

7. Materialien

7.1. Materialien für die Zellkultur

Zelllinien

Caco-2	Schering, Passage Nr.: 66 ATCC (American Type Culture Collection), Katalog Nr.: HTB-37
LS180	ECACC (European Collection of Cell Cultures) Katalog Nr.: 87021202, Passage Nr.: 52

Nährmedien und Lösungen:

Dulbecco`s MEM

Für die Kultivierung der Caco-2 Zellen wurde als Medium DMEM mit einem D-Glukose Gehalt von 4,5 g/L verwendet. Das Pulver Medium wurde unter Zugabe von 3,7 g/L NaHCO₃ in Milli Q-Wasser gelöst und sterilfiltriert und bei 2-8 °C im Kühlschrank gelagert. Unter Zusatz folgender Agenzien wurde das Medium frisch am Tag der Verwendung supplementiert (T 043, Biochrom AG, Berlin, Deutschland):

FKS (Fötales Kälber Serum): 10 %	S013/5, Biochrom AG, Berlin, Deutschland, Charge 0025H
Nicht-essentielle Aminosäuren: 1 %	K 0293, Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin: 1%	A 2212, Biochrom AG, Berlin, Deutschland

MEM

Für die Kultivierung der LS180 Zellen wurde nach Empfehlung der ECACC MEM mit Hanks Salzen und einem Glucose Anteil von 1 g/L verwendet. Die entsprechende Menge an Pulvermedium wurde mit 2,2 g/L NaHCO₃ in Milli Q-Wasser gelöst, sofort sterilfiltriert und im Kühlschrank gelagert. Vor Gebrauch wurde das MEM entsprechend dem DMEM supplementiert.

(T 032, Biochrom AG, Berlin, Deutschland)

Transportpuffer (HBSS)

Für den Rhodamin 123-Akkumulationstest und für die Transwell-Studien wurde als Transportpuffer eine Hanks'-Salzlösung (HBSS) verwendet. Zur Herstellung wurden 9,9 g Hanks` Salze Trockensubstanz, 5 g HEPES und 250 mg NaHCO₃ eingewogen und in 1 L Milli Q-Wasser gelöst. Der pH wurde mit 10 N NaOH-Lösung auf 7,4 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung sterilfiltriert und bei Temperaturen < 10 °C gelagert.

(L 201, Biochrom AG, Berlin, Deutschland)

7.2. Testsubstanzen

Substanz	Reinheit [%]	Artikel-Nr	Firma
SCFAs			
Na-Butyrat	≥ 99	B5887	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Buttersäure	≥ 99	B103500	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Isobuttersäure	99	I1754	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Propionsäure	≥ 99,5	402907	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Valeriansäure	≥ 99	V9759	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Isovaleriansäure	99	129542	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Na-Acetat	≥ 99,5	71183	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Na-Formiat	99,998	456020	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
P-gp-Inhibitoren			
Gelucire (G44/14)		3051	Gattefosse´, Frankreich
Elacridar		Probensubstanz	GlaxoSmithKline, England
Quercetin	≥ 98	Q0125	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Rifampicin	≥ 95	R3501	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Verapamil		V4629	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
P-gp-Modellsubstrat			
Rhodamin 123	≥ 90	83702	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Zucker			
D-Glucose		8342	Merck
D-Fructose		21830	Serva Feinbiochemika
D-Lactose	≥ 99	61340	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Aminosäuren			
L-Prolin	≥ 98,5	P5607	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
L-Tryptophan	≥ 98,5	T8941	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
L-Asparagin	≥ 98,5	A4159	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
L-Asparaginsäure	≥ 98,5	A7219	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
L-Serin	≥ 98,5	S4311	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
L-Alanin	≥ 98,5	A7469	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

Substanz	Lagerung der Substanz	Lösungsmittel	Lagerung der Lösung
Na-Butyrat	Raumtemperatur (RT)	PBS	-20 °C
Isobuttersäure	RT	PBS	-20 °C
Na-Valeriat	RT	PBS	-20 °C
Na-Isovaleriat	RT	PBS	-20 °C
Na-Acetat	RT	DMEM/MEM	-20 °C
Na-Formiat	RT	DMEM/MEM	-20 °C
Gelucire (G44/14)	RT	PBS	-20 °C
Elacridar	RT, lichtgeschützt	DMSO	-20 °C
Quercetin	RT, lichtgeschützt	DMSO	-20 °C
Rifampicin	RT	DMSO	-20 °C
Verapamil	RT	PBS	-20 °C
Maillardprodukte	-80 °C	PBS	-20 °C
Rhodamin 123	RT, lichtgeschützt	EtOH (96 %)	-20 °C

7.3. MTT-Test: Herstellung der Reagenz-Lösungen

MTT-Lösung (M5655; Sigma-Aldrich Chemie GmbH):

- 5 g/ml PBS,
- Die Lösung wurde anschließend mit einem Celluloseacetat-Filter (0,2 µm) sterilfiltriert, zu je 5 ml aliquotiert und bei -20 °C lichtgeschützt eingefroren

25 % ige SDS-Lösung:

- 400 mg NaOH/10 ml Aqua bidest. (= 1 N), Lösung erwärmen
- 7,5 ml 1 N NaOH-Lösung/100 ml Aqua bidest. verdünnen (\equiv 0,075 N NaOH-Lsg.)
- 25 g SDS in 100 ml 0,075 N NaOH-Lösung lösen, im Wasserbad lösen und anschließend bei Raumtemperatur bis zur Schaumreduktion stehen lassen

7.4. Durchflusszytometrie

Herstellung der Propidiumjodid- Lösung:

Propidiumjodid (10mg/ml PBS)	4 µl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
RNase A (100 mg/ml)	1 µl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
ad 1000 µl EtOH _{absolut}		

7.5. Lösungen für SDS-PAGE und Western Blot

1. Zusammensetzung und Herstellung des Lysepuffers (Collet et al., 2004)

Substanz	Hersteller	Einwaage bezogen auf 200ml MilliQ	c
NaCl	Sigma-Aldrich	1400 mg	120 mM
HEPES	Biochrom	240 mg	5 mM
Triton-X100	Serva	2000 mg	1 %
Na-EDTA	Sigma-Aldrich	150 mg	2 mM
Na-F	Sigma-Aldrich (456020)	340 mg	25 mM
Na ₃ VO ₄	Sigma-Aldrich (450243)	37 mg	1 mM

Der Protease-Inhibitor-Cocktail (P8340, Sigma-Aldrich) wurde am Tag der Verwendung mit dem Lysepuffer gemischt, wobei das Pipettiervolumen 50 µl/ ml Lysepuffer betrug.

2. Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für die Gelelektrophorese

Trenngel (7,5 %)		Sammelgel (5 %)	
Aqua bidest	6,15 ml	Aqua bidest	2,3 ml
SDS (1 %)	1,2 ml	SDS (1 %)	0,4 ml
Trenngelpuffer	2,4 ml	Sammelgelpuffer	0,8 ml
TEMED	10 µl	TEMED	4 µl
APS	60 µl	APS	20 µl
Acrylamid/Bisacrylamid	3 ml	Acrylamid/Bisacrylamid	0,5 ml

(benötigte Menge für 1 Gel)

3. TBST (Tris-buffered solution solution; 0,1 % Tween 20)

12,14 g/L Tris-HCL

87,66 g/L NaCl

0,1 % Tween 20

In Aqua bidest lösen und auf pH 8 einstellen.

4. Blocklösung

5 % Magermilchpulver Sucofin®

Lösung in TBST

5. Blotpuffer (10 x)

144 g/L Glycin

30 g/L Tris-Base

In Aqua bidest lösen.

6. Laufpuffer (10 x, pH 8,3)

144 g/L Glycin

30,2 g/L Tris-Base

10 g/L SDS

In Aqua bidest lösen.

7. Trenngelpuffer (pH 8,8)

224,8 g/L Tris-Base

In Aqua bidest lösen.

8. Sammelgelpuffer (pH 6,8)

60 g/L Tris-HCL

In Aqua bidest lösen.

9. Antikörper

Primärantikörper: Anti-P-gp C219 (ALX-801-002-C100, Alexis Biochemicals)

Sekundärantikörper: Anti-mouse IgG antibody, HRP-conjugated (Cell Signalling Technology)