

## 3. Material

### 3.I. Reagenzien und Chemikalien

Acrylamid (30%)/Bisacrylamid (0,8%)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agar Noble	Difco Laboratories, USA
Agarose	Roth
Ammonium Persulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ampicillin	Sigma-Aldrich
$\beta$ -Mercaptoethanol, 50 mM steril	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenol Blau	Sigma-Aldrich
„bovine serum albumine“ (BSA)	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid	Roth
Chloroform	Merck, Darmstadt, Deutschland
Chloroquin	Sigma-Aldrich
Coomassie Brilliant Blue G250	Merck
Diethylpirocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich
Dithiotreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck
Essigsäure	Roth
Ethanol, 99%	Merck
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
5-Fluoruracil	GRY-Pharma, Kirchzarten, Deutschland
Formaldehyd, 37%	Roth
Giemsa-Färbelösung	Sigma-Aldrich
Glycerol	Roth
Glycin	Roth
$H^3$ -Thymidin, 1mCi/ml	Amersham, Buckinghamshire, Großbritannien
Igepal	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Roth
$\gamma$ /HindIII-Marker	Sigma-Aldrich
Lennox L Broth Base	Gibco/Invitrogen
Magnesiumchlorid (für PCR)	Bioline, Luckenwalde, Deutschland
May-Grünwald Färbelösung	Sigma-Aldrich

Natriumazid	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid	Roth
Natriumcitrat	Roth
Natriumdesoxycholat	Roth
Natriumhydrogenphosphat	Roth
Natriumhydroxid	Roth
Nonidet P-40 (NP-40)	Sigma-Aldrich
Phosphorsäure	Roth
Polybren	Sigma-Aldrich
Ponceau S	Merck
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich
Protase-Inhibitoren (Phenylmethylsulfonyl Fluorid, Leupeptin, Aprotinin, Pepstatin)	Roche, Mannheim, Deutschland
„sodium dodecyl sulphate“ (SDS)	Sigma-Aldrich
Tetra-methyl-ethylenediamine (TEMED)	Gibco/Invitrogen
Tris Base	Sigma-Aldrich
Tris-hydroxymethyl-aminomethan (Tris)	Roth
Trypanblau	Sigma-Aldrich
Tween 20	Roth
Xylencyanol	Sigma-Aldrich
2-Butanol	Roth

## 3.II. Lösungen und Puffer

Soweit nicht anders angegeben, wurde de-ionisiertes H<sub>2</sub>O (Millipore-H<sub>2</sub>O) als Lösungsmittel verwendet.

Blockierungslösung	5% Milchpulver in TBS, 0,1% Tween 20
Bradford-Lösung	100 mg Coomassie G250, 95 ml 95% Ethanol, 100 ml 85% Phosphorsäure, in 1 l H <sub>2</sub> O, vor der Benutzung filtrieren
DEPC-H <sub>2</sub> O	1 ml DEPC in 1 l H <sub>2</sub> O lösen, über Nacht inkubieren, autoklavieren oder MBI Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland

### 3. Material

---

dNTP-Mix, 10 mM	MBI Fermentas
FACS-Puffer	2% FCS, 2 mM EDTA, 0,1% NaN <sub>3</sub> in PBS
HANK´s balanced salt solution	Gibco/Invitrogen
HEBS-Puffer, 2x	50 mM HEPES, 280 mM NaCl, 1,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 7,05
HEPES	Cambrex, Verviers, Belgien
Ladepuffer (DNA), 10x	0,4% Xylencyanol, 50% Glycerol, 0,1 M EDTA
Laufpuffer (für SDS-PAGE)	25 mM Tris, 250 mM Glycin pH 8,3, 0,1% SDS
Natriumcitrat, 0,1 M in 10% Ethanol	29,41 g Natriumcitrat, 104 ml 96% Ethanol, auf 1 l auffüllen
PBS	PAA Laboratories, Pasching, Deutschland
PI-Färbepuffer	0,05 mg/ml Propidiumiodid, 0,6% NP-40 in PBS; 1:1 mit 1 mg/ml RNase A (in PBS) vermischt
Ponceau-Lösung	0,1% Ponceau in 5% Essigsäure
Puffer für Restriktionsenzyme, 10x	MBI Fermentas
RIPA-Puffer (“ristocetin-induced platelet aggregation –buffer”)	50 mM Tris/HCl pH 7,4, 50 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% Igepal, 0,1% SDS, 0,25% Natrium- Desoxycholat
Sammelgelpuffer, 4x (für SDS-PAGE)	0,5 M Tris/HCl pH 6,8, 0,4% SDS
SDS-Ladepuffer, 4x	0,2 M Tris/HCl pH 6,8, 8% SDS, 40% Glycerol, 0,004% Bromphenol Blau, 0,1 M DTT
TAE-Puffer, 50x	2 M Tris, 57% Essigsäure, 100 mM EDTA, pH 8,0
Taq-Polymerase-Puffer B, 10x	Roboklon, Berlin, Deutschland
Taq-Polymerase-Puffer ohne MgCl <sub>2</sub> , 10x	Bioline
„tris buffered saline” (TBS), 10x	0,5 M Tris Base, 9% NaCl pH 7,6
TBS-T	1x TBS, 0,1% Tween 20
Transfer-Puffer, 5x (für Western Blot)	200 mM Glycin, 250 mM Tris, 0,185% SDS pH 8,3
Trenngelpuffer, 4x (für SDS-PAGE)	1,5 M Tris/HCl pH 8,8, 0,4% SDS

### 3.III. Medien

#### 3.III.1. Zellkultur

##### Grundkomponenten, Zusätze und Zytokine:

BD PharmLyse <sup>®</sup> Lyse Puffer, 10x	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
„fetal calf serum“ (FCS) (30 Minuten, 56°C hitzeinaktiviert)	Biochrom, Berlin, Deutschland
HEPES, 1 M	Cambrex, Verviers, Belgien
„horse serum“ (HS) (30 Minuten, 56°C hitzeinaktiviert)	Biochrom
humanes G-CSF („granulocyte-colony stimulating factor“)	Peprtech, NY, USA
humanes TPO (Thrombopoetin)	Peprtech
IMDM	PAA Laboratories
MethoCult M3134	Stem Cell Technologies, USA
murines GM-CSF („granulocyte/monocyte-colony stimulating factor“)	Peprtech
muriner Flt3 Ligand	Peprtech
murines SCF („stem cell factor“)	Peprtech
Natrium Pyruvat, 100 mM	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
L-Glutamin, 200 mM	Cambrex
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Gibco/Invitrogen
ratten IL-3 (Interleukin 3)	Peprtech
Retronektin <sup>®</sup>	Takara Bio Europe, St. Germain-en-Laye, Frankreich
Trypsin-EDTA, 1x	PAA Laboratories
Zelldissoziations-Puffer, 1x	Gibco/Invitrogen

##### Zellspezifische Medien:

NIH3T3 Medium	500 ml DMEM, 10% FCS, 2 mM Glutamin 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
Makrophagen-Medium	500 ml DMEM, 10% FCS, 5% HS, 2 mM Glutamin, 1 mM Natrium Pyruvat, 0,05 mM $\beta$ -Mercaptoethanol,

Methylcellulose-Medium	100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 20% konditioniertes Medium von L292 Zellen MethoCult M3134, 30% FCS, 2 mM Glutamin, 0,1 mM β-Mercaptoethanol, 2% Pen/Strep in IMDM
Phoenix-Medium	500 ml DMEM, 10% FCS, 2 mM Glutamin 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin pH 7,9 mit 1M NaOH einstellen, 10 ml 1M HEPES hinzugeben, steril filtrieren
Reduktions-Medium	IMDM, 1% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin
Zytokinmedium, 1x	IMDM, 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, Zytokine: 50 ng/ml rSCF, 100 ng/ml hTPO, 100 ng/ml hFlt3-L, 100 ng/ml hG-CSF

#### 3.III.2. Bakterienkultur

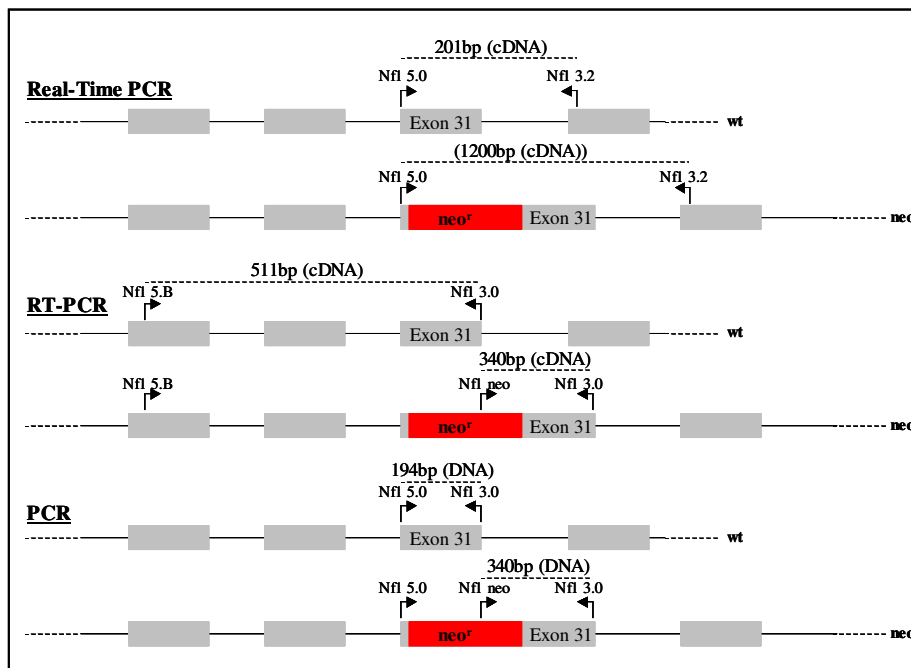
LB-Agar	2% Lennox L Broth Base, 0,5% NaCl, 1,5% Agar
LB-Medium	2% Lennox L Broth Base, 0,5% NaCl

#### 3.IV. Enzyme

„calf intestine alkaline phosphatase“ (CIAP)	MBI Fermentas
EcoRI	MBI Fermentas
RNAse A	Roche
Taq-Polymerase	MBI Fermentas
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas

### 3.V. Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Biotex (Berlin, Deutschland) synthetisiert.



**Abbildung 5: Lage der Nfi-Primer.** Real-Time PCR: Ergibt ein 201bp-Fragment für das *Nfi* WT-Transkript. Das *Nfi Neo*-Transkript ist mit einer Größe von 1200bp zu groß für eine Amplifikation unter den unter 4.I.2.4. genannten Bedingungen. RT-PCR: Ergibt ein 511bp-Fragment für das *Nfi* WT-Transkript und ein 340bp-Fragment für das *Nfi Neo*-Transkript. PCR: Ergibt ein 194bp-Fragment für das *Nfi* WT-Allel und ein 340bp-Fragment für das *Nfi Neo*-Allel. wt: *Nfi*-WT-Lokus, neo: *Nfi*-Lokus mit Insertion des Neomycinresistenz(*neo<sup>r</sup>*)-Gens in Exon 31. Darstellung nicht massstabsgetreu.

#### 3.V.1. Primer für die Real-Time PCR

Nfi 5.0                    5'-gta ttg aat tga agc acc ttt gtt tgg-3'

Nfi13.2                   5'-tcg cac tgg tct tga tga aa-3'            (Abbildung 5)

GAPDH up 200bp        5'-ctg acg tgc cgc ctg gag aaa c-3'

GAPDH low 200bp      5'-ccc ggc atc gaa ggt gga aga g-3'

#### 3.V.2. Primer für die RT-PCR

Nfi 5.B                    5'-gct gtc aca acc tga ctc ca-3'

Nfi 3.0                    5'-ctg ccc aag gct ccc cca g-3'

Nfi neo                    5'-gcg tgt tgc aat tgc cca atg-3'            (Abbildung 5)

GAPDH up                5'-ggg gtg agg ccg gtg ctg agt at -3'

GAPDH low              5'-cat tgg ggg tag gaa cac gga agg-3'

Actin 5.0            5'-tgg aat cct gtg gca tcc atg aaa c-3'

Actin 3.0            5'-taa aac gca gct cag taa cag tcc g-3'

#### 3.V.3. Primer für die PCR

Nf1 5.0            5'-gta ttg aat tga agc acc ttt gtt tgg-3'

Nf1 3.0            5'-ctg ccc aag gct ccc cca g-3'

Nf1 neo            5'-gcg tgt tcg aat tcg cca atg-3'        (Abbildung 5)

#### 3.V.4. Primer zur Sequenzierung des *BCL-2Mieg3* Plasmides

Mieg3 5.0            5'-ttg aac ctc ctc gtt cga cc-3'

Mieg3 3.0            5'-aca ccg gcc tta ttc caa gc-3'

## 3.VI. Antikörper

### 3.VI.1. Western Blot

Bcl-2, sc-509    Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland

goat anti-mouse, sc-2096                                Santa Cruz

(HRP/"horseradish peroxidase" gekoppelt)

### 3.VI.2. Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS)/Durchflusszytometrie

Antigen	Fluorchrom	Hersteller
B220	APC, FITC	BD Biosciences, San Diego, USA
CD4	FITC	BD Biosciences
CD5	biotin	BD Biosciences
CD8	PE	BD Biosciences
CD11b	APC	BD Biosciences
CD11c	FITC	BD Biosciences
CD16/32	PE	BD Biosciences
CD25	biotin	BD Biosciences
CD31	biotin	BD Biosciences
CD34	FITC	BD Biosciences
ckit	APC	BD Biosciences
Flt3	PE	BD Biosciences
F4/80	PE, FITC	Serotec, Düsseldorf, Deutschland
GR-1	PE	BD Biosciences
IL7R $\alpha$	biotin	BD Biosciences
Sca1	FITC, biotin	BD Biosciences

Zur Detektion biotin-gekoppelter Antikörper wurde Streptavidin (PE, APC, FITC, PE-Cy5) von BD Biosciences eingesetzt.

### 3.VII. Zelllinien

NIH3T3	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig Deutschland
Phoenix-gp	Dr. Carol Stocking, HPI für Experimentelle Virologie und Immunologie, Universität Hamburg, Deutschland

### 3.VIII. Bakterien

Escherichia coli, Stamm DH5 $\alpha$	Stratagene, La Jolla, USA
--------------------------------------	---------------------------

### 3.IX. Mäuse

Die *Icsbp* C57/Bl6 Mäuse (-/- und +/+) wurden generiert wie publiziert (Holtschke et al., 1996).

*IcsbpNf1* Mäuse wurden durch Kreuzung der *Icsbp* C57/Bl6 mit *Nf1* +/- (129/sv x C57/Bl6 Hintergrund) Mäusen (Jacks et al., 1994) erzeugt.

Die Mäuse wurden bei standardisierten, pathogen-freien Bedingungen gehalten.

### 3.X. Plasmide

<i>BCL-2</i> pBabe-puro	Ulf Rapp, Institut für Medizinisches Strahlenkunde und Zellforschung der Universität Würzburg, Deutschland
<i>BCL-2</i> Mieg3	Arbeitsgruppe: Dirk Carstanjen, FMP Berlin, Deutschland
K73 Hüllenplasmid	Dr. Carol Stocking
Mieg3	Dr. David Williams, Cincinnati, USA
M57 gag-pol Plasmid	Dr. Carol Stocking



### 3.XI. Kits

BD Mouse Lineage Panel (für MACS)	Becton Dickinson GmbH
mit Streptavidin-Microbeads (für MACS)	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
ECL <sup>®</sup> Western Blotting Detection Reagent	Santa Cruz
LightCycler FastStart DNA Master <sup>Plus</sup>	
SYBR Green 1 Kit	Roche Diagnostics
PeqGOLD <sup>®</sup> Tissue DNA Mini Kit	Peqlab, Erlangen, Deutschland
PeqGOLD <sup>®</sup> Trifast	Peqlab
PeqGOLD <sup>®</sup> Total RNA Kit	Peqlab
QIAexII <sup>®</sup> Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAGEN <sup>®</sup> Plasmid Maxi Kit	Qiagen
RevertAid <sup>®</sup> H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	MBI Fermentas

### 3.XII. Analyseprogramme

CellQuest Pro (für FACS)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
EasyWin32	Herolab, Wiesloch, Deutschland
Image Reader LAS-3000	Fujifilm, Düsseldorf, Deutschland
LightCycler <sup>®</sup> Software	Roche Diagnostics
SeqMan DNA Star	DNA Star, Konstanz, Deutschland
Wallac Software	Wallac/PerkinElmer, Mailand, Italien

### 3.XIII. Geräte

Automatisches Zellzählgerät CASY	Scharfe System, Reutlingen, Deutschland
Automatisches Blutzählgerät ABC	SCIL GmbH, Viernheim, Deutschland
Beheizbarer Schüttler	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Elektrophoresekammern	BioRad, München, Deutschland
FACS Gerät: FACSCalibur	Becton Dickinson GmbH
Gel-Foto Apparatur, DNA	Herolab
Horizontale Gelkammern (für SDS-PAGE)	BioRad
Image Reader <sup>®</sup>	Fujifilm
Inverses Mikroskop	LEICA, Solms, Deutschland

### 3. Material

---

Light Cycler® System	Roche Diagnostics
MasterCycler® Gradient	Eppendorf
Mini Gel System (für SDS-PAGE)	Hoefer, San Francisco, USA
Photometer	Eppendorf
Präzisionswaage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Stereomikroskop	LEICA
Sterilbank	Heraeus, Hanau, Deutschland
Szintillations- und Lumineszenz Counter	Wallac/PerkinElmer
TransBlot SD	BioRad
Wallac Saug- und Spülgerät	Wallac/PerkinElmer
Zell-Inkubator	Heraeus
Zentrifugen	Eppendorf
	Heraeus
	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
	Thermo Shandon, Frankfurt, Deutschland