

## 5 Material

### 5.1 Chemikalien

Salze und Puffersubstanzen wurden in analytischer Qualität von den Firmen Invitrogen (Karlsruhe, D), Merck (Darmstadt, D), Roth (Karlsruhe, D) und Sigma (München, D) bezogen. Lösungen und Lösemittel wurden bei den Firmen J.T. Baker (Deventer, NL), Merck (Darmstadt, D), Roth (Karlsruhe, D) und Sigma (München, D) gekauft. Gase stammen von der Firma Linde (Berlin, D). Enzyme für die Molekularbiologie wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe, D) gekauft.

Spezielle Chemikalien wurden von den unten aufgelisteten Firmen bezogen:

N-octanoylsphingosin (C <sub>8</sub> -Ceramid)	Biotrend (Köln, D)
N-octanoylsphinganin (C <sub>8</sub> -Dihydroceramid)	Biotrend (Köln, D)
Agarose	Roth (Karlsruhe, D)
Dioleoyl-Phosphatidylcholin	Sigma (München, D)
DNA-Marker (ΦX174 / Hae III Fragmente)	Invitrogen (Karlsruhe, D)
High DNA Mass <sup>TM</sup> Ladder	Invitrogen (Karlsruhe, D)
N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(3-propanesulfonic acid) (EPPS)	Sigma (München, D)
Ethidiumbromid	Biomol (Hamburg, D)
Leupeptin	Sigma (München, D)
Pepstatin	Sigma (München, D)
Phenylmethylsulfonflourid (PMSF)	Sigma (München, D)
Super Signal Chemilumineszenz Reagenz	Perbio (Weiskirchen, D)
Sulfatide	Sigma (München, D)
UDP-[ <sup>14</sup> C]-Glukose (U)	Biotrend (Köln, D)

## 5.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien wurden von den folgenden Firmen bezogen:

Hochauflösende Dünnschichtchromatographie-Platten	Merck (Darmstadt, D)
Nitrozellulosemembran für Proteine	Schleicher & Schüll (Dassel, D)
Nitrozellulosemembran für RNA (GeneScreen Plus)	Perkin Elmer Life Sciences (Zaventem, B)
Turbo Blotter GB Set	Schleicher & Schuell (Dassel, D)
Wissenschaftlicher Film X-OMAT AR	Kodak (Stuttgart, D)
Röntgenfilm T-MAT Plus DL	Kodak (Stuttgart, D)
Szintillationscocktail (OptiPhase Supermix)	PerkinElmer Wallac (Freiburg, D)
Szintillations-Röhrchen	Perkin Elmer Wallac (Freiburg, D)
Whatman 3MM Filterpapier	Schleicher & Schuell (Dassel, D)

### 5.3 Zellkulturmaterialien

Die für die Kultivierung der Zellen benötigten Materialien wurden von folgenden Firmen gekauft:

6-Loch- / 24-Loch- / 96-Lochplatten	Sigma (München, D)
Basic fibroblast growth factor (bFGF)	Roche Diagnostics (Mannheim, D)
Choleratoxin	Calbiochem (,D)
Dulbecco´s Modification of Eagles Medium (DMEM)	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Fötales Rinderserum (FCS)	Biochrom Seromed (Berlin, D)
Geniticinsulfat (G418)	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Hydrocortison	Sigma (München, D)
Hygromycin B	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Insulin	Sigma (München, D)
Kochsalzlösung (0,9 % w/v)	Boehringer Ingelheim (,D)
MCDB 153	Biochrom Seromed (Berlin, D)
Penicillin / Streptomycin	Biochrom Seromed (Berlin, D)
Serologische Pipetten	Corning (Wiesbaden, D)
Rinderhypophysenextrakt (BPE)	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Spritzenvorsatzfilter (0,2 µm)	B. Braun (Melsungen, D)
Sterilfilter (0,2 µm)	Roth (Karlsruhe, D)
apo-Transferrin	Sigma (München, D)
Trypsinpulver (1:250)	Biochrom Seromed (Berlin, D)
Trypsinlösung (0,25 %)	Biochrom Seromed (Berlin, D)
Zellkulturflaschen	Nunc (Wiesbaden, D)
Zentrifugenröhrchen	Sarstedt (Nümbrecht, D)

## 5.4 Zellen

### 5.4.1 Zelllinien

Die Zelllinien A-375 (Giard *et al.*, 1973), Bro (Lockshin *et al.*, 1985) und Mel-HO (Holzmann *et al.*, 1988) stammen von primären Tumoren. Die Zelllinie Mel-2A (Bruggen *et al.*, 1981) stammt von Metastasen. Bei der Zelllinie 303AG7 handelt es sich um stabil pTet-On-transfizierte Bro-Zellen. Bei der Zelllinie 502-1 handelt es sich um stabil Bcl-2-überexprimierende Zellen. Das Bcl-2-Gen steht dabei unter der Kontrolle des Tet-On-Gen- Expressions-Systems (BD Biosciences Clontech, Heidelberg, D).

### 5.4.2 Primäre Zellen

Primäre Melanozyten wurden aus Vorhäuten isoliert und maximal zwei Passagen in Kultur gehalten.

## 5.5 Antikörper

Der polyklonale Antikörper gegen die humane UDP-Glukose:Ceramid-Glukosyltransferase (SA-7061) wurde von der Firma Eurogentec (Köln, D) hergestellt. Hierfür wurden aus der Proteinsequenz zwei Peptide ausgewählt, die einem Bereich nahe des N-terminalen Endes (Aminosäuren 33–45, IRLHLNKKK AIDKC) und dem C-terminalen Ende (Aminosäuren 383–394, ACGGTAE EILDV) des Proteins entsprechen.

anti-Aktin (Maus)	Sigma (München, D)
anti-Hase gekoppelt mit Pferdeoxidase (Ziege)	Dako (Hamburg, D)
anti-Maus Bcl-2 (Hase)	Loxo (Dossenheim, D)
anti-Maus gekoppelt mit Pferdeperoxidase (Ziege)	Dako (Hamburg, D)

## 5.6 Primer

Alle Primer wurden bei Tib Molbiol (Berlin, D) synthetisiert. Sequenzen, Annealing Temperatur und Amplicon Länge und eingesetzte Konzentration sind in der Tabelle unten angegeben.

Name	Sequenz	Annealing Temperatur	Amplicon	Konzentration	Zyklen
GluC	5'-gTA ATT CCA gAT ACg CTT AC  5'-gTT ATT TCg TAg TTT ggT CC	50 °C	402 bp	0,6 µM	25
Ribo S9	5'-gAg ACA ATC CAg CAg CCC Agg Agg gAC A  5'-gAT gAg AAg gAC CCA Cgg CgT CTg TTC	45 °C	431 bp	0,4 µM	20

## 5.7 Gene

Das Gen für die human UDP-Glukose:Ceramid-Glukosyltransferase wurde bei ATCC (Manassas, VA, USA) gekauft.

## 5.8 Vektoren

Die Vektoren pTet-ON, pTRE und pTK-Hyg wurden von der Firma BD Biosciences Clontech (Heidelberg, D) bezogen.

## 5.9 Geräte

Brutschrank	B15	Heraeus (Osterode, D)
CO <sub>2</sub> Brutschrank	BB16	Heraeus (Osterode, D)
β-Counter	1450 Microbeta Trilux	Perkin Elmer Wallac (Freiburg, D)
Densitometer	GS-700	BioRad (München, D)
Elektrophoresekammern	GNA-200	Amersham Biosciences (Freiburg, D)
	Mini Protean II Zelle	BioRad (München, D)
	Mini Sub Zelle	BioRad (München, D)
ELISA-Photometer	Model 550	BioRad (München, D)
Gel Dokumentationseinheit		Polaroid (offenbach, D)
PCR-Gerät	Gene Amp PCR System 2400	Perkin Elmer (Weiterstadt, D)
Heizplatte		CAMAG (Berlin, D)
Inkubationsschüttler	Aerotron AI 18	Infors (Bottmingen, CH)
Magnetrührer	MR 2000	Heidolph (Kehlheim, D)
Mikroskop	Diavert	Leitz (Wetzla, D)
Mikrowellenofen	Privileg 8017	Quelle (Furth, D)
Mixer	Thermomixer comfort Vortex IKA VF2	Eppendorf (Hamburg, D) Jahnke & Kunkel (Staufen i. Br., D)
Netzteile	ECP 3000/150	Amersham Biosciences (Freiburg, D)
Probeneindampfer	Reaktitherm III	Perbio (Weiskirchen, D)
Schüttler	WT 17	Biometra (Göttingen, D)
Sterile Werkbank	BSB 4A	Gelaire Flow Laboratories (Opera, I)
Trockenofen	T6	Heraeus (Osterode, D)
Ultraschallstab	Sonoplus	Bandelin (Berlin, D)
Waagen	474 1419	Kern (Albstadt, D) Sartorius (Göttingen, D)
Wasserbad	1002	GFL (Burgwedel, D)

---

Zentrifugen	Biofuge fresco	Heraeus (Osterode, D)
	Biofuge pico	Heraeus (Osterode, D)
	Labofuge 400E	Heraeus (Osterode, D)
	J2-21	Beckmann (München, D)