

### 3 Material

#### 3.1 Zelllinien

Alle Zelllinien stammen vom *American Tissue Culture Center* (ATCC), Rockville, MD, USA mit Ausnahme von HCT116 und HCT116+ch3, die von C. R. Boland freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden. In **Tabelle 1** werden die Zelllinien hinsichtlich ihres Phänotyps, p53-Status, p21 Expression und *mismatch repair* Status beschrieben.

**Tabelle 1:** Beschreibung der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Phänotyp	p53-Status	<i>Mismatch repair</i> Status	p21 <sup>CIP1</sup> - Expression
5583-S	muzinös	p53 <sup>wt</sup> <i>siehe Anmerkung 1</i>	MMR <sup>-</sup> <i>siehe Anmerkung 1</i>	hoch (44)
LS 174T	muzinös	p53 <sup>wt</sup> (86)	MMR <sup>-</sup> (86-89)	hoch (44)
LoVo	nicht-muzinös	p53 <sup>wt</sup> (86, 90)	MMR <sup>-</sup> (Mutation in hMSH2) (86, 88, 90- 95)	normal (96)
HT 29	nicht-muzinös	p53 <sup>mut</sup> (86, 90)	MMR <sup>+</sup> (86, 87)	niedrig (44)
SW480	nicht-muzinös	p53 <sup>mut</sup> (86, 90)	MMR <sup>+</sup> (86, 87, 89, 92, 94, 95)	niedrig (44)
DLD1	nicht-muzinös	p53 <sup>mut</sup> (97)	MMR <sup>-</sup> (Mutation in hMSH2) (90, 92, 95, 98)	niedrig (99)
NCM460	normale Mukosa (100)	p53 <sup>wt</sup> <i>siehe Anmerkung 2</i>	MMR <sup>+</sup> <i>siehe Anmerkung 2</i>	niedrig (44) <i>siehe Anmerkung 2</i>
CSC-1	normale Mukosa	p53 <sup>wt</sup> <i>siehe Anmerkung 2</i>	MMR <sup>+</sup> <i>siehe Anmerkung 2</i>	niedrig (44) <i>siehe Anmerkung 2</i>
HCT116	nicht-muzinös	p53 <sup>wt</sup> (86, 90)	MMR <sup>-</sup> (homozygote Mutation im hMLH1 Gen auf Chromosom 3 (90, 94, 95, 101, 102)	niedrig (103)
HCT116+ch3	nicht-muzinös	p53 <sup>wt</sup> (104)	MMR <sup>+</sup> (HCT116 mit dem hMLH1-Gen auf Chromosom 3 (102)	niedrig (siehe HCT116)

**Anmerkung 1:** Die Zelllinie stammt von einem muzinösen Adenokarzinom (105), so dass sie als p53<sup>wt</sup>, MMR<sup>-</sup> klassifiziert wird. Ihr Status wurde jedoch nicht überprüft.

**Anmerkung 2:** Die Zelllinien CSC-1 und NCM460 wurden aus normalem Kolongewebe gezüchtet und werden deshalb als p53<sup>wt</sup>, MMR<sup>+</sup> klassifiziert. Ihr Status wurde nicht überprüft.

### 3.2 Zellkulturmaterialien

Dulbecco Minimal Essential Medium (DMEM)	(Gibco BRL, Karlsruhe)
Fetales Kälberserum (FCS, <i>fetal calf serum</i> )	(Biochrom, Berlin)
Gewebekulturflaschen (25, 80 und 185 cm <sup>2</sup> )	(Nunc, Roskilde, DK)
Hämatozytometer	(Brand, Wertheim)
Kryoröhrchen	(Nunc, Roskilde, DK)
Latexhandschuhe (nicht-steril)	(Ansell, München)
Mikrotiterplatten (96 Vertiefungen; 0,382 cm <sup>2</sup> )	(Nunc, Roskilde, DK)
Nut Ham Mix	(Gibco BRL, Karlsruhe)
Pasteurpipetten	(Brand, Wertheim)
Petrischalen (9, 6 und 22 cm <sup>2</sup> )	(Nunc, Roskilde, DK)
Pipetten (1 ml, 5 ml, 10 ml und 25 ml)	(Falcon, Heidelberg)
Pipetten (verstellbar: 10, 20, 100, 250, 1000 µl)	(Eppendorf, Hamburg)
Pipettenspitzen (10 µl)	(Eppendorf, Hamburg)
Pipettenspitzen (100 µl)	(Sarstedt, Nümbrecht)
Pipettenspitzen (1000 µl)	(Brand, Wertheim)
Pipettierhilfe (Pipetboy)	(Integra Bioscience, Fernwald)
Reaktionsgefäße (1 und 5 ml)	(Brand, Wertheim)
Reaktionsgefäße (2 ml)	(Eppendorf, Hamburg)
RPMI 1640	(Gibco BRL, Karlsruhe)
Zellschaber	(Nunc, Roskilde, DK)
Zentrifugenröhrchen (15 ml)	(Nunc, Roskilde, DK)
Zentrifugenröhrchen (50 ml)	(Sarstedt, Nümbrecht)

### 3.3 Chemikalien

Acrylamid	(Serva, Heidelberg)
Ammoniumpersulfat (APS)	(Sigma, Steinheim)
Aprotinin	(Sigma, Steinheim)
Bisacrylamid	(Sigma, Steinheim)
Bradford Proteinbestimmungssassay	(Bio-Rad Laboratories, München)

---

5-Bromo-4-chloro-3-indol- $\beta$ -D-Galactopyranosid (X-Gal)	(Biomol, Hamburg)
Bromphenolblau	(Sigma, Steinheim)
Coomassie Brilliantblau G-250	(Merck, Darmstadt)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	(Merck, Darmstadt)
Dimethylformamid (DMF)	(Merck, Darmstadt)
Dithiothreitol (DTT)	(Sigma, Steinheim)
Dodecylsulfatnatriumsalz (SDS)	(Merck, Darmstadt)
Ethanol	(Baker, Deventer, Holland)
Ethylenglycolbis-( $\beta$ -aminoethylether) N, N, N', N'-tetraacetsäure (EGTA)	(Sigma, Steinheim)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	(Sigma, Steinheim)
Fluoromount-G	(Southern Biotechnical Association, Birmingham, AL, USA)
5-Fluorouracil (5-FU) (50 mg/ml)	(Grey-Pharma GmbH, Kirchzarten)
Formamid	(Merck, Darmstadt)
Geneticin (G418 Sulfat)	(Merck, Darmstadt)
Glutaraldehyd	(Sigma, Steinheim)
Glycin	(Roth, Karlsruhe)
$\beta$ -Glycerophosphat	(Sigma, Steinheim)
7-Hydroxystaurosporin (UCN-01) (3mg/ml in DMSO)	(Kyowa Hakko Kogyo, Tokyo, Japan)
Irinotekan (CPT-11) (20 mg/ml)	(Aventis, Frankfurt)
Kaliumchlorid	(Merck, Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat	(Merck, Darmstadt)
Kaliumferrizyanid	(Roche, Mannheim)
Kaliumferrozyanid	(Roche, Mannheim)
Kristallviolett	(Merck, Darmstadt)
Leupeptin	(Sigma, Steinheim)
Magermilchpulver	(Sucofin, Zeven)

---

Magnesiumchlorid	(Merck, Darmstadt)
Methanol	(Baker, Deventer, Holland)
MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid = Thiazolyl Blau)	(Sigma, Steinheim)
Natriumazid	(Merck, Darmstadt)
Natriumchlorid	(Merck, Darmstadt)
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	(Merck, Darmstadt)
Natriumfluorid	(Merck, Darmstadt)
Natriumpyrophosphat	(Sigma, Steinheim)
Natriumvanadat	(Sigma, Steinheim)
Pepstatin A	(Sigma, Steinheim)
Phenylmethansulfon (PMSF)	(Sigma, Steinheim)
Polyoxyethylensorbitan Monolaureat (Tween 20)	(Sigma, Steinheim)
Rinderserum-Albumin	(Pierce, Rockford, IL, USA)
Salzsäure	(Merck, Darmstadt)
Sucrose	(Sigma, Steinheim)
Super Signal West Pico Peroxidase-Lösung	(Pierce, Rockford, IL, USA)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	(Serva, Heidelberg)
Tris Ultrapure	(ICN, Aurora, OH, USA)
Tris Hydrochlorid	(Roth, Karlsruhe)
Triton X-100	(Sigma, Steinheim)
Trypanblau 0,4%	(Sigma, Steinheim)
Trypsin (1:250, 2,5%)	(Biochrom, Berlin)
Zitronensäure	(Sigma, Steinheim)
<b>Antikörper</b>	
Anti-PARP (C2-10)	(BD Transduction Laboratories, Lexington, Kentucky, USA)
Anti- $\beta$ -Actin (AC-150)	(Sigma, Steinheim)
Meerrettichperoxidase(HRP-)konjugiertes anti-Maus (IgG + IgM) Ziegen IgG	(Dianova, Hamburg)

**Molekulargewichtsmarker für Western Blot**

Color Marker Wide Range (Sigma, Steinheim)

**3.4 Geräte und sonstige Materialien**

Autoklav (Webeco, Bad Schwartau)

Blotkammer (Bio-Rad Laboratories, München)

Brutschrank Typ B5060 EC-CO<sub>2</sub> (Heraeus Sepatech, Hanau)

Einmalküvetten für Photometer (Brand, Wertheim)

Elektrophoresekammer (Bio-Rad Laboratories, München)

Filmkassetten (Kodak, Stuttgart)

Immobilon-P Membran (PVDF-Folie) (Millipore, Eschborn)

Invertmikroskop Olympus CK2 (Olympus Optical Co., Japan)

Photometer Dynatech MR 5000 (Pharmacia Dynatech, Denkendorf)

Röntgenfilm T-MAT plus DG 13x18 (Kodak, Stuttgart)

Scanner (GS-700 Imaging Densitometer) (Bio-Rad Laboratories, München)

Schüttler (Köttermann, Uetze/Hänigsen)

Sterilbank Bio 48 (Faster, Ferrara, Italien)

Vortexmixer (Heidolph, Kelheim)

Waagen:

Sartorius (Göttingen)

Kern (Albstadt)

Wasserbad (Julabo, Seelbach)

Zentrifugen:

Biofuge A (Heraeus, München)

Mini Spin (Eppendorf, Hamburg)

Kühlzentrifuge (Sigma, Steinheim)

### 3.5 Puffer und Lösungen

#### **PBS** (*phosphate buffered saline*)

8 g NaCl

0,2 g KCL

14,2 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O

2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

ad 1 l aqua dest.

#### **Trypsinpuffer**

0,5 mM EDTA in PBS

#### **MTT-Test**

**MTT** (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid = Thiazolyl Blau)

5 mg/ml MTT in PBS

#### **Extraktionspuffer**

Dimethylformamid (DMF) 50%

Dodecylsulfatnatriumsalz (SDS) 20%

in aqua dest.

pH mit einer Lösung aus Essigsäure (80%) und HCl (1 N) auf 4,7 einstellen

#### **SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot**

##### **Acrylamid-Bisacrylamid (30%)**

60g Acrylamid

1,8 g Bisacrylamid

ad 200 ml aqua dest.; filtrieren

##### **APS 10%**

1 g APS ad 10 ml aqua dest.

**Blotpuffer**

25 mM Tris Base  
192 mM Glycin  
20 % Methanol  
pH 8,3

**Laufpuffer 10x**

0,025 M Tris Base  
0,192 M Glycin  
0,1% SDS  
pH 8,3

**Lysepuffer**

1% Triton X-100  
150 mM NaCl  
10 mM  $\beta$ -Glycerophosphat  
20 mM Tris-HCl, pH 7,5  
2,5 mM Natriumpyrophosphat  
1 mM Natriumvanadat  
5 mM NaF  
1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) in DMSO  
1 mM EDTA  
1 mM EGTA  
10  $\mu$ g/ml Aprotinin  
10  $\mu$ g/ml Pepstatin A  
10  $\mu$ g/ml Leupeptin

**PBST**

PBS  
0,1 % Tween

**Probenpuffer 5x**

5 g SDS

25 g Sucrose

0,6 g Tris Base

0,1 M EDTA

1 Spatelspitze Bromphenolblau

ad 5 ml aqua dest.

pH 6,8; erst unmittelbar vor Gebrauch 30 mg/ml DTT zugeben

**Sammelgelpuffer 4x**

6,0 g Tris Base

48 ml 1 M HCl

ad 100 ml aqua dest.

pH 6,8; filtrieren

**SDS 1%**

1,0 g SDS, ad 100 ml aqua dest.

**Trenngelpuffer 5x**

45,4 g Tris Base

80 ml 1 M HCl

ad 200 ml aqua dest.

pH 8,8; filtrieren

**Waschpuffer 10x**

42,9 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

14,7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

27 mM KCl

1,37 M NaCl

2% Tween-20

0,02% NaN<sub>3</sub>

pH 7,3



**Trenngel 7,5%**

Acrylamid-Bisacrylamid (30%) s.o.

Trenngelpuffer (5x) 0,375 M

SDS (1%) 0,1%

Temed 0,1%

APS (10%) 0,1%

**Sammelgel 3%**

Acrylamid-Bisacrylamid (30%) 3%

Sammelpuffer (4x) 0,124 M

SDS (1%) 0,1%

Temed 0,1%

APS (10%) 0,1%

**SA-b-Gal-Färbung****Fixierungslösung**

Formamid 2%

Glutaraldehyd 0,2%

PBS

**Färbelösung**

Zitronensäurephosphatpuffer (pH 6) 40 mM

Kaliumferrozyanid 5mM

Kaliumferrizyanid 5 mM

NaCl 150 mM

MgCl<sub>2</sub> 2 mM

(X-Gal) 5-Bromo-4-chloro-3-indol-β-D-Galactopyranosid 1 mg/ml in

Dimethylformamid

40 mM Zitronensäurephosphatpuffer, pH 6:

A) 0,1 M Zitronensäure

B) 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O

für pH 6 ca. 17 ml A) + ca. 32 ml B)