

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Die allgemein verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Boehringer/Roche, Calbiochem, Fluka, Gibco Life Technologies/Invitrogen, Phoenix Pharmaceuticals, Roth, Serva Sigma-Aldrich, Tocris und VWR bezogen und in der Qualität pro Analysis (p.a.) eingesetzt. Spezielle Chemikalien und verwendete Lösungen werden am Anfang jeder Methodenbeschreibung aufgeführt. Alle Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser hergestellt.

3.1.2 Kits und Enzyme für die Molekularbiologie und Biochemie

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
Oligotex mRNA Purification Kit	Qiagen
RNeasy Midi Kit	Qiagen
QIAshredder cell lysate homogenizer	Qiagen
First-Strand cDNA Synthesis Kit	Amersham Pharmacia Biotech
QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit	Qiagen
T4-DNA-Ligase	Boehringer/Roche
Qiagen Plasmid Purification Kit	Qiagen
Lysozym	Eurogentec
Versch. Restriktionsenzyme	Gibco, Boehringer
Taq DNA Polymerase	Amersham, Qiagen
PCR DIG Probe Synthesis Kit	Boehringer/Roche
Lambda/Hind III Marker (Lambda DNA)	Gibco Life Technologies
DNA Ladder, verschiedene	MBI Fermentas
Oligonukleotide (Primer)	Gibco Life Technologies/Eurogentec
Antisense-Oligonukleotide	Eurogentec
Deoxynucleoside Triphosphate Set	Boehringer/Roche
BCA Protein Assay Kit	Perbio Science
cGMP Direct Biotrak EIA	Amersham Pharmacia
IP-Kit	Perbio Science
Trypsin 5%	Invitrogen

3.1.3 Vektoren

In dieser Arbeit wurde der Vektor pOPR aus dem Lac-Switch™ induzierbaren Expressionssystem für Säugetiere von der Firma Stratagene verwendet (siehe 7.2).

3.1.4 Bakterienstämme

Um den pOPR Vektor zu amplifizieren wurden, kompetente DH5a E. coli Bakterien von der Firma Stratagene verwendet.

3.1.5 Allgemeine Lösungen

LB-Medium:	5 g Hefe-Extrakt, 10 g Bacto-Trypton, 5 g NaCl, ad 1000 ml H ₂ O
LB-Platten:	1000 ml LB-Medium, 15 g Agar
10 x TBE:	0,89 M Tris-Base, 0,89 M Borsäure, 0,02 M EDTA
TE:	100 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0
10 x PBS:	1,5 M NaCl, 83 mM Na ₂ HPO ₄ , 17 mM NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O, pH 7.4
10 x TBS:	1,5 M NaCl, 500 mM Tris/HCl, pH 7.6

3.1.6 Antikörper

3.1.6.1 Primäre Antikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Spezies</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Firma/Hersteller</u>
anti-VILIP-1	Kaninchen, polyklonal	WB: 1:10000 IF: 1:2000	Dr. K.-H. Braunewell*
anti-VILIP-1	Maus, monoklonal	IF: 1:1000	Dr. K.-H. Braunewell**
anti-VILIP-1	Ratte, polyklonal		Dr. K.-H. Braunewell*
anti-NCS-1	Huhn, polyklonal	WB: 1:1000	Chemicon
anti-β-Tubulin	Maus, polyklonal	WB: 1:10000	Sigma
anti-GC-B	Kaninchen, polyklonal	WB/IF: 1:500	Dr. K.-H. Braunewell*
anti-Clathrin	Maus, polyklonal	WB: 1:5000	BD Bioscience
anti-AChR a4	Ratte, polyklonal	E: 1:2000	Ratte, polyklonal
anti-Phosphothreonin	Kaninchen, polyklonal	WB: 1:75	Chemicon
anti-Phosphoserin	Kaninchen, polyklonal	WB: 1:75	Chemicon
anti-Phosphothreonin	Maus, monoklonal	WB: 1:500	Santa Cruz
anti-Phosphotyrosin	Maus, monoklonal	WB: 1:1000	Santa Cruz
anti-MAP-2	Maus, monoklonal	IF: 1:1000	Sigma

* eigene Herstellung

** Eurogentec

WB: Western-Blot

IF: Immunfluoreszenz

E: ELISA

3.1.6.1 Sekundäre Antikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Spezies</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Firma</u>
anti-Kaninchen IgG, AP-gekoppelt	Ziege, polyklonal	WB: 1:5000	Sigma
anti-Maus IgG, AP-gekoppelt	Ziege, polyklonal	WB: 1:5000	Sigma
anti-Huhn IgY, AP-gekoppelt	Kaninchen, polyklonal	WB: 1:5000	Chemicon
anti-Kaninchen IgG, HRP-gekoppelt	Ziege, polyklonal	WB: 1:10000	Santa Cruz
anti-Maus IgG, HRP-gekoppelt	Ziege, polyklonal	WB: 1:10000	Santa Cruz
anti-Ratte IgG HRP-gekoppelt	Ziege, polyklonal	WB: 1:10000	Santa Cruz
anti-Huhn IgY, HRP-gekoppelt	Ziege, polyklonal	WB: 1:10000	Santa Cruz
anti-Kaninchen IgG, Cy3-gekoppelt	Ziege, polyklonal	IF: 1:1000	Dianova
anti-Maus IgG, Cy3-gekoppelt	Ziege, polyklonal	IF: 1:1000	Dianova
anti-Ratte IgG, Cy3-gekoppelt	Ziege, polyklonal	IF: 1:1000	Dianova
anti-Kaninchen IgG, Alexa 488	Ziege, polyklonal	IF: 1:1000	Molecular Probes
anti-Maus IgG, Alexa 488	Ziege, polyklonal	IF: 1:1000	Molecular Probes
Streptavidin-HRP		E 1:10000	Chemicon

WB: Western-Blot

IF: Immunfluoreszenz

E: ELISA

3.1.7 Oligonukleotide

3.1.7.1 Antisense-Oligonukleotide

Insgesamt wurden drei verschiedene Oligonukleotide verwendet, wovon zwei an die mRNA von VILIP-1 (NVP-1) binden (AS2, VAS1) und ein Kontrolloligonukleotid. Die Sequenzen der bindenden Oligonukleotide wurden so festgelegt, daß sie um oder kurz hinter dem Startcodon ATG (entspricht translatiert der Aminosäure Methionin, mit der die Proteinsynthese beginnt) binden und so eine Translation des Proteins verhindern. Die Sequenz des Kontrolloligonukleotids wurde so gewählt, daß sie nicht an die VILIP-1 mRNA binden können. Dazu wurde die Sequenz des einen Antisense-Oligonukleotids (AS2) soweit von der mRNA abgewandelt, daß es nicht mehr binden kann (VAS M, VILIP-1 mismatch).

Name	des Sequenz	Länge	Bindungsstelle an der VILIP-1 mRNA von 5'® 3'
Antisense-oligo-nukleotids			
AS.2	TCCCCATTTTGCAGTT	16	um die ATG-Startregion (Nukleotide 240-242), Nukleotide Nr.: 233-248
VAS 1	ATGACTTCTGGGGCCAGT	18	hinter der ATG-Startregion, Nukleotide Nr.: 261-278

VAS M	ACCGCAATTAGCGGT	16	-
-------	-----------------	----	---

3.1.7.2 Primer für die PCR

Name des Primers	Sequenz	Länge (Nukleotide)	Bindungsstelle an der DNA
5'-VILIP-1	ATGGGGAAACAGAATAGCAAAC	22	in 5'→3'Richtung an der VILIP-1 DNA Sequenz, Nukleotide Nr.: 240-261
3'-VILIP-1	TGCAGTGCACATTCAGAAATGA	22	in 3'→5'Richtung an der VILIP-1 DNA Sequenz, Nukleotide Nr.: 793-815
5'-NPR-C-1	TTCTGGCTTTGCATGAAGTG	20	in 5'→3'Richtung an der NPR-C DNA Sequenz Nukleotide Nr.: 1107-1126
3'-NPR-C-1	AGGAGAGCTGTTGGTGTGCT	20	in 3'→5'Richtung an der NPR-C DNA Sequenz Nukleotide Nr.: 1398-1417
5'-NPR-C-2	GCAGGTGTCCATAGCTGCT	19	in 5'→3'Richtung an der NPR-C DNA Sequenz Nukleotide Nr.: 1207-1225
3'-NPR-C-2	CCATTAGCAAACCAGCACCT	20	in 3'→5'Richtung an der NPR-C DNA Sequenz Nukleotide Nr.: 1477-1496

3.1.8 Allgemeine Materialien für die Zellkultur

Produkt

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
 Neurobasal™
 Fötale Kälberserum
 Pferdeserum

Hersteller

Invitrogen
 Invitrogen
 Invitrogen
 Invitrogen

Hank's Balanced Salt Solution, Ca ²⁺ /Mg ²⁺ free (HBSS)	Invitrogen
L-Glutamin	Invitrogen
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen
Trypsin, Trypsin/EDTA	Invitrogen
Geneticin (G 418)	Sigma / Invitrogen
Hygromycin B	Boehringer / Invitrogen
Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG)	Roth
Zellkultur-Flaschen	Nunc
Gewebekulturplatten mit 12 oder 24 Vertiefungen	Nunc
Pipetten	Greiner
15 ml-Zentrifugenröhrchen	Greiner
50 ml- Zentrifugenröhrchen	Greiner
Deckgläschen	Assistent

3.1.9 Tiere

Für die Präparation von Primärkulturen, sowie RNA- und Protein-Gewinnung und Herstellung von Hirnhomogenaten wurden ausschließlich Ratten (*Rattus Rattus norvegicus*) des Stammes Wistar (Hauszüchtung), sowie von der Firma Charles River bezogene Wistar-Ratten verwendet.

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologie

Für die molekularbiologischen Arbeiten wurden Standardmethoden angewendet, die in der Fachliteratur ausführlich beschrieben sind (nachzulesen zum Beispiel in Sambrook *et al.*, 1989). Die hier zum Einsatz gekommenen Methoden werden daher im Folgenden nur kurz beschrieben.

3.2.1.1 RNA-Präparation und reverse Transkription

Die Extraktion von Total-RNA aus Gewebe- oder Zell-Lysaten wurde wie in Berger und Chirgwin (1989) beschrieben durchgeführt. Des Weiteren kam ein mRNA- und ein Total RNA-Aufreinigungs-Kit (Oligotex mRNA Purification Kit/RNeasy Kit, Qiagen) zum Einsatz. Die RNA-Extraktion erfolgte aus circa 30 mg Gewebe, bzw. aus den Gewebekulturschalen nach Angaben des Herstellers.

Für die Erststrang-cDNA-Synthese mittels reverser Transkriptase (First-Strand cDNA Synthesis Kit, Amersham Pharmacia Biotech) wurden 50 – 150 ng der extrahierten mRNA bzw. 1 µg Total-RNA eingesetzt. Als Primer wurden entweder die im Kit enthaltenen oder spezifische Primer (Eurogentec) nach Angaben des Herstellers verwendet.

3.2.1.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerasekettenreaktion kamen

spezifische Primerpaare zum Einsatz. Die Reaktionsansätze (Gesamtvolumen 50 µl) enthielten circa 50 ng cDNA oder Plasmid-DNA als Matrize, jeweils 25 µM Desoxynukleotidtriphosphate d(A, C, G, T)TPs, je 50 pmol Primer, die entsprechende Menge des konzentrierten Reaktionspuffers und 0,5 U thermostabile Taq-Polymerase. Die PCR wurde gestartet mit einem zweiminütigen Denaturierungsschritt bei 94°C, gefolgt von 25-30 Zyklen Denaturierung (30 sec, 95°C), Primerannealing (30 sec, 55-65°C, je nach Schmelztemperatur der Primer) und Extension (2 min 72°C). Zum Abschluss der PCR erfolgte ein 5 minütiger Extensionsschritt bei 72 °C.

Die PCR-Produkte wurden auf ein Agarose-Gel aufgetragen und analysiert.

3.2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden 1%ige Agarose-Gele in Laufpuffer (1 x TBE) hergestellt. Zur späteren Visualisierung der DNA-Banden unter UV-Licht wurde das Gel mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid-Lösung versetzt. Die elektrophoretische Auftrennung der in 1 x DNA-Probenpuffer aufgetragenen Proben erfolgte in horizontalen Elektrophoresekammern (Peqlab) bei einer Stromstärke von circa 10 V/cm. Zur Abschätzung von DNA-Fragmentgrößen wurden verschiedene Fragmentlängenstandards eingesetzt (siehe 3.1.2)

3.2.1.4 Transformation von Bakterien

Zur Transformation von Plasmid-DNA wurden chemisch kompetente Bakterien, hergestellt nach der Vorschrift von Hanahan (1983) eingesetzt. Aliquots (100 µl) wurden auf Eis aufgetaut, mit DNA versetzt und 30 min inkubiert. Nach einem Hitzeschock (90 sec 37°C, 2 min auf Eis) wurden jeweils 900 µl LB-Medium zugegeben und die Ansätze für 1 h bei 37°C geschüttelt. Die transformierten Bakterien wurden auf LB-Agarplatten mit der Resistenz des Vektors entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.1.5 DNA-Präparation (Midipräparation)

Aus einzelnen gepickten Bakterienkolonien (siehe 3.2.1.4) wurden eine Vor-, sowie eine Übernachtskultur in LB-Medium (2, bzw. 200 ml) mit der Resistenz des Vektors entsprechendem Antibiotikum angelegt und bei 37°C inkubiert. Die Präparation größerer DNA-Mengen (Midi-Präparation) erfolgte aus 200 ml Übernachtskultur mit Hilfe spezieller Aufreinigungskits (Plasmid Purification Kit, Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Die so isolierte DNA wurde für Zelltransfektionen eingesetzt

3.2.2 Biochemische Methoden

3.2.2.1 Aufreinigung von Glutathion-S-Transferase (GST-) Fusionsproteinen

LB-Medium:	mit 100 µg/ml Ampicillin
Elutionspuffer:	10 mM reduziertes Glutathion in 50 mM Tris/HCl pH 8
Glutathion-Sepharose 4B:	(Pharmacia Biotech)

Die Aufreinigung der Fusionsproteine erfolgte im Wesentlichen nach Angaben des Herstellers (Qiagen) unter nativen Bedingungen.

Eine 1 l LB-Kultur wurde mit Bakterien (E.coli M15 [pREP4] mit pQE-30/VILIP-Konstrukten transformiert, siehe 3.2.1.4) aus einer 50 ml Übernacht-Kultur angeimpft. Die Expression des Fusionsproteins wurde mit 1 mM IPTG circa 5 h induziert. Die Bakterienkultur wurde anschließend bei 4000 g abzentrifugiert (Sorvall), das resultierende Pellet in 30 ml 1 x PBS mit 1% TritonX-100, 1 mM Benzamidin und 1 mM PMSF resuspendiert und 5 mal 1 min sonifiziert. Nach 30-60 minütiger Inkubation bei 4°C wurde das Bakterienlysate erneut zentrifugiert (20 min, 16000 g, Sorvall) und der Überstand mit 1 ml in PBS äquillibrierte Glutathion-Sepharose versetzt und 1 h bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde anschließend in Chromatographie-Säulen gefüllt und nacheinander je 2-mal mit 10 ml PBS / 1% TritonX-100, PBS / 1 M NaCl und PBS gewaschen. Zur Elution der Fusionsproteine wurde das Säulenmaterial 10 min mit Elutionspuffer in verschlossenem Säulenröhrchen inkubiert. Das Eluat wurde dann in 1 ml Fraktionen aufgefangen und sofort mit 1 M Tris/HCl, pH 9.5 neutralisiert. Jeweils 10 µl der einzelnen Aliquots wurden zur Überprüfung der Elutionseffizienz auf ein Coomassie-Gel aufgetragen (siehe 3.2.2.8). Die Fusionsproteine wurden bei -20°C gelagert und vor Gebrauch über PD-10-Säulen (Pharmacia) umgepuffert.

3.2.2.2 Affinitätsreinigung von Antiseren

Die Aufreinigung von polyklonalen Antikörpern gerichtet gegen VILIP-1-His-Fusionsproteine aus Kaninchen-, bzw. Rattenserum erfolgte über Bindung der Antikörper an immobilisierte GST-Fusionsproteine und anschließende saure Elution.

Kopplung der Antigene:

Für die Herstellung der Affinitätssäule wurde eine aktivierte Gelmatrix (Affi-Gel 15, BioRad) verwendet, bestehend aus an Agarose gekoppelten N-hydroxysuccinimid-Estern. Kopplung eines Liganden erfolgt spontan über primäre Aminogruppen.

Je 2 ml der Gel-Matrix wurden 3-mal mit ddH₂O gewaschen und anschließend mit circa 6-8 mg GST-VILIP-1 (siehe 3.2.2.1) in einem Volumen von 5 ml 50 mM HEPES, pH 7.5 über Nacht inkubiert. Nach Zentrifugation wurde die Gel-Matrix zur Absättigung freier

Bindungsstellen mit 1 M Ethanolamin, pH 8 für 1 h bei 4°C geschüttelt, anschließend in Säulen-Röhrchen gefüllt und solange mit Kopplungspuffer gewaschen, bis die O.D.₂₈₀ des Durchlaufs gleich null war.

Immunoaffinitätschromatographie:

Puffer 1:	10 mM Tris, pH 7.5
Puffer 2:	10 mM Tris, 500mM NaCl, pH 7.5
Elutionspuffer:	100 mM Glycin, 150 mM NaCl, pH 2.5
PBSA:	PBS, 0,01% NaAzid

Die Aufreinigung der Antikörper wurde wie in Harlow (1988) beschrieben durchgeführt. Zunächst wurde die Gelmatrix in mehreren Schritten gewaschen und äquilibriert (aufeinanderfolgend jeweils 10 ml Puffer 1, Elutionspuffer, 10 mM Tris (pH 8.8), 100 mM Triethylamin (pH 11.5), zuletzt 20 ml Puffer 1).

1 ml des Antiserums wurde zunächst hochtourig zentrifugiert, um feste Bestandteile zu entfernen, anschließend mit 9 ml Puffer 1 verdünnt, auf die Gelmatrix gegeben und das Säulenröhrchen verschlossen. Die Antikörper-Antigenbindung erfolgte 1 h lang unter Schütteln bei 4°C. Nach Entfernen der restlichen Antikörper-Lösung und intensivem Waschen der Gelmatrix (jeweils 20 ml Waschpuffer 1, Waschpuffer 2, Waschpuffer 1) wurden gebundene Antikörper mit 10 ml Elutionspuffer eluiert. Das Eluat wurde durch Zentrifugation in Centricon-Röhrchen (Amicon) auf circa 2,5 ml eingengt, über PD-10-Säulen (Amersham Pharmacia) in PBSA umgepuffert und weiter auf circa 1 ml eingengt. Die konzentrierte Antikörper-Lösung wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Alternativ hierzu erfolgte die Aufreinigung von polyklonalen Antikörpern gerichtet gegen die katalytische Domäne der GC-B aus Kannincheserum über die Bindung der Antikörper an auf Nitrocellulose-Membran (NC-Membran) immobilisierten GST-Fusionsproteinen der katalytischen Domäne.

3.2.2.3 Proteinbestimmung

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte colorimetrisch entweder mit der Amidoschwarz-Methode (Popov *et al.*, 1975) oder mit dem BCA-Proteinbestimmungs-Kit (BCA Protein Assay Kit, Pierce).

3.2.2.4 Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation wurden aufgearbeitete Proben aus C6/C6.2 Zelllinien und aus hippokampalen Zellkulturen eingesetzt. Die Zellen wurden aus Kulturschalen gesammelt, bei 700 x g pelletiert, mit 200-500 µl Extraktionspuffer (1xPBS, 1% Triton X-100, 1% IGEPAL, 1x Proteinkinase Inhibitor-Cocktail (Amersham)) versetzt und anschließend 3 x 10 Sekunden

sonifiziert. Die Proteinextraktion erfolgte 30-60 min bei 4°C auf einem Schüttler.

Um nichtlösliche Bestandteile aus dem Homogenat zu entfernen, wurde es nach der Inkubation für 15 min bei 20000 g und 4°C (Biofuge, Eppendorf) zentrifugiert. Die Proteinkonzentration des Überstandes wurde bestimmt (siehe 3.2.2.3) und gleiche Proteinmengen des Lysats für 2 Stunden mit an Protein-G-Agarose Beads (Santa Cruz) gekoppelten Antikörpern inkubiert. Nach dreimaligem, vorsichtigem Waschen wurden die Beads mit 30 µl Aqua dest. und 7 µl SDS/Mercaptoethanol-Probenpuffer versetzt und eine SDS-PAGE (siehe 3.2.2.8) wurde durchgeführt.

Alternativ hierzu wurde die Immunpräzipitation mit dem IP-Kit (Perbio Science) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.2.2.5 Subzelluläre Fraktionierung

Die subzelluläre Fraktionierung wurde nach einem Protokoll von Grimes et al., 1996 und Beattie et al., 2000 durchgeführt. C6/C6.2 Zellen wurden nach pharmakologischer Behandlung (siehe 3.2.6) mittels Zellschaber (Greiner) gesammelt. Die Zellen wurden mit 1000 x g für fünf Minuten pelletiert und in einem eiskalten TRIS/NaCl Puffer (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, 1 x Proteinaseinhibitor Cocktail (complete[®], Roche Diagnostics), 1 mM Natriumorthovanadat, 5 mM Natriumfluorid, 20 mM HEPES, pH 7,4) resuspendiert. Durch dreimaliges einfrieren und auftauen wurden die Zellen lysiert. Dies wurde durch passieren des Zellhomogenats durch eine Kanüle mit 0,45 mm Durchmesser unterstützt. Intakte Zellen und Kerne wurden durch eine Zentrifugation (1000 x g, 5 min, 4 °C) entfernt. Der Überstand wurde auf TRIS-Puffer mit 10 Prozent Sucrose geschichtet und mit 100 000 x g für eine Stunde bei 4°C ultrazentrifugiert. Das Pellet P2 wurde in 50 µl TRIS-Puffer mit 1% IGEPAL resuspendiert. Der Überstand S2 wurde 1:1 in TRIS-Puffer verdünnt.

3.2.2.6 cGMP- Messung in hippokampalen Zellkulturen

Die Messung des intrazellulären cGMP-Spiegels erfolgte mithilfe des cGMP Direct Biotrak EIA (Amersham/Pharmacia) und wurde nach Angaben des Herstellers entsprechend durchgeführt.

3.2.2.7 ELISA

Die Messung der nikotinischen Azetylcholin-Rezeptordichte auf der Zelloberfläche erfolgte nach einem Protokoll von Cooper et al., 1999/Jeanlos et al., 2001. Dazu wurden die Zellen zunächst mit 3% BSA in Neurobasalmedium für 30 min blockiert und anschließend für 45 min bei 37°C mit Antikörperlösung inkubiert. Während dieser Zeit fand die entsprechende pharmakologische Behandlung der Zellen statt (siehe 3.2.6). Die Messung der GC-B Oberflächenpräsentation erfolgte ohne blockieren mittels Inkubation von Biotin-markiertem CNP für verschiedene Zeiträume (siehe 3.2.6, 4.1.3.1). Nach der Inkubation wurde die Antikörper-, bzw. CNP-Lösung entfernt, die Zellen mit 2% PFA in 1 x PBS für 10 min fixiert, und 4mal mit 1 x PBS gewaschen. Die 45 minütige Inkubation mit den entsprechenden

peroxidase-gekoppelten Zweitantikörpern wurde nach viermaligem Waschen von einer einstündigen Inkubation bei 37°C mit 300 µl Peroxidasesubstratlösung (ABTS/Amersham) gefolgt. Die Färbereaktion wurde mit 1% SDS in 1 x PBS gestoppt und 200 µl der Lösung in eine 96-well Mikrotiterplatte überführt. Die Messung des entstandenen grünlichen Produktes erfolgte in einem ELISA-Reader (Dynex MR II) bei 450 nm.

3.2.2.8 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

5x Protein-Probenpuffer:	250 mM Tris pH 6.8, 7.5% SDS, 30 % Glycerol 1% Mercaptoethanol, 0,25% Bromphenolblau
Elektrophoresepuffer:	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS
Coomassie-Färbelösung:	0,125% Coomassie-Brilliantblue R250, 50% Methanol, 10% Essigsäure
Entfärber:	7% Essigsäure, 5% Methanol in ddH ₂ O

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE nach der Methode von Laemmli (1970). Es wurden 5-20%ige Gradientengele und 5%ige Sammelgele für kleine Gelkammern (Peglabs) verwendet. Die zu analysierenden Proben wurden im Verhältnis 1:5 mit 5fach konzentriertem SDS/Mercaptoethanol-Probenpuffer versetzt, für 1-3 min gekocht und mit einer Hamilton-Mikroliter-Spritze auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer Stromstärke von 12 mA und einer Spannung von circa 350 Volt für 2 h in Elektrophoresepuffer durchgeführt.

Die Proteingele wurden anschließend entweder geblottet (siehe 3.2.2.9) oder mit Coomassie-Brilliantblue-Färbelösung gefärbt (circa 1h bei Raumtemperatur). Durch Inkubation in Entfärber-Lösung wurden die Banden im Gel sichtbar gemacht. Zur Dokumentation wurden gefärbte Gele in Aqua dest. gewaschen und anschließend eingescannt (Linoscans 1200, Heidelberger Druckmaschinen).

3.2.2.9 Westernblot und Immundetektion

Blotpuffer:	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,2% SDS, 20% Methanol
Ponceau-Lösung:	0,5% Ponceau in 1% Essigsäure
TBST:	1 x TBS, 0,1% Tween-20
AP-Puffer:	100 mM Tris/HCl, pH 9.6, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂ * 6 H ₂ O
NBT:	50 mg/ml in 70% Dimethylformamide
BCIP:	50 mg/ml in 100% Dimethylformamide
Protran BA Nitrocellulose:	(Schleicher & Schüll)

Der Transfer von Proteinen aus Polyacrylamid-Gelen auf eine Nitrocellulose-Membran (NC-Membran) erfolgte elektrophoretisch nach der Methode von Towbin (1979).

Der Protein-Transfer aus 0,5 mm dicken Gelen wurde in einer Trans-Blot-Cell (BioRad) in Blotpuffer für 1,5 h bei 200 mA und 350 V bei 4°C durchgeführt. Dickere Gele (1,5 mm) wurden für 3 h bei 70 V und 500 mA geblottet. Anschließend wurde der Erfolg des Transfers durch Färbung der NC-Membran in Ponceau-Lösung kontrolliert.

Die Detektion von Antigenen erfolgte indirekt über die Reaktionen der an den Zweitantikörper gekoppelten Enzyme alkalische Phosphatase (Umsetzung der Substrate NBT und BCIP zu einem blauen Farbstoff) oder Meerrettichperoxidase (Umsetzung von Substraten und Emission von Chemilumineszenz, ECL-Detektionssystem, Amersham/PerBio).

Die NC-Membran wurde nach dem Transfer zunächst für mindestens 1 h mit 5% Milchpulver in TBST (MP-TBST) bei RT blockiert. Alle verwendeten Antikörper wurden mit MP-TBST entsprechend verdünnt. Die Inkubation mit dem Erstantikörper betrug mindestens 2,5 h bzw. erfolgte bei 4°C über Nacht. Nach dem Entfernen der Antikörper-Lösung wurde die NC-Membran jeweils dreimal mit TBST für 10 min gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Alkalische Phosphatase-gekoppelte Zweitantikörper wurden 1:5000 in MP-TBST verdünnt. Nach 90 minütiger Inkubation wurde die NC-Membran erneut gewaschen und anschließend für 2-5 min in AP-Puffer inkubiert, bevor die Färbelösung (66 µl NBT, 33 µl BCIP pro 10 ml AP-Puffer) zugesetzt wurde. Nachdem eine klare Färbung der Banden zu erkennen war, wurde die Farbreaktion durch 10 x PBS beendet, die Membran mit Aqua dest. gespült und auf Filterpapier getrocknet.

Bei dem alternativen Antigen-Nachweis mittels ECL-Detektionssystem wurde der Peroxydase-gekoppelte Zweitantikörper 1:10000 in MP-TBST verdünnt und ebenfalls circa 90 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Detektion der Proteine nach Angaben des Herstellers. Durch Exposition der NC-Membranen auf sensitive Filme (HyperFilm, Amersham Life Science) wurde die Chemilumineszenz sichtbar gemacht.

3.2.3 Zellkultur

3.2.3.1 Kultivierung von C6-Gliomazellen

Kulturmedium:	DMEM, 10% FKS, 2 mM L-Glutamin
C6/C6.2	100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
1 x Trypsin/EDTA:	Stammlösung (Gibco/Invitrogen) 1:10 in HBSS ⁻

Die C6/C6.2-Gliomazellen wurden in Kulturmedium in einem 37°C Zellkultur-Inkubator (Heraeus) bei 5% CO₂ und 90% H₂O-gesättigter Luft kultiviert..

Die Passage der Zellen erfolgte zwei mal pro Woche, wobei ungefähr ein Zehntel der Zellen einer konfluenten Flasche nach einem Waschschrift (10 ml HBSS⁻) und 5-10 minütiger Zentrifugation (700 g, 4°C) in neues Medium überführt wurde. Die stark adhärierenden C6/C6.2-Zellen wurden vor der Zentrifugation trypsinisiert. Die Expression von VILIP-1 in den C6.2-Zellen wurde durch die Applikation von 5mM IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalaktosid)

übernacht in das Kulturmedium induziert.

3.2.4 Primärkulturen

3.2.4.1 Präparation von Körnerzellen aus dem Cerebellum

Poly-D-Lysin:	100 mg/l in 0,15 M Borsäure, pH 8.4
Kulturmedium:	DMEM, 10% HS, 2mM Glutamin 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
Trypsin/EDTA:	0,5% in HBSS ⁻
DNase I (Boehringer):	0,01% (200 U) in HBSS ⁻ , 2,4 mM MgSO ₄
Cytosin-Arabinofuranosid (AraC):	4 µM in Kulturmedium

Vier bis sechs Tage alte Ratten wurden dekapitiert, die Gehirne entnommen und die Cerebelli herauspräpariert. Nach Entfernen der Meningen und Blutgefäße wurden die Cerebelli mit einer Schere zerkleinert und zwei Mal mit eiskaltem HBSS⁻ gewaschen. Nach Zugabe von 1 ml der Trypsinlösung folgte eine 10 minütige Inkubation bei 37°C. Anschließend wurden die Gewebestücke erneut gewaschen (3x mit kaltem HBSS⁻) und in Anwesenheit von DNase I mit feuergeglätteten Pasteurpipetten dissoziiert. Nach Zugabe von 10 ml Kulturmedium zu der Zellsuspension erfolgte ein 10 minütiger Zentrifugationsschritt bei 700 g. Die Zellen wurden in Kulturmedium resuspendiert und in Dichten von 200000 – 400000 Zellen pro Vertiefung in 24-well-Gewebekulturplatten ausplattiert. Die 24-well-Kulturplatten waren zuvor mit Deckgläschen bestückt mit Poly-D-Lysin beschichtet worden. Medienwechsel erfolgte 1mal pro Woche, wobei nur die Hälfte des Kulturmediums ausgetauscht wurde. Nach 1 bis 2 Wochen wurden die Zellen fixiert und immungefärbt (siehe 3.2.5).

3.2.4.2 Präparation und Kultivierung von hippocampalen Neuronen

Poly-D-Lysin:	100 mg/l in 0,15 M Borsäure, pH 8.4
Medium 1:	DMEM, 10% FKS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2mM Glutamin
Medium 2:	Neurobasal™, 1 x B27 (Invitrogen), Pen/Strep (s.o.) 0,5 mM Glutamin
Trypsin:	0,1% in HBSS ⁻
DNase I (Boehringer):	0,01% (200 U) in HBSS ⁻ , 2,4 mM MgSO ₄

19-20 d alte Rattenembryos wurden nach Entnahme aus der Bauchhöhle und Befreiung von Plazenta und Fruchtblase dekapitiert. Die Gehirne wurden entnommen, die Hippocampi unter dem Binocular herauspräpariert und in kaltem HBSS⁻ gesammelt. Nach dreimaligem Waschen

mit kaltem HBSS⁻ erfolgte eine 20 minütige Inkubation in Trypsin-Lösung in einem 37°C Wasserbad. Anschließend wurden die Hippocampi erneut 3-4 mal mit kaltem HBSS⁻ gewaschen. Zur Dissoziation des Gewebes wurden 2 ml der DNase-Lösung zugefügt und die Hippocampi je dreimal langsam durch zwei verschiedene Kanülen abnehmender Weite gedrückt. Die Zellsuspension wurde durch ein Nylonnetz (Maschenweite 125µm) gegeben, um nicht dissoziierte Gewebestücke zu entfernen, und mit Medium 1 auf 20 ml aufgefüllt. Nach Bestimmung der Zellzahl wurde die Zellsuspension entsprechend verdünnt. Die Zellen wurden in unterschiedlichen Dichten („High Density“, 80000-100000 Zellen pro Deckglas in 24-well-Schalen und 150000 Zellen pro Vertiefung in 12-well Schalen) in mit Poly-D-Lysin beschichteten Zellkulturschalen ausplattiert. 24 h nach Aussaat erfolgte ein kompletter Medienwechsel auf Medium 2. Weitere Medienwechsel erfolgten einmal pro Woche mit Medium 2, wobei nur etwa die Hälfte des alten Mediums entfernt wurde.

3.2.5 Immuncytochemie

Fixierlösung:	4% PFA in PBS
Glycin-Puffer:	25 mM in PBS
Blockierlösung:	3% BSA, 5% HS, 0,2% Triton X-100 in PBS
Mowiol (Mounting-Medium):	10% Mowiol, 25% Glycerin, 100 mM Tris/HCl, pH 8.5, 2,5% DABCO

Auf Deckgläschen kultivierte cerebelläre oder hippocampale Neurone (siehe 3.2.4.2) wurden nach Absaugen des Mediums für 10 min mit auf 37°C vorgewärmter Fixierlösung bei RT fixiert. Zur Reduktion der Hintergrundfärbung erfolgte nach der Fixierung zweimal ein 10 minütiger Waschschriff mit Glycin-Puffer (Absättigung der freien Bindungsstellen des Paraformaldehyds). Nach den Waschschriffen wurden die Zellen 30 min lang mit Blockierlösung inkubiert. Die Inkubation mit den in Blockierlösung verdünnten ersten Antikörpern erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach Absaugen der Antikörperlösung wurden die Zellen drei mal mit PBS gewaschen und anschließend mit den Fluoreszenz-markierten Zweitantikörpern (entsprechend verdünnt in Blockierlösung ohne Triton X-100) im Dunkeln 60-90 min inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit Mowiol auf Objektträgern eingebettet. Die Dokumentation der Zellen erfolgt mit Hilfe einer digitalen Kamera (Spot RT) und des Programms Meta View (beides Visitron Systems) oder mit Hilfe einer Kappa DX20-Videokamera und des Programms Kappa DX Control Vers. 1.1b. Die Bearbeitung der aufgenommenen Bilder erfolgte anschließend mit Hilfe der Programme Adobe Photoshop 5.5 oder NIH Image für Macintosh.

3.2.6 Pharmakologische Stimulation von Zellkulturen

Hippokampale Neurone oder C6/C6.2 Gliomazellen wurden mit 0,2 µM CNP (Calbiochem), für 20 Minuten (cGMP-Assay, siehe 4.1.1.2, 4.1.2, 4.1.3.3, 4.1.3.4), bzw. für verschiedene

Zeiträume (1min, 5min, 10min, 15min, 20min und 30min; Messung der GC-B Zelloberflächenexpression, siehe 4.1.3.1) mit biotinyliertem CNP (Phoenix Pharmaceuticals) stimuliert. Der allgemeine Phosphodiesterasehemmer IBMX wurde 30 min vor Stimulationsbeginn in einer Konzentration von 10 μM in das Medium appliziert.

Pharmaka, die unter 4.1.3.4 verwendet wurden, stammen von der Firma Sigma-Aldrich. Sie wurden in Konzentrationen eingesetzt, die aus der Literatur für dieses Zellsystem bekannt sind. Um ihre Wirksamkeit zu gewährleisten, wurden die Inhibitoren Wortmannin, Monensin, Phenylarsinoxid (PAO) und Brefildin A, mit den Zellen vorinkubiert.

Wortmannin wurde 1 h in einer Konzentration von 100nM, Monensin 10 μM für 45 min, und PAO 10 μM für 15 min präinkubiert. Brefildin A wurde in einer Konzentration von 5 μM 45 min vor Beginn der CNP-Stimulation in das Medium appliziert.