

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen  
Abteilung Innere Medizin I  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Gregor

DRA (down-regulated in adenoma) –  
Entwicklung eines Systems für die Erforschung der  
Regulation des intestinalen Anionenaustauschers DRA

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen

vorgelegt durch  
Sina Speck, geb. Schmitz  
aus Saarbrücken

2010

Dekan:	Professor Dr. I. B. Authenrieth
1. Berichterstatter:	Privatdozent Dr. G. Lamprecht
2. Berichterstatter:	Privatdozent Dr. N. Stefan

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Abkürzungen .....	6
1 Einleitung.....	8
1.1 Wasser- und Elektrolytresorption im Gastrointestinaltrakt.....	8
1.2 Kongenitale Chlorididiarrhoe .....	9
1.3 DRA.....	10
1.3.1 Entdeckung von DRA.....	10
1.3.2 Struktur von DRA .....	11
1.3.3 Proliferationshemmung durch DRA.....	13
1.3.4 Intestinaler Anionenaustausch durch DRA.....	14
1.4 PDZ-Adapterproteine.....	14
1.5 Expression von Proteinen.....	16
1.5.1 Heterologe Proteinexpression .....	16
1.5.2 Induzierbare Genexpression .....	19
1.5.2.1 Ecdyson-induzierbares System .....	19
1.5.2.2 Tretrazyklin-induzierbares/-reprimierbares System .....	20
1.6 Fragestellung/ Ziel der Arbeit: Entwicklung eines Systems für die Erforschung der Regulation von DRA .....	21
2 Material und Methoden .....	23
2.1 Zellkultur.....	23
2.1.1 Zellen .....	23
2.1.1.1 Caco-2.....	23
2.1.1.2 EcR293.....	23
2.1.1.3 TetOff293.....	24
2.1.2 Nährmedien.....	24
2.1.3 Killing Curves .....	24
2.1.3.1 Killing Curve für klonale EcR293/pEGFP-DRA-Zellen und Hygromycin B.....	25
2.1.3.2 Killing Curve für Caco-2-Zellen und Zeocin .....	25
2.1.3.3 Killing Curve für Caco-2/pTetOff-Zellen und Hygromycin B.	26

2.1.3.4	Killing Curve für EcR293-Zellen und G418 .....	26
2.1.3.5	Killing Curve für 293TetOff-Zellen und Hygromycin B .....	26
2.1.4	Kultivierung der Zellen und Arbeitsvorgänge .....	27
2.1.4.1	Passagieren .....	27
2.1.4.2	Langfristige Aufbewahrung der Zellen .....	27
2.1.4.3	Auftauen .....	28
2.1.4.4	Gewinnung klonaler Zelllinien .....	28
2.1.4.5	Induktion mit PonasteroneA .....	29
2.1.4.6	Repression der Genexpression mittels Doxycyclin im TetOff-System .....	29
2.1.4.7	Gewinnung von Zellmaterial für RNA-Nachweis .....	29
2.2	Transfektion .....	30
2.3	Mikroskopie und Fotodokumentation .....	32
2.4	Fluoreszenz-Messungen .....	32
2.4.1	Mikrofluorometrie-Meßplatz .....	32
2.4.2	Bestimmung des intrazellulären pH mittels BCECF .....	33
2.5	PCR (polymerase chain reaction) .....	34
2.5.1	Präparation der RNA mittels RNAqueous <sup>TM</sup> -4PCR, Kit for Isolation of DNA-free RNA (Ambion <sup>®</sup> ) .....	35
2.5.2	Konzentrationsbestimmung der RNA .....	36
2.5.3	Gewinnung von first-strand cDNA aus RNA mittels SuperScript <sup>TM</sup> II Reverse Transcriptase .....	36
2.5.4	Amplifizierung mittels PCR .....	36
2.5.5	Auftrennung im Agarose-Gel .....	37
3	Ergebnisse .....	39
3.1	Antibiotika-Konzentrationen .....	39
3.1.1	Hygromycin B-Konzentration für klonale EcR293/pEGFP-DRA -Zellen .....	39
3.1.2	Zeocin-Konzentration für Caco-2-Zellen .....	40
3.1.3	Hygromycin B-Konzentration für Caco-2/pTetOff-Zellen .....	41
3.1.4	G418-Konzentration für EcR293-Zellen .....	41
3.1.5	Hygromycin B-Konzentration für TetOff293-Zellen .....	42

3.2	Kontrolle der Transfektionseffizienz.....	43
3.3	Zelllinien aus gemischten Klonen und klonale Zelllinien.....	45
3.4	Transfektion von DRA in Caco-2-Zellen .....	45
3.4.1	Stabile Transfektion von Caco-2-Zellen mit pEGFP/f.l.DRA-5'Kozak.....	46
3.4.2	Stabile Transfektion des Ecdysone-induzierbaren Systems in Caco-2-Zellen .....	48
3.4.3	Induzierbare Transfektion von DRA in Caco-2/pVgRxR-Zellen	49
3.4.4	Stabile Transfektion des Tetrazyklin-reprimierbaren Systems in Caco-2-Zellen .....	50
3.4.5	Induzierbare Transfektion von Caco-2/pTetOff-Zellen mit DRA.....	50
3.5	Induzierbare Transfektion von DRA in TetOff293-Zellen.....	54
3.6	Transfektion von DRA in EcR293-Zellen .....	56
3.6.1	Stabile Transfektion von DRA in EcR293-Zellen.....	56
3.6.2	Messung der DRA-Aktivität .....	58
3.6.3	Induzierbare Transfektion von DRA in EcR293-Zellen.....	61
3.7	Induzierbare Transfektion von DRA-Adapterproteinen in stabil und konstitutiv DRA exprimierenden EcR293-Zellen .....	62
3.7.1	Transfektion von EcR293-Zellen mit DRA-Adapterproteinen ..	63
3.7.2	Transfektion von DRA-Adapterproteinen in EcR293/pEGFP- DRA-Zellen.....	65
4	Diskussion .....	71
4.1	Regulation von DRA.....	71
4.2	Entwicklung einer Zelllinie, in welcher DRA induzierbar heterolog überexprimiert werden kann.....	72
4.3	Induzierbare Expression von PDZ-Adapterproteinen in stabil DRA exprimierenden Zellen.....	76
5	Zusammenfassung .....	80
	Abbildungsverzeichnis.....	82
	Literaturverzeichnis .....	87
	Danksagung.....	93

# Abkürzungen

AE	Anion Exchanger
AS	Aminosäure
BCECF	2',7'-bis-(2-carboxylethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein
bp	base pair
bzw.	beziehungsweise
cDNA	complementary DNA
CFTR	cystic fibrosis transmembrane- conductance regulator
Cl	Chlorid
CLD	chloride loosing diarrhea
Da	Dalton
DIDS	4,4'-Diisothiocyanostilben-2',2'-Disulfonsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid, (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> SO
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DRA	down-regulated in adenoma
DsRed	Discosoma sp. Red
EDTA	ethylene diamine tetracetic acid
EGFP	Enhanced Green Fluorescence Protein
E3KARP	NHE3 kinase A regulatory protein
FCS	fetal calf serum
g	Gramm
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Bikarbonat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
M	Molar
mg	Milligramm
Min.	Minute(n)
Mio.	Million/en

ml	Milliliter
mM	millimolar
mRNA	messenger RNA
ms	Millisekunde/n
Na	Natrium
NHE	Natrium-Proton-Exchanger/ $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher
NHERF	NHE3 regulatory factor
nm	Nanometer
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDZ	postsynaptic density-95 / discs large / zonula occludens-1
pHi	intrazellulärer pH
RNA	ribonucleic acid
rpm	rounds per minute
sec.	Sekunde(n)
sog.	sogenannt
TAE	Tris-Acetate-EDTA
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TMA	Tetramethylammoniumhydroxid
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Trometamol)
W	Watt
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{m}$	Mikrometer
$\mu\text{M}$	mikromolar

# **1 Einleitung**

## **1.1 Wasser- und Elektrolytresorption im Gastrointestinaltrakt**

Der Gastrointestinaltrakt spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation des Wasser- und Elektrolythaushalts. Entsprechend genau sind die Sekretions- und Absorptionsprozesse reguliert.

Über die Schleimhäute des gesunden Darms werden täglich ca. 9l Flüssigkeit resorbiert. Sie setzen sich zusammen aus ungefähr 2l über Nahrung und Getränke aufgenommener Flüssigkeit und ungefähr 7l Speichel, Magensaft, Gallenflüssigkeit, Pankreassekret und vom Darm sezernierter Flüssigkeit. Der größte Teil wird rückresorbiert, sodass mit dem Stuhl nur ca. 0,1 – 0,2l ausgeschieden wird. Der Austausch so großer Flüssigkeitsmengen wird durch die Faltung der Darmschleimhaut mit Villi und Mikrovilli ermöglicht, die die Oberfläche etwa um den Faktor 600 vergrößert. Der Transport von Wassermolekülen aus dem und in das Darmlumen ist ein passiver Vorgang. Das Wasser folgt den aktiv transportierten Elektrolyten. Entscheidend ist hier die Resorption von Natriumchlorid.

Die Resorption von Natrium, Chlorid und anderen Elektrolyten erfolgt im Darm entweder passiv entlang eines chemischen und/ oder elektrischen Gradienten oder aktiv entgegen diesem Gradienten. Der elektrochemische Gradient wird durch die basolateral gelegene  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase aufrecht erhalten und ermöglicht andere Transportvorgänge als so genannten sekundär aktiven Transport. Im distalen Ileum und im Kolon wird auf der Basis des nach intrazellulär gerichteten Natrium- und Chlorid-Gradienten die elektroneutrale Natriumchloridabsorption durch gekoppelten  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ - und  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch vermittelt.

Für den  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austausch kommen prinzipiell die aus der SLC9-Familie stammenden Isoformen NHE2 und NHE3 in Betracht, die in den apikalen Membranen von Dünndarm und Kolonepithel exprimiert werden (16). Schultheis

et al. zeigten, dass jedoch nur NHE3-Knock-out-Mäuse eine Diarrhoe aufweisen, sodass man davon ausgehen muss, dass hauptsächlich NHE3 an der NaCl-Resorption beteiligt ist (36).

Für den  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch kommen prinzipiell Ionenporter aus zwei Genfamilien in Frage: der Anionenaustauscher AE2 aus der SLC4-Familie und SLC26A3 (DRA) aus der SLC26-Familie. Alper et al. zeigten jedoch 1999, dass AE2 im Gastrointestinaltrakt basolateral und nicht apikal lokalisiert ist (1). Außerdem weist die ausgeprägte Störung der  $\text{Cl}^-$ -Absorption bei CLD-Patienten (siehe Absatz 1.2) darauf hin, dass DRA (SLC26A3) der für die NaCl-Resorption entscheidende Anionentrporter ist.

## **1.2 Kongenitale Chloriddiarrhoe**

Die kongenitale Chloriddiarrhoe, auch Chloride Losing Diarrhea (CLD) genannt, ist eine seltene autosomal rezessiv vererbte Erkrankung, die durch Störungen der intestinalen Elektrolytaborption gekennzeichnet ist. Ursächlich betroffen ist der  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch. Die CLD wird durch Mutationen im CLD-Gen verursacht, das dem DRA-Gen entspricht (siehe Absatz 1.3.1) (31).

Die Erkrankung tritt auf der ganzen Welt auf, gehäuft in Populationen, in denen der sog. founder effect zum Tragen kommt. Darunter versteht man das Prinzip, dass, wenn sich eine kleine Gruppe aus einer größeren Population als neue eigenständige Entität etabliert, ihr Genpool nur aus einem Teil der genetischen Vielfalt der parental Population besteht. In Polen, Finnland, Saudi-Arabien und Kuwait liegt die Inzidenz der CLD bei 1:200 000, 1: 20 000 bis 1: 5 000. Möglicherweise liegt diesen lokal hohen Zahlen auch ein gehäuftes Heiraten unter Blutsverwandten zugrunde.

Die klinischen Haupterscheinungen der CLD sind der pränatale Beginn von wässrigen Durchfällen, die im Uterus zu einem Polyhydramnion, sowie zu vermehrter Frühgeburtlichkeit führen. Die pränatale Diagnose ist anhand distendierter Darmanteile mittels Ultraschall möglich. Die Kinder haben ein aufgeblähtes Abdomen, das Mekonium fehlt. Postnatal entwickeln sie schwere

Elektrolytstörungen. Durch den defekten oder fehlenden  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher kommt es zu einem Mangel an intestinaler  $\text{Cl}^-$ -Absorption, große Mengen  $\text{Cl}^-$  werden über den Stuhl ausgeschieden. Die fehlende  $\text{HCO}_3^-$ -Sekretion führt zur metabolischen Alkalose und über eine Übersäuerung des Darminhalts durch Hemmung des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers zu fehlender  $\text{Na}^+$ -Absorption. Es resultiert eine sekretorische Diarrhoe. Der  $\text{Na}^+$ - und Wasserverlust führt zu sekundärem Hyperaldosteronismus mit Kaliumverlust. Die Diagnose kann durch Messung der fäkalen Chloridkonzentration, die bei Patienten mit ausgeglichenen Serumelektrolyten über 90 mmol/l liegt, verifiziert werden. Ohne Therapie verläuft die Erkrankung meist tödlich, führt zumindest aber zu frühem Nierenversagen. Neugeborene werden zunächst intravenös substituiert, danach ist die orale Substitution der Flüssigkeits- und Elektrolytverluste dauerhaft notwendig (18).

## 1.3 **DRA**

### 1.3.1 Entdeckung von DRA

Das DRA-Gen wurde erstmals 1993 von Schweinfest et al. beschrieben. Im Rahmen von Untersuchungen zur Adenom-Carcinom-Sequenz am Kolon isolierten sie aus der Mukosa des menschlichen Kolons mittels subtraktiver Hybridisierung eine cDNA, die sie DRA (für down-regulated in adenoma) nannten. Sie zeigten, dass die Expression von DRA auf Protein- wie auf mRNA-Ebene in Adenomen (Polypen) und Adenokarzinomen des Kolons deutlich verringert ist, und vermuteten, dass es sich um ein Tumorsuppressorgen handelt (37).

Etwa zur gleichen Zeit versuchte die Finnische Arbeitsgruppe um Kere den Gendefekt, der zur chloride losing diarrhea (CLD) führt (siehe Abschnitt 1.2), durch Genom-Analysen zu klären. Sie wiesen die Lokalisation des CLD-Gens auf dem Chromosom 7 Region q31 nach (14). Obwohl das Chromosom 7 mit der kolorektalen Tumorgenese assoziiert ist, konnte im weiteren Verlauf gezeigt

werden, dass die DRA-cDNA zum CLD-Genlocus gehört und einen Anionenaustauscher und kein klassisches Tumorsuppresorgen kodiert (15).

### 1.3.2 Struktur von DRA

Auf zellulärer Ebene wird DRA in Enterozyten als ein apikal lokalisiertes, 84500 Da großes Transmembranprotein aus 764 Aminosäuren exprimiert. Die Arbeitsgruppe um Schweinfest konnte an mit DRA transfizierten Zellen mittels Immunfluoreszenz dessen Lokalisation in der Zellmembran, bzw. während seiner Entstehung im Endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat nachweisen. In der Western Blot-Analyse des Zellmaterials zeigte sich eine diffuse Bande bei circa 95 kD und eine Doppelbande bei 75 kDa. Computerunterstützten Vorhersagen zufolge handelt es sich um ein aus 10, 12 bzw. 14 transmembranären Segmenten bestehendes Membranglykoprotein (3).

Eine schematische Darstellung der verschiedenen Computervorhersagen zeigt Abb. 1.

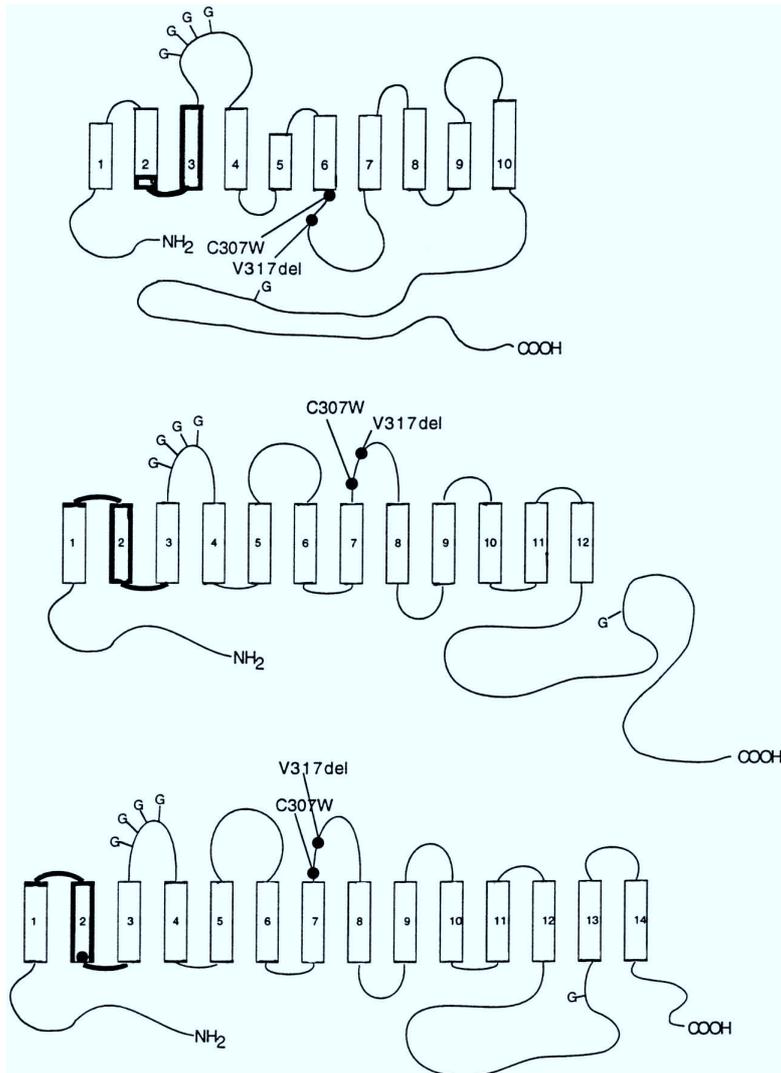


Abb. 1: Computergestützte Vorhersagen der sekundären Molekülstruktur von DRA. Eingezeichnet sind die am häufigsten vorkommenden Mutationen V317del, C307W sowie mögliche Glykolysierungsstellen (G) (31)

Das C-terminale Ende von DRA stellt mit den letzten vier Aminosäuren Glutamat-Threonin-Lysin-Phenylalanin (ETKF) ein PDZ-Interaktionsmotiv für die Bindung an intrazelluläre Adapterproteine der NHERF-Familie dar (25;28). PDZ-Adapterproteine spielen eine wichtige Rolle in der Regulation des intestinalen Ionentransports, indem sie Komplexe mit Transportproteinen bilden und so für Interaktion, Trafficking, Recycling und korrekte Lokalisation der Proteine sorgen. (siehe hierzu auch Absatz 1.4)

### 1.3.3 Proliferationshemmung durch DRA

2002 bewiesen Chapman et al. die wachstumssupprimierende Eigenschaft von DRA. Sie transfizierten mehrere Zelllinien ohne endogene DRA-Expression mit einem DRA-Expressionsvektor und mit einem G418-Resistenz-Vektor (zu Selektionszwecken) und fanden deutlich weniger Transfektionserfolge in den DRA-transfizierten Kulturen als in denen mit den Vektor-Kontrollen. Eine DRA-Proteinexpression ließ sich in den G418-resistenten Kolonien nicht nachweisen, sodass davon auszugehen war, dass die Zellen lediglich die G418-Resistenz erworben hatten. Das Phänomen, dass die Anzahl der Kolonien verringert war, sahen sie in Kolonkarzinom-Zelllinien (DLD-1, HT-29, HCT-15, SW837, SW480), einer Brustkrebs-Zelllinie (MCF-7) und in immortalisierten Mausfibroblasten (NIH3T3). Daher gingen sie von einer wachstumshemmenden Funktion von DRA aus. Sie exprimierten DRA induzierbar mit einem Tetrazyklin-reprimierbaren System in DLD-1-Zellen. Der Vergleich der Klone mit und ohne Tetrazyklin, das heißt ohne und mit DRA-Expression, zeigte ein deutlich verringertes Wachstum bei den Klonen ohne Tetrazyklin, also mit DRA-Expression. Die Expression von DRA führte folglich zu Wachstumssuppression, wahrscheinlich jedoch nicht zum Zelltod; es gab keine Anzeichen für Zelltoxizität oder Apoptose. Zellen, denen dann erneut Tetrazyklin zugesetzt wurde, setzten das Wachstum fort.

Die Arbeitsgruppe zeigte weiterhin, dass DRA bei neoplastischen Prozessen auf Transkriptionsebene frühzeitig herunterreguliert ist (4).

Antalis et al. zeigten anhand einer Untersuchung von gutartigen adenomatösen Polypen, malignen kolorektalen Tumoren und gesundem Kolongewebe, dass die DRA-mRNA in allen Tumorgeweben herunterreguliert war, teilweise bis auf nicht mehr nachweisbare Level. Die Herunterregulierung von DRA war assoziiert mit der Progression der Kolontumoren entsprechend der Einteilung nach Duke (2).

Allerdings ist bei Patienten mit chloride losing diarrhea (CLD), also homozygoten Mutationsträgern, das Risiko an einem kolorektalen Carcinom zu erkranken, lediglich geringfügig erhöht (9;11). Auch die Struktur des DRA-Proteins und seine apikale Membranlokalisation sprechen gegen eine Funktion

als klassisches Tumorsuppressorgen. Möglicherweise ist die endogene DRA-Expression ein Zeichen hoher Zelldifferenzierung. Diese Interpretation erklärt aber nicht den proliferationshemmenden Effekt in transfizierten Zellen. Aus der Proliferationshemmung durch DRA ergibt sich jedoch die Notwendigkeit der induzierbaren Transfektion, weil sonst die schlecht exprimierenden Klone andere Klone mit guter Expression überwachsen.

#### 1.3.4 Intestinaler Anionenaustausch durch DRA

Die Arbeitsgruppe um Höglund lokalisierte das DRA-Gen auf dem Chromosom 7q31, also an derselben Position, an der auch der Gendefekt für die Kongenitale Chlorid diarrhoe liegt. Sie zeigten, dass die Erkrankung durch eine Mutationen des DRA-Gens hervorgerufen wird (siehe 1.2) (13-15), und dass DRA einen Anionenaustauscher kodiert. Im Weiteren stellte sich heraus, dass DRA (SLC26A3) zu einer Familie von Anionenaustauschern (SLC26-Familie) gehört, die keine genetische Nähe zu den klassischen Anionenaustauschern (AE-Familie, SLC4-Familie) hat.

1999 bestätigten Melvin et al. die erwartete Funktion von DRA als  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher in vitro in stabil mit Maus-DRA transfizierten HEK293-Zellen (30). DRA fungiert im Intestinaltrakt als Anionenaustauscher parallel zu NHE3. Zusammen sind die beiden Austauscher für die elektroneutrale Resorption von NaCl im distalen Ileum und im Kolon verantwortlich. Lamprecht et al. zeigten an einem heterologen Expressionssystem für humanes DRA in HEK293-Zellen, dass DRA elektroneutralen  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch vermittelt.  $\text{OH}^-$  wird nicht transportiert.  $\text{SO}_4^{2-}/\text{HCO}_3^-$ -Austausch findet nur in geringem Ausmaß statt (23). Außerdem konkurrieren  $\text{Cl}^-$  und  $\text{HCO}_3^-$  mit etwa der gleichen Affinität zu DRA um den Transport (27).

## 1.4 PDZ-Adapterproteine

PDZ-Domänen sind die im menschlichen Genom am häufigsten vorkommenden Protein-Protein-Interaktionseinheiten. Die Abkürzung ergibt sich aus den ersten

drei Proteinen, in denen solche Domänen entdeckt wurden: postsynaptic density protein 95, Drosophila homolog Disc-large und das tight junction protein ZO-1. PDZ-Domänen sind aus 90-100 Aminosäuren aufgebaute, globuläre Strukturen aus sechs  $\beta$ -Faltblättern und zwei  $\alpha$ -Helices (10). Sie binden an das jeweilige PDZ-Interaktionsmotiv der Liganden. Für gewöhnlich besitzen PDZ-Adapterproteine mehrere PDZ-Domänen, sowie häufig weitere Nicht-PDZ-Protein-Interaktions-Domänen, sodass sie mit mehreren Bindungspartnern gleichzeitig interagieren können, weshalb man sie auch als Adapterproteine bezeichnet. Ursprünglich ging man davon aus, dass an der Interaktion zwischen PDZ-Bindungsmotiv und PDZ-Domäne die letzten vier Aminosäuren des Bindungsmotivs des COOH-terminalen Proteinendes beteiligt seien. Neuere Studien zeigen jedoch, dass weitere Aminosäuren in den komplexen Vorgang involviert sind (39). Außerdem können bestimmte PDZ-Domänen auch mit im Inneren eines Proteins liegenden Sequenzen, die eine  $\beta$ -Haarnadelstruktur annehmen, interagieren (12). Man geht davon aus, dass die Formation von Multiproteinkomplexen, bestehend aus Transportproteinen, PDZ-Adapterproteinen, Bindeproteinen, dem Zytoskelett sowie entsprechenden Proteinkinasen, die Regulation von Transportvorgängen im Gastrointestinaltrakt beeinflusst (28). In heterologen Expressionssystemen binden die PDZ-Adapterproteine NHERF (NHE regulatory factor) (auch NHERF-1 oder EBP50 genannt) und E3KARP (NHE3 kinase A regulatory protein) (NHERF-2) an CFTR, NHE3 und DRA (25;41;45).

NHERF und E3KARP enthalten zwei PDZ-Domänen und eine COOH-terminale Ezrin/Radixin/Moesin(ERM)- Bindungsdomäne, die diese Proteine über Ezrin mit dem Zytoskelett verbindet (41;45). Ein weiteres Proteine aus der NHERF-Familie, PDZK1 (PDZ protein kidney 1) (NHERF-3), bindet ebenfalls an CFTR (43), DRA (35) und NHE3 (6;46;47). Es enthält vier PDZ-Domänen aber keine ERM-bindende Domäne (22;43).

## 1.5 Expression von Proteinen

### 1.5.1 Heterologe Proteinexpression

Transportproteine werden im natürlichen Kontext üblicherweise in vergleichsweise geringen Mengen exprimiert. Gleichzeitig besteht meist ein komplexes Expressionsmuster anderer Proteine. In besonderem Maße gilt dies für Transportproteine in resorbierenden oder sezernierenden Epithelien, wie dem Dün- und Dickdarm und den verschiedenen Segmenten des Nierentubulus, weil in diesen Epithelien jeweils sehr komplexe Transportvorgänge ablaufen. Strukturproteine des Zytoskeletts oder am Metabolismus beteiligte Proteine sind hingegen häufig stärker exprimiert. Nur in Ausnahmefällen gibt es in einzelnen Geweben, die in besonderer Weise spezialisiert sind, auch hoch exprimierte Transportproteine, zum Beispiel den Anionenaustauscher AE1 in Erythrozyten.

Um niedrig exprimierte Transportproteine charakterisieren zu können, hat es sich bewährt, sie in möglichst einfachen Systemen zu überexprimieren, um ihre Funktion vor dem Hintergrund der Aktivität anderer Transportproteine differenzieren zu können. Da es sich in der Regel um Expression in Zellen handelt, die das in Frage stehende Transportprotein normalerweise kaum bzw. gar nicht exprimieren, spricht man in diesem Zusammenhang von heterologer Expression. Bei bestehender endogener Expression ist es korrekter von heterologer Überexpression zu sprechen. Üblicherweise wird jedoch der Ausdruck heterologe Expression verwendet.

Verschiedene Systeme stehen für die heterologe Expression von Proteinen zur Verfügung:

1. Prinzipiell am einfachsten ist die Expression in *E. coli*. Eukaryote Transmembranproteine werden von *E. coli* jedoch schlecht oder gar nicht exprimiert, so dass die Expression dieser Proteine in *E. coli* nur in ganz wenigen Fällen gelungen ist (34).
2. *Xenopus* Oozyten sind ein klassisches Expressionssystem für Transportproteine. Hier wird cRNA in die Oozyten mikroinjiziert, vom Oozyten-eigenen Transskriptionsapparat weiter verarbeitet, und die entsprechenden

Transmembranproteine gelangen an die Oozytenoberfläche. Klassischerweise sind solche Transporter durch Patchclamptechniken oder Tracer-uptake-Studien charakterisiert worden. Funktionelle Untersuchungen zu einem elektroneutralen Transporter wie dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten Cl/HCO<sub>3</sub>-Austauscher DRA können jedoch mit Patchclamp wegen ihrer Elektroneutralität nicht durchgeführt werden. Tracer-uptake-Studien mit Chlorid sind durchgeführt worden, leiden jedoch unter der geringen spezifischen Aktivität des radioaktiven Chlorid-36. Untersuchungen des intrazellulären pH leiden darunter, dass das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen bei Xenopus-Oozyten relativ ungünstig ist, so dass Effekte auf den intrazellulären pH in hohem Maße abgepuffert werden.

3. Hefezellen sind erfolgreich zur heterologen Genexpression verwendet worden, zum Beispiel Pichia für die Expression von PEPT1 (19). Die Expression von NHE3 hat sich in Hefezellen jedoch als nicht erfolgreich erwiesen (Donowitz, persönliche Mitteilung).

4. Relativ einfache Fibroblasten oder epitheliale Zelllinien wie PS-120-Zellen, CHO-Zellen oder HEK-Zellen sind in vielen Fällen erfolgreich als heterologe Expressionssysteme verwendet worden. Grundlegende Nachteile liegen darin, dass es sich um einfache Zellsysteme handelt, die viele Regulationsmechanismen nicht aufweisen. Die Basis der vorliegenden Arbeit war jedoch unter anderem die erfolgreiche Expression von DRA in HEK293-Zellen (23).

5. Prinzipiell wünschenswert ist die Expression von eukaryoten Transmembranproteinen in entsprechend komplexen eukaryoten hochdifferenzierten Epithelzelllinien wie MDCK- oder Caco-2-Zellen. Diese Zellsysteme gelten aber als schwierig zu transfizieren. Erschwerend kommt im Fall von DRA hinzu, dass DRA wachstumsinhibierend wirkt (4), so dass erfolgreich transfizierte Zellen sich nicht gut expandieren lassen. Dieses Phänomen ist auch von anderen Proteinen als sogenannte „toxische Genexpression“ bekannt. Üblicherweise stehen die heterolog zu exprimierenden Proteine unter der Kontrolle eines konstitutiven starken viralen Promoters, z.B. des CMV- oder des SV40-Promotors. Diese Promotoren

umgehen die komplexe, engmaschig regulierte und üblicherweise in niedriger Expression resultierende Kontrolle der Genexpression eukaryoter Zellen und gelten als sogenannte starke Promotoren. Sie erlauben die oben beschriebene und in der Regel gewünschte Überexpression in Frage stehender Proteine. Für die Expression sogenannter toxischer Gene sind sie ungeeignet, da sie zur „Vergiftung“ der Zelle oder zur Wachstumsinhibition führen. Dies gilt in besonderer Weise für die sogenannte stabile heterologe Expression, bei der die Zellen nicht nur transient transfiziert werden, sondern das in Frage stehende Expressionskonstrukt dauerhaft auf DNA-Ebene integrieren und replizieren.

Als Ausweg für die Expression toxischer Gene ist die induzierbare Genexpression entwickelt worden. Als erste Stufe hierfür wurden Expressionsvektoren mit Glucokorticoide-response-Elementen versehen und entsprechend transfizierte Zellen mit Glucocorticoiden stimuliert. Dieses Vorgehen birgt den Nachteil, dass diverse endogen exprimierte Gene auch unter der Kontrolle der Glucokorticoide stehen, so dass nicht nur das transfizierte Transgen sondern auch endogene Proteine in ihrer Expression entsprechend beeinflusst werden. Als nächste Generation dieses Ansatzes wurden Ecdyson-induzierbare Vektoren entwickelt. Hierbei handelt es sich um ein Insekten-Steroid, das auf Zellen wirkt, die den Ecdyson-Steroid-Rezeptor auf der Zelloberfläche exprimieren. Nach Stimulation solcher Zellen wird das Ecdyson zusammen mit seinem Rezeptor in den Nukleus transportiert und reguliert entsprechende Promotorelemente in ähnlicher Weise wie humane Steroide (siehe hierzu auch Absatz 1.5.2.1). Es besteht jedoch keine nennenswerte Kreuzreaktivität humaner Steroide auf die Ecdyson-Promoter-Elemente und vice versa. Dieses System ist erfolgreich für die heterologe induzierbare Expression der Anionenaustauscher AE2 bzw AE3 (aus der SLC4 Familie) in HEK293-Zellen verwendet worden (29).

Ein weiteres induzierbares Expressionssystem sind die Tretrazyklin-induzierbaren bzw. Tretrazyklin-reprimierbaren Vektoren, deren methodische Details in Abschnitt 1.5.2.2. dargelegt sind.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, DRA in Caco-2-Zellen zu überexprimieren. Die Erfahrungen von Chapman zeigten bereits, dass eine ausreichende

konstitutive Expression von DRA in Caco-2-Zellen wegen des wachstumsinhibierenden Effektes von DRA nicht möglich ist. Von vornherein wurde daher die induzierbare Expression von DRA in Caco-2-Zellen angestrebt. Die oben dargelegten Überlegungen erklären, warum hierfür das Ecdyson-System bzw. ein Tetrazyklin-abhängiges Expressionssystem in Frage kamen. Vor dem Hintergrund der in der Arbeitsgruppe bestehenden Erfahrungen mit den Schwierigkeiten der Expression von DRA als genuines, d.h. nicht mit einem sogenannten Tag markiertes Protein wurde DRA als N-terminal EGFP-markiertes Fusionskonstrukt verwendet (23). Hierbei kann die EGFP-Eigenfluoreszenz genutzt werden, um mittels Fluoreszenzmikroskopie den Transfektions- und Expressionserfolg abschätzen zu können.

## 1.5.2 Induzierbare Genexpression

Wie bereits oben erwähnt, kommen für die induzierbare heterologe Expression in eukaryoten Zellen hauptsächlich zwei Systeme in Frage: ein Ecdyson-induzierbares System oder ein Tetrazyklin-induzierbares bzw. Tetrazyklin-reprimierbares System.

### 1.5.2.1 Ecdyson-induzierbares System

In der vorliegenden Arbeit wurde das Ecdysone-Inducible Mammalian Expression System von Invitrogen® verwendet.

Das Ecdysone-induzierbare Expressionssystem wurde von Forschern am Salk Institute for Biological Studies, Kanada entwickelt. Es basiert auf der Fähigkeit des Insektenhormons 20-OH-Ecdysone (Steroidhormon aus *Drosophila melanogaster*), die Genexpression über den Ecdysone-Rezeptor zu aktivieren. Es benutzt ein Heterodimer des Ecdysone-Rezeptors bestehend aus dem Ecdysone-Rezeptor VgEcR und dem RetinoidX-Rezeptor RxR, die in Anwesenheit eines Liganden (Ecdysone oder ein stabiles Analogon wie z.B. MuristeroneA oder PonasteroneA) an ein modifiziertes Ecdysone-response-Element (EcRE) binden. Der Ecdysone-Rezeptor VgEcR wird aus dem natürlichen *Drosophila* Ecdysone-Rezeptor gewonnen und so modifiziert, dass

er eine VP16 Transkriptionsaktivierungsdomäne enthält. RxR ist das Säugetierhomolog von USP (ultraspiracle), dem natürlichen Partner des Drosophila Ecdysone-Rezeptors. Diese beiden Rezeptoren werden gemeinsam vom pVgRxR Vector im Ecdysone-System exprimiert und verbinden sich in Anwesenheit eines Ecdysone-Analogons, sodass die Transkription aktiviert wird. pVgRxR enthält außerdem ein Zeocin-Resistenz-Gen, sodass die transfizierten Zellkulturen mit Zeocin selektiert werden können. Normalerweise enthalten Säugetierzellen keinen Ecdysone-Rezeptor und reagieren nicht auf Ecdysone oder seine Analoga, sodass basale Transkriptionslevel sehr gering oder gar nicht vorhanden sind. Nach Zugabe eines induzierenden Agens wie MuristeroneA oder PonasteroneA wurden jedoch z.T. über 200fache Transkriptionslevel beobachtet (33).

#### 1.5.2.2 Tetrazyklin-induzierbares/-reprimierbares System

In der vorliegenden Arbeit wurde das Tet-Off Gene Expression System von BD Biosciences Clontech verwendet. Im Tet-Off System wird die Genexpression eingeschaltet, wenn Tetrazyklin oder Doxycyclin (ein Tetrazyklin-Derivat) aus dem Kulturmedium entfernt wird. Im Gegensatz dazu wird die Genexpression beim Tet-On System durch die Zugabe von Doxycyclin eingeschaltet, es reagiert jedoch nicht auf Tetrazyklin. Die maximalen Expressionslevel in Tet-Systemen sind sehr hoch und durchaus vergleichbar mit denen, die durch sog. starke konstitutive Promotoren wie z.B. CMV erreicht werden (44). Die Genregulation ist in Tet-Systemen im Vergleich zu anderen induzierbaren Expressionssystemen sehr spezifisch, sodass die Interpretation der Ergebnisse nicht durch pleiotrophe Effekte oder unspezifische Induktion verkompliziert wird. Das Tet-Off System enthält zwei wichtige Komponenten: erstens ein regulierendes Protein, das auf dem Tet-Repressor-Protein TetR aus E.coli basiert. Es ist ein 37kDa großes Fusionsprotein aus den Aminosäuren 1 bis 207 von TetR und den C-terminalen 127 Aminosäuren der Aktivierungsdomäne des Proteins VP16 des Herpes simplex Virus, die aus dem Transkriptionsrepressor TetR einen Transkriptionsaktivator, genannt tTA, macht. Als Zweites enthält das Tet-Off System das Response Plasmid, das tetracyclin-response-element TRE,

welches das im Interesse stehende Protein exprimiert. In Abwesenheit von Tetrazyklin oder Doxycyclin verbinden sich tTA und TRE und die Transkription wird aktiviert (7). Für die vorliegende Arbeit wurde zur Unterdrückung der Genexpression Doxycyclin verwendet, da gegenüber Tetrazyklin deutlich niedrigere Dosen für eine vollständige Unterdrückung notwendig sind, und da die Halbwertszeit mit 24 Stunden bei Doxycyclin gegenüber 12 Stunden bei Tetrazyklin länger und die Handhabung daher einfacher ist. Das verwendete Tet-System enthält zusätzlich ein Hygromycin-Resistenz-Gen, das die Selektion der erfolgreich transfizierten Zellen von nicht transfizierten Zellen mittels des Antibiotikums Hygromycin erlaubt, einem Aminoglykosid, das durch Hemmung der Proteinbiosynthese wirkt.

## **1.6 Fragestellung/ Ziel der Arbeit: Entwicklung eines Systems für die Erforschung der Regulation von DRA**

DRA (SLC26A6) ist als Mitglied der SLC26A-Familie von Anionentransportern am intestinalen Anionenaustausch beteiligt. Im oberen Gastrointestinaltrakt ist es an CFTR gekoppelt und vermittelt  $\text{Cl}^-$ - und  $\text{HCO}_3^-$ -Sekretion, im unteren Gastrointestinaltrakt ist es an NHE3 gekoppelt und vermittelt elektroneutrale NaCl-Absorption. Alle drei genannten Transportproteine besitzen PDZ-Interaktionsmotive. Hier können PDZ-Adapterproteine binden und so Proteinkomplexe bilden, welche Einfluß auf die Regulation der Transportproteine ausüben. Störungen im Ionentransport, etwa durch eine gestörte Regulation der Transportproteine oder – sehr viel seltener – durch Defekte der Transportproteine selbst (wie z.B. Defekt des DRA-Gens bei der CLD), führen zu Störungen im Wasser- und Elektrolythaushalt des Menschen. Eine Erforschung der Transportproteine bzw. ihrer Regulation ist im Hinblick auf Verständnis und im Weiteren Behandlung von z.B. Durchfallerkrankungen relevant.

Da konstant DRA exprimierende Zellkulturen aufgrund der Proliferationshemmenden Wirkung von DRA ein gestörtes Wachstum zeigen, stellt sich hier die Aufgabe, ein System zu entwickeln, in dem die Expression von DRA induzierbar ist. Sobald die stabil transfizierten, aber noch nicht exprimierenden Zellen die nötige Konfluenz erreicht haben, wird die Expression von DRA gestartet, sodass dann eine DRA-exprimierende Zellkultur zur Verfügung steht, die für weitere Versuche oder Messungen verwendet werden kann. Ein solches induzierbares System für DRA sollte unter möglichst physiologischen Bedingungen geschaffen werden, um die physiologische Relevanz der damit durchgeführten funktionellen Experimente zu erhöhen. Die Expression von DRA sollte also in entsprechend komplexen eukaryoten hochdifferenzierten Epithelzellen wie beispielsweise Caco-2-Zellen erfolgen. Caco-2-Zellen besitzen folgende Eigenschaften, die sie als Resorptionsmodell geeignet machen: Die Zellen lassen sich unter relativ einfachen Bedingungen kultivieren, sie haften stark an Oberflächen wie z.B. Kunststoffzellkulturflaschen, proliferieren gut und bilden nach wenigen Tagen ein zusammenhängendes polarisiertes Monolayer. Des Weiteren exprimieren Caco-2-Zellen in geringen Mengen endogen DRA, verfügen also über alle notwendigen Strukturen und Prozesse, um DRA zu exprimieren (40). Man geht außerdem davon aus, dass sie eine Signaltransduktionsmaschinerie für die Regulation apikaler Transporter besitzen (17). So bieten Caco-2-Zellen annähernd physiologische Grundlagen für die Etablierung eines Systems, welches DRA induzierbar heterolog überexprimiert.

Im Weiteren würde eine Zelllinie, die stabil und konstitutiv DRA exprimiert und zusätzlich über die zellulären Komponenten eines induzierbaren Expressionssystems verfügt, die Möglichkeit bieten, DRA-Adapterproteine induzierbar zu exprimieren und so die Zusammenhänge zwischen DRA und den jeweils induzierten Adapterproteinen zu untersuchen. Ein zweites Ziel dieser Arbeit war es daher, eine Zelllinie mit diesen Voraussetzungen zu etablieren.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Zellkultur**

#### **2.1.1 Zellen**

##### **2.1.1.1 Caco-2**

Die verwendeten Caco-2-Zellen stammen von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland). Es handelt sich um humane Adenokarzinomzellen, die 1974 aus dem primären Adenokarzinom des Kolons eines 72-jährigen Mannes kaukasischer Rasse isoliert wurden. Caco-2 sind epitheliale adhärenente Zellen. Sie wachsen polarisiert und bilden als Monolayer kultiviert eine apikale und eine basolaterale Membran zum jeweiligen Kompartiment aus.

##### **2.1.1.2 EcR293**

Die verwendeten EcR293-Zellen wurden von Invitrogen™ (Invitrogen™, Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Sie stammen von HEK293-Zellen ab, einer seit Ende der 1970er Jahre bestehenden humanen Zelllinie, welche als Transformationsprodukt einer embryonalen Nierenzelle (Human Embryonic Kidney) durch Einfügen von 4,5 kb des viralen Genoms des humanen Adenovirus Typ 5 in das Erbgut der Nierenzelle geschaffen wurde. Es sind adhärenent wachsende Zellen. Sie wurden zwar künstlich transformiert, d.h. künstlich Charakteristika einer Krebszelle erzeugt, indem Fremd-DNA eingeführt wurde, was sie als Modell nur bedingt tauglich erscheinen lässt. Sie sind für Studienzwecke jedoch geeignet, solange Komponenten innerhalb der Zelle von Interesse sind und nicht das Verhalten der Zelle an sich. EcR293-Zellen sind HEK293-Zellen, die stabil den unter 1.5.2.1 beschriebenen Ecdysone-Rezeptor exprimieren. Hierdurch bedingt besitzen sie eine Resistenz gegen das Antibiotikum Zeocin.

### 2.1.1.3 TetOff293

Die TetOff293-Zellen wurden ebenfalls über Invitrogen™ bezogen. Auch TetOff293-Zellen stammen von den oben beschriebenen HEK293-Zellen ab. Es sind somit ebenfalls humane adhärenente Zellen aus Nierengewebe, die stabil mit pTetOff (pUHD15-1neo) transformiert wurden und den unter 1.5.2.2 beschriebenen Tet-Repressor exprimieren.

### 2.1.2 Nährmedien

Für die Kultivierung der Zellen wurde ein Basisnährmedium hergestellt und verwendet, dessen Antibiotikazusammensetzung und -konzentration, sowie der Anteil von Serum je nach Zelllinie variiert wurden. Für Zelllinien, die das Tet-System enthalten, wurde speziell ein FCS (Fetal Calf Serum) verwendet, das geprüft frei von Tetrazyklin oder Doxycyclin ist, um eine unerwünschte Unterdrückung der Proteinexpression durch eine Kontamination im FCS zu vermeiden.

Als Basismedium wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM (GIBCO®, Invitrogen™) verwendet. Diesem wurden für alle Zelllinien 10% Fetal Calf Serum (FCS) (GIBCO®, Invitrogen™) und 0.5% sterilfiltriertes Penicillin/Streptomycin (GIBCO®, Invitrogen™) zugesetzt.

Allen Medien, die für Caco-2-Zellen verwendet wurden, wurden 10% FCS zusätzlich zugesetzt.

### 2.1.3 Killing Curves

Die meisten der verwendeten Zelllinien besitzen bereits Resistenzen gegen ein bestimmtes Antibiotikum. Weitere Resistenzen waren in den verwendeten Vektoren enthalten, und wurden so bei der Transfektion übertragen. Um die Konzentration an Antibiotika festzulegen, durch die resistente Zellen nicht beeinträchtigt werden, nicht resistente Zellen jedoch absterben, wurden sogenannte killing curves erhoben.

#### 2.1.3.1 Killing Curve für klonale EcR293/pEGFP-DRA-Zellen und Hygromycin B

Im Rahmen einer regulären Passage wurden zunächst EcR293/pEGFP-DRA/clone15-Zellen in mehrere 6-well-Gewebeplatten passagiert (Tag 1), und dann über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag (Tag 2) wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt bestehend aus 0, 12,5, 25, 50, 100 und 200 µg Hygromycin B pro ml Nährmedium. Das Basismedium in den wells wurde gegen das Medium mit Zeocin ausgetauscht, jeweils ein well pro unterschiedlicher Konzentration. Es wurden jeweils wells ausgewählt, in denen die Zellen nach der Passage über Nacht eine gute Haftung am Flaschenboden erreicht und eine gleichmäßige Zellschicht entwickelt hatten mit einer etwa 20-30%igen Konfluenz. Bei einer höheren Konfluenz wäre die Wahrscheinlichkeit zu groß, dass die Zellen aufgrund zu hoher Zelldichte und nicht aufgrund des Antibiotikums absterben. Der nächste Wechsel des Mediums mit den entsprechenden Zeocin-Konzentrationen erfolgte an Tag 3, dann wieder an Tag 6, an Tag 8, an Tag 10 und nocheinmal an Tag 12.

#### 2.1.3.2 Killing Curve für Caco-2-Zellen und Zeocin

Caco-2-Zellen wurden in 6-well-Gewebeplatten passagiert (Tag 1). An Tag 2 wurde eine Zeocin-Verdünnungsreihe hergestellt mit 0, 100, 200, 400, 600 und 800 µg Zeocin pro ml Basismedium. Dann wurde das Medium in den wells gegen die einzelnen Konzentrationen der Verdünnungsreihe ausgetauscht. Wiederum wurden jeweils wells ausgewählt, in denen die Zellen über Nacht eine gute Adhärenz erreicht hatten, allerdings mit einer etwa 40%igen Konfluenz, da Caco-2-Zellen im Vergleich zu EcR293-Zellen eine etwas höhere Zelldichte für gutes Wachstum benötigen. Dann wurde das Medium jeweils an Tag 6, 8, 11, 13 und 15 gewechselt. An Tag 11 wurde zusätzlich einmal mit PBS gespült, um die abgestorbenen Zellen möglichst vollständig zu entfernen.

#### 2.1.3.3 Killing Curve für Caco-2/pTetOff-Zellen und Hygromycin B

Mehrere 6-well-Platten mit Caco-2/pTetOff-Zellen wurden passagiert (Tag 1) und kultiviert. An Tag 3 wurde bei allen wells das Medium gewechselt und nochmals mit normalem Nährmedium mit G418 gefüttert, um die Zellen nach der Passage weiter zu stabilisieren und die nötige Konfluenz zu erreichen. Am nächsten Tag wurde eine Verdünnungsreihe mit 0, 200, 400, 500, 600, 800 µg Hygromycin B pro ml Basismedium pipettiert. Wieder wurde in wells mit zu ca. 40% konfluenten Zellen das Medium gegen Medium mit jeweils einer Konzentration an Hygromycin B getauscht (Tag 4). Die nächsten Wechsel erfolgten jeweils an den Tagen 6, 8, 10, 12, 14, 16 und 18.

#### 2.1.3.4 Killing Curve für EcR293-Zellen und G418

EcR293-Zellen wurden auf mehrere 6-well-Platten passagiert, und regulär kultiviert, an Tag 3 wurde einmal das Nährmedium gewechselt, bis die Zellen an Tag 8 eine etwa 20-30%ige Konfluenz erreicht hatten. Es wurde eine G418-Verdünnungsreihe hergestellt mit 0, 100, 200, 300, 400 und 500 µg G418 pro ml Medium. Das Nährmedium in den einzelnen wells wurde gegen jeweils eine G418-Konzentration ausgetauscht. Die weiteren Wechsel erfolgten an den Tagen 11, 13, 15 und 18.

#### 2.1.3.5 Killing Curve für 293TetOff-Zellen und Hygromycin B

Die 293TetOff-Zellen wurden auf 6-well Platten passagiert und für zwei Tage regulär kultiviert. An Tag 3 zeigten die Zellen eine 30%ige Konfluenz. Es wurde eine Hygromycin B-Verdünnungsreihe hergestellt mit jeweils 0, 12,5, 25, 50, 100, 200µg Hygromycin B pro ml Nährmedium. Hierzu wurde das Hygromycin B sterilfiltriert verwendet. Diese Verdünnungsreihe wurde an Tag 3 zu den Zellen pipettiert, und an Tag 6 und Tag 8 jeweils gewechselt.

#### 2.1.4 Kultivierung der Zellen und Arbeitsvorgänge

Die Zellen wurden im Inkubationsschrank kultiviert bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in 25cm<sup>2</sup>-Kunststoffflaschen mit einem Deckel, der über eine Membran die Zirkulation von Gasen erlaubt (Greiner, Deutschland). Arbeitsvolumen waren jeweils 5ml Medium.

Die Arbeiten mit den Zellen wurden in einer Sterilbank unter aseptischen Bedingungen durchgeführt. Die Arbeitsfläche wurde stets zunächst mit 70%igem Ethanol gereinigt. Autoklavierbare Gegenstände wurden vor Benutzung sterilisiert. Ansonsten wurden sterile Einwegmaterialien verwendet. Alle Nährmedien, Puffer, etc. wurden unter hygienischen Bedingungen bei 4°C gelagert und jeweils in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt, bevor sie mit den Zellen in Berührung kamen.

##### 2.1.4.1 Passagieren

Die Zellen wurden in der Regel passagiert, sobald sie unter dem Mikroskop eine ca. 80-90%ige Konfluenz zeigten. Zuerst wurde das vorhandene Nährmedium mit Hilfe einer Pasteurpipette und einer Vakuumpumpe abgesaugt, dann wurden die Zellen mit 5ml PBS (GIBCO®) gewaschen. Danach wurden sie mit 2,5ml einer Trypsin/EDTA-Lösung (GIBCO®; Trypsinkonzentration für HEK293 und EcR293 Zellen: 0,05%, Trypsinkonzentration für Caco-2 Zellen: 0,25%) inkubiert, bis sie sich vom Untergrund zu lösen begannen; dann wurde das Trypsin wieder abgesaugt und die Zellen in 5ml Medium resuspendiert. Ca. 0,25ml (für HEK-Zellen) bzw. 1 ml (für Caco-2-Zellen) der Suspension wurden in 5ml frisches Nährmedium in eine neue 25cm<sup>2</sup>-Flasche pipettiert und im Inkubationsschrank kultiviert.

##### 2.1.4.2 Langfristige Aufbewahrung der Zellen

Zur langfristigen Lagerung wurde die beim Passagieren erhaltene Zellsuspension mit zusätzlich 10% FCS und 10% DMSO in Kryokonservierungsröhrchen (Greiner, Deutschland) pipettiert. Die Röhrchen wurden für 24 Stunden in einem Gefrierschrank bei -70°C gelagert, dazu

wurden sie in Styropor verpackt, um ein langsames Abkühlen zu gewährleisten. Danach wurden die Kryoröhrchen mit den Zellen in einem Tank mit flüssigem Stickstoff bei  $-194^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

#### 2.1.4.3 Auftauen

Die Zellen wurden im Kryokonservierungsröhrchen in einem auf  $37^{\circ}\text{C}$  temperierten Wasserbad unter langsamem Bewegen aufgetaut. Dann wurde der Inhalt des Röhrchens sofort in 10ml  $37^{\circ}\text{C}$  warmes Medium überführt, um das im Medium zum Einfrieren enthaltene DMSO zu verdünnen. Am nächsten Tag nach Anhaften und Anwachsen der Zellen wurde das Medium erneut gewechselt, um die zelltoxische Wirkung des DMSO so gering wie möglich zu halten.

#### 2.1.4.4 Gewinnung klonaler Zelllinien

Zur Gewinnung klonaler Zelllinien wurde die im Rahmen einer regulären Passage entstehende Zellsuspension nach dem Vorgang des Trypsinisierens und Resuspendierens (siehe 2.1.4.1) verdünnt. Und zwar wurden  $50\mu\text{l}$  Zellsuspension in einen 50ml-Falcon mit 25ml Nähmedium pipettiert. Von in der Arbeitsgruppe vorliegenden Schätzungen ausgehend, beträgt die Zellzahl in einer konfluenten  $25\text{cm}^2$ -Flasche mit 5 ml Nährmedium etwa  $5 \times 10^6$  Zellen. Das heißt, in 1ml befinden sich etwa  $1 \times 10^6$  Zellen. Entsprechend waren in den  $50\mu\text{l}$ , die in 25ml frisches Medium pipetiert wurden, etwa  $5 \times 10^4$  Zellen enthalten. Hiervon wurden nun jeweils  $250\mu\text{l}$ ,  $80\mu\text{l}$  und  $25\mu\text{l}$  in drei weitere 50ml-Falcons mit je 25ml Medium pipettiert, sodass dann jeweils ein Falcon mit  $5 \times 10^2$  Zellen in 25ml Medium, ein Falcon mit  $1,7 \times 10^2$  Zellen in 25ml Medium, und ein Falcon mit  $5 \times 10^1$  Zellen in 25ml Medium vorlagen. Nun wurden alle drei Falcons mit je 25ml Medium weiter verdünnt, das heißt es lagen dann folgende drei Konzentrationen (jeweils angegeben für 0,5ml Zellsuspension) vor: 10 Zellen, 3 Zellen und 1 Zelle. Um jeweils eine ausreichende Anzahl klonaler Zelllinien zu erhalten, wurden je Konzentration zwei 24-well Platten mit 0,5ml Zellsuspension

pro well pipettiert, und alle wells um weitere 0,5ml frisches Nährmedium ergänzt. Das beschriebene Verfahren wird auch als „serial dilution“ bezeichnet.

#### 2.1.4.5 Induktion mit PonasteroneA

Bei Zelllinien, die das Ecdysone-System enthalten, mussten die Zellen mit PonasteroneA (Invitrogen<sup>®</sup>) versetzt werden, um die Transkription zu aktivieren. Dazu wurde PonasteroneA in Ethanol gelöst (Konzentration der Stammlösung: 1mM) und in einer Endkonzentration von 5µM dem Medium zugegeben. Dann wurden die Zellen für 20 Stunden bei 37°C inkubiert. Kontrollen wurden mit derselben Menge Ethanol versetzt, um auszuschließen, dass der Alkohol ausschlaggebenden Einfluss auf die Induktion hat.

#### 2.1.4.6 Repression der Genexpression mittels Doxycyclin im TetOff-System

Zellen, die mit Komponenten des TetOff-Systems und induzierbaren Expressionsvektoren transfiziert waren, wurde zur Unterdrückung der Genexpression 1µg/ml Doxycyclin im Nährmedium zugesetzt. Aufgrund der Halbwertszeit des Doxycyclins von 24h wurde das Nährmedium alle 48h ausgetauscht, um stets eine ausreichende Konzentration und damit eine suffiziente Repression zu gewährleisten.

#### 2.1.4.7 Gewinnung von Zellmaterial für RNA-Nachweis

Entsprechend konfluente Zellkulturflaschen wurden mit PBS gespült und mit 1ml RNAlater (Ambion<sup>®</sup>) versetzt, welches die Zellen lysiert und dabei die empfindliche RNA stabilisiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem speziellen Schaber (Nunc<sup>™</sup>) vom Flaschenboden abgekratzt und die Lösung in Eppendorf Tubes pipettiert. Diese wurde dann 1 Min. mit 7000 rpm bei 4°C zentrifugiert, sodass ein sogenanntes Pellet am Boden des Tubes entstand. Die darüberstehende Flüssigkeit konnte verworfen werden. Eine langfristige Aufbewahrung des Pellets erfolgte bei -80°C.

## 2.2 Transfektion

Um eine optimale Vergleichbarkeit der Transfektionen zu erzielen, wurden alle Zellen nach dem gleichen Schema transfiziert, angelehnt an die Empfehlungen des Herstellers der verwendeten Reagenzien (Invitrogen®).

Zunächst wurden die zu transfizierenden Zellen auf 24-well-Platten (Greiner, Deutschland) passagiert. Sobald eine ca. 80%ige Konfluenz erreicht war, erfolgte die Transfektion.

Für Transfektionen von Caco-2-Zellen wurden 5µg DNA pro well verwendet, für Transfektionen von EcR293-Zellen wurden 2µg DNA pro well verwendet.

Zunächst wurde die zu transfizierende DNA (bzw. die Positivkontrolle / Negativkontrolle) jeweils mit dem Plus Reagenz und dem Optimem gemischt.

Tab. 1: Mengenangaben DNA-Mischung

<sup>1)</sup> x abhängig von der Konzentration der DNA

<sup>2)</sup> x wurde so bemessen, dass die Gesamtmenge 25µl betrug

	DNA	Positivkontrolle	Negativkontrolle
DNA <sup>1)</sup>	xµl	xµl	0µl
Plus Reagent (Invitrogen)®	8µl	8µl	8µl
Optimem(GIBCO®) <sup>2)</sup>	xµl	xµl	xµl
Gesamtmenge	25µl	25µl	25µl

Parallel dazu wurden pro zu transfizierendem well folgende Reagenzien zusammenpipettiert:

Tab. 2: Mengenangaben Lipofectamine-Komplex

Lipofectamine™2000(Invitrogen)	12µl
Optimem(GIBCO®) <sup>2)</sup>	13µl
Gesamtmenge	25µl

Diese beiden separat pipettierten Mischungen wurden jeweils 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die einzelnen DNA-Mischungen mit je einem Lipofectamine-Komplex zusammenpipettiert und noch einmal 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser insgesamt 30 minütigen Inkubationszeit der Transfektionslösungen wurden die Zellen einmal mit 200µl OPTIMEM gespült und dann mit 200µl frischem OPTIMEM versorgt. Die

inkubierte Transfektionslösung wurde anschließend hinzupipettiert und die Zellen über Nacht im Inkubationsschrank unter regulären Kulturbedingungen inkubiert. Nach 24 Stunden wurde die Transfektionsmischung abgesaugt und durch antibiotikafreies Nährmedium ersetzt. Nach weiteren 24 Stunden wurde dieses antibiotikafreie Nährmedium durch das entsprechende antibiotikahaltige Nährmedium der jeweiligen Zelllinie ersetzt.

Folgende Vektoren lagen zur Transfektion vor:

pEGFP

pIND/EGFP

pBI/EGFP

pTRE2[hygro]/EGFP

pEGFP/full-length-DRA-5'-Kozak

pIND/EGFP/full-length-DRA-5'-Kozak

pBI/EGFP/full-length-DRA-5'-Kozak

pTRE2[hygro]/EGFP/full-length-DRA-5'-Kozak

pVgRxR

pIND/DsRed[hygro]/EBP50

pIND/DsRed[hygro]/PDZK1

pIND/DsRed[hygro]

Für alle Transfektionen der Zellen mit DRA wurde DRA als EGFP (Enhanced Green Fluorescence Protein) -markiertes Fusionsprotein verwendet, was durch die EGFP-Eigenfluoreszenz die Möglichkeit bietet, in der Fluoreszenzmikroskopie den Transfektionserfolg abschätzen und im Verlauf beurteilen zu können. Die PDZ-Adapterproteine waren entsprechend an DsRed (Discosoma sp. Red) gekoppelt. Als Kontrolle wurde jeweils mit einem lediglich EGFP bzw. DsRed enthaltenden Vektor transfiziert. Der EGFP-Vektor enthielt außerdem immer eine Resistenz für das Antibiotikum G418, um erfolgreich transfizierte Zellen selektieren zu können. Der DsRed-Vektor enthielt die Resistenz für Hygromycin B.

## **2.3 Mikroskopie und Fotodokumentation**

Die Zellen wurden unter einem CKX40-Mikroskop (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) mit variabler Vergrößerung (10fach, 20fach, 40fach) betrachtet. Mit der in dieses Mikroskop integrierten F-View-Kamera (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) wurden Abbildungen der dokumentationsrelevanten Bildausschnitte erstellt und mit dem Programm analySIS® (Soft Imaging System GmbH, Münster, Deutschland) nachbearbeitet und gespeichert.

Um die relevante Bildinformation optimal für das menschliche Auge darzustellen, das je nach Betrachtungsbedingungen nur etwa 40 bis 100 Graustufen unterscheiden kann, wurde die Backgroundfluoreszenz der Bilder durch Einstellung der Grauwertbereiche ausgeblendet. Dadurch ließ sich der Kontrast der Bilder anheben.

Die Abbildungen zeigen jeweils den gleichen Bildausschnitt einmal in Fluoreszenzlichttechnik zur Darstellung der Strukturen, die an grün fluoreszierendes EGFP gekoppeltes DRA, bzw. an rot fluoreszierendes DsRed gekoppelte Adapterproteine enthalten, sowie einmal in Durchlichttechnik zur Orientierung. Die Belichtungszeit war jeweils für den direkten Vergleich zweier Zellproben möglichst identisch gewählt worden.

## **2.4 Fluoreszenz-Messungen**

### **2.4.1 Mikrofluorometrie-Meßplatz**

Die Fluoreszenzmessungen wurden an einem Perkin-Elmer LS55B Küvettenfluorometer durchgeführt. Dieses Gerät verfügt über eine gepulste Lichtquelle, die bei einer Lampenleistung von 100W pro Zeiteinheit nur 8W in die Küvette einstrahlt, sodass der Fluoreszenzfarbstoff kaum ausbleicht. Die Küvette war eine Spezialanfertigung, in der mit Zellen besetzte Glasplättchen mit 11 x 22 mm (Thomas Scientific) eingespannt werden konnten. Die durchspülte Kammer der Küvette fasste 200µl und wurde auf 37°C beheizt,

innen war sie geschwärzt. Die Glasplättchen wurden in einem Winkel von 30° zum Exzitationslicht eingebracht, um Spiegelungsartefakte des Exzitationslichts in den Emissionsstrahlengang zu vermeiden. Die benötigten Pufferlösungen wurden in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt, kontinuierlich begast und über ein Perfusionssystem mit CO<sub>2</sub>-dichten Teflonschläuchen zur Küvette geleitet. Ein Vielschalter (Cole Parmer) sorgte für kontinuierliche blasenfreie Perfusion auch bei Pufferwechsel, die konstante Perfusionsgeschwindigkeit von 3 ml/min wurde durch eine im Ausflusstrakt des Systems installierte Pumpe (KNT, Basel) gewährleistet.

Die folgende Tabelle zeigt die Zusammensetzung der verwendeten Puffer.

Tab. 3: Pufferzusammensetzungen für Mikrofluorometriemessungen

Puffer 1: + Cl <sup>-</sup> - HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Puffer 2: + Cl <sup>-</sup> + HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Puffer 3: - Cl <sup>-</sup> + HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Kalibrationspuffer
5mM K-Glukonat	5mM K-Glukonat	5mM K-Glukonat	5mM K-Glukonat
2mM Mg-Glukonat	2mM Mg-Glukonat	2mM Mg-Glukonat	2mM Mg-Glukonat
10mM HEPES	10mM HEPES	10mM HEPES	10mM HEPES
10mM Glucose	10mM Glucose	10mM Glucose	10mM Glucose
140mM NaCl	115mM NaCl	115mM Na-Glukonat	1mM CaCl <sub>2</sub>
1mM CaCl <sub>2</sub>	25mM NaHCO <sub>3</sub>	25mM NaHCO <sub>3</sub>	40mM TMA-Cl
	1mM CaCl <sub>2</sub>	1mM Ca-Glukonat	100mM KCl

HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-haltige Puffer wurden mit einem 5%CO<sub>2</sub>/95%O<sub>2</sub>-Gemisch und HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-freie Puffer mit 100% O<sub>2</sub> begast. Alle Puffer wurden auf die korrekte Osmolarität überprüft (Roebing-Osmometer). Die pH-Einstellung erfolgte bei 37°C unter der entsprechenden Begasung auf ca. 7,4 für Puffer 1-3 mittels 5mM NaOH bzw. HEPES, und auf pH 7,0 und 7,5 für die beiden Kalibrationspuffer mittels TMA-OH.

#### 2.4.2 Bestimmung des intrazellulären pH mittels BCECF

Der intrazelluläre pH (pH<sub>i</sub>) wurde mittels des pH-abhängigen Fluoreszenzfarbstoffes 2',7'-bis-(2-carboxylethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein

(BCECF) erfasst. Hierzu wurden die Zellen mit BCECF-Acetomethylester beladen, indem sie mit 1  $\mu$ l BCECF in 1000  $\mu$ l Puffer 2 versetzt und für 20 Min. im Brutschrank bei 37°C inkubiert wurden. Die Esterform permeiert in die Zellen, wird dort durch unspezifische Esterasen gespalten, und das entstehende BCECF verbleibt in den Zellen.

Für die eigentliche Messung wurden die Zellen zunächst 200 sec. mit Puffer 1 zur Stabilisierung des intrazellulären pHs vorgespült, dann für 300 sec. mit Puffer 2, für weitere 300 sec. mit Puffer 3, und erneut für 300 sec. mit Puffer 2 gespült. Anschließend erfolgte zur Kalibrierung für je 300 sec. die Spülung mit den Kalibrationspuffern eingestellt auf pH 7,0 und 7,5.

Die Anregung erfolgte bei 440 und 482 nm, die Emission wurde bei 530 nm aufgezeichnet. Bedingt durch das Hin- und Herfahren des Exzitationsmonochromators konnte auf diese Weise alle 2,9 sec ein Datenpunkt erfasst werden (FL Win Lab, Perkin Elmer). Es wurde jeweils das Verhältnis der Emission bei einer Exzitation bei 440 nm (pH-unabhängig) und einer Exzitation bei 482 nm berechnet. Am Ende jedes Experimentes wurde dieses Verhältnis, die sogenannte Ratio, auf den intrazellulären pH kalibriert, indem der intrazelluläre pH auf den extrazellulären pH mittels des Ionophors Nigericin (10  $\mu$ M) auf die Werte 7.0 und 7.5 eingestellt wurde. Anhand dieser Kalibrationsdaten wurde die Ratio des jeweiligen Experimentes in pH<sub>i</sub>-Werte umgerechnet (Microsoft Excel).

## **2.5 PCR (polymerase chain reaction)**

Die Polymerase- Kettenreaktion ist eine hochsensitive Technik, um ein DNA-Segment zu amplifizieren, und somit ein qualitatives Verfahren zum Nachweis spezifischer DNA oder RNA (nach reverser Transkription: RT-PCR). Dazu wird das DNA-template in sukzessiven Zyklen von Denaturierung (Trennung des Doppelstrangs in die Einzelstränge), primer annealing (Hybridisierung zweier komplementärer Oligodeoxynukleotide an mehr oder weniger weit auseinander liegenden Regionen der beiden Stränge der doppelsträngigen DNA durch zwei

Primer) und Polymerisation exponentiell amplifiziert, sodass im Idealfall nach ca. 20 Zyklen eine millionenfache bzw. nach ca. 30 Zyklen eine milliardenfache Vermehrung des ursprünglichen template erreicht werden kann. Bei jedem Zyklus kann man im Prinzip folgende drei Schritte unterscheiden: Zuerst wird das Reaktionsgemisch (DNA-template, primer, dNTPs und Taq-Polymerase) in einem Thermocycler auf ca. 95 °C erhitzt, um die beiden komplementären DNA-Stränge zu trennen. Danach wird auf ca. 50- 60 °C heruntergekühlt, die Primer binden an die separierten Stränge. Als Drittes wird die Temperatur wieder auf ca. 70 °C erhöht und die thermostabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*) synthetisiert durch Hinzufügen der Nukleotidbasen an die Primer die neuen DNA-Stränge.

#### 2.5.1 Präparation der RNA mittels RNAqueous™-4PCR, Kit for Isolation of DNA-free RNA (Ambion®)

Die wie unter 2.1.4.7 beschrieben gewonnenen Pellets wurden mit dem RNAqueous™-4PCR, Kit for Isolation of DNA-free RNA (Ambion®) behandelt. Zunächst wurden 500µl der darin enthaltenen Lysis/Binding Solution zum Pellet pipettiert und dann auf dem Vortex gemischt, um das Pellet aufzulösen. Dann wurden dem Lysat 500µl 64%iges Ethanol zugegeben und durch Auf- und Abpipettieren vorsichtig gemischt. Dann wurde der mitgelieferte Filtereinsatz auf eines der ebenfalls im Kit enthaltenen 2ml-Tubes gesetzt, die Lysat/Ethanolmischung daraufpipettiert und 1 Min. bei 14000 rpm zentrifugiert. Dann wurde die Flüssigkeit unter dem Filter abgegossen. Als nächstes wurden 700µl der Wash Solution #1 zugegeben und wiederum 1 Min. bei 14000 rpm zentrifugiert und die Flüssigkeit unter dem Filter verworfen. Anschließend wurde dieser Vorgang zweimal mit der Wash Solution #2/3 wiederholt. Dann wurde der Filtereinsatz auf das zweite im Kit enthaltene 2ml-Tube gesetzt, und zum Eluieren der RNA 40µl Elution Solution aus dem Kit zugefügt. Diese war zuvor im Heizblock auf 80 °C erwärmt worden. Wieder wurde 1 Min. mit 14000rpm zentrifugiert, dann erneut 10µl Elution Solution zupipettiert und nochmal zentrifugiert. Nun wurde der Filter verworfen.

### 2.5.2 Konzentrationsbestimmung der RNA

Für die unter 2.5.1 gewonnene RNA-Elution wurde die Konzentration an RNA mittels Spectrophotometermessung bestimmt. Hierfür wurden 1,5µl der RNA 1:100 mit Wasser verdünnt und im Photometer die Absorption bei 260nm gemessen. Diese wurde über das integrierte Programm (SS DNARNA) nach der Formel [Absorption x 40 (Extinktionskonstante) x 100 (Verdünnung) : 1000] in die Konzentration an RNA in µg/µl umgerechnet.

### 2.5.3 Gewinnung von first-strand cDNA aus RNA mittels SuperScript™ II Reverse Transcriptase

Es wurden zunächst 1µl Oligo(dT) in der Konzentration 500µg/ml und xµl RNA in ein Eppendorftube pipettiert. x ist abhängig von der bestimmten RNA-Konzentration, da höchstens 5µg / 20ml Gesamt-Reaktionsvolumen vom Hersteller (Invitrogen®) empfohlen werden. Oligo(dT) und RNA zusammen sollten 12µl ergeben. Diese beiden Komponenten wurden im Thermocycler für 2 Min. auf 42°C erwärmt und dann schnell auf Eis gegeben. Dann wurden 4µl First-strand Puffer (im Set enthalten), 2µl DTT (0,1M), 1µl dNTP Mix (10mM) und 1µl SuperScript™ II RT (200 units) zugegeben und vorsichtig gemischt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch im Thermocycler für 50 Min. bei 42°C inkubiert und für weitere 15 Min. bei 70°C wieder inaktiviert.

### 2.5.4 Amplifizierung mittels PCR

Diese gewonnene cDNA wurde nun als Template zur Amplifizierung in der PCR verwendet. Es wurden in ein steriles Eppendorf Tube pipettiert:

1µl Template,  
2µl primer (100µM primer Stammlösung 1:10 verdünnt)

10µl 10X PCR Puffer (1:10 verdünnt)

1µl Taq DNA Polymerase

1µl dNTPs

xµl H<sub>2</sub>O (x wurde so gewählt, dass das Gesamtvolumen 50µl betrug)

Diese Komponenten wurden mit dem Vortex gemischt und nach folgendem Protokoll im Thermocycler (GeneAmp 9700, Perkin Elmer, Wellesley, USA) inkubiert:

	5 Min.	bei 94 °C,
30 Zyklen:	45 sec.	bei 94 °C,
	45 sec.	bei 58 °C,
	90 sec.	bei 72 °C,
	10 Min	bei 72 °C,
	30 Min.	bei 4 °C.

## 2.5.5 Auftrennung im Agarose-Gel

Zur Herstellung des Gels wurden 0,5g Agarose-Pulver in 50ml TAE-Puffer (Tris-Acetate-EDTA-Puffer, GIBCO<sup>®</sup>) gekocht, bis die Agarose vollständig gelöst war, und wieder abgekühlt, dann wurden 2,5µl Ethidiumbromid zugesetzt. Das Gießen des Gels erfolgte möglichst luftblasenfrei in den Gelträger mit eingesetztem Kamm für die Ladekammern. Das feste Gel wurde dann in die entsprechende mit Laufpuffer (TAE-Puffer) gefüllte Kammer eingesetzt.

Als nächstes wurden zur Herstellung des Ladepuffers gemischt:

5ml H<sub>2</sub>O dest.

20mg Bromphenol-Blau (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>)

1g Ficoll 400 (Amersham Pharmacia Biotech<sup>®</sup>).

Dann wurden zu 18µl der PCR-Produkte bzw. zu 17µl sterilem Wasser mit 1µl Molecular Weight Marker (Roche<sup>®</sup>) jeweils 2µl dieses Ladepuffers pipettiert. Damit wurden die Taschen des Gels beladen. Freigebliebene Taschen wurden mit Puffer gefüllt, um Konzentrationsgradienten innerhalb des Gels zu vermeiden. Die Laufzeit im Gel betrug etwa 1 Stunde bei 80V und

Raumtemperatur. Anschließend erfolgte die Gel-Dokumentation unter UV-Licht im Transilluminator.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Antibiotika-Konzentrationen**

Anhand der unter 2.1.3 beschriebenen Killing Curves wurden für die einzelnen Zelllinien jeweils die Antibiotika-Konzentrationen ermittelt, welche von resistenten Zellen toleriert werden, nicht resistente Zellen jedoch absterben lassen. Die entsprechenden Resistenzen waren entweder bereits in der verwendeten Zelllinie vorhanden, wie z.B. die Resistenz gegen Zeocin bei EcR293-Zellen, oder wurden bei der Transfektion mit übertragen.

#### **3.1.1 Hygromycin B-Konzentration für klonale EcR293/pEGFP-DRA -Zellen**

Die Zellen wurden täglich unter dem Mikroskop betrachtet, um den Effekt des Antibiotikums zu verfolgen und zu beurteilen. An den Tagen 2 bis 5 konnte man keine wesentliche Veränderung beobachten. An Tag 6 ließ sich erkennen, dass die Zellen bei den Konzentrationen 0, 12,5 und 25 µg/ml Hygromycin B weiterhin nicht beeinträchtigt waren. Bei 50 µg/ml Hygromycin B waren jedoch bereits etwa die Hälfte der Zellen, bei 100 µg/ml Hygromycin B nahezu alle Zellen abgestorben. Bei 200 µg/ml Hygromycin B waren keine Zellen mehr im well verblieben, da die abgestorbenen Zellen, die nicht mehr am Boden des wells adhärent gewesen waren, beim Absaugen des alten Nährmediums bereits mit abgesaugt worden waren. An Tag 10 setzte sich diese Beobachtung fort: bei 12,5 und 25 µg/ml Hygromycin B schwammen zwar tote Zellen an der Oberfläche, da die Zellzahl pro Fläche zu hoch war, die haftenden Zellen zeigten jedoch keinen Unterschied zu den Zellen, die ohne Antibiotikum kultiviert waren. Bei 50 - 200 µg/ml Hygromycin B war die Zellzahl im Gegensatz dazu insgesamt geringer, viele der noch haftenden Zellen zeigten bereits eine spärliche Form, und eine in Relation viel höhere Anzahl war abgestorben. Dies verdeutlicht Abb. 2.

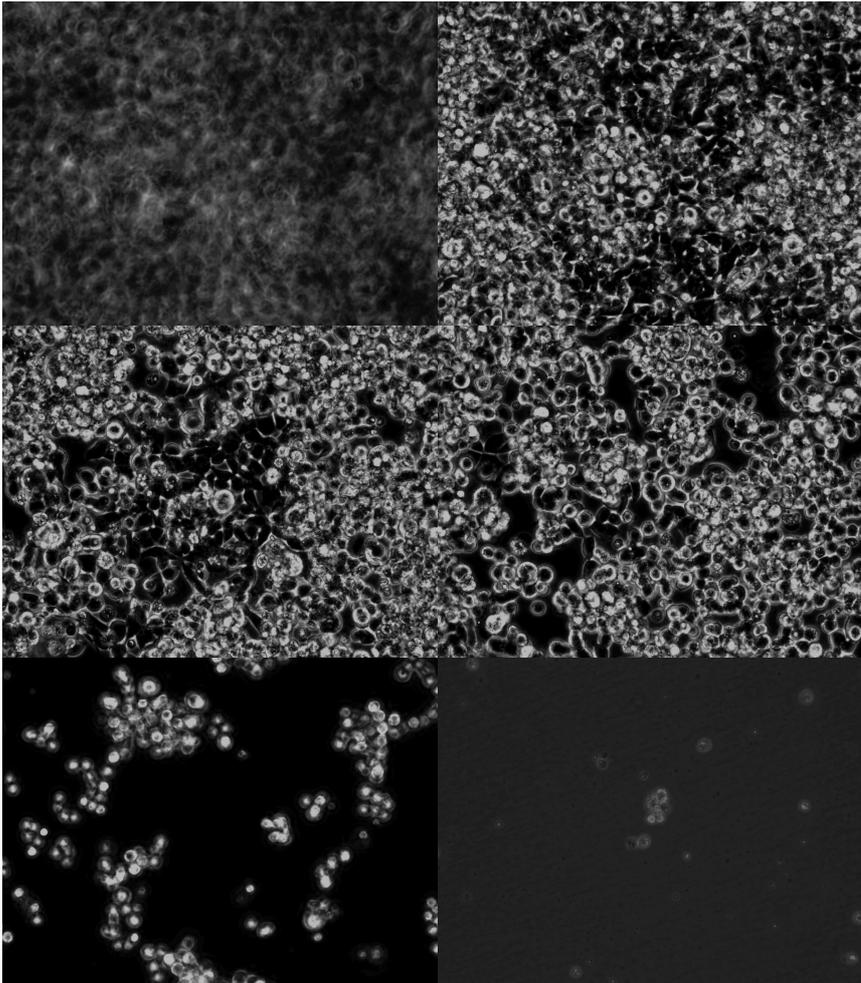


Abb. 2: EcR293/pEGFP-DRA/clone15-Zellen nach 10 Tagen Kultivierung in Nährmedium mit folgenden Konzentrationen an Hygromycin B (von links oben beginnend): 0, 12,5, 25, 50, 100 und 200  $\mu\text{g/ml}$  Hygromycin B

An Tag 12 zeigten die ohne Antibiotikum kultivierten Zellen noch immer ein regelrechtes Kulturverhalten, die Zellzahl bei 12,5 und 25  $\mu\text{g/ml}$  Hygromycin B war etwas geringer, ab 50  $\mu\text{g/ml}$  Hygromycin B waren alle Zellen abgestorben. Somit wurden 100  $\mu\text{g/ml}$  Hygromycin B als richtige Konzentration definiert.

### 3.1.2 Zeocin-Konzentration für Caco-2-Zellen

Die Zellen wurden jeden Tag mikroskopiert, um die Wirkung des Zeocins einzuschätzen. Nach einer Woche zeigte sich deutlich, dass die Zellen bereits ab 200  $\mu\text{g/ml}$  Zeocin zugrunde gingen. Bei 100  $\mu\text{g/ml}$  Zeocin zeigten sie sich zwar im Wachstum beeinträchtigt, starben jedoch nur zu geringen Anteilen ab. Nach zwei Wochen waren nahezu keine vitalen Zellen bei 200  $\mu\text{g/ml}$  Zeocin

mehr erkennbar, bei 400 µg/ml hafteten noch wenige tote Restzellen am Boden des wells, bei 600 und 800 µg/ml waren keine Zellen mehr übrig, da die toten Zellen bei den Mediumwechseln mit abgesaugt worden waren. Bei 100 µg/ml Zeocin war das well zwar überwuchert und viele Zellen lösten sich plattenartig ab, die Einzelzellen hatten jedoch ein weitgehend gesundes Aussehen. Daher wurden 150 µg/ml Zeocin als wirksame Konzentration für Caco-2-Zellen bestimmt. Zur Überprüfung wurde in einer separaten, regulär passagierten Flasche mit Caco-2-Zellen am zweiten Tag nach der Passage das Nährmedium gegen Medium mit 150 µg/ml Zeocin getauscht, ein weiterer Wechsel des Mediums erfolgte an Tag 5. Hier starben die Zellen kontinuierlich ab, bis an Tag 8 keine vitalen Zellen mehr vorhanden waren. Somit war die ausreichende Wirksamkeit von 150 µg/ml Zeocin bei nicht resistenten Caco-2-Zellen zu Selektionszwecken bewiesen.

### 3.1.3 Hygromycin B-Konzentration für Caco-2/pTetOff-Zellen

Bei der täglichen Betrachtung unter dem Mikroskop zeigte sich bei allen Konzentrationen des Antibiotikums eine deutliche Verlangsamung der Zellproliferation. Die Zellen starben außerdem kontinuierlich ab bei 400, 500, 600 und 800 µg/ml Hygromycin B, bei 200 µg/ml lediglich in geringerem Ausmaß. Nach zwei Wochen und zwei Tagen waren alle Zellen abgestorben und abgesaugt bei 500, 600 und 800 µg/ml Hygromycin B, wenige tote Restzellen verblieben bei 400 µg/ml und die meisten Zellen abgestorben bei 200 µg/ml. Somit wurden 400 µg/ml Hygromycin B als sicher selektiv wirksame Konzentration für Caco-2/pTetOff-Zellen bestimmt.

### 3.1.4 G418-Konzentration für EcR293-Zellen

Die Zellen wurden jeden Tag unter dem Mikroskop betrachtet, an Tag 11 begannen die ersten Zellen abzusterben bei 400 und 500 µg/ml G418. An Tag 13 waren die meisten Zellen zugrundegegangen bei 400 und 500 µg/ml G418, viele auch bei 300 µg/ml. An Tag 20 waren alle Zellen gestorben bei 400 und 500 µg/ml G418, sowie nahezu alle Zellen bei 300 µg/ml G418. Daher wurden

400 µg/ml G418 als suffiziente Selektionskonzentration für EcR293-Zellen definiert.

### 3.1.5 Hygromycin B-Konzentration für TetOff293-Zellen

Die Zellen wurden täglich mikroskopiert und hierbei die Wirkung des Hygromycin B beurteilt. Bereits an Tag 4, also einen Tag, nachdem das Antibiotikum zugegeben worden war, begannen die Zellen bei 100 und 200 µg/ml Hygromycin B abzusterben. An Tag 6 waren auch bei 50 µg/ml Hygromycin B die ersten toten Zellen zu beobachten. An Tag 9 waren alle Zellen abgetorben bei 200 und 100 µg/ml Hygromycin B, sowie der größte Teil auch bei 50µg/ml Hygromycin B. Daher wurden 100µg/ml Hygromycin B für TetOff293-Zellen als selektionswirksame Konzentration festgelegt.

Für Caco-2-Zellen und G418, für EcR293-Zellen und Zeocin, sowie für TetOff-Zellen und G418 lagen entsprechende Daten bereits in der Arbeitsgruppe vor. Es ergaben sich die folgenden Konzentrationen an Antibiotika für die aufgeführten Zelllinien, die dem Basismedium jeweils zu Selektionszwecken zugesetzt wurden.

Tab. 4: Antibiotikakonzentrationen im Nährmedium in µg/ml zu Selektionszwecken; n.z. = nicht zutreffend

	G418	Zeocin	Hygromycin B
EcR293	n.z.	400	n.z.
EcR293/pEGFP-DRA und EcR293/pEGFP	400	400	n.z.
EcR293/pIND/EGFP-DRA und EcR293/pIND/EGFP	400	400	n.z.
EcR293/pDsRed	400	400	n.z.
EcR293/pIND/DsRed[hygro]EBP50 und EcR293/pIND/DsRed[hygro]PDZK1 und EcR293/pIND/DsRed[hygro]	400	400	100

EcR293/pEGFP-DRA/pIND/DsRed[hagro]EBP50 und EcR293/pEGFP-DRA/pIND/DsRed[hagro]PDZK1 und EcR293/pEGFP-DRA/pIND/DsRed[hagro]	400	400	100
Caco-2	n.z.	n.z.	n.z.
Caco-2/pEGFP-DRA und Caco-2/pEGFP	800	n.z.	n.z.
Caco-2/pVgRxR	n.z.	150	n.z.
Caco-2/pVgRxR/pIND/EGFP-DRA und Caco-2/pVgRxR/pIND/EGFP	800	150	n.z.
Caco-2/pTetOff	100	n.z.	n.z.
Caco-2/pTetOff/pTRE2[hagro]EGFP-DRA und Caco-2/pTetOff/pBI/EGFP	100	n.z.	400
TetOff293	100	n.z.	n.z.
TetOff293/pTRE2[hagro]EGFP-DRA und TetOff293/pBI/EGFP	100	n.z.	100

## **3.2 Kontrolle der Transfektionseffizienz**

Für alle durchgeführten Transfektionen war eine Kontrolle der Transfektionseffizienz notwendig, um alle weiterführenden Arbeiten nur mit erfolgreich transfizierten Zellen fortzusetzen und die Expressionsergebnisse vor dem Hintergrund der Transfektionseffizienz zu interpretieren. Da DRA als EGFP-markiertes Fusionsprotein zur Transfektion verwendet wurde, lag es nahe, hierfür das konstitutiv exprimierende pEGFP einzusetzen. Bei allen Transfektionen mit DRA-Konstrukten wurden jeweils parallel Zellen der gleichen Passage auch mit pEGFP transfiziert und unter den gleichen Bedingungen kultiviert. 12 - 24 Stunden nach der Transfektion konnte dann anhand der grünen Eigenfluoreszenz von EGFP die Transfektionseffizienz beurteilt werden. Eine Transfektion wurde als erfolgreich eingestuft, wenn mindestens 50-60%

der Zellen eine grüne Autofluoreszenz durch transfiziertes EGFP zeigten. Ein Beispiel für erfolgreich mit pEGFP transfizierte Caco-2-Zellen zeigt Abb. 3.

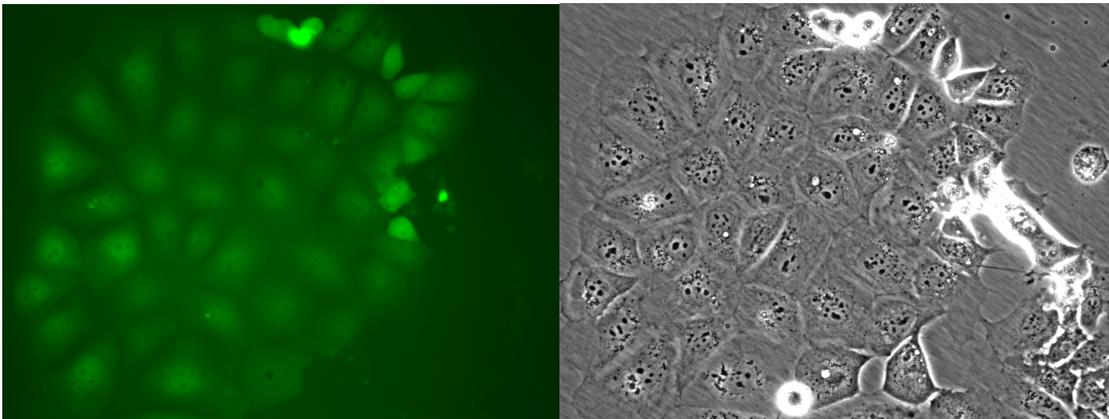


Abb. 3: Fluoreszenzmikroskopieaufnahme (links) und Durchlichtmikroskopieaufnahme (rechts) von Caco-2/EGFP, 24 Stunden nach Transfektion, Vergrößerung 20fach

War die Transfektion zu weniger als 50-60% erfolgreich, wurden die Zellen verworfen und der Versuch wiederholt.

Analog wurde die Transfektionseffizienz bei den als Fusionsproteine mit rot fluoreszierendem DsRed klonierten Adapterproteinen mit pIND/DsRed und pDsRed kontrolliert. Hier konnte ebenfalls etwa 12 – 24 Stunden nach der Transfektion die rote Autofluoreszenz von DsRed unter dem Mikroskop bewertet werden. Lag hierbei die Effizienz unter 30-40%, wurden die Zellen verworfen und der Versuch wiederholt. Ein Beispiel für die rote Eigenfluoreszenz des DsRed zeigt Abb. 4.

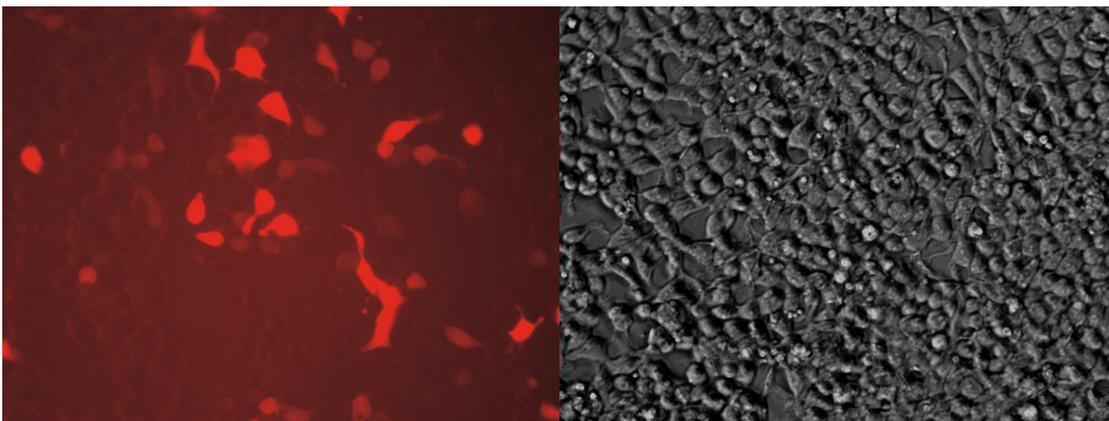


Abb. 4: Fluoreszenzmikroskopieaufnahme (links) und Durchlichtmikroskopieaufnahme (rechts) von EcR293/pDsRed, 24 Stunden nach Transfektion, Vergrößerung 20fach

Insgesamt muss davon ausgegangen werden, dass ein Teil der Fluoreszenz immer durch Doppelbrechung infolge zuoberst schwimmender toter Zellen zustande kommen kann.

### **3.3 Zelllinien aus gemischten Klonen und klonale Zelllinien**

Wie unter 2.1.4.4 beschrieben wurden von einigen Zelllinien klonale Zellen gezogen. Sofern im Folgenden die Zelllinien jedoch nicht explizit als klonal beschrieben sind, handelt es sich um sogenannte gemischte Klone also Zelllinien, die aus mehreren verschiedenen Klonen bestehen.

### **3.4 Transfektion von DRA in Caco-2-Zellen**

Einer der beiden Hauptziele der vorliegenden Arbeit war es, ein möglichst physiologisches Zellsystem zu schaffen, das die Möglichkeit bietet, DRA induzierbar heterolog zu überexprimieren. Um so eine Grundlage zu bereiten für die weitere Charakterisierung und Erforschung der Funktionen von DRA insbesondere als Anionenaustauscher sowie bezüglich seiner Interaktion mit anderen Proteinen (PDZ-Adapterproteinen).

Aus den unter 1.5 erläuterten Gründen eignen sich hierfür Caco-2-Zellen besonders.

Um die Notwendigkeit der induzierbaren Expression von DRA noch einmal zu überprüfen, wurde zunächst versucht, Caco-2-Zellen stabil mit EGFP-markiertem DRA zu transfizieren.

### 3.4.1 Stabile Transfektion von Caco-2-Zellen mit pEGFP/f.l.DRA-5'Kozak

Caco-2-Zellen wurden mit pEGFP/f.l.DRA-5'Kozak nach dem unter 2.2 beschriebenen Schema transfiziert. Die Kontrolle der Transfektionseffizienz erfolgte über parallel mit pEGFP transfizierte Zellen, wie unter 2.1.4.7 erläutert. Einzelne Zellen zeigten jeweils nach ca. 10 Tagen eine grüne EGFP-Autofluoreszenz in der Fluoreszenzmikroskopie (Bildmaterial nicht gezeigt). Es wurde mittels G418 selektiert (eine entsprechende Resistenz war in den beiden Vektoren pEGFP/f.l.DRA-5'Kozak und pEGFP enthalten) und mehrmals passagiert. Bereits nach der zweiten Passage ließ sich keine grüne EGFP-Autofluoreszenz mehr nachweisen.

Ergänzend wurden bei Passage 4 Zellysate für den DNA-Nachweis mittels RT-PCR gewonnen.

PCR für EGFP-DRA in Caco-2-Zellen:

Die PCR wurde nach dem unter 2.5 beschriebenen Protokoll durchgeführt.

Folgende Primer wurden für 5'EGFP-DRA verwendet:

1) EGFP\_DRA\_P1\_280403; Nr. 4429D; Bindungsstelle 1156-1181;

Sequenz CAC TAC CAG CAG AAC ACC CCC ATC GG

2) EGFP\_DRA\_M5\_280403; Nr. 4430D; Bindungsstelle 1757-1782;

Sequenz ACT CAG AAT CGG AAA CGG ACC CAG GG.

Die zu erwartende Größe des PCR-Produkts lag bei 626 bp.

Für 3'EGFP-DRA wurden folgende Primer verwendet:

1) DRA\_RT\_P1 ; Nr. 6928D ; Bindungsstelle 1863-1890;

Sequenz TTG GCT TTA GTC CAC TTC GAA TTC TAC G

2) DRA\_RT\_M1; Nr. 6929D; Bindungsstelle 2233-2260;

Sequenz CTC AAT GAA GTC ATC ATC AGT TCC AAC G

Die zu erwartende Größe des PCR-Produkts lag bei 397 bp.

Abb. 5 zeigt die Geldokumentation der PCR.

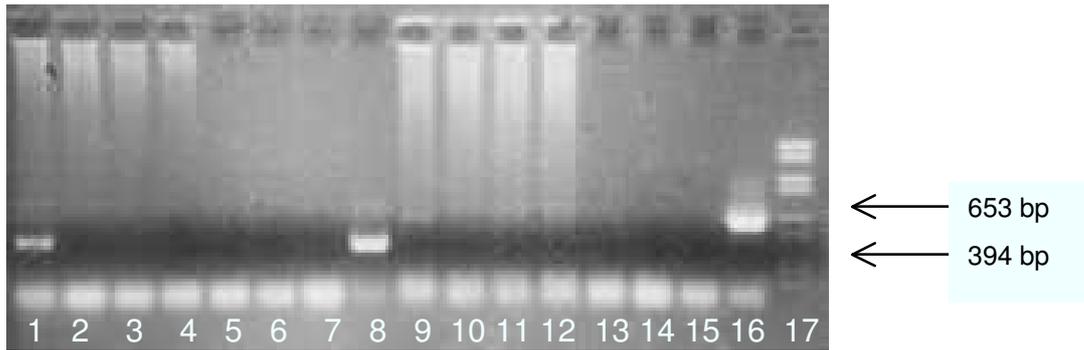


Abb. 5: PCR für EGFP-DRA in Caco-2-Zellen:

Spur 1-8: 3'EGFP-DRA, Spur 9-16: 5'EGFP-DRA;

Spur 1	EcR293/pEGFP-f.l.DRA
Spur 2	EcR293/pEGFP
Spur 3	Caco-2/pEGFP-f.l.DRA
Spur 4	Caco-2/pEGFP
Spur 5	rt H <sub>2</sub> O
Spur 6	H <sub>2</sub> O
Spur 7	Caco-2/pEGFP-f.l.DRA (RNA Kontrolle)
Spur 8	pIND/GFP-DRA 5' Kozak (positive Kontrolle)
Spur 9	EcR293/pEGFP-f.l.DRA
Spur 10	EcR293/pEGFP
Spur 11	Caco-2/pEGFP-f.l.DRA
Spur 12	Caco-2/pEGFP
Spur 13	rt H <sub>2</sub> O
Spur 14	H <sub>2</sub> O
Spur 15	Caco-2/pEGFP-f.l.DRA (RNA Kontrolle)
Spur 16	pBS/DRA 3' (positive Kontrolle)
Spur 17	Marker VI

Die Spuren 1, 2, 9 und 10 enthalten Lysate von mit EGFP und EGFP-DRA transfizierten EcR293-Zellen (siehe Kapitel 3.6.1). Sie dienen hier als positive (EcR293/pEGFP-DRA) bzw. negative (EcR293/pEGFP) Kontrollen. Als positive Kontrollen dienen die Spuren 8 bzw. 16, die jeweils den entsprechenden Vektor enthalten. Die Spuren 5, 6, 13 und 14 enthalten Wasser bzw. rt Wasser, und dienen als negative Kontrolle. Man erkennt deutlich die Bande in Spur 1 und in Spur 8 minimal oberhalb der Bande des Markers bei 394 pb, jeweils entsprechend 3'EGFP-DRA. In Spur 16 und schwächer auch in Spur 9 zeigt sich eine Bande etwas unterhalb 653 bp, entsprechend 5'EGFP-DRA. Die

übrigen Spuren, insbesondere die Spuren 3 und 11, in denen Lysate der stabil mit DRA transfizierten Caco-2-Zellen aufgetragen wurden, enthalten diese Banden nicht. Hier besteht also auch auf RNA-Ebene kein Nachweis von EGFP-DRA.

Da Caco-2-Zellen bei regulärem Wachstum polarisieren, also ein apikales und ein basolaterales Kompartiment ausbilden, wurden die transfizierten Zellen ergänzend auf kollagen-beschichteten Membranen (Transwell- COL 3459, Porengröße 0,4 µm; Sigma Aldrich®) kultiviert. Auch diese Zellen zeigten fluoreszenzmikroskopisch keine relevante Grünfärbung. Es musste davon ausgegangen werden, dass die Zellen DRA nicht stabil exprimierten.

### 3.4.2 Stabile Transfektion des Ecdysone-induzierbaren Systems in Caco-2-Zellen

Als Konsequenz aus der nicht erfolgreichen konstitutiven Expression von DRA in Caco-2 Zellen wurde als alternatives Verfahren die induzierbare Transfektion bzw. Expression von DRA angestrebt. Hierfür mussten Caco-2-Zellen als Erstes mit einem Induktionssystem versehen werden. Die Grundlagen des gewählten Ecdysone-induzierbaren Systems sind in Kapitel 1.5.2.1 erläutert.

Caco-2-Zellen wurden mit dem Vektor pVgRxR transfiziert, der neben Informationen für das Ecdysone-System auch eine Resistenz für das Antibiotikum Zeocin enthält, sodass anschließend die erfolgreich transfizierten Zellen durch Zufügen von Zeocin in das Nährmedium selektiert werden konnten.

Die entstandene Zelllinie wird im Folgenden Caco-2/pVgRxR genannt. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz nach den unter 3.2 dargelegten Kriterien diente pEGFP. Es wurden, wie unter 2.1.4.7 beschrieben, entsprechende Zellysate für die PCR gewonnen, um anhand derer die Expression der EcR-mRNA zu untersuchen.

PCR für EcR-Rezeptor in Caco-2-Zellen:

Als Primer wurden ecr\_1\_fw\_110303 (2033) und ecr\_1\_rev\_110303 (2034) verwendet. Die zu erwartende Größe des PCR-Produkts lag bei 625 bp. Als Positiv-Kontrolle diente pVgRxR Midi.

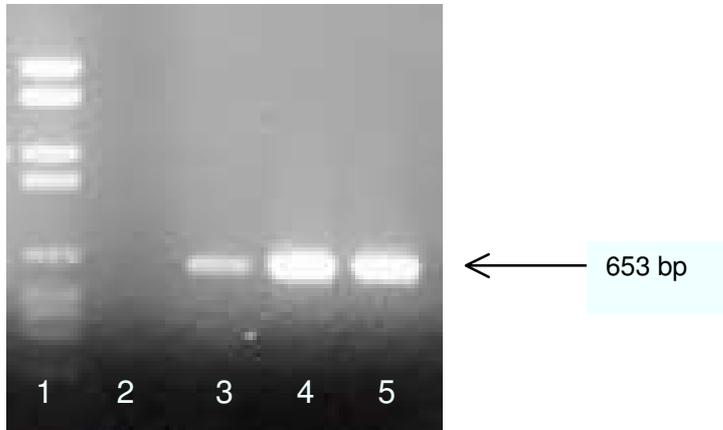


Abb. 6: PCR für EcR-Rezeptor in Caco-2/pVgRxR-Zellen

Spur 1	Marker VI
Spur 2	Caco-2
Spur 3	EcR293 als Positiv-Kontrolle
Spur 4	Caco-2/pVgRxR
Spur 5	pVgRxR Midi als Positiv-Kontrolle

Spur 4, in welcher das PCR-Produkt der Caco-2/pVgRxR-Zellen aufgetragen wurde, zeigt minimal unterhalb der Bande des MarkersVI bei 653 bp eine Bande bei ca. 625 bp, entsprechend dem EcR-Rezeptor.

Diese Daten zeigen, dass die Caco-2-Zellen erfolgreich stabil mRNA für den EcR-Rezeptor exprimieren.

### 3.4.3 Induzierbare Transfektion von DRA in Caco-2/pVgRxR-Zellen

Im nächsten Schritt wurden diese stabil den Ecdysone-Rezeptor exprimierenden Caco-2/pVgRxR-Zellen induzierbar mit DRA transfiziert. Im Vektor pIND/EGFP-F.L.DRA5'Kozak wird EGFP-DRA induzierbar unter Kontrolle des Ecdyson-Systems transskribiert. Der vektor enthält zusätzlich eine Resistenz für das Antibiotikum G418. So konnten wieder die erfolgreich

transfizierten Zellen durch Zufügen von G418 zum Nährmedium selektiert werden. Als Positivkontrolle diente pIND/EGFP.

20 Tage nach der Transfektion wurden die Zellen mit 5µM PonasteroneA induziert und zeigten 48 Stunden später eine deutliche EGFP-Autofluoreszenz (Bildraten nicht gezeigt). Bereits nach einmaligem Passagieren der transfizierten Zellen war jedoch keine grüne Fluoreszenz mehr nachweisbar.

Zusammenfassend ließ sich DRA also auch mit dem Ecdyson-induzierbaren System nicht stabil induzierbar in Caco-2-Zellen transfizieren. Im Weiteren wurde als Alternative daher das Tetrazyklin-reprimierbare System verwendet.

#### 3.4.4 Stabile Transfektion des Tetrazyklin-reprimierbaren Systems in Caco-2-Zellen

Caco-2-Zellen wurden zunächst mit dem Vektor pTetOff, der das Tetrazyklin-reprimierbare System und eine Resistenz gegen das Antibiotikum G418 enthält, transfiziert. Zur Kontrolle erfolgte wiederum parallel eine Transfektion mit pEGFP. Die erfolgreich transfizierten Zellen wurden mittels G418 selektiert. Dann wurden, wie unter 2.1.4.4 beschrieben, mehrere Klone gezogen, die somit stabil das Tetrazyklin-reprimierbare System exprimierten. Mit pTetOff transfizierte Zellen werden im Folgenden Caco-2/pTetOff-Zellen genannt.

#### 3.4.5 Induzierbare Transfektion von Caco-2/pTetOff-Zellen mit DRA

Sowohl Caco-2/pTetOff-Zellpopulationen aus gemischten Klonen als auch mehrere klonale Caco-2/pTetOff-Zellpopulationen wurden jeweils mit und ohne Doxycyclin mit pTRE2[hygro]/EGFP-DRA und mit pBI/EGFP sowie zur Transfektionskontrolle transient mit pEGFP transfiziert. Selektioniert wurden die erfolgreich transfizierten Zellen über die Resistenz gegen Hygromyzin B (Invitrogen®). 24 Stunden bis etwa drei Tage nach der Transfektion zeigten einige Zellen der gemischten Klone ebenso wie einige klonale Zellen, die

jeweils in Nährmedium ohne Doxycyclin (induzierter Zustand) gewachsen waren, in der Fluoreszenzmikroskopie eine deutliche EGFP-Autofluoreszenz, im Gegensatz zu jenen, welchen Doxycyclin im Nährmedium zugesetzt worden war (reprimierter Zustand). Die folgenden Abbildungen zeigen jeweils fluoreszenz- und durchlichtmikroskopische Aufnahmen beispielhaft einmal für die mit pTRE2[hygro]/EGFP-DRA und mit pBI/EGFP transfizierten Zellpopulationen aus gemischten Klonen (Abb. 7 und Abb. 8). Sowie zwei Beispiele für Klone, die mit pTRE2[hygro]/EGFP-DRA transfiziert wurden (Abb. 9 und Abb. 10), und ein Beispiel für mit pBI/EGFP transfizierte Zellen (Abb. 11).

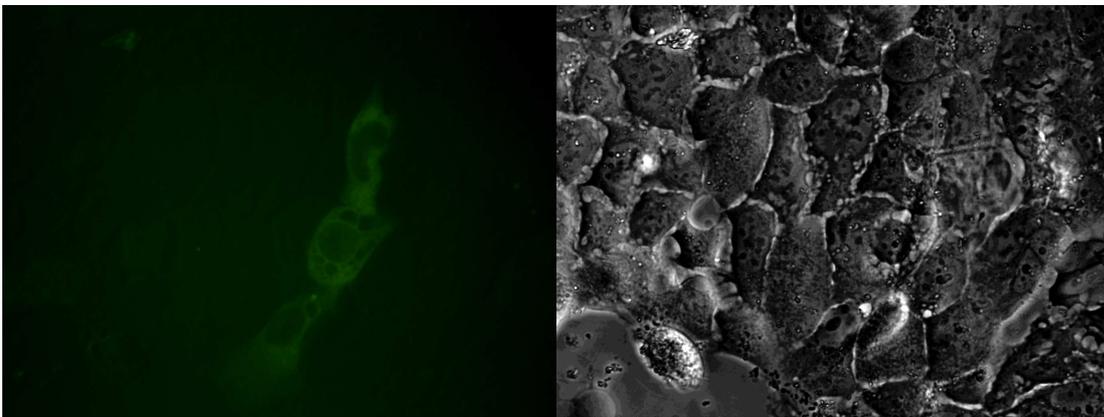


Abb. 7: Fluoreszenzmikroskopieaufnahme (links) und Durchlichtmikroskopieaufnahme (rechts) von Caco-2/pTetOff/gemischte Klone/pTRE2[hygro]/pEGFP-DRA, ohne Doxycyclin, 24 Stunden nach Transfektion, Vergrößerung 40fach, Belichtungszeit 2500ms

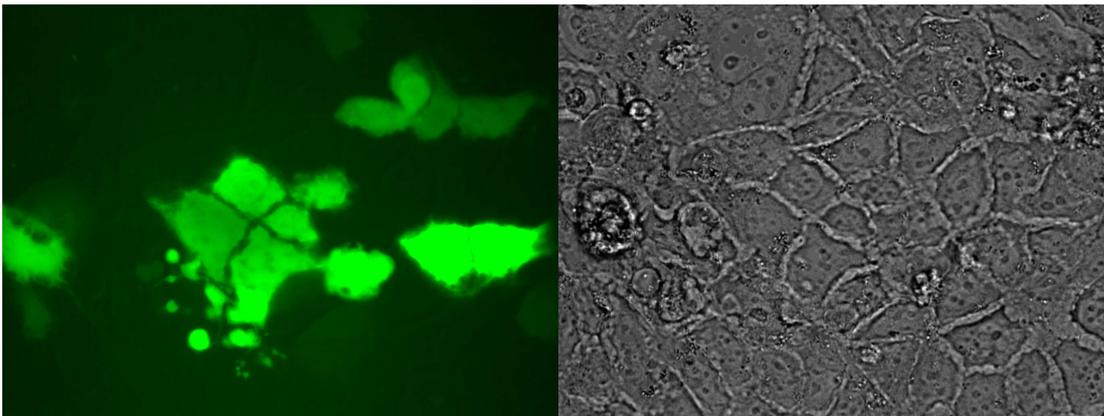


Abb. 8: Fluoreszenzmikroskopieaufnahme (links) und Durchlichtmikroskopieaufnahme (rechts) von Caco-2/pTetOff/gemischte Klone/pBI/EGFP, ohne Doxycyclin, 24 Stunden nach Transfektion, Vergrößerung 40fach, Belichtungszeit 2500ms

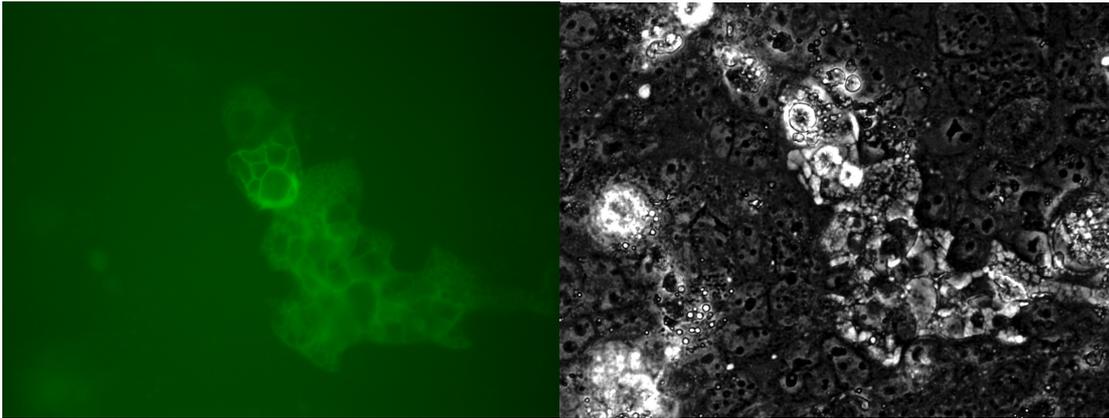


Abb. 9: Fluoreszenzmikroskopieaufnahme (links) und Durchlichtmikroskopieaufnahme (rechts) von Caco-2/pTetOff/clone1/pTRE2[hygro]/EGFP-DRA, ohne Doxycyclin, 24 Stunden nach Transfektion, Vergrößerung 40fach, Belichtungszeit 4000ms

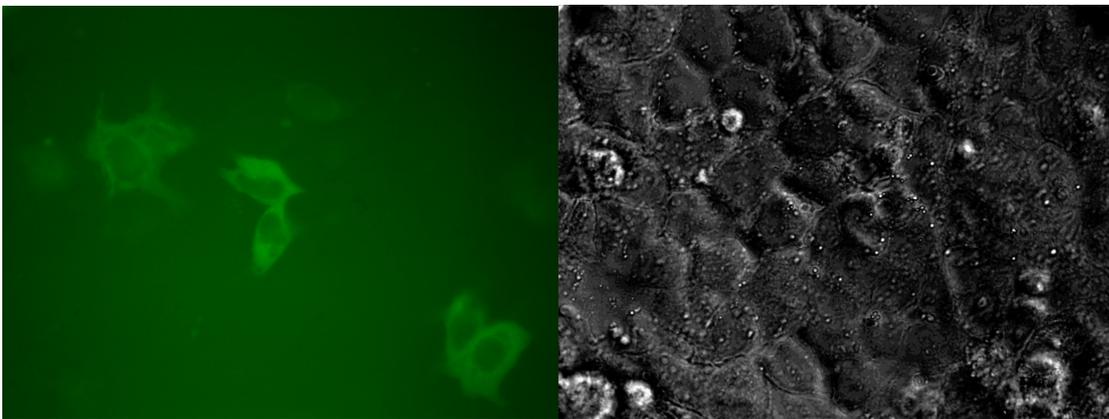


Abb. 10: Fluoreszenzmikroskopieaufnahme (links) und Durchlichtmikroskopieaufnahme (rechts) von Caco-2/pTetOff/clone3/pTRE2[hygro]/EGFP-DRA, ohne Doxycyclin, 24 Stunden nach Transfektion, Vergrößerung 40fach, Belichtungszeit 4000ms

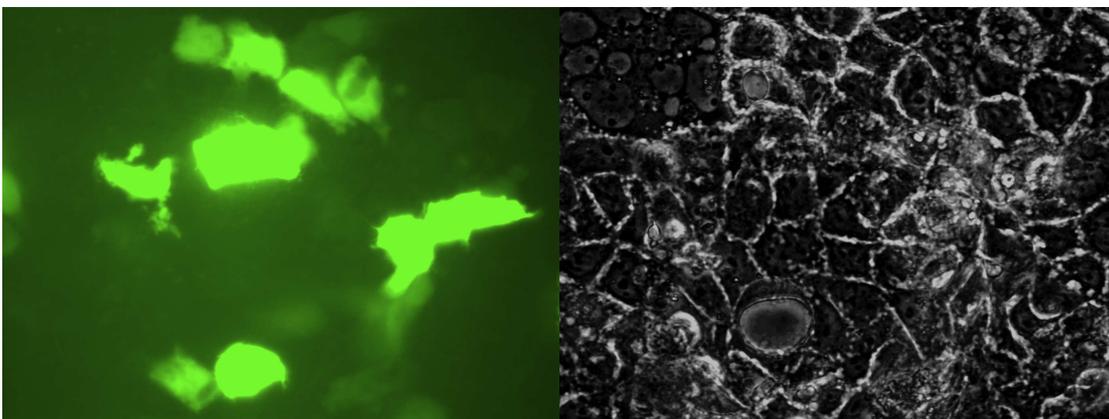


Abb. 11: Fluoreszenzmikroskopieaufnahme (links) und Durchlichtmikroskopieaufnahme (rechts) von Caco-2/pTetOff/clone2/pBI/EGFP, ohne Doxycyclin, 24 Stunden nach Transfektion, Vergrößerung 40fach, Belichtungszeit 4000ms

Betrachtet man nur mit EGFP transfizierte induzierte Zellen (pBI/EGFP) im Vergleich mit Zellen, welche mit an EGFP gekoppeltem DRA transfiziert und induziert sind (pTRE2[hygro]/EGFP-DRA), so fällt auf, dass sich die grüne Fluoreszenz unterschiedlich verteilt darstellt. In den DRA exprimierenden Zellen ist die Grünfärbung vornehmlich in der Peripherie der Zellen lokalisiert, während die lediglich das EGFP exprimierenden Zellen komplett grün fluoreszierend imponieren. Hieraus lässt sich eine weitere Bestätigung für die erfolgreiche Transfektion mit DRA ableiten, welches als Transmembranprotein im Bereich der Zellmembran erwartet werden muss.

Für alle induzierbar mit DRA transfizierten Caco-2-Zellen mussten folgende Beobachtungen festgehalten werden:

1. Im Laufe mehrerer Zellpassagen war ein Nachlassen der EGFP-Autofluoreszenz sowohl in der Anzahl der positiven Zellen als auch in der Fluoreszenzintensität zu beobachten, obwohl grün-fluoreszierende, also erfolgreich transfizierte Zellen, im Zuge dieser Transfektion eine Resistenz gegen das zugesetzte Hygromycin erworben hatten. Bereits nach dem Verlauf weniger Passagen der transfizierten Zellen war keine Grünfärbung, welche einer Expression von DRA entsprechen sollte, mehr nachweisbar.

2. Der Zustand der Zellen verschlechterte sich stetig. Die Zellen benötigten mehr Zeit, um nach dem Passagieren erneut am Flaschenboden zu haften, und es dauerte länger, bis eine konfluente Zellschicht in der Flasche entstand. Daher konnte vermutet werden, dass die Expression von DRA die Zelle anfälliger macht für andere Einflüsse, wie beispielsweise die Änderung der Zusammensetzung des Nährmediums oder den Stress einer Passage.

Es wurde angenommen, dass die Zellen möglicherweise nicht in der Lage sind, über einen längeren Zeitraum DRA kontinuierlich zu exprimieren. Darum wurde in einer weiteren Reihe von Experimenten versucht, nach primär induzierter erfolgreicher Transfektion, bestätigt durch die EGFP-Autofluoreszenz der Zellen sowie die Kontrolle mit pEGFP, die Expression von DRA durch Zugabe von

Doxycyclin in das Nährmedium wieder zu unterdrücken. Dies erwies sich als durchführbar, die Zellen verloren ihre Färbung innerhalb von 48 Stunden nach Zugabe von Doxycyclin komplett. Eine erneute Grünfärbung, im Sinne einer erneuten Induktion der Expression von DRA durch erneutes Weglassen von Doxycyclin war jedoch in keinem Fall möglich.

### **3.5 Induzierbare Transfektion von DRA in TetOff293-Zellen**

Um die Frage zu klären, ob die induzierbare Expression von EGFP-DRA im TetOff-System überhaupt funktioniert, wurden – als Positivkontrolle - Tet293-Zellen transfiziert. Sie sind ein HEK293-Zellklon , welcher bereits stabil das Tet-System exprimiert. Sie wurden entsprechend den Caco-2/pTetOff-Zellen mit pTRE2[hygro]/EGFP-DRA-5'-Kozak bzw. wiederum als Kontrolle mit pBI/EGFP transfiziert. Die Selektion erfolgte auch hier durch Hygromycin B.

Die Abbildungen 12, 13 und 14 zeigen die mit pBI/EGFP bzw. mit pTRE2[hygro]/EGFP-DRA-5'-Kozak transfizierten und primär induzierten TetOff293-Zellen am ersten Tag nach Transfektion.

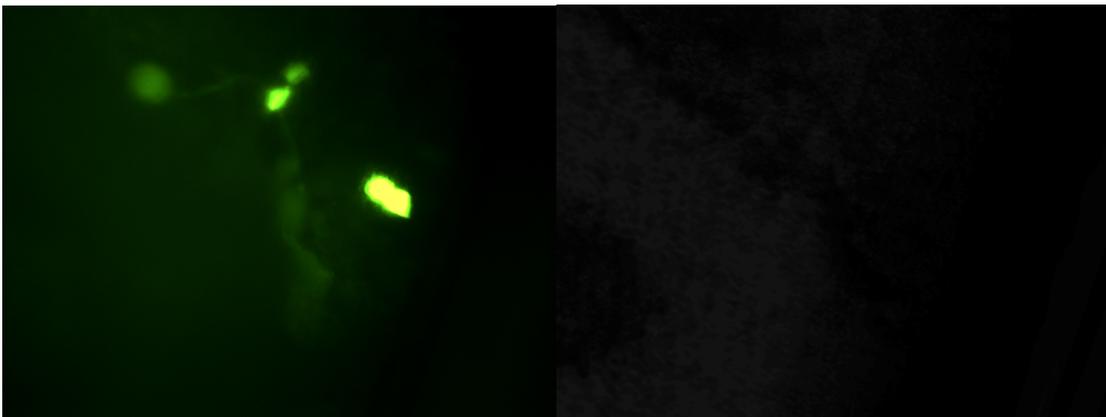


Abb. 12: Fluoreszenzmikroskopieaufnahme (links) und Durchlichtmikroskopieaufnahme (rechts) von TetOff293/pBI/pEGFP, ohne Doxycyclin, 24 Stunden nach Transfektion, Vergrößerung 20fach, Belichtungszeit 1000ms in Fluoreszenztechnik und 75ms in Durchlichttechnik

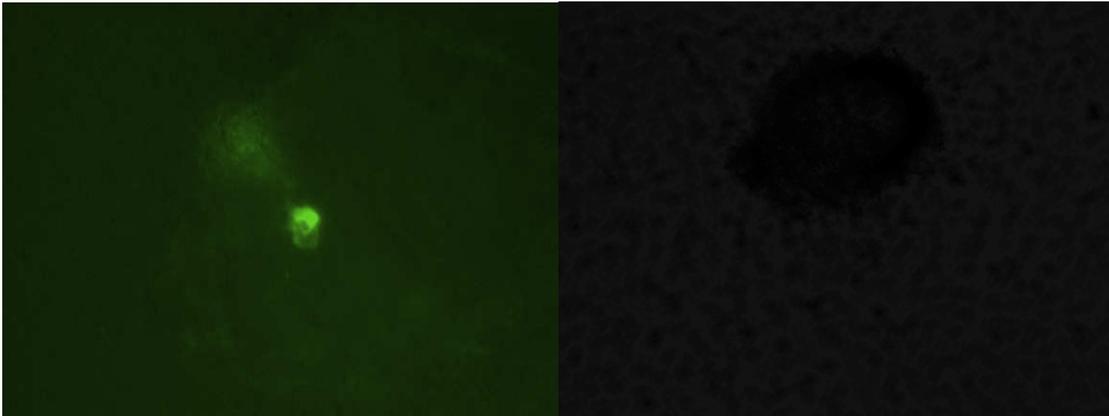


Abb. 13: Fluoreszenzmikroskopieaufnahme (links) und Durchlichtmikroskopieaufnahme (rechts) von TetOff293/TRE2[hygro]/EGFP-DRA, 24 Stunden nach Transfektion, Vergrößerung 20fach, Belichtungszeit 1000ms in Fluoreszenztechnik und 75ms in Durchlichttechnik

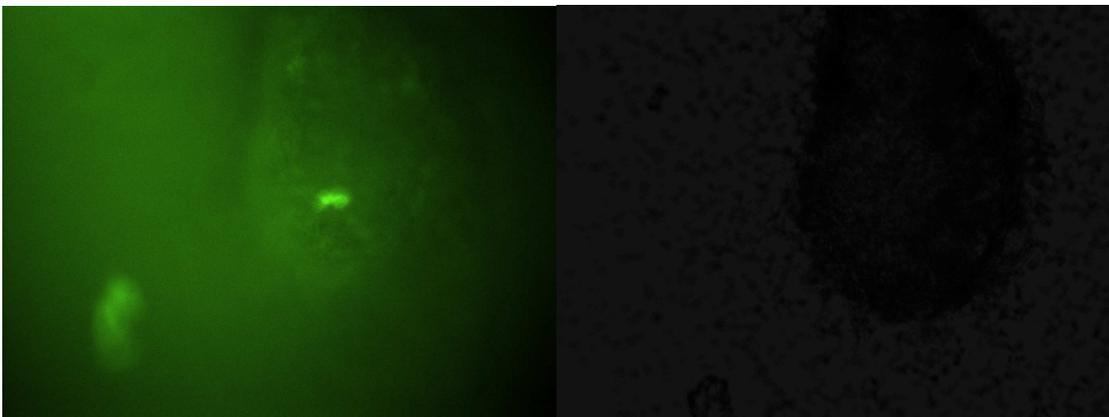


Abb. 14: Fluoreszenzmikroskopieaufnahme (links) und Durchlichtmikroskopieaufnahme (rechts) von TetOff293/TRE2[hygro]/EGFP-DRA, 24 Stunden nach Transfektion, Vergrößerung 20fach, Belichtungszeit 1000ms in Fluoreszenztechnik und 75ms in Durchlichttechnik

Alle TetOff293-Zellen, auch die lediglich regulär kultivierten, nicht transfizierten Zellpopulationen hafteten kaum bis gar nicht auf den verwendeten Zellkulturflaschen. Dieser Umstand erklärt die schlechte Bildqualität in den oben gezeigten Durchlichtmikroskopieaufnahmen. Auch eine Schonung der Zellen nach der Passage im Sinne der Versorgung mit antibiotikafreiem Nährmedium brachte keine Verbesserung. Eine Option zur Lösung dieses Problems wäre die Kultivierung der TetOff293-Zellen in Kollagen-beschichteten Zellkultur-Flaschen gewesen. Es wäre zu erwarten, dass die Zellen auf dem beschichteten Untergrund eine bessere Adhärenz gezeigt hätten. Entsprechendes Zellkulturgut stand jedoch aus Kostengründen nicht zur Verfügung. Somit wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

## **3.6 Transfektion von DRA in EcR293-Zellen**

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, in einer Zelllinie, die stabil DRA exprimiert und zusätzlich über ein induzierbares Expressionssystem verfügt, DRA-Adapterproteine wie beispielsweise NHERF oder PDZK1 induzierbar zu exprimieren, um anhand dessen deren Einfluß auf die DRA-Funktion zu untersuchen.

Im Folgenden wird, der ursprünglichen Klonierung von Reczek und Bretscher folgend, die Bezeichnung EBP50 für die humane NHERF cDNA verwendet.

Hierzu wurden EcR293-Zellen gewählt, die einen HEK293-Zellklon darstellen, der das Ecdyson-induzierbare Expressionssystem beinhaltet. Bedingt durch das Ecdyson-System sind diese Zellen resistent gegen das Antibiotikum Zeocin. HEK293-Zellen sind relativ einfach in der Handhabung, und waren bereits erfolgreich in der Arbeitsgruppe stabil mit DRA transfiziert worden. Sie sind dementsprechend in der Lage, konstitutiv DRA zu exprimieren.

### **3.6.1 Stabile Transfektion von DRA in EcR293-Zellen**

In dem für die stabile Transfektion der EcR293-Zellen verwendeten Vektor pEGFP-f.I.DRA- 5'Kozak war das DRA wie bei den Caco-2-Zellen gekoppelt an das Fluoreszenzprotein EGFP. Auch hier erfolgte die Kontrolle der Transfektionseffizienz mit pEGFP. Die Selektion erfolgte über die im Vektor enthaltenen Resistenzen mittels Zeocin und G418. In der Fluoreszenzmikroskopie ließ sich jeweils eine eindeutige EGFP-Autofluoreszenz nachweisen, und zwar - ähnlich wie bei den Caco-2-Zellen - mit einer Betonung der Zellperipherie bei den EGFP-DRA exprimierenden Zellen und diffus zytoplasmatisch bei den lediglich EGFP exprimierenden Zellen. Es wurden jeweils Klone gezogen. Die folgenden Abbildungen zeigen zwei der mit pEGFP-f.I.DRA- 5'Kozak transfizierten Klone, sowie einen mit pEGFP transfizierten Klon.

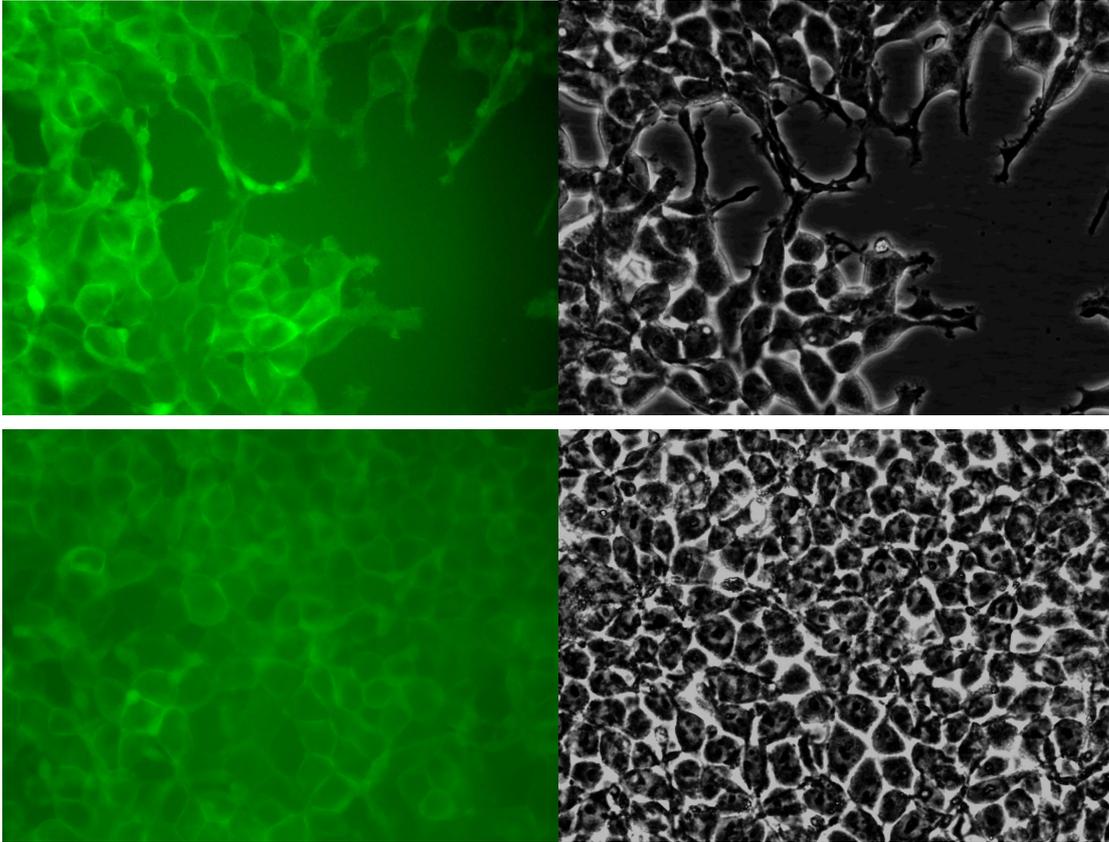
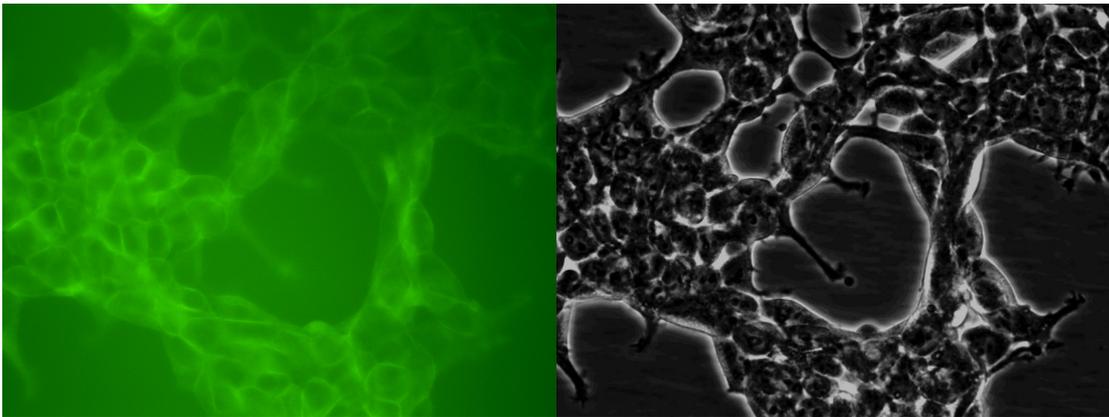


Abb. 15: Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen (jeweils links) und Durchlichtmikroskopieaufnahmen (jeweils rechts) von EcR293/pEGFPfIDRA/clone12, klonal aus Passage 3; obere Zeile: 88 Tage nach Transfektion, untere Zeile: 128 Tage nach Transfektion, Vergrößerung 40fach, Belichtungszeit 2500ms



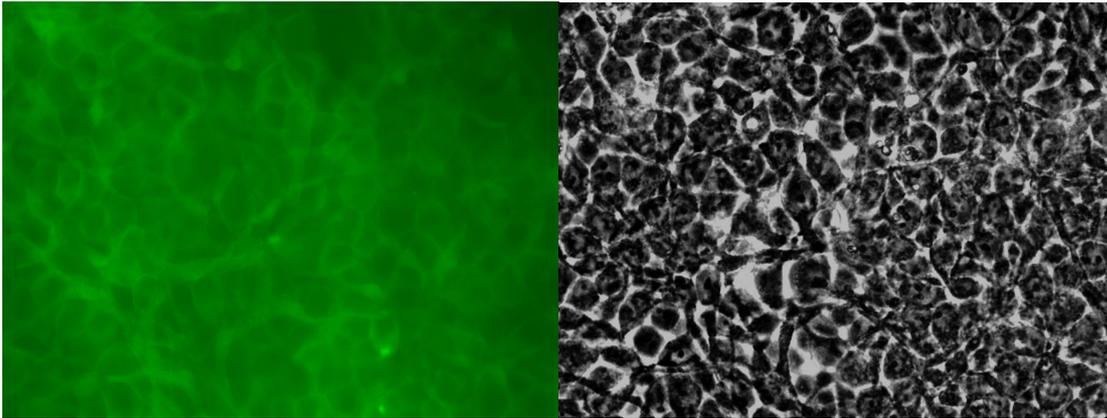


Abb. 16: Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen (jeweils links) und Durchlichtmikroskopieaufnahmen (jeweils rechts) von EcR293/pEGFPfIDRA/clone13, klonal aus Passage 3; obere Zeile: 88 Tage nach Transfektion, untere Zeile: 128 Tage nach Transfektion, Vergrößerung 40fach, Belichtungszeit 2500ms

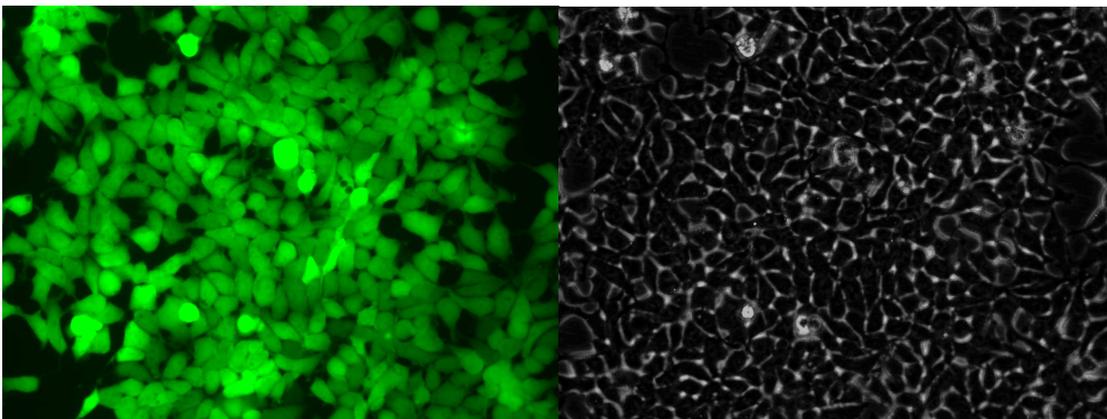


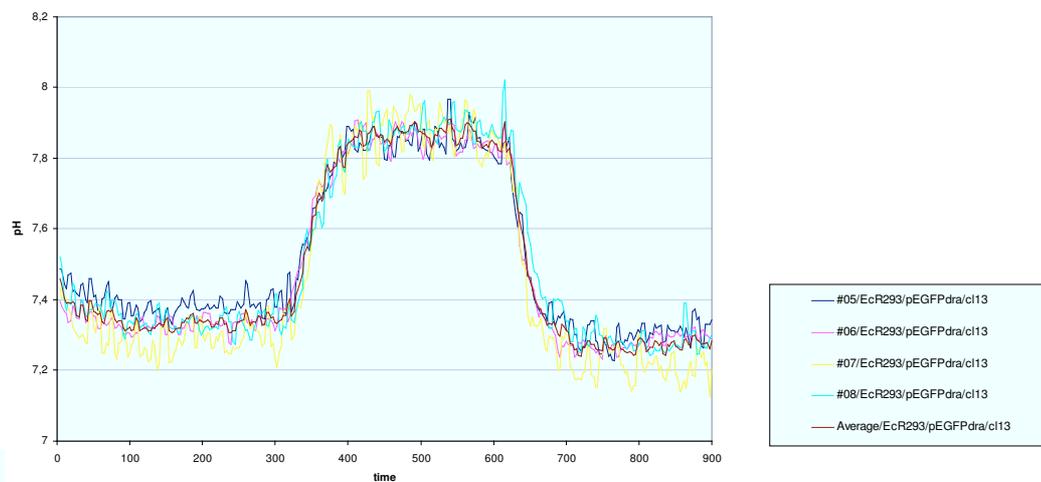
Abb. 17: Fluoreszenzmikroskopieaufnahme (links) und Durchlichtmikroskopieaufnahme (rechts) von EcR293/pEGFP/clone2, klonal aus Passage 3; 61 Tage nach Transfektion, Vergrößerung 40fach, Belichtungszeit 500ms

### 3.6.2 Messung der DRA-Aktivität

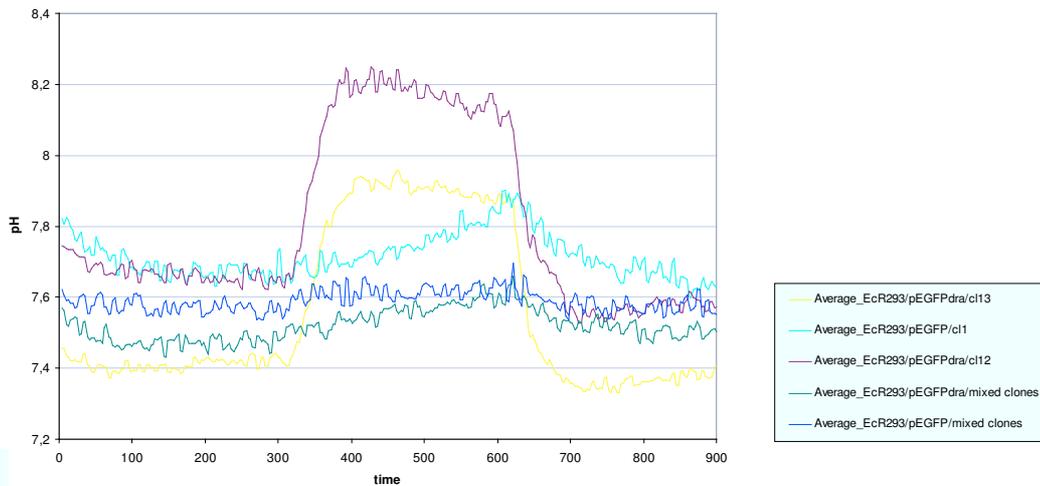
Um die funktionelle Aktivität des DRAs in den transfizierten Zellen zu klären, wurden Mikrofluorometrie-Messungen zur Erfassung des intrazellulären pHs durchgeführt. Sie beruhen prinzipiell darauf, dass nach Entfernen von extrazellulärem Chlorid, Chlorid aus der Zelle herausdiffundiert, im Gegenzug Bikarbonat in die Zelle aufgenommen wird, und der intrazelluläre pH infolgedessen steigt. Nach Wiedergabe von Chlorid kehrt sich dieser Prozess um und der intrazelluläre pH fällt wieder.

Die unter 3.6.1 beschriebenen, stabil mit DRA transfizierten EcR293-Zellen wurden auf Glasplättchen (Thomas Scientific, USA) kultiviert, und bei Erreichen einer etwa 50%igen Konfluenz der Zellen Mikrofluorometrie-Messungen wie unter 2.4 beschrieben damit durchgeführt.

Die folgenden Abbildungen zeigen beispielhaft einmal die Ergebnisse der Messungen eines Klons von mit pEGFP-DRA transfizierten EcR293-Zellen (Abb. 18 a)), sowie zum Anderen die Durchschnittsergebnisse gemischter Populationen und einzelner Klone von mit pEGFP-DRA transfizierten Zellen und der lediglich mit pEGFP transfizierten Kontrollen (Abb.18 b)). Auf der y-Achse ist der  $\text{pH}_i$ -Wert aufgetragen, auf der x-Achse die Messzeit in Sekunden. Abgebildet sind nur die Zeiten, in denen mit den Puffern 2 und 3 gespült wurde. Die Vorspülung mit Puffer 1 und die Kalibration sind der Übersichtlichkeit wegen nicht dargestellt.



a)



b)

Abb. 18: Kurvenverläufe des intrazellulären pH-Wertes ( $pH_i$ ) der Mikrofluorometriemessungen von:

- a) EcR293/pEGFP-DRA/cl13 Einzelerperimente und Durchschnitt,
- b) EcR293/pEGFP-DRA/cl13 Durchschnitt, EcR293/pEGFP-DRA/mixed clones, EcR293/pEGFP/cl1, EcR293/pEGFP/mixed clones

Man erkennt sowohl bei den Kurven der Einzelerperimente als auch bei den Durchschnittskurven deutlich den sprungartigen Anstieg des intrazellulären pH-Wertes ( $pH_i$ ) bei den beiden mit pEGFP-DRA transfizierten Klonen (cl13 und cl12, der gelben und violetten Kurve entsprechend) um etwa 0,5 Einheiten während des Spülens mit Puffer 3. Während dieser Zeit war aufgrund der Pufferzusammensetzung von Puffer 3 der extrazelluläre Chloridgehalt verringert, was durch Austausch von intrazellulärem Chlorid gegen extrazelluläres Bicarbonat (getrieben durch den nach extrazellulär gerichteten Chlorid-Gradienten) zu einer raschen und deutlichen intrazellulären Alkalisierung führte. Nach Zufügen von Chlorid extrazellulär durch erneutes Spülen mit Puffer 2 fiel der  $pH_i$ -Wert wieder auf die Ausgangswerte ab entsprechend einer Wiederansäuerung. Dies ist bei den gemischten Klonen und den mit pEGFP transfizierten Klonen nicht in demselben Ausmaß zu beobachten.

Alle stabil mit DRA transfizierten EcR293-Zellen werden im Folgenden als EcR293/EGFP-DRA-Zellen aufgeführt, es wird der Übersichtlichkeit wegen in

der Bezeichnung nicht zwischen gemischter Population und einzelnen Klonen unterschieden.

### 3.6.3 Induzierbare Transfektion von DRA in EcR293-Zellen

Als Nächstes wurde DRA induzierbar in EcR293-Zellen transfiziert, um Erfahrungen mit der Induktion mittels PonasteroneA zu sammeln.

EcR293-Zellen wurden mit pIND/EGFP-f.l.DRA-5'Kozak und zur Kontrolle der Transfektionseffizienz mit pIND/EGFP induzierbar transfiziert. Selektioniert wurde mit Zeocin und G418. Nach ca. zweieinhalb Wochen war jeweils eine stabile Zellpopulation entstanden, die mit 5µM PonasteroneA induziert werden konnte. Zusätzlich wurden Klone gezogen, welche dann ebenfalls mit 5µM PonasteroneA induziert wurden. Sowohl für die gemischten Klone als auch für die separat kultivierten Klone konnte durch RNA-Nachweis DRA nachgewiesen werden. In der Fluoreszenz-Mikroskopie stellte sich ca. eine Woche nach Induktion eine deutliche EGFP-Autofluoreszenz der mit pIND/EGFP-f.l.DRA-5'Kozak transfizierten Zellen wie auch der mit pIND/EGFP transfizierten Zellen dar. Diese somit nachweislich erfolgreich induzierbar mit DRA transfizierten Zellen wurden anschließend auf Glasplättchen kultiviert. Jeweils zwei Tage nach Induktion mit 5µM PonasteroneA wurden dann Fluoreszenzmessungen damit durchgeführt.

In Abbildung 19 sind die Änderungen des errechneten intrazellulären pH beispielhaft für einen der Klone dargestellt, jeweils zwei Kurven mit PonasteroneA induzierter Zellen und zwei Kurven nicht induzierter Zellen.

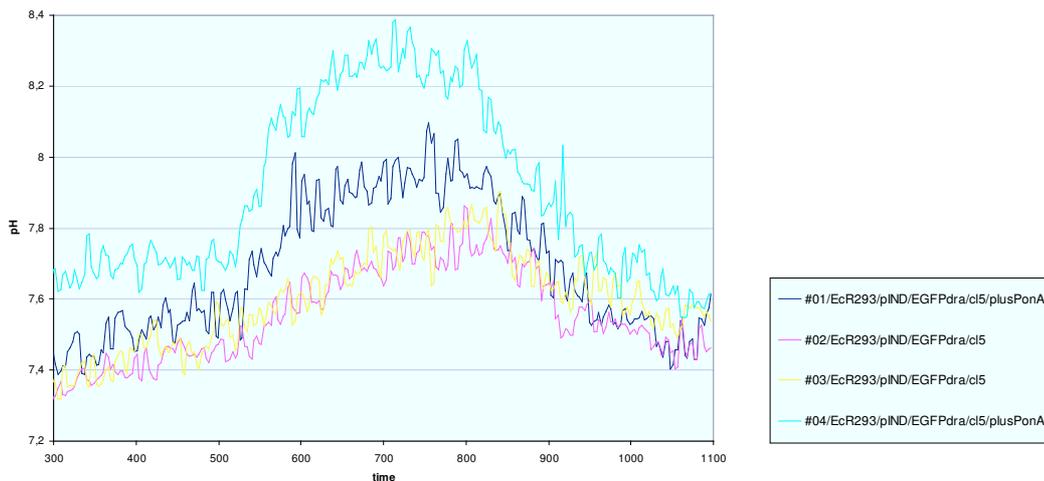


Abb. 19: Kurvenverläufe des intrazellulären pH-Wertes ( $pH_i$ ) der Mikrofluorometriemessungen von EcR293/pIND/EGFP-DRA/cI5: jeweils zwei Messungen mit durch PonasteroneA induzierten Zellen (türkisfarbene und dunkelblaue Kurve) und zwei Messungen mit nicht induzierten Zellen (rosafarbene und gelbe Kurve)

Man erkennt bei den induzierten Zellen, welche das DRA exprimieren, ähnlich wie bei den stabil DRA exprimierenden Klonen (siehe oben unter 3.3.1) den Anstieg des intrazellulären pH-Werts während der Phase des Experiments, in der die Zellen mit Puffer 3 gespült werden, d.h. der extrazelluläre  $Cl^-$ -Gehalt verringert ist. Diese Alkalisierung findet langsamer statt als bei den zuvor untersuchten stabil und konstitutiv DRA exprimierenden Zellen.

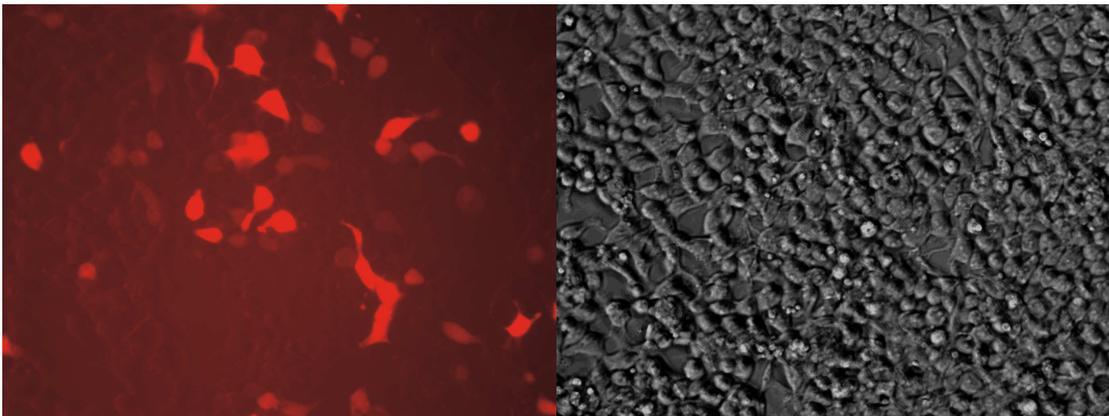
### **3.7 Induzierbare Transfektion von DRA-Adapterproteinen in stabil und konstitutiv DRA exprimierenden EcR293-Zellen**

Wie oben erläutert, besteht die Möglichkeit, Zellen, welche stabil DRA exprimieren und zusätzlich über die zellulären Komponenten eines Induktionssystems verfügen, in diesem Fall die unter 3.5.1 beschriebenen EcR293/EGFP-DRA-Zellen, induzierbar mit PDZ-Adapterproteinen von DRA zu transfizieren.

### 3.7.1 Transfektion von EcR293-Zellen mit DRA-Adapterproteinen

Hierzu wurden im ersten Schritt EcR293-Zellen induzierbar mit den DRA-Adapterproteinen EBP50 (Vektor pIND/DsRed[hygro]/EBP50) und PDZK1 (Vektor pIND/DsRed[hygro]/PDZK1) transfiziert. Die Adapterproteine waren analog zum grün fluoreszierenden EGFP bei DRA als Fusionsproteine mit rot fluoreszierendem DsRed kloniert. Der Transfektionserfolg wurde mit pIND/DsRed (Vektor pIND/DsRed[hygro]) und pDsRed (pDsRed[hygro]) kontrolliert. Die Vektoren enthielten zusätzlich eine Resistenz gegen das Antibiotikum Hygromycin B zu Selektionszwecken.

Die mit pDsRed[hygro] transfizierten Zellen wurden in der üblichen Weise kultiviert, da dieser Vektor einen konstitutiven Promotor besitzt. Jeweils ein Teil der mit pIND/DsRed[hygro], pIND/DsRed[hygro]/EBP50 bzw. pIND/DsRed[hygro]/PDZK1 transfizierten Zellen wurde drei Tage nach der Transfektion mit 5µM PonasteroneA induziert. Die induzierten Zellen und die mit pDsRed[hygro] transfizierten Zellen zeigten an Tag fünf und sechs, bzw. zwei und drei Tage nach Induktion, eine rote Eigenfluoreszenz. Diese war am ausgeprägtesten bei den mit pIND/DsRed[hygro] und pDsRed[hygro] transfizierten Kontrollzellen. Etwas geringer, aber noch deutlich gefärbt waren die mit pIND/DsRed[hygro]/EBP50 transfizierten Zellen. Die mit pIND/DsRed[hygro]/PDZK1 transfizierten Zellen schließlich zeigten die schwächste Rotfärbung.



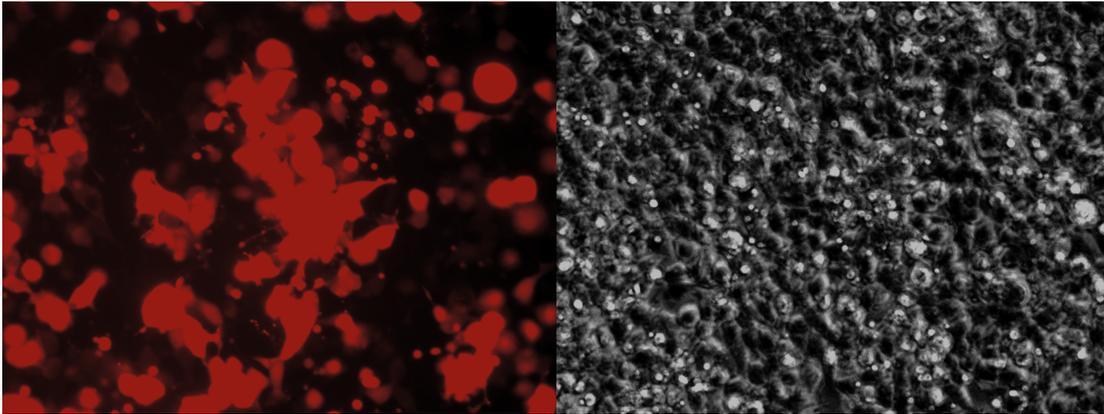


Abb. 20: Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen (jeweils links) und Durchlichtmikroskopieaufnahmen (jeweils rechts) von EcR293/pDsRed 1 Tag (obere Zeile) / 2 Tage (untere Zeile) nach Transfektion; Vergrößerung 40fach, Belichtungszeit 1800/1000ms in Fluoreszenztechnik und 20/50 ms in Durchlichttechnik

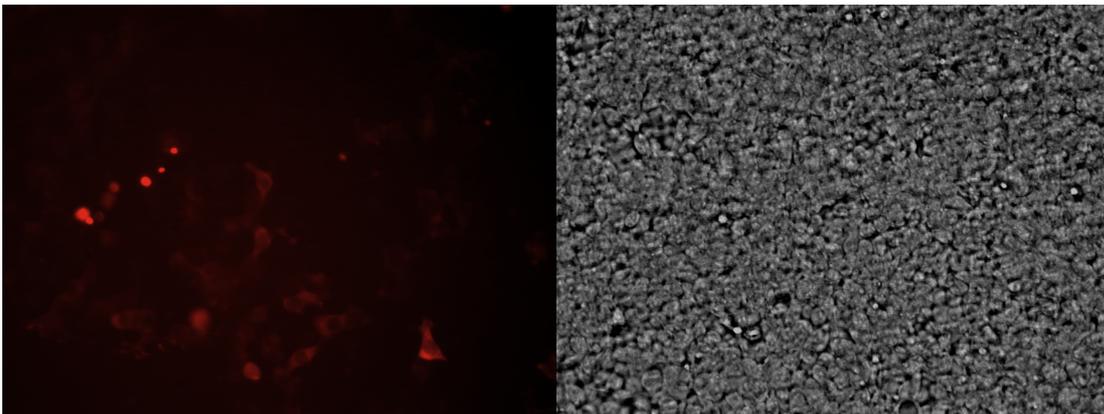


Abb. 21: Fluoreszenzmikroskopieaufnahme (links) und Durchlichtmikroskopieaufnahme (rechts) von EcR293/pIND/DsRed/EBP50 2 Tage nach Transfektion, 1 Tag nach Induktion mit PonasteroneA; Vergrößerung 20fach, Belichtungszeit 1000ms in Fluoreszenztechnik und 20 ms in Durchlichttechnik

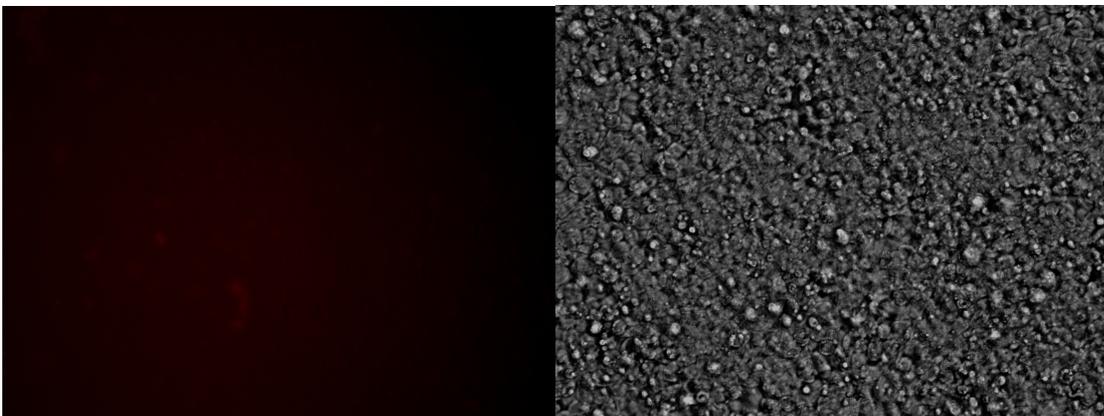


Abb. 22: Fluoreszenzmikroskopieaufnahme (links) und Durchlichtmikroskopieaufnahme (rechts) von EcR293/pIND/DsRed/PDZK1 2 Tage nach Transfektion, 1 Tag nach Induktion mit PonasteroneA; Vergrößerung 20fach, Belichtungszeit 1000ms in Fluoreszenztechnik und 20 ms in Durchlichttechnik

### 3.7.2 Transfektion von DRA-Adapterproteinen in EcR293/pEGFP-DRA-Zellen

Als Nächstes wurden nun Klone der EcR293/EGFP-DRA-Zellen (siehe 3.5.1) jeweils mit pIND/DsRed[hygro]/EBP50, pIND/DsRed[hygro]/PDZK1 und pIND/Dsred[hygro] bzw. pDsRed transfiziert. Sie wurden am dritten Tag nach der Transfektion induziert. Sie zeigten am fünften und sechsten Tag, also wieder am zweiten und dritten Tag nach Induktion, eine ähnliche rote Autofluoreszenz wie die transfizierten EcR293-Zellen (siehe 3.6.1). Die Färbung war auch hier am stärksten bei den Kontrollzellen mit pIND/DsRed[hygro], und bei den mit pIND/DsRed[hygro]/EBP50 transfizierten Zellen deutlicher ausgeprägt als bei den mit pIND/DsRed[hygro]/PDZK1 transfizierten Zellen.

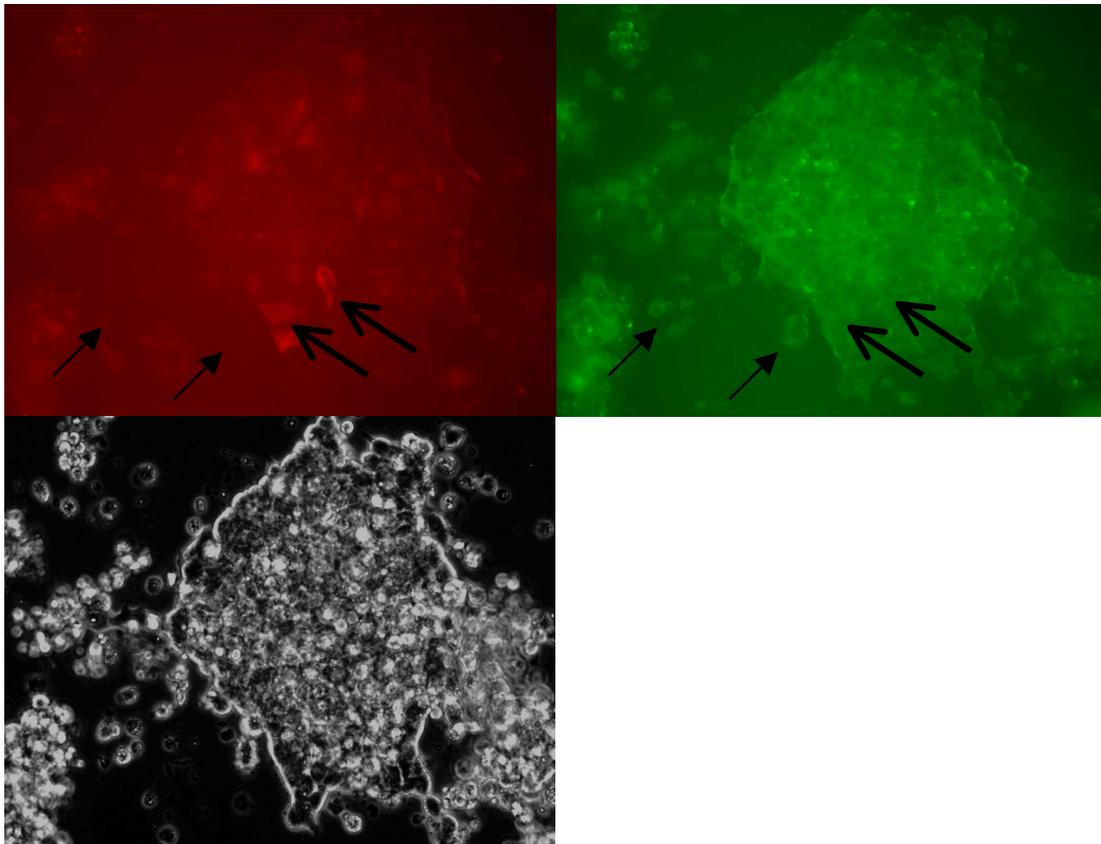


Abb. 23: Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen und Durchlichtmikroskopieaufnahme von EcR293/pEGFP-DRA/clone13/pIND/DsRed/EBP50 2 Tage nach Transfektion, 1 Tag nach Induktion mit PonasteroneA; Vergrößerung 20fach, Belichtungszeit 1500ms in Fluoreszenztechnik und 25 ms in Durchlichttechnik

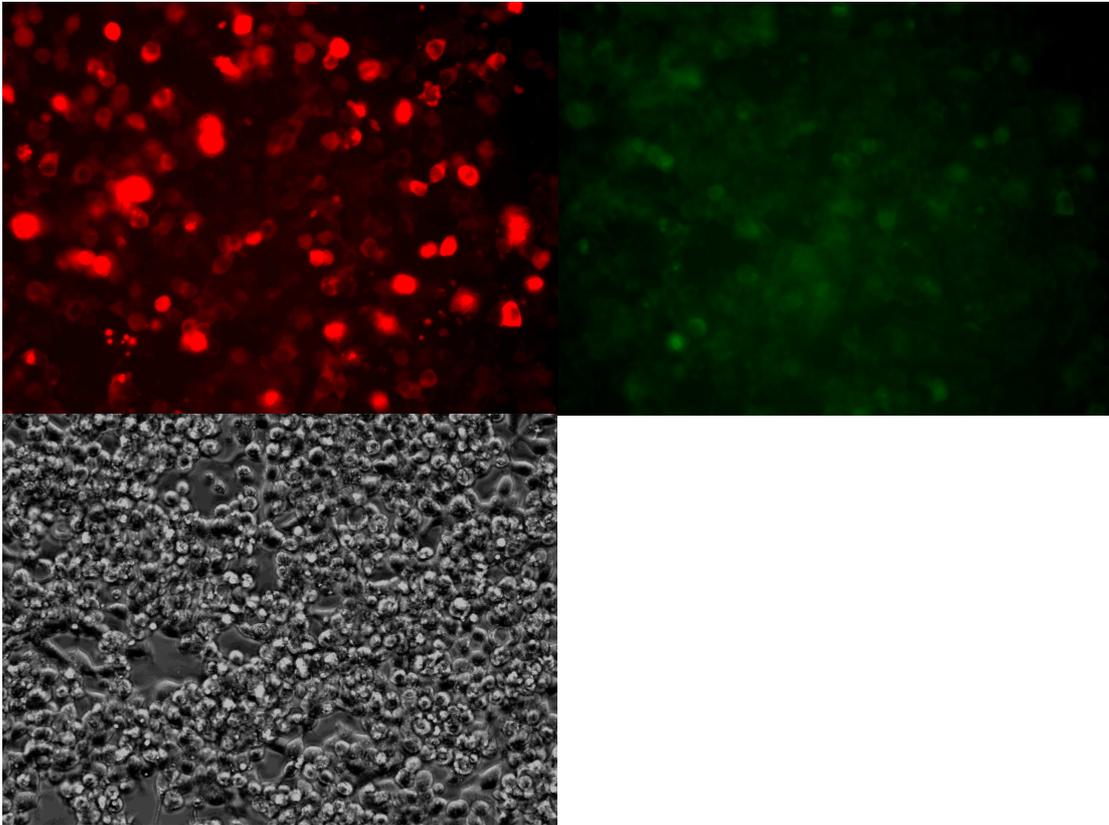
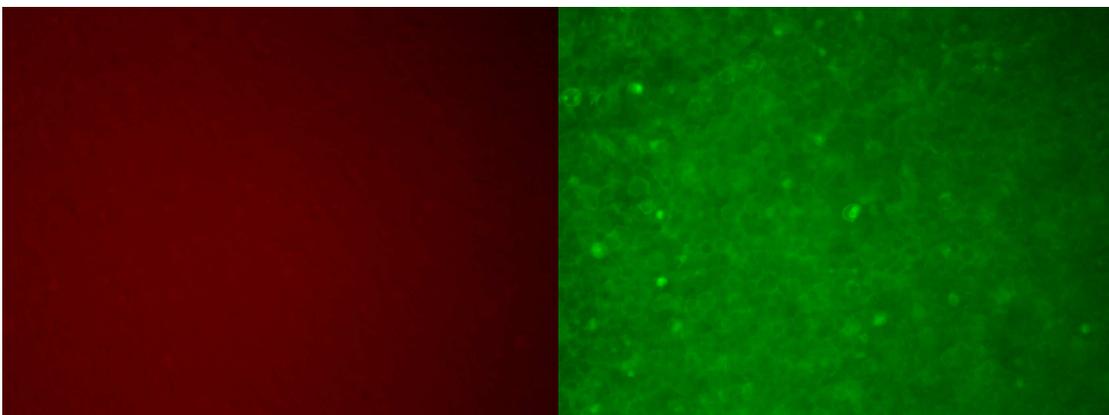


Abb. 24: Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen und Durchlichtmikroskopieaufnahme von EcR293/EGFP-DRA/clone12/pIND/DsRed/EBP50 2 Tage nach Transfektion, 1 Tag nach Induktion mit PonasteroneA; Vergrößerung 20fach, Belichtungszeit 1000ms in Fluoreszenztechnik und 20 ms in Durchlichttechnik



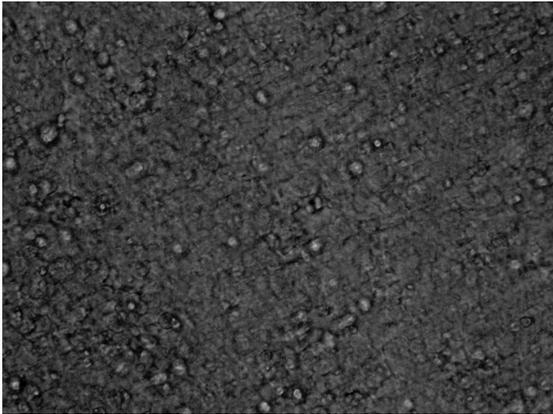


Abb. 25: Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen und Durchlichtmikroskopieaufnahme von EcR293/pEGFP-DRA/clone13/pIND/DsRed/PDZK1 2 Tage nach Transfektion, 1 Tag nach Induktion mit PonasteroneA; Vergrößerung 20fach, Belichtungszeit 1500ms in Fluoreszenztechnik und 20 ms in Durchlichttechnik

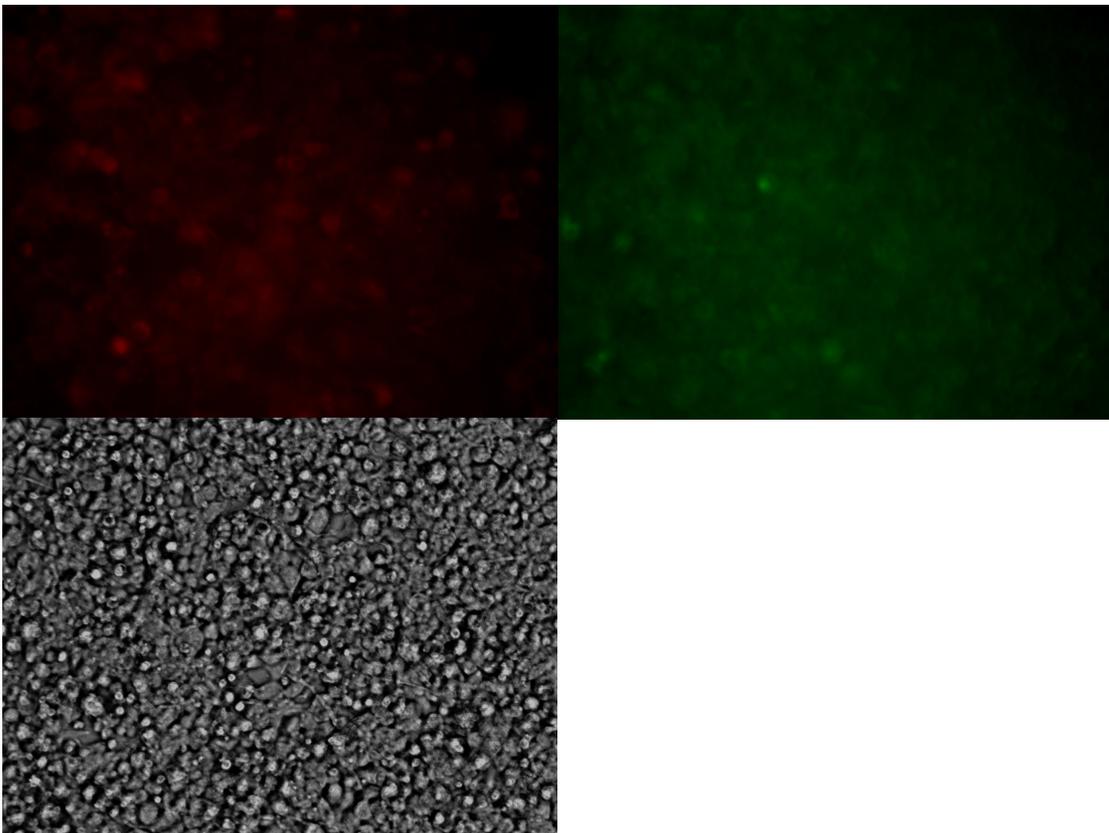


Abb. 26: Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen und Durchlichtmikroskopieaufnahme von EcR293/EGFP-DRA/clone12/pIND/DsRed/PDZK1 2 Tage nach Transfektion, 1 Tag nach Induktion mit PonasteroneA; Vergrößerung 20fach, Belichtungszeit 1500ms in Fluoreszenztechnik und 20 ms in Durchlichttechnik

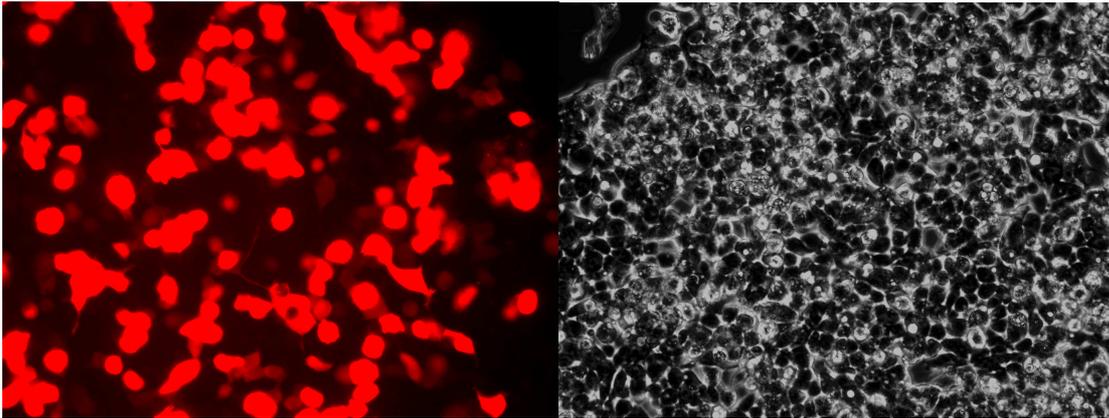


Abb. 27: Fluoreszenzmikroskopieaufnahme und Durchlichtmikroskopieaufnahme von EcR293/EGFP-DRA/clone12/pIND/DsRed 2 Tage nach Transfektion, 1 Tag nach Induktion mit PonasteroneA; Vergrößerung 20fach, Belichtungszeit 1000ms in Fluoreszenztechnik und 20 ms in Durchlichttechnik

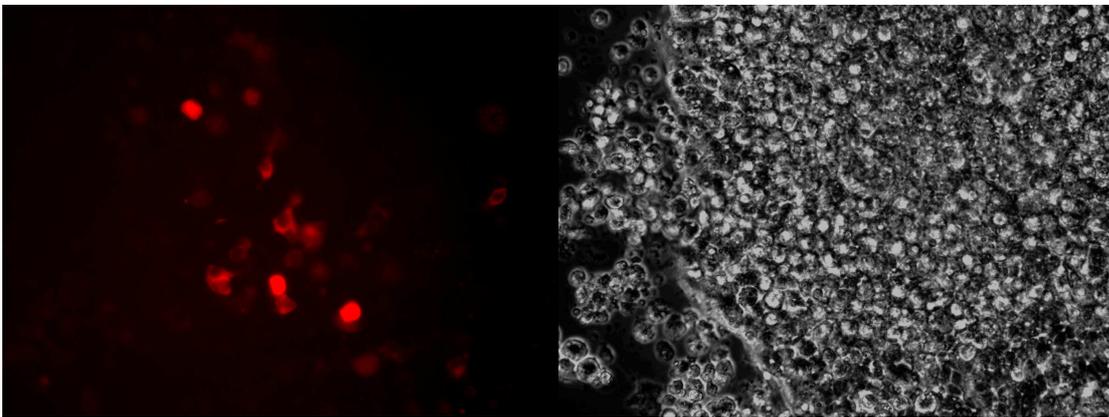


Abb. 28: Fluoreszenzmikroskopieaufnahme und Durchlichtmikroskopieaufnahme von EcR293/EGFP-DRA/clone13/pIND/DsRed/EBP50 3 Tage nach Transfektion, 36 Stunden nach Induktion mit PonasteroneA; Vergrößerung 20fach, Belichtungszeit 1000ms in Fluoreszenztechnik und 50 ms in Durchlichttechnik

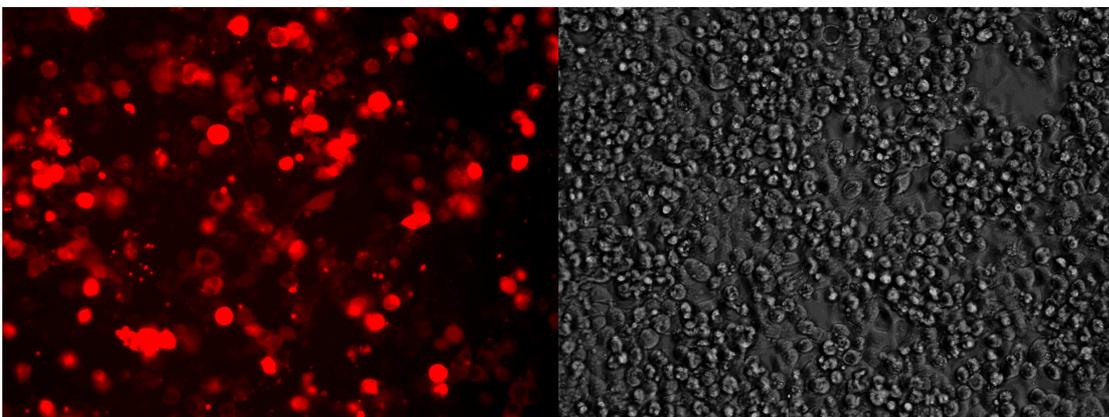


Abb. 29: Fluoreszenzmikroskopieaufnahme und Durchlichtmikroskopieaufnahme von EcR293/EGFP-DRA/clone12/pIND/DsRed/EBP50 3 Tage nach Transfektion, 36 Stunden nach

Induktion mit PonasteroneA; Vergrößerung 20fach, Belichtungszeit 1000ms in Fluoreszenztechnik und 50 ms in Durchlichttechnik

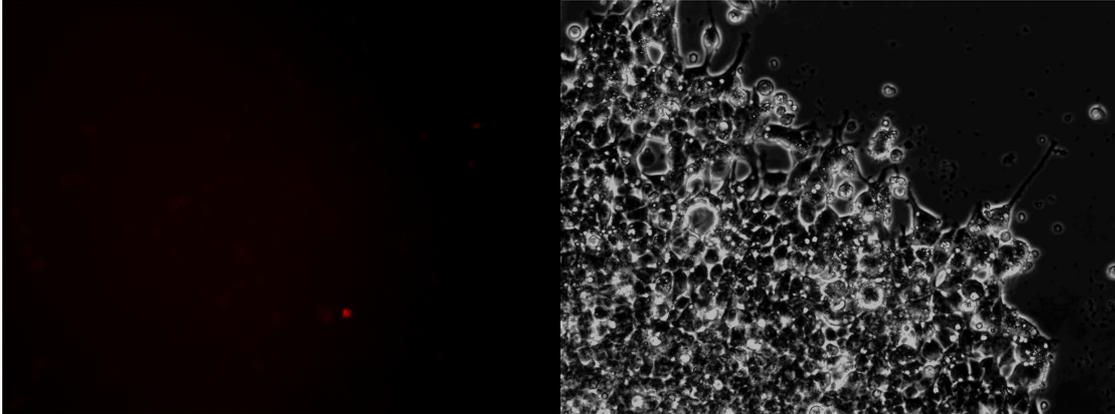


Abb. 30: Fluoreszenzmikroskopieaufnahme und Durchlichtmikroskopieaufnahme von EcR293/EGFP-DRA/clone13/pIND/DsRed/PDZK1 3 Tage nach Transfektion, 36 Stunden nach Induktion mit PonasteroneA; Vergrößerung 20fach, Belichtungszeit 1000ms in Fluoreszenztechnik und 60 ms in Durchlichttechnik

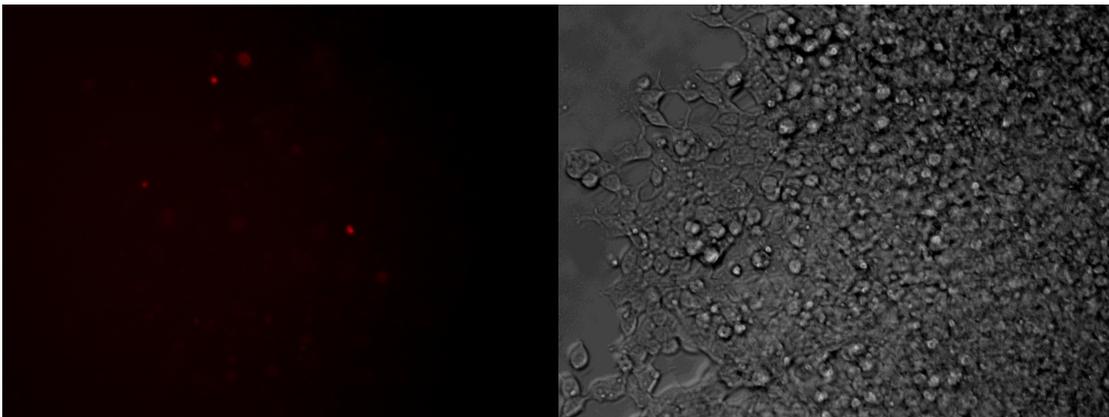


Abb. 31: Fluoreszenzmikroskopieaufnahme und Durchlichtmikroskopieaufnahme von EcR293/EGFP-DRA/clone12/pIND/DsRed/PDZK1 3 Tage nach Transfektion, 36 Stunden nach Induktion mit PonasteroneA; Vergrößerung 20fach, Belichtungszeit 1000ms in Fluoreszenztechnik und 50 ms in Durchlichttechnik

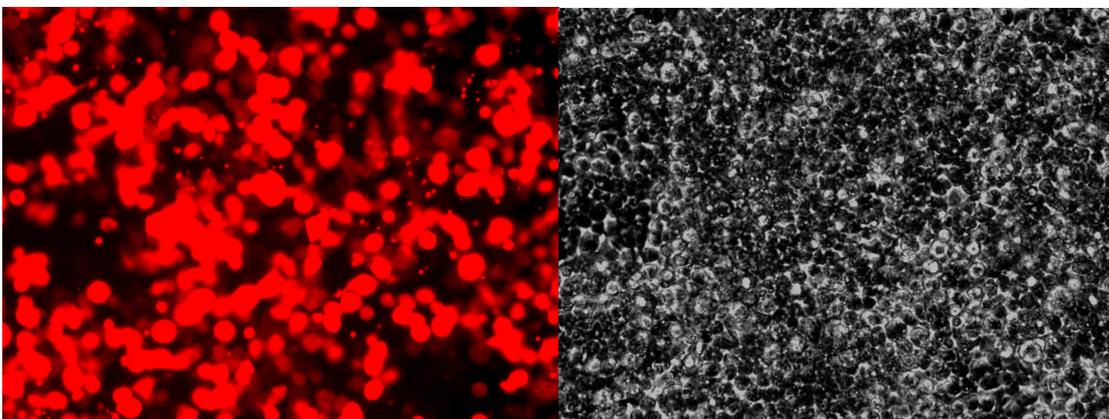


Abb. 32: Fluoreszenzmikroskopieaufnahme und Durchlichtmikroskopieaufnahme von EcR293/EGFP-DRA/clone12/pIND/DsRed 3 Tage nach Transfektion, 36 Stunden nach Induktion mit PonasteroneA; Vergrößerung 20fach, Belichtungszeit 1000ms in Fluoreszenztechnik und 20 ms in Durchlichttechnik

## **4 Diskussion**

Die vorliegende Arbeit verfolgte zwei primäre Ziele: zum Einen die Entwicklung einer Zelllinie, in welcher DRA induzierbar heterolog überexprimiert werden kann; und zum Anderen die induzierbare heterologe Expression von DRA-Adapterproteinen in einer Zelllinie, welche stabil DRA exprimiert.

### **4.1 Regulation von DRA**

Transepithelialer Transport und Barrierefunktionen hängen allgemein eng zusammen, da gerichteter Transport von einander getrennte Kompartimente voraussetzt (24). Transzelluläre und parazelluläre Transportprozesse bestimmen daher großteils den Aufbau luminaler und serosa-seitiger Kompartimente. Im menschlichen Gastrointestinaltrakt treten Störungen des transepithelialen Transports häufig parallel zu Störungen der Barrierefunktion auf.

DRA ist ein intestinaler Anionenaustauscher der SLC26A-Familie, der sowohl Anionensekretion als auch NaCl-Absorption vermittelt. DRA ist im oberen Gastrointestinaltrakt (in Duodenum und Pankreas) für die Chlorid- und Bikarbonatsekretion funktionell an CFTR gekoppelt (28;42). Diese Verbindung erfolgt über die Interaktion der R- und der STAS-Domäne von CFTR und DRA (20;21) sowie über die Bindung beider Transportproteine an PDZ-Adapterproteine (NHERF und PDZK1) (8).

Stimuliert wird der Komplex cAMP-abhängig über die Phosphorylierung der R-Domäne von CFTR durch PKA. Im unteren Gastrointestinaltrakt (in Ileum und proximalem Kolon) sorgt DRA zusammen mit NHE3 für die elektroneutrale NaCl-Absorption (28;32). Hier sind die Mechanismen von Komplexbildung und Regulation noch nicht im Detail geklärt. DRA verfügt jedoch über ein PDZ-Interaktionsmotif, mit dem es an E3KARP, PDZK1, IKEPP und NHERF binden kann (24;26).

Somit scheint die Regulation von DRA abhängig zu sein von der Anwesenheit anderer Transportproteine wie CFTR und NHE3, sowie von der Ausbildung von

Komplexen zwischen Transportproteinen, Adapterproteinen und Signalmolekülen. Desweiteren wird die DRA-Aktivität beeinflusst durch den intrazellulären pH, ebenso wie durch intra- und extrazellulären Ionengehalt (27). cAMP hat auf die Funktion von DRA und CFTR und auf die intestinale Anionensekretion stimulierenden Einfluss (38;42), auf die Funktion von NHE3 und auf die intestinale NaCl-Absorption jedoch hemmenden Einfluss (28). Erste Daten neuerer Experimente in der Arbeitsgruppe geben jedoch auch Hinweise darauf, dass DRA außerdem abhängig von der intrazellulären Calciumkonzentration auch einer individuellen Regulation unabhängig von CFTR und NHE3 unterliegt (24).

## **4.2 Entwicklung einer Zelllinie, in welcher DRA induzierbar heterolog überexprimiert werden kann**

Eine induzierbare Expression, im Gegensatz zu einer konstitutiven Expression erschien notwendig, da DRA wachstumshemmende Eigenschaften hat, die die konstitutive Expression in den meisten Zelllinien, außer HEK293-Zellen, unmöglich machen (4). Allerdings stellen HEK293-Zellen ein vergleichsweise einfaches, nicht polarisiertes, nicht aus dem Gastrointestinaltrakt stammendes Modell dar, welches insofern nur bedingt geeignet erscheint, um spezifische Fragen der Regulation von DRA im Darm zu untersuchen. Caco-2-Zellen sind das klassische Modell für resorbierende Zellen aus dem Kolon und sind daher das angestrebte Zellkulturmodell für die Untersuchung der Regulation von DRA, zumal sie geringe Mengen DRA exprimieren, was darauf schließen lässt, dass sie prinzipiell in der Lage sind, auch heterolog (durch Transfektion) zugefügtes DRA zu exprimieren und möglicherweise auch zu regulieren. Der Aspekt der induzierbaren Expression war also ein methodischer Ansatz, um die Schwierigkeit der Wachstumshemmung durch DRA und die daraus

resultierenden Probleme einer Überexpression von DRA in Caco-2-Zellen zu umgehen.

Ein induzierbares Expressionssystem ist viel komplexer und erreicht meistens auch eine geringere Überexpression als ein konstitutives Expressionssystem. Es wurde daher zunächst noch einmal die Unmöglichkeit der konstitutiven Expression von DRA als Ausdruck der Notwendigkeit der induzierbaren Überexpression von DRA nachgewiesen, indem versucht wurde, Caco-2-Zellen stabil mit DRA zu transfizieren. DRA wurde als EGFP-markiertes Fusionsprotein eingesetzt, um den Transfektionserfolg mittels Fluoreszenzmikroskopie beurteilen zu können. Nach primär offensichtlich erfolgreicher Transfektion verloren die Zellen nach mehrmaligem Passagieren jedoch die Grünfärbung in der Fluoreszenzmikroskopie, sodass davon ausgegangen werden musste, dass die Caco-2-Zellen lediglich transient transfiziert waren und das EGFP-markierte DRA nicht dauerhaft exprimierten. Diese Interpretation bestätigte sich auch in der PCR, die nach mehreren Passagen kein DRA-Signal mehr zeigte.

Caco-2-Zellen wachsen regulär polarisiert, d.h. sie bilden ein apikales und ein basolaterales Kompartiment aus. Die Funktion von DRA als apikalen Anionenaustauscher miteinbeziehend, bestand die Annahme, dass die Caco-2-Zellen eventuell das transfizierte DRA nicht stabil exprimierten, weil sie hierfür aufgrund des Wachstums in Zellkulturflaschen mit lediglich über den Zellen stehendem Nährmedium keine oder zumindest keine ausreichende Polarisierung ausbilden würden. Daher wurden die Zellen ergänzend auf kollagen-beschichteten Membranen kultiviert, sodass sie von beiden Seiten mit Nährmedium umgeben waren und eine Polarisierung in apikal und basolateral möglich wäre. Allerdings hafteten die Zellen auf den Filtern nach der Passage sehr viel später und schlechter als am Boden der ansonsten verwendeten Kunststoffflaschen. Auch unter diesen Bedingungen ließ sich keine konstitutive stabile Expression von DRA erreichen.

Somit war dargelegt, dass die Überexpression von DRA in Caco-2-Zellen nur in einem induzierbaren System Aussicht auf Erfolg hatte.

Um DRA induzierbar transfizieren und exprimieren zu können, mussten im nächsten Schritt die Caco-2-Zellen zuerst mit einem Induktionssystem transfiziert werden. Hier wurde zunächst das Ecdysone-induzierbare System gewählt, da hiermit bereits erste Erfahrungen in der Arbeitsgruppe vorlagen, die allerdings an EcR293-Zellen, einem HEK293-Zellklon, gewonnen worden waren. Caco-2-Zellen wurden mit dem Vektor pVgRxR, welcher die zellulären Komponenten des Ecdysone-Systems enthält, transfiziert. Eine ausreichende Transfektionseffizienz der Caco-2-Zellen, die als schwierig zu transfizieren gelten, konnte mittels deutlicher EGFP-Autofluoreszenz der parallel mit pEGFP transfizierten Kontrollzellen in der Fluoreszenzmikroskopie bestätigt werden.

Die so gewonnenen gemischten Caco-2/pVgRxR-Zellen wurden dann induzierbar mit DRA in Form des Vektors pIND/EGFP-F.L.DRA5'Kozak transfiziert. Nach Selektion der erfolgreich transfizierten Zellen wurde die Transkription und Expression von DRA durch Zufügen von PonasteroneA zum Nährmedium induziert. Hier ließ sich ebenso wie bei den mit pEGFP transfizierten Kontrollzellen in der Fluoreszenzmikroskopie eine Autofluoreszenz nachweisen. Die Caco-2/pVgRxR/pIND/EGFP-F.L.DRA5'Kozak-Zellen zeigten jedoch bereits nach den ersten Passagen keine grüne Fluoreszenz mehr. Eine Ursache dafür könnte gewesen sein, dass die Zellen das DRA-EGFP-Fusionsprotein zwar transkribieren, jedoch nur den EGFP-Anteil und nicht den DRA-Anteil auf Proteinebene exprimieren. Diesen Fragen wurde nicht weiter nachgegangen, da sie nicht zielführend für die bestehende Fragestellung waren.

Weiterhin erscheint es möglich, dass die Caco-2-Zellen den normalerweise in humanen Zellen nicht vorkommenden Ecdysone-Rezeptor nicht suffizient bzw. nicht dauerhaft exprimieren können. Möglicherweise war auch bereits die Transfektion der Caco-2-Zellen mit pVgRxR nicht so erfolgreich wie angenommen.

Zusammenfassend war eine induzierbare Überexpression von DRA in Caco-2-Zellen unter Verwendung des Ecdysone-Systems somit nicht erfolgreich.

Davon ausgehend wurde versucht, als Alternative das Tetrazyklin-reprimierbare System zu verwenden.

Hierzu wurden Caco-2-Zellen zunächst stabil mit dem Tetrazyklin-reprimierbaren System in Form des Vektors pTetOff transfiziert. Über die G418-Resistenz der erfolgreich transfizierten Caco-2/pTetOff-Zellen wurde selektiert und anschließend wurden Klone gezogen.

Im nächsten Schritt wurden die Caco-2/pTetOff-Zellen dann induzierbar mit DRA transfiziert. Parallel wurden gemischte Zellpopulationen und mehrere Klone jeweils primär mit pTRE2[hygro]/EGFP-DRA sowie als Kontrollen mit pBI/EGFP und pEGFP transfiziert. Die Selektion erfolgte wiederum über eine transfizierte Antibiotikaresistenz. 24 Stunden bis etwa drei Tage nach der Transfektion zeigten bei den primär induzierten Zellen sowohl die gemischten Populationen als auch mehrere Einzelklone in der Fluoreszenzmikroskopie eine deutliche Grünfärbung, im Gegensatz zu jenen, bei denen die Induktion durch Doxycyclin unterdrückt worden war.

Die jeweilige Verteilung der grünen Fluoreszenz stellte sich unterschiedlich für die mit EGFP und die mit EGFP gekoppeltem DRA transfizierten Zellen dar. Erwartungsgemäß war die Grünfärbung in den mit dem Transmembranprotein DRA transfizierten Zellen insbesondere im Bereich der Zellmembran lokalisiert, im Gegensatz zu den diffus zytoplasmatisch grün fluoreszierenden EGFP transfizierten Klonen. Mittels Lichtmikroskopie kann jedoch nicht unterschieden werden zwischen der Zellmembran selbst und Strukturen, die intrazellulär direkt unter der Zellmembran liegen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine induzierbare Expression von DRA in Caco-2-Zellen unter den gegebenen Bedingungen nur transient möglich war, und dass die erneute Induktion von DRA in einer vorübergehend nicht induzierten, stabilen Zelllinie nicht mehr möglich war.

Zum Zeitpunkt der Experimente ließ sich über die Gründe dieser Ergebnisse nur spekulieren. Mittlerweile konnte in der Arbeitsgruppe Lamprecht an einem anderen, aus der Arbeitsgruppe Turner stammenden Caco-2-Klon, der stabil das Tet-Off-System exprimiert, DRA stabil transfiziert und zuverlässig induzierbar exprimiert werden. Prof. Turner berichtet, dass in seiner

Arbeitsgruppe über 70 verschiedene Klone getestet wurden mussten, um diesen für die induzierbare Expression geeigneten Klon identifizieren zu können. Retrospektiv sind die Daten also dahingehend zu interpretieren, dass nicht genügend Caco-2-Klone nach Transfektion des Tet-Off-Systems auf Induzierbarkeit getestet wurden. Gleichzeitig zeigen die vorliegenden Experimente jedoch prinzipiell die Möglichkeit der induzierbaren Expression von DRA in Caco-2-Zellen im Tet-Off-System im Sinne eines proof of principle. Diese viel versprechenden Daten waren damit Ausgangspunkt einer nach Ende des experimentellen Teils der vorliegenden Arbeit begonnenen und sehr erfolgreichen Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Turner unter Verwendung der genannten Zellen.

### **4.3 Induzierbare Expression von PDZ-Adapterproteinen in stabil DRA exprimierenden Zellen**

Das zweite Ziel dieser Arbeit war die induzierbare heterologe Expression von DRA-Adapterproteinen in einer stabil DRA exprimierenden Zelllinie.

Wie unter 1.4 beschrieben gibt es zahlreiche Beispiele, wie PDZ-Adapterproteine an der Regulation epithelialer Ionenporter in der Niere und im Darm beteiligt sind (28). Sie beeinflussen unter Anderem Trafficking/Targeting, sowie Kontrolle der Aktivität und Interaktion einzelner Transportproteine durch Bildung von Proteinkomplexen. Da während des physiologischen Verdauungsvorgangs große Mengen an Elektrolyten und Wasser absorbiert und sezerniert werden, können Defekte von Ionenporterproteinen ebenso wie Störungen ihrer Regulation zu teils schweren Krankheitsbildern führen. Eine Zelllinie, welche stabil den Anionenaustauscher DRA exprimiert, und in der induzierbar zusätzlich DRA-Adapterproteine exprimiert werden können, stellt eine Basis für die weitergehende Erforschung von Protein-Protein-Interaktionen des am

intestinalen Ionen- und somit auch Flüssigkeitstransport beteiligten DRA dar, und könnte somit auch wichtige Informationen zur Entwicklung medikamentöser Therapien, die auf die PDZ-Adapterproteine wirken, ergänzen. Im Rahmen der Therapieverbesserung der Cystischen Fibrose wird bereits an Substanzen gearbeitet, die spezifisch in die PDZ-Interaktion von CFTR eingreifen (5).

Um diesen Ansatz zu verfolgen, wurde eine Zelllinie gewählt, die über die zellulären Komponenten eines induzierbaren Expressionssystems verfügt, nämlich EcR293-Zellen. Deren „Mutterzelllinie“, HEK293-Zellen, waren in der Arbeitsgruppe bereits erfolgreich stabil und konstitutiv mit DRA transfiziert worden. EcR293-Zellen wurden im ersten Schritt erfolgreich stabil mit DRA als EGFP-markiertem Fusionsprotein transfiziert und mittels ebenfalls transfizierter Antibiotikaresistenz selektiert. Davon wurden klonale Zelllinien erzeugt, und anschließend Mikrofluorometrie-Messungen durchgeführt, die eine hohe funktionelle DRA-Aktivität zeigen. Erwartungsgemäß zeigten die Populationen gemischter Klone eine geringere DRA-Aktivität als die klonalen Zelllinien.

Im nächsten Schritt wurden EcR293-Zellen induzierbar mit DRA transfiziert, um zu testen, ob mit induzierbarer Expression ein Expressionsniveau erreicht werden kann, das für die Detektion eines funktionellen Signals ausreicht. DRA wurde wiederum EGFP-markiert eingesetzt. Parallel wurde wie bei den Caco-2-Zellen zur Kontrolle stabil mit pEGFP transfiziert. Anhand der Fluoreszenzmikroskopie konnte der Erfolg der Transfektion und anschließenden Induktion mit PonasteroneA dokumentiert werden, da sich sowohl die Kontrollzellen komplett grün gefärbt darstellten, als auch die mit DRA transfizierten EcR293-Zellen im Bereich der Zellränder grün fluoreszierten. Auch auf RNA-Ebene konnte DRA nachgewiesen werden.

In den ebenfalls durchgeführten intrazellulären pH-Messungen ließ sich in diesen Zellen ähnlich wie in den stabil mit DRA transfizierten Zellen der Austausch von Chlorid gegen Bikarbonat darstellen. Die DRA-Aktivität war aber deutlich geringer als in den stabil DRA exprimierenden Zellen. Dies konnte bereits bei den gemischten Populationen im Vergleich zu den klonalen Zelllinien der stabil DRA exprimierenden Zellen beobachtet werden und ist am besten

dadurch zu erklären, dass im induzierbaren System vergleichsweise weniger DRA exprimiert wird.

Im Weiteren wurden zunächst normale EcR293-Zellen induzierbar mit den DRA-Adapterproteinen EBP50 (NHERF-1) und PDZK1 (NHERF-3) transfiziert. Diese waren mit dem rot fluoreszierenden DsRed markiert, um mittels Fluoreszenzmikroskopie den Induktionserfolg abschätzen zu können und um in Zukunft anhand der grünen Autofluoreszenz des EGFP-DRA und der roten Autofluoreszenz der DsRed-markierten PDZ-Adapterproteine Kolokalisationsstudien durchführen zu können.

Mit pIND/DsRed[hygro]/EBP50, pIND/DsRed[hygro]/PDZK1, sowie zur Kontrolle mit pIND/DsRed[hygro] transfizierte Zellen wurden mit PonasteroneA induziert. Alle Zellen zeigten daraufhin eine Rotfärbung fluoreszenzmikroskopisch, am ausgeprägtesten und flächig die mit pIND/DsRed[hygro] und pDsRed[hygro] transfizierten Kontrollzellen. Etwas geringer, aber noch eindeutig erkennbar, und vor allem randlich im Bereich der Zellwand gefärbt waren die mit pIND/DsRed[hygro]/EBP50 transfizierten Zellen. Die mit pIND/DsRed[hygro]/PDZK1 transfizierten Zellen schließlich zeigten die schwächste Rotfärbung.

Dann wurden entsprechend Klone der EcR293/EGFP-DRA-Zellen mit pIND/DsRed[hygro]/EBP50, pIND/DsRed[hygro]/PDZK1 und pIND/DsRed[hygro] bzw. pDsRed transfiziert. In der Fluoreszenzmikroskopie war hier die Rotfärbung durch pDsRed ebenfalls am stärksten und flächig bei den Kontrollzellen mit pIND/DsRed[hygro], sowie bei den mit pIND/DsRed[hygro]/EBP50 transfizierten Zellen im Bereich der Zellmembran lokalisiert und deutlicher ausgeprägt als bei den mit pIND/DsRed[hygro]/PDZK1 transfizierten Zellen zu beobachten.

Betrachtete man den gleichen Ausschnitt einer Population von klonalen EcR293/EGFP-DRA-Zellen, die mit pIND/DsRed[hygro]/EBP50 transfiziert waren, einmal mit einem Filter für Grünfluoreszenz und einmal mit einem Filter für Rotfluoreszenz, so fielen zwei Dinge auf:

1. Obwohl es sich ursprünglich um klonale DRA-exprimierende Zellen handelt, finden sich einzelne rot aber nicht grün fluoreszierende Zellen (siehe Pfeile Abb. 23). Dieses Phänomen ist aus der Zellkultur allgemein bekannt, ohne dass es hierfür eine überzeugende Erklärung gibt. Es muss davon ausgegangen werden, dass die Zelllinie nicht im engsten Sinne klonal ist.
2. In manchen Zellen findet sich eine Kolo-kalisation von roter und grüner Fluoreszenz. Dies war zwar nicht eigentliches Thema der vorliegenden Arbeit, deutet aber darauf hin, dass die PDZ-Adapterproteine an dieser Stelle mit DRA über dessen PDZ-Interaktionsmotiv interagieren. Es zeigt, dass das Modell grün fluoreszierenden DRAs und rot fluoreszierender Interaktionsproteine geeignet ist, zellbiologische Untersuchungen zur Regulation von DRA mit fluoreszenzoptischer und ggf. konfokaler Methodik fortzuführen. Perspektivisch wären solche hochauflösenden Untersuchungen wegen der Eigenfluoreszenz der Fusionsproteine und der damit fehlenden Notwendigkeit zur Antikörper-Färbung auch an lebenden Zellen durchzuführen.

## **5 Zusammenfassung**

DRA (down-regulated in adenoma) ist ein intestinaler Anionenaustauscher der SLC26A-Familie (SLC26A3), der im oberen Gastrointestinaltrakt Clorid- und Bikarbonatsekretion und im unteren Gastrointestinaltrakt Natriumchloridabsorption vermittelt. Er ist dabei funktionell an CFTR bzw. an NHE3 gekoppelt. DRA besitzt ein PDZ-Interaktionsmotif zur Ausbildung von Komplexen mit Adapterproteinen, anderen Transportproteinen und Signalmolekülen. Im Weiteren wird die Aktivität von DRA über den intra- und extrazellulären pH reguliert. Eine Punktmutation im DRA-Gen führt zur Kongenitalen Chloriddiarrhoe.

Um die Regulation von DRA zu untersuchen, erscheint ein möglichst hoch differenziertes intestinales Zellkulturmodell ein aussichtsreicher Ansatz.

DRA hat aber in der Zellkultur wachstumsinhibierende Eigenschaften, so dass für die heterologe Expression von DRA die Entwicklung eines induzierbaren Expressionssystems notwendig ist.

Als Zellkulturmodell wurden hierfür CaCo-2-Zellen gewählt, und diese mit dem Ecdysone-induzierbaren System transfiziert. Kontrollen der Transfektionseffizienz erfolgten für alle Transfektionen über grüne EGFP-Autofluoreszenz von parallel mit EGFP transfizierten Zellen. Eine induzierbare heterologe Überexpression von EGFP-markiertem DRA war in diesen mit dem Ecdysone-induzierbaren Rezeptor pVgRxR transfizierten CaCo-2-Zellen jedoch nicht möglich. Entweder waren die CaCo-2-Zellen nicht in der Lage, den normalerweise in humanen Zellen nicht vorkommenden Ecdysone-Rezeptor suffizient und dauerhaft zu exprimieren, oder die Transfektionseffizienz war nicht so erfolgreich wie aufgrund der fluoreszenzmikroskopischen Kontrolle angenommen.

Alternativ wurden CaCo-2-Zellen mit dem Tetrazyklin-reprimierbaren System in Form des pTetOff-Vektors transfiziert. Anschließend wurden diese Zellen induzierbar mit wiederum als EGFP-Fusionsprotein konstruiertem DRA transfiziert und induziert. Hier zeigten sowohl die gemischten Zellpopulationen als auch die gewonnenen klonalen Zelllinien vorübergehend eine grüne

Autofluoreszenz. Es konnte deutlich unterschieden werden zwischen diffus zytoplasmatisch grün fluoreszierenden EGFP-transfizierten Klonen, und im Bereich der Zellmembran lokalisierter grüner Autofluoreszenz bei den mit EGFP-DRA transfizierten Klonen. Die Fluoreszenz ging jedoch nach mehrmaligem Passagieren der Zellen verloren, sodass eine induzierbare Überexpression von DRA in CaCo-2-Zellen somit unter den gegebenen Bedingungen nur transient erfolgreich war.

Als zweiter methodischer Ansatz für die Untersuchung der Regulation von DRA durch verschiedene interagierende PDZ-Adapterproteine würde die induzierbare Expression dieser Adapterproteine in einer stabil DRA exprimierenden Zelllinie die Möglichkeit bieten, Protein-Protein-Interaktionen von DRA weiter zu erforschen.

Es wurden daher EcR293-Zellen, die den Ecdysone-Rezeptor bereits stabil exprimieren, zunächst stabil mit DRA transfiziert, und damit erfolgreich funktionelle Messungen der DRA-Aktivität durchgeführt.

Zusätzlich wurden dann die als Fusionsproteine mit rot fluoreszierendem DsRed klonierten PDZ-Adapterproteine EBP50 und PDZK1 erfolgreich induzierbar in EcR293-Zellen transfiziert und induziert. Die Kontrolle der Transfektionseffizienz erfolgte hierbei über die rote Autofluoreszenz von parallel mit DsRed transfizierten Zellen.

Entsprechend wurden im nächsten Schritt klonale Zellen von stabil DRA exprimierenden EcR293-Zellen induzierbar mit den Adapterproteinen EBP50 und PDZK1, sowie zur Kontrolle mit induzierbarem DsRed transfiziert, und anschließend erfolgreich induziert. Hier fand sich fluoreszenzmikroskopisch teilweise eine Kolo-kalisation von rot fluoreszierenden Adapterproteinen und grün fluoreszierendem DRA, was zum Einen darauf hindeutet, dass die PDZ-Adapterproteine mit DRA über dessen PDZ-Interaktionsmotif interagieren, und was zum Anderen zeigt, dass ein solches Zellmodell für weitere zellbiologische Untersuchungen zur Regulation von DRA mit fluoreszenzoptischer Methodik geeignet ist – mittelfristig sogar an lebenden Zellen, da die Eigenfluoreszenz der Tags eine Fixierung und Antikörpermarkierung überflüssig macht.

# **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1:	Computergestützte Vorhersagen der sekundären Molekülstruktur von DRA.....	12
Abb. 2:	EcR293/pEGFP-DRA/clone15-Zellen nach 10 Tagen Kultivierung in Nährmedium mit folgenden Konzentrationen an Hygromycin B (von links oben beginnend): 0, 12,5, 25, 50, 100 und 200 µg/ml Hygromycin B.....	40
Abb. 3:	Fluoreszenzmikroskopieaufnahme (links) und Durchlichtmikroskopieaufnahme (rechts) von Caco-2/EGFP, 24 Stunden nach Transfektion, Vergrößerung 20fach.....	44
Abb. 4:	Fluoreszenzmikroskopieaufnahme (links) und Durchlichtmikroskopieaufnahme (rechts) von EcR293/pDsRed, 24 Stunden nach Transfektion, Vergrößerung 20fach.....	44
Abb. 5:	PCR für EGFP-DRA in Caco-2-Zellen: .....	47
Abb. 6:	PCR für EcR-Rezeptor in Caco-2/pVgRxR-Zellen.....	49
Abb. 7:	Fluoreszenzmikroskopieaufnahme (links) und Durchlichtmikroskopieaufnahme (rechts) von Caco-2/pTetOff/gemischte Klone/pTRE2[hygro]/pEGFP-DRA, ohne Doxycyclin, 24 Stunden nach Transfektion, Vergrößerung 40fach, Belichtungszeit 2500ms.....	51
Abb. 8:	Fluoreszenzmikroskopieaufnahme (links) und Durchlichtmikroskopieaufnahme (rechts) von Caco-2/pTetOff/gemischte Klone/pBI/EGFP, ohne Doxycyclin, 24 Stunden nach Transfektion, Vergrößerung 40fach, Belichtungszeit 2500ms.....	51
Abb. 9:	Fluoreszenzmikroskopieaufnahme (links) und Durchlichtmikroskopieaufnahme (rechts) von Caco-2/pTetOff/clone1/pTRE2[hygro]/EGFP-DRA, ohne Doxycyclin, 24 Stunden nach Transfektion, Vergrößerung 40fach, Belichtungszeit 4000ms.....	52

Abb. 10:	Fluoreszenzmikroskopieaufnahme (links) und Durchlichtmikroskopieaufnahme (rechts) von Caco- 2/pTetOff/clone3/pTRE2[hygro]/EGFP-DRA, ohne Doxycyclin, 24 Stunden nach Transfektion, Vergrößerung 40fach, Belichtungszeit 4000ms.....	52
Abb. 11:	Fluoreszenzmikroskopieaufnahme (links) und Durchlichtmikroskopieaufnahme (rechts) von Caco- 2/pTetOff/clone2/pBI/EGFP, ohne Doxycyclin, 24 Stunden nach Transfektion, Vergrößerung 40fach, Belichtungszeit 4000ms .....	53
Abb. 12:	Fluoreszenzmikroskopieaufnahme (links) und Durchlichtmikroskopieaufnahme (rechts) von TetOff293/pBI/ pEGFP, ohne Doxycyclin, 24 Stunden nach Transfektion, Vergrößerung 20fach, Belichtungszeit 1000ms in Fluoreszenztechnik und 75ms in Durchlichttechnik.....	54
Abb. 13:	Fluoreszenzmikroskopieaufnahme (links) und Durchlichtmikroskopieaufnahme (rechts) von TetOff293/TRE2[hygro]/EGFP-DRA, 24 Stunden nach Transfektion, Vergrößerung 20fach, Belichtungszeit 1000ms in Fluoreszenztechnik und 75ms in Durchlichttechnik.....	55
Abb. 14:	Fluoreszenzmikroskopieaufnahme (links) und Durchlichtmikroskopieaufnahme (rechts) von TetOff293/TRE2[hygro]/EGFP-DRA, 24 Stunden nach Transfektion, Vergrößerung 20fach, Belichtungszeit 1000ms in Fluoreszenztechnik und 75ms in Durchlichttechnik.....	55
Abb. 15:	Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen (jeweils links) und Durchlichtmikroskopieaufnahmen (jeweils rechts) von EcR293/pEGFPfIDRA/clone12, klonal aus Passage 3; obere Zeile: 88 Tage nach Transfektion, untere Zeile: 128 Tage nach Transfektion, Vergrößerung 40fach, Belichtungszeit 2500ms .....	57
Abb. 16:	Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen (jeweils links) und Durchlichtmikroskopieaufnahmen (jeweils rechts) von EcR293/pEGFPfIDRA/clone13, klonal aus Passage 3; obere Zeile:	

	88 Tage nach Transfektion, untere Zeile: 128 Tage nach Transfektion, Vergrößerung 40fach, Belichtungszeit 2500ms .....	58
Abb. 17:	Fluoreszenzmikroskopieaufnahme (links) und Durchlichtmikroskopieaufnahme (rechts) von EcR293/pEGFP/ clone2, klonal aus Passage 3; 61 Tage nach Transfektion, Vergrößerung 40fach, Belichtungszeit 500ms.....	58
Abb. 18:	Kurvenverläufe des intrazellulären pH-Wertes (pH <sub>i</sub> ) der Mikrofluorometriemessungen von:.....	60
	a) EcR293/pEGFP-DRA/cl13 Einzelexperimente und Durchschnitt, 60	
	b) EcR293/pEGFP-DRA/cl13 Durchschnitt, EcR293/pEGFP- DRA/mixed clones, EcR293/pEGFP/cl1, EcR293/pEGFP/mixed clones .....	60
Abb. 19:	Kurvenverläufe des intrazellulären pH-Wertes (pH <sub>i</sub> ) der Mikrofluorometriemessungen von EcR293/pIND/EGFP-DRA/cl5: jeweils zwei Messungen mit durch PonasteroneA induzierten Zellen (türkisfarbene und dunkelblaue Kurve) und zwei Messungen mit nicht induzierten Zellen (rosafarbene und gelbe Kurve) .....	62
Abb. 20:	Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen (jeweils links) und Durchlichtmikroskopieaufnahmen (jeweils rechts) von EcR293/pDsRed 1 Tag (obere Zeile) / 2 Tage (untere Zeile) nach Transfektion; Vergrößerung 40fach, Belichtungszeit 1800/1000ms in Fluoreszenztechnik und 20/50 ms in Durchlichttechnik .....	64
Abb. 21:	Fluoreszenzmikroskopieaufnahme (links) und Durchlichtmikroskopieaufnahme (rechts) von EcR293/pIND/DsRed/EBP50 2 Tage nach Transfektion, 1 Tag nach Induktion mit PonasteroneA; Vergrößerung 20fach, Belichtungszeit 1000ms in Fluoreszenztechnik und 20 ms in Durchlichttechnik .....	64
Abb. 22:	Fluoreszenzmikroskopieaufnahme (links) und Durchlichtmikroskopieaufnahme (rechts) von EcR293/pIND/DsRed/PDZK1 2 Tage nach Transfektion, 1 Tag nach Induktion mit PonasteroneA; Vergrößerung 20fach,	

	Belichtungszeit 1000ms in Fluoreszenztechnik und 20 ms in Durchlichttechnik .....	65
Abb. 23:	Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen und Durchlichtmikroskopieaufnahme von EcR293/pEGFP- DRA/clone13/pIND/DsRed/EBP50 2 Tage nach Transfektion, 1 Tag nach Induktion mit PonasteroneA; Vergrößerung 20fach, Belichtungszeit 1500ms in Fluoreszenztechnik und 25 ms in Durchlichttechnik .....	66
Abb. 24:	Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen und Durchlichtmikroskopieaufnahme von EcR293/EGFP- DRA/clone12/pIND/DsRed/EBP50 2 Tage nach Transfektion, 1 Tag nach Induktion mit PonasteroneA; Vergrößerung 20fach, Belichtungszeit 1000ms in Fluoreszenztechnik und 20 ms in Durchlichttechnik .....	66
Abb. 25:	Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen und Durchlichtmikroskopieaufnahme von EcR293/pEGFP- DRA/clone13/pIND/DsRed/PDZK1 2 Tage nach Transfektion, 1 Tag nach Induktion mit PonasteroneA; Vergrößerung 20fach, Belichtungszeit 1500ms in Fluoreszenztechnik und 20 ms in Durchlichttechnik .....	67
Abb. 26:	Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen und Durchlichtmikroskopieaufnahme von EcR293/EGFP- DRA/clone12/pIND/DsRed/PDZK1 2 Tage nach Transfektion, 1 Tag nach Induktion mit PonasteroneA; Vergrößerung 20fach, Belichtungszeit 1500ms in Fluoreszenztechnik und 20 ms in Durchlichttechnik .....	67
Abb. 27:	Fluoreszenzmikroskopieaufnahme und Durchlichtmikroskopieaufnahme von EcR293/EGFP- DRA/clone12/pIND/DsRed 2 Tage nach Transfektion, 1 Tag nach Induktion mit PonasteroneA; Vergrößerung 20fach, Belichtungszeit 1000ms in Fluoreszenztechnik und 20 ms in Durchlichttechnik .....	68

Abb. 28:	Fluoreszenzmikroskopieaufnahme und Durchlichtmikroskopieaufnahme von EcR293/EGFP- DRA/clone13/pIND/DsRed/EBP50 3 Tage nach Transfektion, 36 Stunden nach Induktion mit PonasteroneA; Vergrößerung 20fach, Belichtungszeit 1000ms in Fluoreszenztechnik und 50 ms in Durchlichttechnik .....	68
Abb. 29:	Fluoreszenzmikroskopieaufnahme und Durchlichtmikroskopieaufnahme von EcR293/EGFP- DRA/clone12/pIND/DsRed/EBP50 3 Tage nach Transfektion, 36 Stunden nach Induktion mit PonasteroneA; Vergrößerung 20fach, Belichtungszeit 1000ms in Fluoreszenztechnik und 50 ms in Durchlichttechnik .....	68
Abb. 30:	Fluoreszenzmikroskopieaufnahme und Durchlichtmikroskopieaufnahme von EcR293/EGFP- DRA/clone13/pIND/DsRed/PDZK1 3 Tage nach Transfektion, 36 Stunden nach Induktion mit PonasteroneA; Vergrößerung 20fach, Belichtungszeit 1000ms in Fluoreszenztechnik und 60 ms in Durchlichttechnik .....	69
Abb. 31:	Fluoreszenzmikroskopieaufnahme und Durchlichtmikroskopieaufnahme von EcR293/EGFP- DRA/clone12/pIND/DsRed/PDZK1 3 Tage nach Transfektion, 36 Stunden nach Induktion mit PonasteroneA; Vergrößerung 20fach, Belichtungszeit 1000ms in Fluoreszenztechnik und 50 ms in Durchlichttechnik .....	69
Abb. 32:	Fluoreszenzmikroskopieaufnahme und Durchlichtmikroskopieaufnahme von EcR293/EGFP- DRA/clone12/pIND/DsRed 3 Tage nach Transfektion, 36 Stunden nach Induktion mit PonasteroneA; Vergrößerung 20fach, Belichtungszeit 1000ms in Fluoreszenztechnik und 20 ms in Durchlichttechnik .....	70

# Literaturverzeichnis

1. Alper, Seth L., Rossmann, Heidi, Wilhelm, Sabine, Stuart-Tilley, Alan K., Shmukler, Boris E., and Seidler, Ursula. Expression of AE2 Anion Exchanger in Mouse Intestine. *AJP - Gastrointestinal and Liver Physiology* 1-8-1999;277(2):G321-G332.
2. Antalis, T. M., Reeder, J. A., Gotley, D. C., Byeon, M. K., Walsh, M. D., Henderson, K. W., Papas, T. S., and Schweinfest, C. W. Down-Regulation of the Down-Regulated in Adenoma (DRA) Gene Correlates With Colon Tumor Progression. *Clin.Cancer Res.* 1998;4(8):1857-63.
3. Byeon, M. K., Westerman, M. A., Maroulakou, I. G., Henderson, K. W., Suster, S., Zhang, XK, Papas, T. S., Vesely, J., Willingham, M. C., Green, J. E., and Schweinfest, C. W. The Down-Regulated in Adenoma (DRA) Gene Encodes an Intestine-Specific Membrane Glycoprotein. *Oncogene* 18-1-1996;12(2):387-96.
4. Chapman, J. M., Knoepp, S. M., Byeon, M. K., Henderson, K. W., and Schweinfest, C. W. The Colon Anion Transporter, Down-Regulated in Adenoma, Induces Growth Suppression That Is Abrogated by E1A. *Cancer Research* 2002;62:5083-8.
5. Dev, K. K. Making Protein Interactions Druggable: Targeting PDZ Domains. *Nat.Rev.Drug Discov.* 2004;3(12):1047-56.
6. Gisler, Serge M., Pribanic, Sandra, Bacic, Desa, Forrer, Patrik, Gantenbein, Andrea, Sabourin, Luc A., Tsuji, Akira, Zhao, Zhuo S., Manser, Edward, Biber, Jurg, and Murer, Heini. PDZK1: I. A Major Scaffold in Brush Borders of Proximal Tubular Cells. *Kidney International* 1-11-2003;64(5):1733-45.
7. Gossen, M. and Bujard, H. Tight Control of Gene Expression in Mammalian Cells by Tetracycline-Responsive Promoters. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 15-6-1992;89(12):5547-51.
8. Guggino, William B. The Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator Forms Macromolecular Complexes With PDZ Domain Scaffold Proteins. *Proceedings of the American Thoracic Society* 1-1-2004;1(1):28-32.
9. Haila, S., Saarialho-Kere, U., Karjalainen-Lindsberg, M. L., Lohi, H., Airola, K., Holmberg, C., Hastbacka, J., Kere, J., and Högglund, P. The Congenital Chloride Diarrhea Gene Is Expressed in Seminal Vesicle, Sweat Gland, Inflammatory Colon Epithelium, and in Some Dysplastic Colon Cells. *Histochem.Cell Biol* 2000.Apr.;113(4.):279-86. 113(4):279-86.

10. Harris, Baruch Z. and Lim, Wendell A. Mechanism and Role of PDZ Domains in Signaling Complex Assembly. *Journal of Cell Science* 15-9-2001;114(18):3219-31.
11. Hemminki, A., Hoglund, P., Pukkala, E., Salovaara, R., Jarvinen, H., Norio, R., and Aaltonen, L. A. Intestinal Cancer in Patients With a Germline Mutation in the Down-Regulated in Adenoma (DRA) Gene. *Oncogene* 5-2-1998;16(5):681-4.
12. Hillier, B. J., Christopherson, K. S., Prehoda, K. E., Bredt, D. S., and Lim, W. A. Unexpected Modes of PDZ Domain Scaffolding Revealed by Structure of NNOS-Syntrophin Complex. *Science* 30-4-1999;284(5415):812-5.
13. Hoglund, P., Haila, S., Gustavson, K. H., Taipale, M., Hannula, K., Popinska, K., Holmberg, C., Socha, J., de-la, Chapelle A., and Kere, J. Clustering of Private Mutations in the Congenital Chloride Diarrhea/Down-Regulated in Adenoma Gene. *Hum.Mutat.* 1998;11(4):321-7.
14. Hoglund, P., Haila, S., Scherer, S. W., Tsui, L. C., Green, E. D., Weissenbach, J., Holmberg, C., de la Chapelle, A., and Kere, J. Positional Candidate Genes for Congenital Chloride Diarrhea Suggested by High-Resolution Physical Mapping in Chromosome Region 7q31. *Genome Research* 1996;6(3):202-10.
15. Hoglund, P., Haila, S., Socha, J., Tomaszewski, L., Saarialho-Kere, U., Karjalainen-Lindsberg, M. L., Airola, K., Holmberg, C., de la Chapelle, A., and Kere. Mutations of the Down-Regulated in Adenoma (DRA) Gene Cause Congenital Chloride Diarrhoea. *Nature Genetics* 1996;14(3):316-9.
16. Hoogerwerf, W. A., Tsao, S. C., Devuyst, O., Levine, S. A., Yun, C. H. C., Yip, J. W., Cohen, ME, Wilson, P. D., Lazenby, A. J., Tse, C. M., and Donowitz, M. NHE2 and NHE3 Are Human and Rabbit Intestinal Brush-Border Proteins. *American Journal of Physiology* 1996;270(1 Pt 1):G29-G41.
17. Janecki, A. J., Montrose, M. H., Zimniak, P., Zweibaum, A., Tse, C. M., Khurana, S., and Donowitz, M. Subcellular Redistribution Is Involved in Acute Regulation of the Brush Border Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger Isoform 3 in Human Colon Adenocarcinoma Cell Line Caco-2. Protein Kinase C-Mediated Inhibition of the Exchanger. *J Biol Chem* 10-4-1998;273(15):8790-8.
18. Kere, J., Lohi, H., and Hoglund, P. Genetic Disorders of Membrane Transport III. Congenital Chloride Diarrhea. *Am.J.Physiol* 1999;276(1 Pt 1):G7-G13.

19. Knutter, I., Hartrodt, B., Theis, S., Foltz, M., Rastetter, M., Daniel, H., Neubert, K., and Brandsch, M. Analysis of the Transport Properties of Side Chain Modified Dipeptides at the Mammalian Peptide Transporter PEPT1. *Eur.J.Pharm.Sci.* 2004;21(1):61-7.
20. Ko, S. B., Zeng, W., Dorwart, M. R., Luo, X., Kim, K. H., Millen, L., Goto, H., Naruse, S., Soyombo, A., Thomas, P. J., and Muallem, S. Gating of CFTR by the STAS Domain of SLC26 Transporters. *Nat.Cell Biol.* 2004;6(4):343-50.
21. Ko, Shigeru B., Shcheynikov, Nikolay, Choi, Joo Young, Luo, Xiang, Ishibashi, Kenichi, Thomas, Philip J., Kim, Joo Young, Kim, Kyung Hwan, Lee, Min Goo, Naruse, Satoru, and Muallem, Shmuel. A Molecular Mechanism for Aberrant CFTR-Dependent HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> Transport in Cystic Fibrosis. *The EMBO Journal* 1-11-2002;21(21):5662-72.
22. Kocher, O., Comella, N., Gilchrist, A., Pal, R., Tognazzi, K., Brown, L. F., and Knoll, J. H. PDZK1, a Novel PDZ Domain-Containing Protein Up-Regulated in Carcinomas and Mapped to Chromosome 1q21, Interacts With CMOAT (MRP2), the Multidrug Resistance-Associated Protein. *Lab.Invest.* 1999;79(9):1161-70.
23. Lamprecht, G., Baisch, S., Schoenleber, E., and Gregor, M. Transport Properties of the Human Intestinal Anion Exchanger DRA (Down Regulated in Adenoma) in Transfected HEK293 Cells. *Pflugers Archiv - European Journal of Physiology* 2005;449(5):479-90.
24. Lamprecht, G., Gaco, V., Turner, J. R., Natour, D., and Gregor, M. Regulation of the Intestinal Anion Exchanger DRA (Downregulated in Adenoma). *Annals of the New York Academy of Sciences* 2009;1165:261-6.
25. Lamprecht, G., Heil, A., Baisch, S., Lin-Wu, E., Yun, C. C., Kalbacher, H., Gregor, M., and Seidler, U. The Down Regulated in Adenoma (Dra) Gene Product Binds to the Second PDZ Domain of the NHE3 Kinase A Regulatory Protein (E3KARP), Potentially Linking Intestinal Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> Exchange to Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchange. *Biochemistry* 2002;41(41):12336-42.
26. Lamprecht, G., Hsieh, C. J., Lissner, S., Nold, L., Heil, A., Gaco, V., Schafer, J., Turner, J. R., and Gregor, M. Intestinal Anion Exchanger Down-Regulated in Adenoma (DRA) Is Inhibited by Intracellular Calcium. *Journal of Biological Chemistry* 17-7-2009;284(29):19744-53.
27. Lamprecht, G., Schaefer, J., Dietz, K., and Gregor, M. Chloride and Bicarbonate Have Similar Affinities to the Intestinal Anion Exchanger DRA (Down Regulated in Adenoma). *Pflugers Archiv - European Journal of Physiology* 2006;452(3):307-15.

28. Lamprecht, G. and Seidler, U. The Emerging Role of PDZ Adapter Proteins for Regulation of Intestinal Ion Transport. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 2006;291(5):G766-G777.
29. Lee, B. S., Gunn, R. B., and Kopito, R. R. Functional Differences Among Nonerythroid Anion Exchangers Expressed in a Transfected Human Cell Line. *Journal of Biological Chemistry* 25-6-1991;266(18):11448-54.
30. Melvin, J. E., Park, K., Richardson, L., Schultheis, P. J., and Shull, G. Mouse Down-Regulated in Adenoma (DRA) Is an Intestinal Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> Exchanger and Is Up-Regulated in Colon of Mice Lacking the NHE3 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger. *Journal of Biological Chemistry* 8-6-1999;274(32):22855-61.
31. Moseley, R. H., Høglund, P., Wu, G. D., Silberg, D. G., Haila, S., de la Chapelle, A., Holmberg, C., and Kere, J. Downregulated in Adenoma Gene Encodes a Chloride Transporter Defective in Congenital Chloride Diarrhea. *AJP - Cell Physiology* 1-1-1999;276(1 Pt 1):G185-G192.
32. Musch, M. W., Arvans, D. L., Wu, G. D., and Chang, E. B. Functional Coupling of the Downregulated in Adenoma Cl<sup>-</sup>/Base Exchanger DRA and the Apical Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchangers NHE2 and NHE3. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 2009;296(2):G202-G210.
33. No, D., Yao, T. P., and Evans, R. M. Ecdysone-Inducible Gene Expression in Mammalian Cells and Transgenic Mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 16-4-1996;93(8):3346-51.
34. Quick, M. and Wright, E. M. Employing Escherichia Coli to Functionally Express, Purify, and Characterize a Human Transporter. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 25-6-2002;99(13):8597-601.
35. Rossmann, H., Jacob, P., Baisch, S., Hassoun, R., Meier, J., Natour, D., Yahya, K., Yun, C., Biber, J., Lackner, K. J., Fiehn, W., Gregor, M., Seidler, U., and Lamprecht, G. The CFTR Associated Protein CAP70 Interacts With the Apical Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> Exchanger DRA in Rabbit Small Intestinal Mucosa. *Biochemistry* 2005;44:4477-87.
36. Schultheis, P. J., Clarke, L. L., Meneton, P., Miller, M. L., Soleimani, M., Gawenis, L. R., Riddle, T. M., Duffy, J. J., Doetschman, T., Wang, T., Giebisch, G., Aronson, P. S., Lorenz, J. N., and Shull, G. E. Renal and Intestinal Absorptive Defects in Mice Lacking the NHE3 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger. *Nat Genet* 1998;19(3):282-5.
37. Schweinfest, C. W., Henderson, K. W., Suster, S., Kondoh, N., and Papas, T. S. Identification of a Colon Mucosa Gene That Is Down-Regulated in Colon Adenomas and Adenocarcinomas. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1-5-1993;90(9):4166-70.

38. Seidler, U., Blumenstein, I., Kretz, A., Viellard, Baron D., Rossmann, H., Colledge, W. H., Evans, M., Ratcliff, R., and Gregor, M. A Functional CFTR Protein Is Required for Mouse Intestinal CAMP-, CGMP- and Ca(2+)-Dependent HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> Secretion. *J Physiol.Lond.* 1-12-1997;505(Pt 2):411-23.
39. Sheng, Morgan and Sala, Carlo. PDZ Domains and the Organization of Supramolecular Complexes. *Annual Review of Neuroscience* 1-1-2001;24(1):1-29.
40. Silberg, D. G., Wang, W., Moseley, R. H., and Traber, P. G. The Down Regulated in Adenoma (Dra) Gene Encodes an Intestine-Specific Membrane Sulfate Transport Protein. *Journal of Biological Chemistry* 1995;270(20):11897-902.
41. Sun, Fei, Hug, Martin J., Lewarchik, Christopher M., Yun, C.-H. Chris, Bradbury, Neil A., and Frizzell, Raymond A. E3KARP Mediates the Association of Ezrin and Protein Kinase A With the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator in Airway Cells. *Journal of Biological Chemistry* 15-9-2000;275(38):29539-46.
42. Walker, M. M., Talley, N. J., Prabhakar, M., Pennaneac'h, C. J., Aro, P., Ronkainen, J., Storskrubb, T., Harmsen, W. S., Zinsmeister, A. R., and Agreus, L. Duodenal Mastocytosis, Eosinophilia and Intraepithelial Lymphocytosis As Possible Disease Markers in the Irritable Bowel Syndrome and Functional Dyspepsia. *Aliment.Pharmacol.Ther.* 1-4-2009;29(7):765-73.
43. Wang, Shusheng, Yue, Hongwen, Derin, Rachel B., Guggino, William B., and Li, Min. Accessory Protein Facilitated CFTR-CFTR Interaction, a Novel Molecular Mechanism to Potentiate the Chloride Channel Activity. *Cell* 29-9-2000;103:169-79.
44. Yin, D. X., Zhu, L., and Schimke, R. T. Tetracycline-Controlled Gene Expression System Achieves High-Level and Quantitative Control of Gene Expression. *Anal.Biochem.* 15-3-1996;235(2):195-201.
45. Yun, C. H. C., Lamprecht, G., Foster, D. V., and Sidor, Agnieszka. NHE3 Kinase A Regulatory Protein (E3KARP) Binds the Epithelial Brush Border Na/H Exchanger, NHE3, and the Cytoskeletal Protein Ezrin. *Journal of Biological Chemistry* 10-2-1998;273(40):25856-63.
46. Zachos, N.; Li, X.; Hodson, C.; Cha, Boyoung; Chen, Y.; Milgram, S. L.; Donowitz, M. Brush Border (bb) PDZ Proteins PDZk1 and Ikepp (intestinal and Kidney Epithelial PDZ Domain Protein) Differentially Regulate NHE3 in Response To Elevated Ca<sup>2+</sup>: Inhibition With PDZk1 and Stimulation With Ikepp. *Gastroenterology* 128. 2005.

47. Zachos, N. C., Tse, M., and Donowitz, M. Molecular Physiology of Intestinal Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchange. *Annual Review of Physiology* 2005;67:411-43.

## **Danksagung**

Bedanken möchte ich mich bei all denjenigen, die diese Dissertation ermöglicht und zu ihrem Gelingen beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. M. Gregor, Ärztlicher Direktor der Abteilung Innere Medizin I der Medizinischen Klinik, danke ich für die Betreuung der Doktorarbeit, und für die Möglichkeit, die Experimente in den Gastroenterologischen Forschungslabors seiner Abteilung durchführen zu können.

Herrn PD Dr. H.-G. Lamprecht, Abteilung für Innere Medizin I der Medizinischen Klinik, danke ich für die direkte Betreuung meiner Arbeit, beginnend mit der Themenstellung, über eine ausführliche Anleitung, die kontinuierliche Unterstützung während des experimentellen Arbeitsteils, sowie Vorschläge und Hilfestellungen bei allen Fragen und Problemen, hin zur konstruktiven Kritik und Korrektur der schriftlichen Form.

Den Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe (Frau Susannah Baisch, Frau Julia Meier, Dr. rer. nat. Chi-jen Hsieh) danke ich für die gute Zusammenarbeit und für ihre Hilfsbereitschaft.

Meinem Mann Aurelius Speck danke ich für seine unermüdliche Unterstützung in Allem während der gesamten Zeit.

Ebenfalls für ihre Unterstützung danken möchte ich meinen Eltern.