

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden Wistar-Ratten im Alter von sieben Tagen (P7) verwendet. Die Versuchstiere wurden in Übereinstimmung mit § 8 des Tierschutzgesetzes bei der zuständigen Behörde, dem Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin, beantragt und genehmigt. Die Züchtung der Tiere erfolgte in der Zentralen Versuchstierhaltung der Charité, ihre Haltung und Pflege durch qualifiziertes Personal und unter Aufsicht des Tierschutzbeauftragten (§ 8b Absatz 3 TierSchG) im zentralen Forschungslabor des Virchow Klinikums, Standort Westend. Die Planung und Durchführung der Tierversuche stand unter der Aufsicht der Leiterin des Versuchsvorhabens (§ 9 TierSchG).

2.1.2 Chemikalien

2.1.2.1 Histologie, Elektronenmikroskopie

- Aceton (J.T.Baker, Deventer, Holland)
- Agar-Puder (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, Pennsylvania, USA)
- Allantoin (Sigma A-7878, St. Louis, MO. USA)
- Ammoniumhydroxid (Sigma A-6899, St. Louis, MO. USA)
- Boratpuffer (ICN Biomedicals Inc., Ohio, USA)
- Chloralhydrat (Fluka, 23100, Buchs, Schweiz)
- Citrat (Sigma C-0759, St. Louis, MO. USA)
- Gelatine (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, Pennsylvania, USA)
- Kalium-Chrom-Sulfat (Sigma P-8131), St. Louis, MO. USA)
- Kaliumferrizyanat (Sigma P-8131, St. Louis, MO. USA)
- Kupfernitrat (Sigma C-6176, St. Louis, MO. USA)
- NaOH Pellets (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Natrium-Cacodylat (Sigma C-0250, St. Louis, MO. USA)
- Natriumthiosulfat (Sigma S-7062, St. Louis, MO. USA)
- Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- PBS-Azid (Sigma S-8032, St. Louis, MO. USA)

- Permout Mounting Medium (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, Pennsylvania, USA)
- Pyridin (Sigma P-3776, St. Louis, MO. USA)
- Silbernitrat (Roth 9370.3, Karlsruhe, Deutschland)
- Thrombophob 25000, Heparin-Natrium (Nordmark Arzneimittel GmbH 2082 Uetersen)

2.1.2.2 Western Blot

- 2-Mercaptoethanol (Fluka, Buchs, Schweiz)
- 2-Propanol (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Acrylamid Rotiphorese[®] Gel 30 (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Acrylamid Rotiphorese[®] Gel 40 (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Ammoniumpersulfat (Serva, Heidelberg, Deutschland)
- Antikörper anti-Akt (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)
- Antikörper anti-44/42 MAPK #9102 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)
- Antikörper anti-P-44/42 P-MAPK Thyr 202/204 #9101S (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)
- Antikörper anti-P-Akt (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)
- Antikörper anti-P-Raf-1 Ser 259 #9421S (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)
- Antikörper anti-Rabbit (Amersham Bioscience, Buckinghamshire, England)
- Antikörper anti-Raf-1 sc7267 (Santa Cruz Biotechnology, California, CA, USA)
- Aqua Spüllösung (Delta Select, Pfullingen, Deutschland)
- Blot-Papier ProteanR XL size Blot Paper (Biorad, Hercules, CA, USA)
- Bovines Serumalbumin (Sigma, Saint Louis, USA)
- Bromphenolblau (Fluka, Buchs, Schweiz)
- Color Burst[™] Electrophorese Marker (Sigma, Saint Louis, USA)
- Coumarinsäure (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Diazepam (Ratiopharm, Ulm, Deutschland)
- DMSO (Fluka, Buchs, Schweiz)
- EDTA (Merck, Darmstadt, Deutschland)

- Ethanol (J.T.Baker, Deventer, Holland)
- Glycerin (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Glycin (ICN Biomedicals, Inc, Aurora, Ohio, USA)
- Luminol (Fluka, Buchs, Schweiz)
- Magermilchpulver (Nöll, Büren, Deutschland)
- Methanol (J.T.Baker, Deventer, Holland)
- Micro BC Assay Protein Quantitation Kit (interchim, Montluçon, Frankreich)
- Natriumchlorid (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Nitrocellulosemembran (Hybond ECL, Amersham pharmacia biotech, Buckinghamshire, England)
- PBS-Puffer (Gibco Paisly, Schottland, England)
- Pilocarpin-Hydrochlorid (Sigma, St. Louis, MO. USA)
- Ponceau-Lösung (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Salzsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Sodiumdodecylsulfat (Serva, Heidelberg, Deutschland)
- Temed (Serva, Heidelberg, Deutschland)
- Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Tween 20 (Fluka, Buchs, Schweiz)
- Wasserstoffperoxyd 30% (Merck, Darmstadt, Deutschland)

2.1.3 Puffer und Lösungen

2.1.3.1 Histologie: Kupfer-Silber-Färbung

Agarlösung: 20g Agar-Puder, 500ml Aqua bidest.

Formaldehyd-Zitrat-Lösung: 135ml Aqua bidest., 15ml Ethanol (100%), 180µl Formaldehydlösung (37%), 10,5mg Citrat

Gelatine-Medium: 1,5g Gelatine, 250ml Aqua bidest (50°C), nach Abkühlen 0,15g Kalium-Chrom-Sulfat dazu, auf 500ml auffüllen

Kaliumferrizyanidlösung (0,3%): 0,45g (K_3FeCN_6), 150ml Aqua bidest.

Natriumthiosulfatlösung (0,1%): 0,2g Natriumthiosulfat ($Na_2S_2O_3$)

PBS-Azid: 100ml 10fach PBS mit 0,05% Natrium-Azid (NaN_3), ad 1l

Perfusionslösung I: Heparin-Natrium (Thrombophob) 25.000, Phosphate buffered saline (PBS), 10fach Konzentrat: 70ml monobasisches 1M Natrium-Phosphat (NaH_2PO_4), 330ml dibasisches 1M NaH_2PO_4 , 180mg NaCl

Perfusionslösung II: 4% Paraformaldehydlösung in Cacodylatpuffer: 2l 10% Stammlösung: 100g Paraformaldehyd in 800ml Aqua bidest. (erhitzt auf 60°C), 2 Pellets NaOH lösen, abkühlen, pH 7,5, auf 1l auffüllen; 4% Lösung: 800ml Stammlösung, 18g NaCl, 2g Natrium-Cacodylat, auf 2 Liter auffüllen, pH 7,4

Silber-Diamin-Lösung: 24g AgNO_3 , 120ml Aqua bidest., 60ml 0,4% Natronlauge (NaOH), 30 ml Ammoniumhydroxid (N_4OH)

Silberlösung: 180ml Aqua bidest (40°C), 1,5g Silbernitrat (AgNO_3), 3ml 0,5% Kupfernitrat (CuNO_3), 15ml 0,1% Allantoinlösung, 9ml Boratpuffer, 17ml Ethanol absolut, 9ml Pyridin

2.1.3.2 Elektronenmikroskopie

Perfusionslösung: 1% Paraformaldehyd, 1,5% Glutaraldehyd in 0,1M Pyrophosphat-Puffer, pH 7,4

2.1.3.3 Western Blot

Probenaufbereitung

Lämmli-Puffer: 30% Glycerol; 3% 20%SDS; 0,1875M Tris-HCl (pH 6,8); 0,015% 0,15% Bromphenolblau; 3% Beta-Mercaptoethanol; $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$.

RIPA-Puffer: 1% NP-40; 0,5% Natriumdeoxycholat; 0,1% Sodiumdodecylsulfat (SDS); 0,25% 40mM EDTA; 2% 50mM EGTA; 2% 1M Natriumfluorid; 0,1% 1M Natriumorthovanadat; 1% 100mM PMSF; 0,5% 100mM DTT; PBS

Gele

Sammelgel (2 Gele): 6ml Aqua Spüllösung; 2,5ml Sammelgel-Puffer; 1,5ml 30% Acrylamid; 100 μl SDS; 32 μl APS; 20 μl Temed

Sammelgel-Puffer: 0,5M Tris; $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$

Trenngel (2 Gele): 3,84ml Aqua Spüllösung; 3,34ml Trenngel-Puffer; 2,66ml 40 % Acrylamid; 133,4 μl APS; 33,4 μl Temed

Trenngel-Puffer: 1,5M Tris; $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$

Elektrophorese und Transfer

Elektrophorese-Puffer (10x): 1mol/l Glycin; 0,192mol/l Tris; 0,1% SDS

Semi-Dry-Transferpuffer pH 9,0-9,4: 48mM Tris; 39mM Glycin ; 20% Methanol ; H₂O_{dest} , pH 9,0-9,4

TBS-Tween: TBS, 0,1% Tween 20

Chemilumineszenz

ECL-Lösung I: 1% Luminol; 0,44% Coumarinsäure; 10% Tris-HCl (pH 8,5); H₂O_{dest}

ECL-Lösung II: 10% Tris-HCl (pH 8,5); H₂O_{dest}

2.1.4 Geräte

- Absorptionmessgerät: Multilabelcounter Victor 2 (Wallac, Freiburg, Deutschland)
- Deckgläser (Menzel, Microm, Walldorf, Deutschland)
- Entwicklungsmaschine X-OMAT 5000RA (Kodak, Stuttgart, Deutschland)
- Elektrophoresekammer Mini transblot cell (Biorad, Hercules, CA)
- Filmkassette Hypercassette™ (Amersham pharmacia biotech, Buckinghamshire, England)
- Hyperfilm™ ECL™ (Amersham pharmacia biotech, Buckinghamshire, England)
- Magnetrührer MR 3001 (Heidolph, Kehlheim, Deutschland)
- Objektträger (Menzel, Microm, Walldorf, Deutschland)
- Rotationsvibrator (Leica, VT 1000S, Nussloch, Deutschland)
- Schüttler Vortex Genie 2 (Scientific Industries, New York, USA)
- Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Tischzentrifuge 5415C (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Transfergerät TransBlot^R SD semi dry transfer cell (Biorad, Hercules, CA)
- Transmissionselektronenmikroskop (Zeiss, EM 900)
- Wärmeschrank (Biometra, Frankreich)
- Zellkulturplatten (24-well-Platten, Falcon, Beston Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA)
- Zentrifuge 5417R (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

2.2 Methoden

2.2.1 Tierversuch

Die Versuchstiere wurden mit Zahlen markiert und zufällig einer von vier Versuchsgruppen zugeteilt. Die Pilocarpin-Gruppe erhielt Pilocarpin-Hydrochlorid in einer Dosierung von 200mg/kg Körpergewicht. Diese Dosis löst bei der neugeborenen Ratte limbische Krampfanfälle mit sekundärer Generalisierung und Status epilepticus aus, wobei der Anfall nach etwa 2 Stunden ohne medikamentöse Intervention sistiert. Die zweite Versuchsgruppe erhielt Diazepam in einer Dosierung von 5mg/kg Körpergewicht, wobei sich diese Dosierung im Pilocarpin-Modell als antikonvulsiv erwiesen hat und histologisch nicht zu einer verstärkten Neurodegeneration führt („primär nicht-toxische Dosis“) ¹⁶. In der dritten Versuchsgruppe wurden beide Medikamente kombiniert: durch die Injektion von Pilocarpin wurde zunächst ein Status epilepticus provoziert und nach 2 Stunden Diazepam appliziert. Die vierte Gruppe bildete die Kontrollgruppe, in der die Tiere Injektionen mit Aqua-Spüllösung erhielten. Für die histologischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden 4-6 Tiere pro Versuchsgruppe verwendet, im Western Blot die gleiche Anzahl in jeder Zeitstufe.

Etwa 30 min vor der Injektion von Pilocarpin wurde den betreffenden Versuchstieren Methyloskopolamin in einer Dosierung von 1mg/kg Körpergewicht verabreicht, um periphere cholinerge Nebenwirkungen des Pilocarpins zu antagonisieren. Die Injektion aller Testlösungen erfolgte intraperitoneal, wobei das Injektionsvolumen 10ml/kg Körpergewicht betrug. Um die Entwicklung eines Status epilepticus feststellen zu können, wurden die Tiere der entsprechenden Versuchsgruppen bis zum Auftreten des Status auf einem Wärmekissen bei 37°C gelagert und beobachtet. Nach Sistieren des Status wurden die Tiere für die verbleibende Überlebenszeit dem Muttertier zurückgegeben, um weiteren Stress und Hypothermie zu vermeiden.

Gruppen	Zeitstufen				
	3h	4h	6h	12h	24h
1: Diazepam (5mg/kg)					
2: Pilocarpin (200mg/kg)					
3: Pilocarpin (200mg/kg), nach 2h Diazepam (5mg/kg)					
4: Kontrollen (H ₂ O)					
Untersuchungsmethode	Western Blot				De Olmos Kupfer-Silber-Färbung, Elektronenmikroskopie, Western Blot

Abb. 3: Darstellung des Tierversuchs mit Versuchsgruppen, Zeitintervallen und verwendeten Untersuchungsmethoden

2.2.2 Histologie: Kupfer-Silber-Färbung

Perfusion

Die für die histologische Untersuchung verwendeten Tiere wurden 24 Stunden nach Injektion der verschiedenen Testlösungen durch die intraperitoneale Injektion einer Überdosis Chloralhydrat (1g/kg Körpergewicht) getötet. Nach Eröffnung des Thorax wurde der rechte Vorhof inzidiert, um den Abfluss der Perfusionsflüssigkeit zu ermöglichen. Über die linke Herzkammer wurde eine Kanüle in die Aorta vorgeschoben. Anschließend wurden die Tiere mit 20 ml heparinierter PBS-Lösung (4°C) langsam über ein Infusionssystem perfundiert. Danach folgte eine Tropfinfusion mit 20 ml 4% Paraformaldehydlösung in Cacodylat-Puffer (vgl. 2.1.3.1) über 10 Minuten. Nach Abschluss der Perfusion wurden die Gehirne aus der Kalotte präpariert und in einer 4% Paraformaldehydlösung in Cacodylat-Puffer für mindestens einen Tag fixiert.

Zuschnitt

Im Grobschnitt wurden zunächst Riechhirn und Cerebellum entfernt und die Gehirne anschließend durch einen koronaren Schnitt in zwei Anteile unterteilt. Die Hirnhälften wurden dann für weitere vier Tage in der Fixationslösung gelagert.

Im nächsten Schritt erfolgte die Trocknung der Hirnhälften und daraufhin die Einbettung in eine 4% Agarlösung (vgl. 2.1.3.1). Nach Erhärten wurden rechteckige Agarblöcke ausgeschnitten, die jeweils eine Hirnhälfte enthielten. Die Blöcke wurden auf einem Präparierteller fixiert und am Rotationsvibrator zu Präparaten von 70µm Schichtdicke zugeschnitten. Jeder siebente Schnitt wurde für die Kupfer-Silber-Färbung verwendet und für mindestens 3 weitere Tage in 4% Paraformaldehyd in Cacodylat-Puffer gelagert. Pro Tier erfolgte die Anfärbung von 10 bis 12 Schnitten, die überzähligen Schnitte wurden in PBS-Azid (vgl. 2.1.3.1) bei 4°C aufbewahrt.

Färbung

Zu Beginn wurden die Schnitte dreimal in Aqua bidest gewaschen. Darauf folgte über eine Stunde die Inkubation in auf 40°C erhitzter Silberlösung (vgl. 2.1.3.1) im Wärmeschrank bei 40°C. Die Schnitte verblieben über 72 Stunden bei Raumtemperatur in der Silberlösung, wurden dann mit Aceton gewaschen und erneut für 30 Minuten in einer Silber-Diamin-Lösung (vgl. 2.1.3.1) inkubiert. Daraufhin wurden die Präparate in ethanolischer Formaldehyd-Citrat-Lösung (vgl. 2.1.3.1) geschwenkt, bis eine dunkelbraune Färbung erreicht war. Nach zweimaligem Waschen in Aqua bidest wurden die Schnitte in 0,3% Kaliumferrizyanidlösung (vgl. 2.1.3.1) bernsteinfarben gebleicht, erneut zweimal gewaschen und in 0,1% Natriumthiosulfat (vgl.

2.1.3.1) inkubiert. Nach drei weiteren Waschgängen wurden die Präparate mittels eines Gelatine-Mediums (vgl. 2.1.3.1) auf einen Objektträger aufgebracht. Die auf dem Objektträger befindlichen Präparate wurden dann im letzten Arbeitsschritt in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und zum Schluss unter Verwendung von Permout Mounting Medium gedeckelt.

Im Ergebnis werden in der Kupfer-Silber-Färbung degenerierte Zellen dunkelbraun bis schwarz vor einem goldgelben Hintergrund dargestellt ³².

Auszählung der Präparate

Zur Quantifizierung der in den histologischen Präparaten dargestellten Neurodegeneration erfolgte die Auszählung der Präparate unter Anwendung der stereologischen Dissektionsmethode ⁵⁷. Dazu wurde ein im Okular des Lichtmikroskops befindliches Zählgitter verwendet. Bearbeitet wurden folgende Hirnregionen: Frontalkortex (Schicht II, V), parietaler Kortex, Gyrus cinguli, retrosplenialer Kortex, Septumsregion, ventraler, mediodorsaler und laterodorsaler Thalamuskern, Hypothalamus, Subiculum und Hippocampus (Schicht CA I und Gyrus dentatus). Für jede untersuchte Hirnregion wurden zwei Schnitte untersucht und dafür in jedem Schnitt an vier zufällig ausgewählten Stellen die dunkel markierten Zellen innerhalb eines Zählrahmens ausgezählt. Die Auszählung erfolgte bezüglich der Versuchsgruppe, aus der das untersuchte Präparat stammte, verblindet.

Die Auszählung eines Präparates ergab bei der Auswertung von vier Stellen pro Schnitt und zwei Schnitten pro Region acht Zahlenwerte pro Tier und untersuchter Hirnregion. Unter Einbeziehung der ermittelten Zellzahl, der Zählrahmenmaße (0,05mm×0,05mm), der Schichtdicke (0,07mm) und der jeweiligen Vergrößerung wurde die Anzahl der untergegangenen Zellen in einem Kubikmillimeter Hirngewebe ermittelt (numerische Dichte). Aus den acht Werten für eine Region wurde für jedes Tier der Mittelwert errechnet. Die mittleren Dichtewerte der verschiedenen Regionen wurden addiert und ergaben für jedes Tier einen Summenscore, der ein Maß für den Schweregrad der Neurodegeneration im Gehirn des jeweiligen Tieres darstellt. Aus den Summenscores der einzelnen Versuchstiere wurde der mittlere Score für die Tiere einer Gruppe berechnet. Für die Abweichung der Mittelwerte zwischen den Tieren einer Versuchsgruppe wurden die Standardabweichung und der Standardfehler bestimmt. Im Anschluss konnten die Versuchsgruppen anhand der Summenscores verglichen werden. Die statistische Auswertung erfolgte im Computerprogramm PRISM[®]. Hierbei wurde zunächst eine Varianzanalyse mit den Summenscores aller Versuchsgruppen durchgeführt. Mit Hilfe des Student's t-Test (Newman-Keul-Test) wurde dann gezeigt, zwischen welchen Gruppen

signifikante Mittelwertabweichungen bestanden.

2.2.3 Morphologie: Elektronenmikroskopie

Die für die Elektronenmikroskopie verwendeten Tiere wurden 24 Stunden nach Injektion der entsprechenden Testsubstanzen mit einer Lösung aus 1% Paraformaldehyd und 1,5% Glutaraldehyd, gelöst in 0,1M Pyrophosphat-Puffer (vgl. 2.1.3.2) perfundiert. Die Anfärbung der Präparate und die Elektronenmikroskopie wurden in der Abteilung für Klinische Pathologie der Medizinischen Universität Lublin (Polen) vorgenommen. Der Zuschnitt der Gehirne erfolgte transversal in Präparate mit 70µm Schichtdicke, die in 1% Osmiumtetroxyd fixiert wurden. Die Schnitte wurden in aufsteigender Alkoholreihe entwässert und bei Raumtemperatur in einem Toluol-Plastik-Gemisch eingebettet (Verhältnis Toluol:Plastik 3:1, 1:1; 1:3). Ausgewählte Präparate wurden mit einem Glasmesser zu 1µm Schnitten aufbereitet und mit Azur II und Methylblau gefärbt. Am Ultramikrotom erfolgte der Zuschnitt der Präparate in 60-70nm Schichten, die anschließend mittels Transmissionselektronenmikroskopie untersucht wurden.

2.2.4 Molekularbiologie: Western Blot

Die Tiere wurden nach Ablauf von 3, 4, 6, 12 oder 24 Stunden dekapitiert, das Hirngewebe entnommen, gewogen, zugeschnitten, anschließend schockgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert.

Proteinextraktion

Für die Proteinextraktion wurde das Hirngewebe mit 500µl RIPA-Puffer (vgl. 2.1.3.3) versetzt und im Kühlraum bei 4°C homogenisiert. Es folgte die Zentrifugation der Proben über 20 Minuten bei 3000g. Die sich im Überstand befindliche zytosolische und nukleäre Zellfraktion wurde abpipettiert und das Pellet verworfen. Im Folgenden wurde mit dem Supernatant weiter gearbeitet.

Proteinbestimmung

Die Ermittlung der für den Western Blot zu verwendenden Probenmengen erfordert die Bestimmung des Proteingehaltes der gewonnenen Proben.

Die Proteinbestimmung wurde mit dem BCA-Test nach Pierce durchgeführt. Die zugrunde liegende Reaktion ist eine Biuret-Reaktion: Proteine bilden in alkalischem Milieu Komplexe mit Kupfer-II-Ionen. Die Kupferionen werden reduziert und es entsteht ein violetter Farbkomplex. Die Reaktionslösungen weisen je nach Proteingehalt unterschiedliche Absorptionsmaxima auf.

Um nun den Proteingehalt einer Probe zu bestimmen, ist zunächst das Erstellen einer

Standardreihe notwendig. Dabei wurden bekannte Mengen (0,05mmol/l, 0,1mmol/l, 0,2mmol/l, 0,5mmol/l und 1mmol/l) des Proteins Bicinchoninsäure (BCA), mit einer Testlösung (Micro BC Assay Protein Quantitation Kit) versetzt, eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend die Absorptionsmaxima für die verschiedenen Proteinkonzentrationen in einem Absorptionsmessgerät gemessen. Anhand der Messwerte wurde eine Standardkurve erstellt, die jeder der bekannten Proteinkonzentrationen den gemessenen Absorptionswert zuordnete.

Die Proben mit unbekanntem Proteingehalt wurden im Verhältnis 1:15 mit PBS-Puffer (vgl. 2.1.2.2) verdünnt und ebenfalls mit der Testlösung versetzt. Dann folgte nach einstündiger Inkubation in einem Wärmeschrank bei 37°C die Messung der Absorptionsmaxima. Nach Abzug des RIPA-Puffer-Leerwertes ließen sich jetzt unter Verwendung der Standardkurve die den entsprechenden Absorptionswerten zugehörigen gesuchten Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben ermitteln. Es wurden sowohl für die BCA-Werte, als auch für den RIPA-Puffer-Leerwert und die Probenwerte Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Die Erstellung der Standardkurve und die Ermittlung der gesuchten Proteinkonzentrationen erfolgte im Computerprogramm Sigma Plot.

Western Blot

Gele

Für die zu untersuchenden Proteine eigneten sich 10,5% Acrylamidgele. Die Gele bestanden aus einem Trenn- und einem darüber geschichteten Sammelgel, welches Taschen für das Einpipettieren der Proben enthielt (vgl. 2.1.3.3).

Probenvorbereitung

Im Western Blot erwies sich eine Proteinmenge von 10µg Protein pro Probe als ausreichend für den Nachweis der zu untersuchenden Faktoren. Die entsprechende Probenmenge wurde mit Aqua Spüllösung auf 5µl aufgefüllt und dann im Verhältnis 1:1 mit Lämmli-Puffer (vgl. 2.1.3.3) gemischt. Um eine gute Lösung der Proteine, die Auflösung von Tertiärstrukturen und die Inhibition von Proteasen zu gewährleisten, wurden die vorbereiteten Proben 5min bei 95°C im Thermomixer erhitzt.

Elektrophorese

Die SDS-Gelelektrophorese ermöglicht die Trennung von Proteingemischen entsprechend der proteinspezifischen Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld.

Gel und Elektrophorese-Puffer wurden in eine Elektrophoresekammer (vgl. 2.1.4) eingebracht,

anschließend die Proben aufgetragen. Das Anlegen einer Spannung (30min 100V, dann ca. 40min 160V) bewirkt die Wanderung der negativ geladenen Proteine in Richtung des Pluspols. Die Wanderungsgeschwindigkeit richtet sich dabei nach dem Molekulargewicht der Proteine: kleinere Proteine wandern schneller durch das Gel, größere legen im gleichen Zeitraum kürzere Strecken zurück.

Blot

In diesem Schritt erfolgt der Transfer der im Gel befindlichen Proteine auf eine Nitrocellulosemembran. Es wurde hierbei das Semi-Dry-Verfahren angewendet.

Dazu war zunächst die zwanzigminütige Inkubation des Gels in einem Semi-Dry-Transferpuffer (vgl. 2.1.3.3) erforderlich. Anschließend wurde das Gel im Transfergerät auf der Nitrocellulosemembran zwischen zwei Lagen Blot Papier gelagert und der Transfer bei einer Stromstärke zwischen 0,38-0,40 A über 30 Minuten durchgeführt.

Dem Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran liegt wiederum die Wanderung der Proteine im elektrischen Feld zugrunde. Im Gegensatz zur Gelelektrophorese wandern die Proteine beim Blot in vertikaler Richtung: aus dem Gel in die darunter liegende Membran. Nach dem Transfer bleiben die Proteine über nicht-kovalente, hydrophobe Wechselwirkungen an die Membran gebunden.

Blockierung

Um die Proteine auf der Nitrocellulosemembran zu fixieren und die Qualität von Elektrophorese und Blot zu überprüfen, wurden die Banden auf der Membran mit Ponceau-Lösung kurz angefärbt. Nach Darstellung der Proteinbanden erfolgte die Entfärbung der Membran durch Waschen in 0,1% TBS-Tween-Lösung (vgl. 2.1.3.3).

Da die Proteinbindung an die Nitrocellulosemembran nur im Bereich der dargestellten Proteinbanden erfolgt, weist die Membran im verbleibenden Bereich eine Vielzahl unbesetzter Proteinbindungsstellen auf. Diese müssen vor der Inkubation der Membran mit dem ersten Antikörper, der ausschließlich an die gesuchte Proteinbande binden soll, blockiert werden. Dazu erfolgte über zwei Stunden die Inkubation der Membran in 5% Magermilch-TBS-Tween-Lösung auf einem Schüttler.

Ohne die Blockierung der nicht gesättigten Proteinbindungsstellen ergäbe sich später auf der Membran ein zu starkes Hintergrundsignal, das die Auswertung der Proteinbanden erschweren würde.

Nach der Blockierung wurde die Membran dreimal 10 Minuten in 0,1% TBS-Tween gewaschen.

Antikörper

Die Inkubation mit dem ersten, spezifisch an das nachzuweisende Protein bindenden Antikörper (vgl. 2.1.2.2) erfolgte über 12 Stunden in der Kühlkammer bei 4°C. Die Antikörperlösungen (anti-P-Raf-1/Raf-1; anti-P-Akt/Akt oder anti-P-ERK1/2/ERK1/2) wurden mit einer einprozentigen Lösung aus bovinem Serumalbumin (BSA) und TBS-Tween im Verhältnis 1:2000 verdünnt. Nach 12 Stunden ist die Membran dreimal 10 Minuten mit 0,1% TBS-Tween-Lösung gewaschen worden, um nicht an Protein gebundenen Antikörper zu entfernen.

Daraufhin wurde die Membran mit einem Peroxidase-gekoppelten, gegen den bereits gebundenen ersten Antikörper gerichteten zweiten Antikörper (anti-Rabbit, vgl. 2.1.2.2) für eine weitere Stunde inkubiert. Der Antikörper ist in 1%BSA-TBS-Tweenlösung im Verhältnis 1:5000 (für P-Raf-1/Raf-1), 1:8000 (für P-ERK1/2/ERK1/2) und 1:10 000 (für P-Akt/Akt) verwendet worden. Um die geeignete Konzentration sowohl des ersten als auch des zweiten Antikörpers zu ermitteln, wurden zu Beginn der Untersuchungen „Testblots“ durchgeführt, anhand derer die Antikörper-Konzentrationen für die jeweiligen Faktoren optimiert wurden. Im Anschluss an die Reaktion mit dem zweiten Antikörper ist die Membran wiederum dreimal 10 Minuten in TBS-Tween gewaschen worden, um überschüssigen Antikörper zu entfernen.

Chemilumineszenzreaktion

Eine an den zweiten Antikörper gekoppelte Peroxidase ermöglicht es, die proteinspezifische Bande auf der Nitrocellulosemembran sichtbar zu machen.

Hierfür wurde eine sowohl das Substrat der Peroxidase, (Luminol, vgl. 2.1.2.2), als auch Wasserstoffperoxyd (vgl. 2.1.2.2) enthaltende Testlösung auf die Membran gegeben. Die stattfindende Reaktion besteht in der Oxidation des Luminols durch das an den Antikörper gekoppelte Enzym, wobei Energie in Form von Licht freigesetzt wird. Das Licht schwärzt einen der Membran aufgelegten Film (vgl. 2.1.4) im Bereich der gesuchten Proteinbande. Der Film wurde in einer Maschine von Kodak (vgl. 2.1.4) entwickelt.

Semiquantitative Auswertung

Die Filme sind eingescannt und mit dem Computerprogramm TINA 2.09[©] bearbeitet worden.

Das Programm ermöglicht die Messung des Schwärzegrades der Banden in Form von Grauwerten pro Flächeneinheit. Hierbei wird davon ausgegangen, dass die Intensität der Schwärzung des Films und die Breite der Bande mit der Proteinkonzentration im Bereich der

Bande korrelieren.

Die gemessenen Werte für die mit Diazepam, Pilocarpin oder Pilocarpin und Diazepam behandelten Tiere wurden zu denen der Kontrolltiere ins Verhältnis gesetzt, so dass im Folgenden mit Prozentwerten gearbeitet werden konnte.

Datenverarbeitung

Der Western Blot wurde für alle untersuchten Faktoren für die Tiere aller Gruppen und Zeitstufen mehrfach durchgeführt. Aus den verschiedenen pro Tier gemessenen Werten wurde der Mittelwert für jedes Tier errechnet. Diese Werte ergaben dann den Mittelwert für jede Zeitstufe unter den Tieren einer Gruppe. Standardabweichung und Standardfehler wurden für die Mittelwertabweichungen der Tiere einer Gruppe und Zeitstufe bestimmt. Die Berechnungen für die Ergebnisauswertung wurden in Microsoft Excel[®] vorgenommen.

Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte unter Verwendung des Computerprogramms PRISM[®]. Die Säulendiagramme zeigen die Prozentmittelwerte der Versuchsgruppen mit zugehörigem Standardfehler im zeitlichen Verlauf.

Die statistische Auswertung der Ergebnisse konnte ebenfalls mit PRISM[®] durchgeführt werden. Dabei wurde mit den für jeweils eine Zeitstufe ermittelten Werten der vier Versuchsgruppen eine Varianzanalyse (One-Way-ANOVA) durchgeführt. Wurde so eine statistisch signifikante Mittelwertabweichung zwischen den Gruppen gezeigt, erfolgte der Vergleich der einzelnen Gruppenwerte gegeneinander mit einem t-Test (Student's Newman Keul-Test). Hierdurch konnte festgestellt werden, zwischen welchen Gruppen die signifikante Mittelwertabweichung innerhalb einer Zeitstufe bestand.