

5. Materialien

5.1 Elektrische Geräte

Gerät	Hersteller/Vertreiber in Deutschland
Biofuge A	Heraeus Sepatech, Kendro Laboratory Products GmbH, Berlin
Centrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg
GPR Centrifuge	Beckmann Instruments GmbH, München
Heraeus CO-AUTO-ZERO	Heraeus Sepatech, Kendro Laboratory Products GmbH, Berlin
Vortex Genie 2	Scientific Instruments/Merck Eurolabs, Berlin

5.2 Grundchemikalien, Feinchemikalien und Zytostatika

Sämtliche verwandten Grundchemikalien, Feinchemikalien und Zytostatika stammten von der Firma SIGMA (Deisenhofen, Deutschland) und entsprachen dem höchsten zur Verfügung stehenden Reinheitsgrad, sofern dies in untenstehender Tabelle nicht anders angegeben ist.

Reagenz	Hersteller/Vertreiber in Deutschland
Aqua _{bidest} -Spüllösung, steril, auf Pyrogenfreiheit geprüft	Delta-Pharma GmbH/Boehringer Ingelheim, Pfullingen
CO ₂	Air Liquide GmbH, Düsseldorf,
DAKO IntraStain	DAKO, Hamburg
HEPES-Lösung (1 M)	GIBCO-Life Technologies/Invitrogen, Eggenstein-Leopoldshafen
PBS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	GIBCO-Life Technologies/Invitrogen, Eggenstein-Leopoldshafen

5.3 Puffer und Stammlösungen

7-Amino-Aktinomycin D (7-actinomycin D, 7-AAD):

Die Stammlösung wurde, wie bei Philpott (Philpott, 1996) beschrieben, in einem geringen Volumen Aceton gelöst und anschließend mit PBS auf eine Konzentration von 10 mg/mL verdünnt.

Annexin V-Binde-Puffer (ABB):

10 mM HEPES; 140 mM NaCl; 2,5 mM CaCl₂; finaler pH 7,4 und Lagerung bei 4°C

Arsentrioxid (Arsen(III)-oxid, Arsentrioxyd, ATO, Arsenige Säure, Arsenigsäure-Anhydrid, Arsenik, 2,4,6,8,9,10-Hexaoxa-1,3,5,7-tetraarsatricyclo[3,3,1,1,(3,7)]dekan):

Wegen des niedrigen Löslichkeitsproduktes von Arsentrioxid in Wasser wurde die Substanz zunächst in einem geringen Volumen 10%-iger NaOH aufgenommen. Anschließend wurde die Lösung mit Wasser bis zur vorgesehenen Konzentration von 100 mM verdünnt, sterilfiltriert und bei Raumtemperatur gelagert.

Camptothecin:

Camptothecin wurde in DMSO in einer Konzentration von 10 mM gelöst und bei Raumtemperatur gelagert.

Dihydroethidium (DHE, Hydroethidin):

DHE kam nach Lösen in DMSO (5 mM) sofort zum Einsatz und kann nicht gelagert werden.

Doxorubicin (Adriamycin):

Doxorubicin wurde in 70%-igem Ethanol in einer Konzentration von 1 mg/mL gelöst und bei 2°C gelagert.

Etoposid (VP-16-213, 4'-Desmethylepipodophyllotoxin 9-[4,6-O-ethyliden-β-D-glucopyranosid]):

Etoposid wurde in DMSO in einer Konzentration von 50 mM gelöst und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanin-Iodid):

JC-1 wurde in DMSO in einer Konzentration von 20 μM gelöst, bei -20°C gelagert und unmittelbar vor Benutzung mit PBS auf eine Konzentration von 10 nM verdünnt.

MitoTrackerRed CMXRos und MitoTrackerRed CM-H₂XRos-Stammlösungen:

Die Stammlösungen wurden, wie vom Hersteller empfohlen, in DMSO angesetzt und zur weiteren Benutzung in PBS verdünnt, bis eine 1000-fach konzentrierte Lösung der Endkonzentration erreicht wurde. MitoTrackerRed-

CM-H₂XRos-Lösungen mußten auf Grund ihrer extrem hohen Sauerstoffempfindlichkeit nach einmaligem Gebrauch verworfen werden; gleiches galt für wäßrige Verdünnungen von MitoTrackerRed CMXRos. Die Lagerung der DMSO-Stammlösung erfolgte bei -20°C.

Mitoxantron (1,4-Dihydroxy-5,8-bis[(2-[(2-hydroxyethyl)amino]-ethyl)amino]-9,10-anthracendion):

Mitoxantron wurde in 70%-igen Ethanol in einer Konzentration von 10 mM gelöst und bei -20°C aufbewahrt.

Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS, ohne Ca²⁺/Mg²⁺, in dieser Arbeit als PBS bezeichnet):

140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 6,5 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄; finaler pH 7,4

Propidiumiodid-Inkubationspuffer (PIB):

0,1 mg/mL RNase; 50 µg/mL Propidiumiodid; 0,1% IGEPAL CA-630; 100 mM EDTA; 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 6,5 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄; finaler pH 7,4. Der Puffer wurde bei 2°C aufbewahrt und die bei -20°C gelagerte RNase unmittelbar vor der Benutzung des Puffers zugegeben.

Propidiumiodid-Stammlösung:

Propidiumiodid wurde in sterilem, deionisiertem Wasser in einer Konzentration von 1 mg/mL gelöst und bei 2°C gelagert.

5.4 Reagenzien für die Zellkultur

Sämtliche in der Zellkultur benutzten Medien und Medienzusätze (z. B. RPMI 1640, fötales Rinderserum, Natriumbicarbonatlösung, HEPES) stammten von der Firma GIBCO-Life Technologies/Invitrogen (Eggenstein-Leopoldshafen, Deutschland) sofern diese nicht in untenstehender Tabelle aufgeführt sind.

Reagenz	Hersteller/Vertreiber in Deutschland
Natriumpyruvat-Lösung	SIGMA, Deisenhofen
Phenolrot-Lösung	SIGMA, Deisenhofen
QBSF 51®-Medium	SIGMA, Deisenhofen
Trypanblau-Lösung	SIGMA, Deisenhofen
Türks-Lösung	Merck, Darmstadt

5.5 Zelllinien

Die Zelllinien 697, BV-173, CCRF-CEM, DOHH-2, HL-60, Jurkat, K-562, KG-1a, LOUCY, ML-2, MV-4-11, NB-4, NC-NC, PBL-985 sowie SD-1 wurden von der *Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen* (DSMZ, Braunschweig, Deutschland), die Zelllinie KG-1 von der *European Collection of Cell Cultures* (Salisbury, England) und die Zelllinien CEM/C1, CEM/C2, HEL, HL-60/MX1, HL-60/MX-2 sowie U937 von der *American Type Culture Collection* (Manassas, USA) bezogen.

Die Doxorubicin-resistenten Zelllinien K-562(0.02) und K-562(0.1) wurden von Frau Dr. Baldus, Medizinische Klinik III des Universitätsklinikums Benjamin Franklin (Berlin), etabliert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. K-562(0.02)-Zellen sind ursprünglich resistent gegen bis zu 0,02 µg/mL Doxorubicin, K-562(0.1)-Zellen gegen bis zu 0,1 µg/mL Doxorubicin. Eine detaillierte Beschreibung der Zelllinien (Angabe des Zelltyps und des Gewebes, aus dem die Zelllinien ursprünglich isoliert wurden) befindet sich im Kapitel *Ergebnisse* (**Tabelle 2, Seite 60**).

5.6 Fluoreszenzfarbstoffe

Die Hersteller der in verschiedenen Experimenten verwandten Fluoreszenzfarbstoffe sind der nachstehenden Tabelle zu entnehmen.

Reagenz	Hersteller/Vertreiber in Deutschland
7-AAD	SIGMA, Deisenhofen
ApoAlert™ NitricOxide/Annexin V Dual Sensor Kit	BD Clontech, Heidelberg
DHE	Molecular Probes/MoBiTec, Göttingen
JC-1	Molecular Probes/MoBiTec, Göttingen
MitoTrackerRed CM-H ₂ XRos	Molecular Probes/MoBiTec, Göttingen
MitoTrackerRed CMXRos	Molecular Probes/MoBiTec, Göttingen
PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit	SIGMA, Deisenhofen
Propidiumiodid	Molecular Probes/MoBiTec, Göttingen

5.7 Antikörper

Die in den Experimenten benutzten monoklonalen bzw. polyklonalen Antikörper sowie deren Bezugsquellen sind in nachstehender Tabelle aufgelistet. An Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelte Antikörper sowie polyklonale Antikörper sind als

solche gekennzeichnet. Monoklonale Antikörper sind unter Nennung ihres Klones gelistet.

Antikörper	Klon	Hersteller/Vertreiber
Isotyp-Kontrollen		
Maus-IgG1, κ	MOPC-21	SIGMA, Deisenhofen
Maus-IgG1, κ -FITC	DAK-GO1	DAKO, Hamburg
Maus-IgG1, κ -FITC	X40	BD Biosciences, Heidelberg
Maus-IgG1, κ -PE	X40	BD Biosciences, Heidelberg
Maus-IgG2a, κ	UPC-10	SIGMA, Deisenhofen
Maus-IgG2a, κ -PE	X39	BD Biosciences, Heidelberg
Maus-IgG2b, κ	MOPC-141	SIGMA, Deisenhofen
Maus-IgG2a, κ -FITC	MPC-11	BD Pharmingen, Heidelberg
Maus-IgM	MOPC-104E	SIGMA, Deisenhofen
Monoklonale Antikörper		
Maus-IgG1, κ -Anti-Human-CD90-PE	5E10	BD Pharmingen, Heidelberg
Maus-IgG1, κ -Anti-Human-CD95-FITC	DX2	BD Pharmingen, Heidelberg
Maus-IgG1, κ -Anti-Human-(D4-GDI)-FITC	97A1015	IMGENEX/MoBiTec Göttingen
Maus-IgG1,-Anti-Human-Ki67-FITC	Ki67	DAKO, Hamburg
Maus-IgG1, κ -Anti-Human-TNFR1-FITC	16803.161	R&D Systems, Wiesbaden
Maus-IgG2a, κ -Anti-Human-TNFR1-PE	22235.311	R&D Systems, Wiesbaden
Maus-IgG2b-Anti-Human-LRP [MVP]	LRP-56	ALEXIS, Grünberg
Maus-IgG2b, κ -Anti-Human-CD95	SM1/23	ALEXIS, Grünberg
Maus-IgG2b, κ -Anti-Human-p53-FITC	DO-7	BIOsource, Ratingen
Maus-IgG2b, κ -Anti-Human-(P-Glykoprotein)-FITC	17F9	BD Pharmingen, Heidelberg
Maus-IgM-Anti-Human-CD95	7C11	Coulter Immunotech, Hamburg
Maus-IgM-Anti-Human-CD95	CH11	Coulter Immunotech, Hamburg
Polyklonale Antikörper		
Kaninchen-Anti-Human-(Aktivierte-Caspase-3)-PE	polyclonal	BD Pharmingen, Heidelberg
Kaninchen-Anti-Human-(PARP- <i>cleavage-site</i> -(214/215))-FITC	polyklonal	BIOsource, Ratingen
Sekundärantikörper		
Ziege F(ab') ₂ Anti-Maus-IgG-FITC	polyklonal	DAKO, Hamburg

5.8 *Annexin V-FITC, Aminosäurederivate und modifizierte Peptide*

Annexin V-FITC wurde von der Firma BD Pharmingen (Heidelberg) bezogen. Die Bezugsquellen der in den Caspasen-Aktivitätsnachweisen verwandten Substrate und Inhibitoren sind der folgenden Tabelle zu entnehmen:

Substanz	Hersteller/Vertreiber in Deutschland
Boc-Asp(OMe)-FMK (auch Z-V-FMK)	ALEXIS, Grünberg
CaspACE™ (FITC-VAD-FMK)	Promega, Mannheim
FITC-YVADAPK-DNP	BACHEM Biochemica, Heidelberg
PhiPhiLux G ₂ D ₂ (GDEV DGI)	OncoImmunin/MoBiTec, Göttingen
Z-Asp-2,6-DBMK	ALEXIS, Grünberg
Z-D(OMe)E(OMe)VD(OMe)-FMK	ALEXIS, Grünberg
Z-VAD-FMK	ALEXIS, Grünberg

5.9 *Verbrauchsmaterialien*

Die in der Zellkultur eingesetzten Verbrauchsmaterialien (serologische Einmalpipetten, Flaschen für die Zellkultur etc.) wurden von der Firma NUNC GmbH&Co.KG (Wiesbaden) bezogen. Polypropylen-Reaktionsgefäße mit den Fassungsvermögen 50 mL und 15 mL wurden von der Firma Greiner (Frickhausen) geliefert. Die für Arbeiten mit kleineren Volumina eingesetzten Reaktionsgefäße stammten von der Firma Eppendorf (Hamburg), Einmal-Spritzenvorsatzfilter mit der Porengröße 0,45 µm zum Sterilfiltrieren von Lösungen von der Firma Carl Roth GmbH (Karlsruhe). Peripheres Blut von Patienten wurde mit Einverständnis der Patienten durch Venenpunktion entnommen und in Vacutainer® CPT™ (BD Biosciences, Heidelberg) gesammelt.

5.10 *Durchflußzytometrie*

Die durchflußzytometrischen Untersuchungen wurden mit einem FACScan der Firma BD Biosciences (Heidelberg) durchgeführt. Die für das Durchflußzytometer benötigten Probenröhrchen stammten von der Firma BD Falcon (Heidelberg). Reagenzien zur Kalibrierung (CaliBRITE Beads) und Instandhaltung des Durchflußzytometers (Trägerflüssigkeit für Probenmaterial FACSFlow, Reinigungslösungen FACSSafe und FACSRinse) wurden ebenfalls von der Firma BD Biosciences (Heidelberg) bezogen.