

2 MATERIAL

2.1 Arzneistoffe

Gefitinib (IressaTM) wurde freundlicherweise von AstraZeneca (Wedel, D) und Erlotinib (TarcevaTM) von Roche (Penzberg, D) zur Verfügung gestellt. Cetuximab (ErbixTM) wurde von Merck Pharma (Darmstadt, D) bezogen.

2.2 Antikörper

Die in dieser Arbeit für die Immunzytochemie oder zur Detektion in der Immunoblot-Analyse eingesetzten Primär- und Sekundärantikörper sind in **Tab. 2-1** aufgelistet.

Zielprotein	Spendertier	Art des Antikörpers	Arbeits-Verdünnung	Bezugsquelle
β-Aktin	Maus	monoklonal	1 : 5000	Sigma, D
Bcl-2	Maus	polyklonal	1 : 500	Novocastra, UK
Cyclin D1	Maus	monoklonal	1 : 100	Santa Cruz, CA
EGFR	Kaninchen	polyklonal	5 µg/mL	Santa Cruz, CA
p-EGFR (TYR1068)	Kaninchen	polyklonal	1 : 500	Cell Signaling, MA
ERK1/2	Kaninchen	polyklonal	1 : 500	Santa Cruz, CA
p-ERK1/2	Maus	monoklonal	1 : 500	Santa Cruz, CA
IGF-1R-β	Kaninchen	polyklonal	5 µg/mL	Santa Cruz, CA
Isotypenkontrolle IgG	Kaninchen	polyklonal	5 µg/mL	Dako, D
Kaninchen-IgG-POD	Ziege	polyklonal	1 : 10000	Amersham, S
Maus-IgG-POD	Ziege	polyklonal	1 : 10000	Amersham, S
p21 ^{Waf1/CIP1}	Kaninchen	polyklonal	1 : 200	Santa Cruz, CA
p27 ^{Kip1}	Maus	monoklonal	1 : 2500	BD Biosciences, D
STAT1	Kaninchen	polyklonal	1 : 1000	Santa Cruz, CA
p-STAT1 (TYR701)	Kaninchen	polyklonal	1 : 500	Cell Signaling, MA
STAT3	Kaninchen	polyklonal	1 : 1000	Santa Cruz, CA
p-STAT3 (TYR705)	Kaninchen	polyklonal	1 : 500	Cell Signaling, MA
STAT5	Kaninchen	polyklonal	1 : 1000	Santa Cruz, CA
p-STAT5 (TYR694)	Kaninchen	polyklonal	1 : 500	Cell Signaling, MA
Rabbit-IgG-Alexa TM 488	Ziege	polyklonal	1 : 125	Molecular Probes, OR

Tabelle 2-1: Liste der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper und ihrer Verdünnungen.

2.3 PCR-Primer

Folgende aufgelistete Primer wurden von der Firma TIB Molbiol (Berlin, D) bezogen. Der das 5'-Ende des Amplikons begrenzende Primer wurde als *forward* (F)-, der das 3'-Ende begrenzende als *reverse* (R)-Primer bezeichnet:

Name des Gens	Sequenz (5'-3')	Produktgröße	Position in der mRNA
EGFR-1	F: TCCTCCCAGTGCCTGAATAC R: TAATTTGGTGGCTGCCTTTC	240 bp	3442-3462 3682-3663
EGFRvIII*	F: GGCTCTGGAGGAAAAGAAAG R: TGATGGAGGTGCAGTTTTTG	226 bp	255-274 1282-1263
IGF-1R- β	F: GAAGTGGAAACCCTCCCTCTC R: CTTCTCGGCTTCAGTTTTGG	241 bp	1932-1951 2172-2153
β -Aktin	F: ATCATGTTTGAGACCTTCAACAC R: TCTGCGCAAGTTAGGTTTTGTC	822 bp	437-459 1258-1237

Tabelle 2-2: Liste der verwendeten Primer für die RT-PCR.

*EGFRvIII besitzt die gleiche mRNA-Sequenz wie der Wildtyprezeptor, aber die Exons 2 – 7 fehlen. Mit dem oben genannten Primer bildet EGFRvIII ein Amplifikat von 226 bp, während der Wildtyprezeptor über ein Produkt von 1028 bp detektiert werden kann.

2.4 Zellkulturmedien, Zusätze und Chemikalien

Die für die Zellkultur eingesetzten Medien und Chemikalien wurden von Biochrom (Berlin, D) bezogen, wenn nicht anders erwähnt.

2.4.1 Zellkulturmedien

2.4.1.1 Medium für HepG2, Huh-7, Kyse-30, Kyse-70 und Kyse-140

Das Kulturmedium für die Tumorzelllinien bestand aus 90% RPMI 1640 Medium und 10% fötalem Kälberserum unter Zusatz von 100 U/mL Penicillin und 100 μ g/mL Streptomycin.

2.4.1.2 Medium für Primärzellkulturen

Zur Anzucht der Primärzellkulturen wurde ein spezielles, von der Firma Biochrom entwickeltes Primärzellkulturmedium verwendet. Dieses bestand aus 76% Medium 199 Earle, 20% fötalem Kälberserum, 2 mM L-Glutamin, 100 U/mL Penicillin, 100 mg/mL Streptomycin, 2,5 μ g/mL Amphotericin B und 1% Biotect-Schutzmedium.

2.4.2 Chemikalien und Lösungen

Salze und Puffersubstanzen wurden von Merck (Darmstadt, D), Sigma (München, D) oder Roth (Karlsruhe, D) bezogen. Lösungsmittel und Lösungen wurden in analytischer Qualität von den Firmen J.T.Baker (Deventer, NL), Merck (Darmstadt, D), Roth (Karlsruhe, D) und Sigma (München, D) bezogen. Spezielle Substanzen wurden von nachfolgend aufgelisteten Firmen bezogen:

Artikel	Hersteller	Artikel	Hersteller
Ac-DEVD-AMC	Calbiochem, D	Kristallviolett	Sigma, D
Aprotinin	Roth, D	Lachssperma-DNA	Sigma, D
[α - 32 P]dATP	Amersham, S	β -Mercaptoethanol	Sigma, D
Bromphenolblau	Sigma, D	Nonidet P-40	Sigma, D
BSA	Sigma, D	Pepstatin	Sigma, D
Diethylpyrocarbonat	Sigma, D	PMSF	Fluka, D
Dithiothreitol	Sigma, D	RNAClean LS	Hybaid, GB
DMSO	Sigma, D	Propidiumiodid	Sigma, D
DNase I	Roche, D	Rnase Zap	Ambion, TX
Ethidiumbromid	Gibco BRL, GB	Taq-Polymerase	Amersham, S
Glutaraldehyd	Sigma, D	Triton X-100	Sigma, D
Glycerin	Sigma, D	Trypanblau	Sigma, D
Hyperfilm ECL	Amersham, S	Tween 20	BioRad, D
JC-1	Molecular Probes, OR		

2.5 Kits

Artikel	Hersteller
Apoptotic DNA-Ladder Kit	Roche Diagnostics, Mannheim, D
Atlas Human Apoptosis Array	Clontech, Palo Alto, CA
BCA Protein Assay Reagent Kit	Pierce, Rockford, IL
Cycle Test PLUS DNA Reagent Kit	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Cytotoxicity Detection Kit	Roche Diagnostics, Mannheim, D
Dynabead Purification Kit	Dynal, Oslo, N
ECL Western Blotting Detection Reagent	Amersham Biosciences, S
Fix & Perm Cell Permeabilization Kit	Caltag Laboratories, Hamburg, D
In Situ Cell Death Detection Kit	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, D
Live/Dead-Assay	Molecular Probes, Leiden, NL
SuperScript RT Preamplification Kit	GibcoBRL, Paisley, GB