

## **3 MATERIAL UND METHODEN**

### **3.1 Northern blotting**

Die humane Monozyten Zelllinie U937 differenziert sich während der Inkubation mit 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Azetat (TPA) zu Makrophagen aus (Hass et al., 1989). Diese Fähigkeit geht verloren, wenn die Zellen mit einem Antisense-Konstrukt gegen CD11b transfiziert werden (Prudovsky et al., 2002)

U937 Zellen (Kultur s. Kap. 3.6.1.) wurden wiederholt mit RPMI Medium gespült und geerntet. Die mRNA Präparation erfolgte mit RNeasy-Affinitätssäulen gemäß des Quiagen Protokolls (Quiagen Inc., Valencia, CA). Aliquots von 20µg RNA wurden in einem Agarose-Formaldehyd-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf Hybond N Nylon Membranen (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) transferiert. Durch beidseitige UV-Bestrahlung wurde die RNA mit der Nylonmembran quervernetzt. Anschließend wurde die Membran mit der [32P]dCTP-markierten MAF-cDNA-Probe hybridisiert. Nach sorgfältigem Waschen wurde das Signal durch autoradiographische Exposition der Membran sichtbar gemacht.

Die gleichmäßige Beladung des Gels wurde durch die 18s- und 28s-Untereinheiten der ribosomalen RNA kontrolliert. Die Densitometrie wurde mit dem Bioprofil 1D Image Analysis System mit Bio-1D V.97 Software (Bioprofil; Froebel, Wasserburg) durchgeführt. RNA wurde standardmäßig bei -80°C aufbewahrt.

### **3.2 Herstellung polyklonaler Anti-MAF-Antikörper**

#### **3.2.1 Auswahl der Peptide**

Die Auswahl der Peptide als Antigene zur Produktion von polyklonalen MAF-spezifischen Antikörpern (Ak) zielte auf die mögliche Bindung der Ak an das Protein im Gewebe. Ausgehend davon, dass sich ein Protein mit den hydrophoben Teilen nach "innen" und den hydrophilen Teilen nach "außen",

dem wässrigen Milieu der Zelle oder des Interstitiums zugewandt, falten wird, wurden mithilfe des Kyte-Doolittle-Algorithmus (s. Kap. 3.10 und 4.8), der hydrophobe und hydrophile Bereiche des Proteins berechnet und graphisch darstellt, die hydrophilen Bereiche von MAF bestimmt (Kyte und Doolittle, 1982). Der C-Terminus des Proteins blieb diesmal unberücksichtigt, da zwei in von mir durchgeführten Vorversuchen bestellte Peptid-Antikörper gegen Sequenzen des C-Terminus in ausgiebigen Tests keine spezifische Färbung im Gehirnschnitt ergeben hatte. Damit blieben fünf hydrophile Bereiche von MAF, die durch fünf Peptidsequenzen abgedeckt wurden (s. Tab. 3.2.2.1.).

### 3.2.2 Kopplung der Peptide an Trägerproteine

Um antigen wirken zu können, müssen Peptide an so genannte Trägerproteine gekoppelt werden. Das Schneckenprotein keyhole limpet hemocyanin (KLH) und Ovalbumin (Hühnerei-Albumin) sind verbreitete Trägerproteine. Jedes der ausgewählten Peptide wurde an KLH und an Ovalbumin gekoppelt und dann Kaninchen injiziert. Damit wurden insgesamt zehn Antikörper hergestellt.

Tab. 3.2.2.1. Peptide und Kopplungsmethoden an Trägerproteine

Peptid	Sequenz	Kopplung an KLH über	Kopplung an Ovalbumin über
1	SALLHRLSDDCWEK-OH	MBS	Glutaraldehyd
2	HIVSWKKSHLRTAEHC-OH	MBS	MBS
3	YAPWLNLRRELGK-OH	MBS	Glutaraldehyd
4	TSMNNTDGLQEK-OH	MBS	Glutaraldehyd
5	CHYYAIWKYLYRSPTDFMRHL-OH	MBS	MBS

#### 3.2.2.1 Kopplung der Peptide über MBS an KLH oder Ovalbumin

Das Prinzip einer Kopplung über m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide Ester (MBS) besteht darin, dass in der Aminreaktion das MBS mit seiner

aktiven N-hydroxysuccinimid-Estergruppe an freie Aminogruppen (z.B. denen von Lysin) des zugegebenen Peptids oder Proteins bindet und diese damit als Bindungsstelle aktiviert. Im zweiten Schritt reagieren die freien SH-Gruppen des nun zugegebenen Peptids oder Proteins unter Ausbildung einer Thioether-Bindung mit der Doppelbindung des Maleimid-Restes des MBS. Gibt es bei einem Peptid also ein endständiges Lysin (K), wird dieses in der ersten Reaktion mit MBS aktiviert und dann im zweiten Schritt über die freien Thiolgruppen des Trägerproteins an dieses gebunden. Hat das Peptid ein endständiges Cystein (C), werden im ersten Schritt freie Aminogruppen des Proteins mit MBS aktiviert und im zweiten Schritt an die freie Thiolgruppe des Cysteins des Peptids gebunden.

Alle Inkubationsschritte wurden sofern nicht anders angegeben bei Raumtemperatur rührend durchgeführt.

Es wurden 1mg Trägerprotein oder Peptid pro Milliliter 50mM Natriumphosphatpuffer pH=8,0 gelöst und 100µl einer 0,1% MBS-Lösung in Dimethylformamid (DMF) dazugegeben. Nach einer halbstündigen Inkubation wurde das überschüssige MBS mit einer Gelfiltration über Sephadex G25 Säulen (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) entfernt. Dann wurde der pH auf 7,0 eingestellt und 1mg Peptid oder Trägerprotein pro Milligramm Trägerprotein oder Peptid dazugegeben und drei Stunden inkubiert. Die so gekoppelten Peptid wurde aliquotiert in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C aufbewahrt.

#### *3.2.2.2 Kopplung der Peptide über Glutaraldehyd an Ovalbumin*

Pro Milligramm Peptid wurde ein Milligramm Ovalbumin eingesetzt. Das Peptid wurde zusammen mit dem Ovalbumin (Grade V, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) in einem Milliliter Phosphate buffered Saline pH 7,4 (PBS) pro Milligramm Peptid auf Eis gelöst. Das entsprechend gleiche Volumen einer frisch angesetzten 2,5% Glutaraldehydlösung in PBS wurde tropfenweise zugegeben. Diese Mischung wurde mindestens eine Stunde auf Eis gerührt. Die Reaktion wurde durch langsame Zugabe von 10mg Natriumborhydrit pro Milligramm

Peptid und einständiges Rühren bei 4°C gestoppt. Nach der Dialyse gegen PBS bei 4°C über Nacht wurden die so gekoppelten Peptide aliquotiert in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C aufbewahrt.

### 3.2.3 Adsorption an Bentonit

Bentonit ist ein Lehm, der ursprünglich nahe des Forts Benton in Wyoming, USA, gefunden wurde und aus überlagerten Al-Mg-Si (OH)- Gittern besteht, mit einer absorbierenden Oberfläche von 100-300 m<sup>2</sup>/g. Die Größe der Partikel, die für Immunisierungen benutzt werden ist unter 1 µm und damit die richtige, um von Makrophagen phagozytiert zu werden.

#### 3.2.3.1 Herstellen der Bentonit-Stammlösung

Ein Gramm Bentonit (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) wurden in 200ml destilliertem Wasser (Aqua dest.) suspendiert und auf einen Liter Aqua dest. Endvolumen aufgefüllt. Zur Abtrennung der großen Partikel wurde diese Mischung bei 1000xg für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde bei 2000xg zentrifugiert und das Pellet in das gleiche Volumen PBS aufgenommen. Diese Stammlösung wurde aliquotiert in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C aufbewahrt.

#### 3.2.3.2 Kopplung des Proteins an Bentonit

Pro 50µl Bentonite-Stammlösung wurden 100µg Protein gekoppelt. Nach erneutem Waschen des Bentonits wurde das Antigen in entsprechender Menge zugegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Mischung wurde aliquotiert in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C aufbewahrt.

### 3.2.4 Immunisierung der Kaninchen

Alle Versuche, die Tiere involvieren, wurden im Einklang mit den Deutschen und Europäischen Richtlinien zum Umgang mit Labortieren durchgeführt. Zehn weibliche Weiße Neuseeländer Kaninchen wurden immunisiert und Serum wurde gewonnen.

#### 3.2.4.1 Präimmunserum:

Vor der ersten Injektion von Antigenen wurde jedem Kaninchen 3-5ml Blut abgenommen, um später Präimmunserum als Kontrolle zu haben. Wir untersuchten vor Anfang der Immunisierung das Präimmunserum auf unseren Systemen, bei Kreuzreaktionen hätten wir die Tiere aus dem Versuch genommen, es gab jedoch nur eine sehr leichte Hintergrundfärbung in unseren Testsystemen (s. Kap. 3.3).

#### 3.2.4.2 Technik der subskapulären Injektion:

Die verwendete Technik der subskapulären Injektion ist eine besondere Form der subkutanen Applikation von Antigenen beim Kaninchen. Sie gilt als die effektivste und verträglichste Form der lokalen Applizierung eines Antigens. Der Ort der Injektion ist nahe den axillären Lymphknoten gelegen und es treten im Gegensatz zur sonst üblichen subkutanen Injektion auf dem Rücken keine Ulzera auf. Bis zu 4ml können auf einer Seite injiziert werden, bei der subkutanen sind nur 0,5-1ml pro Injektion möglich.

Die sicherste Methode zur subskapulären Injektion ist, auf dem Boden kniend, das Kaninchen zwischen den Beinen leicht zu fixieren. Der obere Rand der Skapula lässt sich leicht palpieren. Es wurde in den Raum zwischen der medialen (inneren) Fläche des Schulterblattes und der Thoraxwand injiziert. In den meisten Fällen reagieren die Kaninchen kaum und zeigen keine Schmerzreaktion.

### 3.2.4.3 Immunisierung, Zeitschema und Serengewinnung

Es wurde ein Milligramm gekoppeltes und an Bentonit adsorbiertes Peptid in Freundschem Adjuvans komplett (freund, 1942), in einem Mischungsverhältnis von 2/5 Antigen zu 3/5 Adjuvans emulgiert und unter die Schulterblätter injiziert. Nach drei Wochen erfolgte die erste Boosterinjektion mit der gleichen Menge Peptid emulgiert im gleichen Mischungsverhältnis in Freundschem Adjuvans incomplett. Drei Wochen nach dem ersten Boostern erfolgte die nächste Injektion. Die Blutentnahme erfolgte sieben bis zehn Tage danach (nicht mehr als 10ml/kg Körpergewicht). Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C wurden die geronnenen Teile des Blutes (Zellen und Fibrin) abzentrifugiert (10 min. bei 800xg). Das Serum wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C aufbewahrt.

## 3.3 Testung der neu produzierten Antikörper

Die neu produzierten Antikörper wurden in drei verschiedenen Systemen getestet.

### 3.3.1 Dot Blots

Um herauszufinden, ob in dem jeweiligen Serum spezifische Antikörper auf das zum Immunisieren verwendete (antigene) Peptid vorhanden sind, wurden Dot Blots durchgeführt.

Untersucht wurde jeweils: Das ungekoppelte antigene Peptid, das an das verwendete Trägerprotein gekoppelte antigene Peptid und ein an das verwendete Trägerprotein gekoppelte Nonsense (nicht antigenes) -Peptid.

Alle Inkubationsschritte wurden sofern nicht anders angegeben bei Raumtemperatur schwenkend durchgeführt.

Es wurde jeweils 1µg ungekoppeltes oder gekoppeltes Peptid auf eine Nitrocellulose- Membran aufgetropft und mit einem weichen Bleistift markiert. Die Membran wurde anschließend eine Stunde in der Blockierungslösung 10%

Milchpulver in PBS inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen wurde die Dot Blots zwei Stunden mit Präimmunserum (verdünnt 1:100) oder Serum (verdünnt 1:1000) in 10% Milchpulver in PBS inkubiert. Nach erneutem sorgfältigem Waschen folgte die Inkubation mit Peroxidase-markierten Zweitantikörpern (1:250 in 10% Milchpulver in PBS). Die gebundenen Zweitantikörper wurden mit Chloronaphthol detektiert.

Für sämtliche neu produzierte Antikörperseren ergab sich die spezifische Reaktion: Gefärbt wurde das antigene Peptid in jeder Form, nicht aber das Nonsense Peptid oder die Ovalbumin-Ovalbumin-Verbindung. Zur Kontrolle durchgeführte Inkubationen mit Zweitantikörpern ohne vorheriger Inkubation mit Seren ergab keine Färbung. Keines der Präimmunsera zeigte Färbungen.

Demnach wurden zehn spezifische polyklonale Peptidantikörper gegen MAF produziert.

### 3.3.2 Western Blot mit U937 Zellen

Da im Northern Blot (s. Kap. 4.1) gezeigt werden konnte, dass MAF auf mRNA Ebene nur in ausdifferenzierten Makrophagen exprimiert wird, wurde als nächster Schritt Western Blots mit undifferenzierten und durch TPA-Inkubation differenzierten U937 Zellen (s. Kap. 4.1 und 3.6.1.) durchgeführt.

Die Zellen wurden durch wiederholtes Aufziehen mit einer Kanüle lysiert.  $10^6$  Zellen wurden pro Spur aufgetragen.

Ein 10% SDS Trenngel wurde mit Sammelgel vorbereitet und die Zellysate wurden im elektrischen Feld aufgetrennt. Bei 0,3A/Gel und nicht mehr als 20V wurden die aufgetrennten Proteine vom Gel auf Nitrocellulose Membranen transferiert.

Soweit nicht anders angegeben wurden alle Inkubationen bei Raumtemperatur schwenkend durchgeführt. Nach einer einstündigen Inkubation mit 10% Magermilch in PBS wurden die Blots über Nacht getrennt mit den 1:1000 verdünnten primären MAF-Antikörpern in 10% Magermilch PBS bei 4°C

geschüttelt. Dreimaligem Waschen mit PBS, versetzt mit 0,05% Tween, folgte die einstündige Inkubation mit dem 1:1000 verdünnten Zweitantikörper Peroxidase-anti-Kaninchen IgG (Camon, Wiesbaden, Germany). Nach dreimaligem Waschen mit 0,05% Tween PBS wurden die Blots mit dem Chemoluminescence Detection Kit (Amersham, Buckinghamshire) entwickelt.

Um die Spezifität auch im Western zu überprüfen, wurde Präimmunserum und Serum untersucht. Die MAF-spezifische Bande lief bei ca. 66kDa. TPA-differenzierte Makrophagen zeigten eine deutliche MAF-Bande, wohingegen undifferenzierte U937 Monozyten keine MAF-Expression zeigten. Das Präimmunserum zeigte keine MAF-Bande. Der neue MAF-Antikörper ist demnach auch im Western Blot spezifisch.

### 3.3.3 Immunohistochemie mit Peptidinhibition

Die Spezifität des ausgewählten Antikörpers wurde schließlich die Immunohistochemie nach ECL (s. Kap. 3.7.2 Immunohistochemie) mittels der Peptidinhibition (s. Kap. 3.3.3.1. Peptidinhibition) auf ihre spezifische MAF-Färbung überprüft. Nach der Vorinkubation des Antikörpers mit dem Nonsense-Peptid, bleibt die spezifische MAF-Färbung auf Makrophagen/Mikroglia im deafferenzierenden Hippocampus erhalten, nach der Vorinkubation mit dem antigenen Peptid, gibt es keine Färbung (s. Ergebnisse 4.2).

Ich habe also einen auch im Schnitt spezifischen polyklonalen MAF-Antikörper generiert.

#### 3.3.3.1 *Peptidinhibition*

Das Serum wurde in 1ml PBS in der benötigten Verdünnung mit entweder 10µg an das entsprechende Trägerprotein gekoppeltem antigenen Peptid oder einem nicht-antigenen (Nonsense) gekoppeltem Peptid über Nacht bei 4°C rollend vorinkubiert und danach bei 14 000xg 1 min abzentrifugiert. Mit den der jeweiligen Methode entsprechenden Zusätzen versetzt, wurde der Überstand dann zur primären Antikörperinkubation verwendet.



### **3.4 Western Blot mit BV-2 Zellen**

BV-2 Zellen (Kultur, s. Kap. 3.6.2.) wurden durch wiederholtes Gefrieren und Auftauen lysiert. Die SDS/Page Analyse wurde in einem 7,5% Separationsgel durchgeführt. Danach wurden die aufgetrennten Proteine auf Nitrocellulose transferiert. Die Membranen wurden mit dem MAF-spezifischen Antikörper wie in Kap. 3.3.2. beschrieben inkubiert. Nach der Inkubation mit einem Horseradish-Peroxidase-gekoppelten Esel-anti-Kaninchen-Antikörper IgG (Amersham, Buckinghamshire), wurden die Blots mit dem Chemoluminescence Detection Kit (Amersham, Buckinghamshire) entwickelt.

### **3.5 Stereotaktische entorhinale Kortexläsion (ECL) *in vivo***

Sämtliche Operationen wurden in Einklang mit den Deutschen und Europäischen Richtlinien zur Verwendung von Labortieren durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit bekamen 12 BL/9 Mäuse eine unilaterale entorhinale Kortexläsion (ECL). Die stereotaktische Operation wurde unter tiefer Rompun/Ketamin-Anästhesie vorgenommen. Der linke mediale entorhinale Kortex wurde durch eine 2mm weite Stahlklinge definiert läsioniert. Die mediale Kante des Messers wurde auf die folgenden Koordinaten vom  $\lambda$  aus gemessen eingestellt: Anterior/Posterior 0,4mm; Lateral 1,2mm; Dorsoventral bis zur Basis des Schädels. Es wurde während oder nach dem Setzen der ECL keine Elektrizität angewendet.

Drei Tage nach Läsion wurden die Mäuse in tiefer Rompun/Ketamin Anästhesie transkardial mit 4% Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt) in 0,1M Phosphatpuffer (pH=7,4, PB) perfundiert. Die Gehirne wurden entnommen, gespült und über Nacht in PB gelagert. Dann wurden sie mit einem Vibratom in 40 $\mu$ m dicke Schnitte geschnitten und in PB aufbewahrt.

## **3.6 Zellkultur**

### **3.6.1 U937 Zellen**

U937 Zellen wurden in RPMI 1640 Medium (Invitrogen, Karlsruhe) versetzt mit 10% fetalem Kälberserum (Fetal Calf Serum, FCS; Invitrogen, Karlsruhe) bei einer Zelldichte nicht über  $2 \times 10^5$  Zellen/ml bei 37 °C kultiviert. Die U937 Monozyten wurden durch 24-stündige Inkubation mit 10nM TPA in RPMI Medium mit FCS bei 37 °C zu Makrophagen ausdifferenziert (Hass 1989).

### **3.6.2 BV-2 Mikrogliazellen**

BV-2 Zellen sind primäre Maus-Mikroglia, die durch eine stabile Transfektion mit einem v-raf/v-myc rekombinanten Retrovirus immortalisiert wurden (Blasi et al., 1990). Ihr Phänotyp entspricht funktionell nativen aktivierten Mikrogliazellen (Bocchini et al., 1992).

BV-2 Mikrogliazellen wurden mit einer Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen/ml auf poly-L-Lysin beschichteten 24-Lochplatten ausplattiert und 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

### **3.6.3 Gemischte Neuron/Glia-Kokulturen**

Gemischte Neuron/Mikroglia-Zellkulturen wurden aus den Gehirnen von 2-3 Tagen alten B10.PL Mäusen wie zuvor beschrieben präpariert (Lehnardt et al., 2002; Vartanian et al., 1995). Zusammengefasst wurde Gehirngewebe trituriert und mit Trypsin 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach einer mechanischen Dissoziation wurden die Zellen in DMEM mit 0,05% BSA, 2% FCS (Fetal Calf Serum) und N2 Zusätzen ausplattiert. Die Zellen wurden eine Woche in Kultur gehalten.

## **3.7 Immunohistochemie**

Alle immunohistochemischen Färbungen wurden an schwimmenden Schnitten durchgeführt.

Visualisiert wurden die primären Antikörper entweder durch einen Avidin-Biotin-Komplex und das Chromogen 3,3' Diaminobenzidin (DAB) oder durch verschiedenfarbige Fluoreszenzfarbstoffe.

Solange nicht ausdrücklich anders dargestellt wurden alle Schritte bei Raumtemperatur schwenkend durchgeführt.

### 3.7.1 Visualisierung durch das Chromogen 3,3' Diaminobenzidin (DAB)

Zuerst wurden die endogenen Peroxidasen durch eine fünfminütige Inkubation mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck, Darmstadt) in Phosphatpuffer (pH= 7,4; PB) blockiert.

Nach dreimaligem Waschen in PB für jeweils 10 Minuten, wurden die Schnitte dann über Nacht bei 4°C mit 10% Normal Goat Serum (NGS, Vector, Burlingame, CA, USA) mit 0,5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) vorinkubiert, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Mit den Erstantikörpern (MAF 1:1000 oder CD11b (Mac-1, Chemicon, Temecula, CA, USA), 1:250) wurde bei 4°C über Nacht in 1% NGS mit 0,5% Triton X-100 in PB inkubiert. Bei jeder Färbung wurden Kontrollen mitgeführt, die nur mit dem Zweitantikörper oder ohne jeglichen Antikörper inkubiert wurden. Nach dreimaligem Waschen (je 10 Minuten in PB), wurden die Schnitte mit dem biotylinierten Anti-Kaninchen-Zweitantikörper aus der Ziege (Vector, Burlingame, CA, USA), verdünnt 1:250 in 1% NGS mit 0,5% Triton X-100 in PB, zwei Stunden inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (je 10 Minuten in PB), wurden die Schnitte 45 Minuten mit der AB – Lösung (ABC Elite Kit, Vectastain, Vector, Burlingame, CA, USA) und dann 5 Minuten mit DAB 0,7 mg in 0,1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PB inkubiert. Die Schnitte wurden nach der Entwässerung in der Alkoholreihe mit Entellan aufgezogen und mit einem BX-50 Mikroskop (Olympus, Tokyo, Japan) untersucht.

### 3.7.2 Immunofluoreszenzfärbungen

Die Fluoreszenzfärbungen wurden an schwimmenden Gehirnschnitten, gemischten Neuron/Glia-Kokulturen und BV-2 Mikrogliazellen durchgeführt.

Die Zellen und Kokulturen wurden mit 2% Paraformaldehyd fixiert. Zur Präparation der Schnitte siehe Kap. 3.5.

Nach dreimaligem Waschen (je 10 Minuten in PB) wurden die Zellen und Schnitte 30 Minuten mit 10% Normal Goat Serum (NGS, Vector, Burlingame, CA, USA) mit 0,5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) in PB vorinkubiert, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Bei jeder Färbung wurden Kontrollen mitgeführt, die nur mit dem Zweitantikörper oder ohne jeden Antikörper inkubiert wurden. Dann wurden die Zellen oder Schnitte über Nacht mit dem primären MAF-Antikörper (1:1000 verdünnt in PB mit 1% NGS und 0,5% Triton X-100) inkubiert.

Für die Detektion der MAF-gebundenen Primärantikörper wurde das Material mit TRITC-gekoppelten Sekundärantikörpern aus der Ziege gegen Kaninchen (Alexa 568, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) verdünnt 1:250 in PB mit 1% NGS und 0,5% Triton X-100 inkubiert. Die BV-2 Zellen und Schnitte für die konfokale Mikroskopie wurden außerdem mit dem FITC-gekoppelten Makrophagen/Mikroglia marker *Griffonia simplicifolia* Isolektin IB4 (IB4, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) gefärbt. Hierfür wurde das Material drei Stunden mit IB4 verdünnt 1:40 in PB mit 1% NGS mit 0,5% Triton X-100 inkubiert.

Andere Schnitte wurden zwei Stunden mit einem CD11b Antikörper (Mac-1, Chemicon, Temecula, CA, USA) verdünnt 1:250 in PB mit 1% NGS und 0,5% Triton X-100 doppelmarkiert und nach dreimaligem Waschen (je 10 Minuten in PB) mit einem FITC-gekoppelten Zweitantikörper (Molecular Probes, Eugene, OR) für weitere zwei Stunden inkubiert und dadurch doppelgefärbt. Die gemischten Neuron/Glia-Kulturen wurden in gleicher Weise mit MAF und CD11b, Neurofilament oder GFAP doppelgefärbt.

Die Zellen und Schnitte wurden unter einem BX-50 Mikroskop (Olympus, Tokyo, Japan) untersucht oder konfokal mikroskopiert (siehe Kap. 3.8).

### **3.8 Konfokale Mikroskopie**

BV-2 Mikrogliazellen und Gehirnschnitte von Mäusen drei Tage nach ECL wurden mit MAF-TRITC und IB4-FITC gefärbt wie für die Immunofluoreszenz

beschrieben. Zellorganellen wurden durch ein Zwei-Photonen-Aufbau (Leica, Heidelberg) mit einem aufrechten Mikroskop, welches mit einem x40 Wasser-Immersion-Objektiv ausgestattet ist (NA 0.8, Leica, Heidelberg). Die Fluoreszenzfarben (Flou-4 und CMTMR) wurden simultan mit der Wellenlänge 840nm durch einen Titan-Saphir-Infrarotlaser angeregt (Tsunami, Spectra-Physics). Die Fluoreszenz der grünen (FITC) und roten (TRITC) Kanäle wurde durch zwei externe Detektoren aufgenommen. Die resultierenden Datenströme von jedem Kanal wurden zu endgültigen Zweifarben-Bildern vereint.

### **3.9 Genbank Analyse**

Die GenBank® ist die genetische Sequenz-Bibliothek der National Institutes of Health (NIH) speziell des Nationalen Center für Biotechnologie Information (NCBI) (Altschul et al., 1997), sie ist eine Sammlung aller öffentlich zugänglicher DNA Sequenzen (Nucleic Acids Research 2004 Jan 1;32(1):23-6). Der Zugang findet sich online unter <http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>.

Es wurde die humane MAF-Sequenz (Rehli 1995) gegen die Genbank laufen gelassen. Sequenzhomologien wurden analysiert. Zusätzlich wurde mittels der übersetzten MAF-Proteinsequenz in der Conserved Domain Suche (CD – Search) des NCBI (Marchler-Bauer und Bryant, 2004) die MAF-Verwandtschaft zu Proteinfamilien überprüft.

### **3.10 Kyte-Doolittle-Algorithmus**

Der Kyte-Doolittle-Algorithmus sagt die Proteinstruktur und das Einbetten in die Membran voraus, indem er hydrophobe und hydrophile Bereiche des Proteins berechnet und graphisch darstellt (Kyte und Doolittle, 1982). Die positiven Werte des Algorithmus repräsentieren hydrophobe und die negativen hydrophile Areale. Ab einem Wert von +0,5 wird eine Einbettung in die Membran vorausgesagt.

### 3.11 Hämolysepotential

Die MAF-Sequenz wurde mittels RT-PCR (Reverse-Transkription-Polymerase-Ketten-Reaktion) aus Rattenhirn amplifiziert und mit Hilfe des TOPO-TA-Cloning-Kits in den TOPO TA Vektor kloniert (Clontech, Heidelberg). Nach der Transformation des MAF-Vektors und eines TOPO TA Kontrollvektors ohne kloniertes Amplifikat in *Escherichia coli* Bakterien (*E. coli*) plattierte ich diese auf Blutagar aus und las das Hämolysepotential in Form des Vorhanden- oder Nicht-Vorhanden-Seins eines klaren Hofes um die Bakterienkolonien ab.