

2 Material

2.1 Geräte

2.1.1 Zellkultur

- Lichtmikroskop Axiovert 25; Zeiss
- Homogenisator nach Potter-Elvehjem; Braun
- Begasungsbrutschrank BB 6220; Heraeus-Christ
- Sterile Werkbank Herasafe HS12; Heraeus-Christ
- Stickstofftank zur Lagerung von Zellen; Taylor-Wharton
- Gefriergerät für Zellen Nicole LM 10; Air Liquide

2.1.2 Zentrifugen

- Tischzentrifuge 5415; Eppendorf
- Tischzentrifuge 5402, kühlbar; Eppendorf
- Zellzentrifuge Megafuge 2.0 R, kühlbar; Heraeus-Christ
- Ultrazentrifuge Optima L-90 K mit Ti-45, Ti-60 und Ti70.1 Rotoren; Beckman-Coulter

2.1.3 Proteinelektrophorese und Westernblot

- Vertikal-Elektrophorese-System für Minigele; CBS
- Netzgerät Electrophoresis Power Supply EPS 3500; Amersham Pharmacia Biotech
- Gelrockner 583; Bio-Rad

2.1.4 Photometer

- UV-Photometer DU640; Beckman Instruments GmbH
- Multiplate Reader Spectra MAX 340 PC; Molecular Devices

- Fluoreszenzphotometer Spectra MAX Gemini; Molecular Devices

2.1.5 PCR und Agarosegelelektrophorese

- Thermocycler Trio-Thermoblock; Biometra Inc
- Horizontal-Elektrophoresesystem Mini Sub Cell GT System; Bio-Rad

2.1.6 Sonstige Geräte

- Heizblock QBT; Grant Instruments
- Analysenwaage BP 211D; Sartorius
- Wasseraufbereitungsanlage; Millipore
- MultiCal™ pH526 pH-Meter; WTW
- Überkopfschüttler Fröbel; Labortechnik
- Cell line Nucleofector™; Amaxa GmbH
- Vakuumkonzentrator CentriVac; Heraeus Christ
- Film-Entwicklereinheit Optimax Typ TR; Ms Laborgeräte
- ABI Prism Genetic Analyser 310; PE Applied Biosystems / Perkin Elmer
- FujiFilm Image Reader LAS-1000 / Aida Version 3.21 program; Berthold Technologies

2.2 Chemikalien

Alle aufgelisteten Chemikalien besitzen eine *pro analysis*-Qualität.

- 5,5'-Dithobis-2-nitrobenzoesäure; Sigma-Aldrich
- Acetylthiocholinjodid; Sigma-Aldrich
- Acrylamid-4K-Lösung (30 %) Mix 37,5:1 Acrylamid: Bisacrylamid; AppliChem
- Agarose NEO Ultra; Roth
- Ammoniumacetat; Merck
- Ammoniumsulfat; Roth
- Ascorbinsäure; Merck

- ATP (25 mM); Epicentre Technologies
- Bisindolylmaleimid I (GF 109203X); Sigma-Aldrich
- Brij 58 (Polyethylenglykolhexadecylether); Sigma-Fluka
- CNBr-aktivierte Sepharose; Pharmacia
- Dimethylsulfoxid (DMSO); Sigma-Aldrich
- dNTP-Mix (10 mM); Promega
- *Enhanced chemiluminescence*-Westernblot-Detektionsreagens; Perkin Elmer
- Eisenammoniumcitrat; Sigma-Aldrich
- Eisendichlorid; Merck
- Ferrozin; Sigma-Aldrich
- Hämin; Sigma-Aldrich
- Kaliumpermanganat; Sigma-Aldrich
- Magermilchpulver Glücksklee; Nestlé
- May-Grünwald-Giemsa-Lösung; Sigma-Aldrich-Fluka
- β -Mercaptoethanol; Merck
- N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED); Pharmacia
- Natriumdodecylsulfat (SDS); Merck
- Neocuprine; Sigma-Aldrich
- Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA); Sigma-Aldrich
- Triton X-100; Sigma-Aldrich
- Tween 20; Sigma-Aldrich
- Wasserstoffperoxid; Merck

2.3 Verbrauchsmaterialien

- Röntgenfilme Biomax MR-1; Kodak
- Mikroplatten Maxi Sorb U16 Module; Nunc

- Sterilfilter, Minisart, Porengröße 0,2 µm; Sartorius
- Sterile Einwegmaterialien wie Zellkulturgefäße, Pipetten und Schraubdeckelröhrchen für die Zellkultur; Nunc oder Falcon / Becton Dickinson
- Nitrocellulosemembran Hybond *enhanced chemiluminescence*; Amersham Biosciences

2.4 Zellkultur

- DMEM; GibcoBRL
- RPMI 1640 mit L-Glutamin; PAA LAB
- *Fetal calf serum*; Biochrom KG
- Dulbecco's PBS mit Calcium und Magnesium; PAA Lab
- Dulbecco's PBS ohne Calcium und Magnesium; PAA Lab
- Penicillin (10000 µg/ml) / Streptomycin (10000 µg/ml); PAA Lab
- G418-Sulfat, Antibiotikum zur Selektion von eukaryotischen Zellen; GibcoBRL

2.5 Kits

- *RNeasy Mini Kit*; Qiagen
- *BCA-Proteinassay*; Pierce
- *OneStep RT-PCR Kit*; Qiagen
- *QIAGEN Plasmid Maxi Kit*; Qiagen
- *QIAquick Gel Extraction Kit*; Qiagen
- *Fast-LinkTM DNA Ligation Kit*; Epicentre
- *pCR-Blunt II-TOPO Cloning Kit*; Invitrogen
- *NucleoSpin RNA / Protein Kit*; Macherey-Nagel
- *BigDye Terminator v1.1 Kit* und *Template Suppression Reagent*; Perkin Elmer

2.6 Puffer, Medien und Marker

Alle Puffer wurden mit dem in der ELIX-Wasseraufbereitungsanlage hergestelltem Wasser (ELIX-Wasser) hergestellt, das dem Reinheitsgrad von Typ 2 bidestilliertem Wasser entspricht. Die Verwendung von zusätzlich autoklaviertem MilliQ-Wasser (Reinstwasser) wurde auf molekularbiologische und proteinchemische Arbeiten beschränkt. Andere, hier nicht aufgelistete Lösungen sind in Verbindung mit den jeweiligen Methoden beschrieben.

- LB-Medium: 10 g/l Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Natriumchlorid, pH 7,0, autoklaviert, vor Verwendung auf 50 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin eingestellt; für LB Platten vor dem Autoklavieren, Zusatz von 15 g Agar pro 1 Liter LB Medium.
- SOC-Medium: 2 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 10 mM Natriumchlorid, 2,5 mM Kaliumchlorid, 10 mM Magnesiumchlorid, 20 mM Magnesiumsulfat, 20 mM Glukose
- PBS-Puffer (Phosphate-buffered saline): 150 mM Natriumchlorid, 8,33 mM Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat, 1,67 mM Kaliumdihydrogenphosphat, pH 7,4
- TST-Puffer (Tris-Saline-Tween): 150 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween 20, 10 mM Tris/HCl pH 7,5
- *1 Kb DNA Ladder* und *100 bp DNA Ladder*; GibcoBRL
- *Page Ruler Prestained Ladder* und *Molecular Weight Marker*; Fermentas

2.7 Antikörper

2.7.1 Primärantikörper

- Monoklonaler Antikörper aus der Maus (OKT9) gegen die extrazelluläre Domäne des humanen TfR, gereinigt aus den Zellkulturüberständen der Hybridomazelllinie OKT9 mittels Protein A-Sepharose CL-4B-Affinitätschromatographie nach Angaben des Herstellers (Amersham Biosciences), 1 mg/ml; *American Type Culture Collection*
- Monoklonaler Antikörper (IgG) aus der Maus (ab662) gegen Integrin $\alpha 2b/\beta 3$; Abcam
- Monoklonaler Antikörper (IgM) aus der Maus (BM-75.2) gegen α -Aktinin; Sigma-Aldrich

- Polyklonaler Antikörper (IgG) aus der Ziege (sc-18807) gegen HFE; Santa Cruz Biotechnology
- Polyklonaler Antikörper (IgG) aus dem Kaninchen (1835238) gegen PARP; Boehringer Mannheim
- Monoklonaler Antikörper (IgG) aus der Maus (A5441) gegen β -Aktin; Sigma-Aldrich

2.7.2 Sekundärantikörper

- Kaninchen-IgG gegen Maus-IgG, HRP-konjugiert (RAM*), 1,3 mg/ml; Dako
- Schweine-IgG gegen Kaninchen-IgG, HRP-konjugiert, (SAR*), 1,3 mg/ml; Dako
- Kaninchen-IgG gegen Ziege-IgG, HRP-konjugiert (sc2768); Santa Cruz Biotechnology
- Ziege IgG gegen Maus-IgM, HRP-konjugiert (A8786); Sigma-Aldrich

2.8 Enzyme und weitere Proteine

- Restriktionsenzyme und dazugehörige Puffer; NEB oder Fermentas
- T4-DNA-Ligase mit Puffer; Fermentas
- Taq-Polymerase; Promega
- Pwo-Polymerase; Promega
- M-MLV RT (H-)-Reverse Transcriptase; Fermentas oder Promega
- Ferritransferrin, human; Sigma-Aldrich
- BSA; Sigma-Aldrich
- Proteaseinhibitoren: Antipain, Aprotinin, Chymostatin, Leupeptin, Pepstatin A; Sigma-Aldrich

2.9 Vektoren

- pCR[®]-Blunt II-TOPO; Invitrogen
- pcDNA3; Invitrogen

2.10 Oligonukleotide

Tab. 2.1: Auflistung der Primer; alle Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion bezogen.

mRNA	Forward Primer (5' → 3')	Reverse Primer (5' → 3')
CD 61	ggcatttgtggacaagcctgtgtcacc	ctgggatagcttctcagtcacagccc
γ-Globin	ggacaaggctactatcacaagcctgtgg	ccaggtgctttgtggcatctcccaagg
β-Aktin	ttcctgggcatggagtcctgtgg	cgctagaagcatttgcgggtgg
TfR1	ccattgtcatataccgggtcagcctgg	ggttctaccctttacaatagcccaagtagc
TfR2	cctctcagaccgtctaccagcgtgtgg	ggaaggcgacgtagcccagtaggaagg
L-Ferritin	ccatgagctcccagattcgtcagaattattc	ggctcttagtctgtgcttgagagtgagc
H-Ferritin	gggagagcggctgaatgcaatgg	ggtcacgtggtcacccaattctttgatgg
Fpn1	ggagggaaactcatctaatgggtgtgaagg	cctaaagcttcaggatttgagcccagg
FLVCR	ggagctgcagaacgggccccaaagcgg	ccgggaagatgaggggacgtagggcc
ALAS2	ccgctgggctgatgcatatccctttgcc	ggtctctgtgtggcttgcaagaccagg
FECH	cgcagaagaggaagccgaaac	ggtcgcctctgttgaccacaga
DMT1A	ggagctggcattgggaaagtc	ggagatcttctcattaaagtaag
DMT1B	gttgcggagctgtaagaatc	ggagatcttctcattaaagtaag
Hepcidin-1	ccagagcaagctcaagaccagcagtg	ccgtctgttgggaaaacagagccactgg
Hepcidin-2	atggcactgagctcccagatctggg	ggcagcaggaagaaataaggaaggagg
Hepcidin-3	gactcactatagggagaccaagcttgggtacc	ggcagcaggaagaaataaggaaggagg

2.11 Bakterienstämme

- *E.coli One Shot*[®] TOP10F'; Invitrogen

2.12 Zelllinien

- K562, humane myeloische Leukämiezelllinie; ATCC
- HL60, humane promyeloide Leukämiezelllinie; ATCC
- THP1, humane monozytäre Leukämiezelllinie; ATCC,
- U937, humane histiozytäre Leukämiezelllinie; ATCC
- HepG2, humane Hepatomzelllinie; ATCC
- HT29B6, humane Kolonkarzinomzelllinie (Subklon B6) wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Fromm (Institut für Klinische Physiologie, Charité - Campus Benjamin Franklin) zur Verfügung gestellt.