

2. Material

2.1. Synthetische Oligonukleotid-Primer

Alle Primer wurden von der Firma Biotez GmbH (Berlin-Buch, BRD) bezogen. Die Darstellung der Primer erfolgt in 5' – 3'-Richtung.

Primer für die Genotypisierung von transgenen und ,knockout'-Tieren

AT13N	5'-	GTA GCG GTC GAT GCT GAG A	-3'
AT1A5	5'-	ACC CCA GAA AAG CAA AAT GGC	-3'
AT1TW32	5'-	GAA CAG GAA GCC CAG GAT GTT CTT GG	-3'
NeoPVU	5'-	GGC AGC GCG GCT ATC GTG G	-3'
HSKLK3	5'-	TCT GTC ACC TTC TGG ACG TGG	-3'
HSKLK5	5'-	CAA CAT GAG CCT CCT GGA G	-3'
Mas 11	5'-	CTG GTT CCT CTG CTT CCG GAT GAG G	-3'
Mas 12	5'-	GCC GTT GCC CTC CTG GCG CCT GGG	-3'
MMB12	5'-	CTC AGG GAG GCC AGG ATG TG	-3'
MMB18	5'-	TCA GCG GGG TCA TCA AGG CC	-3'
MMB1ES	5'-	GGA AGC CAT CAC TCA ACA TCC	-3'
Neo1L	5'-	CCT GCG TGC AAT CCA TCT TGT TCA ATG	-3'
MMB23Ba	5'-	GGT CCT GAA CAC CAA CAT GG	-3'
MMB25Ba	5'-	TGT CCT CAG CGT GTT CTT CC	-3'
MMB232	5'-	CCT TCC AAT ACT AAG TGT CC	-3'
NeoTho	5'-	CTG CTT GCC GAA TAT CAT GG	-3'

Primer für die 5'- und 3'-RACE

Neben den Primern des 5'- und 3'-RACE-Kits (Roche), Smart II A Oligonukleotid, 3'-RACE CDS Primer A, 5'-RACE CDS Primer, Universal Primer A Mix (UMP) und ,Nested' Universal Primer A, wurden folgende Primer für die 5'-RACE-Analysen verwendet:

B1N3	5'-	CAG ATA GTG ATG ACG AAC C	-3'
B2N3	5'-	GGC AGT TGA CCT CTG AAA AGG	-3'
B2T3	5'-	CCA GGT AGA TCT CAG CCA C	-3'
MMB12	5'-	CTC AGG GAG GCC AGG ATG TG	-3'

Primer für Sonden, Sequenzierungen und Expressionsvektoren

ACE31	5'-	GCC TCG TGG AAG CCA GGG TTG G	-3'
ACE32	5'-	CTA TGT CAT TGG CAA CAC GG	-3'
ACE51	5'-	GGA ATT CTT TAC CTC GCT GG	-3'
ACE52	5'-	GGA CTT CTA CAA CAG GAA GG	-3'
B1N5	5'-	CTC CCA AGA CAG CAG TCA CC	-3'
B2N5	5'-	GAG AGT GAG TAG TAC TGT TGG	-3'
B2RnE35	5'-	GCT GTC GTG GCT GTG TCC TGG	-3'

B2T5	5'-	CCT TCC TTG TGG CCC GAG G	-3'
HSB1R3	5'-	GGT AGC GGT CCT GGC TGA TGG	-3'
HSB1R31	5'-	CGT TGA TGA CAC GGC AGA GG	-3'
HSB131	5'-	CTT CTG GAG CAT TGT CAC AGG C	-3'
HSB132	5'-	GGC AGC ACT CTG TGC AGC AGG	-3'
HSB151	5'-	GGC ACA ATC ATA GCT CGC TG	-3'
HSB152	5'-	CCT CTC GAG TTG CTG GGA C	-3'
HSB1TAA	5'-	GCT GTT TTA ATT CCG CCA G	-3'
HSB1ATG	5'-	GAC CAC AGG TCA CTG TGC ATG G	-3'
HSB213A	5'-	CCT GTC TCC TTC TGG ACC	-3'
HSB213B	5'-	CCG CTG AGG GGT AAC AGC CTC	-3'
HSB231	5'-	GGT GAC ATT GAG CAT GTC GG	-3'
HSB232	5'-	CTG GAT GGT GTT GAG CCA GC	-3'
HSB233	5'-	CTC TTG TGC AGG CAG AAG ACG C	-3'
HSB251	5'-	GTC CCC ATG CGG CTT GCT CC	-3'
HSB2TAA	5'-	CGT TTG CTC ACT GTC TGC TCC	-3'
HSB2ATG	5'-	CCG ACA TGC TCA ATG TCA CC	-3'
IL1β3	5'-	GCT TTT CCA TCT TCT TCT TT	-3'
IL1β5	5'-	CTT CAA AGA TGA AGG AAA AG	-3'
MMB1N3	5'-	CTG CTG CCA CCA TCG TCG CC	-3'
MMB1N5	5'-	CTT TAT TGT CTG GGA TAG ACC	-3'
MMB21	5'-	GAC CCA CAG AAC CAG TCC CTG G	-3'
MMB23	5'-	CCA GGT AGA TCT CGG CCA C	-3'
MMB231	5'-	CCT TCC AAT ACT AAG TGT CC	-3'
MMB25	5'-	CCA GGT GTG GCA TTC ACG ACC	-3'
MMB251	5'-	CAG AGC CTT CTC ATC ATT CTG CC	-3'
RNB1TAA	5'-	CAT TTA TAA AGT CCC CAG AAC C	-3'
RNB1ATG	5'-	CGT CAG GTC ACT GGC GAT GG	-3'

2.2. Verwendete Bakterien

Zur Transformation von Vektoren wurden kompetenten Zellen des Bakterienstammes *E.coli DH5α*TM (Gibco/BRL [Bethesda, USA]) bezogen.

2.3. Vektoren

Alle Vektoren-tragenden Bakterien wurden in Medien oder auf Platten mit 100μg/ml Ampicillin kultiviert.

2.3.1. Vektoren zur Klonierung

pCRII	Amp ^R	(Stratagene, La Jolla, USA)
pCR 2.1	Amp ^R	(Stratagene, La Jolla, USA)
T-Vektor	Amp ^R	(Promega, Madison, USA)
pGEM [®] 3	Amp ^R	(Promega, Madison, USA)

2.3.2. Vektoren mit einklonierten Fragmenten

Sonden für den ‚RNase-Protection-Assay‘

Sonde RNB1: Diese Sonde ist 320bp lang und überspannt Exon 1 und Exon 2 des B₁R. Sie ist an Ratten-cDNA unter Verwendung der Primer: B1N5 (5`): 5`-CTCCCAAGACAGCAGTCACC-3` und B1N3 (3`): 5`-CAGATAGTGATGACGAAC C-3` amplifiziert worden. Das aus der Reaktion isolierte Fragment ist in den T-Vektor (2.3.1.) kloniert (3.1.8.2.) und mit einer T7-Polymerase-Reaktion transkribiert worden (3.2.4.). Die Sonde ist komplementär zu 192bp (Exon 2) bzw. zu 257bp (65bp Exon 1 und 192bp Exon 2) der B₁R-mRNA der Ratte. Die Sonde wurde selbst hergestellt (Anlage 7).

Sonde RNB2: Diese Sonde ist ein 337bp langes Fragment, was einen Teil von Intron 3 und Exon 4 des B₂R überspannt. Sie ist mit Hilfe von Ratten-cDNA mit den Primern: B2T5 (5`) 5`-CCTTCCTTGTG GCCCGAGG-3` und B2T3 (3`) 5`-CCAG GTAGATCTCAGCCAC-3` amplifiziert worden. Das entstandene Fragment ist in den T-Vektor (2.3.1.) kloniert (3.1.8.2.) und mit der T7-Polymerase transkribiert worden (3.2.4.). Die so entstandene Sonde ist komplementär zu 53bp des Introns 3 und zu 221bp des Exons 4 der B₂R-RNA der Ratte. Die Sonde wurde selbst hergestellt (Anlage 8).

Sonde MMB1: Die Sonde (354bp lang), welche 17bp von Intron 1 und 250bp der kodierenden Region des B₁R überspannt, ist an muriner cDNA unter Verwendung der Primer: MMB1N5 (5`): 5`-CTTTATTGTCTGGGATTAGACC-3` und MMB1N3 (3`): 5`-GGCGACGATGGTGGCAGCAG-3` amplifiziert worden. Das isolierte Fragment ist in den T-Vektor (2.3.1.) kloniert (3.1.8.2.) und mit einer SP6-Polymerase-Reaktion transkribiert worden (3.2.4.). Die Sonde ist komplementär zu 250bp der kodierenden Sequenz der B₁R-RNA der Maus und wurde selbst hergestellt (Anlage 9).

Sonde MMB2: Diese Sonde ist ein 334bp langes Fragment, was einen Teil von Intron 3 und Exon 4 des B₂R überspannt. Sie ist mit Hilfe von muriner cDNA mit den Primern: B2T5 (5`) 5`-CCTTCCTTGTGGCCCGAGG-3` und B2T3 (3`) 5`-CCAG GTAGATCTCAGCCAC-3` amplifiziert worden. Das entstandene Fragment ist in den T-Vektor (2.3.1.) kloniert (3.1.8.2.) und mit der T7-Polymerase transkribiert worden (3.2.4.). Die so entstandene Sonde ist 231bp zur B₂R-RNA der Maus komplementär und wurde selbst hergestellt (Anlage 10).

Sonde IL1β: Die Sonde (411bp) überspannt einen Teil der kodierenden Region von Interleukin-1β und wurde unter Verwendung der Primer: IL1βN5 (5`): 5`-CTTTTCCTTCATCTTTGAAG-3` und IL1βN3 (3`): 5`-AAAGAAGAAGATGGAAAA GC-3` an cDNA der Ratte amplifiziert. Das isolierte Fragment wurde in den T-Vektor (2.3.1.) kloniert (3.1.8.2.) und mit einer SP6-Polymerase-Reaktion transkribiert

(3.2.4.). Die Sonde ist komplementär zu 365bp der kodierenden Sequenz der IL1 β -RNA der Ratte und wurde selbst hergestellt (Anlage 11).

Sonde RNACE: Die 339bp lange Sonde überspannt einen Teil der kodierenden Region des Angiotensin-Converting-Enzyms. Mit Hilfe der Primer: ACE51 (5'): 5`-G GAATTCTTTACCTCGCTGG-3` und ACE31 (3'): 5`-GCCTCGTG GAAGCCAGGGTTGG-3` wurde die Sonde an Ratten-cDNA amplifiziert. Das so entstandene Fragment wurde in den T-Vektor (2.3.1.) kloniert (3.1.8.2.) und mit T7-Polymerase transkribiert (3.2.4.). Die Sonde ist komplementär zu 261bp der kodierenden Sequenz der ACE-RNA der Ratte. Die Sonde wurde selbst hergestellt (Anlage 12).

Sonde RNCol I: Dieses Konstrukt enthielt eine RNCol I-cDNA (Teilstück von Kollagen I der Ratte), die in den pGEM[®]3-Vektor (2.3.1.) kloniert (3.1.8.2.) und von Prof. Walther zur Verfügung gestellt wurde. Mit der SP6-Polymerase ist eine 418bp-lange radioaktive Probe transkribiert worden (3.2.4.), welche komplementär zu 315bp der RNCol I-RNA der Ratte ist (Anlage 13).

Sonde RNAT1: Dieses Konstrukt eines pGEM[®]3-Vektor (2.3.1.) enthielt eine Ratten AT1-Rezeptor-cDNA und wurde von Prof. Bader zur Verfügung gestellt. Mit einer T7-Polymerase-Reaktion ist eine 404bp-lange radioaktive Probe transkribiert worden (3.2.4.), die komplementär zu 352bp der AT₁-RNA der Ratte ist (Anlage 14). 3.2.4.), die komplementär zu 255bp der AT₁-RNA der Maus ist.

Sonde hKLK1: Diese Sonde ist 183bp lang und überspannt 163bp von Exon 3 und 20bp von Exon 4 des humanen Kallikrein-Gens. Sie ist in den pCRII-Vektor kloniert und mit dem Restriktionsenzym Eco RI geschnitten. Die Sonde wurde von PD Dr. Bader zur Verfügung gestellt (Anlage 15).

Sonde MMBNP: Dieses T-Vektor-Konstrukt (2.3.1.) enthielt eine BNP-cDNA der Maus, die 127bp des Exon 1 und 244bp des Exon 2 des BNP überspannt und wurde von Prof. Walther zur Verfügung gestellt. Mit einer T7-Polymerase-Reaktion ist eine 449bp-lange radioaktive Probe transkribiert worden (3.2.4.), die komplementär zu 371bp der BNP-RNA der Maus ist (Anlage 16).

Sonde GAPDH: Das pCR 2.1-Vektor-Konstrukt (2.3.1.) enthielt eine GAPDH-cDNA der Ratte und wurde schon von Tschöpe et al. (2000) beschrieben. Mit einer T7-Polymerase-Reaktion ist eine 197bp-lange radioaktive Probe transkribiert worden (3.2.4.), die komplementär zu 80bp der GAPDH-RNA ist (Anlage 17).

Sonde L32: Eine T7-Polymerase-Reaktion transkribierte eine 144bp-lange radioaktive Probe (3.2.4.), die komplementär zu 127bp der mRNA, die für das ribosomale Protein L32 kodiert, ist (kommerziell erworbenes Plasmid, PharMingen International, San Diego, USA).

Zusammenfassung der Genregulationsanalyse

Vektor	Insert	Insertlänge	Grundvektor	Linearisierung
RNB1	(Ratte) B ₁	257	T-Vektor	Not I/Sal I
RNB2	(Ratte) B ₂	264	T-Vektor	Not I/Sal I
MMB1	(Maus) B ₁	268	T-Vektor	Apa I/Sac II
MMB2	(Maus) B ₂	274	T-Vektor	Not I/Pst I
IL1β	(Ratte) IL1 β	365	T-Vektor	Apa I/Sac II
RNACE	(Ratte) ACE	267	T-Vektor	Not I/Pst I
RNCol I	(Ratte) Col I	315	pGEM [®] 3	Aat II
RNKLK	(Ratte) hKLK1	250	pCR II	Sac I
MMBNP	(Maus) BNP	371	T-Vektor	Not I/Pst I
MMAT1	(Maus) AT1	255	T-Vektor	Not I/Sal I
RNAT1	(Ratte) AT1	352	pGEM [®] 3	Sty I

Tab. 2.1 Übersicht über die Plasmide, die für Genexpressionsanalysen (4.1.3. bis 4.4.2.) genutzt wurden.

Sonden für den Southern-Blot

Sonde hKLK1: Diese Sonde ist 183bp lang und überspannt 163bp von Exon 3 und 20bp von Exon 4 des humanen Kallikrein-Gens. Sie ist in den pCRII-Vektor kloniert und mit dem Restriktionsenzym Eco RI rausgeschnitten. Die Sonde wurde von PD Dr. Bader zur Verfügung gestellt (siehe Anlage 15).

2.4. Antikörper

„Anti rat B₁R (A15C)“ Dieser polyklonale Antikörper wurde im Kaninchen generiert und von Prof. Jean-Loup Bascands, Institut Luis Bugnard (Toulouse, F), zur Verfügung gestellt. Dieser ist nicht kommerziell erhältlich.

„Anti rat B₂R“ Dieser Antikörper ist polyklonal, stammt aus dem Kaninchen und wurde von Prof. Samir El Dahr, School of Medizin, Institut für Pädiatrie und Physiologie (New Orleans, USA) zur Verfügung gestellt, da dieser nicht kommerziell erhältlich ist.

„Anti rabbit IgG (H+L)“ Dieser polyklonale sekundäre Antikörper ist biotinyliert und wurde kommerziell erworben bei der Fa. Jackson Immuno Research Laboratories Inc. (West Baltimore Pike, USA).

2.5. Zelllinien

CMC Kardiomyozyten wurden aus zwei bis drei Tage alten neonatalen Sprague-Dawley (SD)-Ratten (siehe 2.6.1.) isoliert und im spezifischen Medium (2.9.2.) kultiviert.

2.6. Tierversuche

2.6.1. Tierstämme

Die SD-Ratten und die C57BL/6-Mäuse wurden von Charles River (Sulzbach, BRD) bezogen. Alle ‚knockout‘-Mäuse wurden von Prof. Dr. Walther gezüchtet und stammen aus dem FEM, der Charité Campus Benjamin Franklin (Berlin-Lichterfelde).

TGR- α MHCAT1 Die TGR- α MHCAT1-Ratten wurden von Dr. Sigrid Hoffmann (Universitätsklinikum Mannheim) generiert und zur Verfügung gestellt (Hoffmann *et al.*, 1996).

TGR(hKLK1) Die TGR(hKLK1)-Ratten wurden von Prof. Bader (Silva *et al.*, 2000) (MDC, Berlin-Buch) generiert, von Prof. Walther gezüchtet und stammen aus dem FEM, Charité Campus Benjamin Franklin (Berlin-Lichterfelde).

B1^{-/-}(129xC57BL/6) Die B₁-Rezeptor-‚knockout‘-Mäuse wurden ebenfalls von PD. Dr. Bader generiert (Pesquero *et al.*, 2000).

B2^{-/-}(C57BL/6) Die B₂-Rezeptor-‚knockout‘-Mäuse wurden von Borkowski *et al.* (1995) produziert.

AT1KO^{-/-}(129xC57BL/6) Die AT₁-Rezeptor-‚knockout‘-Mäuse wurden von Ito *et al.* (1995) generiert.

Alle Tiere wurden unter standardisierten Bedingungen in einem künstlichen 12h Hell-Dunkel-Zyklus mit freiem Zugang zu Futter und Wasser gehalten. Sie wurden durch zervikale Dislokation getötet. Alle Tierversuche sind in Übereinstimmung mit dem „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals‘ published by the OPRR (Office for Protection against Research Risks) of the US National Institutes of Health, Washington, D.C. [NIH Publication No. 85-23, revised 1985]“ durchgeführt worden und von der Berliner Behörde (LAGetSi, Berlin) genehmigt worden.

2.6.2. Chirurgische Verbrauchsmaterialien

Braunülen

Vasofix G20	Braun Melsungen AG	(Melsungen, BRD)
Vasofix G18	Braun Melsungen AG	(Melsungen, BRD)

Alzet Osmopumpen

Modell 2001D	Charles River	(Sulzbach, BRD)
Modell 2ML1	Charles River	(Sulzbach, BRD)

Nahtfäden

P-1 Mersilene R697H, 6/0	Ethicon	(Brüssel, Belgien)
FS-1 Mersilene R7683H, 2/0	Ethicon	(Brüssel, Belgien)
FS-1 Mersilene R7683H, 3/0	Ethicon	(Brüssel, Belgien)

Diverses

Clip REF 523435	Weck Closure systems	(Houston, USA)
-----------------	----------------------	----------------

2.6.3. Chirurgische Instrumente und Geräte

Instrumente

Pinzetten

Modell 60-3878	Harvard	(Kent, UK)
Modell 52-2250 (Semken)	Harvard	(Kent, UK)

Nadelhalter

Modell 820-646-18 (De Bakey)	Harvard	(Kent, UK)
Modell 60-3987	Harvard	(Kent, UK)

Scheren

Modell 52-2557	Harvard	(Kent, UK)
Modell 52-2300 (Vannas)	Harvard	(Kent, UK)

Retraktoren

Modell 51-3168 (Weitlaner)	Harvard	(Kent, UK)
Modell 52-3738 (Alm)	Harvard	(Kent, UK)

Diverses

Clipzange Modell 523140	Weck Stainless	(Houston, USA)
Klemme 60-76493 (Baker)	Harvard	(Kent, UK)

Geräte

Beatmungsmaschine Ugo Basile, Typ 7025	FMI GmbH	(Seeheim, BRD)
Messwerterfassungssystem Digital, PowerLab/8s	Wiss Tech	(Speebach, BRD)
French Mikro-Tip-Katheder MTK 2.0	Millar Instruments Inc. (Houston, USA)	
Blutzuckermessgerät	Acutrend Sensor	(Roche, BRD)

2.6.4. Pharmaka

Chirurgische Eingriffe

Ketanest (Ketamin)	Parke-Davis GmbH	(Berlin, BRD)
Xylocain® 2%	Ceva Tiergesundheits GmbH	(Düsseldorf, BRD)
Tramadol	Ratiopharm GmbH	(Ulm, BRD)

Induktion von Diabetes mellitus

Streptozotocin	Sigma	(München; BRD)
----------------	-------	----------------

Pharmakologische Behandlungen

Quinapril (ACE-Inhibitor)	Pfizer	(Karlsruhe, BRD)
Angiotensin II	Bachem	(Weil, BRD)
Irbesartan (AT ₁ -R-Antagonist)	Parke-Davis GmbH	(Berlin, BRD)
PD123319 (AT ₂ -R-Antagonist)	Sigma	(München, BRD)
HMR 3480 (ICE-Inhibitor)	Aventis Pharma GmbH	(Frankfurt, BRD)

2.7. Enzyme und Radiochemikalien

DNA-modifizierende und Restriktions-Enzyme

Die Restriktions- und andere DNA-modifizierende Enzyme und die entsprechenden Puffer wurden von folgenden Firmen verwendet:

Amersham Buchler	(Braunschweig, BRD)
Gibco/BRL	(Bethesda, USA)
Promega	(Madison, USA)
Roche	(Mannheim, BRD)

Enzyme

DNase A	Roche	(Mannheim, BRD)
MMLV	Gibco/BRL	(Bethesda, USA)
Proteinase K	Sigma	(München, BRD)
Restriktionsenzyme	Amersham	(Braunschweig, BRD)
Reverse Transkriptase	Gibco/BRL	(Bethesda, USA)
RNasin	Promega	(Madison, USA)
RNase A	Roche	(Mannheim, BRD)
Taq-Polymerase	Gibco/BRL	(Bethesda, USA)
T4-DNA Ligase	Promega	(Madison, USA)

Radiochemikalien

Alle Radiochemikalien wurden von der Fa. Hartmann (Berlin, BRD) bezogen.

[α -³²P] dCTP 3000 Ci/mmol

[α -³²P] γ UTP 800 Ci/mmol

2.8. Geräte und Materialien zur Dokumentation

Geräte

Neben allgemeinen Laborgeräten fanden Anwendung:

β -Counter LS6000SC	Beckman	(Fullerton, USA)
Gel-Trockner	BioRad Laboratories	(München, BRD)
Gradienten-PCR	Eppendorf	(Hamburg, BRD)
Inkubator	Heraeus	(Osterode, BRD)
PCR-Maschine	Eppendorf	(Hamburg, BRD)
Phosphor-Imager FUJIX	FUJI	(Tokyo, Japan)
Spektralphotometer	Pharmacia	(Uppsala, Schweden)
Kryostat Jung CM 3000	Leica	(Bensheim, BRD)
Feuchte Kammer	Nalgene	(Hereford, UK)
Lichtmikroskop DMRD	Leica	(Bensheim, BRD)
Digitalkamera		
Color Vision Module XC-00P	Donpisha	(Tokio, Japan)

Materialien zur Dokumentation

Die Bildaufnahme der Agarosegele erfolgte über das Kamera- und Bildverarbeitungssystem der Fa. Biometra (Pleasanton, USA).

Die RPA-Gele wurden mit Hilfe des Phosphorimagersystems der Firma FUJI (Tokyo, Japan) eingelezen. Die Bildbearbeitung und Analyse wurde mit Hilfe des Computer-Programms „Tina 2.2“ durchgeführt.

Die Bildbearbeitung und Analyse der immunhistochemisch gefärbten Schnitte wurde mit Hilfe der Computer-Software „Lucia G 5.1a“ durchgeführt.

2.9. Medien

2.9.1. Bakterienkultur

Agarplatten	LB-Medium	1l	
	Agar	15g [1,5 %]	
Ampicillin-Platten	LB-Medium	1l	
	Agar	15g [1,5 %]	
	Ampicillin	100µg/ml	
IPTG/X-Gal-Platten	LB-Medium	1l	
	Agar	15g [1,5 %]	
	Ampicillin	100µg/ml	
	X-Gal	800µl (50mg X-Gal/800µl DMSO)	
	IPTG	200µl (200mg IPTG/ 1ml H ₂ O)	
LB-Medium	Hefeextrakt	5g	
	Bacto-Tryptone	10g	ad 1l pH 7,5 (NaOH)

2.9.2. Zellkultur

Als Standardmedium wurde DMEM verwendet. Die Medien, Zellkultur-Supplemente und Trypsin wurden von Gibco/BRL (Bethesda, USA) bezogen. Fetales Kälberserum (FCS) für die Zellkultur wurde vor Verwendung einem Wachstumstest unterzogen und erst nach positivem Befund bestellt (Gibco/BRL [Bethesda, USA]).

Spezielle Zellkultursupplemente wurden von folgenden Firmen genutzt:

Bromodeoxyuridin (BrdU)	Sigma	(München, BRD)
HBSS, Ca ²⁺ - und Mg ²⁺ -frei	Gibco	(Bethesda, USA)
HEPES	Gibco	(Bethesda, USA)
0,125% Trypsin-EDTA	Sigma	(München, BRD)

CMC-Zellen-Medium

DMEM (4,5 g/l Glukose)	400ml
FCS	50ml [=10%]
Penicillin [10000 U]/	
Streptomycin (10000µg/ml)	5ml [=1%]
BrdU (50mM)	0,1mM

2.10. Stammlösungen, Puffer und Gele

2.10.1. Stammlösungen und Puffer

Ampicillin	50mg/ml H ₂ O _{bidest}
Carbazol-Lösung	10ml (5mg 3-Amino-9-Ethylcarbazol/ml NN-Dimethylformamid) 35ml 200mM Na-Acetat 15ml 200mM Essigsäure 200ml H ₂ O _{bidest} 100µl 30% H ₂ O ₂ , unmittelbar vor Nutzung
Chlorform/Isoamylalkohol (CIAA)	24 Teile Chlorophorm : 1Teil Isoamylalkohol
Citratpuffer	0,1M Na-Citrat pH 4,5
DEPC-Wasser	0,1% Diethyl-Pyrocbonat - 37°C ün - autoklavieren
Ethidiumbromid	1mg/ml H ₂ O _{bidest}
GTE-Puffer	25mM Tris/HCl pH 8,0 25mM Glukose 10mM EDTA
Na-Acetat	3M Na-Acetat pH 5,5
Ohrloch-Puffer	10mM Tris pH 8,5 5mM EDTA pH 8,0 0,2% SDS 200mM NaCl
10xPBS	80g NaCl 2g KCl 11,5g Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 2g KH ₂ HPO ₄ ad 1l pH 7,2
Probenpuffer	4g Sucrose 2,5mg Bromphenolblau in 10ml TE
Proteinase K-Stammlösung	10mg/ml H ₂ O _{bidest}
RNase A-Stammlösung	4mg/ml in H ₂ O _{bidest}
SDS/NaOH-Lösung	1% SDS 0,2N NaOH

10xTAE	40mM Tris 40mM Acetat 1mM EDTA	pH 8,2
Tailpuffer	50mM Tris 100mM EDTA 100µM NaCl 1% SDS	
10xTBE	890mM Tris 890mM Borat 2mM EDTA	
10xTE	100mM Tris/HCl 10mM EDTA 8M Harnstoff	pH 8.0 pH 8.0

2.10.2. Gele

Agarosegel

Je nach Größe der zu erwartenden Fragmente wurden 1% oder 2% Agarosegele verwendet.

1%	2g Agarose (AGS, Heidelberg, BRD)	200ml 1xTAE-Puffer
2%	4g Agarose	200ml 1xTAE-Puffer

Um die Fragmente sichtbar zu machen, wurden auf 20ml Agarose-Lsg. 10µl EtBr-Stammlösung gegeben. Beim Southern-Blot wurden grundsätzlich 0,8% Gele verwendet.

PAA-Gel

Für ein 15% PAA-Gel sind angesetzt worden:

28,8g	UREA	(in 16ml H ₂ O bei RT lösen)
24,5ml	H ₂ O bidest	
6ml	10xTBE	
480µl	APS	
7,5ml	AA/BAA	
64µl	TEMED	

Nach Zugabe von TEMED wurde das Gel zügig gegossen und 2-3ml zurückbehalten, um überprüfen zu können, wann die Vernetzung des Gels abgeschlossen war.

2.11. Chemikalien

Die allgemein verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen genutzt:

Aldrich	(Steinheim, BRD)
Boehringer	(Mannheim, BRD)
Fluka	(Neu-Ulm, BRD)

Merck	(Darmstadt, BRD)
Pharmacia	(Uppsala, Schweden)
Promega	(Madison, USA)
Roth	(Karlsruhe, BRD)
SERVA	(Heidelberg, BRD)
SIGMA	(München, BRD)

Spezielle Chemikalien wurden von folgenden Firmen genutzt:

Agarose	Gibco/BRL	(Bethesda, USA)
Bacto-Trypton, Bacto-Agar	Becton Dickinson	(Le Port de Claix, F)
DEPC, 2-Mercaptoethanol	Sigma	(München, BRD)
Dimethylsulfoxid	Aldrich	(Steinheim, BRD)
dNTPs, Hexamere	Gibco/BRL	(Bethesda, USA)
Ethidiumbromid	Serva	(Heidelberg, BRD)
Hefe-Extrakt	Becton Dickinson	(Le Port de Claix, F)
Phenol	Roth	(Karlsruhe, BRD)
Tissue Tek [®]	Sakura-Finetek	(Zoeterwoude, NL)
TRizol [®]	Sigma	(München, BRD)
Hämalaun nach Mayer	Sigma	(München, BRD)

2.12. Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

5' Race-Kit	Boehringer	(Mannheim, BRD)
3' Race-Kit	Boehringer	(Mannheim, BRD)
Long range Kit	Boehringer	(Mannheim, BRD)
Prime-It-Labeling Kit	USB	(Cleveland, USA)
Qiagen-Maxikit	Qiagen	(Hilden, BRD)
RPA-Kit	Ambion	(Austin, USA)
Transkriptionskit	Stratagene	(La Jolla, USA)
Avidin- Biotin-Blocking-Kit	Vector	(Burlingame, USA)
Vectastain [®] Elite ABC-Kit	Vector	(Burlingame, USA)