

3. Methoden

3.1. Material

Produkt	Herkunft
Acetylethylcholin Mustard	Sigma
Acrylamid (30% Acrylamid/Bis Solution 29:1)	Bio-Rad
Anti-Bcl ₂ -Antikörper (Maus) Monoclonal	Sigma
Anti-Synaptophysin-Antikörper (Maus) Monoclonal	Synaptic System
B27-Rinder-Serumalbumin (BSA)	Sigma
BCA-Kit	Pierce
Bromphenolblau	Serva
CollagenG	Biochrom
Complete-Mini Protease-Inhibitor-Mix	Roche
Corticosteron	Sigma
Cycloheximid	Sigma
Dexamethason	Sigma
DMSO	Sigma
Enhanced Chemiluminescent Kit (SuperSignal® West Pico)	Pierce
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma
Enzyme-Standard control-2-E	Sigma
Fötales Kälberserum (FKS oder FKS Gold)	Biochrom
Glukose	Sigma
L-Glutamat	Sigma
L-Glutamin	Biochrom
LY 294002	Calbiochem, Bad Soden
Glycerol	Sigma
Glycin	Bio-Rad
HEPES	Biochrom

high-range molecular weight standard	Sigma
Hoechst-Kernfarbstoff (1mg/ml)	
Insulin (Insuman Rapid 40 I.E./ml)	Aventis
LDH-Standard	
β-Mercaptoethanol	Serva
Methanol	Merck
Milchpulver	Difco
Minimum essential Medium-Eagle (MEM)	Biochrom
β-NADH	Sigma
NaCl	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck
Neurobasales Medium (NBM)	Gibco
Paraformaldehyd	Sigma
10x PBS mit und ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Gibco
Penicilin/Streptomycin (Pen/Strep)	Biochrom
Poly-L-Lysin	Biochrom
Polyclonal antibody p27	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Polyvinylidendifluoridmembran	Millipore
Prestained SDS-PAGE Standard Broad Range	Bio-Rad
Pyruvat	Sigma
Restore Western Blot Stripping Buffer	Pierce
RU 486	Sigma
Staurosporin	Sigma
Spirocholacton	Sigma
Supplement B27	Gibco
Tris-Base	Sigma
Tris-HCl	Merck
Triton X-100	Ferack Berlin
10x Trypsin/EDTA	Biochrom
Tween 20	Serva

ELISA-Platten 96-Loch	Falcon
Zellkulturplatten: 6-/24-Loch	Falcon
Röntgenfilme	Kodak

3.2. Primäre Zellkultur

Die primären neuronalen Zellen des Kortex wurden aus Embryonen am Embryonentag E16-E18 von Wistarratten gewonnen. Die Tierversuche wurden vom Landesamt für Gesundheit und Soziales in Berlin (Tötungsanzeige 0322/96) am 29.10.2002 legitimiert. Die Präparation der Neuronen wurde nach einer modifizierten Methode von Brewer durchgeführt (Brewer 1995).

Die trächtigen Ratten wurden mit Isofluran narkotisiert und anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Nach der Entnahme des Uterus wurden unter sterilen Bedingungen die Embryonen freipräpariert und in calcium- und magnesiumfreier phosphatgepufferten Kochsalzlösung (PBS) gelagert.

Unter dem Mikroskop (Leica 2000) wurden die Gehirne herauspräpariert, die Kortizes isoliert und die Meningen entfernt. Das in NBM+B27 gelagerte kortikalen Gewebe wurde mit PBS dreimal gespült und 15 Minuten mit 5 ml Trypsin/EDTA [0,05/0,02% Gewicht pro Volumen (w/v)] bei 36,5°C in PBS ohne Calcium/Magnesium inkubiert. Die Inaktivierung des Trypsins erfolgte durch das anschließende zweimalige Waschen des Gewebes in serumhaltigen N-Medium (Eagle's modifiziertes Medium, im folgenden Dissoziationsmedium genannt, mit 10% fötalem Kälberserum, 10 mM HEPES, 44 mM Glukose, 100 internationalen Einheiten (IE) Penicillin und Streptomycin/ml, 2 mM L-Glutamin, 100 IE Insulin/l).

Die Zellen wurden vorsichtig mit einer Pasteurpipette dissoziiert und anschließend mit 1200 U/min für zwei Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und die Zellen wurden in 5 ml Startermedium aufgenommen. Das Startermedium setzt sich aus Neurobasalem Medium (NBM) unter Zusatz von B27 (10 ml auf 500 ml), 100 IE Penicillin/Streptomycin/ml und 0,5 mM L-Glutamin und 25 µM Glutamat zusammen. Es erfolgte nochmals eine mechanische Dissoziation und Zugabe von weiteren 25 ml Startermedium.

Die Zellzahl wurde in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt. Um eine Aussage über die Qualität der Präparation zu erhalten wurde mittels Trypan-Blau-Färbung der Anteil toter Zellen im Verhältnis zu den lebenden Zellen ermittelt.

Die Zellsuspension wurde in beschichteten Kulturplatten in einer Zelldichte von 3×10^5 Zellen/cm² ausgesät. Die Beschichtung der Platten erfolgte mit Poly-L-Lysin-Lösung mit nachfolgender Inkubation bei 4°C für eine Stunde. Anschließend erfolgte eine einmalige Spülung mit PBS ohne Calcium/Magnesium. Die Platten wurden dann für eine Stunde mit Collagen-Medium bei 36,5°C inkubiert, zweimal mit PBS gespült und letztendlich mit 500 µl Starter-Medium pro Vertiefung befüllt.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte zunächst in NBM unter Zusatz von B27 und 25 mM Glutamat bei 5% CO₂-Atmosphäre, 95% Luftfeuchtigkeit und einer Temperatur von 36,5°C. Am vierten und am siebten Tag in Kultur wurden jeweils 50% des Mediums gewechselt, wobei das neue Medium kein Glutamat enthielt.

3.3. Modelle der Zellschädigung

Die Kulturen wurden in allen Zellschädigungsmodellen nach 10-11 Tagen Kulturzeit behandelt (*days in vitro*; DIV). Vor Beginn des Experiments wurde das alte Medium entnommen und mit der gleichen Menge neuen NBM+B27-Medium gemischt. Von diesem Gemisch (konditioniertes Medium) wurden gleiche Volumina auf alle Zellen vor dem Start des Experiments gegeben.

3.3.1. Ethylcholin-Aziridiniumion (AF64A)

AF64A wurde aus Acetylethylcholin Mustard nach der Methode von Fisher hergestellt (Fisher et al., 1982). Die benötigte Menge Mustard wurde in bidestilliertem Wasser gelöst, um eine Konzentration von 1 mM Stammlösung zu erhalten. Bei Raumtemperatur wurde diese Stammlösung für 20 Minuten auf einen pH-Wert von 11,5, danach für eine Stunde auf einen pH-Wert von 7,3 titriert. Parallel dazu wurde eine Kontrolllösung (Vehikel) angefertigt, welche ebenfalls auf die pH-Werte eingestellt, anschließend sterilfiltriert und zur Verdünnung der Stammlösung verwendet wurde. AF64A wurde in einer

Endkonzentration von 40 μM benutzt. Vehikel-behandelte Zellen erhielten die gleiche Behandlung mit der Kontrolllösung.

3.3.2. Staurosporin

Staurosporin wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgelöst und als 10 mM Stammlösung hergestellt. Die Verdünnung erfolgte mit PBS zu Lösungen von 10 und 30 μM , die dem Medium im Verhältnis 1:100 zugegeben wurden. Die Endkonzentrationen von Staurosporin ergaben 100 und 300 nM im Medium. In gleicher Weise wurde das Vehikel verdünnt und mit der höchsten DMSO-Konzentration dem Medium zugegeben.

3.3.3. Camptothecin

Camptothecin wurde in DMSO aufgelöst, als 5 mM Stammlösung hergestellt und dem Medium im Verhältnis 1:500 zugegeben wurden. Die Endkonzentrationen von Camptothecin im Medium betrug 10 μM . Vehikel-behandelte Zellen erhielten die gleiche Konzentration an DMSO.

3.3.4. Glutamat

Glutamat wurde als 10 mM Lösung in PBS hergestellt und dem Medium im Verhältnis 1:100 zugegeben. Daraus ergab sich eine Endkonzentration von 100 μM Glutamat im Medium. Vehikel-behandelte Zellen erhielten die gleiche Behandlung mit PBS. Nach 30 Minuten wurde die Wirkung von Glutamat durch Entfernung des Mediums und Zugabe von konditioniertem Medium unterbrochen. Dieser Vorgang erfolgte auch bei den Vehikel-behandelten Zellen.

3.3.5. Kombiniertes Sauerstoff- und Glukoseentzug (OGD)

Für die OGD wurde das Medium aus den Kulturen entfernt und bei 36,5°C aufgehoben. Die Kulturen wurden zweimal mit PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} gespült und in BSL_0 , einer

desoxygenierten gepufferten Salzlösung ohne Glukose, bei einem $pO_2 < 2$ mmHg (5% $CO_2/95\% N_2$) für 90 Minuten inkubiert (Bruer et al., 1997). BSL_0 besteht aus 143,8 mM Na^+ , 5,5 mM K^+ , 0,8 mM Ca^{2+} , 0,8 mM Mg^{2+} , 125,3 mM Cl^- , 26,2 mM HCO_3^- , 1,0 mM $H_2SO_4^{2-}$, 0,8 mM SO_4^{2-} und 0,01 mM Glycin, mit einem pH-Wert bei 7,4. Der pO_2 wurde mit einer polarographischen Elektrode gemessen (Licox, GMS, Kiel). Die Temperatur in der Hypoxiekammer wurde bei $36,5 \pm 0,5^\circ C$ und die Luftfeuchtigkeit bei $>90\%$ konstant gehalten. Im Anschluss wurde das zuvor entnommene Medium wieder zurückgegeben. Die Kontrollkulturen wurden für die gleiche Zeit mit balanzierter Salzlösung mit 20 mM D-Glukose (BSL_{20}) inkubiert und im Brutschrank belassen.

3.4. Vorbereitung der Zellkulturen, Versuchsaufbau und pharmakologische Interventionen

Nach 10-11 DIV wurde den neuronalen Primärkulturen ein Teil des Mediums entnommen und mit der gleichen Menge frischen Neurobasalen Medium in einem Falcon-Tube vermischt. Anschließend wurde das restliche Medium aus den Zellkulturen abgesaugt und 0,5 ml dieser Mischung pro Vertiefung einer 24-Loch-Zellkulturplatte oder 2 ml pro Vertiefung einer 6-Loch-Zellkulturplatte zugegeben. So wurden vor Versuchsbeginn mögliche Unterschiede in der Zusammensetzung und Menge des Mediums ausgeglichen.

Für den Versuchsaufbau wurden folgende Substanzen in unterschiedlichen Vehikeln aufgelöst. Die jeweiligen Substanzen mit den Vehikeln werden in Tabelle 1 aufgeführt, wobei die Verdünnungsreihen immer in der höchsten Konzentration den Kontrollkulturen zugegeben wurden. Vehikel und Substanzen wurden als 100fach konzentrierte Lösung angesetzt, so dass 5 μl pro 24er-Vertiefung und 20 μl pro 6er-Vertiefung in die Kultur zugegeben wurden. Angegeben sind Endkonzentrationen in der Zellkultur. Die Konzentrationen sind der Literatur entnommen und in eigenen Versuchen überprüft worden. Die Applikationszeitpunkte variierten je nach Substanz und Schadensmodell und sind im Ergebnisteil aufgeführt.

Tabelle 1: Verwendete Substanzen, Lösungsvehikel, Auflösung, Verdünnung und verwendete Endkonzentration für die verwendeten Substanzen.

Substanz	Vehikel	Auflösung und Verdünnung
Corticosteron	DMSO (0,02% Endkonzentration)	250 mM Stammlösung; Verdünnung mit H ₂ O; Endkonzentrationen von 1-50 µM
Cycloheximid	Aquabidest	500 ng/ml Endkonzentration
Dexamethason	Aquabidest	Endkonzentrationen von 1-50 µM
LY 294002	DMSO (0,008% Endkonzentration)	65 mM Stammlösung; Verdünnung mit H ₂ O; 5 µM Endkonzentration
Mifepriston	Ethanol (0,02% Endkonzentration)	50 mM Stammlösung; Verdünnung mit H ₂ O; 10 µM Endkonzentration
Spirolacton	DMSO (0,1% Endkonzentration)	50 mM Stammlösung, Verdünnung mit H ₂ O, 50 µM Endkonzentration

3.5. Evaluierung der Zellschädigung

Das Schädigungsausmaß wurde qualitativ durch Beurteilung der Morphologie der Zellen mittels Phasenkontrastmikroskopie und quantitativ mit der Bestimmung der Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivität im Medium als Maß des Verlustes der Zellmembranintegrität sterbender Zellen vorgenommen.

3.5.1. Phasenkontrastmikroskopie

Die morphologischen Veränderungen der Zellkulturen nach Schädigung wurden mit einem Phasenkontrastmikroskop (Leitz, DM IL) nach 48 und 72 Stunden dokumentiert. Die lebenden Neuronen wiesen einen relativ großen Zellkörper mit glatter Zellmembran, relativ schmalen Zytoplasmasaum, großen Zellkern mit mehreren Nukleolen und einem ausgeprägten Netzwerk aus langen Neuriten auf. Morphologische Charakteristika der

Apoptose sind Neuritendegeneration, Schrumpfung des Zellkörpers und Ansammlung kondensierter Partikel im Zellkern und Zerfall in apoptotische Körperchen, die in der Zellkultur mangels der Möglichkeit der Phagozytose schließlich lysiert werden.

Die Nekrose geht mit einer Schwellung des Zellkörpers und des Zellkerns einher. Die Zellen zeigen ein balloniertes Bild mit doppelter Größe des Zellkörpers und glatt begrenzter Membran. Freie Kernreste nach Zelllyse treten auf.

3.5.2. Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivitätsmessung

Die LDH-Aktivität wurde aus dem Medium der Zellkulturen nach unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen. Die LDH-Ausschüttung in das Medium der Zellen gilt als Maß für die Desintegrität der Zellmembran. Der Anstieg der LDH-Aktivität lässt keine Rückschlüsse auf die Art des Zelluntergangs zu, korreliert aber außerordentlich gut mit der Zahl untergegangener Zellen (Koh et al., 1987). Entscheidende Unterschiede ergeben sich aus der Kinetik und den Maximalwerten der LDH-Ausschüttung bei den verschiedenen Zellschädigungsmodellen.

Zur Bestimmung der LDH-Aktivität wurden 25 µl Medium/Vertiefung entnommen und in die Vertiefungen einer 96-Loch-Zellkulturplatte gegeben. Zusätzlich wurden noch 25 µl Enzym-Standard auf jede Platte pipettiert. Dieser Standard von Sigma enthielt eine LDH-Aktivität von 500 Einheiten/ml. Jeder Vertiefung der Platte wurde anschließend 125 µl 0,1 M LDH-Puffer zugefügt. Dieser Puffer wurde als 1 M Stammlösung zubereitet. Dazu wurden 45,3 g KH_2PO_4 (MW 136,1 g/mol) und 116,1 g K_2HPO_4 (MW 174,2 g/mol) in circa 800 ml H_2O -Bideest gelöst, der pH-Wert auf 7,4 eingestellt, auf 1000 ml aufgefüllt und mit H_2O 1:10 verdünnt. Jeder Vertiefung wurde im darauffolgenden Schritt 100 µl β -NADH-Lösung zugefügt, die jeden Tag frisch hergestellt wurde [3 mg β -NADH, reduzierte Form (MW 709,4 g/mol)/10 ml 0,1 M LDH-Puffer]. Die Mikrotiterplatte wurde im nächsten Schritt in das Plattenlesegerät gestellt. Den Vertiefungen wurde nun 25 µl Pyruvatlösung zugefügt [1,25 g Na-Pyruvat (MW 110 g/mol)/500 ml 0,1 M LDH-Puffer] und diese sofort anschließend bei 340 nm Wellenlänge zehn Mal alle 20 Sekunden gemessen. Die Extinktionsabnahme bei 340 nm zeigte die Abnahme der Konzentration des Substrats β -NADH in dieser Zeit als annähernd lineare Funktion. Die negative Steigung dieser Funktion

konnte nun auf die Extinktionsabnahme der Standardlösung mit 500 Einheiten Aktivität (Sigma enzyme control 2-E) bezogen werden, so dass sich die LDH-Aktivitäten in Einheiten/ml Medium der Proben errechnen ließen.

3.6. Quantifizierung der Proteinexpression

3.6.1. Ernten der Zellen und Zelllyse

Die Zellen wurden aus den 24-Loch- bzw. 6-Loch-Zellkulturplatten mit einer umgedrehten Eppendorfpipettenspitze vom Boden der Plattenvertiefung gekratzt, in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und 3 Minuten mit 5000 Umdrehungen pro Minute bei 3°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet bei -80°C eingefroren.

Das Zellpellet wurde mit 50 µl Lyse-Puffer pro Vertiefung einer 6-Loch-Zellkulturplatte aufgelöst. Der Lyse-Puffer setzte sich aus folgenden Substanzen zusammen: 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl, pH 7,8, 1% Triton x-100 und Proteinase-Inhibitor-Cocktail (Boehringer-Mannheim, Deutschland).

Anschließend erfolgte die Zentrifugation mit 12.000 Umdrehungen pro Minute bei 4°C für 30 Minuten. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die Proteinkonzentration mit dem BCA-Protein-Assay von Pierce bestimmt (siehe 3.6.2.).

3.6.2. Proteinquantifizierung (BCA-Assay)

In die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wurde eine Standardreihe mit einer Albuminkonzentration von 1 mg/ml in Doppelbestimmung pipettiert. Es wurden also 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 15 und 20 µg Albuminstandardlösung pipettiert. Dabei entspricht der Leerwert 0 µl. Von der Probenlösung wurde jeweils 2 und 4 µl in Doppelbestimmung pipettiert und alle Vertiefungen mit 250 µl der BCA-Reaktionslösung versehen. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 36,5°C wurden die Extinktionen bei 550 nm im Plattenlesegerät gemessen. Die Extinktionswerte der Proben lagen immer im Bereich der Standardkurve und die Extinktionswerte waren in diesem Bereich proportional zur

Proteinkonzentration. Nach linearer Regressionsanalyse der Standardkurve konnten die Proteinwerte errechnet werden.

3.6.3. Gelelektrophorese, Western Blot und Visualisierung der Banden

Zuerst erfolgte die Verdünnung der Proben mit 2 x SDS-Probenpuffer (Laemmli-Puffer). Der SDS-Probenpuffer besteht aus: 2 ml 0,625 M Tris/HCl, pH 6,8; 0,2 g SDS; 5 ml Glycerin; 0,1 ml Bromphenolblau (1%ige Lösung in Ethanol); 2,4 ml H₂O-Bidest. Anschließend wurden die Proben mit frischem β -Mercaptoethanol in einer Konzentration von 1:20 versehen und drei Minuten im Wasserbad gekocht. Zur Gelelektrophorese wurde 10%iges-SDS Polyacrylamid-Minigel verwendet. Pro Slot wurden 10 μ g Protein aufgetragen und über 40 Minuten elektrophoretisch aufgetrennt. Auf einer halbtrockenen (semidry) Polyvinylidendifluoridmembran (PVDF-Membran) wurden die Proteine mit 1 mA pro cm² für 90 Minuten transferiert. Zum Blockieren unspezifischer Bindungen der Antikörper erfolgte die Inkubation der PVDF-Membran für eine Stunde mit 5% Trockenmilch in Tris-gepufferter Salzlösung mit Tween 20 (TBS-T-Puffer: 20 mM Tris/HCl, pH 7,5; 0,9% NaCl; 0,1% Tween 20). Die Inkubation der Primärantikörper wurde über Nacht in TBS-T-Puffer mit 1% Trockenmilch mit 0,02% Natrium-Azid durchgeführt. Alle verwendeten Primärantikörper waren monoklonale Maus-Antikörper (siehe Materialien und Ergebnisse). Danach wurde die Membran für eine halbe Stunde mit TBS-T-Puffer mit mehrmaligem Austausch des Puffers gewaschen. Die Sekundärantikörperinkubation erfolgte mit monoklonalen Maus-Antikörpern, die mit Meerrettichperoxidase gekoppelt waren. Die PVDF-Membranen wurden für eine Stunde in 1%iger Trockenmilch in TBS-T-Puffer mit dem Sekundärantikörper inkubiert (Titer 1:5000).

Anschließend wurde erneut eine halbe Stunde mit TBS-T-Puffer gewaschen. Die Detektion des Signals erfolgte mit einem ECL-Kit (enhanced chemiluminescence-Kit) und Röntgenfilmen.

3.6.4. Semiquantitative Analyse der Bandendichten

Für die semiquantitative Auswertung der Bandenintensitäten wurden die gescannten Immunoblotfilme mit dem Computerprogramm Tiff 16 Analysis (Dirk Megow, Berlin) gemessen und ausgewertet. Dazu wurden die Bandendichten von drei verschiedenen und unabhängigen Western-Blots und für die unterschiedlichen Proteine verglichen. Die Bandendichten der jeweiligen Gruppen wurden für jeden Film addiert und als Gesamtsignal als 100% Pixel-Intensität definiert, so dass die individuellen Banden als Prozentzahl des Gesamtsignals errechnet werden konnten.

3.7. Caspasen-Aktivitätsmessung

Die Zellen wurden wie unter 3.6.1. beschrieben geerntet. Das Zellpellet wurde mit 100 µl Lyse-Puffer pro Vertiefung einer 6-Loch-Zellkulturplatte aufgelöst und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Der Lyse-Puffer setzte sich aus folgenden Substanzen zusammen: 100 mM NaCl, 50 mM N-[2-Hydroxyethyl]-piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure (HEPES), 10 mM Dithiothreitol (DTT), 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), 10% Glycerol, 0,1% 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylamino]-1-propansulfonat (CHAPS), pH 7,4. Anschließend erfolgte die Zentrifugation mit 12.000 Umdrehungen pro Minute bei 4°C für 10 Minuten. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die Proteinkonzentration mit dem BCA-Protein Assay von Pierce bestimmt.

Für die Caspasenaktivitätsmessung wurden 20 µl einer jeden Probe in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert und alle Vertiefungen mit 80 µl Assay-Puffer und 2 µl Caspasesubstrat versehen. Als Leerwert wurden 80 µl Assay-Puffer und 2 µl Caspasesubstrat verwendet. Der Assay-Puffer setzte sich aus folgenden Substanzen zusammen: 100 mM HEPES, 10% Sucrose, 10 mM DTT, 0,5 mM EDTA, pH 7,5. Die Mikrotiterplatte wurde dann für 60 Minuten bei 37°C inkubiert und darauf im Fluoreszenzreader bei einer Exzitation/Emission von 380/460 nm gemessen.

3.8. Hoechst-Kernfärbung

Neuronale Primärkulturen wurden auf sterilen Deckplättchen in 24-Loch-Zellkulturplatten in einer Zelldichte von 180000 Zellen/Plättchen wie unter 2.1. beschrieben behandelt. Nach 11 DIV wurde den neuronalen Kulturen Corticosteron bzw. Vehikel zugegeben und 20 Stunden später AF64A. Am zu untersuchenden Zeitpunkt erfolgte die Absaugung des Mediums und die einmalige Spülung mit 1xPBS. Anschließend wurden die Zellen 15 Minuten mit 4% PFA fixiert, zweimal fünf Minuten mit 1xPBS gewaschen und 8,5 Minuten mit 0,1% Triton X-100 behandelt. Danach wurden die Kulturen zweimal fünf Minuten mit 1xPBS gespült und für fünf Minuten im Dunkeln unter Schütteln mit einer 1:10000 Verdünnung Hoechst (1mg/ml)-Lösung gefärbt. Nach der Färbung wurde wiederum mit 1xPBS gründlich gewaschen und die Plättchen auf Objektträger eingedeckt.

3.9. Statistik

Alle Daten wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) gezeigt. Es wurden zwei bis drei Experimente zusammengefasst. Dabei wurden die Rohdaten (zum Beispiel 35 LDH-Werte in Einheiten/ml Medium) zusammengefasst und erst anschließend die Kontrollwerte (basale LDH-Werte) zur besseren graphischen Darstellung in einigen Abbildungen abgezogen. Die basalen LDH-Werte sind in diesen Abbildungen in den Legenden jeweils angegeben. Zur statistischen Analyse wurde ein one-way ANOVA (one-way analysis of variance) mit dem Tukey-Test als posthoc-Test durchgeführt. Als statistisch signifikant wurden Werte mit $p < 0,05$ gekennzeichnet. Die einzelnen Werte für p sind in den Legenden gekennzeichnet.