

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Analysenwaage	Sartorius
LightCycler®	Roche Diagnostics
Cleanbench Lamin Air	Heraeus
DNA-Sequenzautomat ABI 377	ABI/Perkin Elmer
Elektrophoreseapparaturen	GIBCO BRL
Großschnittmikrotom ('Cryocut')	Leica
Hybridisierungsöfen	Biometra
PCR Cycler 9600 und 9700	Perkin Elmer
Tisch-Zentrifugen	Eppendorf
UV-Photometer Ultraspec 3000	Pharmacia
UV-Vernetzungsgerät ('Stratalinker')	Stratagene
GenePulser Elektroporationsgerät	Biorad

3.1.2 Chemikalien und Feinreagenzien

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders erwähnt, von den Firmen Merck, Serva, Sigma und Difco in analytischer Qualität bezogen. Die radioaktiv markierten Nukleotide lieferte die Firma Amersham.

Feinchemikalien

CDP Star™	DIG-Markierung	Roche Diagnostics
DIG Easy Hyb	DIG-Markierung	Roche Diagnostics
DIG Wash and Block Puffer Set	DIG-Markierung	Roche Diagnostics
DNA Molecular Weight Marker II, Dig-labelled	DIG-Markierung	Roche Diagnostics
GeneAmp® dNTP Mix	PCR/ RT-PCR	PE Applied Biosystems
GeneScan 500 ROX-Standard	Größenstandard für ABI 377 Sequenzer	PE Applied Biosystems
Hygromycin B	Antibiotika	Gibco BRL
Puromycin	Antibiotika	Gibco BRL
Ampicillin	Antibiotika	Gibco BRL
Geneticin (G418)	Antibiotika	Gibco BRL
RNAzol™ B	RNA-Isolierung	WAK Chemie
Nylonmembran	Hybridisierung	Amersham
Whatman 3MM Papier	Hybridisierung	Roth
Tfx™-10, -20, -50 Transfektionsreagenzien	Transfektion	Promega

3.1.3 Enzyme, Primer und Vektoren

Enzyme

Ampli Taq [®] DNA-Polymerase und Puffer	PE Applied Biosystems
Klenow DNA Polymerase	Promega
MMLV Reverse Transkriptase (RNase H ⁻)	Gibco BRL
Restriktionsendonukleasen und Puffer	MBI Fermentas
Rnase freie DNase	Amersham
T4 DANN Ligase	Gibco BRL
T4 Polynukleotid Kinase	Gibco BRL

Primer und Oligonukleotide

Cx-Primer	5' Fam-CCC TTA CCC TTA CCC TTA CCC TTA 3'	Perkin Elmer
TS-Primer	5' AAT CCG TCG AGC AGA GTT 3'	Perkin Elmer
mt mTERT up	5' TTT TGT TGC TGC CTT TCT 3'	TIBMOLBIOL
wt mTERT up	5' TTT TGT TGA TGA CTT TCT 3'	TIBMOLBIOL
MTERT low	5' TCT GGG CAT AAC CTG AGT 3'	TIBMOLBIOL
MTERT endo up	5' CAG ACA TTT CCT TTA CTC 3'	TIBMOLBIOL
MTERT endo low	5' ACC ATA TAC CTG CCA GGG 3'	TIBMOLBIOL
TRF-Sonde	5' TTAAGGG TTAAGGG TTAGGG 3'	TIBMOLBIOL
MTR-U24	5' ACC CCA TAA ATT CCA GCT CCC GCC G 3'	TIBMOLBIOL
MTR-L413	5' TGG ACT CGA CAC CCT TCA CGT GGT 3'	TIBMOLBIOL
Beta-Aktin-U144	5' GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA 3'	TIBMOLBIOL
Beta-Aktin-L660	5' CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC 3'	TIBMOLBIOL
Sonde aus PNA	5' Cy3-TTAAGGG TTAAGGG TTAGGG 3'	EUROGENTEC

Vektoren

PBABE lacZ	Von M. Blasco zur Verfügung gestellt
PBABE puro	Von M. Blasco zur Verfügung gestellt
pBlueskript SK	Gibco BRL
PCDNA 2	Invitrogen
PCRII	Invitrogen
PCR [™] 3	Invitrogen

3.1.4 Bakterien

Subcloning Efficiency DH α [™] Competent cells	Gibco BRL
--	-----------

3.1.5 Kits

Cell Proliferation ELISA BrdU (colorimetric)	Proliferationsmessungen	Roche Diagnostics
DC Protein Assay	Proteinbestimmung	BioRad
DIG Oligonukleotide 3'-End Labeling Kit	DIG-Markierung	Roche Diagnostics
DNA Isolationskit	DNA-Isolierung	Quiagen
GENECLEAN II® Kit	Isolierung von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel	Bio 101
HTERT RT-PCR ELISA		Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Roche Diagnostics
hTR RT-PCR ELISA		Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Roche Diagnostics
<i>in vitro</i> Mutagenesis System	Mutagenese	Amersham Pharmacia
LightCycler – RNA Amplification Kit SybrGreen I		Roche Diagnostics
LightCycler Telo TAGGG hTERT Quantification Kit		Roche Diagnostics
LightCycler Telo TAGGG hTR Quantification Kit		Roche Diagnostics
QIAEX II	DNA-Isolierung von Fragmenten	Quiagen
SUPERSCRIP T Preamplification System	Reverse Transkription	Gibco BRL
TA Cloning® Kit Version 1.0	Klonierung	Invitrogen
Telomerase PCR ELISA		Roche Diagnostics

3.1.6 Zelllinien, Medien und Zellkultur

Für die Experimente wurden verschieden humane Nierenkarzinomzelllinien A 498, A 407, ACHN, Caki-1, Caki-2, SN12L1 (ATCC-Zellkatalog) und die murine Nierenkarzinomzelllinie RENCA (Murphy & Hrushesky, 1973) verwendet.

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte als Monolayer-Kulturen in 75 cm³ Zellkulturflaschen (Nunc, Roskilde, Dänemark) bei 37°C und 5 % CO₂. Als Kulturmedium für die humanen

Nierenkarzinomzellen wurde Minimum Essential Medium Eagle (MEM) mit 10 % fötalem Kälberserum, 2 % L-Glutamin, 7,5 % Natriumbikarbonat und 1 % Penicillin-Streptomycin verwendet (Gibco BRL). Die RENCA-Zelllinie und ihre Subzelllinien wurden in DMEM Medium (Dulbeccos Minimum Eagles Medium) mit 10 % fötalem Kälberserum, 1 % Penicillin-Streptomycin, 2 % Glutamin und 5 % Natriumpyruvat kultiviert (Gibco BRL).

Die Zellen wurden bei Erreichen der Konfluenz (ein- bis zweimal pro Woche) mit Trypsin-EDTA (0.05 % /0.02 % (w/v)) abgelöst und in einer Ausgangskonzentration von ca. $2 \cdot 10^4$ Zellen je ml passagiert.

3.1.7 Gewebeproben

Die Gewebeproben der Niere wurden aus Operationspräparaten der Urologischen Klinik des Universitätsklinikums Benjamin Franklin der Freien Universität direkt nach Tumornephrektomie entnommen und sofort im urologischen Labor weiterverarbeitet. Die histologische Verifikation des Untersuchungsmaterials erfolgte durch das Institut für Pathologie nach der TNM-Klassifikation. Die normalen Nierengewebe wurden ebenfalls aus den tumorbefallenen Nieren entnommen, jedoch in möglichst weitem Abstand vom Tumor.