

2. Material

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden in höchstem Reinheitsgrad von folgenden Firmen bezogen:

Amersham/Pharmacia, Difco Laboratories, FMC Bioproducts, Gibco BRL, Merck, Roche, Sigma

2.1.2. Radiochemikalien

γ -³²P-ATP und α -³²P-dCTP wurden von ICN Radiochemicals bezogen.

2.1.3. Restriktionsenzyme

<i>Bam</i> HI	Roche oder Appligene/Oncor
<i>Eco</i> RI	Roche oder Appligene/Oncor
<i>Not</i> I	Roche
<i>Acc</i> I	Roche
<i>Cl</i> aI	Roche
<i>Bgl</i> II	Roche
<i>Kpn</i> I	Roche
<i>Nco</i> I	Roche

2.1.4. Enzyme (andere)

DNaseI	Roche
Klenow Polymerase	Roche
Proteinase K	Sigma
RNase A	Sigma
RNasin	Promega
T4-DNA Ligase	Sigma
T4-Polynukleotid Kinase	Roche
Taq-DNA-Polymerase	Gibco BRL

2.1.5. DNA Längenmarker

1 μ g Lambda DNA <i>Hind</i> III Verdau	Gibco BRL
1 kbp DNA Marker	Gibco BRL

2.1.6. Antikörper

GATA1	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA
LMO2	Seramun Diagnostica GmbH, Dolgenbrodt, Deutschland
SP1	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA
NLI	Seramun Diagnostica GmbH, Dolgenbrodt, Deutschland

2.1.7. Lösungen und Puffer

Caesiumchlorid-Lösung	5,7 M CsCl; 0,1 M EDTA; pH 7.0 in DEPC behandeltes Wasser
Denaturierungslösung (Southern)	1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH
Denhardts Reagenz (50x)	10 mg/ml Ficoll (Typ 400); 10 mg/ml PVP; 10 mg/ml BSA
Dialyse Puffer	50 % Glycerin; 10 mM HEPES, 50 mM NaCl; 0,4 mM PMSF; 0,5 mM DTT; pH 7,9
Guanidinthiocyanat Lösung	4 M Guanidinthiocyanat; 0,5 % Sarcosyl; 25 mM EDTA; 0,7 % β -Mercaptoethanol in DEPC behandeltes Wasser
HBS Puffer	140 mM NaCl; 5 mM KCl; 0,1 % Dextrose (D-(+)-Glukose); 1,4 mM Na^+ , 0,7 mM PO_4^{3-} ; 20 mM HEPES; pH 7,05
Hemin-Chlorid Lösung	nach Sambrook et al., 1989
Hybridisierungslösung (Northern)	6 x SSC; 2 x Denhardts Reagenz; 0,1 % SDS; pH 7,0
Ladepuffer für Agarosele (5 x)	25 % Ficoll 70; 25 mM EDTA; 2,5 mg/ml Bromphenolblau; pH 8,0
Lyse Puffer	50 % Glycerin; 100 mM KCl; 5 mM MgCl_2 ; 0,05 % Saponin; 200 mM β -Mercaptoethanol; 50 mM Tris-HCl; pH 7,9
MOPS Puffer (10x)	200 mM Na-MOPS; 50 mM NaOAc; 10 mM EDTA; 2 % DEPC; pH 7,0
Neutralisationslösung (Southern)	3 M NaCl; 0,5 M Tris-HCl; pH 7,2
PBS (10 x)	1,36 M NaCl; 15 mM KH_2PO_4 ; 25 mM KCl; 65 mM Na_2HPO_4 ; pH 7,3
PS Puffer	1 M NaCl; 2,2 mM Na-Pyrophosphat; 1 x Denhardts Reagenz; 5 mM EDTA 50 mM Tris-HCl; 1 % SDS, pH 7,5
Puffer A	100 mM NaCl; 3 mM MgCl_2 ; 0,1 mM PMSF; 50 mM Tris-HCl; pH 8,0

Puffer D	50 mM Tris-HCl; 0,42 M KCl; 20 % Glycerin (v/v); 5 mM MgCl ₂ ; 10 % Sucrose (w/v); 0,1 mM EDTA; 1 mM PMSF; 2 mM DTT; 1 mM Na-Metabisulfit; 1 mM Benzamidin-HCl; pH 7,5
Puffer H	10 mM Tris-HCl; 10 mM KCl; 1,5 mM MgCl ₂ ; 1 mM Na-Metabisulfit; 1 mM Benzamidin-HCl; 1 mM DTT; 1 mM PMSF; pH 7,9
RNA Ladepuffer (5 x)	50 % Glycerin; 0,25 % Bromphenol-blau; 1 mM EDTA; 0,25 % Xylen-cyanol FF; in DEPC behandeltes Wasser
SSC Puffer (10 x)	1,5 M NaCl; 150 mM Natriumcitrat
SSPE Puffer (20 x)	3,6 M NaCl; 20 mM EDTA; 0,2 M NaH ₂ PO ₄ ; pH 7,4
TAE (50 x)	2 M Tris-Base; 57 % Eisessig (v/v); 50 mM EDTA; pH 7,0
TBE (10 x) (EMSA)	1,34 M Tris-Base; 225 mM Borsäure; 39 mM EDTA; pH 7,5
TBE (10 x) (LI-COR)	1,34 M NaCl; 0,45 M Borsäure; 25 mM EDTA; pH 8,5 (50°C)
TE (100 x)	100 mM EDTA; 1 M Tris-HCl; pH 8,0
Bindepuffer (EMSA)	12 mM HEPES, 60 mM KCl, 1 mM ZnSO ₄ , 12 % Glycerol, 1 mM DTT, 4 mM Tris-HCl, pH 8,0

2.1.8. Nährmedien und -böden

LB Medium	10 g/l Bacto-Tryptone; 5 g/l Bacto-Yeast Extract; 170 mM NaCl; pH 7,5
TfB1 Medium	30 mM CoOAc; 50 mM MnCl ₂ ; 100 mM KCl; 10 mM MgCl ₂ ; 15 % Glycerol (v/v); pH 5,8
TfB2 Medium	10 mM Na-MOPS; 75 mM CaCl ₂ ; 15 % Glycerol (v/v); 10 mM KCl
TYM Medium	1 % Bacto Tryptone; 0,1 M NaCl; 0,5 % Bacto-Yeast Extract; 10 mM MgCl ₂ ;

2.1.9. Zelllinien

B-Zellen	Immortalisierte humane B-Zellen, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Susanne Freyer und Prof. Dr. Hans-Hilger Ropers, Max-Planck Institut für Molekulare Genetik, Berlin.
COS-7	Affennierenzelllinie, von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) in Braunschweig
HEK 293	Human embryonale Nierenzelllinie, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Joe Sodrosky, Dana Farber Cancer Institute, Boston, Mass., USA.
HEL	Humane Leukämiezelllinie, von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) in Braunschweig
K562	Humane CML-Linie, von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) in Braunschweig
NIH3T3	Embryonale Mauszelllinie, von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) in Braunschweig

2.1.10. Zellkulturmedien

Dulbecco's MEM	Dulbecco's MEM Medium versetzen mit 10 % fötales Kälberserum; 1 x Penicillin/Streptomycin Lösung 1 x Glutamin
Optimem 1	Optimem Nährmedium versetzen mit 2 % fötales Kälberserum; 1 x Penicillin/Streptomycin Lösung
RPMi	RPMi Medium versetzen mit 10 % fötales Kälberserum; 1 x Penicillin/Streptomycin Lösung; 1 x Glutamin
Iscove's MEM	Iscove's MEM versetzen mit 10 % fötales Kälberserum; 1 x Penicillin/Streptomycin Lösung; 1 x Glutamin

2.1.11. Transfektionsreagenzien

DAC-30	Eurogenetech
Transfectam	Promega
Fugene	Roche

2.1.12. Oligonukleotide

Alle verwendeten Phosphothioatoligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech, München, bezogen, wobei alle Nukleotidbindungen modifiziert wurden. Alle nicht-modifizierten Oligonukleotide lieferte metabion, München.

Aktin Oligonukleotide:

Aktin A for 5'- GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA -3'

Aktin B rev 5'- GTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC -3'

ε-Globin Oligonukleotide:

EpsilonEx2a 5'- GAT TGG GAA AGT CCT CAA G -3'

EpsilonEx2b 5'-CAC CAG CAC CTG AAC TCA -3'

LMO2 Promotor P1 Oligonukleotide:

TTG_P1 5'- GGT CCT GCA GGG CTT G -3'

TTG_P2 5'- GGG CCT CTT GGT GGC -3'

RACE Oligonukleotide (*LMO2* spezifisch):

MR12 5'- GCC ATC GAA AGG AAG AGC C -3'

MR10 5'- ACG AAT CCG CTT GTC ACA GGC -3'

MR5 5'- GTT AAG TGG GCT TTG C -3'

MMP1_long 5'- GAG CTT CCG GCC CAG TTT GTA GTA GAG G -3'

MMP2_long 5'- CGA TGG CCT TCA GGA AAG TAG GGG TCC CCG -3'

MMP3 5'- ACG AAT CCG CTT GTC ACA GGA TGC G -3'

RACE Oligonukleotide (*Cathepsin D* spezifisch, Oligo ist homolog zu *LMO2*):

BRP4 5'- GCA GCA CCT CAT CCA CTG -3'

Oligonukleotide für die Sequenzierung:

T7-800 5'- CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG -3'

U19-800 5'- GTT TTC CCA GTC ACG ACG T -3'

EMSA Oligonukleotide:

HS_GATA_457a 5'- GAG GCA CAA GAT AAT TTC CCA GAG A -3'
HS_GATA_457b 5'- TCT CTG GGA AAT TAT CTT GTG CCT C -3'
HS_GATA_510a 5'- CTG ACA CAG ATA ACC CCT CAA GAG G -3'
HS_GATA_510b 5'- CCT CTT GAG GGG TTA TCT GTG TCA G -3'
HS_GATA_989a 5'- CAT TTC TTT GGA TTA TCT TTC ATC G -3'
HS_GATA_989b 5'- CGA TGA AAG ATA ATC CAA AGA AAT C -3'
HS_GATA_1248a 5'- GAC CAC ACT GCC AGA TAA AGA AAA A -3'
HS_GATA_1248b 5'- TTT TTC TTT ATC TGG CAG TGT GGT C -3'

Phosphothioat-Oligonukleotide:

PTO-LMO2_P1wta 5'- GAA GGC TCC GCC CTA TCA GAT AGA CAA CC -3'
PTO-LMO2_P1wtb 5'- GGT TGT CTA TCT GAT AGG GCG GAG CCT TC -3'
PTO-LMO2_P1muta 5'- GAA GGC TCC GCC CTA TTT TAT AGA CAA CC -3'
PTO-LMO2_P1mutb 5'- GGT TGT CTA TAA AAT AGG GCG GAG CCT TC -3'
PTO-LMO2_P1mut3a 5'- GAA GGC TCT AAC CTA TTT TAT AGA CAA CC -3'
PTO-LMO2_P1mut3b 5'- GGT TGT CTA TAA AAT AGG GTT AAG CCT TC -3'

2.1.13. Kits

Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad
Megaprime DNA labelling System	Amersham/Pharmacia
pT7-blue3 perfect cloning system	Novogene
PCR optimizer Kit	Invitrogen
QIAEX II Gel Extraction Kit	QIAGEN
Qiagen Plasmid Maxi Kit	QIAGEN
Qiagen Endo free Plasmid Maxi Kit	QIAGEN
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN
mRNA Purification Kit	Amersham/Pharmacia
Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing Kit	Amersham/Pharmacia
SMART RACE cDNA Amplification Kit	Clontech
Firefly Luciferase (pGL2) Kit	Promega
β -Galaktosidase Assay	Promega
Marathon-Ready cDNA	Clontech
G/C-PCR Kit	Clontech

2.1.14. Verbrauchsmaterialien

Dialyseschläuche	Roth
Objektträger	Shandon
Nylon Membran Hybond N	Amersham/Pharmacia
Nylon Membran Hybond N ⁺	Amersham/Pharmacia
Röntgenfilm Xomat AR	Kodak
Whatman 3MM	Schleicher & Schuell