

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Allgemeine Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden in der Qualität pro analysis (p.a.) eingesetzt. Allgemeine Chemikalien und Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller sind in unten stehenden Tabellen aufgelistet. Spezielle Chemikalien, Verbrauchsmittel und verwendete Lösungen werden am Anfang jeder Methodenbeschreibung aufgeführt. Alle Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) angefertigt.

<u>Chemikalien</u>	<u>Hersteller</u>
Acrylamid 30%	Roth, Karlsruhe
Acrylamid 40%	Roth, Karlsruhe
Amoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Coomassie-Brilliantblue	Serva, Heidelberg
1,4-Diazabicyclooctan (DABCO)	Merck, Darmstadt
Ethylendiamin-tetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> * 6H <sub>2</sub> O)	Serva, Heidelberg
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O)	Roth, Karlsruhe
Proteingewichtsmarker für SDS-PAGE	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver	Humana Milchunion, Herford
Mowiol	Calbiochem, Bad Soden
Natriumazid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe

Natriumdihydrogenphosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe
Pferdeserum	Gibco BRL, Eggenstein
Phenolrot	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Restore™ Western Blot Stripping Buffer	Pierce/Perbio, Bonn
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
Albumin Fraktion V (BSA)	Roth, Karlsruhe
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Tween-20	Roth, Karlsruhe

### 2.1.2 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

<u>Verbrauchsmaterialien</u>	<u>Hersteller</u>
Hyperfilm™ ECL	Amersham, Freiburg
Objektträger	Roth, Karlsruhe
Protran BA Nitrocellulose	Schleicher & Schuell, Dassel
PVDF Membran	Roth, Karlsruhe

### 2.1.3 Biochemische Kits

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
BCA-Kit	Pierce/Perbio, Bonn
Western Lightning™ ECL-Kit	Perkin Elmer, Rodgau-Jürgesheim
NBT/BCIP	Boehringer/Roche, Mannheim

### 2.1.4 Allgemeine Materialien für die Zellkultur

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM) (4500mg/l Glukose, 584 mg/l L-Glutamin, 110 mg/l Pyruvat)	Gibco BRL, Eggenstein
Neurobasal™	Gibco BRL, Eggenstein
Fötiales Kälberserum	Gibco BRL, Eggenstein
Hank´s Balanced Salt Solution, Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> frei (HBSS <sup>-</sup> )	Gibco BRL, Eggenstein
L-Glutamin	Gibco BRL, Eggenstein
Penicillin/Streptomycin/Amphotericin B	Gibco BRL, Eggenstein
Trypsin	Gibco BRL, Eggenstein
Gewebekulturplatten mit 12 oder 24 Vertiefungen	Nunc, Wiesbaden
Pipetten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
15 ml-Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
50 ml- Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Deckgläschen	Assistent, Sondheim
Poly-D-Lysin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
B-27	Gibco BRL, Eggenstein
Filtereinheiten 0,2 µm steril	Schleicher & Schuell, Dassel
DNAse I	Boehringer/Roche, Mannheim
Kanülen (26G, 20G)	Braun, Melsungen
Nylonnetz	Sefar, Rüslikon, CH
Trypan Blue Stain 0,4%	Gibco BRL, Eggenstein

### 2.1.5 Allgemeine Lösungen

10 x PBS:	1,5 M NaCl, 83 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 17 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O, pH 7.4
10 x TBS:	1,5 M NaCl, 500 mM Tris/HCl, pH 7.6

## 2.1.6 Rezeptoragonisten und -antagonisten

<u>Substanz</u>	<u>Funktion</u>	<u>Hersteller/Referenzen</u>
L-Glutamat	unselektiver Agonist an ionotropen und metabotropen Glutamatrezeptoren	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
(+)-MK 801 Maleat	selektiver nicht-kompetitiver Antagonist am NMDA-Rezeptor	Tocris/Biotrend, Köln
(RS)-3,5-DHPG	selektiver Agonist der Gruppe I metabotropen Glutamatrezeptoren	Tocris/Biotrend, Köln
(S)-4CPG	kompetitiver Antagonist der Gruppe I metabotropen Glutamatrezeptoren	Tocris/Biotrend, Köln
MPEP Hydrochlorid	Selektiver nicht-kompetitiver Antagonist des metabotropen Glutamatrezeptors 5	Tocris/Biotrend, Köln
CPCCOEt	Selektiver nicht-kompetitiver Antagonist des metabotropen Glutamatrezeptors 1b	Tocris/Biotrend, Köln

## 2.1.7 Antikörper

### 2.1.7.1 Primäre Antikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Spezies</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Firma/Hersteller</u>
anti-VILIP-1	Kaninchen, polyklonal	WB: 1:10.000 IF: 1:2.000	Dr. K.-H. Braunewell*
anti-VILIP-1	Ratte, polyklonal	IF: 1:2.000	Dr. K.-H. Braunewell**
anti-GAD 65	Maus, monoklonal	IF: 1:1000	Chemicon
anti-mGluR1 $\alpha$	Kaninchen, polyklonal	IF: 1:500	Chemicon
anti- $\alpha$ -Tubulin	Maus, monoklonal	WB: 1:10.000	Sigma-Aldrich

\* eigene Herstellung

\*\* Eurogentec

WB: Western-Blot

IF: Immunfluoreszenz

### 2.1.7.2 Sekundäre Antikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Spezies</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Firma</u>
anti-Kaninchen IgG, AP-gekoppelt	Ziege, polyklonal	WB: 1:5000	Sigma-Aldrich
anti-Maus IgG, AP-gekoppelt	Ziege, polyklonal	WB: 1:5000	Sigma-Aldrich
anti-Kaninchen IgG, HRP-gekoppelt	Ziege, polyklonal	WB: 1:5000	Santa Cruz
anti-Maus IgG, HRP-gekoppelt	Ziege, polyklonal	WB: 1:5000	Santa Cruz
anti-Kaninchen IgG, Cy3-gekoppelt	Ziege, polyklonal	IF: 1:1000	Dianova
anti-Maus IgG, Alexa 488	Ziege, polyklonal	IF: 1:1000	Molecular Probes
anti-Ratte IgG, Alexa 488	Esel, polyklonal	IF: 1:1000	Molecular Probes

WB: Western-Blot IF: Immunfluoreszenz

### 2.1.8 Tiere

Für die Präparation von Primärkulturen (siehe 2.2.1) wurden ausschließlich Ratten (*Rattus Rattus norvegicus*) des Stammes Wistar aus der Hauszucht und von der Firma Charles River Deutschland (Sulzfeld) verwendet.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Primärkultur hippokampaler Neurone

Poly-D-Lysin:	100 mg/l in 0,15 M Borsäure, pH 8,4, nach der Herstellung steril filtriert, Porengröße 0,2 µm
Medium 1:	DMEM, 10% FKS, 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 0,25 µg/ml Amphotericin B
Medium 2:	Neurobasal™, 1 x B27 (Gibco), Pen/Strep (s.o.) 0,5 mM Glutamin
Trypsin:	0,2% in HBSS <sup>-</sup>
DNase I:	0,01% (200 U) in HBSS <sup>-</sup> , 2,4 mM MgSO <sub>4</sub>

Trächtigen Ratten wurden 19-20 Tage alte Embryos aus der Bauchhöhle entnommen und nach Befreiung von Plazenta und Fruchtblase dekapitiert. Nach Entnahme der Gehirne wurden die Hippokampi unter dem Binokular herauspräpariert und in kaltem HBSS<sup>-</sup> gesammelt. Es folgte nach dreimaligem Waschen mit kaltem HBSS<sup>-</sup> eine 20minütige Inkubation in Trypsin-Lösung

bei 37°C im Wasserbad. Anschließend wurden die Hippokampi erneut drei Mal mit kaltem HBSS<sup>-</sup> gewaschen. Zur Dissoziation des Gewebes wurde das HBSS<sup>-</sup> auf 1,6 ml abgenommen, mit 400 µl 0,05%iger DNase-Lösung in ein Eppendorfgefäß überführt und je drei Mal langsam durch zwei verschiedene Kanülen abnehmender Weite (20G, 26G) gedrückt. Die Zellsuspension wurde durch ein Nylonnetz (Maschenweite 125 µm) gegeben, um nicht dissoziierte Gewebestücke zu entfernen, und mit 37°C warmem Medium 1 auf 15 ml aufgefüllt. Nach Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer und Trypan-Blue-Stain-0,4%-Färbelösung wurde die Zellsuspension mit Medium 1 entsprechend verdünnt. Die Zellen wurden in unterschiedlichen Dichten (Western-Blotting: ca. 80.000 Zellen pro well in 12-well-Schalen, Immunzytochemie: ca. 100.000 Zellen pro well in 24-well-Schalen mit Deckgläschen) auf mit Poly-D-Lysin beschichteten Schalen ausgesät. Nach 24 h erfolgte ein kompletter Medienwechsel auf Medium 2. Weitere Medienwechsel erfolgten einmal pro Woche mit Medium 2, wobei nur etwa die Hälfte des alten Mediums entfernt wurde.

Die Zellkultur-Arbeiten wurden unter einer Steril-Bank (Herasafe, Heraeus, Osterode) durchgeführt. Die Zellen wurden im Brutschrank (Heraeus, Osterode) bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 90% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Reinheit der Kulturen wurde mittels des Astrozytenmarkers saures Gliafaserprotein (GFAP, „Glial fibrillary acidic protein“) wiederholt geprüft.

### **2.2.2 Pharmakologische Stimulation von Zellkulturen**

Alle Experimente wurden mit ausgereiften (16-20 Tage alten) Zellkulturen durchgeführt. Hippokampale Neurone wurden entsprechend den im Text beschriebenen Angaben stimuliert. Antagonisten wurden 30 Minuten vor Agonistengabe appliziert. Bei 10minütiger Applikation wurden anschließend alle Schalen drei Mal mit warmem Medium 2 gewaschen, um die Wirkungen möglicher Restkonzentrationen zu vermeiden. Zum Ausschluss eines verfälschenden Effekts durch den Medienwechsel wurden auch die Kontrollschalen diesem Prozedere unterzogen. Die Kulturen wurden direkt nach dem Ende des Experiments aufgearbeitet. Alle Reagenzien wurden in Konzentrationen eingesetzt, die aus der Literatur für dieses Zellsystem bekannt sind oder sich aus den Zwischenergebnissen ergaben. Um eine möglichst exakte Endkonzentration der Reagenzien im Medium zu gewährleisten, wurde vor Versuchsbeginn in allen Schalen das Volumen des Mediums angeglichen. Sämtliche Lösungen wurden unmittelbar vor Beginn der Experimente angefertigt.

## 2.2.3 Biochemische Methoden

### 2.2.3.1 Proteinisolation

Um die Zellkultur mittels Western-Blot-Analyse auswerten zu können, wurden die Zellen in 70%igem Ethanol aus den Schalen aufgenommen und bei 4°C mehrmals zentrifugiert (14.000 U/min, 10 min) und resuspendiert. Anschließend wurden die Pellets in PBS mit 1% SDS aufgenommen und die Proteine durch vorsichtiges Erwärmen in Lösung gebracht.

### 2.2.3.2 Proteinbestimmung

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte photometrisch mit dem BCA-Proteinbestimmungs-Kit (BCA Protein Assay Kit, Pierce) und ermöglichte, dass für die semiquantitative Western-Blot-Analyse gleiche Mengen Protein aufgetragen werden konnten.

### 2.2.3.3 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

5x Protein-Probenpuffer:	250 mM Tris pH 6.8, 7.5% SDS, 30% Glycerin 1% Mercaptoethanol, 0,25% Bromphenolblau
Elektrophoresepuffer:	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% SDS

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE nach der Methode von Laemmli (Laemmli 1970). Es wurden 5-20%ige Gradientengele und 5%ige Sammelgele verwendet. Die zu analysierenden Proben wurden im Verhältnis 1:5 mit 5fach konzentriertem SDS/Mercaptoethanol-Probenpuffer versetzt, für 1-3 Minuten gekocht und mit einer Hamilton-Mikroliter-Spritze auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer Stromstärke von 25 mA und einer Spannung von ca. 400 Volt für 1,5 h bei 4°C in Elektrophoresepuffer durchgeführt.

Die Proteingele wurden anschließend entweder geblottet (siehe 2.2.3.5) oder mit Coomassie-Brilliantblue-Färbelösung gefärbt (siehe 2.2.3.4).

### 2.2.3.4 Coomassie-Brilliantblue-Färbung

Coomassie-Färbelösung:	0,125% Coomassie-Brilliantblue R250, 50% Methanol, 10% Essigsäure in ddH <sub>2</sub> O
Entfärber:	7% Essigsäure, 5% Methanol in ddH <sub>2</sub> O

Die Coomassie-Brilliantblue-Färbung diente der Kontrolle der Proteinbestimmung. Dafür wurden die Proteingele ca. 1h bei Raumtemperatur mit Coomassie-Brilliantblue-Färbelösung gefärbt. Die anschließende Inkubation in Entfärber-Lösung machte die Banden im Gel sichtbar. Zur Dokumentation wurden die gefärbte Gele am Computer eingescannt und mit NIH-Image 1.6 densitometrisch ausgewertet (siehe 2.2.5.1).

### 2.2.3.5 Western-Blotting und Immundetektion

Blotpuffer:	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,2% SDS, 20% Methanol
TBST:	1 x TBS, 0,1% Tween-20
AP-Puffer:	100 mM Tris/HCl, pH 9.6, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O
NBT:	50 mg/ml in 70% Dimethylformamide
BCIP:	50 mg/ml in 100% Dimethylformamide

Der Transfer von Proteinen aus Polyacrylamid-Gelen auf eine Nitrocellulose-Membran (NC-Membran) oder eine Polyvinylidenfluorid- (PVDF-) Membran erfolgte elektrophoretisch nach der Methode von Towbin (Towbin et al. 1979). PVDF-Membranen mussten vor dem Transfer in Methanol aktiviert werden.

Der Protein-Transfer aus den 0,5 mm dicken Gelen wurde in einer Trans-Blot-Cell (BioRad) in Blotpuffer für 1,5 h bei 100 mA, 400 V und 4°C durchgeführt.

Der Erfolg des Transfers konnte anhand des aufgetragenen gefärbten Markers beurteilt werden.

Die Detektion von Antigenen erfolgte indirekt über die Reaktionen der an den Zweitantikörper gekoppelten Enzyme alkalische Phosphatase (AP; Umsetzung der Substrate NBT und BCIP zu einem blauen Farbstoff) oder Meerrettichperoxidase (Umsetzung von Substraten und Emission von Chemilumineszenz, ECL-Detektionssystem, Amersham).

Die Membran wurde nach dem Transfer zunächst für mindestens 1 h mit 5% Milchpulver in TBST (MP-TBST) bei Raumtemperatur blockiert. Primäre Antikörper wurden mit 0,01% Natriumacid in TBST, sekundäre Antikörper mit MP-TBST entsprechend verdünnt. Die



Inkubation mit dem Erstantikörper betrug mindestens 2,5 h bzw. erfolgte bei 4°C über Nacht. Nach dem Entfernen der Antikörper-Lösung wurde die Membran drei Mal mit TBST für 10 Minuten gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen.

AP-gekoppelte Zweitantikörper wurden 1:5000 für 90 Minuten eingesetzt. Danach wurde die Membran erneut gewaschen und anschließend für 2-5 Minuten in AP-Puffer inkubiert, bevor die Färbe-Lösung (66 µl NBT, 33 µl BCIP pro 10 ml AP-Puffer) zugesetzt wurde. Nachdem eine klare Färbung der Banden zu erkennen war, wurde die Farbreaktion mit 10 x PBS-Lösung beendet, die Membran mit Aqua dest. gespült.

Beim alternativen Antigen-Nachweis mittels des ECL-Detektionssystems wurde der Peroxydase-gekoppelte Zweitantikörper 1:5000 in MP-TBST verdünnt und ebenfalls ca. 90 Minuten inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBST wurde die Membran für 1 Minute mit ECL-Reagenz bedeckt. In einer Dunkelkammer wurde anschließend die Chemilumineszenz durch Exposition der Membran auf sensitiven Filmen (HyperFilm) detektiert.

Die Verwendung von PVDF-Membran und der Antigen-Nachweis mittels des ECL-Systems ermöglichten durch sogenanntes „Stripping“ die Primärantikörper zu entfernen und die Membran mit einem anderen primären Antikörper erneut zu inkubieren. Dazu wurde die Membran zwei Mal für 20 Minuten mit TBST, dann 30 Minuten mit Restore™ Western Blot Stripping Buffer und abschließend zwei Mal mit TBST für 20 Minuten gewaschen.

SDS-PAGE, Western-Blotting und Immundetektion wurden im Rahmen einer Expressionsanalyse von VILIP-1, NCS-1 und Hippocalcin in embryonalen und adulten Ratten als Vorarbeit für diese Doktorarbeit modifiziert (Gierke et al. 2004).

#### 2.2.4 Immunzytochemie

Fixierlösung:	4% PFA in PBS
Glycin-Puffer:	25 mM in PBS
Blockierlösung:	3% BSA, 5% HS, 0,2% Triton X-100 in PBS
Mowiol (Mounting-Medium):	10% Mowiol, 25% Glycerin, 100 mM Tris/HCl, pH 8.5, 2,5% DABCO

Auf Deckgläschen kultivierte hippokampale Neurone wurden nach Absaugen des Mediums und einem kurzen Waschschrift mit PBS für 20-25 Minuten mit auf 37°C vorgewärmter Fixierlösung bei Raumtemperatur fixiert. Zur Reduktion der Hintergrundfärbung erfolgte nach der Fixierung zwei Mal ein 10minütiges Waschen mit Glycin-Puffer, der die freien Bindungsstellen des

Paraformaldehyds absättigt. Nach den Waschschritten wurden die Zellen 30 Minuten lang mit Blockierlösung permeabilisiert. Die Inkubation mit den in Blockierlösung verdünnten ersten Antikörpern erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach Absaugen der Antikörperlösung wurden die Zellen drei mal mit PBS gewaschen und anschließend mit den fluoreszenz-markierten Zweitantikörpern (entsprechend verdünnt in Blockierlösung ohne Triton X-100) im Dunkeln 60-90 Minuten inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit Mowiol auf Objektträgern eingebettet.

Die Fluoreszenz wurde an einem Leica-Fluoreszenzmikroskop (Leica DM RA) visualisiert. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mittels der CCD-Kamera Leica DC200 (768x582 Pixel) und des Programms Leica-DC-Viewer (Leica, Wetzlar).

## **2.2.5 Auswertung**

### **2.2.5.1 Auswertung der Western-Blot-Daten**

Sowohl die Membranen, deren Banden mittels AP-gekoppelter Zweitantikörper sichtbar gemacht wurden, als auch die exponierten Filme des ECL-Systems wurden mit einem Scanner digitalisiert. Mit Hilfe des Programms NIH-Image 1.6 (National Institutes of Health, Maryland, USA) wurden die Banden densitometrisch ausgewertet. Die Ergebnisse der verschiedenen Behandlungen und Zeitpunkte wurden an der jeweils zugehörigen Kontrolle normalisiert. Aus mehreren Experimenten wurden Mittelwert und Standardabweichung ermittelt.

Die Signifikanz der Ergebnisse wurde mit dem zweiseitigen gepaarten student's t-test geprüft und mit Sternchen kodiert (\*  $p < 0,5$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

### **2.2.5.2 Auswertung der Immunzytochemie-Bilder**

Mit dem Fluoreszenzmikroskop aufgenommene Bilder der Doppel-Immunfluoreszenzfärbungen wurden mit Adobe Photoshop 5.5 für Macintosh (Adobe Systems, San Jose, CA) übereinander gelegt und ausgewertet.

Es wurden pro Ansatz 300-500 Neurone ausgezählt. Aus mehreren Experimenten wurden wiederum Mittelwert und Standardabweichung ermittelt. Eine automatisierte Quantifizierung der Immunzytochemie-Bilder war nicht möglich, da aufgrund des heterogenen Zellbildes zu viele Fehler entstanden wären.

Die Signifikanz der Ergebnisse wurde mit dem zweiseitigen gepaarten student's t-test geprüft und mit Sternchen kodiert (\*  $p < 0,5$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).