

2 Material

2.1 Geräte

2.1.1 Elektrophorese und Western Blot

- Elektrophorese-Apparatur Dual Vertikal Mini Gel (C.B.S., Del Mar, CA., USA)
- Horizontales Elektrophorese-System Multiphor II (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
- Netzgeräte:
 - Electrophoresis Power Supply EPS 3500 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
 - Power Pac 300 (Bio-Rad, München)
 - Standard Power Pack P25 (Biometra, Göttingen)
- Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, München)

2.1.2 Bakterien- und Zellkultur

- Begasungs-Brutschrank Function Line (Heraeus-Christ, Hanau)
- Branson Sonifier Ultraschall (Ultraschall & Labortechnik, Schwäbisch Gmünd)
- Brutschrank Function Line (Heraeus-Christ, Hanau)
- Lichtmikroskop Axiovert 25 (Zeiss, Oberkochen)
- Sterile Werkbank Hera Safe HS12 (Heraeus-Christ, Hanau)
- Varioklav[®] Dampfsterilisator (H+P Labortechnik, Oberschleißheim)
- Stickstofftank zur Lagerung von Zellen (Taylor-Wharton, Hollywood, USA)
- Dr. Lange Universal-Thermostat Wasserbad (Lange, Berlin)
- Warmluft-Rundschüttler HT (Infors AG, Bottmingen, CH)
- Nicool LM10 (Gefriergerät für Zellen, Air Liquide, Bussy Saint Georges, France)

2.1.3 Zentrifugen

- Kühlzentrifuge Sorvall Evolution RC Superspeed mit SS34- und GSA-Rotoren (Sorvall/ Du Pont, Bad Homburg)
- Tischzentrifuge 5417C (Eppendorf, Hamburg)
- Tischzentrifuge 5417R, gekühlt (Eppendorf, Hamburg)
- Ultrazentrifuge Optima L90K mit Ti70.1 und Ti60 Rotoren (Beckman Instruments GmbH, München)
- Vakuumzentrifuge Centrivac (Heraeus-Christ, Hanau)
- Zellzentrifuge Megafuge 2.0R, gekühlt (Heraeus-Christ, Hanau)

2.1.4 Sonstige Geräte

- ABI Prism[™] Genetic Analyzer 310 (PE Applied Biosystems, Langen)
- Film-Entwicklereinheit Optimax TR (MS Laborgeräte, Heidelberg)
- Geltrockner Model 583 (Bio-Rad, München)
- Gene Amp PCR System 2400 (PE Applied Biosystems, Langen)
- Heizblock QBT (Grant Instruments, Cambridge; UK)
- Luminometer Lumat LB 9507 (Berthold Technologies, Bad Wildbad)
- Lumineszenz-Imager LAS 1000 (Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt)
- MS1 Minishaker (IKA-Labortechnik, Staufen)
- MultiCal[®] pH526 pH Meter (WTW, Weilheim)
- Multiplate Reader SpectraMax 340PC (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)
- Phospho- und Fluoreszenz-Imager Fuji FLA-3000 (Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt)
- UV-Photometer DU640 (Beckman Instruments GmbH, München)

2.2 Reagenzien und Reaktionskits

- Acrylamid, Rotiphorese[®] GEL 30, 30 % Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid (Roth, Karlsruhe)
- Agar (Merck, Darmstadt)
- Agarose, ultra pure (GIBCO/BRL, Eggenstein)
- Ammoniumpersulfat (Sigma, München)
- Ampicillin, Natriumsalz (Roth, Karlsruhe)
- Apigenin (Sigma, München)
- Bacto-Agar (Difco, Detroit, USA)
- Bacto-Tryptone (Difco, Detroit, USA)
- Bacto-Yeast Extract (Difco, Detroit, USA)
- BCA-Protein Assay Reagent Kit (Pierce, Weiskirchen)
- Bromphenolblau (SERVA, Heidelberg)
- BSA (Sigma, München)
- CK1-7 (Medac, Hamburg)
- Complete[™]-EDTA (Roche Applied Science, Mannheim)
- Complete[™]-EDTA-free (Roche Applied Science, Mannheim)
- Coomassie[®] Brilliant blue R250 (Merck, Darmstadt)
- DNA Sequencing Kit - BigDye[™] Terminator Cycle Sequencing v2.0 Ready Reaction (PE Applied Biosystems)
- dNTP's PCR-Grade (Roche Applied Science, Mannheim)
- DTT (Sigma, München)
- Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System (Promega, Darmstadt)
- EDTA (Merck, Darmstadt)
- Ethidiumbromid (Sigma, München)
- Heparin (5000 U/ml) (Biochrom KG Seromed[®], Berlin)
- Imidazol (Merck, Darmstadt)
- IPTG (AppliChem, Darmstadt)
- Kanamycindisulfat (Merck, Darmstadt)
- 2-Mercaptoethanol (Merck, Darmstadt)
- Ninhydrin Sprühreagenz (Merck, Darmstadt)

- o-Phospho-DL-Tyrosine (Sigma, München)
- o-Phospho-DL-Serine (Sigma, München)
- o-Phospho-DL-Threonine (Sigma, München)
- N ϵ -2,4-DNP-L-Lysine (Sigma, München)
- SDS (Merck, Darmstadt)
- TEMED (Sigma, München)
- Tris (Merck, Darmstadt)
- Triton X-100 (Sigma, München)
- Tween 20 (Sigma, München)

Alle weiteren nicht aufgeführten Laborchemikalien wurden in p. A. Qualität von den Herstellern Merck (Darmstadt), Sigma (München) oder SERVA (Heidelberg) bezogen.

2.3 Verbrauchsmaterialien

- Biomax MR Imaging Film (Kodak, Stuttgart)
- Centri-Sep Säulen (Edge Biosystems/MoBiTec, Göttingen)
- Dialyseschläuche, Ausschlußgröße 10 kDa (Roth, Karlsruhe)
- Edge Gel Filtration Cartridges (Edge Biosystems/MoBiTec, Göttingen)
- Filterpapier Whatman[®] 3MM (Biometra, Göttingen)
- Gene Clean II Kit (Bio101, Heidelberg)
- Lumi-Light Western Blotting Substrate (Roche Applied Science, Mannheim)
- Micropure[®]-EZ, Centrifugal Filter Devices (Millipore, Eschborn)
- Mikrokonzentriervorrichtungen, Centricon 30 (Millipore, Eschborn)
- Nuc Trap[®] Probe Purification Columns (Stratagene, Heidelberg)
- Plasmid Midi und Maxi Präparationskit (Qiagen, Hilden)
- PolyScreen[®], PVDF Transfer Membrane, (NEN, Köln)
- Sterilfilter Minisart[®], Porengröße 0,2 μ m (Sartorius, Göttingen)

Sterile Einwegmaterialien wie Pipetten, Schraubdeckel-Röhrchen oder Platten und Schalen für die Bakterien- und Zellkultur wurden von Falcon/Becton-Dickinson (Heidelberg), Nunc (Wiesbaden) oder Greiner Labortechnik (Frickhausen) bezogen.

2.4 Materialien für die Zellkultur

- DMEM High Glucose (GIBCO/BRL, Eggenstein)
- DMSO (Serva, Heidelberg)
- FKS (Biochrom KG Seromed[®], Berlin)
- Glutamax 100× (GIBCO/BRL, Eggenstein)
- PBS Dulbecco's ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ (GIBCO/BRL, Eggenstein))
- PBS Dulbecco's mit Ca²⁺ (0,9 mM) und Mg²⁺ (0,5 mM) (GIBCO/BRL, Eggenstein)
- Penicillin/Streptomycin 100× (GIBCO/BRL, Eggenstein)
- Trypsin-EDTA (GIBCO/BRL, Eggenstein)

2.5 Zelllinien

HEK293: humane, embryonale Nierenzelllinie (adhärent, epithelial)

HT29: Zelllinie eines humanen Adenocarcinoms (adhärent, epitheloid)

Charakteristika: mutiertes APC, wenig freies β -Catenin

SW480: Zelllinie eines humanen Adenocarcinoms (adhärent, epitheloid)

Charakteristika: mutiertes APC, viel freies β -Catenin

2.6 Radionuklide

- Redivue ³²P γ ATP (spez. Aktivität > 5000 Ci/mmol; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
- Easy Tide ³²P γ GTP (spez. Aktivität > 6000 Ci/mmol; NEN, Köln)

2.7 Proteine, Peptide und ihre Konjugate

- Casein Kinase 1 Phospho-Substratpeptid (New England Biolabs, Frankfurt)
- Casein Kinase 2 Substratpeptid (New England Biolabs, Frankfurt)
- Glutathion, reduzierte Form (Sigma, München)
- Glutathion Agarose (Sigma, München)
- Protein A-Sepharose[™] CL-4B (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

2.8 Antikörper

2.8.1 Primärantikörper

Auflistung der für Western Blots (WB) und Immunpräzipitationen (IP) verwendeten Primärantikörper und ihre eingesetzten Konzentrationen bzw. Verdünnungen:

Antikörper	Antigen	Typ	WB	IP	Firma
Anti- β -Catenin (Klon: 14)	β -Catenin C-Terminus	Maus IgG ₁ , monoklonal	1:5000		Transduction Laboratories, Heidelberg
Anti- Casein Kinase 1 δ	N-19, N-terminales Peptid	Ziege IgG, polyklonal	1:500		Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti- Casein Kinase 1 ϵ (Klon: 1)	CK1 ϵ C-Terminus	Maus IgG ₁ , monoklonal	1:250		Transduction Laboratories, Heidelberg
Anti-FLAG M2	FLAG-Tag	Maus IgG ₁ , monoklonal	1:1000	3 μ g	Sigma, München
Anti-HA (Klon: 12CA5)	HA-Tag	Maus IgG _{2b} , monoklonal	1:1000	3 μ g	Chemicon Internatio- nal, Hofheim
Anti-Human Casein Kinase 2 α (Klon: 1AD9)	CK2 α	Maus IgG ₁ , monoklonal	1:500		Chemicon Internatio- nal, Hofheim
Anti-LEF292	mLEF-1 AS 1-292	Kaninchen, Serum	1:200		selbst gewonnen (Otmar Huber)
Anti-LEF-1 (Klon:13E5)	mLEF-1	Maus IgG ₁ , monoklonal	1:1000		Nano Tools, Teningen
Anti-myc (Klon: 9E10)	myc-Tag	Maus IgG ₁ , monoklonal	1:5000		gereinigt aus Hybridoma, Zellkultur ÜS (Barbara Kosel)

2.8.2 Sekundärantikörper

Die nachfolgend genannten, mit HRPO-konjugierten Antikörper der Firma Dianova (Hamburg) wurden jeweils in einer Verdünnung von 1:10.000 eingesetzt.

- Anti-Maus IgM aus der Ziege, affinitätsgereinigtes F(ab')₂ Fragment
- Anti-Kaninchen IgG (H+L) aus der Ziege, affinitätsgereinigtes F(ab')₂ Fragment
- Anti-Ziege IgG (H+L) aus dem Kaninchen, affinitätsgereinigtes F(ab')₂ Fragment

2.9 Enzyme

- Casein Kinase 1, rekombinant, 1.000.000 U/ml (New England Biolabs, Frankfurt)
- Casein Kinase 2, rekombinant, 500.000 U/ml (New England Biolabs, Frankfurt)
- alkalische Phosphatase aus dem Kälberdarm (Roche Applied Science, Mannheim)
- Pwo-DNA Polymerase (Roche Applied Science, Mannheim)
- Restriktionsenzyme (New England Biolabs, Frankfurt bzw. Roche Applied Science, Mannheim)
- T4-DNA Ligase (Promega, Darmstadt), Rapid DNA Ligation Kit (Roche Applied Science, Mannheim)
- T4-Polynukleotid Kinase (Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf)

2.10 Bakterienstämme, Vektoren, cDNAs

Bakterienstämme (kompetente Zellen):

Bakterienstamm	Genotyp
<i>E. coli</i> BL21	B F- <i>dcm ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal</i>
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>hsdS</i> , <i>gal</i> (λ clts857, <i>ind1</i> , <i>Sam7</i> , <i>nin5</i> , <i>lacUV5-T7</i> gene 1)
<i>E. coli</i> BL21 (RE4)	<i>E. coli</i> BL21 mit pREP4 transfiziert
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>supE44</i> , Δ <i>lacU169</i> (Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>
<i>E. coli</i> XL1 blue	<i>supE44</i> , <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>end A1</i> , <i>gyrA46</i> , <i>thi</i> , <i>relA1</i> , <i>lacF'</i> [<i>proAB</i> ⁺ , <i>lacI</i> ^q , <i>lacZ</i> Δ M15, Tn10 (<i>tet</i> ^r)]

Vektoren:

- pcDNA3, eukaryontischer Expressionvektor (Invitrogen, Groningen, NL)
- pCS2+/ pCS2+ myc, eukaryontische Expressionsvektoren (wurden freundlicherweise von Dr. Ralph Rupp, Max Planck Institut für Entwicklungsbiologie, Tübingen zur Verfügung gestellt)
- pCMV4-FLAG, eukaryontischer Expressionsvektor (Sigma, München)
- pGEX-4T1, Vektor zur prokaryontischen Expression von GST-Fusionsproteinen (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

cDNAs:

Prokaryontische und eukaryontische Expressionsvektoren für LEF-1 und verschiedene LEF-1 Deletionskonstrukte wurden in früheren Arbeiten hergestellt und beschrieben (Huber *et al.*, 1996).

Die cDNA für humane Casein Kinase 1 ϵ wurde mir freundlicherweise in Form des prokaryontischen Expressionsvektors pRSETB durch Dr. David Virshup (Department of Oncological Sciences and Pediatrics, Huntsman Cancer Institute, University of Utah, Salt Lake City, UT) zur Verfügung gestellt.

Eukaryontische Expressionsvektoren für HA-getaggte α' - und myc-getaggte β -Untereinheit von humaner Casein Kinase 2 wurden freundlicherweise von Dr. David Litchfield (Department of Biochemistry, Health Sciences Center, University of Western Ontario, London, Canada) zur Verfügung gestellt (Penner *et al.*, 1997; Vilk *et al.*, 1999).

Das für die Repotergen-Assays eingesetzte Reporterkonstrukt Siamois-Luciferase wurde freundlicherweise von Dr. David Kimelman (Department of Biochemistry, University of Washington, Seattle, USA) zur Verfügung gestellt (Brannon *et al.*, 1997).

2.11 Molekulargewichtsstandards für Proteine und DNA

- Bench Mark™ Prestained Protein Ladder (GIBCO/BRL, Eggenstein)
- Bench Mark™ Protein Ladder (GIBCO/BRL, Eggenstein)
- [¹⁴C] Methylated Protein Molecular Weight Markers (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
- 1kb DNA Leiter (GIBCO/BRL, Eggenstein)
- SDS-7B Molekulargewichtsstandard, vorgefärbt (Sigma, München)