

Bakterien

- Top 10 F Arbeitskreis

Enzyme

- BamH I MBI
- EcoR I MBI
- DNA-Polymerase „Advantage™ KlenTaq Polymerase Mix“ Clontech
- DNA-Polymerase I (Klenow) New England BioLabs
- Nco I MBI
- Reverse Transkriptase SuperScript™ II GibcoBRL
- Shrimp Alkaline Phosphatase Amersham
- T4 DNA Ligase New England BioLabs

Feinchemikalien

- 4 Hydroxitamoxifen (Stammlösung in absolutem Ethanol) Sigma
- Dihydroethidium (HE) [3,8-Diamino-5,6-dihydro-5-ethyl-6-phenyl-phenanthridin].
Stammlösung: 0,2 M in DMSO, Lagerung bei -20°C. Fluka
- DMSO (Dimethyl Sulfoxid) SIGMA®
- DEPC (Diethylpyrocarbonat) SIGMA®
- EDTA Roth
- Percoll Pharmacia
- Tris Roth
- Trypanblau Sigma

Filmmaterial

- “x-ray RETINA” XBD, medizinischer Röntgenfilm Fotochemische Werke GmbH

Medien

Für

<u>Zellen:</u>	RPMI⁺	
	RPMI 1640	Haus bzw. GibcoBRL
	supplementiert mit	
	Glutamin (0,07 %)	
	nicht essentiellen Aminosäuren (1:100)	GibcoBRL
	Natriumpyruvat (1:100)	GibcoBRL
	Fötalem Kälberserum (5%, hitzeinaktiviert*)	GibcoBRL
	β -Mercaptoethanol (5×10^{-5} M)	GibcoBRL
	Penicillin (0,025 %)	Apotheke
	Streptomycin (0,025%)	Apotheke
	* 30 min bei 56°C	

Bakterien: **LB-Medium** (Fertigmedium: GibcoBRL)
Agarplatten LB-Medium mit 1,5% Agar-Agar (Roth)

Gebrauchsfertige Lösungen und Kits

- DNA Präparation:	
Kits für DNA Mini- bzw. Maxipräparation	QIAGEN
- DNA-Aufreinigung:	
GENECLEAN [®] III Kit	Bio 101, Inc.
- RNA-Isolierung:	
TRIzol [®] Reagens	GibcoBRL
- RNase Protektionen:	
RiboQuant [®] Kit	Pharmingen

Oligonukleotide

Sequenzen von 5' nach 3':

- **Primer für A1** (GibcoBRL):

5': CGC GGA TCC ACC ATG GCT GAG TCT GAG CTC ATG

3': CGC GGA TCC GTG TTA CTT GAG GAG AAA GAG

- **Primer für Caspase 7** (GibcoBRL):

5': GCA GAC GAA TTC GCG CCA CCA TGA CCG ATG ATC AGG ACT GTG

3': GGA GTC GAA TTC TCA CGG ATC CCG ACG GCT GAA GTA CAG CTC TTT G

Plasmide bzw. Vektoren

Überexpression von A1, cMyc-ER und Caspase 7

Das hier verwendete bicistronische, retrovirale Vektorplasmid pEYZ/MCS (Abb.3C) basiert auf dem retroviralen Vektor pczCFG2 hCD8 IEYZ (Das Konstrukt enthält eine humane CD8-cDNA (hCD8) als Insert - Dirk Lindemann, unveröffentlicht bzw. [116] -).

In diesem Konstrukt ersetzt der CMV enhancer die U3 Region im 5'LTR des zugrunde liegenden Murine Lukemia Virus (MuLV). In transduzierten Zielzellen sorgt eine sogenannte IRES (Internal Ribosomal Entry Site) für die gekoppelte Expression von chimärem Markergenprodukt aus Gelbfluoreszenzprotein (Enhanced Yellow Fluorescence Protein; EYFP) und Zeocin Resistenzprotein auf der einen Seite und Testgen auf der anderen Seite. Dies geschieht infolge der reversen Transkription nun in Abhängigkeit von MuLV-LTR. Die IRES stammt vom Encephalo-Myocarditis Virus [116].

Um hieraus pEYZ/MCS herzustellen war das Testgen (hCD8) durch ein Oligonukleotid ersetzt worden (Diplomarbeit von Carolin Schlegel)⁴, welches Schnittstellen für EcoR I, Sma I und BamH I enthält (multiple cloning site; MCS).

Analog war ein Vektor mit grüner Fluoreszenz und G418 Resistenzprotein erzeugt worden. Dadurch war es möglich – aufgrund der verschiedenen Resistenzen und unterschiedlichen Absorptionsmaxima der chimären Marker – Zellen doppelt zu transduzieren und anschließend zweifach positive Populationen zu identifizieren und zu isolieren.

⁴ Schlegel, C. 1999 Diplomarbeit "Klonierung retroviraler Vektoren mit Fluoreszenzproteinen als Selektionsmarker"

Die A1 (A1-a[117]) cDNA wurde durch reverse Transkription (siehe 3.2.4) von RNA aus WEHI 231 Zellen und anschließende PCR (siehe 3.2.5) gewonnen. Die cDNA wurde dann am Amino-Terminus über eine Nco I Schnittstelle um ein Oligonucleotid verlängert, das die Information für ein sog. "Flag"-Peptid (N-Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-C) enthält. Dieses Konstrukt wurde dann über die Schnittstellen für EcoR I und BamH I in die MCS von pEYZ/MCS eingefügt (pEYZ/FmA1).

Die cDNA für cMyc-ER⁵ (Arbeitskreis) wurde über die EcoR I-Schnittstelle in die MCS von pEGN/MCS eingefügt. Die cDNA für Caspase 7 wurde mittels PCR aus einem reversen Transkriptionsprodukt von WEHI 231 RNA gewonnen und ebenfalls über die EcoR I-Schnittstelle in die MCS in pEGN/MCS eingefügt.

Überexpression von SEAP (Secreted form of human placental alkaline phosphatase)

Plasmid aus dem Arbeitskreis

Überexpression eines NFκB-abhängigen Luciferasereporters

Plasmid aus dem Arbeitskreis

Puffer und Lösungen

BSS 1 (10x) 10,0 g Glucose
 0,6 g KH₂PO₄
 2,3 g Na₂HPO₄ x 2H₂O
 0,1 g Phenolrot
 H₂O ad 1 l; Sterilfiltrieren!

BSS 2 (10x) 1,86 g CaCl₂ x 2H₂O
 4,0 g KCl
 80,0 g NaCl
 2,0 g MgCl₂ x 6 H₂O
 2,0 g MgSO₄ x 7 H₂O
 H₂O ad 1 l; Sterilfiltrieren!

⁵ Littlewood et al., 1995 *Nucleic Acids Res* **23**: 1686

BSS (Gebrauchslösung):	1 Vol. BSS 1 1 Vol BSS 2 8 Vol. H ₂ O Sterilfiltrieren!
MOPS (10x)	0,1 M MOPS (3-(N-morpholino)propansulfonsäure), pH= 7,0 40 mM Natriumacetat 5 mM EDTA, pH=8,0
PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung):	10 l-Ansatz in H ₂ O: 8,0 g NaCl 0,2 g KCl 1,15 g Na ₂ HPO ₄ 2,0 g KH ₂ PO ₄ 1,67 g CaCl ₂ 1,0 g MgCl ₂ 0,1 g BSA (Rinderserumalbumin)
SSPE	3,6 M NaCl 0,2 M NaH ₂ PO ₄ 0,02 M EDTA [Ethylendiamin-tetraessigsäure] pH = 7,4 (einstellen mit NaOH aq)
SSC	3,0 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat pH = 7 (einstellen mit HCl aq)
TAE (50x)	2 M Tris-Base 2 M Essigsäure 100 mM EDTA pH = 7,8 (einstellen mit Essigsäure)

TBE (5x) 445 mM Tris
 445 mM Borsäure
 25 mM EDTA

Radioaktivität

[α - ³² P] UTP	(3000 Ci/mmol)	Amersham
[α - ³² P] dCTP	(3000 Ci/mmol)	Amersham
[Methyl- ³ H]Thymidin	(5 Ci/mmol)	Amersham

Zelllinien

- WEHI 231 (murines B-Zell-Lymphom, ATCC CRL 1702)