86 mM NaCl
- LB-Amp-Agar: 1,5 % (w/v) Agar in LB-Medium; 50 µg/ml Ampicillin

Die im folgenden beschriebene Transformation eines Plasmids in kompetente *E. coli* Zellen der Stämme DH5α und JM83 erfolgte in Anlehnung an eine von Hanahan beschriebene Methode (Hanahan, 1983). Für 10 min wurde Plasmid-DNA mit 50 µl kompetenten Zellen auf Eis inkubiert und im Anschluss 2 min bei 42°C erhitzt. Nach Zugabe von 300 µl LB-Medium erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei 37°C.

Zur Selektionierung der transformierten Bakterien wurde die Bakteriensuspension auf LB-Amp-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank kultiviert.

3.2.2 Kultivierung und Transfektion von eukaryontischen Zellen

3.2.2.1 Allgemeine Hinweise

- DMEM-Medium: DMEM High Glucose (4,5 g/l); 10 % (v/v) hitzeinaktiviertes FKS; 100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin; 1 % (v/v) Glutamax
- RPMI 1640-Medium: RPMI 1640-Basismedium; 10 % (v/v) hitzeinaktiviertes FKS; 100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin; 1 % (v/v) Glutamax
- Kollagen A-Lösung: 0,1 mg/ml Kollagen A in PBS

Eukaryontische Zellen wurden in einem Begasungs-Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Sämtliche Zellkulturarbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Für die Zellkultur wurden ausschließlich steril verpackte Einmalartikel oder Materialien verwendet, die zuvor in einem Autoklaven bei 120°C mit Wasserdampf sterilisiert wurden.

Die Kultivierung der HEK293, MDCK, SW480 und SW620 Zellen erfolgte in DMEM-Medium auf Zellkulturschalen, die Kultivierung der HT29/B6 Zellen entsprechend in RPMI 1640-Medium.

Für alle quantitativen Analysen wurden die Zellen auf mit Kollagen A beschichteten Zellkulturschalen ausgesät. Die Beschichtung mit Kollagen A erfolgte durch eine 15-minütigen Inkubation der Zellkulturschalen mit Kollagen A-Lösung.

Alle 2-3 Tage wurde das Zellkulturmedium entfernt, die Zellen zweimal mit Dulbecco's-PBS gewaschen und anschließend mit frischem Medium versehen.

3.2.2.2 Passagieren adhärenter Zellen

Zum Passagieren konfluent gewachsener Zellen wurde das Medium abgesaugt. Die Zellen wurden zweimal mit Dulbecco's-PBS gewaschen und für 2 bis 5 min mit 3 ml Trypsin-EDTA-Lösung inkubiert. Nachdem die Trypsinlösung entfernt und die Zellen durch Klopfen von der Zellkulturschale gelöst worden waren, konnten die Zellen durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren in frischem Medium vereinzelt werden. Die Zellen wurden anschließend zentrifugiert (4 min, 310 × g, RT) und der Überstand entfernt. Anschließend wurden die Zellen in frischem Medium aufgenommen. In der Regel wurden die Zellen in einer 1:10 Verdünnung auf neuen Zellkulturschalen ausgesät. Das Passagieren der Zellen erfolgte alle 3-5 Tage.

3.2.2.3 Bestimmung der Zellvitabilität

- Trypanblau-Lösung: 0,5 % (w/v) Trypanblau in PBS

Im Gegensatz zu toten Zellen, die Trypanblau aufnehmen und sich folglich tiefblau färben, können vitale Zellen diesen Farbstoff aus ihrem Zellinneren ausschließen. Folglich erscheinen lebende Zellen im mikroskopischen Bild hell und können somit von toten Zellen unterschieden werden.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 20 µl der Zellsuspension mit 20 µl Trypanblau-Lösung gemischt. Diese Suspension wurde für 5 min bei RT inkubiert und anschließend in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Dabei wurde die Zahl der lebenden Zellen, welche sich innerhalb der vier Großquadrate der Neubauer-Zählkammer befinden, unter dem Mikroskop ermittelt. Die Zelldichte der ursprünglich eingesetzten Zellsuspension wurde nach folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Zelldichte (Zellen/ml)} = 2 \times (\text{Zahl lebender Zellen} / 4) \times 10^4 \times \text{ml}^{-1}$$

3.2.2.4 Einfrieren und Auftauen eukaryontischer Zellen

- Gefriermedium: DMEM- bzw. RPMI 1640-Medium, 10 % (v/v) DMSO, 20 % (v/v) FKS

Einfrieren von Zellen:

Zur Langzeit-Lagerung wurden Zellen von einer konfluent gewachsenen Zellkulturschale gelöst (3.2.2.2) und durch mehrfaches Pipettieren in frischem Medium vereinzelt. Nach Zentrifugation der Zellsuspension (4 min, 310 × g, RT) und Entfernung des Überstands wurden die pelletierten Zellen in 1 ml Gefriermedium resuspendiert und in 1,5 ml Kryoröhrchen überführt. Mit Hilfe des Zelleinfriergeräts Nicool LM10 (Geräteeinstellung: 30 min Stufe 3; 10 min Stufe 10) wurden die Zellen eingefroren und anschließend sofort in einen Tank über flüssigem Stickstoff gelagert.

Auftauen von Zellen:

Um Zellen in Kultur zu nehmen, wurden Zellen aus dem Stickstofftank entnommen und schnell im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in 10 ml Kulturmedium, welches zuvor auf 37°C vorgewärmt worden war, überführt. Nach Zentrifugation (4 min, 310 × g, RT) und Entfernung des Überstands wurden die Zellen in frischem Kulturmedium resuspendiert und in Zellkulturschalen ausplattiert.

3.2.2.5 Transfektion von eukaryontischen Zellen

3.2.2.5.1 Kalziumphosphat-Transfektion

- 2× HBS-Puffer (HEPES-buffered saline): 55 mM HEPES/NaOH pH 7,00-7,06; 274 mM NaCl; 1,5 mM Na₂HPO₄

Für die Transfektion wurden $7,5 \times 10^5$ HEK293 Zellen pro Well einer 6-Well-Platte ausgesät und über Nacht im Begasungs-Brutschrank inkubiert.

Zur Erzeugung der DNA-Kalziumpräzipitate wurden 5 µg Plasmid-DNA in 250 µl einer 250 mM CaCl₂-Lösung gelöst und anschließend tropfenweise unter ständigem Mischen in ein Polystyrolröhrchen überführt, in welches 250 µl 2× HBS-Puffer vorgelegt worden waren. Während der nachfolgenden 20-minütigen Inkubation bei RT bildeten sich DNA-Kalziumphosphatpräzipitate aus.

Die Suspension mit den Präzipitaten wurde anschließend tropfenweise unter sanftem Schwenken der Zellkulturschale gleichmäßig in dem Zellkultur-Medium verteilt. Nach 7 h Inkubation im Begasungs-Brutschrank wurden die DNA-Präzipitate durch zweimaliges Waschen mit Dulbecco's-PBS entfernt. Nach Zugabe von frischem Kulturmedium wurden die Zellen für weiter 40-42 h kultiviert, bevor sie für folgende Analysen verwendet wurden.

3.2.2.5.2 Transfektion mit FuGene

Die Transfektion von HT29/B6 und MDCK Zellen wurde mit dem FuGENE 6 Transfektionsreagenz vorgenommen. Die Durchführung erfolgte gemäß dem Standardprotokoll des Herstellers.

3.2.3 Selektionierung stabil transfizierter Einzelklone

Die Voraussetzung für eine stabile Expression eines rekombinanten Proteins ist die stabile Integration der transfizierten DNA in das Wirtsgenom. Um im Anschluss an eine Transfektion stabil transfizierte Zellen zu erhalten, kann man Zellen mit Expressionsplasmiden transfizieren, welche neben der Expression des gewünschten Genprodukts auch die Expression eines Antibiotika-Resistenzgens vermitteln. Im Anschluss an die Transfektion werden die Kulturbedingungen durch Zugabe des jeweiligen Antibiotikums so verändert, dass nur die stabile Integration des Resistenzgens das Überleben einer Zelle gewährleisten kann.

Zum Erhalt stabil transfizierter Zellen wurden Transfektionen mit Expressionsplasmiden vorgenommen, welche neben der Expression des gewünschten Genprodukts auch die Expression des Neomycin/Geneticinresistenzgens vermittelten. Die vom Neomycin/Geneticinresistenzgen kodierte Aminoglycosid-Phosphotransferase ermöglicht den Zellen das Überleben in geneticinhaltigem Zellkulturmedium.

Zur Selektionierung resistenter Zellen wurden zwei Tage nach der Transfektion mit FuGENE die transfizierten Zellen in einer 1:4 Verdünnung auf vier neue Zellkulturschalen ausgesät und das Zellkulturmedium wurde mit 1 mg/ml Geneticin (G418) versehen. Unter Beibehaltung der Geneticinkonzentration im Zellkulturmedium starb in den folgenden 2-3 Wochen ein Großteil der Zellen ab. Um einzelne, genecitinresistente Klone zu isolieren, wurden die Zellen zunächst 5 min mit Dulbecco's-PBS bei 37°C inkubiert. Anschließend konnten selektiv Zellen jeweils eines Klons mit Hilfe einer sterilen Pipette in eine neue Kulturschale überführt werden.

Nach der Isolierung stabiler Klone wurden die Zellen bei einer reduzierten Geneticinkonzentration von 0,2 mg/ml weiterkultiviert.

3.2.4 Proliferationsassay

- FDA-Stammlösung: 10 µg/µl Fluoresceindiacetat in DMSO
- FDA-Lösung: FDA-Stammlösung 1:1000 verdünnt in PBS

Für die Bestimmung der Proliferationsrate wurden 10^3 HT29/B6 Zellen in ein Well einer 96-Well-Platte ausgesät. Die Quantifizierung der Zellzahlen erfolgte nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten im Brutschrank mit Hilfe eines Fluoresceindiacetatassays (FDA-Assay). Bei diesem Assay werden Zellen mit farblosem Fluoresceindiacetat versetzt, welches nach Aufnahme in intakte, stoffwechselaktive Zellen von cytoplasmatischen Esterasen zu Fluorescein hydrolysiert wird. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS wurde der überschüssige Puffer durch Trockenklopfen auf Papiertüchern vorsichtig entfernt. Anschließend wurde die frisch zubereitete FDA-Lösung (200 µl pro Well) zugegeben. Es folgte eine 15-minütige Inkubation im Bruttschrank, bevor die Fluoreszenzsignale (Anregungswellenlänge: 485 nm, Emission: 538 nm) gemessen wurden.

3.2.5 Migrationsassay

Für den *in vitro* Zellmigrationsassay wurde die Gummiedichtung von 8-Well *chamber slides* auf eine Zellkulturschale mit einem Raster gelegt. Anschließend wurde in die durch die Gummiedichtung vorgegebenen Felder je 150 µl Zellsuspension mit jeweils $0,5 \times 10^5$ Zellen pipettiert. Einen Tag nach Aussaat der Zellen wurde die Gummiabdichtung vorsichtig entfernt. Durch mehrmaliges, behutsames Waschen mit PBS wurden anschließend lose Zellen entfernt und nach Zugabe von frischem Zellkulturmedium für weitere 3 Tage inkubiert. Um zu bestimmen, wie schnell sich die Zellen in die zunächst zellfreien Bereiche der Zellkulturschale bewegen, wurden in zeitlichen Intervallen Phasenkontrastaufnahmen gemacht.

3.3 Proteinbiochemische und immunologische Methoden

3.3.1 Expression und chromatographische Reinigung rekombinanter Proteine

3.3.1.1 Genexpression in *E.coli*

- LB/Amp.-Medium: 1% (w/v) Bacto-Tryptone; 5 % (w/v) Bacto-Yeast Extract; 86 mM NaCl; 50 µg/ml Ampicillin

Die Expressionsplasmide (hTFF1-pRBI/DsbA2 und hTFF3-pRBI/DsbA2) wurden in *E. coli* JM83 transformiert. 1 l LB/Amp.-Medium wurden mit einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C unter Schütteln (210 Upm) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,9–1,1 kultiviert. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG in der Gegenwart von 5 mM Acetylcystein induziert und erfolgte für 15 h unter weiterem Schütteln bei 30°C.

3.3.1.2 Periplasma-Aufschluss

- MOPS-Puffer: 10mM MOPS/NaOH, pH 7,0; 5 mM EDTA; 150 mM NaCl; 1 mg/ml Polymyxin B Sulfat

Die Bakterien wurden durch Zentrifugation (6000 x g, 10 min, 4°C) pelletiert und in 40 ml MOPS-Puffer resuspendiert. Nach zweistündigem, leichtem Rühren bei 4°C wurde die Bakteriensuspension erneut zentrifugiert (35000 x g, 30 min, 4°C) und abschließend wurde der Überstand (Periplasma-Extrakt) gegen 10 mM Ameisensäure dialysiert.

3.3.1.3 Ionenaustauscherchromatographie über SP Sepharose Fast Flow

Zur Vorbereitung der chromatographischen Reinigung wurde eine Säule mit einem Gelbett von ca. 4 ml SP Sepharose Fast Flow gegossen und mit eiskalter 20 mM Ameisensäure äquilibriert (Flußrate: 1,0 ml/min). Im Anschluss wurde der dialysierte Periplasma-Extrakt auf die Säule aufgetragen (Flußrate: 0,5 ml/min). Um nichtbindende Proteine zu entfernen, wurde die Säule zunächst mit 40 ml kalter 20 mM Ameisensäure gewaschen (Flußrate: 1,0 ml/min); durch Anlegung eines NaCl-Gradienten von 0-1 M NaCl wurde das TFF-Peptid eluiert (Flußrate: 1,0 ml/min, Fraktionsvolumen: 2 ml, UV-Detektion bei 280 nm) eluiert. Je 10 µl pro Fraktion wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend durch Coomassie-Blau Färbung nachgewiesen. Alle Fraktionen, die das TFF-Peptid in ausreichenden Konzentrationen enthielten, wurden vereinigt, mit Centricon YM-3 aufkonzentriert und gegen PBS dialysiert.

3.3.2 Lyse von Zellen

- TX-100-Lysispuffer: 10 mM Imidazol, pH 6,8; 0,1 M KCl; 0,3 M Saccharose; 2 mM MgCl₂; 10 mM EGTGA; 1 mM NaF; 1 mM Na₂MbO₄; 1 mM NaVO₃; 0,2 % (v/v) Triton X-100; Complete-EDTA
- SDS-Lysispuffer: 50 mM Tris/HCl, pH 6,8; 2 % (w/v) SDS; 250 U/ml Benzonase

Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, mit einer möglichst geringen Menge an Lysispuffer für 10 min bei 4°C lysiert und anschließend unter Verwendung eines „Cell-Lifters“ (Costar, Corning NY, USA) von der Zellkulturschale geschabt. Die unlöslichen Zellbestandteile werden durch Zentrifugation (10 min, 4°C, 20800 x g) pelletiert und der resultierende Überstand bis zur weiteren Untersuchung bei -20°C aufbewahrt.

3.3.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Jeweils 20 µl der Proteinlösung wurden mit 200 µl BCA-Reagenz versetzt und für 30 min unter leichtem Schütteln bei 37°C inkubiert. Die Extinktionsmessung erfolgte in einem Plattenleser gegen den verwendeten Puffer als Leerwert. Für die Erstellung einer Eichkurve wurde BSA in einem Konzentrationsbereich von 0,05-0,5 µg/µl in entsprechendem Puffer eingesetzt.

3.3.4 SDS-Gelelektrophorese

- Elektrophoresepuffer: 24,8 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,01 % (w/v) SDS
- 2x SDS-Probenpuffer: 65 mM Tris/HCl pH 6,8; 3 % (w/v) SDS; 30 % (w/v) Glycerin; 5 % (w/v) 2-Mercaptoethanol; 4 mg/ml Bromphenolblau; 4 mg/ml Pyronin G

Die elektrophoretische Trennung von Proteingemischen erfolgte nach der von Laemmli beschriebenen diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) (Laemmli, 1970). Für die Elektrophorese wurde das vertikale Gelelektrophoresesystem der Firma C.B.S für Gele der Größe 80 x 85 x 0,75 mm verwendet.

Die Acrylamidkonzentration des Sammelgels betrug 5,0 % (v/v) und die des Trenngels 7,5 %, 10 % oder 14 %. Die Zusammensetzung der einzelnen Lösungen ist im folgenden Pipettierschema zusammengefaßt:

Lösungen	Sammelgel	Trenngel		
		7,5 %	10 %	14 %
30 % Acrylamid 0,8 % Bisacrylamid	0,50 ml	2,50 ml	3,33 ml	4,60 ml
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	—	2,50 ml	2,50 ml	2,50 ml
0,5 M Tris/HCl pH 6,8	0,83 ml	—	—	—
10 % (w/v) SDS	33,30 µl	100,00 µl	100,00 µl	100,00 µl
ddH ₂ O	1,60 ml	4,79 ml	3,96 ml	2,70 ml
10 % (w/v) APS	33,30 µl	100,00 µl	100,00 µl	100,00 µl
TEMED	6,70 µl	13,40 µl	13,40 µl	13,40 µl

Die angegebenen Volumina beziehen sich jeweils auf 2 Sammel- bzw. Trenngele. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von TEMED gestartet.

Die durch die Elektrophorese zu trennenden Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit 2× SDS-Probenpuffer versetzt, 3 min bei 95°C im Heizblock denaturiert und in die Taschen des Gels geladen. Die Elektrophorese wurde bei 13 mA gestartet, so dass die Proben langsam in das Sammelgel einwandern konnten und konzentriert wurden. Im Trenngel erfolgte die Elektrophorese bei einer Stromstärke von 20 mA, bis die durch den Farbstoff Pyronin G definierte Lauffront am unteren Ende des Gels angelangt war.

3.3.5 Gelfärbung und Trocknung

- Färbelösung: 30 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Ethanol; 0,1 % (w/v) Coomassie Brillant Blau R-250
- Entfärberlösung: 10 % (v/v) Essigsäure; 40 % (v/v) Ethanol

Das zu färbende Polyacrylamidgel wurde für 30 min in der Färbelösung inkubiert und anschließend unter mehrfachem Wechsel solange in Entfärberlösung geschüttelt, bis die Hintergrundfärbung vollständig verschwunden war. Die Nachweisgrenze für die Färbung liegt im Bereich von 0,1–2 µg Protein pro Bande.

Das in Wasser äquilibrierte zu trocknende Gel wurde in gewässerter Cellophanfolie luftblasenfrei eingeschlagen. Die Trocknung erfolgte unter Vakuum zwischen Filterpapier auf einem Geltrockner bei 80°C für eine 1 h.

3.3.6 Western Blot und Immunodetektion

- Anodenpuffer 1: 300 mM Tris/HCl pH 9,4
- Anodenpuffer 2: 30 mM Tris/HCl pH 9,4
- Kathodenpuffer: 25 mM Tris/HCl; 40 mM Aminocapronsäure; 0,1 % (w/v) SDS
- TST-Puffer: 150 mM NaCl; 0,1 % (v/v) Tween 20; 10 mM Tris/HCl pH 7,5

Western Blot:

Mit der von Towbin et al. eingeführten Methode des Elektrotransfers können gelelektrophoretisch getrennte Proteine auf Membranträger (z. B. Nitrocellulose oder PVDF) übertragen werden (Towbin et al., 1979). Die Proteine werden so weiteren Untersuchungen zugänglich gemacht.

Der Elektrotransfer erfolgte in einer Trans-Blot Semi Dry-Apparatur in einem diskontinuierlichen Puffersystem. Hierzu wurden zwischen zwei horizontale Platinelektroden nacheinander ein in Anodenpuffer 1 getränktes Filterpapier, ein in Anodenpuffer 2 getränktes Filterpapier, eine in Anodenpuffer 2 equilibrierte PVDF-Membran, das proteinhaltige Gel sowie drei im Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere gelegt. Die Proteine wurden über einen Zeitraum von 8 min (hTFF3 und FLAG-hTFF3), 45 min (ZO-1 und ZO-2) und 15-20 min (alle weiteren Proteine) bei 2,8 mA/cm² auf die Membran transferiert.

Immunodetektion:

Die auf einer PVDF-Membran fixierten Proteine wurden durch spezifische Primärantikörper und über Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper mittels der enzymatischen Umsetzung eines Chemilumineszenzsubstrats nachgewiesen.

Die Membran wurde für 1 h in TST-Pufferlösung abgesättigt und anschließend für 1 h mit in TST-Puffer verdünntem Primärantikörper inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TST-Puffer für je 5 min wurde die Membran weitere 30 min mit einem gegen den Primärantikörper gerichteten, Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper inkubiert, welcher ebenfalls in TST-Puffer verdünnt wurde. Im Anschluß folgten wiederum drei Waschschrte mit TST-Puffer für je 5 min.

Die Detektion der entstandenen Immunkomplexe erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers durch enzymatische Umsetzung eines Chemolumineszenz-Substrats (Lumi-Light Western Blotting Substrate oder Lumi-Light^{PLUS} Western Blotting Substrate) durch die Peroxidase. Das dabei entstehende Lumineszenzsignal wurde mit Hilfe eines Lumineszenz-Imager oder Röntgenfilms detektiert. Die Expositionszeiten im Lumineszenz-Imager bzw. auf einem Röntgenfilm variierten je nach Signalstärke zwischen 30 s und 30 min.

3.3.7 Immunpräzipitation

- Protein A Sepharose CI-4B 1:1 in Lysis-Puffer; 0,2 % (w/v) BSA)
- *low salt*-Puffer: 100 mM HEPES/NaOH pH 6,8; 10 mM KCl; 0,1 mM EDTA; 0,1 mM EGTA; 1 mM NaF; 1 mM Na₂MbO₄; 1 mM NaVO₃

Immunpräzipitation mit dem monoklonalen anti-hTFF3-Antikörper:

Für den Nachweis der Expression und Sekretion von hTFF3 bzw. FLAG-getagtem hTFF3 wurde der Zellkultur-Überstand von transient transfizierten Zellen zentrifugiert (10 min, 20800 x g, 4°C) und jeweils 5 ml Überstand mit 30 µl Protein A Sepharose auf einem Über-Kopf-Schüttler vorabsorbiert (30 min, 4°C). Anschließend wurden die Protein A Sepharose Beads durch Zentrifugation (3 min, 2700 x g, 4°C) sedimentiert und der Überstand mit 2 µg anti-hTFF3 Antikörpern unter ständiger Rotation bei 4°C für 30 min inkubiert. Dabei bilden sich Antigen-Antikörper Komplexe aus, die nach 1 h Inkubation mit Protein A Sepharose (40 µl einer 1:1 Suspension) durch Zentrifugation (2 min, 2700 x g, 4°C) abgetrennt wurden. Unspezifisch bindende Proteine wurden durch viermaliges Waschen mit je 400 µl PBS entfernt. Durch 5-minütiges Aufkochen in 18 µl 2 x SDS-Probenpuffer (3.3.4) wurden die präzipitierten Proteinkomplexe von den Protein A Beads eluiert, die anschließend durch Zentrifugation (2 min, 20800 x g, RT) abgetrennt wurden. Die im Überstand befindlichen Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt (3.3.4), geblottet und mittels Immundetektion nachgewiesen (3.3.6).

Immunpräzipitation mit anti-FLAG-Antikörper:

Die IP mit dem anti-FLAG M2-Antikörper unterschied sich von der vorher beschriebenen IP in folgenden Punkten: i) es wurden 4 ml Zellkultur-Überstand mit 8 ml eiskaltem *low salt*-Puffer versetzt und anschließend mit Protein A Sepharose vorabsorbiert; ii) es wurden 4 µg anti-FLAG M2-Antikörper verwendet; iii) das Waschen der Präzipitat erfolgt mit dem *low-salt*-Puffer.

Immunpräzipitation mit anti-E-Cadherin-Antikörper:

Um den E-Cadherin/Catenin-Komplex aus Zelllysaten zu isolieren, wurden Zellen mit dem TX-100-Lysispuffer lysiert (3.3.2). Nach Vorabsorbition mit 30 µl Protein A Sepharose und einer 30-minütigen Inkubation mit 1 µg anti-E-Cadherin Antikörper wurden der Antigen-Antikörper-Komplex wie oben beschrieben mit Protein A Sepharose-Beads isoliert. Nach viermaligem Waschen mit je 400 µl TX-100-Lysispuffer wurde der präzipitierte Protein-Komplex wie oben beschrieben eluiert und elektrophoretisch aufgetrennt.

3.3.8 Pulse Chase-Experimente

- RPMI 1640-Medium: RPMI 1640-Basismedium; 10 % (v/v) hitzeinaktiviertes, dialysiertes FKS; 100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin; 1 % (v/v) Glutamax

HT29/B6-Zellen wurden 36 h nach Aussaat zweimal mit PBS gewaschen und für 30 min in Methionin-freiem Zellkulturmedium kultiviert. Durch Zugabe von 80 µCi des *Pro-mix-[³⁵S]-in vitro cell labelling-Mixes* wurden die zellulären Proteine für 30 min radioaktiv markiert (*Pulse*). Im Anschluß wurde durch zweimaliges Waschen mit PBS die freie Radioaktivität entfernt und die Zellen mit nicht-radioaktivem Zellkulturmedium inkubiert (*Chase*). Nach einer weiteren Kultivierung für 0 h, 5 h und 10 h wurden die Zellen für die weitere Untersuchung lysiert (3.3.2).

Um die Lysate hinsichtlich ihres Gehaltes an radioaktiv markiertem E-Cadherin zu untersuchen, wurde zunächst die Proteinkonzentration der Lysate bestimmt (3.3.3). Danach wurde aus jeweils 500 µg Zelllysate die Menge an radioaktiv markierten Proteinen mittels Immunopräzipitation (3.3.7), SDS-PAGE (3.3.4) und Autoradiographie analysiert. Die Radioaktivität der Banden wurde mit einem Phospho- und Fluoreszenz-Imager Fuji FLA-3000 quantifiziert.

3.3.9 Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie

3.3.9.1 Nachweis von Komponenten des E-Cadherin/Catenin-Komplexes und der *Tight Junctions*

- Blocklösung: 0,1 % (v/v) Kaninchen-Serum in PBS

Nach dem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 10 Minuten mit -20°C kaltem Methanol fixiert, mit PBS gewaschen und anschließend mit Blocklösung für 30 min bei Raumtemperatur blockiert. Anschließend wurden die fixierten Zellen mit 200 µl Primärantikörper (Verdünnung in Blocklösung; siehe 2.3.4.1) für 30 min bei RT inkubiert, dreimal mit Blocklösung gewaschen und mit 200 µl fluorophormarkiertem Sekundärantikörper inkubiert (20 min, RT). Nicht gebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit Blocklösung entfernt. Für die Mikroskopie wurden die Deckgläschen mit dem Eindeckmittel ProTaq Mount Fluor auf Objektträger eingebettet und mit einem Immunfluoreszenz-Mikroskop Olympus BX60 analysiert.

3.3.9.2 Nachweis von F-Aktin

- Blocklösung: 0,1% (v/v) Kaninchen-Serum in PBS
- Paraformaldehyd-Lösung: 3 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS; 1 mM CaCl₂; 1 mM MgCl₂

Nach dem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 3 % (w/v) Paraformaldehyd-Lösung fixiert (20 min, RT). Überschüssiges Paraformaldehyd wurde durch Inkubation mit 25 mM Glycin in PBS für 5 min inaktiviert und abgewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 0,1 % (v/v) Triton X-100/PBS-Lösung für 3 min permeabilisiert. Unspezifische Bindungen wurden durch 30 min Inkubation mit Blocklösung bei Raumtemperatur unterdrückt. Im Anschluß erfolgte die Aktin-Färbung mit Alexa Fluor 594 Phalloidin entsprechend der Herstellerangabe. Für die Mikroskopie wurden die Deckgläschen mit dem Eindeckmittel ProTaq Mount Fluor auf Objektträger eingebettet und mit einem Immunfluoreszenz-Mikroskop Olympus BX60 analysiert.