

2 Material

2.1 Geräte

2.1.1 Elektrophorese- und Blotapparaturen

- Elektrophoreseapparatur Dual Vertical Mini Gel (C.B.S., Del Mar, CA, USA)
- Elektrophoreseapparatur Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, München)
- Netzgerät Power Pac 300 (Bio-Rad, München)
- Netzgerät Standard Power Pack P25 (Biometra, Göttingen)
- Netzgerät Electrophoresis Power Supply EPS 3500 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)

2.1.2 Zentrifugen

- Kühlzentrifuge Sorvall Evolution RC Superspeed mit GSA- und SS34-Rotoren (Kendro, Langenselbold)
- Tischzentrifuge 5417C (Eppendorf, Hamburg)
- Tischzentrifuge 5417R, gekühlt (Eppendorf, Hamburg)
- Ultrazentrifuge Optima L90K mit Ti60 Rotor (Beckman Instruments GmbH, München)
- Vakuumzentrifuge Centrivac (Heraeus-Christ, Hanau)
- Zellzentrifuge Megafuge 2.0R, gekühlt (Heraeus-Christ, Hanau)

2.1.3 Zell- und Bakterienkultur

- Begasungs-Brutschrank Function Line (Heraeus-Christ, Hanau)
- Brutschrank Function Line (Heraeus-Christ, Hanau)
- Dr. Lange Universal-Thermostat Wasserbad (Lange, Berlin)
- Incubator Shaker C25KC (New Brunswick Scientific Edison, SJ, USA)

- Lichtmikroskop Axiovert 25 (Zeiss, Oberkochen)
- Nicool LM10 (Gefriergerät für Zellen, Air Liquide, Bussy Saint Georges, Frankreich)
- Sterile Werkbank Hera Safe HS12 (Heraeus-Christ, Hanau)
- Stickstofftank zur Lagerung von Zellen (Taylor-Wharton, Hollywood, USA)
- Varioklav[®] Dampfsterilisator (H+P Labortechnik, Oberschleißheim)
- Warmluft-Rundschüttler HT (Infors AG, Bottmingen, CH)

2.1.4 Sonstige Geräte

- Äkta[™] Explorer Chromatographieanlage (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
- Branson Sonifier Ultraschall (Ultraschall & Labortechnik, Schwäbisch Gmünd)
- DNA-Sequenzierer ABI Prism[™] Genetic Analyzer 310 (PE Applied Biosystems, Langen)
- Film-Entwicklereinheit Optimax TR (MS Laborgeräte, Heidelberg)
- Fluoreszenz-Mikroskop Axioplan (Zeiss, Oberkochen)
- Gelrockner 583 (Bio-Rad, München)
- Gene Amp PCR-System 2400 (PE Applied Biosystems, Langen)
- Heizblock QBT (Grant Instruments, Cambridge, UK)
- HPLC HP Agilent 1100 (Agilent Technologies, Waldbronn)
- Konfokales Mikroskop LSM510 (Zeiss, Oberkochen)
- Luminometer Lumat LB 9507 (Berthold Technologies, Bad Wildbad)
- MS1 Minishaker (IKA-Labortechnik, Staufen)
- MultiCal[™] pH526 pH-Meter (WTW, Weilheim)
- Multiplate Reader SpectraMax 340PC (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)
- UV-Spektrophotometer DU640 (Beckman Instruments GmbH, München)

2.2 Verbrauchsgegenstände

2.2.1 Chemikalien

- 4', 6-Diamidino-2-Phenylindol, DAPI (Sigma, Taufkirchen)
- 2-Mercaptoethanol (Merck, Darmstadt)
- Acrylamid, Rotiphorese[®] GEL 30, 30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid (Roth, Karlsruhe)
- Adenosin-5`-diphosphat, ADP (Sigma, Taufkirchen)
- Adenosin-5`-monophosphat, AMP (Sigma, Taufkirchen)
- Adenosin-5`-monophosphoramidat, AMA (Sigma, Taufkirchen)
- Adenosin-5`-triphosphat, ATP (Sigma, Taufkirchen)
- Agar (Merck, Darmstadt)
- Agarose, ultra pure (Invitrogen, Karlsruhe)
- Ammoniumpersulfat (Sigma, Taufkirchen)
- Ampicillin, Natriumsalz (Roth, Karlsruhe)
- Bacto-Agar (Difco, Detroit, USA)
- Bacto-Tryptone (Difco, Detroit, USA)
- Bacto-Yeast Extract (Difco, Detroit, USA)
- Bromphenolblau (SERVA, Heidelberg)
- Carboanhydrase (Sigma, Taufkirchen)
- Complete[™] -EDTA (Roche Applied Science, Mannheim)
- Complete[™]-EDTA free (Roche Applied Science, Mannheim)
- Coomassie[®] Brilliant Blue R250 (Merck, Darmstadt)
- Desoxyribonukleotid-5`-triphosphate, dNTPs PCR-Grade (Roche Applied Systems, Mannheim)
- Diadenosin-5`, 5``-tetrachosphat, Ap₄A (Sigma, Taufkirchen)
- Diadenosin-5`, 5``-triphosphat, Ap₃A (Sigma, Taufkirchen)
- Dimethylsulfoxid, DMSO (Serva, Heidelberg)
- Dithiothreitol, DTT (Sigma, Taufkirchen)
- Ethidiumbromid (Sigma, Taufkirchen)
- Ethylendiamintetraessigsäure, EDTA (Merck, Darmstadt)

- Glutathion-Agarose (Sigma, Taufkirchen)
- Glutathion, reduzierte Form (Sigma, Taufkirchen)
- Harnstoff (Amersham/Pharmacia, Freiburg)
- Imidazol (Merck, Darmstadt)
- Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid, IPTG (AppliChem, Darmstadt)
- Kanamycindisulfat (Merck, Darmstadt)
- Nickel-NTA-Agarose (Qiagen, Hilden)
- N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin, TEMED (Sigma, Taufkirchen)
- ProTaq Mount Fluor (BIOCYC, Luckenwalde)
- Protein-A-Sepharose™ CL-4B (Amersham Biosciences, Freiburg)
- Sodiumdodecylsulfat, SDS (Merck, Darmstadt)
- Tris-Base (Merck, Darmstadt)
- Triton X-100 (Sigma, Taufkirchen)
- Tween 20 (Sigma, Taufkirchen)
- Ziegenserum (Sigma, Taufkirchen)

Alle nicht aufgelisteten Chemikalien (p.a.) wurden in von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Taufkirchen) bezogen.

2.2.2 Verbrauchsmaterialien

- Biomax MR Imaging Film (Kodak, Stuttgart)
- Dialyseschläuche, Viskin, Ausschlussgröße 10 kDa (Roth, Karlsruhe)
- Filterpapier Whatman® 3MM (Biometra, Göttingen)
- Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences, Freiburg)
- Lumi-Light Western Blotting Substrate (Roche Applied Science, Mannheim)
- Micropure®-EZ, Centrifugal Filter Devices (Millipore, Eschborn)
- Mikrotiterplatten, MaxiSorbU16 Module (Nunc, Wiesbaden)
- Mini-Leak™-Beads (Kem-En-Tec, Kopenhagen, Dänemark)
- Multiwell™-Zellkulturplatten, 6-well (Falcon/Becton-Dickinson, Heidelberg)
- PD10-Sephadex-Säulen (Amersham Biosciences, Freiburg)
- PolyPrep® Chromatographiesäulen (BioRad, München)

- PolyScreen[®], PVDF Transfer Membrane (NEN, Köln)
- Reversed Phase HPLC Column C-18 Nucleosil-100-3 (Macherey-Nagel, Düren)
- Sterilfilter Minisart[®], Porengröße 0,2 µM (Sartorius, Göttingen)
- Superdex[®] 75HR 10/30 Gelfiltrationssäule (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
- Ultrafree[®]-MC Zentrifugationsfilter, 5000 NMWL (Millipore, Eschborn)
- Zellschaber (Costar, Corning, NY, USA)

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

2.2.3 Zellkultivierungslösungen

- DMEM High Glucose (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)
- Fetales Kälberserum, FKS (Biochrom KG Seromed[®], Berlin)
- PBS Dulbecco's (0,9 mM Ca²⁺, 0,5 mM Mg²⁺), PBS (+/+), (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)
- PBS Dulbecco's w/o Ca²⁺/Mg²⁺, PBS (-/-), (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)
- Penicillin/Streptomycin 100x (Invitrogen, Karlsruhe)
- Trypsin-EDTA (Invitrogen, Karlsruhe)

2.2.4 Reaktionskits

- ABI PRISM[™] Big Dye Terminator Cycle Sequencing V.1.1 Reaction Kit (Applied Biosystems/Perkin Elmer, Weiterstadt)
- BCA-Protein Assay Reagent Kit (Pierce, Weiskirchen)
- β-Galactosidase Reporter Gene Assay-Kit (Roche Applied Science, Mannheim)
- Fugene[™] Reagent (Roche Applied Science, Mannheim)
- Luciferase Reporter Gene Assay (Roche Applied Science, Mannheim)

- Montage[®] PCR Kit (Millipore, Eschborn)
- NucleoSEQ[®] Kit (Macherey-Nagel, Düren)
- Plasmid DNA Purification Kit (Macherey-Nagel, Düren)
- QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden)
- QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA)
- Quick Ligation Kit (New England Biolabs, Frankfurt)

2.2.5 Molekulargewichtsstandards

- 1 kB Ladder (Invitrogen, Karlsruhe)
- Bench Mark[®] Page Ruler[™] Prestained Protein Ladder (Invitrogen, Karlsruhe)
- Bench Mark[®] Prestained Protein Ladder (Invitrogen, Karlsruhe)
- Bench Mark[®] Protein Ladder (Invitrogen, Karlsruhe)

2.3 DNA

2.3.1 Vektoren

Die Tabelle 2.1 gibt eine Übersicht über die Vektoren, die zur pro- oder eukaryotischen Expression von rekombinanten Proteinen eingesetzt wurden. Sollten Proteine hergestellt werden, die mit einem oder mehreren Fusionspartnern verknüpft waren, ist dies in der Tabelle angegeben.

Name	Fusionsprotein	Quelle
pcDNA3	ohne	Invitrogen, Karlsruhe
pcDNA3-NCFP, pcDNA3-NYFP pcDNA3-YFP	CFP, YFP (N- bzw C- terminal)	Prof. Michael Schäfer, Institut für Pharmakologie, Freie Universität Berlin (freundlicherweise zur Verfügung gestellt)
pCMV4-FLAG	FLAG-Antigen, N- bzw. C- terminal	Sigma, Taufkirchen
pCS2+	ohne	Dr. Ralph Rupp, Max-Planck- Institut für Entwicklungsbiologie, Tübingen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt)
pCS2+ myc ₆	6 x myc	Dr. Ralph Rupp, Max-Planck- Institut für Entwicklungsbiologie, Tübingen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt)
pEGFP-N3	EGFP	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
pGEX-4T1, pGEX-5X2	GST	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
pMal-p2s	MBP	New England Biolabs, Frankfurt
pQE30	6 x Histidin	Qiagen, Hilden

Tabelle 2.1: Übersicht über die verwendeten Expressionsvektoren

2.3.2 cDNA

Die cDNA für humanes Hint1 in den Vektoren pGEX-4T1, pQE30, pMal-p2s und pCMV4-FLAG wurde freundlicherweise von Dr. Jörg Weiske zur Verfügung gestellt. Die für humanes Hint2 kodierende DNA stammte von Prof. Otmar Huber als pGEX5X2-Hint2 und die entsprechende cDNA für humanes Hint3 wurde von Dr. Andrea Hämmerlein als pGEX-4T1-Hint3, pQE30-Hint3, pMal-p2s-Hint3 und pCMV4-FLAG-Hint3 kloniert.

2.3.3 Oligonukleotide und Primer

Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide und Primer (Tab. 2.2), in den Sequenzen sind Schnittstellen für Restriktionsenzyme **fett**, Transkriptionsstart (ATG)- und -stop (TGA, TAA)-sequenzen sind *kursiv* hervorgehoben (AS = Aminosäuren).

Nr.	Protein	Richtung	Schnittstelle	Sequenz
1	hHint2	forward	EcoR I	5'- GCG GAA TTC GCC ACC <i>ATG</i> GCG GCA GCC GTG GTG CTG GCT GC -3'
2	hHint2	reverse	EcoR I	5'- GCG GAA TTC GTC GAC <i>TCA</i> ACC TGG AGG CCA CTG GAG CTG CCG- 3'
3	hHint2	forward	Bgl II	5'- GCG TCT AGA TCT GAG GGC GGC TCA GGG AAG <i>ATG</i> -3'
4	hHint2	forward	EcoR I	5'- CGC GCG AAT TCC ACC <i>ATG</i> GCG GCA GCC GTG GTG CTG GCT GC -3'
5	hHint2	reverse	EcoR I	5'- GCG GAA TTC CAA CCT GGA GGC CAC TGG AG -3'
6	hHint2 AS 1-54	reverse	EcoR I	5'- CGC GAA TTC <i>TCA</i> GGT TGG GGC TGC TCC CCC AGG -3'
7	hHint2 AS 47-99	forward	EcoR I	5'- CGC GAA TTC <i>TCA</i> CCG AGG AAT GGG CTT CTT AGG -3'
8	hHint2 AS 1-99	reverse	EcoR I	5'- CGC GAA TTC <i>TCA</i> CCG AGG AAT GGG CTT CTT AGG -3'
9	hHint2 AS 92-160	forward	EcoR I	5'- GCG GAA TTC GCC ACC <i>ATG</i> ATT CCT AAG AAG CCC ATT C -3'
10	hHint2-S144A	forward	/	5'- GAT GGG AAG CTG GGT GCA CAA GCT GTG TAT CAT CTG CAC ATT CAT G -3'
11	hHint2-S144A	reverse	/	5'- CAT GAA TGT GCA GAT GAT ACA CAG CTT GTG CAC CCA GCT TCC CAT C -3'
12	hHint2-H147N	forward	/	5'- GGT GCA CAA TCT GTG TAT AAT CTG CAC ATT CAT GTA CTT GGG -3'
13	hHint2-H147N	reverse	/	5'- CCC AAG TAC ATG AAT GTG CAG ATT ATA CAC AGA TTG TGC ACC -3'
14	hHint2-H149N	forward	/	5'- CAA TCT GTG TAT CAT CTG AAC ATT CAT GTA CTT GGG GGC CGG -3'
15	hHint2-H149N	reverse	/	5'- CCG GCC CCC AAG TAC ATG AAT GTT CAG ATG ATA CAC AGA TTG -3'
16	hHint2-H151N	forward	/	5'- GTG TAT CAT CTG CAC ATT AAT GTA CTT GGG GGC CGG CAG CTC -3'
17	hHint2-H151N	reverse	/	5'- GAG CTG CCG GCC CCC AAG TAC ATT AAT GTG CAG ATG ATA CAC -3'
18	hHint3	forward	EcoR I	5'- GTG GAA TTC TAT <i>GGC</i> GGA GGA ACA GGT GAA C -3'
19	hHint3	reverse	EcoR I	5'- CGC GAA TTC <i>TCA</i> TGT TCT TAG TTT TTC AAT CAA GTG -3'
20	hHint3	forward	BamH I	5'- GCG GAT CCA GCC ACC <i>ATG</i> GCG GAG GAA CAG GTG -3'
21	hHint3	reverse	EcoR I	5'- GTG AGA ATT CTT TGT TCT TAG TTT TTC AAT CAA -3'
22	hHint3	reverse	BamH I	5'- CGC GGA TCC <i>TCA</i> TGT TCT TAG TTT TTC AAT CAA GTG -3'

Tabelle 2.2: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide und Primer

2.4 Proteine

2.4.1 Enzyme

- Alkalische Phosphatase aus dem Kälberdarm, CIP (Roche Applied Science, Mannheim)
- Pwo-DNA-Polymerase (Roche Applied Science, Mannheim)
- Quick T4-DNA-Ligase (New England BioLabs, Frankfurt)
- Restriktionsenzyme (New England Biolabs, Frankfurt bzw. Roche Applied Science, Mannheim)
- Taq-DNA-Polymerase (New England BioLabs, Frankfurt)

2.4.2 Antikörper

2.4.2.1 Primärantikörper

Tabellarische Übersicht (Tabelle 2.3) der für Immunfluoreszenzen (IF), Immunpräzipitationen (IP) und Western Blots (WB) eingesetzten Primärantikörper und Konzentrationen.

Antikörper	Antigen	Typ	IF	IP	WB	Hersteller
Anti-Hint2	Hint2	Kaninchen IgG1, polyklonal	20 µg/ml	2 µg	2 µg/ml	im Rahmen dieser Arbeit selbst gewonnen
Anti-OxPhos-Complex 4 Subunit 1 (1D6)	Mitochondrialer Proteinkomplex 4, Untereinheit 1 (1D6)	Maus IgG1, monoklonal	0,4 µg/ml	/	/	Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe
Anti-β-Actin	β-Actin	Maus IgG1, monoklonal	/	/	0,1 µg/ml	Sigma, Taufkirchen
Anti-β-Catenin (Klon: 14)	β-Catenin C-Terminus	Maus IgG1, monoklonal	1 µg/ml	/	0,2 µg/ml	Transduction Laboratories, Heidelberg
Anti-E-Cadherin (Klon: 36)	E-Cadherin, zytoplasmatische Domäne	Maus IgG1, monoklonal	2 µg/ml	/	/	Transduction Laboratories, Heidelberg
Anti-FLAG-M2	FLAG-Tag	Maus IgG1, monoklonal	/	2 µg	0,5 µg/ml	Sigma, Taufkirchen
Anti-myc (Klon: 9E10)	myc-Tag	Maus IgG1, monoklonal	/	2 µg	1,3 µg/ml	gereinigt aus Hybridoma Zellkulturüberständen (B. Kosel)
Anti-GST	GST-Tag	Kaninchen IgG1, monoklonal	/	/	0,5 µg/ml	Prof. J. Wienands, Universität Bielefeld
Anti-MBP	Maltose-bindendes Peptid	Maus IgG1, monoklonal	/	/	0,25 µg/ml	Sigma, Taufkirchen

Tabelle 2.3: Primärantikörper

2.4.2.2 Sekundärantikörper

- Meerrettich Peroxidase (horseradish peroxidase, HRPO)-konjugierte Antikörper (Dianova, Hamburg)
 - Anti-Maus IgG (H+L) aus der Ziege, affinitätsgereinigtes F(ab')₂ Fragment (0,1 µg/ml)
 - Anti-Kaninchen IgG (H+L) aus der Ziege, affinitätsgereinigtes F(ab')₂ Fragment (0,1 µg/ml)
- Fluorophor-konjugierter Antikörper (Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe):
 - Alexa Fluor™ 488 Ziege-anti-Kaninchen IgG (0,5 µg/ml)
 - Alexa Fluor™ 594 Ziege-anti-Maus IgG (0,5 µg/ml)

2.5 Zelllinien

2.5.1 Eukaryotische Zellen

HEK293: humane, embryonale Nierenzelllinie
HeLa: humane Zervixkarzinom-Zelllinie
SW480: humane kolorektale Adenokarzinom-Zelllinie

2.5.2 Prokaryotische Zellen

Stamm	Genotyp
E. coli BL21 DE3	hsdS, gal (λ clts857, ind1, Sam7, nin5, lacUV5-T7 gene 1)
E. coli BL21 RE4	B F- dcm ompT hsdS ($r_B^- m_B^-$) gal; mit pREP4 transfiziert
E. coli XL1 blue	supE44, hsdR17, recA1, end A1, gyrA96, thi, relA1, lacF ^c [proAB ⁺ , lacq, lacZ Δ M15, Tn10(tetr)]

Tabelle 2.4: Bakterienstämme