

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Reagenzien

40% Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung (37,5:1)	Roth (Karlsruhe)
Agarose	Roth (Karlsruhe)
Amplex [®] Red Monoaminoxidase Assay Kit	Invitrogen (Karlsruhe)
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma (München)
Ascorbinsäure	Sigma (München)
Di-Natrium-Adenosin-5'-Triphosphat (Na ₂ -ATP)	Sigma (München)
Bafilomycin	Axxora (Grünberg)
BAY 41-2272	Axxora (Grünberg)
BAY 66-7550	Axxora (Grünberg)
BCA (Natrium Bicinchoninsäure-4,4-dicarboxy-2,2-Bichinolin)	Sigma (München)
BSA, Fraktion V (Bovines Serum Albumin)	Roth (Karlsruhe)
cAMP (zyklisches Adenosin 3',5'-monophosphat)	Sigma (München)
cGMP (zyklisches Guanosin 3',5'-monophosphat)	Sigma (München)
Clorgylin	Sigma (München)
Deprenyl	Sigma (München)
dBcAMP (di-Butyryl-cAMP)	Sigma (München)
dBcGMP (di-Butyryl-cGMP)	Sigma (München)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma (München)
DTT (Dithiothreitol; threo-1,4-Dimercapto-2,3-butandiol)	Sigma (München)
ECL [™] (Enhanced Chemiluminescence)	GE Healthcare (München)
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Roth (Karlsruhe)
EGTA (Ethylenglykolbis(2-aminoethyl-)tetraacetat)	Roth (Karlsruhe)
Essigsäure	Roth (Karlsruhe)
Glukose	Sigma (München)
Glyzin	Sigma (München)
GMP-P(NH)P (5'-Guanolyimidodiphosphat)	Sigma (München)
Heparin	Biochrom (Berlin)

HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N´-2-ethansulfonsäure)	Biochrom (Berlin)
Kaliumchlorid	Sigma (München)
Kaliumhydroxid	Roth (Karlsruhe)
Kaliumglutamat	Sigma (München)
Kupfersulfat	Sigma (München)
LMW (Low Molecular Weight Marker)	GE Healthcare (München)
m-3m3FBS	Sigma (München)
Magermilchpulver	Molkerei Heideblume (Elsdorf)
Magnesiumchlorid	Sigma (Karlsruhe)
Mass-Ruler-DNA-Ladder-Marker	Fermentas (St. Leonrot)
Methanol	Merck (Darmstadt)
Natriumacetat	Sigma (München)
Natriumbicarbonat	Sigma (München)
Natriumcarbonat	Sigma (München)
Natriumchlorid	Sigma (München)
Natriumhydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydroxid	Sigma (München)
Natriumtartrat	Sigma (München)
Nigericin	Sigma (München)
Oligonukleotide (Primer)	TIBMOlBiol (Berlin)
Optiphasen`HighSafe 3´ (Szintillationsflüssigkeit)	Beckman Coulter (Krefeld)
Pipes (Piperazin-N,N´-bis [2-ethansulfonsäure])	Sigma (München)
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma (München)
Ponceau S	Sigma (München)
Porablot® (Nitrozellulosemembran)	Macherey & Nagel (Düren)
Protease-Inhibitor-Cocktail (für Säugetiergewebe) (enthält 4-(2-aminoethyl)benzenesulfonylfluorid, Pepstatin A, E-64, Bestatin, Leupeptin, and Aprotinin)	Sigma (München)
Proteinase K	Roth (Karlsruhe)
Reserpin	Sigma (München)

Material und Methoden

Red-Taq-Polymerase	Fermentas (St. Leonrot)
RNase A	Roth (Karlsruhe)
SDS (Sodiumdodecylsulfate-Natriumdodecylsulfat)	Sigma (München)
Serotonin-Hydrochlorid	Sigma (München)
[³ H]-Serotonin ([³ H]-5-Hydroxy-[³ H] Tryptamintrifluoracetat)	GE Healthcare (München)
Salzsäure	Sigma (München)
Sucrose	Roth (Karlsruhe)
Sulfosalicylsäure	Sigma (München)
TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin)	Sigma (München)
Tetrabenazin	Jean Pierre Henry, Institut de Biologie Physico- Chimique (Paris, Frankreich)
Trichloressigsäure	Sigma (München)
Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)	Sigma (München)
Triton X-100	Roth (Karlsruhe)
Trypsin	Sigma (München)
Tween 20	Merck (Darmstadt)
U-73122	Axxora (Grünberg)

2.2 Puffer und Lösungen

Lösungen für die Proteinbestimmung

1) Lösung A

1 % (w/v)	BCA
17 % (w/v)	Na ₂ CO ₃
0,16 % (w/v)	2,3-Na ₂ C ₄ H ₄ O ₆
0,4 % (w/v)	NaOH
0,95 % (w/v)	NaHCO ₃

2) Lösung B

4 % (w/v)	CuSO ₄
-----------	-------------------

Lösungen für Immunoblots

Antikörperlösung

0,2 % (w/v)	BSA
in PBS	

TBS-T(Tris Buffered Saline-Triton)-Puffer

50 mM	Tris
140 mM	NaCl
0,01 % (v/v)	Triton X-100
pH 7,6 (HCl)	

Magermilchlösung

5 % (w/v)	Magermilchpulver
0,05 % (v/v)	Tween 20
in 1x TS Puffer	

Lösungen für Elektrophorese

Elektrophoresepuffer (1x)

25 mM	Tris
200 mM	Glyzin
3,5 mM	SDS

Ponceau S-Färbelösung

0,3 % (w/v)	Ponceau S
3 % (w/v)	Trichloressigsäure
3 % (w/v)	Sulfosalicylsäure

Material und Methoden

Proteintransferpuffer

386 mM	Glyzin
48 mM	Tris
1,3 mM	SDS
20 % (v/v)	Methanol

Sammelgel

3,75 % (v/v)	Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)
0,13 % (v/v)	TEMED
1 % (w/v)	APS
in Tris I-Puffer	

Trenngel 10%

10 % (v/v)	Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)
0,13 % (v/v)	TEMED
1 % (w/v)	APS
in Tris II-Puffer	

Trenngel 12%

12 % (v/v)	Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)
0,13 % (v/v)	TEMED
1 % (w/v)	APS
in Tris II-Puffer	

Tris I-Puffer

500 mM	Tris
pH 6,8	(HCl)

Tris II-Puffer

1,5 M	Tris
pH 8,8	(HCl)

TS-(Tris-Saline) Puffer (10x)

20 mM	Tris
150 mM	NaCl
pH 7,5	(HCl)

Lösungen für Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Agarosegel

2 % (w/v) Agarose
in 1x TAE-Puffer

Tail (Mausschwanz)-Puffer

100 mM Tris (pH 8.5/ HCl)
5 mM EDTA (pH 8.0/ NaOH)
0,2 % (w/v) SDS
200 mM NaCl

TAE (Tris-Acetat-EDTA)-Puffer

40 mM Trisacetat
5 mM Natriumacetat
1 mM EDTA
pH 7,4 (Essigsäure)

TE (Tris-EDTA)-RNAse-Puffer

100 mM Tris
10 mM EDTA
20 µg/ml RNAse A
pH 7,4 (HCl)

Lösungen für Vesikelpräparationen und Neurotransmitteraufnahme

Homogenisierungspuffer

320 mM Sucrose
4 mM HEPES
pH 7,4 (NaOH)

KG (Kaliumglutamat)-Puffer

150 mM Kaliumglutamat
20 mM Pipes
4 mM EGTA
2,8 mM MgCl₂ (durch Komplexbildung ca. 1mM freies Mg²⁺)
pH 6,5; 7,0; 8,5 (KOH)

KG (Kaliumglutamat)-ATP-Puffer

KG-Puffer mit zusätzlich 2mM ATP

KG (Kaliumglutamat)-Puffer doppelt konzentriert

300 mM Kaliumglutamat
40 mM Pipes
8 mM EGTA
5,6 mM MgCl₂
pH 7,0 (KOH)

Natrium-Puffer

10 mM	Glucose
5 mM	KCl
140 mM	NaCl
5 mM	NaHCO ₃
1 mM	MgCl ₂
1,2 mM	Na ₂ HPO ₄
20 mM	HEPES
pH 7,4	(NaOH)

Tyrode HEPES (TH)-Puffer

134 mM	NaCl
0,34 mM	Na ₂ HPO ₄
2,9 mM	KCl
12 mM	NaHCO ₃
10 mM	HEPES
5 mM	Glucose
1 mM	MgCl ₂
pH 7,3 (HCl)	

2.3 Antikörper

2.3.1 primäre Antikörper

Anti-G _{αq} Polyklonal, Kaninchen	Calbiochem, La Jolla, Ca ,USA
Anti-G _{αo} (Klon 101.1, 101.4) Monoklonal, Maus	Prof. Dr. Reinhard Jahn Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen
Anti-Phosphodiesterase 2a Polyklonal, Kaninchen	Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH Echingen, Deutschland
Anti-Phosphodiesterase 9 Polyklonal, Kaninchen	Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH Echingen, Deutschland
Anti-Synaptophysin (Klon 7.2) Monoklonal, Maus	Synaptic Systems Göttingen, Deutschland
Anti-Tyrosinhydroxylase Polyklonal, Kaninchen	Chemicon International Ltd. Hampshire, United Kingdom
Anti-VMAT2 Polyklonal, Kaninchen	Synaptic Systems Göttingen, Deutschland

2.3.2 sekundäre Antikörper

Ziege-Anti-Kaninchen IgG Peroxidase gekoppelt	Vector Laboratories Burlingham, USA
Ziege-Anti-Maus IgG Peroxidase gekoppelt	Vector Laboratories Burlingham, USA

2.4 Geräte und Apparaturen

Elektrophorese

Power/Pac® 200/300 Spannungsgerät	Bio-Rad(CA; USA)
TransBlot® SD Semidry Elektrophorese Transferzelle	Bio-Rad(CA; USA)
Mini Protean® II Elektrophorese-Kammer	Bio-Rad(CA; USA)

Homogenisierung von Gewebe

Heidolph RZR 2021
Wheaton Homogenisierer

Photometer

Dynatech MR 500 Elisa Reader

BIO-TEK FL 600 Fluorescence Reader

Zentrifugen

Beckmann L-70 Ultrazentrifuge

Rotoren: TLS 55, TLA 100.4, TLA 100.1

Beckmann Optima™ TL Ultrazentrifuge

Rotoren: Ti70, SW 40

Eppendorf Zentrifuge 5402

Sonstige

Beckman LS 6500, Liquid Szintillation Counter

BioDoc Analyse (Video Dokumentationssystem)

Neubauer Zählkammer

PTC 200 DNA-Engine, Fa. Biozym (PCR-Gerät)

2.5 Durchführung der Experimente

2.5.1 Aufarbeitung von Gewebe und Gewinnung von Thrombozyten

Die Experimente wurden entweder an frisch isolierten Synaptosomen bzw. an synaptischen Vesikeln aus Mäusegehirnen oder Thrombozyten durchgeführt.

2.5.1.1 Vesikelpräparation (Synaptische Vesikel und Synaptosomen)

Mäuse wurden mit Äther betäubt und anschließend dekapitiert. Das Gehirn wurde durch Eröffnen des Schädeldaches entnommen und unverzüglich in 4 °C kalten, mit Proteaseinhibitorcocktail versetzten Homogenisierungspuffer überführt.

Bei der Präparation synaptischer Vesikel und Synaptosomen kam die Methode nach Hell und Jahn (Hell & Jahn, 1998) in einer leicht modifizierten Form zum Einsatz (s. Abb. 2). Die Gehirne wurden in Homogenisierungspuffer (5ml pro Gramm Gewebe), welchem kurz vorher Proteaseinhibitorcocktail (Verdünnung 1:1000) zugegeben wurde, aufgenommen, mit einem Wheaton-Homogenisator zehnmal bei 900 rpm homogenisiert (Homogenat) und anschließend bei 1.400xg für 10min. zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand bei 14.000xg für 15min. zentrifugiert. Die so gewonnenen Synaptosomen (P2) wurden entweder für Versuche mit Synaptosomen in Natrium-Puffer aufgenommen und weiterverwendet oder durch die Aufnahme in zehnfachem Volumen Wasser (versetzt mit 10mM HEPES (pH 7,4) und 1:1000 Proteaseinhibitorcocktail) und dreimaligen Homogenisieren bei 2.000 rpm einer osmotischen Lyse unterzogen und anschließend bei 29.000xg für 20min. zentrifugiert. Das Lysepellet (LP1) wurde verworfen oder für Immunoblots in 10 ml Homogenisierungspuffer resuspendiert. Der Lyseüberstand (LS1) wurde bei 350.000xg für 30min. zentrifugiert. Das klare bis glasklare, an synaptischen Vesikeln reiche Pellet (LP2) wurde mit einer 27G-Kanüle in dem für den Versuch vorgesehenen Puffer resuspendiert und verwendet.

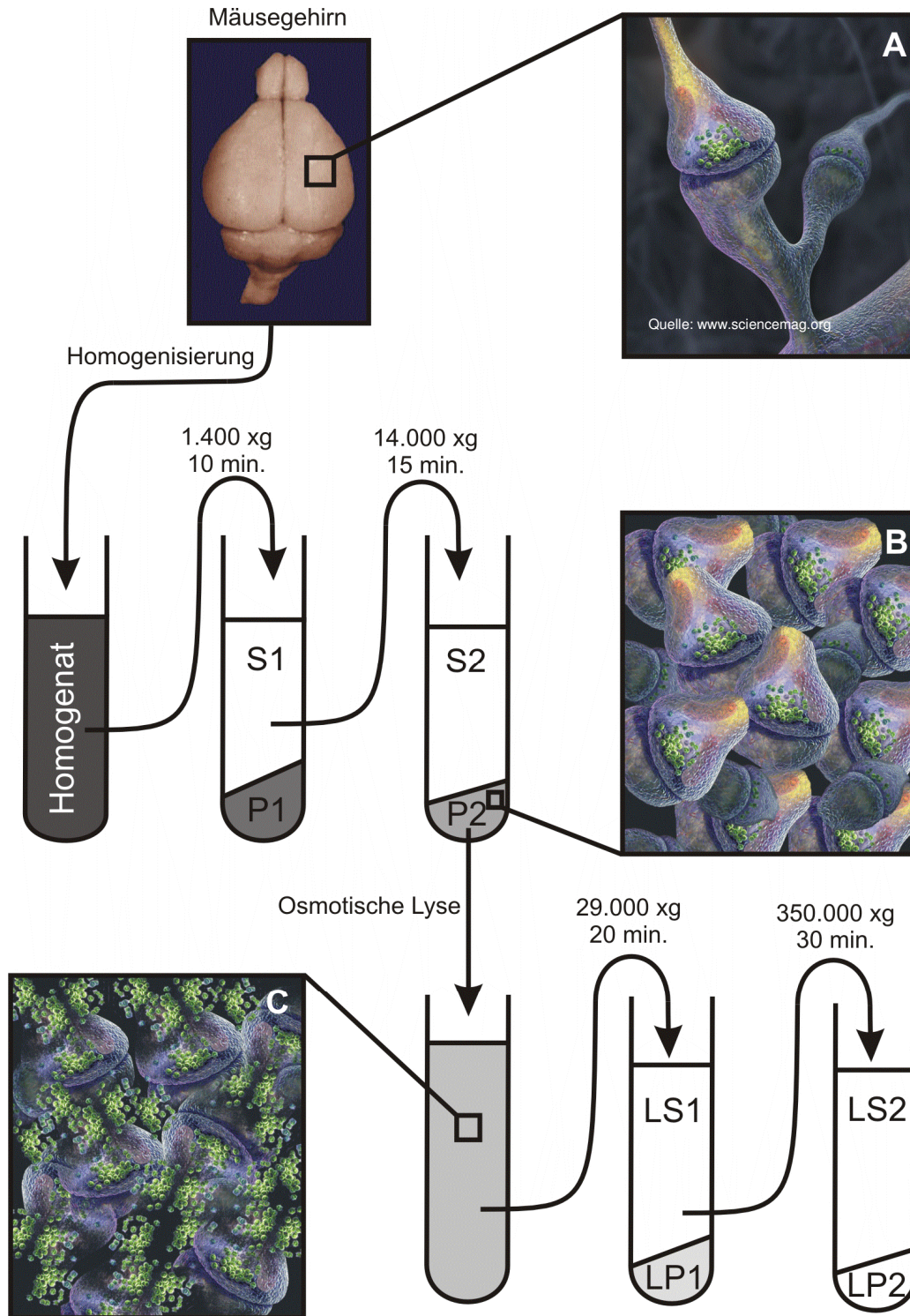


Abbildung 2

Schema der synaptischen Vesikelpräparation

Bei der Homogenisierung des Gehirns reißen die Nervenendigungen von den Axonen ab (A). Nach zwei Zentrifugationsschritten erhält man eine angereicherte Synaptosomenfraktion (B). In dieser haben sich die Abrissstellen der Nervenendigungen wieder neu verbunden. Durch die anschließende osmotische Lyse reißen diese auf, und geben so die synaptischen Vesikel frei (C). Nach der Beseitigung von synaptosomalen Fragmenten durch verschiedene Zentrifugationsschritte, werden die synaptischen Vesikel durch Ultrazentrifugation sedimentiert. Das resultierende glasklare Pellet enthält eine 5-6 fache Anreicherung an synaptischen Vesikeln gegenüber dem Homogenat.

2.5.1.2 Gewinnung von Thrombozyten

Humane Thrombozyten wurden freundlicherweise von Herrn Dr. K. Movassaghi (CVK, Institut für Transfusionsmedizin) als Thrombozytenkonzentrat zur Verfügung gestellt. Die Thrombozyten wurden aus einer Sammelblutspende gewonnen und in einer Mischung aus humanem Plasma und der Stabilisatorlösung CPD nach Ph.Eur. 1997[®] mit Zitronensäure als Antikoagulanzen aufbewahrt.

2.5.2 Permeabilisierung von Synaptosomen und Thrombozyten mit Streptolysin O

Für die Permeabilisierung der Synaptosomen und Thrombozyten kam das aus *Streptococcus pyogenes* stammende Toxin Streptolysin O (SLO), Mutante 101 (Weller et al., 1996) zum Einsatz. SLO in seiner monomeren Form bindet bei 4°C an das Cholesterin der Plasmamembran und bildet durch Erwärmen bogen- und ringförmige Polymere, welche Poren mit einem Durchmesser von 12nm einschließen (s. Abb. 3). Zur Reduzierung von Disulfidbrücken wurde dem SLO vor der Inkubation mit den Synaptosomen bzw. Thrombozyten 1mM DTT zugegeben. Die Bestimmung der hämolytischen Aktivität des Toxins (HE/ml) erfolgte nach einer Methode von Ahnert-Hilger (Ahnert-Hilger et al., 2000).

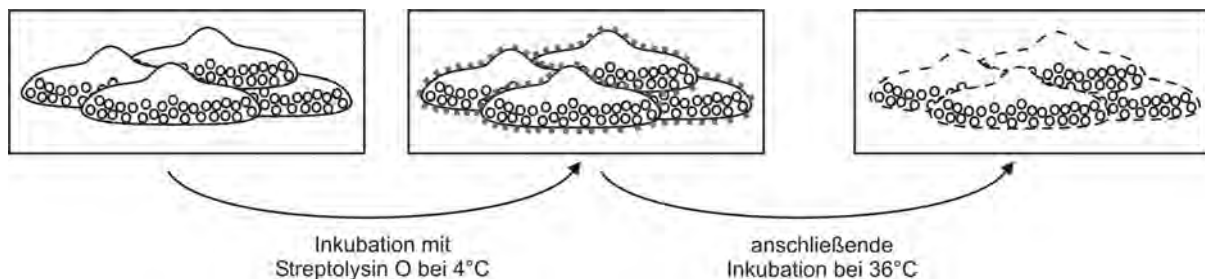


Abbildung 3

Schematische Darstellung der Permeabilisierung durch Streptolysin O

Im ersten Schritt lagert sich Streptolysin O (graue Quadrate) bei 4°C an das Cholesterin der Plasmamembran an und polymerisiert dann bei 36°C zu großen bogen- oder ringförmigen Strukturen, welche Poren mit einem Durchmesser von 12nm einschließen. Dadurch können Moleküle von bis zu 150 kD die Zellmembran passieren.

2.5.2.1 Permeabilisierung von Thrombozyten

Das Thrombozytenkonzentrat (s. 2.5.1.3) wurde bei 1.300xg für 2min. zentrifugiert und anschließend mit dem zehnfachen Volumen KG-Puffer versetzt, welchem ~50 HE/ml SLO zugesetzt wurden und 10min. bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde wiederum bei 16.000xg bei 4°C zentrifugiert und der Überstand entfernt.

Die so vorbereiteten Thrombozyten konnten nun für Neurotransmitteraufnahme-Experimente genutzt werden.

2.5.2.2 Permeabilisierung von Synaptosomen

Die in Natrium-Puffer aufgenommenen Synaptosomen (s. 2.5.1.2) wurden bei 16.000xg für 2min. zentrifugiert, der Überstand entfernt und anschließend mit dem zehnfachem Volumen KG-Puffer versetzt, welchem ~5000 HE/ml SLO zugesetzt wurden und 10min. bei 4°C inkubiert. Höhere Streptolysin O Konzentrationen waren durch die größere Oberfläche der Synaptosomen im Vergleich zu den Thrombozyten notwendig, da nur durch eine höhere Konzentration an SLO-Monomeren auf der Oberfläche der Synaptosomen eine Polymerbildung und damit verbundene Porenbildung erreicht werden konnte. Des Weiteren ist für eine Vergleichbarkeit der Versuche eine gleichmäßige Permeabilisierung aller Synaptosomen notwendig. Anschließend wurde wiederum bei 16.000xg bei 4°C zentrifugiert und der Überstand entfernt. Die so vorbereiteten Synaptosomen wurden nun für Neurotransmitteraufnahme-Experimente genutzt.

2.5.3 Messung der vesikulären Neurotransmitteraufnahme

Die vesikuläre Transmitteraufnahme wurde an permeabilisierten Thrombozyten sowie aus dem Gehirn isolierten Synaptosomen und Vesikeln mit [³H] Serotonin durchgeführt.

2.5.3.1 Monoaminaufnahme in Synaptosomen und Thrombozyten

Die wie oben beschrieben vorbereiteten Synaptosomen oder Thrombozyten wurden in KG-Puffer resuspendiert entweder mit Chemikalien (bei 4°C oder 37 °C) vorinkubiert und dann zu je 25 µl in Reaktionsgefäße überführt oder direkt zu je 25 µl in verschiedene Reaktionsgefäße überführt. Pro Bedingung wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Serotoninaufnahme wurde durch Zugabe von je 25 µl KG-ATP-Puffer mit 80 nM [³H] Serotonin, 2 mM Ascorbinsäure ohne bzw. mit Zusätzen (wie z.B. Aktivatoren und Inhibitoren verschiedener Enzyme) für 10min. bei 37°C durchgeführt. Die unspezifische Aufnahme wurde mit Reserpin ermittelt. Reserpin bindet im nanomolaren Bereich irreversibel an die zytoplasmatische Seite der VMAT und verhindert so die spezifische Aufnahme von Serotonin in das Vesikel.

Die Monoaminaufnahme wurde durch Verbringen der Proben auf Eis gestoppt. Anschließend wurden die Proben bei 16.000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen und die individuellen Pellets für 20min. mit 0,4% Triton in H₂O bei 42°C lysiert. Von dem so erhaltenen Lysat wurde eine definierte Menge abgenommen, mit Szintillationsflüssigkeit versetzt und im Beckman Coulter LS 6500 vermessen. Das übrige Lysat jeder Probe wurde für eine BCA-Messung (s. 2.5.6) verwendet. Die von den Synaptosomen und Thrombozyten aufgenommene Menge Neurotransmitter wurde auf ein Milligramm Protein normalisiert und mit Hilfe der spezifischen Aktivität sowie der radioaktiven Zerfälle /min. als pmol/mg Protein errechnet und dargestellt. Die durch Reserpin ermittelte unspezifische Aufnahme wurde von den Werten subtrahiert.

Die Standardabweichungen der Darstellungen ergaben sich aus den Dreifach-Bestimmungen der einzelnen Bedingungen. Die Signifikanz wurde durch den Student's T-Test verifiziert und gegenüber den unbehandelten Kontrollen berechnet.

2.5.3.2 Monoaminaufnahme in synaptischen Vesikeln

Für die Messung der Serotoninaufnahme wurden die synaptischen Vesikel zunächst in KG-ATP-Puffer bei 4°C mit einer 27G-Kanüle resuspendiert und zu je 25µl in individuelle Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurde die Serotoninaufnahme durch Zugabe des gleichen Volumens von KG-ATP-Puffer mit 80nM [³H] Serotonin und 2 mM Ascorbinsäure ohne bzw. mit Additiva gestartet. Die unspezifische Aufnahme wurde auch hier mit Reserpin ermittelt.

Die Inkubation erfolgte für 10 Min bei 25°C. Pro Bedingung wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt (s. Abschnitt 2.5.3.1). Die Serotoninaufnahme wurde auch durch Verbringen der Proben auf Eis gestoppt und anschließend wurden diese bei 460.000xg für 10min. zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Die individuellen Pellets wurden 20min. mit 0,4% Triton bei 42°C lysiert.

Von diesem Lysat wurde ein definierter Teil im Beckman Coulter LS 6500 vermessen, der andere Teil wurde für die BCA-Proteinbestimmung (s. Abschnitt 2.5.6) verwendet.

2.5.4 Versuchstiere

2.5.4.1 Zucht

$G\alpha_{o2}^{-/-}$ -Mäuse und deren Wildtypen (129/SvxC57/BL) sowie die $G\alpha_{o1+2}^{+/-}$ -Mäuse wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Lutz Birnbaumer, Department of Molecular Cell and Developmental Biology, University of California, Los Angeles, USA zur Verfügung gestellt.

Alle Tiere wurden sowohl im MPI für Humangenetik, Berlin-Dahlem als auch in den Tierställen der Charité (Philippstr.; Hessische Str.) gezüchtet.

Die $G\alpha_{o2}$ -Deletionsmutanten ließen sich untereinander verpaaren. Für Versuche mit heterozygoten Tieren wurden die Deletionsmutanten mit Wildtyp-Mäusen gekreuzt und die Nachkommen (Heterozygote Tiere) nach dem Erreichen der Geschlechtsreife untereinander verpaart. Die so generierten Würfe enthielten sowohl Wildtyp- und heterozygote Tiere als auch die Deletionsmutanten.

$G\alpha_{o1+2}$ -Mäuse konnten nur heterozygot mit einander verpaart werden, da deren Knockout Nachkommen spätestens nach ca. 21 Tagen post partum sterben (Jiang et al., 1998). Man erhielt pro Wurf ca. 10% $G\alpha_{o1+2}^{-/-}$ -Mäuse.

Für die Versuche wurden im Fall der $G\alpha_{o2}$ -Mäuse 4-12 Wochen alte Mäuse verwendet. Bei der Verwendung mehrerer Tiere und Stämme für ein Experiment wurden Mäuse gleichen Geschlechts und ähnlichen Alters verwendet, um die Vergleichbarkeit zu wahren.

2.5.4.2 Genotypisierung der $G\alpha_{02^-}$ und $G\alpha_{01+2^-}$ -Deletionsmutanten

Zur Genotypisierung der Mäuse wurden ca. 5 mm der Schwanzspitze entfernt und in 200 μ l Tail-Puffer, versetzt mit 88 μ g Proteinase K über Nacht bei 55 °C verdaut. Das so gewonnene Lysat wurde zur Zerstörung der Proteinase K für 10min. auf 95 °C erhitzt, anschließend mit einer definierten Menge TE-RNase-Puffer versetzt und 10min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die folgende Zentrifugation bei 18.000xg für 5min. trennte restliche Gewebebruchstücke von der gelösten DNA. Durch eine saure Alkoholfällung und anschließender Zentrifugation wurde die DNA gefällt. Im Anschluss wurde noch zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen um die DNA zu reinigen. Das so entstandene Pellet wurde in 200 μ l Wasser aufgenommen und die Konzentration der DNA auf 25 μ g/ μ l eingestellt.

Zur Genotypisierung der $G\alpha_{02^-}$ Mäuse wurden folgende Primer verwendet:

Primer zur Analyse der $G\alpha_{02^-}$ -Deletionsmutanten

Primer	Sequenz
#2	5'-GGA TAC ACT CGA GCA CAG CA-3'
#3	5'-GAA AGG GAC AGC ACT CCT GA-3'

(Rudolph et al., 1993)

Für die PCR der $G\alpha_{02^-}$ Mäuse wurde das Primerpaar #2 und #3 verwendet. Eine anschließender Verdau mit dem Enzym Eco R1 ermöglichte die Differenzierung der verschiedenen Genotypen (s.u.).

Zur Genotypisierung der $G\alpha_{01+2^-}$ Mäuse wurden folgende Primer verwendet:

Primer zur Analyse der $G\alpha_{01+2^-}$ -Deletionsmutanten

Primer	Sequenz
F470	5'-GGA CAG CCT GGA TCG GAT TGG-3'
R700	5'-ACC TGG TCA TAG CCG CTG AGT G-3'
R199	5'-GAT TGT CTG TTG TGC CCA GTC ATA G-3'


(Jiang et al., 1998)

Für die PCR der $G\alpha_{01+2^-}$ Mäuse wurde zum Nachweis des Wildtyp-Allels das Primerpaar F470 und R700 (WT-Ansatz) bzw. für das mutante Allel die Primerkombination R700 und R199 (NEO-Ansatz) verwendet.

Pro Ansatz (20 μ l) wurden für die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) benötigt:

1U	RedTaq-Polymerase
0,2mM	dNTP
1,5mM	MgCl ₂
0,2 μ M	Primer
100ng	DNA-Lysat
2 μ l	10x RedTaq-Puffer
ad 20 μ l	H ₂ O

Folgendes Temperaturprofil wurde für beide Deletionsmutanten verwendet:

94 °C	04min.	
94 °C	30 sec.	
62 °C	01min.	
72 °C	02min.	
72 °C	10min.	
04 °C	∞	

Das PCR-Produkt der G α_{o2} - Mäuse wurde anschließend noch mit dem Enzym Eco R1 für 30min. bei 37 °C verdaut. Pro Ansatz wurden benötigt:

Eco R1 10x Puffer	8 μ l
H ₂ O	8 μ l
BSA 100x	2 μ l
Eco R1	2 μ l

(Rudolph et al., 1993; Jiang et al., 1998)

Zwanzig Microliter der jeweiligen PCR Produkte wurden anschließend auf ein 2%iges Agarosegel (versetzt mit 4µg/ml Ethidiumbromid in TE-Puffer) aufgetragen. Als Basenleiter wurden 2µl Mass-Ruler-DNA-Ladder-Marker (1µg/µl DNA) verwendet. Das Gel lief bei 100V für 40min. Anschließend wurde es unter UV-Licht (254nm) sichtbar gemacht und fotografiert (s. Abb. 4).

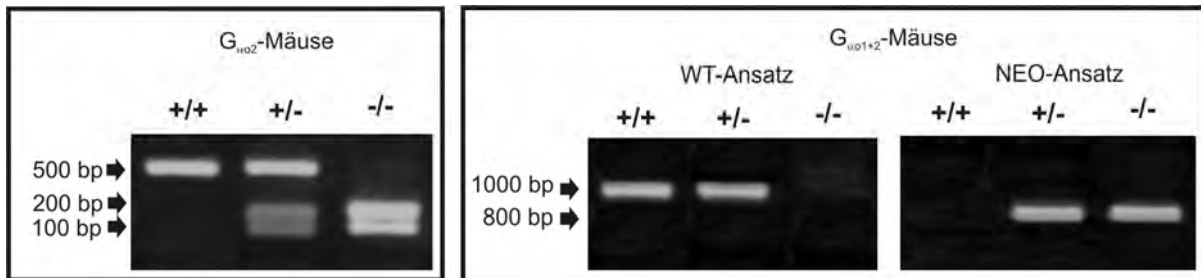


Abbildung 4

Fotografie elektrophoretisch aufgetrennter PCR-Proben zur Genotypisierung von Wildtyp- (+/+), Heterozygot- (+/-) sowie Homozygot-mutanter (-/-) Mäusen.

Genotypisierung von $G_{\alpha 02}$ -Mäusen

Bei Verwendung dieser Primerkombination und des anschließenden Verdaus zeigten die PCR-Proben der Wildtyp-Tiere eine Bande um 500bp, während die mutanten homozygoten Tiere bei 200 bp und 100 bp einen positiven Nachweis brachten. Die PCR-Proben der heterozygoten Tiere zeigten alle drei Banden.

Genotypisierung $G_{\alpha 01+2}$ -Mäuse

Bei Verwendung dieser Primerkombinationen zeigten die PCR-Proben der Wildtyp-Tiere eine Bande im WT-Ansatz bei 800 bp, während die mutanten homozygoten Tiere im NEO-Ansatz bei 1000 bp einen positiven Nachweis brachten. Die PCR-Proben der heterozygoten Tiere zeigten sowohl eine Bande im WT- als auch NEO-Ansatz.

2.5.5 Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Immunreplikaanalyse (Western-Blot)

Um Proteinproben elektrophoretisch aufzutrennen, wurde die denaturierende Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli, 1970) angewendet.

Die Proben wurden nach Ermittlung der Proteinkonzentration mit 4x RotiLoad[®] (enthält 5% Mercaptoethanol als reduzierendes Agens) versetzt und 5min. bei 95°C erhitzt. Zur Auftrennung wurden ein 3,75%iges Sammelgel und ein 10 bzw.12%iges Trenngel mit einer Dicke von 0,75mm verwendet. Als Referenz wurde bei jedem Gel ein LMW Marker (Low molecular weight marker; ein Gemisch definierter Proteine zwischen 14 und 94 kDa) als Standard parallel aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde bis zum Erreichen des Trenngels bei 80 Volt, danach bei 160 Volt durchgeführt. Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine im Semi-Dry-Verfahren in einer Trans Blot[®] SD Kammer bei 0,3A/Gel für 30min. auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Um die getrennten Proteine sichtbar zu machen, wurde die Nitrozellulosemembran mit Ponceau S-Lösung für 2min. gefärbt und anschließend mehrfach mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Membran wurde kühl und feucht gelagert und gegebenenfalls in Streifen geschnitten.

Im Anschluss wurde die Membran, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, für eine Stunde in Magermilchlösung inkubiert. Die Behandlung mit dem jeweiligen Erstantikörper mit 1,5% (w/v) BSA in TS-Puffer erfolgte über Nacht bei 4 °C. Am darauf folgenden Tag wurde je fünfmal 5min. mit Magermilchlösung gewaschen und die Membran mit Meerrettichperoxidase-gekoppeltem Zweitantikörper (ebenfalls in 1,5% (w/v) BSA in TS Puffer) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde fünf mal 5min. mit 0,05% (v/v) Tween 20 in TS-Puffer gewaschen. Die Detektion der Proteine erfolgte mit ECL-Lösung (Inkubation 1min.) und anschließender Belichtung eines Fotofilms. Die Entwicklung des Fotofilms erfolgte vollautomatisch in der Cura 60 (AGFA).

2.5.6 Messung der Aktivität der Monoaminoxidase

Für die Messung der Aktivität der Monoaminoxidasen (MAO) kam der Amplex Red Monoaminoxidase Assay Kit der Firma „Molecular Probes Invitrogen“ zur Anwendung. Dieser Test liefert eine fluorometrische Methode zur kontinuierlichen Messung der Monoaminoxidasen-Aktivität. Diese Analyse basiert auf der Detektion von H₂O₂ in einer Meerrettichperoxidase gekoppelten Reaktion mit Amplex Red[®] (10-Acetyl-3,7-Dihydroxyphenoxazin). Als Produkt dieser Reaktion entsteht Resorufin mit einem Absorptionsmaximum von 571nm und eine Emmissionsmaximum von 585nm. Die Entstehung von Resorufin wurde über die Zeit in einem Fluoreszenz Reader gemessen. Eingesetzt wurden in diesen Versuchen Synaptosomen in einer Konzentration von 20 µg Protein je Einzelprobe, welche vor der Messung der Aktivität der Monoaminoxidasen kurz schockgefroren wurden, um die Zellwände der Synaptosomen aufzubrechen. Als Substrat wurde p-Tyramin eingesetzt, welches sowohl von der MAO-A als auch von der MAO-B zu Wasserstoffperoxid umgesetzt wird. Als spezifische Inhibitoren dienen für MAO-A Clorgylin und für MAO-B Pargylin.

2.5.7 Proteinbestimmung (BCA-Methode)

Die Proteinkonzentration wurde mit der BCA-Methode nach Smith (Smith et al., 1985) ermittelt. Zunächst wurde eine Standardkurve von 50 bis 400µg/ml BSA in 0,4% Triton X100 erstellt. Die zu bestimmenden Proben, ein Leerwert sowie die Standardwerte wurden zu je 20µl in 96-Loch Mikrotiterplatten pipettiert. Anschließend wurden je 200µl der Mischung von Lösung A und Lösung B im Verhältnis 50:1 dazu pipettiert und für 30min. bei 60°C im Wasserbad inkubiert. Die Platten wurden danach für 10min. abgekühlt und die Extinktion bei 550nm im Elisa-Reader gemessen. Die Proteinkonzentrationen der Proben wurden anhand der Standardkurve ermittelt.