

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Geräte

- Acryl-Küvetten, Fa. Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf, Deutschland
- Autoklav, Fa. Gössner, Modell GVA4,6-3, Hamburg, Deutschland
- Brutschrank, Fa. Heraeus, Modell B5060, Hanau, Deutschland
- Elektronenmikroskop, Zeiss 900, Fa. Zeiss, Jena, Deutschland
- Einmalpipetten, Fa. Falcon, 5, 10, 25 ml, Lincoln Park, USA
- Einmalröhrchen, Fa. Falcon, Blue Max, 50 ml, Lincoln Park, USA
- Einmalspritzen, Fa. Braun, 10 ml, Melsungen, Deutschland
- Kulturschalen, Fa. Greiner 36/10 mm, Frickenhausen, Deutschland
- Kulturschalen, Fa. Nunc, 4well Multidish, Roskilde, Dänemark
- Laborwaage, Fa. Sartorius, Göttingen, Deutschland
- Mikroskop, Fa. Leica, Typ DMLB, Leica-Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland, Fotoeinheit HRD 100-NIK
- Pasteurpipetten, Fa. Roth; Karlsruhe, Deutschland
- Pipettenspitzen, Fa. Roth; Karlsruhe, Deutschland
- pH-Meter, Fa. WTW, Modell 537, Weilheim, Deutschland
- Pipettierhilfe, Fa. Hirschmann, Modell Pipetus-Akku, Eberstadt, Deutschland
- Schüttler, Fa. IKA-Labortechnik, Modell MTS 4, Staufen, Deutschland
- Stereolupe, Fa. Zeiss, Modell SV 11, Oberkochen, Deutschland
- Sterilfilter 150 ml, Fa. Nalgene, Modell 1550020, Hereford, U.K.
- Sterilfilter 500 ml, Fa. Nalgene, Modell 1564020, Hereford, U.K.
- Tischzentrifuge, Fa. Hettich, Modell Universal, Tuttlingen, Deutschland
- Trockenheiluftsterilisator, VEB MLW Medizinische Geräte, Modell 113-0100, Berlin, Deutschland
- Ultratom, Fa. Reichert, Modell Ultracut S, Wien, Österreich
- Vibratom, Fa. Pelco, Serie 1000, Redding, USA
- Vortex, Fa. IKA-Labortechnik, Modell G560E, Staufen, Deutschland
- Wärmeschrank, VEGB MLW Medizinische Geräte, Berlin, Deutschland

3.2 Chemikalien

- ABC-Elite Kit, Vector Laboratories, Camon Wiesbaden, Deutschland
- ABC-Peroxidase Kit, Vector Laboratories, Camon Wiesbaden, Deutschland
- Agarose, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Ammoniumnickelsulfat, Fluka, Buchs, Schweiz
- Anti-Kv 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.6, polyklonal, made in rabbit
freundlicherweise zur Verfügung gestellt von R. W. Veh, Institut für Anatomie, Charité, Berlin, Deutschland
- Anti-Kv 1.5, polyklonal, made in rabbit, Alomone Labs, Jerusalem, Israel
- Anti-rabbit- IgG (H+L), biotynilated, made in goat, Vector Laboratories, Camon Wiesbaden, Deutschland
- Anti-SAP90, polyklonal, made in rabbit, Fa. Abcam, Cambridge, U.K.
- Anti-SAP97, polyklonal, made in rabbit
freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Th. Jöns, Institut für Anatomie, Charité, Berlin, Deutschland
- Aqua bidest, Tissue cultured tested, Fa. Gibco, Eggenstein, Deutschland
- BSA (bovine serum albumin), Sigma, St. Louis, USA
- DAB (Diaminobenzidin), Fa. Sigma, München, Deutschland
- Dinatriumhydrogenphosphat, Fa. Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
- Eisessig, Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Entellan, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Epon 812, Fa. Fluka, Buchs, Schweiz
- Epon-Accelerator, Fa. Fluka, Buchs, Schweiz
- Epon Hardener DDSA, Fa. Fluka, Buchs, Schweiz
- Epon Hardener MNA, Fa. Fluka, Buchs, Schweiz
- Ethanol, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Ether, Fa. Sigma, München, Deutschland
- Gelatine, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Glutaraldehyd 70 %, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Imidazol, Fa. Sigma, München, Deutschland
- Kaliumchlorid, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Kaliumchromsulfat-12-hydrat, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland

- Natriumazid, Fa. Sigma, Heidelberg, Deutschland
- Natriumborhydrid, Fa. Fluka, Buchs, Schweiz
- Natriumchlorid, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Natriumdihydrogenphosphat, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Natriumhydroxid, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Natriumnitrat, Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- NGS (Normal-goat-serum), Vector Laboratories, Camon Wiesbaden, Deutschland
- Paraformaldehyd, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Phenylhydrazin, Fa. Merck-Schuchardt, München, Deutschland
- Saccharose, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Thimerosal, Fa. Sigma, München, Deutschland
- Trichloressigsäure, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Tris-Hydroxymethylaminomethan, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Triton-X-100, Fa. Serva, Heidelberg, Deutschland
- Uranylacetat, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Wasserstoffperoxid, Fa. Sigma, München, Deutschland
- Xylol, Fa. Baker, Deventer, Holland

3.3 Gebrauchslösungen

Puffer

- PBS (phosphate buffered saline):
140 mM NaCl, 50 mM Na₂PO₄ in Aqua bidest, pH 7,4
- Phosphatpuffer (0,1 M):
33 mM NaH₂PO₄, 67 mM Na₂HPO₄ in Aqua bidest, pH 7,4

Lösungen zur Immunzytochemie

- Perfusions-Lösung:
4 % Paraformaldehyd, 0,05 % Glutaraldehyd, 0,2 % Picrinsäure in 0,1 % Phosphatpuffer, pH 7,4
- Paraformaldehydlösung 4 %:
4 % Paraformaldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,2

- Antikörperverdünner:
0,5 % BSA, 0,05 % NaN_3 in PBS, pH 7,3
- 10 % NGS-PhT:
0,3 ml Triton-Stocklösung zu 9,7 ml 10 % NGS, dazu 5 μl Phenylhydrazin
- 10 % NGS-TAT:
0,3 ml Triton-Stocklösung zu 9,7 ml 10 % NGS, dazu 100 μl Natriumazid-Stocklösung, 100 μl Thimerosal-Stocklösung
- PBS-A-Stocklösung (20 mg/ml):
400 mg BSA (Bovine Serum albumine) in 20 ml PBS
- PBS-A:
2 ml PBS-A-Stocklösung zu 18 ml PBS
- ABC-Elite-Komplex:
10 μl Elite A in 10 ml PBS-A, dann 10 μl Elite B zugeben, 30 min vorinkubieren
- Tris-Stocklösung (1 M):
12,2 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan in 100 ml H_2O , pH 7,6
- Imidazol-Stocklösung (1 M):
681 mg Imidazol in 10 ml H_2O , pH 7,6
- DAB-Stocklösung:
50 mg DAB in 1 ml H_2O
- Vorinkubationslösung:
500 μl Tris-Stocklösung, 100 μl Imidazol-Stocklösung, 100 μl DAB-Stocklösung zu 9,5 ml H_2O
- Inkubationslösung:
Direkt vor Reaktionsbeginn, 500 μl 3 % Ammoniumnickelsulfat und 250 μl 0,3 % H_2O_2 zu 5 ml Vorinkubationslösung

Lösungen für den elektronenmikroskopischen Nachweis:

- Uranylacetat:
1 g Uranylacetat in 100 ml PBS
- Glutaraldehyd 2 %:
2 g Glutaraldehyd in 100 ml PBS
- Eponmischung:
10,7 g Epon 812, 7,8 g DDSA, 6,5 g MNA, 0,5 g Eponbeschleuniger

3.4 Versuchstiere

Für die Gewebegewinnung wurden Ratten genau bekannten Alters benötigt. Es handelt sich bei den untersuchten Tieren um Wistar-Ratten der Fa. Harlan Winkelmann (Borchen, Deutschland). Die Betreuung der Tiere erfolgte im zentralen Tierversuchsstall der Charité und im Tierstall des anatomischen Instituts der Charité, wobei die Zucht und alle weiteren Arbeiten mit den Ratten entsprechend den geltenden Tierschutzbestimmungen durchgeführt wurden.

Der Tag der Geburt wurde als P0 (Postnataltag 0) betrachtet.

3.5 Gewinnung der Retina

Nach Betäubung mit Narkoseether wurden die Ratten durch zervikale Dislokation getötet und dekapitiert. Mit Hilfe eines Skalpells, sowie einer chirurgischen Pinzette wurden die Augen entnommen und sofort mit 0,1 ml Paraformaldehydlösung durch den N. opticus fixiert. Für die weitere Präparation unter der Stereolupe wurden die Augen in einer mit Paraformaldehydlösung gefüllten Petrischale auf Eis gelegt.

Die Präparation der Retinae erfolgte bei 16-facher Vergrößerung, im Anschluß wurden diese für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer Perfusionslösung fixiert und in PBS überführt, bevor sie in Agarose eingebettet wurden.

Am Vibratom wurden Schnitte mit einer Dicke von 50 µm angefertigt.

3.6 Licht- und elektronenmikroskopischer Nachweis von Proteinen

3.6.1 Immunzytochemie

Das den immunzytochemischen Nachweismethoden zugrunde liegende Prinzip basiert auf spezifischer Bindung eines Primärantikörpers an das gesuchte Antigen. Die Darstellung dieses Antigen-Antikörper-Komplexes in der hier vorliegenden Arbeit gelang durch Sichtbarmachung mittels eines Avidin-Biotin-Komplexes, nach der ABC-DAB/Ni-Methode (Veh et al, 1995). Die Darstellung der Proteine gelingt dabei durch Binden antigenspezifischer Antikörper, die durch Kopplung an biotinylierte Sekundärantikörper die Bindung eines Avidin-Peroxidase-Komplexes ermöglichen.

ABC-DAB/Ni-Technik:

Nach der Fixierung wurden die Schnitte in 1 %igem Natriumborhydrid für 15 Minuten reduziert. Dann wurden sie zur Zerstörung der endogenen Peroxidaseaktivität, sowie zur Permeabilisierung 30 Minuten bei Raumtemperatur mit Phenylhydrazin in 10 % NGS-PhT behandelt. Danach erfolgte die direkte Inkubation in einer geeignet konzentrierten Lösung des Erstantikörpers im Kühlraum (Tabelle 1). Nach 36 Stunden wurden die Vibratonschnitte für 60 Minuten in bovinem Serumalbumin in PBS (PBS-A) vorinkubiert, und weitere 24 Stunden gekühlt in der entsprechenden Lösung des biotinylierten Zweitantikörpers belassen (Tabelle 2). Wiederholte Vorinkubation in PBS-A ging der Inkubation mit ABC-Elite-Kit 1:1000 in PBS-A für 6 Stunden bei Raumtemperatur voraus. Dabei erfolgte eine Komplexbildung zwischen dem Biotin des Zweitantikörpers und dem zugegebenen Avidin, an das eine Peroxidase gekoppelt war. Danach wurden die Schnitte für 15 Minuten mit einer Lösung aus 5 % Tris-Imidazol-Stock und 1 % DAB-Stock in H₂O behandelt. DAB sollte die Peroxidaseaktivität sichtbar machen. Durch Zusatz von 0,3 % Ammonium-Nickelsulfat und 0,015 % H₂O₂ wurde die enzymatische Reaktion gestartet. Die Zunahme der Intensität der Färbung wurde unter dem Mikroskop verfolgt und im gewünschten Stadium mit PBS unterbrochen. Anschließend wurden die Schnitte noch ein weiteres Mal für 20 Minuten in PBS gewaschen, bevor sie mit Hilfe feiner Pinsel auf Gelatine-gecoatete-Objektträger gezogen und 20 Minuten an der Luft getrocknet wurden. Nach der Trocknung erfolgte eine Entwässerung der Schnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70 %, 90 %, 96 %, 2 x 100 % für jeweils eine Minute) und in Xylol für 10 Minuten. Danach wurden die Schnitte mit Entellan eingedeckt.

Die Auswertung wurde mittels eines Leica Lichtmikroskops durchgeführt, eine angeschlossene digitale Leica-Kamera ermöglichte die fotografische Dokumentation.

Tabelle 1 Bei der DAB/Nickel-Methode verwendete Primärantikörper und deren Konzentration.

Primärantikörper	Eigenschaft/Herkunft	Verdünnung in NGS-TAT
Anti-Kv1.1	polyklonal, rabbit	1:500
Anti-Kv1.2	polyklonal, rabbit	1:1000
Anti-Kv1.3	polyklonal, rabbit	1:30
Anti-Kv1.4	polyklonal, rabbit	1:500
Anti-Kv1.5	polyklonal, rabbit	1:20
Anti-Kv1.6	polyklonal, rabbit	1:1000
Anti-SAP90	polyklonal, rabbit	1:300
Anti-SAP97	polyklonal, rabbit	1:300

Tabelle 2 Bei der DAB/Nickel-Methode verwendete Sekundärantikörper und deren Konzentration.

Sekundärantikörper	Herkunft	Verdünnung in PBS-A mit 1% Natriumazid-Stocklg.
Biotinylated anti-rabbit	Goat	1:2000

Spezifitätskontrolle:

Zum Ausschluß von methodisch bedingten unspezifischen Reaktionen wurden Spezifitätskontrollen durchgeführt. In Negativkontrollen wurden entweder die Primärantikörper durch Puffer oder die biotinylierten Sekundärantikörper bzw. der ABC-Komplex durch Puffer ersetzt.

3.6.2 Elektronenmikroskopischer Nachweis

Nach Spülen mit PBS wurden die Schnitte durch Zugabe von 1 %igem Natriumborhydrid für 15 Minuten reduziert. Dann wurden sie zur Zerstörung der endogenen Peroxidasetätigkeit, sowie zur Permeabilisierung 30 Minuten bei Raumtemperatur mit Phenylhydrazin in 10 % NGS-PhT behandelt. Danach erfolgte die

direkte Inkubation in einer geeignet konzentrierten Lösung des Erstantikörpers für 36 Stunden im Kühlraum (Tabelle 1). Anschließend wurde wieder gespült und für 1 Stunde in 0,2 % bovine serum in PBS (PBS-A) vorinkubiert, bevor die Schnitte für 24 Stunden bei 4 °C in eine Lösung des biotinylierten Sekundärantikörpers überführt wurden.

Einem Waschschrift mit PBS zum Entfernen der ungebundenen Antikörper folgte eine einstündige Vorinkubation mit PBS-A bei Raumtemperatur und anschließend die Inkubation mit dem ABC-Elite Kit für 6 Stunden, ebenfalls bei Raumtemperatur. Danach wurden die Schnitte für 15 Minuten mit einer Lösung aus 5 % Tris-Imidazol-Stock und 1 % DAB-Stock in H₂O behandelt. DAB sollte die Peroxidaseaktivität sichtbar machen. Durch Zusatz von 0,3 % Ammonium-Nickelsulfat und 0,015 % H₂O₂ wurde die enzymatische Reaktion gestartet. Die Zunahme der Intensität der Färbung wurde unter dem Mikroskop verfolgt und im gewünschten Stadium, aber spätestens nach drei Minuten mit PBS unterbrochen. Anschließend wurde noch ein weiteres Mal für 20 Minuten in PBS gewaschen.

Hiernach wurden die Retina-Präparate für 30 Minuten mit 4 % OsO₄ behandelt, was der unspezifischen Nachkontrastierung diente. Der Vorbehandlung durch Waschen mit 50 % und 70 % Alkohol, 40 Minuten Einwirken von 2 %igen Uranylacetat und erneutem Waschen mit 70 % Alkohol folgte eine alkoholische Schnellentwässerung mit 70 %, 95 %, und 100 % Ethanol.

Danach erfolgte die Einbettung in Epon 812 mit verschiedenen Konzentrationen in vier Schritten à 15 Minuten: Zunächst in einer Eponmischung aus 2 Volumenteilen (VT) HPMA (Hydroxypropylmethacrylat) und 1 VT Epon, gefolgt von einer Einbettung in einer Mischung aus je 1 VT HPMA und Epon, dann in 1 VT HPMA und 2 VT Epon und schließlich 5 Minuten in reinem Epon.

Nach Polymerisation bei 60 °C wurden die in Epon eingebetteten Präparate mittels Sekundenkleber auf neue Eponblöcke aufgebracht. An einem Ultramikrotom wurden Ultradünnschnitte angefertigt und diese auf Nickelgrids aufgezogen. Abschließend wurden die hergestellten Präparate nochmals je 3 Minuten mit einer Lösung aus 4 % Uranylacetat und 0,2 % Bleicitrat nachkontrastiert. Die Präparate wurden mit einem Zeiss 900 Elektronenmikroskop untersucht.