

## **5 MATERIALIEN UND METHODEN**

### **5.1 Zellkultur**

Die humanen Zell-Linien EA.hy926 (endotheliale Zellen) und KELLY (Neuroblastom) wurden mit den unten angegebenen Medien in einem Zellinkubator bei 37°C, 100 % Luftfeuchtigkeit, 95 % Sauerstoff und 5 % Kohlendioxid kultiviert. Das Medium wurde jeden zweiten bis dritten Tag gewechselt. Bei Konfluenz der adhären wachsenden Zellen wurden diese passagiert, indem sie mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA versetzt wurden. Die von der Oberfläche abgelösten Zellen wurden nach Verdünnung in dem entsprechenden Nährmedium in einem Verhältnis 1:10 wieder ausgesät.

### **5.2 ECE-1c Promotorkonstrukte**

Die Herstellung der ECE-1c Promotorkonstrukte, die sich bis zur Position -512 bzw. -586 erstrecken (Nukleotidpositionen beziehen sich auf das mutmaßliche Translationsstartkodon von ECE-1c) sowie der übrigen verwendeten Deletionsmutanten des humanen ECE-1c Promotors wurden in der Arbeitsgruppe hergestellt und sind an anderer Stelle beschrieben (Funke-Kaiser et al., 2000).

### **5.3 Gezielte Mutierung von Konsensussequenzen für die Bindung von Transkriptionsfaktoren**

Gleiches gilt für die Herstellung von ECE-1c Promotorkonstrukten mit gezielter Mutierung von Konsensussequenzen für die Bindung von E2F (-154) bzw. Sp1 (-21, -179), die an anderer Stelle beschrieben wurde (Funke-Kaiser et al., 2000; 2003b).

### **5.4 Transfektionsexperimente**

Die Zellen wurden nach Waschen mit PBS (10ml/Flasche) mit 3ml Trypsin-EDTA gelöst und in einer sog. „Neubauer-Kammer“ gezählt (50 µl Trypanblue plus 50 µl Zellsuspension).

Die entsprechende Zellzahl wurde zu entsprechender Menge Medium gegeben und auf 6-Loch-Platten aliquotiert. Die Zellen wurden in der Regel eine komplette Woche in einer großen Zellkulturflasche hochgezogen, bevor diese in die 6-Loch-Platte eingesät wurden.

Promotor/Firefly-Luciferasekonstrukte wurden in Sechs- o. Zwölflochplatten transfiziert. Dabei wurden jeweils 3 oder 1.5 µl Fugene-6 (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland) und 0.5 oder 0.25 µg Plasmid pro Loch verwendet. Die Transfektionseffizienz

wurde durch Kotransfektion von pRL-Null (Promega) bzw. pSV- $\beta$ -Galactosidase (Promega) kontrolliert. Hiervon wurde jeweils 0.25 oder 0.5  $\mu\text{g}$  pro Loch verwendet.

Pro einzeltem Loch:

- 1  $\mu\text{g}$  Plasmid. Dies sollte eine Konzentration von 0.1 bis 2.0  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  aufweisen und davon sollten 0.5  $\mu\text{g}$  von dem zu untersuchenden Luziferase-Reporterplasmid und 0.5  $\mu\text{g}$   $\beta$ -Galaktosidase-Plasmid sein. H<sub>2</sub>O ad 5  $\mu\text{l}$ .
- 3  $\mu\text{l}$  Fugene.
- Optimem-Medium ad 100  $\mu\text{l}$ .

Bei Kotransfektionen:

Bei Ansätzen mit einem Expressionsvektor wurde mehr Plasmid-DNA verwendet, also mußte auch die Fugene-Menge entsprechend erhöht werden.

Pro einzeltem Loch:

- 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Plasmid (wieder 0.5  $\mu\text{g}$  Luziferaseplasmid und 0.5  $\mu\text{g}$  Galaktosidaseplasmid). H<sub>2</sub>O ad 5  $\mu\text{l}$ .
- 4.5  $\mu\text{l}$  Fugene.
- Optimem ad 100  $\mu\text{l}$ .
- Bei Renilla-Standardisierung wird noch 2,0  $\mu\text{l}$  Renilla-R0-Plasmid hinzugefügt.

Ein Medienwechsel wurde am gleichen Tag vor der Transfektion durchgeführt. Fugene wurde mit Optimem verdünnt und tropfenweise zu den Plasmiden gegeben. Dann Inkubation für 15 Minuten.

100  $\mu\text{l}$  der Optimem-Fugen-DNA-Mischung wurden fraktioniert auf ein Well gegeben und die Platte anschließend leicht geschwenkt. Anschließend Inkubation im Brutschrank bei 37°C.

Nach 24h Medienwechsel: Altes Medium wurde abgesaugt und pro Well 2 ml Medium (auf 37°C vorgewärmt) hinzupipettiert. Die Zellen wurden 48 Stunden nach Beginn der

Transfektionsprozedur mit „Passive Lysis Buffer“ (Promega; „Dual Luciferase Assay“ nach Kotransfektion von pRL-Null) oder mit „Reporter Lysis Buffer“ (Promega; Luciferase Assay nach Kotransfektion mit dem Galactosidasevektor) geerntet (500  $\mu\text{l}$  1x „Lysis-Buffer“ pro Loch). Die Lysate wurden bei 4°C für 2 min bei 14 000 U zentrifugiert und der Überstand

abgenommen. Die Reporter-Aktivitäten wurden in einem Lumat LB 9510 (Berthold

Technologies, Bad Wildbad, Deutschland) mit „Dual Luciferase Reporter Assay“ (Promega; mit pRL-Null) oder „Galacton Light Emission Accelerator“ (Tropic, Bedford, USA) gemessen.

Hierbei wird die Promotoraktivität durch die relative Luciferaseaktivität (RLA) ausgedrückt.

Diese ist als Mittelwert der Firefly-Luciferase/Renilla-Luciferase- oder des Firefly-

Luciferase/Galactosidase-Verhältnisses jedes Konstrukts in Bezug zum leeren pGL3basic-Vektor definiert [RLA = (Firefly-Luciferase-Konstrukt / Renilla-Luciferase-pRL-Null) / (Firefly-Luciferase-pGL3basic / Renilla-Luciferase-pRL-Null)].

Die RLA-Daten repräsentieren den Durchschnitt von mindestens vier Einzel-Transfektionsexperimenten (wie in den Diagrammen angezeigt), mit Ausnahme der Transfektion der *in vitro*-methylierten Reporterplasmide -142, -240, -409 und -968 (n = 3).

### **5.5 Analyse der mRNA-Expression**

PolyA<sup>+</sup> RNA von humanem fetalem und adultem Herz wurde bei Clontech (Heidelberg, Deutschland) erworben. Nabelschnüre zur Primärkultur von humanen Endothelzellen und humanen glatten Muskelzellen aus den Nabelschnurvenen wurden erhalten aus der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe, und humanes Lungengewebe aus der Abteilung für Chirurgie, jeweils Charité, Campus Benjamin Franklin, Berlin. Lysate der humanen Keratinozytenzelllinie, HaCaT, wurden bei der Abteilung für Mund- und Kieferchirurgie, Charité, Campus Virchow, Berlin, besorgt. Die gesamte RNA wurde aus den Zellen mit dem „Rneasy-Mini-Kit“ (Qiagen) isoliert. Aus den Geweben mit dem Trizol-Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland). Die „Rnase-Protection-Assays“ für die Analyse der ECE-mRNA Expression wurden mit 10 – 40 µg Gesamt-RNA (nach DNase-Dau) oder mit 2 µg polyA<sup>+</sup> RNA von Hr. Dr. Funke-Kaiser durchgeführt (bei Funke-Kaiser H. et al., 2000 beschrieben): Die Reverse-Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) für die ECE-1c mRNA Dektektion erfolgte mit folgenden „Primern“: 5' - GGAGCTGCGCGAAGCCGGGG-3' („Sense-Primer“), und 5' - TTCGAGGAGGTGCTTGATGATTGC-3' („Antisense-Primer“).

### **5.6 Proteinextraktion**

Für die Extraktion von Kern- und zytosolischen Proteinen wurden EA.hy926-Zellen in „phosphate-buffered-saline“ (PBS) geerntet und in kaltem, hypotonem Puffer [10 mmol/l HEPES-KOH (pH 7.9), 10 mmol/l KCl, 1 mmol/l Dithiothreitol (DTT), 0.1 mmol/l EGTA, 1 x Complete (Roche Molecular Biochemicals)] resuspendiert. Nach der Zugabe von 37.5 µl/ml 10 % Igepal CA-630 (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) und dem Vortexen wurden aus dem Überstand nach Zentrifugation (10 000 g, 10 min, 4°C) die zytoplasmatischen Proteine erhalten. Der Niederschlag der nukleären Proteine wurde in hypertonem Puffer (20 mmol/l HEPES-KOH, pH 7.9, 400mmol/l NaCl, 1 mmol/l EGTA, 1 mmol/l DTT, 1 x Complete, 25 % Glycerol) resuspendiert und für 1.5 h bei 4°C unter kontinuierlichem Schütteln inkubiert. Nach der Zentrifugation (13 000 g, 4°C, 30 min.) wurde der Überstand, der die nukleären Proteine enthielt,

erhalten und die Proteinkonzentrationen wurden mittels „DC-Protein-Assay“ (Bio-Rad, München, Deutschland) bestimmt.

Die Gesamtproteine aus gefrorenen Rattengeweben (Milz, Wirbelsäule und Blut) wurden isoliert nach Gewebekomposition in RIPA-Puffer, der 1 x PBS, 1 % Igepal CA-630, 0.5 % Natrium Deoxycholat, 1 % Natrium Dodecyl Sulfat (SDS) enthält, mittels Ultra-Turrax-T25-Homogenisator (Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland) bei 24 000 rpm. Das Gewebe- zu Puffer-Verhältnis betrug 1 : 9 (mg/ml, oder ml/ml im Falle des gesamten Blutes). Nach Inkubation auf Eis für 15 min und darauffolgender Zentrifugation (14 000 g, 5 min, 4°C) erhielt man den Überstand und die Proteinkonzentration wurde mit dem „DC-Protein-Assay“ gemessen.

### **5.7 EMSA (= Electrophoretic mobility shift assay)**

Doppelsträngige (ds) Oligodesoxynukleotide (ODNs) [E2F: 5`-CGGCACTCGGCGCCGA-AGCCGCGAG-3`; GATA-CAAT: 5`-AGGCCGTGATTGGCTGCGCCCAC-3`; SP1 (-21): 5`-GCGAAGCCGGGGCGGAGCACGCGAG-3`; SP1 (-179): 5`-CGCGGCGGCCCCGCC-CCTCCGGCAA-3`] wurden durch Wiederverbindung der komplementären Einzelstrang ODNs gebildet. Die jeweiligen als unnatürliche „Sense-Antisense“-Einzelstränge vorliegenden Oligonukleotide wurden also zunächst renaturiert. Dies geschieht durch Zusammenpipettierung der „Sense“- u. „Antisense“-Oligonukleotide und 3-5 min Kochen im Wasserbad. Danach sollten die Oligonukleotide langsam über 6 h abkühlen. Durch die Renaturierung sinkt die Molarität um die Hälfte. Jeder Ansatz wurde auf 1 pmol/μl verdünnt. Das APS (Ammoniumpersulfat) wurde selbst hergestellt. Anschließend wurden die Oligonukleotide radioaktiv markiert mittels einer T4-Kinase (auf Eis): sie katalysierte die Reaktion eines γ-P vom ATP auf den 5`-Terminus eines Poly-/Mononukleotids. Wichtig hierbei: die Oligonukleotide haben kein störendes 5`-Phosphat. Arbeiten im Radioaktivraum: Ansatz: 2 μl Oligonukleotide + 4 μl T4-Kinasepuffer (10x, entspricht 12.5 Units) + 2 μl T4-Kinase + 28 μl H<sub>2</sub>O + 4 μl γ-<sup>32</sup>P-ATP (10 μCi/μl; Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland). Programm des Thermocyclers: 1h bei 37°C. Dann erfolgt bei 65°C eine zehnmünütige Inaktivierung der T4-Kinase. H<sub>2</sub>O ad 100 μl wurde hinzugefügt. Daraufhin Aufreinigung der radioaktiv markierten Oligonukleotide: Es wurden Micro-spin G-25 Säulen von Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland verwendet. Diese werden bei -20° C gelagert. Die Säulen zunächst 5 min auftauen lassen und dann wie in der mitgelieferten Beschreibung für die eigentliche Aufreinigung vorbereiten [die Tubes der Säulen zentrifugieren (3 min, 2200 rpm), die Säulen mit einer Pinzette herausholen und in ein neues Tube stellen],

dann 50 µl der radioaktiv markierten ungereinigten Oligonukleotide auf die Säule geben. Nach erneuter Zentrifugation (4 min bei 2200 rpm) wurden das Eluat bzw. die radioaktiv markierten Oligonukleotide im „β-Counter“ gemessen. Die Aktivität sollte 60 000 cpm/µl Oligonukleotid haben. Dementsprechend wurden die Oligonukleotide verdünnt. Es folgten die Bindungsreaktionen {Das Gesamtvolumen von 25 µl enthält 5 – 30 µg Protein, 30 000 – 80 000 cpm ds-ODN, 10 mmol/l Tris-HCl (pH 7.5), 1mmol/l EDTA, 1 mmol/l DTT, 300 mmol/l KCl, 1 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 5 % Glycerol und 2 µg Poly[d(I-C)] (Roche Molecular Biochemicals)}, die entweder über Nacht bei 4°C [E2F-ODN, SP1-ODNs, GATA-CAAT-ODN (Supershift-Experiment)] oder bei 4°C für 1 – 2 h [GATA-CAAT-ODN (Kompetitions-Experiment)] durchgeführt wurden. Für die Kompetitions-Analysen wurden Bindungsreaktionen ausgeführt mit überschüssiger Menge an ungekennzeichneter ds-DNTP (E2F, SP1: 1 und 50 pmol pro Bindungsreaktion; GATA-CAAT: 0.06 – 10 pmol pro Bindungsreaktion). Für Supershift-Analysen wurden die Proteine mit 6 µg Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur präinkubiert. Es wurden dabei folgende Antikörper verwendet: Ziege, antihuman NF-YB (CBF-A) Antikörper (FL-207); Ziege, antihuman GATA-2 Antikörper (C-20); Hase, antihuman E2F-1 (C-20); Hase, antihuman E2F-2 (C-20); und Hase, antihuman E2F-3 (C-18); alle Antikörper wurden von Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland, erhalten. Die Bindungsreaktionen wurden in einem 4 % Polyacrylamidgel, das mit Tris-Borat-EDTA (0.5 x oder 1 x ) oder mit Tris-Glycin gepuffert war, aufgetrennt. Der Ansatz für das Gel: 5 ml Gel 40 (38 % Acrylamid und 2 % Bisacrylamid) + 10 ml 5x-Tris-Glycin + 5 ml 10x-TBE + 35 ml H<sub>2</sub>O + 250 µl APS + 50 µl TEMED. Anschließend erfolgt das Auftragen des Mixes auf das Gel: „Prerun“ des Gels für 45 min bei 15 mA Stromstärke und 1x Tris-Glycin als Laufpuffer. Der „Run“ selbst wurde bei 10 mA für ca. 10 h gestartet. Blotting: Nach Beendigung der Gelelektrophorese wird der Laufpuffer entfernt und die Glasplatten mit dem Gel vorsichtig auseinandergebaut, dabei bleibt das Gel an einer der Glasplatten kleben. Ein 3 mm Whatman-Filterpapier wird vorsichtig auf das Gel gedrückt. Das Gel haftet jetzt am Filterpapier. Auf die noch unbedeckte Gelseite wird Zellophanfolie (Saran) gelegt und die Kombination Gel/Filterpapier insgesamt in Zellophan eingewickelt. Anschließend wird dies dann für ca. eine Woche bei -20°C einer „Fujifilm BAS-MP 2040S-Imaging“-Platte ausgesetzt und mittels eines „Fujifilm BAS-1500-Imaging“-Plattenlesegerätes (Raytest Isotopenmessgeräte, Straubenhardt, Deutschland) analysiert.

## 5.8 Analyse der polymorphen Mikrosatelliten

Humane genomische DNA wurde aus Blutproben von 11 anonymen Donoren mit QIAamp DNA Blut Mini Kit (Quiagen) extrahiert. Wir markierten 1.32 pmol „Sense-Primer“ (5'-GTTGTCCTGAAGTCCCTGG-3') am 5'-Ende mit 0.556  $\mu$ Cu [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP (Amersham Biosciences) und 0.162 U T4 Polynukleotidkinase (Promega) für 45 min bei 37°C, gefolgt von Inaktivierung durch Hitze. Der markierte „Sense“- und der unmarkierte „Antisense-Primer“ (5'-TGCACTGGAGTGTGACCCG-3') wurden in PCR-Reaktionen (Annealing-Temperatur: 65 °C, 40 Zyklen) verwendet mit 50 ng genomischer DNA als Matrize und mit Taq-DNA-Polymerase (Promega). Nach thermaler Denaturierung wurden die PCR-Produkte (um die 500 bp, die alle drei Mikrosatelliten umspannen) durch Gel-Elektrophorese in einem 6 % denaturierendem Polyacrylamidgel (30 W, 6 h) aufgetrennt. Das Gel wurde einem Biomax-Film (Kodak, Stuttgart, Deutschland) für 2 Tage ausgesetzt.

Die Korrekturlesungs-PCR wurde mit 100 ng genomischer DNA, den „Primern“ wie für die radioaktiv markierte PCR und klonierter *Pfu*-DNA-Polymerase (Stratagene, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden entweder direkt nach der Geleluierung und Aufreinigung (QIAquick PCR Aufreinigungs Kit) sequenziert oder nach der Subklonierung in einen pCRII-Vektor (Invitrogen).

Die individualen polymorphen Promotorregionen wurden mit HotStarTaq-DNA-Polymerase (Quiagen) und mit den folgenden „Primern“ amplifiziert: 5'-GTTGTCCTGAAGTCCCTGG-3' („Sense“) und 5'-AGCTCGCGTGCTCCGCC-3' („Antisense“; Position -1). Die amplifizierten Produkte wurden in einen Luciferase-Reporter-Vektor, pGL3basic, für nachfolgende „Reporter-Gen-Assays“ subkloniert.

## 5.9 Detektion der Methylierung

Genomische DNA wurde aus EA.hy926-Zellen mit dem QIAamp-DNA-Mini-Kit isoliert. Ca 700 ng genomische DNA wurde mit *Eco*RI gedaut und einer Bisulfid-Modifizierung der unmethylierten Cytosin-Überreste (Umwandlung in Uracil) unterzogen. Anschließend Amplifizierung der in einen Agarosetropfen eingebetteten DNA. Dies geschah nach Art der beschriebenen Methode aus Olek et al., 1996. Die modifizierte DNA (ein DNA-Agarose-Tropfen pro Reaktion) diente als Matrize in nachfolgenden sog. „nested“-PCRs mit HotStarTaq-DNA-Polymerase und „Primern“, die die CG-Mikrosatellit-Wiederholungen umspannen. Die „Primer“ der PCR der ersten Runde (465 bp Produkt) waren:

5'-GATATATATATATAGTAATAAATTTTA-3' („Sense“), 5'-  
AAAAACCTAAAAACAAAACAAA-3' („Antisense“). „Primer“ der PCR der zweiten  
Runde (mit einem 212 bp Produkt) waren:

5'-TAATAAATTTTAAATATAGTTAGGATT-3' („Sense“),

5'-CCTAACTCCTACACTAAAATATAA-3' („Antisense“). Das PCR-Endprodukt wurde mit  
dem QIAquick-Aufreinigungs-Kit aufgereinigt und sequenziert.

### **5.10 *In vitro*-Methylierung von gesamten Reporter-Plasmiden**

Drei Mikrogramm des pGL3basic-Vektors, der die genannten Deletionsmutanten des humanen  
ECE-1c-Promotors enthält, wurden mit 2 U *SssI*-Methylase (New England Biolabs, Frankfurt-  
am-Main, Deutschland), mitgeliefertem Puffer und 160 µmol/l S-Adenosylmethionin in einem  
Gesamtvolumen von 20 µl für 3 h bei 37°C und folgender Hitze-Inaktivierung (20 min, 65 °C)  
und Aufreinigung (QIAquick-PCR-Purifikation-Kit) methyliert. Kontrollvektoren wurden einer  
identischen Prozedur unterzogen, aber ohne *SssI*-Methylase.

### **5.11 „Patch“-Methylierung des Reporterplasmids**

Die „Patch“-Methylierung des Promotor-Reporter-Konstrukts wurde wie bei Nan X. et al., 1997,  
beschrieben mit einigen Veränderungen durchgeführt. Wir haben 250 µg des ECE-1c-  
Promotorplasmids (pGL3basic) mit *KpnI* und *BglIII* gedaut. Die freigewordene Promotorregion  
wurde aufgereinigt über ein Qiaex II-Gel-Extraktions-System (Quiagen) und dann wurden um  
die 8 µg der Promotor-DNA *in vitro* in einem Gesamtvolumen von 100 µl methyliert, mittels 4 U  
*SssI*-Methylase (New England Biolabs), mitgeliefertem Puffer und 160 µmol/l S-  
Adenosylmethionin bei 37°C für 4 h und nachfolgender Hitze-Inaktivierung (20 min, 65°C). Als  
Kontrolle wurde das gleiche Fragment unter identischen Bedingungen ohne *SssI*-Methylase  
inkubiert. Nach Aufreinigung mit QIAquick-PCR-Aufreinigungs-Kit wurden methylierte oder  
nicht-methylierte Einsätze, die die Promotorregion enthalten, wieder in die unmethylierten  
Plasmide eingebunden in einem 1 : 1 Verhältnis. Nach Phenol-Chloroform-Extraktion und  
Isopropanol-Ausfällung wurden die Plasmide mit Fugene-6 und 0.5 µg Plasmid pro Loch einer  
12-Loch-Platte transfiziert. Die RLA-Daten stellen den Hauptteil der vier unabhängigen  
Transfektionsexperimente dar.

## 5.12 Die Sequenzanalyse

Die Promotorsequenzen wurden nach potenziellen *cis*-Elementen hin analysiert mittels der Datenbank TRANSFAC, siehe Heinemeyer T. et al., 1999 (Version 3.5, Gesellschaft für biotechnologische Forschung, Braunschweig, Deutschland; <http://www.motif.genome.ad.jp>).

## 5.13 Die statistischen Analysen

Für alle statistischen Analysen wurde ein zweiseitiger t-Test durchgeführt und statistische Signifikanz wurde bei  $p < 0.05$  angenommen.

## 5.14 Materialien

### Biochemische Substanzen:

<i>Substanz</i>	<i>Hersteller</i>
100 bp DNA-Längenstandard	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Appligene Oncor, Illkirch, Graffenstaden, Deutschland
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Ampicillin	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Antikörper (Antihuman NF-YB, GATA-2, E2F 1 – 3)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
Bacto™ Agar	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Bacto™ Hefeextrakt	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Bacto™ Tryptone	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Borsäure	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München,



Complete	Deutschland
DMEM	Roche, Molecular Biochemicals
	Cambrex Bio Science Verviers S.P.R.L., Verviers, Belgien
DNTP's	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
E. coli DH5 $\alpha$	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
EGTA	Merck, KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Merck, KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Merck, KGaA, Darmstadt, Deutschland
FCS	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Ficoll	Pharmacia GmbH, Erlangen, Deutschland
FuGENE <sup>TM</sup> 6	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Gel 40-Rotiphorese	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glukose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Glycerol	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
HAT-Zusatz (50x)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
HCl	Merck, KGaA, Darmstadt, Deutschland
Hepes	Merck, KGaA, Darmstadt, Deutschland
Igepal CA-630	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Isopropanol	Merck, KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck, KGaA, Darmstadt, Deutschland
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Luminol/p-Iodophenol	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
Methanol	Merck, KGaA, Darmstadt, Deutschland
MgCl <sub>2</sub>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Micro-Spin-G25 Säulen	Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland
NaCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NaOH	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Natrium Pyruvat (100mM)	Cambrex Bio Science Verviers S.P.R.L., Verviers, Belgien
NEAA (100x)	Cambrex Bio Science Verviers S.P.R.L., Verviers, Belgien
Optimem-1	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
PBS-Dulbecco	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Cambrex Bio Science Verviers S.P.R.L., Verviers, Belgien
Phenol	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
Poly-A + RNA von humanem Gewebe	Clontech, Heidelberg, Deutschland
Q-Solution	Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Reporterlysepuffer (5x)	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
RPMI (= Rowswell Park Memorial Institute )-1640-Medium	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Sodium Duodecyl Sulfat	Bio-Rad GmbH, München, Deutschland
TEMED (=Tetramethylethyldiamin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Tris	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
TRIZol-Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblue	Biochrom AG, Berlin Deutschland
Trypsin	Cambrex Bio Science Verviers S.P.R.L., Verviers, Belgien
Tween 20	Bio-Rad GmbH, München, Deutschland
X-Gal	Carl Roth GmbH Co. Kg, Karlsruhe, Deutschland
Xylencyanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
$\gamma^{32}$ -P-ATP	Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland

## Lösungen, Puffer, Medien, Gele

### 0.5 m EDTA pH 8,0

(Ethyldiamintetraessigsäure)

EDTA•2 H <sub>2</sub> O	93,05 g
-------------------------	---------

---

In 300 ml H<sub>2</sub>O lösen; den pH mit

NaOH auf 8,0 einstellen;

Aqua dest. ad 500 ml

### Ficoll-Puffer

<b>Ficoll</b>	<b>15g</b>
---------------	------------

1x TBE-Puffer	100ml
---------------	-------

Bromphenolblau	1ml
----------------	-----

---

Zunächst Ficoll mit 60 ml 1x TBE in Lösung bringen, dann auf 100 ml auffüllen und Bromphenolblau zugeben.

### LB-Agar

<b>Bacto-Agar</b>	<b>1,5 g</b>
-------------------	--------------

LB-Medium	100ml
-----------	-------

---

Sofort autoklavieren; Lagerung bei 4°C.

### X% Agarosegel

Agarose	xg
---------	----

1x TBE-Puffer	100 ml
---------------	--------

---

durch Kochen in Lösung bringen;  
6 µl/100 ml Ethidiumbromidösung  
(10 mg/ml) zugeben und gießen.

### Gelbeladungspuffer

50 % Glycerol

0,05 % Bromphenolblau

0,05 % Xylencyanol

### LB-Medium

Bacto-Hefeextrakt	5g
-------------------	----

Bacto-Tryptone	10g
----------------	-----

NaCl	10g
------	-----

---

Aqua dest. ad 1000ml; den pH

auf 7.05 einstellen, dann

autoklavieren; Lagerung bei 4°C.

### 10x TBE

Tris-Base	108 g
-----------	-------

Borsäure	55 g
----------	------

0,5 m EDTA pH 8,0	40 ml
-------------------	-------

---

Aqua dest. ad 1 l

### TE-Puffer

1,0 m Tris-Puffer pH 8,0	1 ml
--------------------------	------

0,5 m EDTA pH 8,0	0.2 ml
-------------------	--------

---

Aqua dest. ad 100 ml, dann

autoklavieren; Lagerung bei 4°C

### Laemmli-Puffer

25 mM Tris-Base

129 mM Glycin

0,1 % SDS

### 10x TBS pH = 7,5

200 mM Tris-Base

1,5 m NaCl

### 5x Tris-Glycin

250 mM Tris-Base

2 m Glycin

## Zellkulturmedien

Für EA.hy926:

Für 500 ml:

425 ml DMEM mit 4,5 g/l Glucose, mit stabilem Glutamin

5 ml Pen./Strep. 10 000 U/ml bzw. 10 000 µg/ml

5 ml Natriumpyruvat 100 mM

5 ml NEAA 100x

50 ml FCS

10 ml HAT-Supplement

Für KELLY:

Für 500 ml:

430 ml RPMI 1640 Medium

5 ml Pen./Strep. 10 000 U/ml / 10 000 µg/ml

5 ml Natriumpyruvat 100 mM

5 ml NEAA 100x,

50 ml FCS

5 ml L-Glutamin

## Enzyme

<i>Enzymart</i>	<i>Name</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Puffer</i>	<i>Hersteller</i>
Restriktionsenzyme	Bgl II	New England	Puffer C	Promega
	Kpn I	Biolabs	Puffer C	Promega
	EcoRI	New England Biolabs	Puffer H	New England Biolabs
DNA-Polymerase	Hot-starTaq™	Quiagen	10x PCR- Puffer	Quiagen
	Taq	Promega	10x PCR- Puffer	Promega
	Pfu	Stratagene	10x PCR- Puffer	Stratagene
Ligase	T4	Invitrogen	10x Ligationspuffer	Invitrogen
Methylase	SssI-Methylase	New England Biolabs	10x NE-Puffer	New England Biolabs

## **Vektoren**

<i>Vektorname</i>	<i>Hersteller</i>
PCR II-Vektor	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
pGL3basic®	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
pSV-β-Galaktosidase Kontrollvektor	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Renilla-Luciferasevektor	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Renilla R0 Plasmid	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland

## **Kits**

<i>Name</i>	<i>Hersteller</i>
DC-Protein-Assay	Bio-Rad, München, Deutschland
Duales-Luciferase-Reporter-Assay-System	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Galacton-Light-Emission-Accelerator	Tropic, Bedford, USA
QIAamp DNA Blut Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAex II-Gel-Extraktions-Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAGEN® Plasmid Maxi Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAprep® Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAquick™ PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Rneasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

## **Geräte und andere Materialien**

<i>Name</i>	<i>Hersteller</i>
AB Prism™ 377 DNA Sequenzer	Perkin Elmer, Überlingen, Deutschland
Biomax-Film	Kodak, Stuttgart, Deutschland
Falcon-Röhrchen 15 u. 50 ml	Nalge Nunc™ International
Gelshift Glasplatten	Bio-Rad GmbH, München, Deutschland
Gelshift Kamm	Bio-Rad GmbH, München, Deutschland
Gelshift Spacer	Bio-Rad GmbH, München, Deutschland

Gelschlitten und Kamm	Bio-Rad GmbH, München, Deutschland
Hyperfilm	Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland
Kulturflaschen mit Filter	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland
Lumat LB 9501	Berthold, Bad Wildbad, Deutschland
Mikroskop Olympus CK2	Olympus, Hamburg, Deutschland
Image Plate Scanner BAS-15	Fujifilm, Düsseldorf, Deutschland
Protran-Nitrozellulose-Membran	Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
Plastikpetrischalen	Greiner GmbH, Pleidelsheim, Deutschland
Spannungsquelle	Biometra, Göttingen, Deutschland
Spannungsquelle Feather Volt™ 200	Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland
Spektrophotometer UV-VIS 1202	Shimadzu, Kyoto, Japan
Tischzentrifugen 5417/5402	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Ultra-Turrax-T25-Homogenizer	Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland
3 mm Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
6-Loch-Platten	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland
12-Loch-Platten	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland