

SDS-Gelelektrophorese:

Probenpuffer (2x):	100 mM Tris/HCl, pH 6,8 10 % (v/v) Mercaptoethanol 8 % (v/v) SDS 0,1 % (v/v) Bromphenolblau 20 % (v/v) Glycerin
Laufpuffer (10x):	250 mM Tris/HCl, pH 6,8 2 M Glycin 1 % (v/v) SDS pH 8,3
Sammelgel (5 %):	12,5 % (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid 29:1 (40 % Lösung) 125 mM Tris/HCl, pH 6,8 1 % (v/v) SDS 1 % (v/v) APS 0,1 % (v/v) TEMED
Trenngel (12 %):	30 % (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid 29:1 (40 % Lösung) 325 mM Tris/HCl pH 8,8 1 % (v/v) SDS 1 % (v/v) APS 0,04 % (v/v) TEMED
Ponceau S:	5 % ige Essigsäure 0,1 % (v/v) Ponceau S (Sigma, München)

Western-Blot:

Blot-Puffer:	10 mM CAPS 10 % (v/v) Methanol
Blocklösung:	3 % (v/v) Milchpulver (fettfrei) 150 mM NaCl 50 mM Tris/HCl pH 7,5 0,1 % (v/v) Triton X 100
Waschlösung:	1x PBS pH 7,2 0,1 % (v/v) Tween

3.3. Antikörper

Primärantikörper:

Tab.2: Primärantikörper

Bik/Nbk	polyklonal	Ziege	1 : 500	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
Bak	Klon TC 102	Maus	1 : 500	Calbiochem, Bad Soden, Deutschland
Bax	Klon 4F11	Maus	1 : 1000	Immunotech, Marseille, Frankreich
Bcl-2	Klon bcl-2/100/D5	Maus	1 : 100	Novocastra, Newcastle, GB
Bcl-x _L	polyklonal	Kaninchen	1 : 1000	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
p53	DO-1	Maus	1 : 500	Pharmingen, Hamburg, Deutschland
Caspase-3	Polyklonal	Kaninchen	1 :1000	Pharmingen, Hamburg, Deutschland
Hsp60	Klon LK-1	Maus	1 :1000	StressGen, Victoria, Kanada
Hsp70	Klon C92F3A-5	Maus	1 :1000	StressGen, Victoria, Kanada
Aktin	polyklonal	Kaninchen	1 :100	Sigma, München, Deutschland
P- Glykoprotein	MRK16	Maus	1 :100	Syrinx, Frankfurt, Deutschland

Sekundärantikörper:

FITC- konjugiert Ziege-anti-Maus IgG, IgM: Dianova, Hamburg, Deutschland

Biotinyliert anti-Maus IgG (H+L): Vector Laboratories, Burlingham, USA

HRP-konjugiert anti-Maus IgG: Promega, Mannheim, Deutschland

HRP-konjugiert anti-Kaninchen IgG: Promega, Mannheim, Deutschland

Peroxidase-gekoppeltes Streptavidin: Amersham Buchler, Braunschweig, Deutschland

Herstellung von Zellextrakten:

Puffer A: 20 mM Hepes pH 7,4

10 mM KCl

2 mM MgCl₂

1 mM EDTA

DTT-Lösung: 100 mM DTT (in Puffer A)

PMSF: 10 mM in Ethanol

***In vitro*-Aktivierung:** 1 μ M Cytochrom C (in Puffer A)
100 mM dATP (in Puffer A)

Caspase-3-Aktivierung:

PufferB: 50 mM Hepes pH 7,4
100 mM NaCl
1 mM EDTA
0,1 % (v/v) CHAPS
10 % (v/v) Saccharose

DTT-Lösung: 100 mM DTT in Puffer B

Caspase-3 Substrat: 10 mM Ac-DEVD-pNA
(Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden, Deutschland)

3.4. Zellkultur

- PBS-Puffer (pH 7,2, 10x), Kulturmedium, Trypsin/EDTA (0,25%, 1x), FBS, Penicillin/Streptomycin, L-Glutamin: Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- Farmorubicin (Epirubicinhydrochlorid): Pharmacia Upjohn GmbH, Erlangen, Deutschland
- VEPESID (Etoposid): Bristol Arzneimittelfabrik GmbH, München, Deutschland
- Taxol: Bristol Arzneimittelfabrik GmbH, München, Deutschland
- Sterile Einmalartikel: Nunc, Wiesbaden, Deutschland
- Einfriermedium: 80 % FBS (30 min bei 56°C Hitze-inaktiviert)
20 % DMSO

3.5. Zelllinien

Maligne Brustepithelzelllinien: MT-1, MT-1/Adr, MT-3, MT-3/Adr

Die humanen Mammakarzinom-Zelllinien MT-1 und MT-3 wurden aus Tumorproben von Patienten mit Mammakarzinomen generiert, die in Nackt-Mäuse transplantiert wurden. Beide Tumore wurden als Östradiol- und Progesteron-Rezeptor negativ klassifiziert. Die

Zelllinien sind sensitiv gegenüber den konventionellen, bei Mammakarzinomen verwendeten Zytostatika und deshalb als Tumormodell für diese Substanzen geeignet. Chromosomenstudien ergaben für MT-1 und MT-3 einen aneuploiden Karyotyp (Naundorf et al., 1992). Die resistenten Varianten dieser beiden Zelllinien, MT-1/Adr und MT-3/Adr, wurden durch Kokultur der Zellen mit steigenden Konzentrationen Doxorubicin selektiert (Stein et al., 1997).

Zellkulturmedium für Mammakarzinom-Zelllinien:

- RPMI 1640
- 10 % FBS inaktiviert (Hitze-inaktiviert für 30 min bei 56°C)
- 1 % Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml)
- 1 % L-Glutamin (2mM)

Magenkarzinom-Zelllinien (Dr. A. Jordan, Virchow-Klinikum Berlin):

EPG 85/257 Wildtyp, EPG 85/257 thermoresistent

Die humane Magenkarzinom-Zelllinie EPG 85/257 Wildtyp (wt) wurde aus klinischem Material, einem humanen Magenkarzinom von 1985, generiert. Der Tumor wurde histologisch als Adenokarzinom vom Intestinaltyp diagnostiziert (Dietel et al., 1990). Durch Kokultur der Zellen bei steigender Temperatur über einen Zeitraum von 18 Monaten wurde die thermoresistente Variante, die im Folgenden als EPG 85/257 wt/T bezeichnet wird, selektiert.

Zellkulturmedium für Magenkarzinom-Zelllinien:

- 500 ml Leibovitz's Medium L15
- 10 % FBS
- 1 mM L-Glutamin
- 2,5 mg/l Transferrin
- 6,25 mg/ml Fetuin
- 80 IE/l Insulin
- 10 000 KIE/l Trasylol
- 1,1 g/l NaHCO₃
- 1 % MEM Vitamine
- 1 g/l D-(+)-Glucose Lösung