

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Allgemein verwendete Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien und Puffer

Soweit nicht anders erwähnt, wurden Chemikalien mit höchstem Reinheitsgrad (p.a. Qualität) von den Firmen Roth (Karlsruhe), Sigma (München), Merck (Darmstadt) und Serva (Heidelberg) verwendet.

Phosphat gepufferte Saline (PBS):

137 mM NaCl  
2,7 mM KCl  
10,1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 1H<sub>2</sub>O  
pH 7,4 mit NaOH

#### 2.1.2 Wasserqualität

Alle Puffer und Lösungen wurden mit entionisiertem und zu 99 % gereinigtem Wasser angesetzt, für die Klonierungen wurde Wasser der Güte Milli-Q (Typ 1, National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)) verwendet.

*Milli-Q Anlage..... Millipore, USA*

#### 2.1.3 Geräte

##### 2.1.3.1 Zentrifugen

Kühlzentrifuge:

*Beckman J2-HS, JA-14 Rotor..... Beckman, USA*

Ultrazentrifuge:

*Beckman Optima TL ..... Beckman, USA  
mit Festrotor TLA 100.4*

Tischzentrifuge:

*Eppendorf, centrifuge 5417 .....Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg*

## 2.2 Klonierung

Für die Visualisierung der Sequenzen, der Auswahl der Primer und der Restriktionsschnittstellen wurde die Software DNASIS verwendet.

*MacDNASIS 03.02 .....Hitachi Software Engineering America, USA*

### 2.2.1 Ausgangssequenzen

Plasmide mit den vollständigen cDNA Sequenzen von Kir3.1 bis Kir3.4 wurden mir freundlicherweise von Dr. Andreas Karschin aus Göttingen zur Verfügung gestellt.

***Tabelle 2: Zusammenstellung der vier Ausgangsvektoren.***

	Kir3.1	Kir3.2	Kir3.3	Kir3.4
Accession Code	U01071	U24660	L77929	L47208
DNA stammt aus	<i>Rattus norvegicus</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	<i>Homo sapiens</i>
Original-DNA im Vektor	pSV-Sport 1	pSV-Sport 1	pSV-Sport 1	pSV-Sport 1
AS Länge	501	423	393	419

Um Antikörper zu erhalten, die zwischen den einzelnen Mitgliedern der Kir3 Familie unterscheiden können, wurden ihre variablen, cytoplasmatischen Carboxytermini für die Umklonierungen ausgewählt.

Jede carboxyterminale Sequenz wurde in 2 verschiedene Expressionssysteme mit unterschiedlichen Trägerproteinen einkloniert. Während das eine Fusionsprotein zur Immunisierung von Kaninchen und damit der Antikörpergenerierung diente, wurde das zweite Fusionsprotein für die spätere Aufreinigung des Antikörpers verwendet.

## 2.2.2 Primer

### **Tabelle 3: Umklonierung nach pGEX-4T-1**

Für die Umklonierung in den Expressionsvektor pGEX-4T-1 (Pharmacia Biotech, Schweden) und dem dafür notwendigen Einfügen neuer Schnittstellen wurden folgende Primer verwendet. Die eingefügten Erkennungssequenzen der Restriktionsendonucleasen sind unterstrichen.

	Kir3.1	Kir3.2	Kir3.3	Kir3.4
Aminosäurensequenz	352-501	365-424	329-376	375-419
neue 5' Schnittstelle	BamH I	BamH I	BamH I	BamH I
neue 3' Schnittstelle	EcoR I	EcoR I	EcoR I	EcoR I
Name und Sequenz des 5' Primers	Kir3.1- BamH I	Kir3.1- BamH I	Kir3.1- BamH I	Kir3.1- BamH I
	5' GCG <u>GGA TCC</u> CCC ACC CCT CCG TAC 24-mer (G5 C13 A3 T3)	5' ACC <u>GGA TCC</u> CCA TCC CTT AGT GCC AAA 27-mer (G4 C11 A7 T5)	5' GAG <u>GGA TCC</u> ACA CCC TCA TGC AGT GCT 27-mer (G7 C9 A6 T5)	5' GCG <u>GGA TCC</u> AAC ACA CCC AGC TGC 24-mer (G6 C10 A6 T2)
Name und Sequenz des 3' Primers	Kir3.1- EcoR I	Kir3.1- EcoR I	Kir3.1- EcoR I	Kir3.1- EcoR I
	5' CGC <u>GAA TTC</u> CTA TGT GAA GCG GTC 24-mer (G7 C6 A5 T6)	5' AGC <u>GAA TTC</u> ACT AAA CTT TGG ATT CAT 27-mer (G4 C5 A9 T9)	5' TGC <u>GAA TTC</u> TCA GCT CCA TCT CCT GCG 27-mer (G5 C10 A4 T8)	5' GCG <u>GAA TTC</u> TCA CAC CGA GCC CCT 24-mer (G5 C10 A5 T4)

**Tabelle 4: : Umklonierung nach pQE-40**

Für die Umklonierung in den Expressionsvektor pQE-40 (Quiagen, Hilden) und das Einfügen der neuen Schnittstellen wurden folgende Primer verwendet. Die Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonucleasen sind unterstrichen.

	Kir3.1	Kir3.2	Kir3.3	Kir3.4
Aminosäurensequenz	347-501	362-424	324-376	353-419
neue 5' Schnittstelle	Asp 718	Asp 718	Asp 718	Asp 718
neue 3' Schnittstelle	Sal I	Hind III	Hind III	Hind III
Name und Sequenz des 5' Primers	Kir3.1-Asp 718	Kir3.2-Asp 718	Kir3.3-Asp 718	Kir3.4-Asp 718
	5' TCC CAG TTC CAT <u>GGT ACC</u> TTT <u>GAA GTC</u> 27-mer (G5 C8 A5 T9)	5' TAT GAG ACC <u>GGT ACC CCA</u> <u>TCC CTT AGT</u> GCC 30-mer (G6 C11 A6 T7)	5' GCT AGC TTC CAT <u>GGT ACC</u> TTT <u>GAG GTG</u> 27-mer (G8 C6 A4 T9)	5' AAC ACC TTC CAT <u>GGT ACC</u> TAT GAG ACC 27-mer (G4 C9 A8 T6)
Name und Sequenz des 3' Primers	Kir3.1-Sal I	Kir3.2-Hind III	Kir3.3-Hind III	Kir3.4-Hind III
	5' TGG GGT <u>GGT</u> <u>CGA CTA TGT</u> GAA GCG GTC 27-mer (G12 C4 A4 T7)	5' AGA AGG GTT TGC <u>CAA GCT</u> <u>TGG GCA CTA</u> AAC 30-mer (G9 C6 A9 T6)	5' CCA TTT TGA <u>AGC TTG TCA</u> GCT CCA TCT 27-mer (G4 C8 A5 T10)	5' GCG <u>GAA GCT</u> <u>TCA CAC CGA</u> GCC CCT 24-mer (G6 C10 A5 T3)

### 2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist ein *in vitro* Verfahren zur spezifischen Amplifikation von DNA-Abschnitten.

Durch Erhitzung wird die als Matrize verwendete DNA-Helix in Einzelstränge zerlegt. Diese Einzelstränge können beim Abkühlen mit den im Überschuss zugegebenen spezifischen Oligonucleotiden hybridisieren. Die gegenläufig orientierten Oligonucleotide dienen als Startpunkte (Primer) für eine, den Einzelstrang auffüllende, thermostabile DNA-Polymerase. Um die Wahrscheinlichkeit falsch eingebauter Basen zu reduzieren, wurde die Pfu-Polymerase verwendet. Durch ihr 3'→5' „proofreading“ werden falsch eingebaute Basen korrigiert. Die neu synthetisierten Doppelstränge werden durch Hitze wieder in Einzelstränge zerlegt und der Zyklus beginnt wieder von vorn.

Der PCR Ansatz für 100 µl Reaktionsvolumen:

0,5µl	Plasmid DNA	(0,5 µg)
1,5µl	5' Primer	(150 µM)
1,5µl	3'Primer	(150 µM)
2,0µl	dNTP Mix	(25 mM)
10 µl	10x Puffer	
83,5µl	H <sub>2</sub> O	
Σ 99 µl Volumen		
+ 1 µl Pfu-Polymerase (2,5 U)		

Die Parameter der „hot start“ PCR:

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [Minuten]	Kommentar
1.	94	2	Denaturierung
2.	80	Pause	hot start, Zugabe der Polymerase
3.	56	0,5	Anlagerung der Primer annealing
4.	74	1	Elongation
5.	94	0,5	Termination
6.	zurück zu Punkt 3		25 Zyklen
7.	56	1	
8.	74	5	finale Elongation
9.	Raumtemperatur	∞	Ende

Acht verschiedene PCRs wurden durchgeführt. Die ersten vier dienten der späteren Umklonierung in den pGEX-4T-1 Vektor, die anderen vier wurden für die Umklonierung in das pQE-40 Expressionssystem benötigt.

Nr.:	Template	5' Primer	3' Primer
1.	Kir3.1	Kir3.1- BamH I	Kir3.1- EcoR I
2.	Kir3.2	Kir3.2- BamH I	Kir3.2- EcoR I
3.	Kir3.3	Kir3.3- BamH I	Kir3.3- EcoR I
4.	Kir3.4	Kir3.4- BamH I	Kir3.4- EcoR I
5.	Kir3.1	Kir3.1-Asp 718	Kir3.1-Sal I
6.	Kir3.2	Kir3.2-Asp 718	Kir3.2-Hind III
7.	Kir3.3	Kir3.3-Asp 718	Kir3.2-Hind III
8.	Kir3.4	Kir3.4-Asp 718	Kir3.2-Hind III

Die anschließende Reinigung der PCR Produkte von Primern, Nucleotiden und Polymerasen erfolgte mit dem „PCR Purification Kit“ von Qiagen anhand des dazugehörigen Protokolls.

<i>Thermocycler, Omn-E</i> .....	<i>Hybaid, USA</i>
<i>Pfu-Polymerase und 10 x Puffer</i> .....	<i>Stratagene, USA</i>
<i>dNTP Mix</i> .....	<i>Boehringer, Mannheim</i>
<i>(2'-Desoxyribonucleotid-5'-triphosphat, A, C, T, G)</i>	
<i>Primerhersteller</i> .....	<i>MWG-Biotech, Ebersberg</i>

#### 2.2.4 Schneiden von Vektor und Insert für die Ligation

Die Vektoren und die Inserts (PCR Produkte) wurden durch Doppelverdau mit Restriktionsenzymen für die Ligation passend geschnitten. Es wurden dafür Restriktionsenzyme und Puffer der Firmen Boehringer Mannheim und MBI Fermentas (Litauen) verwendet.

Der Vektor pGEX-4T-1 wurde mit BamH I und EcoR I aufgeschnitten, der Vektor pQE-40 mit Asp 718 und Sal I bzw. mit Asp 718 und Hind III. Für die Inserts wurden die PCR Produkte Nummer 1-4 mit BamH I und EcoR I, das PCR Produkt Nummer 5 mit Asp 718 und Sal I und die PCR Produkte Nummer 6-8 mit Asp 718 und Hind III geschnitten.

Alle enzymatischen Verdau fanden bei 37 °C in einem Volumen von 60 µl für eine Dauer von 2-12 Stunden statt. Anschließend wurde die geschnittene DNA mit dem „PCR Purification Kit“ von Qiagen nach den Anweisungen des Protokolls von Puffern und Restriktionsenzymen gereinigt.

### 2.2.5 Agarosegelelektrophorese

Um die Vollständigkeit der Verdauung zu kontrollieren, wurden die gereinigten und geschnittenen DNA Fragmente mit Agarosegelelektrophorese in 1 x TAE kontrolliert. In 1,2 %iger Agarose wurde der Vektor aufgetrennt, in 1,8 %iger Agarose die PCR Produkte. Als Marker wurde eine 1 kb bzw. 100 bp „Leiter“ verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei konstant 70 V, anschließend wurden die Gele in einem Ethidiumbromidbad für 20 (1,2 %ige Gele) bis 45 Minuten (1,8 %ige Gele) gebadet. Die Wirkung von Ethidiumbromid beruht auf der Interkalierung mit der DNA-Helix und ermöglicht durch UV-induzierte Fluoreszenz das Sichtbarmachen der DNA.

1 x TAE:

40 mM Tris-acetat  
1mM Na<sub>2</sub>EDTA  
pH 7,6  
in H<sub>2</sub>O

Ethidiumbromidbad:

0,5 µg/ml  
in H<sub>2</sub>O

*Agarose*..... *Biozym, Hess.Oldendorf*  
*Marker* ..... *MBI Fermentas, Litauen*  
*6 x Probenpuffer*..... *MBI Fermentas, Litauen*  
*Gelkammer*..... *Keutz Laborgeräte, Reiskirchen*  
*Netzteil, Power Pac 3000* ..... *Bio-Rad, USA*

### 2.2.6 DNA-Konzentrationsbestimmung

Für die Ligation war es wichtig, die genauen Konzentrationen von Vektor und Insert zu kennen. Es wurde deshalb die Extinktion bei 260 nm und 280 nm gegen H<sub>2</sub>O im Photometer gemessen, da dsDNA bei einer Konzentration von 50 µg/ml eine OD<sub>260nm</sub> von 1 hat. Das Verhältnis von OD<sub>260nm</sub> zu OD<sub>280</sub> erlaubte zusätzlich eine Information über den Reinheitsgrad der DNA, ein Quotient von 1,8 und größer entspricht sehr reiner DNA.

*UV-Photometer UV-1202 UV-VIS*..... *Shimadzu, Japan*

### 2.2.7 Ligation

Die Ligation der DNA Fragmente mit T4 DNA Ligase wurde bei 15 °C in einem Volumen von 20 µl über Nacht durchgeführt. Das molare Verhältnis von Vektor zu Insert betrug 1:5.

*T4 DNA Ligase und 10 x Puffer.....MBI Fermentas, Litauen*

### 2.2.8 Herstellung kompetenter Bakterien

Für den Expressionsvektor pGEX-4T-1 wurde der Bakterienstamm DH5α und für den Expressionsvektor pQE-40 der Bakterienstamm XL1-Blue verwendet.

Stamm	Genotype
DH5α:	supE44 ΔlacU169 (Φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1gyrA96 thi-1 relA1
XL1-Blue:	supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lacF'[proAB <sup>+</sup> lacI <sup>q</sup> lacZΔM15 Tn10(tet <sup>r</sup> )]

Zur Herstellung kompetenter Bakterien wurde eine Vorkultur in 20 ml LB Medium überimpft und bis zur log-Phase, bei einer OD<sub>600nm</sub> von 0,4 bis 0,6 bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert und dann für 10 Minuten bei 5000 × g und 4 ° C abzentrifugiert. Die Pellets wurden in 20 ml eiskalter, autoklavierter CaCl<sub>2</sub> Lösung resuspendiert und für mindestens 1 h auf Eis stehen gelassen. Nach einer erneuten Zentrifugation für 10 Minuten bei 5000 × g und 4 ° C wurden die Bakterien in 2 mal 1 ml CaCl<sub>2</sub> Lösung resuspendiert und für 12 bis 48 h auf Eis gelagert.

CaCl<sub>2</sub> Lösung:

70 mM CaCl<sub>2</sub>  
10 mM Tris  
pH 8,0



### 2.2.9 Transformation

Jeweils 100 µl kompetenter Bakterien wurden mit den 20 µl eines Ligationsansatzes für 45 Minuten auf Eis inkubiert und nur einmal während dieser Zeit vorsichtig geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen für 90 Sekunden in einem Wasserbad einem Hitzeschock von 42 °C ausgesetzt und sofort wieder 1-2 Minuten lang in Eis abgekühlt. Für 45 Minuten wurden die Zellen bei 37 °C mit jeweils 1 ml LB mit langsamen Schütteln inkubiert und pelletiert.

Von den Pellets wurden 100 bzw. 10 µl auf LB Agaroseplatten mit 75 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

*Ampicillin-Natrium*..... *Grünenthal, Stolberg*

*LB Agar*..... *Life Technologies, Scotland*

*LB Broth Base*..... *Life Technologies, Scotland*

### 2.2.10 Suche nach positiven Klonen

Von den gewachsenen Klonen auf den LB Agaroseplatten wurden zur analytischen Plasmidisolierung mehrere Klone gepickt und in jeweils 4 ml LB mit 75µg/ml (LB<sub>Amp</sub>) Ampicillin über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Zwei der 4 ml wurden zur Plasmidisolierung gebraucht, die mit dem „QIAprep SpinPlasmid Kit“ von Qiagen und nach dem dazugehörigen Protokoll erfolgte.

Die gereinigte Plasmid DNA wurde einem analytischen Doppelverdau an den Schnittstellen unterzogen, die auch für die Ligation verwendeten wurden. Anschließend erfolgte eine Agarosegelelektrophorese Auftrennung.

Alle positiven Klone, aus denen die DNA Sequenz für den Carboxyterminus des Kir Proteins wieder ausgeschnitten werden konnte, wurden anschließend auf ihre Fähigkeit zur Expression des Fusionsproteins hin getestet.

### 2.2.11 Analytische Proteinexpression

Die laut Restriktionsverdau positiven Klone wurden zur analytischen Proteinexpression in jeweils 2 ml LB<sub>Amp</sub> bei 37 °C auf dem Schüttler über Nacht inkubiert, davon wurde 1 ml in 5 ml LB<sub>Amp</sub> überimpft und bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,5 kultiviert. Die zweistündige Proteinexpression wurde

mit 1 mM IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid) induziert. 1 ml der Kultur wurde dann für eine Minute bei  $20000 \times g$  pelletiert und mit 5  $\mu$ l Probenpuffer für 3 Minuten auf  $95^\circ \text{C}$  aufgeköcht, kurz abzentrifugiert und mit 10  $\mu$ l pro Tasche auf ein SDS-PAGE Gel (siehe Kapitel 2.2.13 auf dieser Seite) aufgetragen.

Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden danach mit der Comassi-blau-Färbelösung angefärbt. Dafür kam das in der Färbelösung schwimmende Gel in eine Mikrowelle, wurde bei 500 W für 3 Minute aufgeköcht und anschließend mehrmals mit heißem Wasser so lange entfärbt, bis nur noch die Proteinbanden sichtbar waren.

Comassi-Blau Färbelösung:

500 mg Serva blue R  
250 ml Ethanol (100 %)  
50 ml Essigsäure (100 %)  
ad 500 ml mit  $\text{H}_2\text{O}$   
→ filtriert

### 2.2.12 DNA Sequenzierung

Es wurden die DNAs derjenigen Klone überprüft, deren Sequenzen als translatiertes Fusionsprotein zur späteren Immunisierung dienen sollten. Die umklonierten DNA Sequenzen wurden auf Leserasterverschiebungen und auf Basenaustausche, die zu Veränderungen in der Aminosäuresequenz oder zu einem verfrühten Abbruch der Translation führten, kontrolliert. Die Sequenzierung mit dem Kettenabbruch-Verfahren nach Sanger unter der Verwendung von  $^{35}\text{S}$  wurde freundlicherweise von A. Thomzig aus unserer Arbeitsgruppe durchgeführt.

### 2.2.13 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteine wurden elektrophoretisch nach der Methode von Laemmli (1970) in denaturierenden, diskontinuierlichen SDS-PAGE Gelen aufgetrennt. In der Regel wurden 12 %ige Acrylamid Trenngele verwendet, die Maße der Trenngele betragen  $90 \times 55 \times 0,75 \text{ mm}$ . Für die Taschen wurden Käbme mit 10 oder 15 Zähnen verwendet, wegen der verzerrenden Randeefekte blieben die äußersten Taschen stets leer.

Die Proben wurden mit dem Probenpuffer für 3 Minuten auf 95 ° C erhitzt, wieder abgekühlt und anschließend mit Hamilton-Spritzen auf das Gel aufgetragen. Bei konstant 20 mA pro Gel dauerte die Elektrophorese ca. 90 Minuten.

Als Marker wurden ein LMW (Low Molecular Weight) Molekulargewichtsstandard von 14,4 bis 94 kDa und ein Marker mit farbig markierten Proteinen (rainbow coloured protein) von 14,3 bis 220 kDa verwendet.

	Trenngel, 12 %	Sammelgel, 4 %
Tris I/II	2 ml Tris I	1 ml Tris II
Acrylamid (30 %)	3,2 ml	0,534 ml
Bisacrylamid (2 %)	1,28 ml	0,214 ml
H <sub>2</sub> O	1,52 ml	2,252 ml
Ammoniumpersulfat (10 %)	75 µl	40 µl
TEMED	8 µl	5,2 µl

4 x Sammelgelpuffer (Tris I):

60,5 g/l Tris  
4,0 g/l SDS  
pH 6,8 mit HCl

4 x Trenngelpuffer (Tris II):

181,7 g/l Tris  
4,0 g/l SDS  
pH 8,8 mit HCl

4 x Laemmli-Probenpuffer:

10 % (w/v) β-Mercaptoethanol  
4 % (w/v) SDS  
2 % (w/v) Bromphenolblau  
20 % (w/v) Glycerol  
250 mM Tris  
pH 6,8 mit HCl

1 x Laufpuffer:

0,3 % Tris/HCl  
1,44 % Glycin  
0,1 % SDS

*Elektrophoresekammer* - ..... *Bio-Rad, USA*  
*Mini-Protean II*

*LMW Standard*..... *Pharmacia Biotech, Schweden*

*Netzteil, Power Pac 3000* ..... *Bio-Rad, USA*

*rainbow coloured protein* ..... *Amersham Life Science, UK*  
*molecular weight marker*

*TEMED (N,N,N',N', -* ..... *Bio-Rad, USA*  
*Tetramethylethyldiamin)*

### 2.2.14 Western Blot und Immundetektion

Aus dem Polyacrylamidgel wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran eluiert. Zum Transferieren der Proteine aus dem Gel auf die Membran wurde Semidry Blotpuffer verwendet und ein Strom von konstant 0,3 A bei einer Zeitdauer von 15-20 Minuten angelegt.

Die Proteine auf der Nitrozellulosemembran wurden für 4 Minuten in der Ponceau-Rot Färbelösung gefärbt und mit H<sub>2</sub>O wieder soweit entfärbt, bis die einzelnen Proteinbanden sichtbar waren.

Die Nitrozellulosemembran wurde anschließend entlang der einzelnen Laufspuren in Streifen zerschnitten und für eine Stunde bei Raumtemperatur in der Blockierungslösung inkubiert. Diese und alle weiteren Inkubationen und Waschschrte wurden auf einem Schüttler durchgeführt.

Die Inkubation mit dem primären Antikörper, in der Blockierungslösung verdünnt, erfolgte über Nacht bei 4 °C.

Nach kurzem Waschen in PBS und anschließend in TBS wurde der gebundene Erstantikörper bei einer dreistündigen Inkubation durch einen mit alkalischer Phosphatase gekoppelten Zweitantikörper gegen Kaninchen (aP-GaR) markiert. Zur Visualisierung wurden dann die kurz im TBS gewaschenen Blotstreifen in der Färbelösung unter Sichtkontrolle für 10 bis 20 Minuten inkubiert.

#### Semidry Blotpuffer:

48 mM Tris  
386 mM Glycin  
0,037 % SDS  
20 % Methanol  
in H<sub>2</sub>O

#### Ponceau-Rot:

2,6 mM Ponceau S  
184 mM Trichloressigsäure  
in H<sub>2</sub>O

## TBS Puffer:

100 mM Tris  
150 mM NaCl  
in H<sub>2</sub>O  
pH 7.4 mit HCl

## Blockierungslösung:

0,1 % Tween-20  
5,0 % Magermilchpulver  
in PBS

## NBT Lösung:

75 mg NBT (Nitroblautetrazoliumchlorid)  
700 µl N,N-Dimethylformamid  
auf 1 ml mit H<sub>2</sub>O  
bei -20 °C lagern

## BCIP Lösung:

50 mg BCIP(5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl-  
phosphat)  
auf 1 ml mit N,N-Dimethylformamid  
bei -20 °C lagern

## Zweitantikörperlösung:

0,1 % Tween-20  
5,0 % Magermilchpulver  
1:1000 aP-GaR  
in TBS

## Färbelösung:

1 ml Tris 1M pH 9,5  
50 mM MgCl  
150 mM NaCl  
50 µl NBT  
37,5 µl BCIP  
auf 10 l mit H<sub>2</sub>O

*Semidry Transfer Kammer* - ..... *Bio-Rad, USA*  
*Trans-Blot SD*

*Netzteil, Power Pac 200* ..... *Bio-Rad, USA*

*aP-GaR*..... *Vector, USA*

*Nitrozellulosemembran, Protran*..... *Schleicher&Schüll, Dassel*

*Magermilchpulver, Glücksklee*..... *Nestle, Schweiz*

### 2.2.15 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der BCA (Bicinchonin Säure) Methode (nach Smith et al., 1985). Es erfolgten stets Doppelbestimmungen. Als Standard wurde in PBS verdünntes BSA (Rinderserum-Albumin) in den 3 Konzentrationen 50, 100 und 200 µg/ml eingesetzt. 40 µl jeder Standardverdünnung, des PBS Leerwertes und der angemessen verdünnten Probe wurden mit 400 µl der BCA Lösung vermischt und für 30 Minuten bei 60 °C inkubiert. Nach Abkühlung

wurden die Lösungen auf eine 96er Mikrotiterplatte pipettiert und die Extinktionen konnten bei 550 nm im ELISA Photometer (siehe Kapitel 2.3.3, Seite 40) bestimmt werden.

Lösung A:

25,8 mM 4,4'-Dicarboxy-2,2'-Biquinolin-Dinatriumsalz  
7 mM di-Natriumtartrat-Dihydrat  
100 mM NaOH  
113 mM NaHCO<sub>3</sub>  
160 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>  
in H<sub>2</sub>O  
pH 11,25

Lösung B:

160 mM CuSO<sub>4</sub>  
in H<sub>2</sub>O

BCA Lösung:

50 Volumenteile Lösung A  
1 Volumenteil Lösung B

*96er Mikrotiterplatte ..... Becton Dickinson, USA*  
*Microtest 96 Falcon*

## 2.2.16 Präparative Proteinexpression

Mit der präparativen Proteinexpression konnten aus 3 l Bakteriensuspension bis zu 10 mg Fusionsprotein unter nativen Bedingungen gewonnen werden.

Beim Expressionsvektor pGEX-4T-1 stammte das Trägerprotein GST (Gluthation-S-Transferase) aus dem Trematoden *Schistosoma japonicum*. Beim Expressionsvektor pQE-40 stammte das Trägerprotein DHFR (Dihydrofolat-Reduktase) aus der Maus *Mus musculus*. Es ist über eine Kette von 6 Histidinresten mit dem Fusionsanteil gekoppelt.

### 2.2.16.1 Reinigung der GST-Fusionsproteine

Die Reinigung der GST-Fusionsproteine erfolgte mit Gluthation-Sepharose nach dem Protokoll von Pharmacia Biotech, Schweden.

### 2.2.16.2 Reinigung der DHFR-Fusionsproteine

Die Reinigung der DHFR-Fusionsproteine erfolgte über die Histidinreste mit Nickel-NTA (Nitrilotriacetic acid, Nitrilotriessigsäure) Agarose nach dem Protokoll von Quiagen, Hilden.

### 2.2.16.3 Präparative Gelelektrophorese

Als letzter Reinigungsschritt wurden die Fusionsproteine elektroeluiert. Die Fusionsproteine wurden in 9 % igen Acrylamid Trenngelen aufgetrennt, mit Comassi-blau-Färbelösung angefärbt und aus dem Gel ausgeschnitten. Die zerkleinerten Polyacrylamid-Gelstückchen wurden dann in eine Tasche der Elektroelutionskammer überführt und über Nacht bei konstant 100 V eluiert.

Elutionspuffer:

25 mM Tris  
192 mM Glycin  
0,025 % SDS

*Elektroelutionskammer, S&S Biotrap.....Schleicher&Schüll, Dassel*  
*Maxigelkammer, Protean Iixi Cell .....Bio-Rad, USA*

## **2.3 Gewinnung der Antikörper**

### **2.3.1 Immunisierung der Kaninchen**

Polyklonale Antikörper gegen die aus dem Trägerprotein Gluthation-S-Transferase und dem Carboxyterminus des Kir Kanalproteins (Kir3.1 bis Kir3.4) bestehenden Fusionsproteine wurden in 4 bis 5 Monate alte Kaninchen der Rasse „Weißer Neuseeländer“ erzeugt. Pro Fusionsprotein wurden zwei Kaninchen mit 80 µg bzw. 160 µg immunisiert und im dreiwöchigen Rhythmus 3 mal nachimmunisiert (boostern). Die Fusionsproteinlösungen waren zur Homogenisation vor Gebrauch mehrmals durch eine G22 Kanüle gepresst worden.

Auf dem geschorenen Rücken der Tiere wurden die intrakutanen Injektionen auf 4 bis 5 Depots verteilt.

35 Tage nach der Immunisierung begann für eine Zeitdauer von 10 Wochen die wöchentliche Blutabnahme, bei der jeweils 30 ml Blut aus dem Kaninchenohr entnommen wurde.

Immunisierungslösung:

1,25 ml Freund's Adjuvants Complete  
400 µg AG  
ad 2 ml mit PBS

Nachimmunisierungslösung:

1,25 ml Freund's Adjuvants Incomplete  
400 µg AG  
ad 2 ml mit PBS

### **2.3.2 Aufarbeitung des Blutes**

Das Rohserum, das sich bei der Gerinnung des Blutes über Nacht bei 4 °C vom Blutkuchen abtrennte, wurde bei 1000 × g abzentrifugiert, für 60 Minuten bei 56 °C zur Inaktivierung von Proteasen inkubiert, danach aliquotiert und bei – 80 °C gelagert.



### **2.3.3 Detektion der spezifischen Antikörper (ELISA Test)**

#### **2.3.3.1 Allgemein**

Zur Detektion der spezifischen Antikörper wurde der indirekte ELISA Test (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) angewandt.

Auf einer 96er ELISA-Mikrotiterplatte wurde in den Vertiefungen jeweils 100 µl des mit einer Konzentration von 1 µg/ml im Beschichtungspuffer gelösten Antigens pipettiert und über Nacht inkubiert. Als Standard wurde in einer Reihe der Vertiefungen auf der Platte Kaninchen IgG in den Konzentrationen 5, 25 und 100 µg/ml pipettiert. Alle Inkubationen erfolgten bei Raumtemperatur und stets wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Am nächsten Tag wurden alle restlichen Bindungskapazitäten an den Wänden der Vertiefungen der Mikrotiterplatte durch eine Inkubation für 1 Stunde mit 150 µl Nachbeschichtungslösung pro Vertiefung abgesättigt. Anschließend wurde mit jeweils 200 µl ELISA-Waschpuffer gewaschen und mit jeweils 100 µl des in der Nachbeschichtungslösung verdünnten Antikörpers für eine Zeitdauer von mindestens 2 Stunden inkubiert.

Nach dieser zweistündigen Inkubation wurde mit jeweils 200 µl PBS gewaschen. Der gebundene Erstantikörper konnte dann durch einen mit Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper gegen Kaninchen (P-GaR) markiert werden. Die Inkubationszeit der 100 µl Zweitantikörperlösung pro well betrug eine Stunde.

Nach erneutem Waschen mit PBS wurde 100 µl der Inkubationslösung für 5 Minuten dazu pipettiert, die enzymatische Aktivität der Peroxidase wurde mit der Stopplösung beendet und die Extinktion bei 405 nm gegen 630 nm im ELISA Photometer bestimmt.

#### **2.3.3.2 Speziell: Der kompetitive ELISA Test**

Bei einem kompetitiven ELISA Test wird der passend verdünnte Antikörper zuvor mit einer Verdünnungsreihe eines Proteins über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Diejenigen der Antikörper, welche das Protein binden, stehen für den anschließenden ELISA Test nicht mehr zur Verfügung (können nicht mehr an der beschichteten Platte binden).

Beschichtungspuffer:	ELISA-Waschpuffer (EWB):
50 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> in H <sub>2</sub> O pH 9,5 mit HCl	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 1 H <sub>2</sub> O 150 mM NaCl 0,05 % Tween 20 3 mM NaN <sub>3</sub> in H <sub>2</sub> O pH 7,2 mit 10 N NaOH
Nachbeschichtungslösung:	Zweitantikörperlösung:
1mg/ml Hämoglobin in EWB	1mg/ml Hämoglobin in PBS 1:1000 P-GaR
Inkubationspuffer:	ABTS-Stammlösung:
50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 1 H <sub>2</sub> O 100 mM CH <sub>3</sub> COONa x 3 H <sub>2</sub> O in H <sub>2</sub> O pH 4,2 mit HCl	100 mg ABTS (2,2'-Azino-bis-[3-ethylbezthiazolin-6-Sulfonsäure] di-Ammoniumsalz 10 ml Inkubationspuffer
Inkubationslösung:	Stoplösung:
9 ml Inkubationspuffer 1 ml ABTS-Stammlösung 1 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30 %)	15 mM NaN <sub>3</sub> in PBS

*ELISA-Mikrotiterplatte, Falcon3912 .....Becton Dickinson, USA*  
*MicroTest III Flexible Assay Plate*

*ELISA Photometer, Dynatech MR 5000 .....Dynatech Laboratories, USA*

*P-GaR .....Vector, USA*

## **2.4 Aufreinigung der Antikörper**

Mit jedem Antigen waren zwei Tiere immunisiert worden. Zur Antikörperaufreinigung wurde das Serum desjenigen Tieres genommen, welches die höhere Immunantwort aufwies. Das Rohserum der einzelnen Blutabnahmen mit vergleichbarem Antikörpertiter wurde gepoolt und von diesem Pool wurden für einen Reinigungsansatz jeweils 2,5 ml genommen.

### **2.4.1 Entfernung der IgM**

Für die Entfernung der IgM wurden die AK mit einer Peristaltikpumpe durch eine Superdex-Säule gepumpt, in der sie nach Größe aufgetrennt wurden. Die kleineren IgGs wanderten langsamer durch die Säule, als die größeren IgMs. Der Durchlauf wurde in Fraktionen gesammelt und der Gesamtproteingehalt des Durchlaufes nach der Säulenpassage von einem Photometer kontinuierlich gemessen und mit einem Schreiber protokolliert. Die IgG-reichen Fraktionen wurden mit dem ELISA Test (siehe Kapitel 2.3.3, Seite 40) bestimmt, gepoolt und für die weitere Aufreinigung auf 25 ml aufgefüllt. Die Antikörper befanden sich damit in einer, bezogen auf das Rohserum, 1:10 Verdünnung.

*Fraktionssammler FC 203 B..... Abimed Gilson, USA*

*Peristaltikpumpe Minipuls 3..... Abimed Gilson, USA*

*Photometer 112, UV/VIS Detecor..... Abimed Gilson, USA*

*Säule Superdex 200 prep grade..... Pharmacia Biotech, Schweden*

*Schreiber BD 111..... Kipp & Zonen / Sci-Tec Instruments, Kanada*

### **2.4.2 Entfernung der Kreuzreaktivität gegen das Trägerprotein**

Für die Entfernung der Kreuzreaktivität gegen das Trägerprotein und bakterielle Oberflächenantigene wurde ein unlösliches pGEX-Bakteriensediment hergestellt, mit dem die entsprechenden Antikörper herausgefangen und abzentrifugiert wurden (Gruber und Zingales, 95; Pompeia et al, 96).

### 2.4.2.1 Herstellung eines pGEX-Bakteriensediments

Eine Bakterienkultur mit dem Plasmid für den Expressionsvektor pGEX-4T-1 wurde kultiviert, mit 0,1 mM IPTG zur Expression des reinen Trägerproteins GST (Gluthation-S-Transferase, ohne Fusionsanteil) induziert und bei  $4000 \times g$  für 15 Minuten pelletiert. Die Pellets wurden in PBS aufgenommen und in zwei gleiche Teile geteilt. Der eine Teil wurde bei 121 °C für eine Stunde autoklaviert, der andere Teil zur gleichen Zeit mit 0,5 % Formaldehyd bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurden die beiden Teile wieder vereinigt, dreimal mit PBS gewaschen und in ELISA-Waschpuffer (siehe Kapitel 2.3.3, Seite 41) mit 1mg/ml Hämoglobin aufgenommen.

### 2.4.2.2 Entfernung der Kreuzreaktivität gegen das Trägerprotein

Um die Kreuzreaktivität gegen das Trägerprotein zu entfernen, wurde das in der Verdünnung 1:10 vorliegende Serum mit der pGEX-Bakteriensuspension im Verhältnis 2:1 für 60 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Die gegen das Trägerproteins GST und bakterielle Proteine gerichteten Antikörper wurden herausgefangen und gemeinsam mit der Bakteriensuspension bei  $4000 \times g$  für 15 Minuten abzentrifugiert.

### 2.4.3 Entfernung der Kreuzreaktivität gegen andere Kir

Es wurde von jedem Serum die Kreuzreaktivität gegen alle anderen Kir3.X Fusionsproteine mit dem ELISA Test (siehe Kapitel 2.3.3 auf Seite 40) bestimmt. Das Fusionsprotein, gegen welches die höchste Kreuzreaktivität existierte, wurde zur Aufreinigung ausgewählt.

Zur Entfernung der Kreuzreaktivität wurden vier Nitrozellulosemembranen (siehe Seite 36) mit einer Oberfläche von jeweils  $100 \text{ cm}^2$  mit je 20 ml des entsprechenden Fusionsproteins ( $5 \mu\text{g/ml}$  PBS) über Nacht beladen. Die restliche Bindungskapazität der Membranen wurde mit 5 % Ziegen Serum (siehe Seite 50) in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Diese und alle weiteren Membraninkubationen wurden auf einem Schüttler durchgeführt. Die Membranen wurden mit dem angemessen verdünnten Serum (die optimale Verdünnung des Serums, die zwischen 1:100 und 1:200 lag, war in einem Vorversuch ermittelt worden) drei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Der auf diese Art von Kreuzreaktivität gereinigte Überstand wurde weiterverwendet.

#### 2.4.4 Affinitätsreinigung der Antikörper

Die Affinitätsreinigung erfolgte ebenso wie die Entfernung der Kreuzreaktivität an Nitrozellulosemembranen. Die Affinitätsreinigung fand mit dem Fusionsanteil desjenigen Kir Kanalproteins statt, der für die Immunisierung verwendet worden war. Es wurde dabei jedoch das alternative Trägerprotein DHFR verwendet. Vier Nitrozellulosemembranen mit einer Fläche von jeweils 100 cm<sup>2</sup> (siehe oben) wurden mit dem entsprechenden Protein beladen. Die restlichen Proteinbindungskapazitäten wurden blockiert und die so vorbereiteten Membranen mit dem kreuzgereinigten Serum inkubiert (siehe oben). Die gebundenen AK wurden mit dem Elutionspuffer für 30 Minuten bei Raumtemperatur eluiert und gegen 20 mM Phosphatpuffer pH 6,0 über Nacht dialysiert.

Elutionspuffer:

200 mM Glycin  
150 mM NaCl  
1 mg/ml BSA (Rinderserum-Albumin)  
in H<sub>2</sub>O  
pH 2,0

#### 2.4.5 Chromatofokussierung

Voraussetzung für die spätere Einengung der Antikörper war die Bestimmung ihres isoelektrischen Punktes. Die Bestimmung des isoelektrischen Punktes durch Chromatofokussierung erfolgte mit einer selbst hergestellten Säule, für die eine Pasteurpipette verwendet wurde. Als Säulenmaterial wurde der Anionenaustauscher PBE 94 verwendet. Die Beladung der Säule mit einer Probe des gereinigten Antikörpers erfolgte bei einem pH-Wert deutlich oberhalb des geschätzten isoelektrischen Punktes, so dass die negativ geladenen Antikörper an den positiven Gruppen des Säulenmaterials hängen blieben. Mit einem pH-Wert unterhalb des vermuteten Punktes wurden die nun positiv geladenen Antikörper eluiert und in Fraktionen gesammelt. Da sich bei der Elution in der Säule ein kontinuierlich abfallender pH Gradient einstellte, konnte aus der Messung der pH-Werte der aufgefangenen Fraktionen und der gleichzeitigen Detektion ihrer Antikörperkonzentration (ELISA Test siehe Kapitel 2.3.3 auf Seite 40) der isoelektrische Punkt bestimmt werden.

Beladungspuffer:

25 mM Ethanolamin  
in H<sub>2</sub>O  
pH 9,4

Elutionspuffer:

Polybuffer 96-CH<sub>3</sub>COOH  
1:10 in H<sub>2</sub>O  
pH 6,0

*PBE 94, Polybuffer exchanger .....Pharmacia, Schweden  
for chromatofocussing*

*Polybuffer 96-CH<sub>3</sub>COOH.....Pharmacia, Schweden*

### 2.4.6 Einengung der Antikörper

Die Einengung erfolgte mit einer selbst hergestellten Säule, siehe Kapitel 2.4.5. Als Säulenmaterial diente SP-Sepharose, dessen Sulfopropylgruppen oberhalb eines pH 2 negativ geladen sind. Das Prinzip der Einengung nutzt den isoelektrischen Punkt der IgGs, der bei den Antikörpern aus den Kaninchenserum bei einem Wert von ca. 7,4 lag. Die Säule wurde mit den in 20 mM Phosphatpuffer pH 6,0 verdünnten Antikörpern über Nacht beladen. Bei diesem pH Wert, unterhalb des isoelektrischen Punktes, verblieben die positiv geladenen Antikörper in der Säule. Eluiert wurden sie in 200 µl Fraktionen mit einem Elutionspuffer oberhalb des isoelektrischen Punktes, in diesem pH Bereich liegen die Antikörper negativ geladen vor. Die Fraktionen mit den eluierten Antikörpern wurden mit dem ELISA Test (siehe Kapitel 2.3.3, Seite 40) bestimmt, gepoolt und auf 2,5 ml aufgefüllt. Somit befanden sich die Antikörper wieder in dem Volumen, dass am Anfang zur Aufreinigung eingesetzt worden war.

Elutionspuffer:

200 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>  
in H<sub>2</sub>O  
pH 9,0

*SP-Sepharose Fast flow .....Pharmacia, Schweden*

## 2.5 Gewinnung der Rattenhirngewebe für die Immuncytochemie

### 2.5.1 Perfusionsfixierung der Rattengehirne

Die mit Ether betäubten 2 bis 3 Monate alten Wistar-Ratten wurden mit einer Kombination von Rompun (10 µl), Heparin (1 µl pro 1 g Körpergewicht) und Ketamin (2 µl pro 1 g Körpergewicht) betäubt. Spätestens ein bis zwei Minuten nach der Eröffnung des Thorax begann die intracardiale Perfusionsfixierung durch den linken Ventrikel mit einer physiologischen Vorspüllösung (Longasteril 70).

#### Ablauf der Perfusionsfixierung:

	Zeitdauer [Minuten]	Druck [torr]
Vorspüllösung	10 Sekunden	250
Fixierungslösung	5	250
Fixierungslösung	20	10-20
Nachspüllösung	5	150

#### Fixierungslösung:

4 % Paraformaldehyd  
 0,05 % Glutaraldehyd  
 0,15 % Pikrinsäure  
 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 1H<sub>2</sub>O  
 in H<sub>2</sub>O  
 pH 7,4

#### Nachspüllösung:

146 mM Saccharose  
 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 1H<sub>2</sub>O  
 in H<sub>2</sub>O  
 pH 7,4

*Heparin-Natrium-2500-ratiopharm..... Ratiopharm, Ulm*

*Ketamin-50-Curamed (50mg/ml)..... Curamed Pharma, Karlsruhe*

*Longasteril 70 (mit Elektrolyten)..... Fresenius, Bad Homburg*

*Rompun 2 %..... Bayer, Leverkusen*

### 2.5.2 Präparation und Zerteilung der Rattengehirne

Die Köpfe der perfusionsfixierten Ratten wurden in der Nachspüllösung über Nacht bei 4 °C gelagert. Anschließend wurden die aus den Schädeln frei präparierten Rattengehirne in 2% ige Agaroseblöcke eingegossen und mit einer Rasierklinge in 2 bis 3 mm dicke Scheiben transversal zerschnitten. Anschließend kamen die Scheiben in die Gefrierschutzlösung, in der sie, durchtränkt vom Gefrierschutz, auf den Boden absanken, bevor sie in auf - 60 °C gekühltes Hexan schockgefroren wurden und bei - 80 °C gelagert werden konnten.

Gefrierschutzlösung:

800 mM Saccharose  
100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 1H<sub>2</sub>O  
in H<sub>2</sub>O  
pH 7,4

2% Agarose:

2% Agarose  
in Nachspüllösung

### 2.6 Gewinnung von Rattenhirnhomogenaten für Western-Blots

Zur Gewinnung von Hirnhomogenaten wurden die Ratten mit Ether betäubt und dekapitiert. Die Gehirne wurden auf Eis herauspräpariert und anschließend gewogen. Sowohl die Homogenisation als auch die folgenden Zentrifugationen erfolgten bei 4 °C. Die Homogenisation wurde in einem Dounce Homogenisator (900 rpm, 5 Minuten) mit 2 ml Homogenisationspuffer pro 1 g Gehirn durchgeführt. Nach der ersten Zentrifugation bei 660 × g für 10 Minuten wurde der postnucleäre Überstand in einer Ultrazentrifuge bei 100000 × g für 45 Minuten pelletiert, mit Homogenisationspuffer resuspendiert und bei - 20 °C gelagert. Die anschließende Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der in Kapitel 2.2.15 auf Seite 36 angegebenen BCA Methode.

Homogenisationspuffer:

250 mM Sucrose  
1 mM Imidazol  
1 mM EDTA  
5 mM NaN<sub>3</sub>

+unmittelbar vor Gebrauch als Proteinaseinhibitoren:  
1 µg/ml Aprotinin  
1 µg/ml Pepstatin A  
1 µg/ml Leupeptin  
1mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfourid)



---

<i>Aprotinin</i> .....	<i>Boehringer, Mannheim</i>
<i>Leupeptin</i> .....	<i>Boehringer, Mannheim</i>
<i>Pepstatin A</i> .....	<i>Boehringer, Mannheim</i>

## **2.7 Immuncytochemie**

### **2.7.1 Immuncytochemie für die Lichtmikroskopie**

#### **2.7.1.1 Schneiden**

Für die lichtmikroskopische Immuncytochemie wurden in einem Kryostaten Scheiben von 20 µm Dicke geschnitten. Das zu schneidende Gewebe war mit Einbettungsmedium auf dem Probenteller fixiert und wurde in der Regel bei einer Kammertemperatur von - 24 °C und einer Gewebetemperatur von - 21 °C in Scheiben geschnitten. Die Schnitte kamen in die mit PBS gefüllten Vertiefungen einer Gewebekulturplatte und wurden bei 4 °C gelagert. Noch am selben Tag begann die anschließende Färbung der Schnitte.

<i>Kryostat 2800 Frigocut-E</i> .....	<i>Reichert-Jung, Nussloch</i>
<i>Einbettungsmedium</i> .....	<i>Jung, Nussloch</i>
<i>24 Vertiefungen, Multiwell</i> .....	<i>Beckton Dickinson Labware, USA</i>
<i>Gewebekulturplatte, Falcon 3047</i>	

#### **2.7.1.2 Färben mit der Avidin-Biotin-Methode**

Bei der Avidin-Biotin-Methode wird der am Antigen gebundene Erstantikörper von einem biotinylierten Sekundärantikörper erkannt. Das Biotin des Sekundärantikörpers wird von einem Komplex aus Avidin und Peroxidase gekoppelten Biotin gebunden, es kommt zur Bildung größerer Komplexe und somit zu einer Signalverstärkung, die durch die enzymatische Aktivität der Peroxidase sichtbar gemacht wird.

Alle Inkubationen und Waschschrte der flottierenden Schnitte erfolgten in den Vertiefungen (wells) der Gewebekulturplatten. Sie wurden, soweit nicht anders erwähnt, bei Raumtemperatur und auf Schüttlern durchgeführt. Gewaschen wurde in einem Volumen von 1 ml/well, inkubiert

in einem Volumen von 0,5 ml/well. Alle Waschschritte wurden mit PBS durchgeführt, dabei wurde das PBS nach 10, 20 und 30 Minuten gewechselt, so dass jeder Waschgang 60 Minuten dauerte.

Die Schnitte wurden gewaschen, dann für 15 Minuten mit der Reduktionslösung inkubiert, erneut gewaschen und zur Zerstörung endogener Peroxidasen mit der Vorinkubationslösung 30 Minuten lang inkubiert. Die Inkubationszeit der Schnitte mit dem geeignet verdünnten Erstantikörper in der Erstantikörper-Lösung betrug 24 Stunden bei Raumtemperatur bzw. 72 Stunden bei 4 °C. Die Schnitte wurden gewaschen, für eine Stunde in der PBS-A Lösung vorinkubiert und für weitere 20 Stunden in der Zweitantikörper-Lösung inkubiert. Nach erneutem Waschen kamen die Schnitte für mindestens 6 Stunden in die ABC-Lösung.

Die erneut gespülten Schnitte kamen für 15 Minuten in die Visualisierungs-Vorinkubationslösung und wurden dann 3 bis 6 Minuten lang in der Visualisierungslösung inkubiert. Die gewaschenen Schnitte wurden auf Gelatine-beschichtete Objektträger aufgezogen und maximal 30 Minuten lang an der Luft getrocknet, bevor sie über eine aufsteigende Alkoholreihe in Xylol überführt und anschließend in Entellan eingedeckelt werden konnten.

Reduktionslösung:

264 mM Natriumborhydrid  
in PBS

PBS-A-Lösung:

2 mg/ml BSA (Rinderserum-Albumin)  
in PBS

Vorinkubationslösung für Erstantikörper:

0,3 % Triton X-100  
0,05 % Phenylhydrazin  
10 % NGS (normal goat serum, Ziegen Serum)  
in PBS

Erstantikörper-Lösung:

0,3 % Triton X-100  
10 % NGS (normal goat serum, Ziegen Serum)  
0,1 % NaN<sub>3</sub>  
0,01 % Thimerosal (Ethylmercurithiosalocyl-  
säure Na-Salz)  
in PBS

Zweitantikörper-Lösung:

0,3 % Triton X-100  
0,1 % NaN<sub>3</sub>  
1:2000 B-GaR  
in PBS-A

ABC-Lösung:

1:1000 Elite-A  
in PBS-A, kurz mischen  
1:1000 Elite-B

Tris-Lösung:

1 M Tris  
in H<sub>2</sub>O  
pH 7,6

Imidazol-Lösung:

1 M Imidazol  
in H<sub>2</sub>O  
pH 7,6

Visualisierungs-Vorinkubationslösung:

5 % Tris-Lösung  
1 % Imidazol-Lösung  
1 % DAB (3,3-Diaminobenzidin-  
tetrahydrochloridhydrat)  
in H<sub>2</sub>O

Visualisierungslösung:

5 % Tris-Lösung  
1 % Imidazol-Lösung  
1 % DAB  
0,015 % Ammoniumnickelsulfat  
0,00075 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
in H<sub>2</sub>O

*NGS, Ziegenserum* ..... *PAN Systems, Aidenbach*

*DAB (3,3-Diaminobenzidin-  
tetrahydrochloridhydrat)* ..... *Aldrich, USA*

*B-GaR, Biotin-conjugated* ..... *Vector, USA*  
*Goat Anti-Rabbit IgG*

*Elite-A, Elite-B* ..... *Vector, USA*  
*Vectastain Elite ABC-Kit*

*Xylol* ..... *Baker, Niederlande*

### 2.7.1.3 Blockadeversuch

Für Blockadeversuche wurde der verdünnte Erstantikörper zwei Stunden bei Raumtemperatur vor der Färbung nach der Avidin-Biotin-Methode (siehe Kapitel 2.7.1.2 auf Seite 48) zusammen mit dem jeweiligen spezifischen Fusionsprotein (10 µg/ml) in der Erstantikörper-Lösung inkubiert. Alle weiteren Schritte entsprechen dem Färbeprotokoll für die Avidin-Biotin-Methode.

#### 2.7.1.4 Folgende Erstantikörper wurden zusätzlich eingesetzt

<b>Antikörper</b>	<b>Spezies</b>	<b>Typ</b>	<b>Hersteller</b>
$\alpha$ -Tyrosinhydroxylase (TH)	Maus	monoklonal	Boehringer, Mannheim
$\alpha$ -Kir3.1 bis 3.4	Kaninchen	polyklonal	eigene Herstellung
$\alpha$ -Parvalbumin	Maus	monoklonal	Sigma, USA
$\alpha$ -Calbindin	Maus	monoklonal	Sigma, USA
$\alpha$ -Calretinin	Kaninchen	polyklonal	eigenes Labor
$\alpha$ -CCK <sub>8</sub> (nicht sulphatiert)	Kaninchen	polyklonal	eigenes Labor
$\alpha$ -GABA	Kaninchen	polyklonal	eigenes Labor
$\alpha$ -GAD <sub>67</sub>	Kaninchen	polyklonal	Chemicon, USA
$\alpha$ -NT	Kaninchen	polyklonal	eigenes Labor
$\alpha$ -5HT	Kaninchen	polyklonal	eigenes Labor
$\alpha$ -Leu-Enkephalin	Kaninchen	polyklonal	CambridgeResearch Biochemicals, England
$\alpha$ - $\mu$ -Opiat-Rezeptor-1A	Kaninchen	polyklonal	eigenes Labor
$\alpha$ - $\delta$ -Opiat-Rezeptor-1A	Kaninchen	polyklonal	eigenes Labor
$\alpha$ -SP	Kaninchen	polyklonal	Milab, Schweden
$\alpha$ -NK-B	Kaninchen	polyklonal	Peninsula Laboratories, USA
$\alpha$ -Glycin-Transporter-2	Schaf	polyklonal	Chemicon, USA
$\alpha$ -ChAT	Kaninchen	polyklonal	Chemicon, USA
$\alpha$ -VACHT	Ziege	polyklonal	Chemicon, USA

### 2.7.1.5 Doppelmarkierung für die Fluoreszenzmikroskopie

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden zwei aus verschiedenen Spezies stammende Primärantikörper eingesetzt, die dann von ihren jeweiligen Sekundärantikörpern erkannt wurden. An den Sekundärantikörpern ist der Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Die Durchführung der Markierungen entspricht bis zum Zweitantikörper weitgehend der Färbung mit der Avidin-Biotin-Methode im Kapitel 2.7.1.2 auf der Seite 48. In der Vorinkubationslösung für den Erstantikörper wurde Phenylhydrazin weggelassen, da die endogene Peroxidase bei der Fluoreszenzmikroskopie nicht stört. Nach Auswaschen des Zweitantikörpers wurden die Schnitte direkt auf unbeschichtete Objektträger aufgezogen und in Mowiol eingedeckelt.

#### Zweitantikörper-Lösung:

0,3 % Triton X-100  
 0,1 % NaN<sub>3</sub>  
 1:1000 Cy2-DaR  
 1:1000 Cy3-GaM  
 in PBS-A

#### Mowiol-Lösung:

2,4 g Mowiol  
 6 g Glycerin  
 6 ml H<sub>2</sub>O  
 mischen und mehrere Stunden bei  
 Raumtemperatur stehen lassen  
 12 ml 0,2 M Tris pH8,5  
 10 Minuten bei 50 °C, gelegentlich mischen  
 → abzentrifugieren (5000 × g, 15 Minuten)  
 klaren Überstand nehmen  
 2,5 % DABCO(1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan)  
 bei - 20 °C lagern

*Cy2-DaR, Cy2-conjugated..... Jackson, USA*  
*Donkey Anti-Rabbit IgG (grüne Emission)*

*Cy3-GaM, Cy3-conjugated..... Jackson, USA*  
*Goat Anti-Mouse IgG (rote Emission)*

*Mowiol 4-88..... Hoechst, Frankfurt am Main*

### 2.7.1.6 Beschichtung der Objektträger

Die für die Lichtmikroskopie bestimmten Schnitte wurden auf mit Gelatine beschichtete Objektträger aufgezogen. Dafür wurden die spülmaschinengereinigten Objektträger für 3 Minuten in eine Gelatinelösung getaucht.

Gelatinelösung:

15 g Gelatine gepulvert  
1,76 g Chrom(III)Kaliumsulfat-Dodecahydrat  
ad 630 ml H<sub>2</sub>O, bei 70 °C lösen  
300 ml Ethanol  
70 ml Eisessig  
→ filtriert

### 2.7.1.7 Kontrollfärbung mit Kresylviolett

Zur Visualisierung der gesamten Cytoarchitektur wurden Kontrollschnitte mit Kresylviolett gefärbt. Dieser Farbstoff stellt besonders gut den Zellkern und die Nissel-Schollen des Somas dar.

Die aufgezogenen und über Nacht in 70 % Ethanol gelagerten Schnitte wurden für 2 Minuten in H<sub>2</sub>O gewaschen und 30 Minuten in der Kresylviolettfärbelösung gefärbt. Nach der Färbung wurden die Schnitte wieder für 2 Minuten in H<sub>2</sub>O gewaschen, durch eine aufsteigende Alkoholreihe gezogen und nach dem Intermedium Xylol in Entellan eingedeckelt.

Kresylviolettfärbelösung:

1,0 g Kresylviolett  
20 mM Essigsäure  
ad 500 ml mit H<sub>2</sub>O  
pH 4,0 mit NaOH  
→ vor jedem Gebrauch neu filtriert

### 2.7.1.8 Lichtmikroskopische Auswertung

Die Auswertung und Dokumentation der Schnitte erfolgte mit einem Lichtmikroskop, dass zur Bilddokumentation über eine Videokamera mit einem Macintosh Rechner verbunden war. Für den Ausdruck der Bilder wurde ein Epson Tintenstrahldrucker benutzt.

*Bilddaufnahme, Scion Image Version 1.62 für Mac .....National Institutes of Health, USA*  
*Bildbearbeitung, Adobe Photoshop 5.0 für Mac .....Adobe, USA*  
*Lichtmikroskop, Leitz DMRB .....Leica, Wetzlar*  
*Rechner, Power Macintosh 8600/250 .....Apple, USA*  
*Videokamera, 3 CCD DXC-950 Power HAD .....Sony, Japan*  
*752 (horizontal) x 582 (vertikal) Bildpunkte*  
*Epson Tintenstrahldrucker, Stylus Photo 750 .....Epson, Japan*

## 2.7.2 Immuncytochemie für die Elektronenmikroskopie

### 2.7.2.1 Schneiden

Für die elektronenmikroskopische Immuncytochemie wurden Vibratomschnitte von 40 µm Dicke verwendet. Die aufgetauten Gewebelöcke wurden mit Sekundenkleber auf einem Objekthalter fixiert und in einer Kammer mit 4 °C kaltem PBS bei niedriger Schneidegeschwindigkeit und hoher Amplitude (nicht kalibrierte Einstellungen) im Vibratom geschnitten. Die Schnitte kamen dann in die mit PBS gefüllten Vertiefungen einer Gewebekulturplatte und wurden bei 4 °C gelagert. Noch am selben Tag begann die Inkubation der Schnitte mit dem ersten Antikörper.

*Vibratom 3000, Tissue Sectioning System...Technical Products International, USA*  
*Sekundenkleber.....Uhu, Bühl/Baden*

### 2.7.2.2 Preembedding Doppelmarkierung für die Elektronenmikroskopie

Bei der Preembedding Doppelmarkierung für die Elektronenmikroskopie wurden DAB und Gold-Silber Markierungen eingesetzt. Der Kir Kanal wurde dabei stets mit der Gold-Silber Methode zuerst visualisiert, anschließend folgte die DAB Entwicklung für die zweite Markierung.

Alle hier nicht erwähnten Lösungen sind bereits zur Färbung für die Lichtmikroskopie im Kapitel 2.7.1.2 auf Seite 49 aufgelistet worden. Alle Inkubationen und Waschschrte der flottierenden Schnitte erfolgten ebenso nach den dort erwähnten Bedingungen.

Die gewaschenen Vibratomschnitte wurden für 15 Minuten mit der Reduktionslösung inkubiert, gewaschen und zur Zerstörung endogener Peroxidase mit der Vorinkubationslösung 30 Minuten lang inkubiert. Zur Schonung der Ultrastruktur war nur in der Vorinkubationslösung, jedoch nicht in der 1. und 2. Antikörper Lösung Triton in einer Konzentration von 0,1 % zugegeben worden. Die Inkubationszeit der Schnitte mit den geeignet verdünnten Erstantikörpern betrug 72 Stunden bei 4 °C. Die Schnitte wurden gewaschen, eine Stunde in der PBS-A Lösung vorinkubiert und in der 2.AK-Lösung für weitere 20 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurden die Schnitte eine Stunde in PBS-Tween und eine weitere Stunde mit PBS gewaschen und für 15 Minuten mit einer 2 % igen Glutaraldehyd-Lösung nachfixiert. Die Schnitte wurden dann zurück ins PBS überführt und mehrmals in einer Natriumnitrat-Lösung gewaschen. Es folgte dann mit der Inkubation in der Silberverstärker-Lösung für 30 Minuten die Silberverstärkung der 0,8 nm kleinen Goldkörner.

Die Schnitte wurden wieder mit PBS gewaschen, erneut 15 Minuten in der 2 % Glutaraldehyd-Lösung stabilisiert und wieder in PBS gewaschen, bevor sie für 12 Stunden bei 4 °C in die ABC-Lösung überführt wurden. Die erneut gespülten Schnitte kamen für 15 Minuten in die Visualisierungs-Vorinkubationslösung, wurden dann 10 Minuten lang in der Visualisierungslösung inkubiert und über PBS in Phosphatpuffer überführt.

Für die anschließende 15 minütige Osmierung wurden die Schnitte auf unbeschichtete Objektträger aufgezogen. Der Osmierung schloss sich dann die Entwässerung über eine Alkoholreihe mit den Stufen 60, 70, 2 x 96 und 3 x 100 % an. In jeder Stufe verblieben die Schnitte 5 Minuten. In der 70 % igen Ethanolstufe wurden sie für 10 Minuten bei 4 °C zur Kontrasterhöhung in einer Uranlyacetat-Lösung inkubiert und für die folgenden Stufen aus den Gewebekulturplatten in Schnappdeckelgläser überführt.

Als Intermedium zwischen Alkohol und Einbettungsmedium kamen die Schnitte nach der Alkoholreihe für 2 mal 5 Minuten in 100 % Propylenoxid (1,2-Epoxypropan) und über Nacht auf einer langsam diagonal rotierenden Scheibe in ein 1:1 Gemisch aus Propylenoxid und Araldit-Gemisch.



Anschließend kamen die Schnitte für 2 mal 2 Stunden in reines Einbettungsmedium, in dem sie völlig durchtränkt vom Einbettungsmedium auf den Boden absanken, bevor sie endeingebettet wurden.

Die Schichtung für die Flacheinbettung war in folgender Reihenfolge von oben nach unten: Messinggewicht, Aralditdeckglas, Schnitt, Aclarfolie und Glasobjektträger. Die Polymerisation des Kunstharzes erfolgte über 72 Stunden bei 65 °C.

Vorinkubationslösung für den 1. AK:

0,1 % Triton X-100  
0,05 % Phenylhydrazin  
10 % NGS (normal goat serum, Ziegen-  
serum)  
in PBS

1.AK-Lösung:

10 % NGS (normal goat serum, Ziegen-  
serum)  
0,1 %  $\text{NaN}_3$   
0,01 % Thimerosal (Ethylmercurithiosalocyl-  
säure Na-Salz)  
in PBS

2.AK-Lösung:

0,1 %  $\text{NaN}_3$   
0,1 % Tween-20  
0,1 % BSA-C  
1:2000 B-HaM  
1:40 0,8 nm Au-GaR  
in PBS-A

PBS-Tween:

0,05 % Tween-20  
in PBS

2 % Glutaraldehyd-Lösung:

2 % Glutaraldehyd  
in PBS

Natriumnitrat-Lösung:

150 mM  $\text{NaNO}_3$   
in  $\text{H}_2\text{O}$   
pH 6,5

## Gummi arabicum-Lösung:

1 Gewichtsteil Gummi arabicum  
 2 Gewichtsteile H<sub>2</sub>O  
 mehrere Tage bei Raumtemperatur rühren lassen  
 → abzentrifugieren  
 klarer Überstand bei - 20 °C lagern

## Phosphatpuffer:

100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 1H<sub>2</sub>O  
 in H<sub>2</sub>O  
 pH7,4

## Uranlyacetat-Lösung:

2 % Uranylacetat  
 in 70 % Ethanol

## 1:1 Gemisch:

22 g Araldit-Gemisch  
 0,6 ml DMP-30 (2,4,6-Tris(dimethylamino-  
 methyl)phenol)  
 20 ml Propylenoxid (1,2-Epoxypropan)

## Silberverstärker-Lösung:

1 Volumenteil Silber A  
 1 Volumenteil Gummi arabicum-Lösung  
 → mischen  
 1 Volumenteil Silber B  
 → mischen

## Osmierungslösung:

1 % OsO<sub>4</sub>  
 in Phosphatpuffer

## Araldit-Gemisch:

30 Gewichtsteile Araldit CY 212  
 24 Gewichtsteile DDSA (2-Dodecenylnbern-  
 steinsäureanhydrid)

## Einbettungsmedium:

100 g Araldit-Gemisch  
 2 ml DMP-30

*0,8 nm Au-GaR* ..... *Aurion, Niederlande*

*Aclar Folie* ..... *AlliedSignal, USA*

*B-HaM* ..... *Vector, USA*

*Gummi arabicum* ..... *Aurion, Niederlande*

*Silber A /B* ..... *Amersham Life Science, UK*

### 2.7.2.3 Preembedding Einfachmarkierung für die Elektronenmikroskopie

Bei der Preembedding Einfachmarkierung wurde der entsprechende Kir Kanal nach Antikörperinkubation mit DAB visualisiert, die Durchführung der Markierung ist im vorhergehenden Kapitel 2.7.2.2 ab der Seite 54 beschrieben.

### 2.7.2.4 Semi- und Ultradünnschnitte

Mit einem Ultramikrotom wurden 700 nm dicke Semidünnschnitte und ca. 60 nm dicke Ultradünnschnitte geschnitten, die Ultradünnschnitte kamen auf meist unbefilmte 200 mesh Kupfergrids.

*Ultramikrotom Ultracut S..... Reichert, Nussloch*

*Grids, Athene-Netzchen..... Smethurst High-Light, USA*

### 2.7.2.5 Kontrastierung der Ultradünnschnitte

Die Ultradünnschnitte wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat nachkontrastiert (Reynolds, 63).

### 2.7.2.6 Elektronenmikroskopische Auswertung

Die Auswertung der Ultradünnschnitte erfolgte an den beiden Elektronenmikroskopen EM 900 und EM 912. Neben den „klassischen“ (7,8 x 7,8 cm) Negativen wurden an dem EM 912 auch digitale Fotos mit einer slow-scan Kamera erstellt. Papierabzüge der Negative wurden mit einem Flachbrettscanner digitalisiert, Bildbearbeitung und Ausdruck erfolgten mit den im Kapitel 2.7.1.8 auf Seite 54 erwähnten Geräten.

*EM 900 ..... Zeiss, Oberkochen*

*EM 912 ..... Leo, Oberkochen*

*Slow-scan, High-speed ..... Proscan, Scheuring  
1024 (horizontal) x 1024 (vertikal) Bildpunkte*

*Flachbrettscanner, DeskScan II ..... Hewlett-Packard, USA*