

## **2 Material**

### **2.1 Allgemeine Hinweise**

Die in dieser Arbeit verwendeten, geschützten Warenzeichen sind nicht als solche gekennzeichnet. Aus dem Fehlen einer Kennzeichnung kann demnach nicht geschlossen werden, dass der entsprechende Produktname frei von den Rechten Dritter ist.

Alle Lösungen und Puffer wurden – falls nicht anders angegeben – mit Wasser aus einer Wasseraufbereitungsanlage der Firma Millipore hergestellt. Dieses Wasser hat einen Reinheitsgrad, der mit bidestilliertem Wasser vergleichbar ist. Die verwendeten Materialien für die Zellkultur und für die molekularbiologischen Methoden waren entweder steril verpackte Einmalartikel oder sie wurden vor ihrer Benutzung in einem Autoklaven bei 120°C für 20 min dampfsterilisiert.

### **2.2 Laborgeräte**

#### **2.2.1 Bakterien und Zellkultur**

- Begasungsbrutschrank Function Line (Heraeus-Christ, Hanau)
- Branson Sonifier Ultraschall (Ultraschall & Labortechnik, Schwäbisch Gmünd)
- Brutschrank Function Line (Heraeus-Christ, Hanau)
- Lichtmikroskop Axiovert 25 (Zeiss, Oberkochen)
- Sterile Werkbank Hera Safe HS12 (Heraeus-Christ, Hanau)
- Varioklav Dampfsterilisator (H+P Labortechnik, Oberschleißheim)
- Stickstofftank zur Lagerung von Zellen (Taylor-Wharton, Hollywood, USA)
- Dr. Lange Universal-Thermostat Wasserbad (Lange, Berlin)
- Warmluft-Rundschüttler HT (Infors AG, Bottmingen, CH)
- Nicoool LM10 (Gefriergerät für Zellen, Air Liquide, Bussy Saint Georges, France)

#### **2.2.2 Elektrophorese und Western Blot**

- Elektrophorese-Apparatur Dual Vertikal Mini Gel (C.B.S., Del Mar, CA., USA)
- Horizontales Elektrophorese-System Multiphor II (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
- Netzgeräte:
  - Electrophoresis Power Supply EPS 3500 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
  - Power Pac 300 (Bio-Rad, München)
  - Standard Power Pack P25 (Biometra, Göttingen)
- Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, München)

### 2.2.3 Zentrifugen

- Kühlzentrifuge Sorvall Evolution RC Superspeed mit SS34- und GSA-Rotoren (Kendro, Bad Homburg)
- Tischzentrifuge 5417C (Eppendorf, Hamburg)
- Tischzentrifuge 5417R, gekühlt (Eppendorf, Hamburg)
- Ultrazentrifuge Optima L90K mit Ti70.1 und Ti60 Rotoren (Beckman Instruments GmbH, München)
- Vakuumzentrifuge Centrivac (Heraeus-Christ, Hanau)
- Zellzentrifuge Megafuge 2.0R, gekühlt (Heraeus-Christ, Hanau)

### 2.2.4 Sonstige Geräte

- ABI Prism Genetic Analyzer 310 (PE Applied Biosystems/ Perkin Elmer, Weiterstadt)
- Film-Entwicklereinheit Optimax TR (MS Laborgeräte, Heidelberg)
- Geltrockner Model 583 (Bio-Rad, München)
- Gene Amp PCR System 2400 (PE Applied Biosystems, Langen)
- Heizblock QBT (Grant Instruments, Cambridge; UK)
- Immunfluoreszenz-Mikroskop BX60 (Olympus, Hamburg)
- LightCycler (Roche Applied Science, Mannheim)
- Luminometer Lumat LB 9507 (Berthold Technologies, Bad Wildbad)
- Lumineszenz-Imager LAS 1000 (Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt)
- MS1 Minishaker (IKA-Labortechnik, Staufen)
- MultiCal pH526 pH Meter (WTW, Weilheim)
- Multiplate Reader SpectraMax 340PC (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)
- Phospho- und Fluoreszenz-Imager Fuji FLA-3000 (Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt)
- UV-Photometer DU640 (Beckman Instruments GmbH, München)

## 2.3 Verbrauchsmaterialien

### 2.3.1 Chemikalien

- Acrylamid, Rotiphorese GEL 30 (Roth, Karlsruhe)
- Agar (Merck, Darmstadt)
- Agarose, ultra pure (GIBCO/BRL, Eggenstein)
- Ammoniumpersulfat (Sigma, München)
- Ampicillin, Natriumsalz (Roth, Karlsruhe)
- Bacto-Agar (Difco, Detroit, USA)
- Bacto-Tryptone (Difco, Detroit, USA)
- Bacto-Yeast Extract (Difco, Detroit, USA)
- Bromphenolblau (SERVA, Heidelberg)
- BSA (Sigma, München)
- Complete-EDTA (Roche Applied Science, Mannheim)
- Complete-EDTA-free (Roche Applied Science, Mannheim)
- dNTPs PCR-Grade (AppliChem, Darmstadt)
- DTT (Sigma, München)
- EDTA (Merck, Darmstadt)
- Ethidiumbromid (Roth, Karlsruhe)
- Fluoresceindiacetat (Sigma, München)
- Hydrochinon (Sigma, München)
- Imidazol (Merck, Darmstadt)
- IPTG (AppliChem, Darmstadt)
- 2-Mercaptoethanol (Merck, Darmstadt)
- Natriumbisulfit (Sigma, München)
- Ninhydrin Sprühreagenz (Merck, Darmstadt)
- Nε-2,4-DNP-L-Lysine (Sigma, München)
- SDS (Merck, Darmstadt)
- TEMED (Sigma, München)
- Tris (Merck, Darmstadt)
- Triton X-100 (Sigma, München)
- Tween 20 (Sigma, München)

Alle weiteren nicht aufgeführten Laborchemikalien wurden in p. A. Qualität von den Herstellern Merck (Darmstadt), Sigma (München) oder SERVA (Heidelberg) bezogen.

### 2.3.2 Zellkulturbedarf

- DMEM High Glucose (PAA GmbH, Cölbe)
- DMSO (Serva, Heidelberg)
- fetales Kälberserum (Biochrom KG Seromed, Berlin)
- Glutamax 100× (GIBCO/BRL, Eggenstein)
- PBS Dulbecco's ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  (PAA GmbH, Cölbe)
- PBS Dulbecco's mit  $\text{Ca}^{2+}$  (0,9 mM) und  $\text{Mg}^{2+}$  (0,5 mM) (PAA GmbH, Cölbe)
- Penicillin/Streptomycin 100× (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe)
- RPMI (PAA GmbH, Cölbe)
- Trypsin-EDTA (GIBCO/BRL, Eggenstein)

### 2.3.3 Molekulargewichtsstandards für Proteine und DNA

- Bench Mark Prestained Protein Ladder (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe)
- Prestained Protein Ladder, ~10-180kDa (Fermentas-GmbH, St. Leon-Rot)
- 100 bp DNA Leiter (GIBCO/BRL, Eggenstein)
- 1kb DNA Leiter (GIBCO/BRL, Eggenstein)
- SDS-7B Molekulargewichtsstandard, vorgefärbt (Sigma, München)

### 2.3.4 Antikörper

#### 2.3.4.1 Primärantikörper

Auflistung der für Western Blots, Immunfluoreszenzanalysen und Immun präzipitationen verwendeten Primärantikörper und ihre eingesetzten Konzentrationen:

Tab. 2-1: Verwendeten Primärantikörper

Antikörper	Antigen	Typ	Konz.	Firma
Anti- $\beta$ -Aktin (Klon AC-15)	$\beta$ -Aktin	mouse IgG <sub>1</sub> , monoklonal	WB 1:2000	Abcam (Acris GmbH, Hiddenhausen)
Anti- $\alpha$ -Catenin	$\alpha$ -Catenin	mouse IgG <sub>1</sub> , monoklonal	IF : 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ WB: 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	nanoTools, Teningen
Anti- $\beta$ -Catenin (Klon: 14)	$\beta$ -Catenin C-Terminus	mouse IgG <sub>1</sub> , monoklonal	IF : 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ WB: 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-E-Cadherin (Klon: 36)	E-Cadherin, cytoplasma- tische Domäne	mouse IgG <sub>1</sub> , monoklonal	IF : 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ IP : 1 $\mu\text{g}$ WB: 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	BD Biosciences, Heidelberg

(Fortsetzung: Tab. 2-2: Verwendeten Primärantikörper)

Antikörper	Antigen	Typ	Konz.	Firma
Anti-Claudin-1 (JAY.8)	Claudin-1 C-terminus	rabbit Ig, polyklonal	IF : 1 µg/µl WB: 1:1000	Zytomed GmbH, Berlin
Anti-Claudin-2 (MH44)	Claudin-2 C-terminus	rabbit Ig, polyklonal	IF : 1 µg/µl WB: 1:1000	Zytomed GmbH, Berlin
Anti-Claudin-4 (Klon 3E2C1)	Claudin-4 C-terminus	mouse IgG <sub>1</sub> , monoklonal	IF : 1 µg/µl WB: 1 µg/ml	Zytomed GmbH, Berlin
Anti-FLAG M2	FLAG-Tag	mouse IgG <sub>1</sub> , monoklonal	IP : 4 µg WB: 1.5 µg/ml	Sigma, München
Anti-Occludin (Klon OC-3F10)	Occludin C-terminus	mouse IgG <sub>1</sub> , monoklonal	IF : 1 µg/µl WB: 1:500	Zytomed GmbH, Berlin
Anti-TFF3 (Klon 15C6)	hTFF3 N-terminus	mouse IgG <sub>1</sub> , monoklonal	IP : 2 µg WB: 0.1 µg/ml	nanoTools, Teningen
Anti-ZO-1 (ZO1-1A12)	ZO-1 internal	mouse IgG <sub>1</sub> , monoklonal	IF : 1 µg/µl WB: 1:1000	Zytomed GmbH, Berlin
Anti-ZO-2 (Klon 3E8D9)	ZO-2 internal	mouse IgG <sub>1</sub> , monoklonal	WB: 1:1000	Zytomed GmbH, Berlin

#### 2.3.4.2 Sekundärantikörper

Fluorophor-konjugierte Antikörper (Molecular Probes; MoBiTec, Göttingen):

- Alexa Fluor 594 Ziege Anti-Maus IgG (1:500 oder 1:1000)
- Alexa Fluor 594 Ziege Anti-Kaninchen IgG (1:1000)
- Alexa Fluor 594 Phalloidin (1:200)

HRPO-konjugierte Antikörper (Dianova, Hamburg):

- Ziege Anti-Maus IgG (H+L), affinitätsgereinigtes F(ab')<sub>2</sub> Fragment voradsorbiert gegen Serumproteine von Rind, Pferd und Mensch
- Ziege Anti-Kaninchen IgG (H+L), affinitätsgereinigtes F(ab')<sub>2</sub> Fragment voradsorbiert gegen menschliche Serumproteine

Die HRPO-konjugierten Antikörper wurden für die Western Blots 1:10.000 verdünnt.

### 2.3.5 Enzyme, Proteine und Reaktionskits

- CIP (Roche Applied Science, Mannheim)
- BCA-Protein Assay Reagent Kit (Pierce, Weiskirchen)
- DNA Sequencing Kit - BigDye Terminator Cycle Sequencing v2.0 Ready Reaction (PE Applied Biosystems)
- Gene Clean II Kit (Bio101, Heidelberg)
- Lumi-Light Western Blotting Substrate (Roche Applied Science, Mannheim)
- Lumi-Light PLUS Western Blotting Kit (Roche Applied Science, Mannheim)
- Plasmid Midi und Maxi Präparationskit (Qiagen, Hilden)
- Promix-L-[<sup>35</sup>S]-invitro cell labelling mix (Amersham Biosciences, Freiburg)
- Pwo-DNA Polymerase (Roche Applied Science, Mannheim)
- QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden)
- QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden)
- Rapid DNA Ligation Kit (Roche Applied Science, Mannheim)
- Restriktionsenzyme (New England Biolabs, Frankfurt bzw. Roche Applied Science, Mannheim)
- RNeasy Midi Kit (Qiagen, Hilden)
- Taq-DNA Polymerase (Roche Applied Science, Mannheim)
- T4-DNA Ligase (Promega, Darmstadt)
- T4-Polynukleotid Kinase (Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf)

### 2.3.6 Sonstiges Verbrauchsmaterial

- Biomax MR Imaging Film (Kodak, Stuttgart)
- Dialyseschläuche, Ausschlußgröße 5 kDa (Roth, Karlsruhe)
- Dialyseschläuche, Ausschlußgröße 10 kDa (Roth, Karlsruhe)
- Edge Gel Filtration Cartridges (Edge Biosystems/MoBiTec, Göttingen)
- Filterpapier Whatman 3MM (Biometra, Göttingen)
- Micropure-EZ, Centrifugal Filter Devices (Millipore, Eschborn)
- Mikrokonzentriervorrichtungen, Centricon 30 (Millipore, Eschborn)
- Nuc Trap Probe Purification Columns (Stratagene, Heidelberg)
- PolyScreen, PVDF Transfer Membrane (Perkin Elmer, Weiterstadt)
- Sterilfilter Minisart, Porengröße 0,2 µm (Sartorius, Göttingen)

Sterile Einwegmaterialien wie Pipetten, Schraubdeckel-Röhrchen, Platten und Schalen für die Bakterien- und Zellkultur wurden von Falcon/Becton-Dickinson (Heidelberg), Nunc (Wiesbaden) oder Greiner Labortechnik (Frickenhausen) bezogen.

## 2.4 Bakterienstämme und eukaryontische Zelllinien

### Bakterienstämme:

<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	Genotyp: F Fd80dlacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZY A-argF)U169 <i>endA</i> 1 <i>recA</i> 1 <i>hsdR</i> 17( <i>r<sub>K</sub></i> <i>m<sub>K</sub></i> <sup>+</sup> ) <i>deoR</i> <i>thi</i> -1 <i>supE</i> 44 1 <i>gyrA</i> 96 <i>relA</i> 1
<i>E. coli</i> JM83	Genotyp: F Fd80dlacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lac-proAB) <i>ara</i> <i>rpsL</i>

### Eukaryontische Zelllinien:

HEK293	humane, embryonale Nierenzelllinie; adhären
HT29/B6	Subklon der colorectalen Zelllinie HT29 (Kreusel et al., 1991); adhären; wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Fromm (Institut für klinische Physiologie, Charité, Berlin) zur Verfügung gestellt
MDCK	Hund, Nierenepithelzelllinie; adhären
SW480	Zelllinie eines humanen colorectalen Adenocarcinoms; adhären
SW620	Metastase, die aus dem humanen colorectalen Adenocarcinom hervorging, aus dem die Zelllinie SW480 stammt; adhären

## 2.5 Vektoren und cDNAs

### Vektoren:

pRBI/DsbA2	prokaryontischer Expressionsvektoren; wurde freundlicherweise von Dr. Martina Huber-Wunderlich, ETH Zürich, zur Verfügung gestellt
pcDNA6/V5-HisB	eukaryontischer Expressionvektor; Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
pCS2+	eukaryontischer Expressionsvektor; wurde freundlicherweise von Dr. Ralph Rupp, Max Planck Institut für Entwicklungs- biologie, Tübingen, zur Verfügung gestellt
pCMV3-FLAG	eukaryontischer Expressionsvektor; Sigma, München

### cDNAs:

Die hTFF1-cDNA wurde aus dem EST-Klon IMAGp998H11349Q (Deutsches  
Ressourcen Zentrum für Genomforschung GmbH (RZPD), Berlin) amplifiziert.

Die hTFF3-cDNA wurde durch RT-PCR aus Gesamt-RNA der Zelllinie SW480  
amplifiziert.

## 2.6 Oligonukleotide

Synthetische Oligonukleotide für DNA-Sequenzierungen sowie für PCR- und RT-PCR-Reaktionen wurden bei Metabion (Martinsried) bezogen.

In der Tabelle Tab. 2-3 sind die Oligonukleotide aufgelistet, die zur Amplifikation der verwendeten cDNA und die nachfolgende Klonierung der PCR-Produkte in die jeweiligen Expressionsvektoren benötigt wurden. In den Tabellen Tab. 2-4 und Tab. 2-5 sind die Primer für die RT-PCR-Reaktionen sowie für die methylierungsspezifischen PCR-Reaktionen aufgelistet:

Tab. 2-3: Primer für die Amplifizierung der verwendeten cDNA

Bezeichnung	Sequenz	Schnittstelle
hTFF1 forw. in pRBI/DsbA2	5´- CGC AGG CCT CAG AGG CCC AGA CAG AGA CG -3´	StuI
hTFF1 rev. in pRBI/DsbA2	5´- CGC GAA TTC AAG CTT TCA CTA AAA TTC ACA CTC CTC TTC -3´	HindIII
hTFF3 forw. in pRBI/DsbA2	5´- CGC AGG CCT CAG AGG AGT ACG TGG GCC TGT C -3´	StuI
hTFF3 rev. in pRBI/DsbA2	5´- CGC GAA TTC AAG CTT CTA TCA GAA GGT GCA TTC TGC TTC -3´	HindIII
hTFF3 forw. in pcDNA6/V5-HisB	5´- GCG GGA TCC GCC GCC ATG GCT GCC AGA GCG CTC -3´	BamHI
hTFF3 rev. in pcDNA6/V5-HisB	5´- CGC GAA TTC AAG CTT CTA TCA GAA GGT GCA TTC TGC TTC -3´	EcoRI
hTFF3 forw. in pFLAG-CMV3	5´- TTG AAT TCT AAG CTT GAG GAG TAC GTG GGC CTG -3´	HindIII
hTFF3 rev. in pFLAG-CMV3	5´- GCG GCG GAA TTC TCA GAA GGT GCA TTC TGC -3´	EcoRI



Tab. 2-4: Primer für RT-PCR-Reaktionen

Bezeichnung	Sequenz
β-Aktin forw.	5´- TCC TGG GCA TGG AGT CCT GTG -3´
β-Aktin rev.	5´- CGC CTA GAA GCA TTT GCG GTG -3´
E-Cadherin forw.	5´- CCC TAC GTA TAC CCT GGT GGT -3´
E-Cadherin rev.	5´- TTG CAA TCC TGC TTC GAC AGG -3´
Claudin-1 forw.	5´- GAG CGA GTC ATG GCC AAC GCG -3´
Claudin-1 rev.	5´- GCC TCT GTG TCA CAC GTA GTC -3´
Claudin-2 forw.	5´- AGG TCT GCC ATG GCC TCT CTT -3´
Claudin-2 rev.	5´- CCT GGT TCT TCA CAC ATA CCC -3´
E12/E47 forw.	5´- TCT CGC TAT TTC TGC TGC TGT TCC -3´
E12/E47 rev.	5´- CGC CGC CTG TCC CCG TTC TGT -3´
SIP1 forw.	5´- TGG CAA GCG CTT CTC ACA C -3´
SIP1 rev.	5´- GCA AGT AAG CCC GGT TCA TCA -3´
Slug forw.	5´- CTC ACA CGG GGG AGA AGC C -3´
Slug rev.	5´- TGG AGA AGG TTT TGG AGC AG -3´
Snail-1 forw.	5´- AGG CCC TGG CTG CTA CAA G -3
Snail-1 rev.	5´- ACA TCT GAG TGG GTC TGG AG -3´

Alle in dieser Tabelle angegebenen Sequenzen sind von den humanen Gensequenzen abgeleitet.

Tab. 2-5: Primer für methylierungsspezifische PCR-Reaktionen

Bezeichnung	Sequenz
meth. CpG-Insel 1 forw.	5´- TTA GGT TAG AGG GTT ATC GCG T -3´
meth. CpG-Insel 1 rev.	5´- TAA CTA AAA TTC ACC TAC CGA C -3´
Unmeth. CpG-Insel 1 forw.	5´- TAA TTT TAG GTT AGA GGG TTA TTG T -3´
Unmeth. CpG-Insel 1 rev.	5´- CAC AAC CAA TCA ACA ACA CA -3´
Meth. CpG-Insel 2 forw.	5´- GGG TTT ATT TGG TTG TAG TTA C -3´
Meth. CpG-Insel 2 rev.	5´- CGA ATC GAA CCG AAC TAA AAC G -3´
Unmeth. CpG-Insel 2 forw.	5´- TTG TGT TGT TGA TTG GTT GTG GTT -3´
Unmeth. CpG-Insel 2 rev.	5´- ACT CAC AAA TAC TTT ACA ATT CCA ACA -3´