

2 Material

2.1 Bakterien

***E. coli* DH5 α** (Vieira und Messing, 1982):

F⁻, *endA1*, *hsdR17*, (*rK*⁻, *mK*⁺), *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, $\Delta(\textit{argF-lacZya})$ U169, *f80dlacZ* Δ M15, λ -

***E. coli* XL1-Blue** (Bullock *et al.*, 1987):

$\Delta(\textit{mcrA})$ 183 $\Delta(\textit{mcrCB-hsdSMR-mrr})$ 173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac* [F' *proAB lacI* Δ Z Δ M15 Tn10 (Tet^r)]

***E. coli* TOP10F'** (Invitrogen):

F'^{*lacI* Δ Tet^R}, *mcrA*, $\Delta(\textit{mrr-hsdRMS-}, \textit{mcrBC})$, Φ 80*lacZ* Δ M15, Δ *lacX74deoR*, *recA1*, *araD139*, $\Delta(\textit{ara-leu})$ 7697, *galU*, *galK*, *rpsL*, *endA1*, *nupG*

***E. coli* M15[pREP4]** (Qiagen):

Nal^S, Str^S, Rif^S, Lac⁻, Ara⁻, Gal⁻, Mtl⁻, F⁻, RecA⁺, Uvr⁺, Lon⁺

***E. coli* SG13009[pREP4]** (Gottesman *et al.*, 1981):

Nal^S, Str^S, Rif^S, Lac⁻, Ara⁻, Gal⁻, Mtl⁻, F⁻, RecA⁺, Uvr⁺, Lon⁺

***E. coli* JM109:**

recA1, *endA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, $\Delta[\textit{lac-proAB}]$, [F⁻, *traD36*, *proAB*, *lacI* Δ Z Δ M15]

2.2 Vektoren genomischer DNA-Banken

λ FIXTMII (Stratagene): Die genomische Phagenbank des 129/SV-Mausgenoms wurde von Dr. Anita Mattis zur Verfügung gestellt.

pBeloBACII (Genome Systems): Der genomische Klon „BACM-155k2“ aus der murinen

129/SV-DNA-Bank wurde von Genome Systems zur Verfügung gestellt.

pADsacB11-Vektor in P1-VIR-Phagen (Genome Systems): Die genomischen Klone „89“ (DMPC HFF#1:86) und „90“ (DMPC HFF#1:303) aus der murinen 129/OLA-DNA-Bank wurden von Genome Systems zur Verfügung gestellt und enthalten die murine genomische *edg6*-Region.

2.3 Plasmide

Invitrogen:

pZErO-2:

f1 ori, *ColE1 ori*, *lacZ α* , *ccdB* (letales Gen), multiple Klonierungsstelle mit flankierenden Sp6- und T7-Promotoren, Kanamycinresistenz, Größe: 3,3 kb

pRC/CMV:

f1 ori, *ColE1 ori*, *PSV40 ori*, Enhancer-Promotor-Sequenz des humanen Cytomegalovirus (CMV), Polyadenylierungssignal und Transkriptions-Terminations-Sequenzen des bovinen Wachstumshormons (BGH), multiple Klonierungsstelle mit flankierenden Sp6- und T7-Promotoren, Ampicillin- und Neomycinresistenz, Größe: 5,5 kb

pcDNA3.1(+):

f1 ori, *ColE1 ori*, *PSV40 ori*, Enhancer-Promotor-Sequenz des humanen Cytomegalovirus (CMV), Polyadenylierungssignal und Transkriptions-Terminations-Sequenzen des bovinen Wachstumshormons (BGH), multiple Klonierungsstelle mit flankierenden T7- und BGH-Promotoren, Ampicillin- und Neomycinresistenz, Größe: 5,4 kb

pZeoSV2(+):

f1 ori, *ColE1 ori*, *PCMV*, *PEM*, *PSV40*, Polyadenylierungssignal und Transkriptions-Terminations-Sequenzen des bovinen Wachstumshormons (BGH), multiple Klonierungsstelle mit flankierenden T7- und BGH-Promotoren, Zeocinresistenz, Größe: 3,5 kb

Pharmacia Biotech:

pGEX-2T:

pBR322 ori, *lacI q Z* (für Induktion der Proteinbiosynthese), *Sj26*, multiple Klonierungsstelle, Ampicillinresistenz, Größe: 3,3 kb

Promega:

pGEM-7Zf(+):

f1 ori, *ColE1 ori*, *lacZ* (für Blau-Weiß-Selektion), multiple Klonierungsstelle mit flankierenden Sp6- und T7-Promotoren, Ampicillinresistenz, Größe: 3,0 kb

Qiagen:**pQE60:**

ColE1 *ori*, T5 Promotor, 2 *lac* Operatorsequenzen, RBS II, 6x His, multiple Klonierungsstelle, Ampicillinresistenz, Größe: 3,4 kb

Stratagene GmbH:**pBluescript II KS(+):**

f1 (-) *ori*, ColE1 *ori*, *lacI* (nicht funktionell), *lacZ* (für Blau-Weiß-Selektion), multiple Klonierungsstelle mit flankierenden T3- und T7-Promotoren, Ampicillinresistenz, Größe: 3,0 kb

pMC1neoPolyA:

Neomycin mit Polyadenylierungssignalsequenz unter Kontrolle des TK Promotors, Ampicillinresistenz, Größe: 3,8 kb

AG Dr. Carmen Birchmeier, MDC-Berlin:

humane Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH, EMBL-Datenbankeintrag M33197, bp 590-1037), mit *EcoRI* in den Vektor PCR^{II} (Clontech) kloniert, Ampicillinresistenz

AG Dr. Yi Zheng, University of Tennessee:

Wildtyp-RhoA und dominant negatives N19-RhoA-Konstrukt im pcDNA3.1-Vektor

Gerd Müller:

C-terminal *myc*-Epitop-markierter humaner Interleukin-8-Rezeptor A im pRC/CMV-Vektor

2.4 RNA und DNA

Es wurden RNA Extraktionen aus folgenden peripheren Zellen und Zelllinien zur Verfügung gestellt: HEp2, cl32: Dr. Günter Bernhardt; BL64, CEM, DG75, U937: Dr. Ralf Burgstahler; 80/1, 18BE10: AG Dr. Martin Zenke, MDC-Berlin; HUVEC: Philipp Reiterer.

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
BL64	humane Burkitt-Lymphom-Linie	(Hartl und Lipp, 1987)
CEM	humane lymphoblastoide T-Zelllinie	(ATCC CCL-119)
HEp2	humane Kehlkopf-Karzinom-Zelllinie	
cl32	humane Kehlkopf-Karzinom-Zelllinie (HEp2-Subklon)	
DG75	humane Burkitt-Lymphom-Linie	
U937	humane Monozyten-Zelllinie	(ATCC CRL-1593)
80/1	murine fötale dendritische Zelllinie aus der Haut	(Elbe <i>et al.</i> , 1994)
18BE10	murine fötale dendritische Zelllinie aus der Haut	(Elbe <i>et al.</i> , 1994)
HUVEC	humane Venenendothelzellen	

Von der humanen Kehlkopf-Karzinom-Zelllinie HEP2 wurde ebenfalls eine Gesamt-DNA Extraktion von Dr. Günter Bernhardt verwendet. RNA aus primären murinen Geweben wurde von Dr. Ralf Burgstahler zur Verfügung gestellt.

2.5 Zellen

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
CHO-K1	Hamster-Ovarien-Zelllinie	(ATCC CCL-61)
HEK293	humane embryonale Nierenzelllinie	(ATCC CRL-1573)
HeLa	humane Cervix-Karzinom-Zelllinie	(ATCC CCL-2)
Jurkat	humane Leukämie-T-Zelllinie	(ATCC TIB-152)
J774A.1	murine Makrophagenzelllinie	(ATCC TIB-67)
RBL	Ratten-Basophilen-Leukämie-Zelllinie	(ATCC CRL-1378)
80/1	murine fötale dendritische Zelllinie aus der Haut	(Elbe <i>et al.</i> , 1994)
18BE10	murine fötale dendritische Zelllinie aus der Haut	(Elbe <i>et al.</i> , 1994)

Primäre Zellen:

Embryonale Fibroblastenzellen (EMFI), zur Verfügung gestellt von Dr. Veniamin Pevzner, Milzlymphozyten aus Balb/c-Mäusen, embryonale Stammzellen E14 aus 129/OLA-Mäusen (Handyside *et al.*, 1989)

2.6 Mäuse

Balb/c-Mäuse wurden vom Tierhaus des Max-Delbrück-Centrums Berlin, 129/OLA-Mäuse von der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilian-Universität München zur Verfügung gestellt.

2.7 Oligonukleotide

Für die Sequenzierung nach dem zyklischen Thermo-Sequenase Verfahren mittels fluoreszenzmarkierter Primer wurden folgende Oligonukleotide der Firma **MWG-Biotech**, verwendet:

5'-IRD800 und IRD700 fluoreszenzmarkierter T7-Primer:

5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

5'-IRD800 und IRD700 fluoreszenzmarkierter Sp6-Primer:

5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3'

5'-IRD800 fluoreszenzmarkierter T3-Primer: 5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3'

5'-IRD700 fluoreszenzmarkierter BGH-Primer: 5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'

5'-IRD800 fluoreszenzmarkierter Gex-3': 5'-CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG-3'

5'-IRD800 fluoreszenzmarkierter Gex-5': 5'-GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG-3'

5'-IRD800 fluoreszenzmarkierter pQEfor: 5'-CCTTTCGTCTTCACCTCGAG-3'

5'-IRD700 fluoreszenzmarkierter pQErev: 5'-GTTCTGAGGTCATTACTGG-3'

Für die Polymerase-Kettenreaktionen wurden die folgenden Primer verwendet:

BioTeZ Berlin-Buch GmbH:

GSPRT: 5'-CTCACCTCGTCTGGGAGGGCCTGC-3'

GSP1: 5'-TGGGCAACTGGCTGGTCCAAGCTC-3'

GSP2: 5'-GCCTCGGGCCAGATCCTCCAGGGGTGCTGCGGACGCTGGAAA-TGCTGG-3'

3'-Primer: 5'-CCACGTCCTCCTGCCCGCCGC-3'

HinEDG: 5'-CGGAAGCTTGGAGGCCATGAACGCCACGG-3'

RückEDG: 5'-GGAGATCTTCCTCAGATATCAGCTTCTGCTCGGGC-CCAGATCCTCCAGGGATGCTCCGCACGCTGGAG-3'

hEDG6HA: 5'-CCCAAGCTTATGGGCTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTGGTGGTCCCAACGCCACGGGGACCCCGGTGGCC-3'

hHISC2: 5'-GAAGATCTCGACAGCCCCCGCAGGGCCCC-3'

hHISC1: 5'-AACGCCACGGGGACCCCGGTGGCCCC-3'

mHISC2: 5'-GAAGATCTCGACGGCCCCCTCAGCATCCC-3'

mHISC1: 5'-AACATCAGTACCTGGTCCACGCTGGTG-3'

medg6g1: 5'-GACTAAGTGCTGTGTGGAGG-3'

medg6g3: 5'-CAGCTTCCTTAGACATATCTCC-3'

3NeoPA1: 5'-CGGCTTCCATCCGAGTACGTGC-3'

3NeoPA2: 5'-GCCGCGCTGCCTCGTCCTGC-3'

hsga165: 5'-GCGGATCCGGGAGTGGCTGCAGGG-3'

hsga163: 5'-GCGGATCCTGTCCACTAGAGTGCG-3'

EDG1vh: 5'-CCCAAGCTTATGGGGCCACCAGCGTCCCG-3'

EDG1r: 5'-GCTCTAGACTAGGAAGAGTGGACGTTTCC-3'

Gibco BRL Life Technologies:

Q0: 5'-CCAGTGAGCAGGTGACG-3'

Q1: 5'-GAGGACTCGAGCTCAAGC-3'

QT: 5'-CCAGTGAGCAGAGTGACGAGGACTCGAGCTCAAGC-TTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'

Pharmacia Biotech:

Oligo(dT)-Primer: 25-30 dT

CA-Primer: 5'-CCACTTCCCGCAACGCCAGCA-3'

Eurogentec:

3'-hGSP2: 5'-CTCTTCACTGCAGGGGAGCGC-3'

2.8 Enzyme

Advanced Biotechnologies: Thermoprime Plus DNA-Polymerase

Amersham International: Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP, ECL-Kit

Boehringer Mannheim GmbH: T4 DNA-Ligase, Terminale Transferase, RNase A, DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II, RNase A, DNase I

Genomed Inc.: Jetstar Midi und Maxi Purification System

Gibco BRL Life Technologies: Random Primers DNA Labeling System, SuperScript Reverse Transkriptase, RNase H

InViTek GmbH: CombiPol DNA Polymerase Mix

E. Merck AG: Proteinase K

New England Biolabs: Restriktionsenzyme, Alkalische Phosphatase, T4 DNA-Polymerase

Pharmacia Biotech: Restriktionsenzyme, Silver Staining Kit

Promega: RNasin

Stratagene: *PfuTurbo* DNA Polymerase

2.9 Chemikalien

Becton-Dickinson: Maus-Collagen, Typ IV

Biomol Feinchemikalien GmbH: Sphingosylphosphorylcholin, Sphingosin-1-phosphat

Biochrom KG: Medien (DMEM, Iscove's MEM, RPMI-1640), fötales Kälberserum (FKS), nicht essentielle Aminosäuren

Boehringer Mannheim GmbH: X-Gal, Hefe-RNA

Calbiochem: Fura 2/AM, Moviol

Clontech Laboratories: ExpressHyb Hybridization Solution, Human Multiple Tissue Northern (MTN) Blot

DuPont: [α - 32 P] dCTP (3000 Ci/mmol)

Fluka Feinchemikalien: Bromphenolblau, Calciumdichlorid, Coomassie Brilliant Blau-R, Kaliumacetat, Kaliumchlorid, Kaliumhydroxid, Kanamycin, Magnesiumsulfat

FMC BioProducts: Long Ranger

Genetics Institute: GM-CSF (3,1 x 10⁶ U/mg), IL-4 (10⁷ U/mg), IL-2

Gibco BRL Life Technologies: Agarose, Dithiotreitol (DTT), Borsäure, KB-Marker, UltrosorG, Pertussistoxin 3'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), Agarose, Gentamycin, G418, L-Glutamin, LIF, β -Mercaptoethanol, Penicillin-Streptomycin

ICN Biomedicals Inc.: Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure) (Pipes)

Invitrogen: Zeocin

MBI Fermentas: pUC 19 DNA / Msp I (Hpa II) Marker 23, KB-Marker

E. Merck AG: Ammoniumperoxodisulfat (APS), Ampicillin, Chloroform, Dextrose, Dikaliumhydrogenphosphat-Trihydrat, Dinatriumhydrogenphosphat, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Formaldehyd, Formamid, Glucose, 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethan-sulfonsäure (HEPES), Kaliumhydrogencarbonat, Magnesiumchlorid, Maltose, Natriumacetat, N,N-Dimethylformamid, Trinatriumcitrat, Natriumdihydrogenphosphat, Natriumdodecylsulfat (SDS), N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED), Triton-X-100, Tween 20

Pharmacia Biotech: Ficoll 400

Promega: 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP), Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT), Dual-Luciferase reporter assay system

Qiagen GmbH: Ni-NTA-Agarose, *Qiaexpressionist*

C. Roth: Agar-Agar, Albumin Fraktion V (BSA), Borsäure, Chloroform, Dimethylsulfoxid (DMSO), Ethanol, Essigsäure, Ethidiumbromid, Glycerin, Glycin, Hefe-Extrakt, Isoamylalkohol, Isopropanol, Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG), Methanol, Natriumchlorid, Natriumcitrat, Rotiphorese Gel 30, Natriumhydroxid, NZ Amin (Casein Hydrolysat), Pepton aus Casein (Trypton), Phenol, Polyvinylpyrrolidon K30 (PVP), Salzsäure, 3'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

Serva: Concanavalin A (Con A)

Sigma Chemie: Trypanblau, Ampicillin, Diethylpyrocarbonat (DEPC), Digitonin, Ethidiumbromid, Glutathion, Glutathion-Agarose, Lipopolysaccharide (LPS), Lysophosphatidylsäure (LPA), Mineralöl, Paraformaldehyd, Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), Sphingosin-1-phosphat (S1P), Trypanblau

Stratagene GmbH: PathDetect *In Vivo* Signal Transduction Pathway Reporting Systems

United States Biochemical Corp.: 3-(N-Morpholino)propan-sulfonsäure (MOPS), Harnstoff

2.10 Antikörper

Alexis: Maus-anti-humanen IL-8RA

Dako A/S: Kaninchen-anti-Ratte-FITC

Jackson ImmunoResearch Laboratories: Maus-anti-Ratte-Biotin, Streptavidin-FITC, Streptavidin-PE, Ziege-anti-Ratte-Peroxidase, Maus-anti-Ratte-Cy3, Ziege-anti-Ratte-PE, Maus-anti-Ratte-Peroxidase, Maus-anti-Ratte-FITC, Gorilla-anti-Maus-PE, Ziege-anti-Maus-Peroxidase

Molecular Probes: Alexa-Fluor-488-Phalloidin

Sigma Chemie: Ziege-anti-Ratte-alkalische Phosphatase

Dr. Elisabeth Kremmer, GSF-München: Maus-anti-*myc*-Epitop 9E10, anti-Hämagglutinin-Epitop-FITC Fab-Fragmente 3F10, Ratte-anti-murinen CXCR5 2G8-2, Ratte-anti-humanen CXCR4 2B11-1-4

2.11 Geräte und sonstige Materialien

Amersham International: HyBond Nitrocellulose, Nylon und Polyvinylidendifluorid Membrane

Appligene: Vacuum Blotter

Bachofer: UV-Schirm

BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH: Reinbank

Beckman Instruments GmbH: Zentrifugen GS-6KR, J2-MC, Ultrazentrifuge Optima TLX

Becton-Dickinson: Durchflußzytometer FACScan, Zellsortierer FACS-Vantage

Bender und Hobein AG: Vortex Genie 2

Berthold: Luminat LB9507

Bio-Rad Laboratories: AG 501-X8 and Bio-Rex MSZ 501(D) Mixed Bed Resin, Pulse Controller II, Gene Pulser II, GS Gene Linker, Proteinmarker, Mini-Gelsystem Mini-Protean, Mini-Blotsystem, Bradford Protein-Test

Biotron: Biometra Trio-Thermoblock

Biozym: Pipettenspitzen

Braun: Kanülen

Buchner Laborservice: Bakterien-Schüttler

Corning Costar Corporation: Transwells

Coulter: Zellzählgerät Z1

Dynatech: ELISA-Reader MR 5000

Eastman Kodak Company: Röntgenfilme X-OMAT AR, Filmentwickler und Fixierer

Eppendorf Gerätebau: Tischzentrifuge 5417 C, Reaktionsgefäße 0,5, 1,5 und 2,0 ml, Thermomixer 5436, Elektroporationsküvetten

Fuji Foto Film Co., LTD.: Fujix Bas 2000 Phospho-Imager, Imaging Plates

Gilson Medical Electronics: Pipetman 2 μl , 20 μl , 200 μl , 1000 μl

Gaulin: French-Press Micron-Lab 40

Greiner GmbH: 1,3 ml Rörchen, Pipettenspitzen, Plastik-Reagenzröhrchen 10ml, Impfnadeln und Impfösen

Hereaus Holding: Brutschränke, Biofuge fresco, Zellkultur-Inkubatoren

IEC: MicroMax Tischzentrifuge

IKA Labortechnik: IKAMAG RCT Rührer und Heizplatte

Leica Mikroskopie und Systeme GmbH: Mikroskop Leitz DMIL, konfokales Mikroskop DM IRBE

MembraPure GmbH: Membrex 25 Sterilfilter, Bottle Filter Systems

Menzel-Gläser: Objektträger, Deckgläser

Mettler Toledo GmbH: Waage PB3002, Feinwaage AG204

Mitsubishi: Video Copy Prozessor P68E

MWG-Biotech: Gelelektrophoresekammern, Mini Oven Rollhybridisierungsöfen, Rollhybridisierungsgefäße, Touch Down PCR-Block, Li-Cor DNA-Sequencer Model 4200L

Nunc-GmbH: Cryotubes 2 ml, 96-Loch-Mikrotiterplatten, Plastikpetrischalen, sterile 10ml Rörchen, Zellkulturschalen und -flaschen

Pharmacia Biotech: Nick-Columns, Gene Quant II RNA/DNA Calculator, Power Supply EPS 600, Ultrospec 3000, Schlauchpumpe P1, MicroSpin S400HR Säulen

Recker: Falcons, Zellkulturschalen und -flaschen

C. Roth: Glaswolle

Sartorius GmbH: Minisart NML Sterilfilter

Schott: Bechergläser, Erlenmeyerkolben, Glaspipetten, Glasflaschen, sonstige Glasgeräte

Shimatzu Corp.: Spektrofluorophotometer RF-1502

Schleicher & Schuell: Nitrocellulose-Rundfilter BA-85/20, 132 mm, Porengröße 0,45 μm

Sony: Printer UP-D8800

Whatman Limited: 3 MM-Papier

