

## 2. Material

### 2.1 Geräte, Software, Verbrauchsmaterial

#### Verbrauchsmaterial

96-well-Mikrotiterplatten, durchsichtig	TPP
96-well-Mikrotiterplatten, weiß	Nunc
96-well-Zellkulturplatten	TPP
96-well-Reaktionsplatten	Applied Biosystems, MicroAmp™
Autoradiographiefilm	Amersham Life Sciences, Hyperfilm™ECL
Blotpapier	Bio-Rad, extra thick blot paper
Cryo-Röhrchen	Greiner
Deckgläser	Menzel
Einmalpipetten (5ml, 10ml, 25ml)	Greiner
Falcon-Röhrchen (15ml, 50mL)	TPP
gestopfte Spitzen	Star Lab
Gummischaber	TPP
Multipipette	Eppendorf
Nitrocellulosemembran	Amersham Biosciences, Hybond™ -C
Objektträger mit Kammern	Nunc, Lab-Tek Chamber Slide™ System
Verschlusskappen	Applied Biosystems, Optical Caps™
Petrischalen	TPP
Pipettenspitzen	Greiner
Reaktionsgefäße (0,5ml; 1,5ml; 2ml)	Eppendorf
Spritzen (2,5ml, 10ml)	Eppendorf
Zellkulturschalen	TPP

#### Geräte

37°C Inkubator	Merck, Cultura Mini Incubator
A.dest.-Anlage	Millipore
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Heraeus Instruments
Elektrophoresekammer	Bio-Rad

---

Elektrophoresezubehör	Bio-Rad
Entwicklungsgerät	AGFA, CURIX 60
Expositionskassetten	Kodak, X-Omatic
Gefrierschrank -20°C	Liebherr
Gefrierschrank -80°C	New Brunswick Scientific
Gelgießvorrichtung	Bio-Rad
Kühlschrank	Bosch
Lichtmikroskop	Nicon Eclipse TS 100
Magnetrührer	IKA Labortechnik
Multipipette	Eppendorf
Neubauer-Kammer	Optik Labor
Operationsbesteck	Aesculap
pH-Meter	Beckman
Pipetten	Eppendorf
Rundschale mit Gefrierlösung	Nalgene, Cryo 1°C Freezing Container
Schwenker	Heidolph Duomax 1030, Heidolph Polymax 1040
Semi-Dry-Transfereinheit	Bio-Rad, Trans-Blot®SD
Spannungsgeber	Bio-Rad, Power-Pac 200
Standzentrifuge	Eppendorf, Centrifuge 5804 R
Sterilbank	Integra Biosciences, Technoflow
Stickstofftank	Linde
Thermoblock	Techne
Thermomixer	Eppendorf, Comfort
Tischzentrifuge	Eppendorf, Centrifuge 5417R
Vortex Mixer	Neo Lab
Waage (0,001g-110g)	Sartorius
Waage (0,01g – 1500g)	Sartorius
Wasserbad	Köttermann
Zentrifuge	Sigma, Laboratory Centrifuges 4K15
GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems
ELISA Mikroplatten-Lesegerät	Biorad, Modell 680

Instrumente und Software

Adobe Photoshop 7.0	Adobe
Applied Biosystems 7700 Sequence Detector	Applied Biosystems
Axio Version 3.0 Software	Zeiss
Axioplan-2 Mikroskop	Zeiss
BD CellQuest Pro Software	Becton Dickinson
BD FACScan Zytometer	Becton Dickinson
GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array	Affymetrix
Lasersharp 4.2 Software	Biorad
Magellan 3.0 Software	Tecan, MTX Lab Systems, Inc.
MRC 1024 Laserscan-System	Biorad
Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer	NanoDrop Technologies Inc.
NIH Genomic BLAST-Program	National Institutes of Health
NIH Scion Image	National Institutes of Health
Nikon Diaphot 300 Invertmikroskop	Nikon
Primer Express Version 2.0 Software	Applied Biosystems
Sequence Detection System Version 1.7 Software	Applied Biosystems
SpectraFluor Plus	Tecan, MTX Lab Systems, Inc.

**2.2 Chemikalien**

Aceton	Merck
Ammoniumpersulfat	Merck
BrdU	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Roth
BSA	Sigma-Aldrich
Chloroform	Roth
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich
dNTP-Mischung	Promega
EDTA	Sigma-Aldrich
Ethanol, absolut	Merck
Glycerol, wasserfrei	Merck
Glycin	Merck

---

HEPES	Gibco BRL
Kaliumhexacyanoferrat (II)	Sigma-Aldrich
Kaliumhexacyanoferrat (III)	Sigma-Aldrich
lineares Acrylamid	Ambion
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck
Methanol	Roth
Natriumchlorid	Merck
Natrium-Desoxycholat	Sigma-Aldrich
Nonidet P40	Roche Molecular Biochemicals
Paraformaldehyd	Merck
Pepton aus Casein	Roth
SDS	Merck
TEMED	Roth
Tris-Base	Roth
Tris-HCl	Roth
Trizol®Reagent	Invitrogen
Tween® 20	Roth
X-Gal	Promega
Zitronensäure-Monohydrat	Roth
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich

### 2.3 Biologisches Material

#### Enzyme und Enzyminhibitoren

Complete-Tabletten	Roche Molecular Biochemicals
DNA-Polymerase I	Promega
DNase I	Sigma-Aldrich
E.coli DNA-Ligase	Invitrogen
Elastase Typ IV	Sigma-Aldrich
Kollagenase Typ I	Worthington Biochemical Corporation
Phosphatase-Inhibitor-Cocktail	Sigma-Aldrich
T4-DNA-Polymerase	Promega

Antikörper

Spezifität	Klon/Kopplung	Spezies	Isotyp	Firma
p21 <sup>Cip1</sup>	F-5	Maus	IgG, mk	Santa Cruz
p27 <sup>Kip1</sup>	C-19	Kaninchen	IgG, pk	Santa Cruz
Cyclin D1	C-20	Kaninchen	IgG, pk	Santa Cruz
Cyclin E	M-20	Kaninchen	IgG, pk	Santa Cruz
Cyclin A	H-432	Kaninchen	IgG, pk	Santa Cruz
cdk2	M2	Kaninchen	IgG, pk	Santa Cruz
Kaninchen IgG	HRP	Ziege	IgG, pk	Jackson Immuno- Research
Maus IgG	HRP	Ziege	IgG, pk	Jackson Immuno- Research
Anti-BrdU-FITC	B44	Maus	IgG, pk	Becton Dickinson
$\alpha$ -Glattmuskel- Actin	1A4	Maus	IgG, pk	Dako
Maus Ig	Alexa Fluor 488	Ziege	IgG, pk	Invitrogen

Tiere

NMRI- und C57BL/6-Mäuse wurden von Charles River Laboratories bezogen. Id2<sup>+/-</sup> und Id2<sup>-/-</sup> Mäuse mit NMRI-Hintergrund stammen aus der Eigenzucht des Max-Delbrück-Centrums, Berlin. Für die Tötung der Tiere lag der Tierschutzantrag 153/03 der zuständigen Behörde vor.

**2.4 Lösungen, Puffer, Medien**

0,05% Trypsin-EDTA

Gibco BRL

4 %ige Trypanblaulösung

Sigma-Aldrich

5x Zweitstrangpuffer

Invitrogen

7,5M Ammoniumacetat-Lösung

Sigma-Aldrich

Bio-11-CTP

Enzo Diagnostics

Bio-16-UTP

Enzo Diagnostics

Detectionslösung 1	Pierce
Detectionslösung 2	Pierce
DMSO	Sigma-Aldrich
EGF-basic	Biochrom
Fetales Rinderserum (FBS)	Biochrom
FGF-basic	Biochrom
Fluka®-Wasser (Biochemika)	Sigma-Aldrich
Molekulargewichtsmarker	Bio-Rad
PBS mit Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	Gibco BRL
PBS ohne Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	Gibco BRL
Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol	Gibco BRL
Ponceau-Färbelösung	Sigma-Aldrich
qPCR MasterMix Plus for SYBRGreen I	Eurogenteq
qPCR Mastermix Plus	Eurogenteq
Rinderinsulin	Sigma-Aldrich
RNase H	Promega
Roti®-Quant	Roth
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Roth
rRNasin®Ribonuclease Inhibitor	Promega
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
SmBM® Zellkulturmedium	Clonetics®; Lonza

### Medien

Vollmedium	20 % (v/v) FBS 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin 0,5 µg/l EGF 2 µg/l FGF 5 mg/l Insulin in SmBM® Zellkulturmedium
Mangelmedium	1% Penicillin/Streptomycin in SmBM® Zellkulturmedium

---

Einfrriermedium	10% (v/v) DMSO 90% (v/v) FBS
Einbettmedium	Polysciences, Aqua-Poly/Mount
DAPI-Einbettmedium	Vector
<u>Puffer</u>	
Verdauungspuffer:	0,5 mg Elastase Typ IV 1,5 mg Kollagenase Typ I in 1 ml PBS, bestehend aus 2/3 PBS ohne Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> 1/3 PBS mit Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>
RIPA-Lysepuffer:	950 µl RIPA-Puffer 50 µl Complete-Lösung 10 µl Phosphatase-Inhibitor-Cocktail
RIPA-Puffer:	50 mM Tris pH 8,0 150 mM NaCl 0,5 % Natrium-Desoxycholat 0,1 % SDS 1 % NP40
Complete:	1 Tablette gelöst in 2 ml PBS ohne Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>
Bradfordlösung:	16,5 ml A.dest. 6,0 ml Roti®-Quant
SDS-Probenpuffer	350 mM Tris-HCl pH 6,8 10 % SDS ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> 45 % Glycerol 0,012 % Bromphenolblau 6 % β-Mercapthoethanol

10x Laufpuffer	1M Tris-Base 1M HEPES 1% SDS
1x Laufpuffer	10% (v/v) 10x Laufpuffer in A.dest.
Transferpuffer	50 mM Tris-Base 40 mM Glycin 3,75 % SDS 20 % (v/v) Methanol
10x TBS	200 mM Tris-Base pH 7,6 1,37 M NaCl
1x TBST	10 % (v/v) 10x TBS in A.dest. 0,1 % Tween®20
Detektionslösung	Detektionslösung 1 (Peroxid-Lösung) Detektionslösung 2 (Luminol-Lösung) im Verhältnis 1:1
Stripping-Lösung	1 % Tris-HCl pH 6,7 2 % SDS 0,5 mM $\beta$ -Mercaptoethanol

	Sammelgel	10%iges Trenngel	12%iges Trenngel
A.dest.	1,4 ml	1,9 ml	1,6 ml
30% Acrylamidmix (Rotiphorese® Gel 30)	0,33 ml	1,7 ml	2,0 ml
1,0 M Tris (pH 6,8)	0,25 ml	—	—
1,5 M Tris (pH 8,8)	—	1,3 ml	1,3 ml
10% SDS	0,02 ml	0,05 ml	0,05 ml
10% APS	0,02 ml	0,05 ml	0,05 ml
TEMED	0,002 ml	0,002 ml	0,002 ml



---

Fixierlösung:	4 % Paraformaldehyd/PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$
Färbelösung	2 mM Magnesiumchlorid 150 mM Natriumchlorid 40 mM Zitronensäure 80 mM Dinatriumhydrogenphosphat 5 mM Kaliumhexacyanoferrat (III) 5 mM Kaliumhexacyanoferrat (II) 1 mg/ml X-Gal, gelöst in DMF pH 6
DNase-Lösung:	25 $\mu\text{l}$ 4% BSA/A.bidest. 50 $\mu\text{l}$ 2x DNase-Pufferlösung 2 $\mu\text{l}$ DNase-Verdünnung
2x DNase Pufferlösung:	1 $\mu\text{l}$ 1M Mercaptoethanol 595 $\mu\text{l}$ 100mM Tris-HCl pH 8,1 66 $\mu\text{l}$ 10mM $\text{MgCl}_2$ 338 $\mu\text{l}$ A.bidest.
DNase-Verdünnung:	1,0 mg DNase gelöst in 0,5 ml A.bidest. 0,5 ml Glycerol
FACS-Puffer:	10 mM HEPES 10 mM EDTA pH8 2% FBS in PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$

## 2.5 Synthetische Oligonukleotide

Random Primers

Invitrogen

T7-Oligo-dT-Promotor Primer

Biotex

5'-GGC CAG TGA ATT GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGG CGG-(dT)24-3'

Gen	Primer/ Sonden	Sequenz (5' → 3')
Id2	vorwärts	AGA ACC AGG CGT CCA GGA C
	rückwärts	CTG CAA GGA CAG GAT GCT GA
	Sonde	6-FAM- CGC TGA CCA CCC TGA ACA CGG AC -TAMRA
p21 <sup>Cip1</sup>	vorwärts	GGT GGG CCC GGA ACA T
	rückwärts	GCG CTT GGA GTG ATA GAA ATC TG
p16	vorwärts	GCC GCA CCG GAA TCC T
	rückwärts	TTG AGC AGA AGA GCT GCT ACG T
Colla1	vorwärts	AGG GTG CTC GTG GAT TGC
	rückwärts	AAG CCT CGG TGT CCC TTC A
Acta2	vorwärts	GAT GCT CCC AGG GCT GTT T
	rückwärts	CCA ACC ATT ACT CCC TGA TGT CT
BMP4	vorwärts	TGG GCT GGA ATG ATT GGA TT
	rückwärts	CCC CAT GGC AGT AGA AGG C
GADPH	vorwärts	GGC AAA TTC AAC GGC ACA GT
	rückwärts	AGA TGG TGA TGG GCT TCC C
	Sonde	6-FAM- AAG GCC GAG AAT GGG AAG CTT GTC ATC- TAMRA

## 2.6 Kits

ATPLite® Luminescence Assay System	Perkin Elmer
enthält	Säugetier-Zellysepuffer Substrat-Pufferlösung lyophilisiertes Substrat (Luciferase/Luciferin) Ansatz: Das Substrat wurde in 25ml Substrat-Pufferlösung gelöst
RNeasy Mini Kit	Qiagen
enthält:	RLT-Puffer RW1-Puffer RPE-Puffer RNeasy Mini-Spinsäulen RNase-freies Wasser
RNase-Free DNase Set	Qiagen
enthält:	DNase I, RNase frei RDD-Puffer RNase-freies Wasser
Superscript™ III Reverse Transcriptase	Invitrogen
enthält:	Superscript™ III Reverse Transcriptase 5x Erststrang-Puffer 0,1 M DTT
RNeasy Mini Kit	Qiagen
enthält:	RNeasy Mini-Spinsäulen Reaktionsgefäße RLT-Puffer (Zugabe von $\beta$ -Mercaptoethanol) RW1-Puffer RPE-Puffer (Zugabe von Ethanol) RNeasy Mini-Spinsäulen RNase-freies Wasser

QIAshredder Spinsäulen

Qiagen

Phase Lock Gel™ Light

Eppendorf

MEGAscript® T7 Kit

Ambion

enthält: T7-Enzym Mischung  
10x Reaktionspuffer  
ATP-Lösung  
CTP-Lösung  
GTP-Lösung  
UTP-Lösung

Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA<sup>PLUS</sup>

Roche Applied Science

enthält: Lyse-Reagenz  
2x Reaktionsmischung bestehend aus einer Lösung von  
biotinyliertem Telomerase-Substrat P1-TS,  
optimiertem Anker-Primer P2, Nukleotiden und Taq DNA-Polymerase  
Interner Standard mit 0,001 amol/μl 216 bp interner Standard DNA  
Kontroll-Template, gering konzentriert (0,001 amol/μl)  
Kontroll-Template, hoch konzentriert (0,1 amol/μl)  
Nuclease-freies Wasser  
Denaturierungsreagenz  
Hybridisierungspuffer T  
Hybridisierungspuffer IS  
10x Waschpuffer  
Anti-DIG-HRP, polyklonaler Antikörper vom Schaf, HRP-konjugiert  
Konjugat-Lösungspuffer  
TMB Substrat-Lösung  
Stopp-Reagenz  
Mikroplatte, beschichtet mit Streptavidin und Blocking-Reagenz  
Abdeckfolien