

3 Material und Methoden

3.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

3.1.1 Laborgeräte

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
Inkubator 1000, Uni max 1010	Heidolph
Luminometer LB9507	Berthold, Wildbad, Deutschland
Power pac 300	Biorad, München, Deutschland
Speed Vac Uniequip	MS Laborgeräte, Heidelberg, Deutschland
Sequenziergerät ABI310	Perkin Elmer, Langen, Deutschland
Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
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 Verbrauchsmaterial

Agarose	Gibco BRL, Paisley, Scotland
Ampicillin	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
Bacto Agar	Difco, Frankreich
Bidest	Fluka, Steinheim, Schweiz
BigDye Terminator Sequencing Kit	PE Applied Biosystems, Foster City, USA
Bromphenolblau	LKB, Pharmacia, Schweden
BSA (100 x)	NEB, Frankfurt, Deutschland
dATP, dTTP, dCTP, dGTP	Perkin Elmer, Weiterstadt, 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
Fugene 6 Reagenz	Roche, Mannheim, Deutschland
FKS	Biochrom, Berlin, Deutschland
Glycerol	Serva, Heidelberg, Deutschland
Isopropanol	J.T. Backer, Deventer, Holland
Lipofectamin Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Luminometer Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Plus Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Plasmid Midi Kit (Endotoxin free)	Qiagen, Hilden, Deutschland

Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Primer	Metabion, Martinsried, Deutschland
QuickChange Kit	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Reaktionsgefäße	Plastibrand, Wertheim, Deutschland
Reaktionsröhrchen (PCR)	Perkin Elmer, Fostercity, CA, USA
Restriktionsendonukleasen	NEB, Frankfurt, Deutschland
Sequenzier-Röhrchen mit Septum	Applied Biosystems, Fostercity, CA, USA
Standardtips 20 , 10 , 1.000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
SOC	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Sucrose	Serva, Heidelberg, Deutschland
TAE 50 x	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
TBE 10 x	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Tris	Merck, Darmstadt, Deutschland
TSR-Lösung	Applied Biosystems, Fostercity, CA, USA
Zellkulturgefäße	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Zellkulturmedien	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

3.1.3 Puffer und Lösungen

EtBr-Lösung:

10	mg	Ethidiumbromid
1	ml	H ₂ O

10xEMSA-Puffer:

0,5	M	NaCl
0,2	M	Tris-HCl pH 7,5
10	mM	DTT
10	mM	MgCl ₂

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

1 x TBE :

100	mM	Tris, pH 8,4
90	mM	Borsäure
1	mM	EDTA

SOB:

20	g/l	Bacto-Trypton
5	g/l	Bacto-Yeast-Extrakt
0,58	g/l	NaCl
0,19	g/l	KCl
		pH 7,0 mit NaOH einstellen, autoklavieren, anschließend hinzufügen:
10	mM	MgCl ₂

SOC:

100	ml	SOB
2	ml	1M Glukose

1 M Glukose :

18	g	Glukose
ad 100 ml H ₂ O, steril filtrieren		

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		
pH 7,6 mit HCl einstellen		
ad 1 l H ₂ O und 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 einstellen		
ad 1 l H ₂ O		

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

3.1.4 Zelllinien

<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lac^fΔM15 Tn10 (Tet^r)]</i>
HEK293	embryonale menschliche Nierenzelllinie mit epithelialer Morphologie; ATCC Nr. CLR-1573
C57MG	epitheliale Zelllinie der Maus aus Brustdrüsengewebe (Blasband et al., 1992)
C57MG/Wnt-1	C57MG-Zellen, die murines Wnt-1 stabil exprimieren (Blasband et al., 1992)

3.1.5 Primer

TCF REV 8	5`-CAAAATATCCCCTTTGATCTATGATTGT-3`
TCF REV 8M	5`-CAAAATATCCATCGATCGCTATGATTGT-3`
TCF REV 9	5`-ATTTCTCTCTCCTTTGCTTGGCTTCCTC-3`
TCF REV 9M	5`-ATTTCTCTCTATCGATCGTGGCTTCCTC-3`
TCF FOR 8 cy5	5`-ACAATCATAGATCAAAGGGGATATTTTG-3`-Cy5
TCF FOR 8M cy5	5`-ACAATCATAGCGATCGATGGATATTTTG-3`-Cy5
TCF FOR 9 cy5	5`-GAGGAAGCCAAGCAAAGGAGAGAGAAAT-3`-Cy5
TCF FOR 9M cy5	5`-GAGGAAGCCACGATCGATAGAGAGAAAT-3`-Cy5
TCF FOR 8M2	5`-GGACAATCATAGCGATCGATGGATATTTTGGG-3`
TCF REV 8M2	5`-CCCAAATATCCATCGATCGCTATGATTGTCC-3`
TCF FOR 7M1	5`-GCTGGTCGATTCCGTCAAAGGCATCC-3`
TCF REV 7	5`-GGATGCCTTTTGACCTTTGTTACCAGC-3`

TCF REV 7M1	5`-GGATGCCTTTTGGACGGAATCGACCAGC-3`
TCF REV 7M2	5`-GGATGCGTAAGTCCCTTTGTTACCAGC-3`
TCF REV 7M12	5`-GGATGCGTAAGTCCGGAATCGACCAGC-3`
TCF FOR 7 cy5	5`-GCTGGTAACAAAGGTCAAAGGCATCC-3`-Cy5
TCF FOR 7M1 cy5	5`-GCTGGTCGATTCCGTCAAAGGCATCC-3`-Cy5
TCF FOR 7M2 cy5	5`-GCTGGTAACAAAGGGACTTACGCATCC-3`-Cy5
TCF FOR 7M12 cy5	5`-GCTGGTCGATTCCGGACTTACGCATCC-3`-Cy5
Cdx mut1+2 FOR	5`-GGTCAATATTTAATCTGGTGGCTGGATTTTTTGGCGGTCTTCTAGATGC-3`
Cdx mut1+2 REV	5`-GCATCTAGAAGACCGCCAAAAAATCCAGCCACCAGATTAAATATTGACC-3`

3.1.6 Plasmide

pcDNA3.1 (+)	Expressionsvektor (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
pGL3-basic	Reportergenvektor (Promega, Madison, USA)
pRL-null, phRL-null	Coreportervektoren (Promega, Madison, USA)
pCS2 (+)	Expressionsvektor
pCLDN1 proluc A+	Claudin-1-Promotor in pGL3-basic
pCLDN1 proluc A+ mut	pCLDN1 proluc A+ mit inaktivierter LEF/TCF-Bindungsstelle
pCLDN2 proluc A+	Claudin-2-Promotor in pGL3-basic
pCLDN2 proluc A+ mut	pCLDN2 proluc A+ mit inaktivierter LEF/TCF-Bindungsstelle
pCLDN2 proluc A+ cdx mut	pCLDN2 proluc A+ mit inaktivierten Cdx-Bindungsstellen
pCLDN2 proluc A+ Lef cdx mut	pCLDN2 proluc A+ mit inaktivierten LEF/TCF- und Cdx-Bindungsstellen
pcDNA/hTCF-4	humanes TCF-4 Gen in pcDNA3.1 (+)
pCS2 (+)/ β Cat	murines β -Catenin Gen in pCS2 (+)
pCS2 (+)/LEF-1	murines LEF-1 Gen in pCS2 (+)

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 EMSA (Gelretardations-Assay)

Um die potentiellen LEF/TCF Bindungsstellen auf ihre Funktionalität hin zu überprüfen, wurde die Verschiebung der elektrophoretischen Mobilität eines Oligonukleotids nach Protein-Bindung untersucht. Dabei handelt es sich um eine nicht-denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Zunächst wurden zwei komplementäre Oligonukleotide, welche die zu untersuchende Bindungsstelle enthielten, miteinander hybridisiert um einen Doppelstrang zu erhalten. Eines der beiden Oligonukleotide war mit dem Fluorophor „Cyber 5“ (Cy5) markiert, wodurch am Ende der Hybridisierung ein fluoreszenzmarkierter DNA-Doppelstrang vorlag, welcher die potentielle Transkriptionsfaktor-Bindungsstelle enthielt. Dieses Doppelstrang-

Oligonukleotid wurde anschließend mit rekombinatem Glutathione-S-Transferase (GST)-LEF-1 Fusionsprotein inkubiert. Handelte es sich bei dem zu untersuchenden Nukleotidmotiv tatsächlich um eine Bindungsstelle für LEF/TCF so kam es zu einer Bindung des Oligonukleotids an den rekombinanten Bindungsfaktor. Zur Überprüfung dieser Bindung wurde eine native Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Freies Oligonukleotid kann sich zügig durch das Gel bewegen, da DNA durch die Polyacrylmatrix kaum in seiner Wanderung behindert wird. Kommt es jedoch zu einer Interaktion zwischen dem Oligonukleotid und dem rekombinanten Protein, so wird die Wanderungsgeschwindigkeit des Oligos stark vermindert, da die Wanderungsgeschwindigkeit seines Bindungspartners durch die Matrix deutlich geringer ist. Ein Protein-DNA-Komplex aus Transkriptionsfaktor und Oligonukleotid legt in der gleichen Zeit also einen wesentlich kürzeren Weg zurück als das Oligonukleotid alleine. Zur Bestimmung des Wanderungswegs des Oligonukleotids durch das Gel wurde die Elektrophorese beendet und das Gel in einem FLA-3000 Fluoroimager bei 633 nm angeregt. Bei dieser Wellenlänge kam es zur Anregung des Cy5 Fluoreszenzfarbstoffs wodurch die Position des Oligonukleotids im Gel bestimmt werden konnte.

Zur Hybridisierung der beiden komplementären Oligonukleotide wurde folgender Hybridisierungsansatz verwendet:

8	µl	Oligonukleotid (10µM)
8	µl	komplementäres Oligonukleotid (10µM)
1,6	µl	0,5 M NaCl
4	µl	100 mM Tris-HCl pH 7,5
0,8	µl	50 mM EDTA pH 8,0
17,6	µl	H ₂ O

Die Hybridisierung erfolgte im Thermocycler unter folgenden Bedingungen:

1x:	90 °C	1 Minute
Gradient:	70 °C	1 Minute
	-0,01 °C	pro Sekunde
	20 °C	10 Minuten
1x:	4 °C	∞

2 µl des Hybridisierungsansatzes wurden mit 18 µl 1x EMSA Puffer gemischt und für die weiteren Versuche benutzt, der Rest bei -20 °C asserviert.

Es wurde ein Mastermix hergestellt:

10 µl	Oligo-Mix
5 µl	10x EMSA Puffer
5 µl	poly(dI-dC) (0,2 µg/µl)
5 µl	BSA (10µg/µl)
5 µl	H ₂ O

Aus diesem Mastermix wurden jeweils drei Reaktionsansätze angefertigt:

Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3
6 µl Mastermix	6 µl Mastermix	6 µl Mastermix
-	0,5 µl GST-Protein	1 µl GST-LEF-Protein
4 µl H ₂ O	3,5 µl H ₂ O	3 µl H ₂ O

Ansatz 1 diente als Negativkontrolle um eine unspezifische Interaktion zwischen dem Oligonukleotid und Protein (BSA) auszuschließen. Ansatz 2 diente als Kontrolle um eine Bindung zwischen dem Oligonukleotid und dem GST-Anteil des Fusionsproteins auszuschließen. Ansatz 3 stellte den eigentlichen Versuchsansatz zur Interaktion dar.

Alle Ansätze wurden 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert mit 2 µl 6x Probenpuffer (ohne Bromphenolblau) gemischt und auf das native Polyacrylamid-Gel (PAA-Gel) geladen. Das PAA-Gel setzte sich folgendermaßen zusammen:

255	µl	10 x TBE
1,34	ml	30% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)
105	µl	10% Ammoniumpersulfat-Lösung
8,3	ml	H ₂ O
16,25	µl	TEMED

Die Gelmischung wurde zwischen zwei Glasplatten gegossen, ein Kamm gesetzt und das Gel für 30 Minuten auspolymerisieren lassen. Dann wurde das Gel mit den Glasplatten in eine Elektrophoresekammer gespannt und mit TBE-Puffer überschichtet. Es wurde für 30 Minuten eine Präelektrophorese bei 20 V durchgeführt. Anschließend wurden die vorbereiteten Proben auf das Gel geladen und für zwei Stunden bei 40 V aufgetrennt. Nach Ablauf der zwei Stunden wurde die Elektrophorese gestoppt, das Gel zwischen den Glasplatten entfernt und auf den Glasschlitten (Fluorostage) des Fluoroimagers FLA-3000 überführt. Durch Scannen des Gels mittels eines Lasers der Wellenlänge 633 nm erfolgte die Anregung des an das Oligonukleotid gekoppelten Cy5 Farbstoffs.

3.2.2 Gerichtete Mutagenese mittels PCR

Zur gerichteten Mutagenese spezifischer Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen in den Reporter-Gen-Konstrukten wurde das QuickChange Site-Directed Mutagenesis System der Firma Stratagene verwendet. Es handelt sich dabei um ein PCR-System in dem zwei komplementäre Oligonukleotide benutzt werden, welche in ihrer Mitte die gewünschte Mutation tragen und von unmodifizierten Nukleotidsequenzen beiderseits flankiert sind. Mittels dieser Mutagenese-Primer wird eine Amplifikation des zu mutierenden Plasmids durchgeführt. Im Anschluss an die PCR erfolgt eine Behandlung mit dem Restriktionsenzym *Dpn* I, welches spezifische Methylierungen der DNA erkennt und für die Durchführung seiner Schnitte benötigt. Da nur die aus Bakterien gewonnenen nicht-mutierten Ausgangsplasmide, welche als Matrize in der PCR dienen, über diese Methylierungen verfügen, nicht aber die aus der PCR hervorgegangenen mutierten Plasmidstränge, kommt es zum selektiven Abbau der im Reaktionsansatz befindlichen nicht-mutierten Plasmide.

Die durchgeführten PCR-Ansätze setzten sich folgendermaßen zusammen:

5 µl	10x Reaktionspuffer
1 µl	Mutagenese-Primer 1 (10 µM)
1 µl	Mutagenese-Primer 2 (10 µM)
1 µl	nicht-mutagenisiertes Ausgangsplasmid (20 ng)
4 µl	dNTPs (10 mM)
1 µl	<i>Pfu Turbo</i> DNA Polymerase (2,5 U)
37 µl	H ₂ O

Dieser Ansatz durchlief im Thermocycler folgendes Programm:

1x:	95 °C	30 Sekunden
25x:	95 °C	30 Sekunden
	48 °C	15 Sekunden
	55 °C	45 Sekunden
	68 °C	12 Minuten
1x:	72 °C	7 Minuten
	4 °C	∞

Zur Überprüfung des Amplifikationserfolgs wurden 5 µl des PCR-Produktes auf ein 0,8%iges Agarosegel aufgetragen. Den restlichen 45 µl Probe wurde 1 µl der Restriktionsendonuklease *Dpn* I (10U/µl) zugesetzt, gemischt und für eine Stunde bei 37 °C im Heizblock inkubiert.

3.2.3 Transformation von DNA in kompetente Zellen

Die durch die PCR erzeugten mutagenisierten Plasmidstränge wurden in XL1-Blue kompetente Zellen transformiert. Dabei handelt es sich um einen *E. coli*-Bakterienstamm, der durch chemische Behandlung DNA Moleküle leicht aufnehmen kann. Diese Bakterien besitzen eine Transformationsrate $\geq 10^8$ Transformanten/ μg Plasmid-DNA. Die kompetenten *E. coli*-Bakterienzellen wurden auf Eis vorsichtig aufgetaut. Jeweils 50 μl Suspension mit kompetenten Zellen wurden mit 1,5 μl des *Dpn* I behandelten PCR-Mutagenese-Ansatzes in ein vorgekühltes Greinerröhrchen gegeben. Es folgte eine Inkubation für 30 Minuten auf Eis. Danach erfolgte die eigentliche Transformation durch einen Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42°C. Die Ansätze wurden zur Regeneration für 2 Minuten auf Eis gestellt. Es erfolgte die Zugabe von 500 μl SOC-Medium und eine einstündige Inkubation bei 37°C und 250 rpm in einem Tischinkubator. Nach Ablauf der Inkubation wurden zweimal 275 μl des Transformationsansatzes auf zwei Agarplatten ausgestrichen, welche 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin enthielten. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Entstandene Kolonien wurden zur Amplifikation und weiteren Analyse in LB-Flüssigmedium überimpft.

3.2.4 Plasmid Miniprep

Mit einer Bakterienkolonie wurden 5 ml LB-Medium, welche 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin enthielten, angeimpft und über Nacht bei 37°C und 225 rpm inkubiert. 1,5 ml der Bakteriensuspension wurden in ein Eppendorf-Röhrchen überführt und für 1 Minute bei 5.000 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 und 14.000 rpm zentrifugiert. 900 μl Überstand wurde mit 450 μl Isopropanol gemischt und bei 4°C und 14.000 rpm für 30 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 250 μl 70% Ethanol gewaschen und für 15 Minuten erneut bei 4°C und 14.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde für 5 Minuten in der Speedvac getrocknet und in 50 μl Wasser resuspendiert. Die Lagerung der DNA-Präparation erfolgte bei -20°C.

3.2.5 Plasmid Midiprep

100 ml LB-Medium mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin wurden mit 330 μl einer frischen Übernachtskultur angeimpft und über Nacht bei 37°C und 225 rpm inkubiert. 3 mal 30 ml

Bakterienkultur wurden in je ein Falcon-Röhrchen überführt und für 15 Minuten bei 4°C mit 7.000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen, die Pellets in je 3,3 ml P1-Puffer resuspendiert und gepoolt. Der Suspension wurden 10 ml P2-Puffer zugegeben, sie wurde vorsichtig 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-Röhrchen (ca. 25 ml) filtriert. Danach wurde das klare Lysat mit 2,5 ml ER-Puffer gemischt, vorsichtig sechsmal invertiert und für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Eine Qiagen TIP-100 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 10,5 ml Isopropanol wurde bei 4°C und 15.000 g für 30 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 5 ml 70% Ethanol (Endotoxin-frei) gewaschen und bei 15.000 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. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt, 100 ng der DNA auf ein Agarosegel aufgetragen und der Rest der Präparation bei -20°C asserviert.

3.2.6 Quantifizierung von DNA

Die Quantifizierung der aus den Midipräparationen gewonnenen Plasmide erfolgte photometrisch. Hierzu wurde ein Gene Quant II Photometer der Firma Pharmacia Biotech verwendet. Es wurden 100 µl einer 1:50 Verdünnung der Plasmidlösung in eine Quarzküvette pipettiert und in das Photometer gestellt. Das Gerät bestimmte die Absorption der Lösung bei 260 nm Wellenlänge und errechnete selbständig unter Berücksichtigung der Verdünnung die Ausgangskonzentration der vermessenen Probe.

3.2.7 Restriktionsanalyse

Unter einer Restriktionsanalyse versteht man den Einsatz von Restriktionsendonukleasen um gezielte Schnitte in DNA-Strängen vorzunehmen. Dies wird ermöglicht durch die Tatsache, dass die verwendeten Nukleasen spezifische Nukleotidsequenzen erkennen und nur im Bereich dieser Sequenzen eine spezifische Spaltung des DNA-Strangs vornehmen.

Zur Überprüfung der Mutagenesen der LEF/TCF Bindungsstellen in den Claudin-1 Reporter-Gen-Konstrukten wurde hierzu die Endonuklease *Pvu* I benutzt. Die Veränderung der Nukleotidsequenz der LEF/TCF Bindungsstelle wurde so gewählt, dass es nicht nur zu einer Inaktivierung der Transkriptionsfaktor-Bindung kam, sondern gleichzeitig auch zur Entstehung einer *Pvu* I Erkennungssequenz. Somit zeigten die mutagenisierten Reporterkonstrukte ein verändertes Fragmentierungsmuster gegenüber den nicht-mutagenisierten Reporterkonstrukten, da sie eine zusätzliche *Pvu* I Schnittstelle enthielten. Die Restriktionsansätze setzten sich folgendermaßen zusammen:

2 µl	Reporter-Gen-Plasmid (aus Miniprep nach der Mutagenese)
2 µl	Puffer #3 (New England Biolabs)
2 µl	BSA
1 µl	<i>Pvu</i> I (5U)
13 µl	H ₂ O

Die Ansätze wurden für 2 Stunden bei 37°C inkubiert und die entstandenen Fragmente anschließend mittels Agarosegel Elektrophorese aufgetrennt.

3.2.8 Agarosegel Elektrophorese

Die Agarosegel Elektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe. Durch den Einsatz von Markern, d.h. DNA-Fragmenten bekannter Größe, kann so eine Größenbestimmung vorgenommen werden. Im Falle der Restriktionsanalysen mit *Pvu* I war es somit möglich eine Größenbestimmung der erzeugten DNA-Fragmente durchzuführen, und damit eine Veränderung des Fragmentierungsmusters zu untersuchen, wie es durch die zusätzliche *Pvu* I Schnittstelle zu erwarten war. Zur Herstellung der Gele wurde die Agarose in 1x TAE-Puffer mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid in der Mikrowelle aufgeköcht bis die Agarose vollständig geschmolzen war. Die flüssige Gelmasse wurde in einen Gelschlitten gegossen und es wurde ein Kamm eingesetzt, um die Taschen für die spätere Probenaufnahme zu bilden. Das Gel wurde für ca. 30 Minuten bis zum vollständigen Erstarren stehen gelassen. Der Schlitten wurde in eine Elektrophoresekammer gelegt, die Kammer mit 1x TAE-Puffer mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid aufgefüllt und der Kamm aus dem Gel gezogen. Die zu untersuchenden Proben wurden mit 1/6 Vol. 6x DNA Probenpuffer versetzt und zusammen mit geeigneten Markern in die Geltaschen pipettiert. Es wurde eine Spannung von 1,5 V/cm angelegt. Das Fortschreiten der Elektrophorese

konnte Anhand der Wanderung des im Probenpuffer enthaltenen Bromphenolblau-Farbstoffs optisch verfolgt werden.

3.2.9 Sequenzierung von DNA

Zur Verifizierung der Promotorsequenzen in den eingesetzten Reporterkonstrukten wurde eine Sequenzierung des Promotorbereiches durchgeführt. Hierbei kam die Didesoxy- oder Kettenabbruch-Methode von F. Sanger zum Einsatz (Sanger et al., 1977). Es handelt sich um eine enzymatische Reaktion. Der zu sequenzierenden DNA wird ein komplementärer Primer zugegeben, welcher durch DNA-Polymerase verlängert wird. Neben den Desoxynukleotiden (dNTP), die für diese Elongation notwendig sind, enthält der Ansatz fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide (ddNTP). Didesoxynukleotide besitzen keine 3'-OH Gruppe, und können somit an ihrem 3'-Ende nicht mit einem anderen Nukleotid verknüpft werden. Kommt es während der Strangsynthese zum Einbau eines solchen Didesoxynukleotids führt dies zum Abbruch der Elongation. Die Wahrscheinlichkeit eines solchen Einbaus wird bestimmt durch das Verhältnis von dNTP zu ddNTP. Somit entsteht im Reaktionsansatz ein Gemisch aus DNA-Fragmenten unterschiedlicher Längen. Diese Fragmente werden im Anschluss an die Reaktion über eine Kapillarelektrophorese voneinander getrennt. Die mit unterschiedlichen Fluorophoren markierten Fragmente werden über einen Laser detektiert. Die so erzeugten Elektropherogramme können mittels geeigneter Computerprogramme ausgewertet werden.

Die Sequenzierungsansätze enthielten:

2	µl	Premix
500	ng	Plasmid-DNA
10	pmol	Primer
ad 10	µl	H ₂ O

Die Ansätze durchliefen im Thermocycler folgendes Programm:

1x:	96 °C	5 Minuten
25x:	96 °C	10 Sekunden
	55 °C	5 Sekunden
	60 °C	4 Minuten
1x:	4 °C	∞

Im Anschluss an die eigentliche Sequenzierungsreaktion im Thermocycler wurden die überschüssigen Nukleotide entfernt. Eine Centriflex Säule wurde dafür 2 Minuten

bei 750 g zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und das Eluat verworfen. Die gesamten 10 µl des Sequenzierungsansatzes wurden in die Mitte des Gelbettes der Säule pipettiert und es erfolgte eine erneute Zentrifugation für 2 Minuten bei 750 g. Das Eluat wurde in der Speedvac für 15 Minuten eingeeengt. Die resultierenden 5 µl Restvolumen wurden mit 20 µl TSR Reagenz versetzt und für 3 Minuten bei 96°C denaturiert. Danach wurde die Probe für 2 Minuten auf Eis inkubiert. Die fertig aufgearbeitete Probe wurde kurz anzentrifugiert, in ein Sequencer-Gefäß überführt und mit einem Septum verschlossen. Die Ermittlung der Sequenz erfolgte durch Prozessierung der Probe in einem ABI 310 Sequencer.

3.2.10 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. Anschließend wurden die Bakterien bei -80°C gelagert.

3.3 Zellkulturtechniken

3.3.1 Anzucht von eukaryontischen Zellkulturen

Zur Durchführung der Versuche wurden die permanenten Zelllinien HEK293 und C57MG benutzt. HEK293 ist eine humane Nierenzelllinie; bei C57MG handelt es sich um eine epitheliale Zelllinie der Maus aus Brustgewebe. HEK293 Zellen wurden in MEME Medium mit 10% FKS und 1% Penicilin/Streptomycin propagiert. C57MG Zellen wurden in DMEM mit 10% FKS und 1% Penicilin/Streptomycin gehalten. Ein C57MG Subklon, der stabil das murine sekretorische Glykoprotein Wnt-1 exprimiert (C57MG/Wnt-1) (Blasband et al., 1992), erhielt zusätzlich G418 in einer Konzentration von 200 µg/ml in das Kulturmedium. Die Haltung der adhärennten Zelllinien erfolgte in Schalen oder Flaschen aus Kunststoff bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5% in einem begasbaren Brutschrank.

Die Zellen wurden zweimal wöchentlich im Verhältnis 1:10 für C57MG und 1:20 für HEK293 umgesetzt. Hierzu wurde zunächst das Kulturmedium entfernt; die Zellen wurden danach einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml

Trypsin/EDTA-Lösung für 5 Minuten im Brutschrank inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurden die abgelösten Zellen in frischem Kulturmedium aufgenommen, verdünnt und bei Bedarf auf mehrere Kulturgefäße umgesetzt.

3.3.2 Zellzählung

Um eine gleichmäßige Zellmenge zu gewährleisten, wurde vor der Aussaat der Zellen für Transfektionen eine Zellzählung vorgenommen. Hierzu wurde ein Aliquot der Zellsuspension mittels einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Die Berechnung erfolgte nach Bestimmung der Zellzahl in allen vier Eckquadraten nach der Formel :

$$(\text{Zellzahl in allen vier Eckquadraten}) \times 2,5 \times 10^3 = \text{Zellzahl/ml}$$

3.3.3 DNA Transfer in eukaryote Zellen

Die Transfektion von HEK293 Zellen erfolgte mittels des Transfektionsreagenzes FuGENE 6 der Firma Roche. Dabei handelt es sich um ein lipidbasierendes Transfektionsreagenz.

Ein bis zwei Tage vor der Transfektion wurden in 6-Loch-Schalen 1×10^6 bzw. 5×10^5 Zellen je Vertiefung ausgesät, und mit 5ml Medium im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach der ein- bis zweitägigen Inkubation wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß 92 µl Medium ohne FKS und Antibiotika vorgelegt, mit 8 µl FuGENE 6 Reagenz versetzt und für 5 min bei RT inkubiert. Es wurden 2 µg zu transfizierende DNA zugegeben, durch leichtes Schütteln gemischt und für 30 min bei RT inkubiert. Die 2 µg zu transfizierende DNA enthielt 0,5 µg des jeweiligen Reportergen-Vektors, 5-50 ng Coreporter-Vektor, bis zu zwei Expressionsplasmide (je 0,5 µg). Die Gesamtmenge von 2 µg DNA wurde durch Auffüllen der Ansätze mit pcDNA3.1 (als Füllplasmid) erreicht. Während dieser Inkubation wurde das Medium von den Zellen abgenommen und durch 2 ml Medium ohne FKS und ohne Antibiotika ersetzt. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Transfektionsansätze tropfenweise auf die Zellen gegeben und für 2 Stunden im Brutschrank (37°C; 5%CO₂) inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation erfolgte die Zugabe von 4 ml Medium mit FKS und Antibiotika. Die Zellen wurden zur Expression des Reportergens für weitere 48 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Die Transfektion der C57MG bzw. der C57MG/Wnt-1 Zellen erfolgte mittels Lipofectamin und Plusreagenz der Firma Invitrogen. Bei dieser Methode wird die DNA zunächst mittels des Plusreagenzes komplexiert, um anschließend in polykationische Lipidvesikel verpackt zu werden. Hierzu wurden am Vortag der Transfektion in 6-Loch-Schalen 5×10^5 C57MG Zellen je Vertiefung ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde je Transfektion 200 μ l Medium ohne FKS und Antibiotika mit 4 μ l Plusreagenz und 1 μ g zu transfizierender DNA in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gemischt und für 15 min bei RT inkubiert. Während der Inkubation wurden in einem zweiten 1,5 ml Reaktionsgefäß 200 μ l Medium ohne FKS und Antibiotika mit 6 μ l Lipofectamin gemischt. Nach Ablauf der Inkubation wurden die beiden Ansätze vereint. Die Probe wurde gemischt und erneut für 15 min bei RT inkubiert. Die zu transfizierenden Zellen wurden einmal mit 5 ml PBS gewaschen, und es wurde 1 ml Medium ohne FKS und Antibiotika zugegeben. Die Transfektionssansätze wurden tropfenweise auf die Zellen gegeben. Es folgte eine Inkubation für vier Stunden im Brutschrank. Anschließend wurden 4 ml Medium mit FKS und Antibiotika zugegeben und die Zellen zur Expression des Reportergens für weitere 20 Stunden im Brutschrank inkubiert.

3.3.4 Dual-Reporter-Gen-Assay

Unter dem Begriff "Dual-Reporter" versteht man die Expression und Messung zweier voneinander unabhängiger Reporterenzyme in einem einzigen System. Dabei korreliert einer der beiden Reporter mit dem Effekt der spezifischen experimentellen Bedingungen, während die Aktivität des zweiten cotransfizierten Reporters eine interne Kontrolle darstellt, welche die Basalaktivität repräsentiert. Durch die Normalisierung der Aktivität des experimentellen Reporters zur Aktivität des Kontroll-Reporters können experimentelle Schwankungen minimiert werden, wie sie z.B. durch Unterschiede in der Zellviabilität oder der Transfektionseffizienz entstehen können.

Als Reporter zur Auswertung der Promotorregulationen wurden die beiden Luciferasegene *Pluc* und *Rluc* benutzt. Bei *Pluc* handelt es sich um das Luciferasegen des Leuchtkäfers *Photinus pyralis*, welches als experimenteller Reporter benutzt wurde. *Rluc* ist das Luciferasegen der Weichkoralle *Renilla reniformis*, und wurde als Kontroll-Reporter verwendet. Die in dieser Arbeit benutzten Reporter-Gen-Konstrukte pCLDN1 proluc A+, pCLDN2 proluc A+ sowie deren mutagenisierte Varianten (-mut;

-cdx mut; -Lef cdx mut; siehe **3.1.6**) exprimieren *P/luc* unter der Kontrolle des Claudin-1- bzw. Claudin-2-Promotors. Die Coreporter pRL-null und phRL-null exprimieren *R/luc*, bzw. ein synthetisch optimiertes *hR/luc* in Abwesenheit eines Promotors. Die Expressions-Plasmide für die nukleären Effektoren des Wnt-Signalwegs pcDNA/hTCF-4, pCS2 (+)/ β Cat und pCS2 (+)/LEF-1 wurden von Prof. Dr. Otmar Huber zur Verfügung gestellt, für dessen freundliche Unterstützung ich mich an dieser Stelle ausdrücklich bedanken möchte.

Die zuvor transfizierten Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 750 μ l 1x Passiv-Lyse-Puffer für 30 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurden die Zellen mit einer Pipettenspitze abgeschabt und die Suspension in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Das Lysat wurde zweimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei 37°C wieder aufgetaut. Es folgte eine Zentrifugation bei 14.000 g für 2 Minuten. Der Überstand wurde abgenommen, in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und anschließend sofort vermessen oder bei -80°C asserviert. Die Auswertung erfolgte in einem Luminometer der Firma Berthold (LB 9507).

20 μ l des aufgearbeiteten Zelllysats wurden in einem Luminometer-Röhrchen vorgelegt. Der Probe wurden durch Injektion im Luminometer 100 μ l Luciferase Assay Reagenz zugesetzt und nach einer Verzögerung von 2 Sekunden wurde für 10 Sekunden die Lichtreaktion luminometrisch vermessen. Der so gemessene Wert entsprach der Aktivität des experimentellen Reporters. Nach Abschluss der Messung injizierte die Maschine automatisch 100 μ l Stop-and-Glo Reagenz und führte nach einer Verzögerung von 2 Sekunden eine erneute Messung von 10 Sekunden durch. Dieser Messwert repräsentierte die Aktivität des Kontroll-Reporters. Für jede Probe wurden zwei Messungen durchgeführt. Jede Transfektion wurde innerhalb eines experimentellen Ansatzes mindestens doppelt, vereinzelt sogar dreifach ausgeführt, um anschließend einen Mittelwert zu bestimmen. Eine dreifache Durchführung der Transfektionen erfolgte nur in der Anfangsphase der Experimente, da sich zeigte, dass aufgrund der geringen Streuung eine Doppelbestimmung ausreichend war.

Die Standardisierung erfolgte innerhalb der Gruppe der gleichbehandelten Transfektionen, um eine Beeinflussung des Kontroll-Reporters durch die nukleären Effektoren des Wnt-Signalwegs auszuschließen. Zunächst wurde der Mittelwert der Kontroll-Reporter Werte gebildet. Die Division dieses Werts durch die einzelnen Kontroll-

Reporter Werte lieferte die Faktoren, welche mit den Werten ihrer korrespondierenden experimentellen Reporter Werte multipliziert wurden. Zu Beginn der Experimente wurde zusätzlich eine Korrektur der Reporter Werte über die Gesamtproteinmenge der Proben vorgenommen. Diese Proteinkorrektur zeigte jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Ergebnisse der Assays, daher wurde in den folgenden Experimenten darauf verzichtet. Bei der Auswertung der Transfektionen in die C57MG Zellen wurde eine andere Standardisierung gewählt. Da zwei unterschiedliche Zelllinien miteinander verglichen wurden, nämlich Wnt sezernierende C57MG-Zellen und C57MG-Zellen ohne Wnt-Sekretion, erfolgte die Standardisierung direkt über den Kontroll-Reporter. Auf diese Weise können Effekte durch unterschiedliche Transfizierbarkeit oder Wachstumsraten der Zelllinien ausgeschlossen werden. Hierzu wurden die experimentellen Reporter Werte durch ihre Kontroll-Reporter Werte dividiert. Die so erhaltenen normalisierten Reporter Werte wurden direkt miteinander verglichen

Jedes Experiment wurde mindestens viermal unabhängig voneinander durchgeführt. Die Mittelwerte der unabhängigen Experimente, sowie ihre zugehörigen 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 $P \leq 0,05$ angesehen. Bei der Testung mehrerer experimenteller Ansätze gegen eine Kontrolle wurde eine Bonferroni-Korrektur für multiple Testungen durchgeführt.