

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

| | |
|--------------------------------------|-------------------|
| Analysenwaage | Sartorius |
| LightCycler® | Roche Diagnostics |
| Cleanbench Lamin Air | Heraeus |
| DNA-Sequenzautomat ABI 377 | ABI/Perkin Elmer |
| Elektrophoreseapparaturen | GIBCO BRL |
| Großschnittmikrotom ('Cryocut') | Leica |
| Hybridisierungsöfen | Biometra |
| PCR Cycler 9600 und 9700 | Perkin Elmer |
| Tisch-Zentrifugen | Eppendorf |
| UV-Photometer Ultraspec 3000 | Pharmacia |
| UV-Vernetzungsgerät ('Stratalinker') | Stratagene |
| GenePulser Elektroporationsgerät | Biorad |

3.1.2 Chemikalien und Feinreagenzien

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders erwähnt, von den Firmen Merck, Serva, Sigma und Difco in analytischer Qualität bezogen. Die radioaktiv markierten Nukleotide lieferte die Firma Amersham.

Feinchemikalien

| | | |
|--|---|-----------------------|
| CDP Star™ | DIG-Markierung | Roche Diagnostics |
| DIG Easy Hyb | DIG-Markierung | Roche Diagnostics |
| DIG Wash and Block Puffer Set | DIG-Markierung | Roche Diagnostics |
| DNA Molecular Weight Marker II, Dig-labelled | DIG-Markierung | Roche Diagnostics |
| GeneAmp® dNTP Mix | PCR/ RT-PCR | PE Applied Biosystems |
| GeneScan 500 ROX-Standard | Größenstandard für ABI 377 Sequenzer | PE Applied Biosystems |
| Hygromycin B | Antibiotika | Gibco BRL |
| Puromycin | Antibiotika | Gibco BRL |
| Ampicillin | Antibiotika | Gibco BRL |
| Geneticin (G418) | Antibiotika | Gibco BRL |
| RNAzol™ B | RNA-Isolierung | WAK Chemie |
| Nylonmembran | Hybridisierung | Amersham |
| Whatman 3MM Papier | Hybridisierung | Roth |
| Tfx™-10, -20, -50 Transfektionsreagenzien | Transfektion | Promega |

3.1.3 Enzyme, Primer und Vektoren

Enzyme

| | |
|--|-----------------------|
| Ampli Taq [®] DNA-Polymerase und Puffer | PE Applied Biosystems |
| Klenow DNA Polymerase | Promega |
| MMLV Reverse Transkriptase (RNase H ⁻) | Gibco BRL |
| Restriktionsendonukleasen und Puffer | MBI Fermentas |
| Rnase freie DNase | Amersham |
| T4 DANN Ligase | Gibco BRL |
| T4 Polynukleotid Kinase | Gibco BRL |

Primer und Oligonukleotide

| | | |
|-----------------|---|--------------|
| Cx-Primer | 5' Fam-CCC TTA CCC TTA CCC TTA CCC TTA 3' | Perkin Elmer |
| TS-Primer | 5' AAT CCG TCG AGC AGA GTT 3' | Perkin Elmer |
| mt mTERT up | 5' TTT TGT TGC TGC CTT TCT 3' | TIBMOLBIOL |
| wt mTERT up | 5' TTT TGT TGA TGA CTT TCT 3' | TIBMOLBIOL |
| MTERT low | 5' TCT GGG CAT AAC CTG AGT 3' | TIBMOLBIOL |
| MTERT endo up | 5' CAG ACA TTT CCT TTA CTC 3' | TIBMOLBIOL |
| MTERT endo low | 5' ACC ATA TAC CTG CCA GGG 3' | TIBMOLBIOL |
| TRF-Sonde | 5' TTAAGGG TTAAGGG TTAGGG 3' | TIBMOLBIOL |
| MTR-U24 | 5' ACC CCA TAA ATT CCA GCT CCC GCC G 3' | TIBMOLBIOL |
| MTR-L413 | 5' TGG ACT CGA CAC CCT TCA CGT GGT 3' | TIBMOLBIOL |
| Beta-Aktin-U144 | 5' GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA 3' | TIBMOLBIOL |
| Beta-Aktin-L660 | 5' CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC 3' | TIBMOLBIOL |
| Sonde aus PNA | 5' Cy3-TTAAGGG TTAAGGG TTAGGG 3' | EUROGENTEC |

Vektoren

| | |
|--------------------|--------------------------------------|
| PBABE lacZ | Von M. Blasco zur Verfügung gestellt |
| PBABE puro | Von M. Blasco zur Verfügung gestellt |
| pBlueskript SK | Gibco BRL |
| PCDNA 2 | Invitrogen |
| PCRII | Invitrogen |
| PCR [™] 3 | Invitrogen |

3.1.4 Bakterien

| | |
|--|-----------|
| Subcloning Efficiency DH α [™] Competent cells | Gibco BRL |
|--|-----------|

3.1.5 Kits

| | | |
|---|--|--|
| Cell Proliferation ELISA BrdU (colorimetric) | Proliferationsmessungen | Roche Diagnostics |
| DC Protein Assay | Proteinbestimmung | BioRad |
| DIG Oligonukleotide 3'-End Labeling Kit | DIG-Markierung | Roche Diagnostics |
| DNA Isolationskit | DNA-Isolierung | Quiagen |
| GENECLEAN II® Kit | Isolierung von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel | Bio 101 |
| HTERT RT-PCR ELISA | | Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Roche Diagnostics |
| hTR RT-PCR ELISA | | Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Roche Diagnostics |
| <i>in vitro</i> Mutagenesis System | Mutagenese | Amersham Pharmacia |
| LightCycler – RNA Amplification Kit SybrGreen I | | Roche Diagnostics |
| LightCycler Telo TAGGG hTERT Quantification Kit | | Roche Diagnostics |
| LightCycler Telo TAGGG hTR Quantification Kit | | Roche Diagnostics |
| QIAEX II | DNA-Isolierung von Fragmenten | Quiagen |
| SUPERSCRIPT Preamplification System | Reverse Transkription | Gibco BRL |
| TA Cloning® Kit Version 1.0 | Klonierung | Invitrogen |
| Telomerase PCR ELISA | | Roche Diagnostics |

3.1.6 Zelllinien, Medien und Zellkultur

Für die Experimente wurden verschieden humane Nierenkarzinomzelllinien A 498, A 407, ACHN, Caki-1, Caki-2, SN12L1 (ATCC-Zellkatalog) und die murine Nierenkarzinomzelllinie RENCA (Murphy & Hrushesky, 1973) verwendet.

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte als Monolayer-Kulturen in 75 cm³ Zellkulturflaschen (Nunc, Roskilde, Dänemark) bei 37°C und 5 % CO₂. Als Kulturmedium für die humanen

Nierenkarzinomzellen wurde Minimum Essential Medium Eagle (MEM) mit 10 % fötalem Kälberserum, 2 % L-Glutamin, 7,5 % Natriumbikarbonat und 1 % Penicillin-Streptomycin verwendet (Gibco BRL). Die RENCA-Zelllinie und ihre Subzelllinien wurden in DMEM Medium (Dulbeccos Minimum Eagles Medium) mit 10 % fötalem Kälberserum, 1 % Penicillin-Streptomycin, 2 % Glutamin und 5 % Natriumpyruvat kultiviert (Gibco BRL).

Die Zellen wurden bei Erreichen der Konfluenz (ein- bis zweimal pro Woche) mit Trypsin-EDTA (0.05 % /0.02 % (w/v)) abgelöst und in einer Ausgangskonzentration von ca. $2 \cdot 10^4$ Zellen je ml passagiert.

3.1.7 Gewebeproben

Die Gewebeproben der Niere wurden aus Operationspräparaten der Urologischen Klinik des Universitätsklinikums Benjamin Franklin der Freien Universität direkt nach Tumornephrektomie entnommen und sofort im urologischen Labor weiterverarbeitet. Die histologische Verifikation des Untersuchungsmaterials erfolgte durch das Institut für Pathologie nach der TNM-Klassifikation. Die normalen Nierengewebe wurden ebenfalls aus den tumorbefallenen Nieren entnommen, jedoch in möglichst weitem Abstand vom Tumor.