

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Aceton	Merck, Darmstadt
Acrylamid	Fluka, Buchs, Schweiz
Agar	EMS, Fort Washington, USA
Agarose	Qbiogene, Straßburg, Frankreich
Allantoin	Sigma-Aldrich, Steinheim
3-Aminopropyltriethoxysilan	Sigma-Aldrich, Steinheim
3-Amino-phthalhydrazid (Luminol)	Fluka, Buchs, Schweiz
Ammoniumhydroxid	Fluka, Buchs, Schweiz
Ammoniak	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Aqua ad injectabilia	Braun, Ingelheim
β-Mercaptoethanol	Fluka, Buchs, Schweiz
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA (bovines Serumalbumin)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Chloralhydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Chloroform	Merck, Darmstadt
Citronensäure-Monohydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
p-Coumarin-Säure	Sigma-Aldrich, Steinheim
DEPC-H ₂ O	Roth, Karlsruhe
Diaminobenzidin (DAB)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka, Buchs, Schweiz
Dithioeritol (DTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim
D.P.X. Mounting-Medium	Sigma, Diesenhofen
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Merck, Darmstadt
EGTA	Serva, Heidelberg
Essigsäure	Merck, Darmstadt

Ethanol (vergällt und unvergällt)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Fluoro-Jade-B	Histo-Chem, Jefferson, AR, USA
Formaldehyd	Riedel-de Haën, Seelze
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	ICN Biomedicals, Aurora, USA
Glykogen	Boehringer, Mannheim
Heparin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Imidazol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol	J.T. Baker, Deventer, Holland
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumferrizyanid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumpermanganat	Merck, Darmstadt
Kupfernitrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Mayers Hämalaun	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Fluka, Buchs, Schweiz
Methanol	Merck, Darmstadt
NaN_3 0,05%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumcacodylat	Sigma, St. Louis, USA
Natriumcarbonat	Fluka, Buchs, Schweiz
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdeoxycholat	Fluka, Buchs, Schweiz
Natriumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumfluorid	Fluka, Buchs, Schweiz
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natrium-Orthovanadat 1 M	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumtetraborat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumthiosulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim
NP40	Fluka, Buchs, Schweiz
Paraffin	Merck, Darmstadt

Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PBS Phosphatpuffer Dulbecco	Biochrom, Berlin
Permount Mounting Medium	EMS, Fort Washington, USA
PMSF	Fluka, Buchs, Schweiz
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pyridin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Roti [®] -Phenol/Chloroform	Roth, Karlsruhe
Roti [®] -Phorese Gel 30 (37, 5:1)	Roth, Karlsruhe
Salpetersäure	Merck, Darmstadt
Salzsäure	Merck, Darmstadt
SDS	Roth, Karlsruhe
Silbernitrat	Merck, Darmstadt
Stickstoff (flüssig)	Linde, Berlin
Tetramethyldiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Tris	Serva, Heidelberg
Triton X-100	Sigma, St. Louis, USA
Tween 20	Fluka, Buchs, Schweiz
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt
Xylencyanol	Merck, Darmstadt
Xylol	Merck, Darmstadt

2.1.2. Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Bezugsquelle
Agar	20 g Agar-Puder 500 ml ddH ₂ O
Agarosegel (RNA-Auftrennung)	0,8 g Agarose 100 ml 1x TAE-Puffer (pH 7,7)
Auftragspuffer A (für Agarosegele)	0,1% (w/v) Bromphenolblau, 10 mM EDTA (pH 8,0), 60% (v/v) Glycerin, 100 mM Tris-HCl (pH 8,0)

Auftragspuffer P (für Polyacrylamidgele)	0,1% (w/v) Bromphenolblau, 10 mM EDTA (pH 8,0), 60% (v/v) Glycerin, 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,1% (w/v) Xylencyanol
Boratpuffer (pH 8,5)	20 mM Borsäure, 50 mM Natriumtetraborat
p-Coumarinsäure-Stammlösung	0,075 g p-Coumarinsäure, 5 ml DMSO
DAB-Wasserstoffperoxidlösung (0,05%)	0,05% (w/v) DAB, 6,7% (w/v) Imidazol, 0,02% (v/v) Wasserstoffperoxid in 0,05 M Tris-HCl (pH 7,4)
ECL-Lösung I	0,5 ml Luminol-Stammlösung, 0,22 ml p-Coumarinsäure-Stammlösung, 5 ml 1 M Tris-HCl pH 8,5, ddH ₂ O ad 50 ml
ECL-Lösung II	5 ml 1 m Tris-HCl pH 8,5, ddH ₂ O ad 50 ml
Essigsäurelösung	5 ml 100% Essigsäure, ad 500 ml ddH ₂ O
Färbelösung A	0,2% (w/v) Silbernitrat
Färbelösung B	0,05% (v/v) Formaldehyd, 0,28 mM Natriumcarbonat
FCS 10%	10% (v/v) in PBS
Fluoro-Jade-B-Arbeitslösung 0,001%	8 ml Fluoro-Jade-B-Stammlösung, 192 ml Essigsäure 0,1%
Fluoro-Jade-B-Stammlösung	100 mg Fluoro-Jade-B, 100 ml dH ₂ O
Injektionslösung IL-18BP	200 µg IL-18BP _a /Fc chimera 1 ml PBS (steril, pH 7,2)
Kaliumferricyanidlösung	0,45 g Kaliumferrizyanid, 150 ml ddH ₂ O

Kaliumpermanganatlösung	120 mg Kaliumpermanganat, 200 ml dH ₂ O
Kupfer-Silber-Lösung	1,5 g Silbernitrat, 3 ml 0,5%ige Kupfernitratlösung, 15 ml 0,1%ige Allantoinlösung, 9 ml Boratpuffer, 17 ml Ethanol absolut, 9 ml Pyridin
Laemmli-Puffer	2 ml 0,625 m Tris/HCl (pH 6,8), 0,2 g SDS, 5 ml Glycerin, 0,5 ml β-Mercaptoethanol, 0,1 ml Bromphenolblau, ad 10 ml ddH ₂ O
Luminol-Stammlösung	0,44 g Luminol, 10 ml DMSO
Magermilchlösung	5% (w/v) Magermilch in TBST
PAGE-Lösung 5%	5% (w/v) Acrylamid, 5% (v/v) Glycerin , 0,9x TBE-Puffer
PAGE-Laufpuffer	90 ml 10x TBE-Puffer, 126 ml Glycerol, 125 ml 40% Acrylamid, ad 1000 ml ddH ₂ O
Paraformaldehydlösung 4%ig	2 Tabletten NaOH, 40 g Paraformaldehyd, 19 ml Monobasisches 1 M Natriumphosphat, 81 ml Dibasisches 1 M Natriumphosphat, ddH ₂ O (ad 1000 ml), pH 7,3-7,4
10x PBS (pH 7,4)	81 mM di-Natriumhydrogenphosphat, 19 mM Natriumhydrogenphosphat, 9,0% (w/v) Natriumchlorid

PBS Azid	10x PBS versetzt mit 0,05% NaN ₃
PCR-H ₂ O	zweifach destilliertes H ₂ O autoklaviert
Polyacrylamidgel 5%	50 ml 5% PAGE-Lösung, 45 µl TEMED, 100 µl APS 30%
Polyacrylamidgelelektrophorese-Puffer	5% (v/v) Glycerin, 0,9 x TBE
5x Reaktionspuffer	50 mM DTT, 0,375 M Kaliumchlorid, 15 mM Magnesiumchlorid, 0,25 M Tris-HCl pH 8,3
Reduktionslösung	15 ml Ethanol absolut, 180 µl 37%ige Formaldehydlösung, 10,5 mg Zitronensäure
RIPA-Puffer	1% NP40, 0.5% Natriumdeoxycholat, 0.1% SDS, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM Natrium-Orthovanadat, 20 mM Natriumfluorid (NaF), 0.5 mM DTT, 1 mM PMS, Proteaseinhibitor-Cocktail in PBS, pH 7.4
Salpetersäure 2%	15 ml 65% Salpetersäure, ddH ₂ O ad 500 ml
Sammelgellösung (für 2 Gele)	1,5 ml Rotiphorese [®] Gel 30 (29:1), 2,5 ml 4x Sammelgelpuffer, 0,1 ml 10% SDS, 6,0 ml ddH ₂ O, 0,02 ml TEMED, 0,032 ml 12,5% APS

4x Sammelgelpuffer	0,4% (w/v) SDS, 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)
Silber-Diamin-Lösung	24 g Silbernitrat, 120 ml ddH ₂ O, 60 ml Natriumhydroxid 0,4%, 30 ml Ammoniak
Stripping-Puffer	50 ml 125 M TrisHCl pH 6,7, 0,7 ml β-Mercaptoethanollösung, 10 ml SDS 20%, ddH ₂ O ad 100 ml
TAE-Puffer (pH 7,7)	10 mM EDTA (pH 8,0), 2,3% (v/v) Essigsäure, 0,5 M Tris
10x TBE-Puffer	121,1 g Tris, 61,83 g Borsäure, 40 ml 0,5 M EDTA, ddH ₂ O ad 1000 ml, pH 8,3
10x TBS	100 ml Tris-HCl (pH 7,4), 88 g Natriumchlorid, dH ₂ O ad 1000 ml
TBST (TBS-Tween)	100 ml 1x TBS, 1 ml Tween 20, ad 1000 ml ddH ₂ O
Transferpuffer (Westernblotting)	39 mM Glycin, 48 mM Tris, 20% (v/v) Methanol, pH 9,2
Trenngellösung 12,5% (für 2 Gele)	3,35 ml Rotiphorese [®] Gel 30 (29:1), 2,0 ml 4x Trenngelpuffer, 0,08 ml 10% SDS, 2,6 ml ddH ₂ O, 0,004 ml TEMED, 0,032 ml 12,5% APS

4x Trenngelpuffer	0,4% (w/v) SDS, 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)
-------------------	--

2.1.3. Kits

Bezeichnung	Bezugsquelle
ABC-Kit	Vector Laboratories, Peterborough, GB
MicroBC-Assay	Interchim, Montluçon, Frankreich
peqGold RNAPure™	Peqlab, Erlangen

2.1.4. Enzyme und Proteine

Bezeichnung	Bezugsquelle
DNase I RNase-frei	Boehringer, Mannheim
IL-18BPα/Fc chimera	R&D Systems, Wiesbaden
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim
Rnasin® Ribonuklease Inhibitor	Promega, Mannheim

2.1.5. Antikörper

Bezeichnung	Bezugsquelle
Goat-polyclonal anti-Caspase-3	Cell Signalling, NEB, Frankfurt
Goat-polyclonal anti-IL-1β	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
Goat-polyclonal anti-IL-18	R&D Systems, MN, USA
Goat-polyclonal anti-IL-18Rα	R&D Systems, MN, USA
HRP linked secondary antibody anti goat	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
HRP linked secondary antibody anti-mouse	DAKO, Glostrup, Dänemark
HRP linked secondary antibody anti-rabbit	Amersham Biosciences, Bucks, UK
Mouse-monoclonal anti-β-Aktin	Sigma Aldrich, Steinheim
Rabbit-polyclonal anti-Caspase-1	Upstate, Charlottesville, VA, USA

Ziegenserum (goat serum)

Cell Signalling, NEB, Frankfurt

2.1.6. Oligonukleotide

Bezeichnung	Bezugsquelle
Oligo(dT) ₁₅ Primer	Promega, Mannheim
Oligonukleotide (für semiquantitative PCR, Tabelle: 2.10.)	Biochemisch-Technologisches Zentrum Berlin Buch

2.1.7. Molekulargewichtsstandard

Bezeichnung	Bezugsquelle
Color Burst™ Electrophoresis Marker	Sigma-Aldrich, Steinheim
Molekulargewichtsmarker phiX174	Promega, Mannheim
phiX174 DNA/Hae III Marker	Promega, Mannheim
RNA-Molekulargewichtsmarker 0,28-6,58kB	Promega, Mannheim

2.1.8. Versuchstiere

Bezeichnung	Bezugsquelle
C57/BL6-Mäuse	Charles River, WIGA GmbH, Sulzfeld
Han Wistar Ratten	Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV), Berlin
IRAK-4 (-/-) Mäuse	Ontario Cancer Institute, Toronto, Canada (zur Verfügung gestellt von Dr. Wen Chen Yeh)

2.1.9. Geräte, Hilfsmittel und Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Bezugsquelle
ABI PRISM [®] 96-Well Optical Reaction Plates und MicroAmp Optical Caps	Applied Biosystems, Darmstadt
Blotting Box	Biometra Göttingen
Blot Paper Extra thick Protean XL Size	Bio-Rad Laboratories, München
Chirurgische Instrumente	EMS, Fort Washington, USA
Deckgläschen	Roth, Karlsruhe
Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
Entwicklungsmaschine X-OMAT 5000RA	KODAK, Stuttgart
Feinwaage MC 210S	Sartorius, Göttingen
GelBond PAG Film (21,0 x 21,3cm)	Serva, Heidelberg
Geldokumentationssystem BioDocAnalyse	Biometra, Göttingen
Gelfilmträgerfolien Gel-Fix for PAG	Serva, Heidelberg
Glasplatten	Diagen, Hilden
Glaswaren	Schott, Mainz
Homogenisationsgefäß	VWR International, Darmstadt
Horizontales Elektrophoresesystem Easy Cast	AGS, Heidelberg
Hypercassette [™]	Amersham, Biosciences, Freiburg
Hyperfilm [™] (ECL)	Amersham, Biosciences, Freiburg
Injektionskanülen (Butterfly)	B. Braun, Melsungen
Inkubationsbox Perfect Western [™]	GenHunter, Nashville, TN, USA
Kamera PM-C35DX	Olympus, Hamburg
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Laborwaage BL 1500S	Sartorius, Göttingen
Leuchtkasten	Roth, Karlsruhe
Lichtmikroskop BX60	Olympus, Hamburg
Magnetrührer MR3001	Heidolph, Kelheim
Mikrotom HM 360	Microtom, Walldorf
Mikrowellenherd M 706	Philips, Hamburg
Mikroplattenreader	Perkin Elmer, Weiterstadt

Mini-PROTEAN [®] 3-Gelsystem	Bio-Rad Laboratories, München
Objektträger	Roth, Karlsruhe
PCR-Thermocycler Gene Amp-PCR System 2400	Perkin Elmer, Weiterstadt
Perfect Western [™]	GenHunter, Nashville, TN, USA
pH-Meter GPHR 1400A	Greisinger, Regenstauf
Pipetten und Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Präzisionsküvette	Hellma, Mühlheim
Präzisionswaage MC 210S	Sartorius, Göttingen
Protean BA 83 (0,2 µm) Nitrocellulosemembran	A. Hartenstein, Würzburg, Versbach
Rotationsvibrator VT 1000S	Leica Microsystems, Nussloch
Schüttelinkubator Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Schütteltisch Stovall Belly Dancer	Castle Scientific, Emersacker
Spacer	Diagen, Hilden
Spektralphotometer Ultraspec [®] III	Pharmacia, Freiburg
Stereotaktisches Gerät	David Kopf Instruments, Tujunga, USA
Stromversorgungsgerät EPS 3500	Pharmacia, Freiburg
Tauml-Wipptisch WT12	Biometra, Göttingen
TGGE-Gelkammer	Diagen, Hilden
Fieberthermometer FT 15	Beurer, Ulm
Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Trans-Blot-SD-System	Bio-Rad Laboratories, München
Transportinkubator T 1500	MEDAP, Hanau
Ultraschallbad Branson 200	VWR International, Darmstadt
Umlufttrockenschrank UT 6000	Heraeus, Hanau
UV- Transluminator TI 1	Biometra Göttingen
Vakuumzentrifuge Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
Vortexgerät REAX 2000	Heidolph, Kelheim
Zentrifugen 5804 und 5417C	Eppendorf, Hamburg

2.1.10. Software und Datenbanken

Bezeichnung	Bezugsquelle
ABI PRISM [®] 7000 Sequence Detection System Software	Applied Biosystems, Darmstadt
Adobe [®] Photoshop [®] Elements 2.0	Adobe Systems
BioDocAnalyze	Whatman Biometra, Göttingen
Ensembl Genome Viewer Datenbank	http://www.ensembl.org
GraphPad PRISM [™] Version 3.0	GraphPad Software, San Diego, USA
NCBI Datenbank	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST
Primer Designer 4.0	Scientific&Educational Software, Durham, USA
StarOffice 6.0	Sun Microsystems, Santa Cruz, USA
TINA 2.09g Software	Raytest Isotopenmessgeräte, Straubenhardt

2.2. Methoden

2.2.1. Durchführung der Tierversuche

Die Untersuchung der vorliegenden Fragestellung wurde an einem Tiermodell vorgenommen. Unter Einhaltung der Richtlinien zur Durchführung von Tierversuchen der Humboldt-Universität zu Berlin wurden hierfür Han Wistar Ratten, IRAK-4 (-/-) Mäuse mit C57/BL6-Hintergrund und Wildtypmäuse verwandt. Die Einwilligung des Landesamtes für technische Sicherheit und Arbeitsschutz Berlin zu diesen Versuchen lag vor. IRAK-4 (-/-) Mäuse weisen phänotypisch keine Unterschiede zum Wildtyp auf [145]. Es wurden wurfübergreifend 6 Tage alte Jungtiere randomisiert und den verschiedenen Versuchsgruppen zugeordnet, welche, zusammen mit einem weiblichen Muttertier, Wasser und Nahrung, je nach spezieller Problemstellung verschiedenen Zeitspannen (2, 6, 12, 48 Stunden) einer definierten Hyperoxie ausgesetzt wurden. Dies geschah in einem Inkubator bei einer konstanten Temperatur von 21 °C, bei normobaren Druckverhältnissen und einem Sauerstoffgehalt der Luft von 80%, welcher permanent mit einem Oxymeter kontrolliert wurde. Kontrolltiere wurden unter gleichen Bedingungen bei einem Sauerstoffgehalt von 21% gehalten. Der normale Tag-Nachtrhythmus galt für alle Tiere.



Abbildung 2.1.: Transportinkubator mit Messgeräten für die Überwachung der Sauerstoffkonzentration.

In bestimmten Versuchsreihen wurde zufällig ausgewählten, 6 Tage alten Tieren unmittelbar vor der Hyperoxieexposition intraperitoneal (i.p.) 40 µg rekombinantes, humanes IL-18BP (IL-18BP_a/Fc chimera) injiziert. Die Kontrolltiere dieser Reihen wurden ebenfalls randomisiert ausgewählt und erhielten i.p. äquivalente Mengen isotoner Kochsalzlösung. Bei einer Hyperoxieexposition, die länger als 24 Stunden andauerte, wurden die adulten Tiere gewechselt, um einem anderenfalls häufig auftretenden akuten Atemnotsyndrom vorzubeugen [67]. Eine Beeinflussung der Ergebnisse durch Stress oder unterschiedliche Ernährungssituationen der Jungtiere wurde durch Reduktion der vom Muttertier zu betreuenden Tiere auf 10 bis 15 Junge möglichst gering gehalten. Weiterhin wurde bei jedem der Versuchstiere vor und nach der Therapie die Körpertemperatur mit einem digitalen Thermometer oral erfasst, um exogene und individuelle Störgrößen, wie mangelnde Zuwendung des Muttertieres oder Erkrankung eines Versuchstiers zu erkennen und zu minimieren.

2.2.2. Aufarbeitung des Gewebes

Für die histologische Aufbereitung wurden die Versuchstiere unmittelbar nach der jeweiligen Behandlung mit einer Überdosis Chloralhydrat getötet und nach Eröffnung des Thorax über eine transkardial, über den rechten Vorhof in die Aorta gelegte Kanüle perfundiert. Hierfür wurden

ca. 2 ml 4 °C kalter, mit Heparin versehener 0,1 M Phosphatpuffer im Bolus verabreicht, gefolgt von einem Bolus und einer Tropfperfusion mit eiskalter 4%iger Paraformaldehydlösung für weitere 10 Minuten. Danach wurde die Kalotte entlang der Sagittalnaht mit Schere und anatomischer Pinzette eröffnet, so dass das Hirn mit einem Spatel herausgelöst werden konnte. Die Hirne wurden gewogen und zur weiteren Fixierung für drei bis vier Tage bei 4 °C in 4%iger Paraformaldehydlösung aufbewahrt.

Molekularbiologische Analysen erforderten das schnelle Dekapitieren der nicht-narkotisierten Tiere mit einer Schere und Herauslösen der Hirne, wie oben erläutert. Mit feinen Spateln und Rasierklingen wurden nun die einzelnen zu untersuchenden Hirnregionen herauspräpariert, jeweils in einem Eppendorfbehälter in flüssigen Stickstoff gegeben und bei -80 °C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert. Gewonnen wurden die im Folgenden genannten Regionen, welche stets nach linker und rechter Hemisphäre getrennt aufbewahrt wurden: Cortex frontalis (Cfr), Retrosplenialer Cortex (Rsc), Thalamus (Thal), Striatum (Str), Hippocampus (Hip), Cerebellum (Cere).

2.2.3. Histologische Methoden

2.2.3.1. DeOlmos Kupfer-Silber-Färbung

Bei der von DeOlmos und Ingram entwickelten Methode zum Anfärben degenerierter Neurone werden diese dunkelbraun bis schwarz angefärbt und heben sich vom goldgelb gefärbten Hintergrund ab [146, 147]. Die Kontrastierung erfolgt hierbei durch das Einlagern von Silbersalzen in die abgestorbenen Zellen, deren Zellmembranen beim degenerativen Prozess durchlässig werden. Aus diesem Grund ist mit Hilfe dieser Methode keine Differenzierung zwischen nekrotischem und apoptotischem Zelltod möglich [148]. Aus früheren Arbeiten ergab sich aber mittels Elektronenmikroskop, dass es sich beim hyperoxie-induzierten Zelltod vorwiegend um Apoptose handelt [69]. Die Methode ist kostengünstig, jedoch in ihrer Ausführung sehr zeitaufwendig und anfällig gegenüber Störgrößen, wie leichten Verunreinigungen.

Zur Durchführung der Färbung mussten die Hirne zunächst in einen rostralen und einen kaudalen Anteil aufgeteilt und in Agar eingebettet werden. Nach Lagerung in PBS Azid konnten nun mit Hilfe eines Rotationsvibrators 70 µm starke koronare Schnitte gefertigt, aus dem Agar gelöst und in 4%iger Paraformaldehydlösung für vier Tage nachfixiert werden. Nach dreimaligem Waschen der zu färbenden Schnitte in ddH₂O wurden diese bei 40 °C für 48 bis 72 Stunden unter Lichtabschluß in der Kupfer-Silber-Lösung inkubiert. Es folgten eine Reinigung der Schnitte in

reinem Aceton und eine 35-minütige Inkubation in Silber-Diamin-Lösung. Im folgenden Reaktionsschritt wurden die Schnitte für ca. 1 Minute in einer Reduktionslösung belassen und anschließend zweimal in ddH₂O gewaschen. Danach wurden sie in 0,3%iger Kaliumferrizyanidlösung gebleicht, erneut zweimal in ddH₂O gewaschen und zur Fixierung der erfolgten Färbung eine Minute in 0,1%iger Natriumthiosulfatlösung inkubiert. Nach Aufbringen der Schnitte auf Objektträger mittels Permount Mounting Medium konnten sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und mit Deckgläsern versehen werden. Da dieses Protokoll bei der Bearbeitung von Mäusegehirnen aufgrund ihrer Größe nicht exakt ausführbar war, fand für diese Versuchsreihen ein Wechsel zu einem anderen, im Folgenden erläuterten Verfahren statt.

2.2.3.2. Fluoro-Jade-B-Färbung

Dieses, von Schmued entwickelte Färbeverfahren, erwies sich als ebenfalls kostengünstig, bei einem einfachen und schnellen Prozedere und geringerer Störanfälligkeit [149]. Fluoro Jade ist ein anionisches Fluoreszinderivat, welches degenerierte Neurone anfärbt, wobei der genaue Mechanismus noch nicht geklärt ist. Auch diese Methode lässt keine Unterscheidung zwischen Nekrose und Apoptose zu.

Vorbereitend mussten die Hirne ebenfalls in einen rostralen und einen kaudalen Anteil geteilt und nachfolgend in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert werden. Hiernach erfolgte das Imprägnieren in reinem, flüssigen Paraffin für eine Stunde bei 60 °C und ein zweites Mal bei gleicher Temperatur für ca. 12 Stunden. Anschließend konnte das Gewebe in kleine Paraffinblöcke eingebettet, und mit Hilfe eines Mikrotoms in 10 µm starke koronare Präparate geschnitten werden. Nach Aufbringen dieser auf Objektträger wurden sie deparaffinisiert und für 15 Minuten in 0,06%iger wässriger Kaliumpermanganatlösung vorsichtig geschüttelt. Nach einem Waschgang in ddH₂O wurden die Schnitte in Fluoro-Jade-B-Lösung unter Lichtabschluß inkubiert und nach dem anschließenden Trocknen mit D.P.X. nicht-fluoreszierendem Mounting-Medium gedeckelt.

Komponente	Inkubationsdauer bei RT
Xylol	3 x 5 min
Ethanol 100%	2 x 5 min
Ethanol 95%	2 x 3 min
Ethanol 70%	3 min
Ethanol 40%	3 min
dH ₂ O	3-40 min

Tabelle 2.1.: Deparaffinisieren der Hirnschnitte.

2.2.3.3. Immunhistochemische Färbungen für Caspase-3, IL-18 und IL-18R α

Für immunhistochemische Färbungen wurden 5 μ m dicke paraffineingebettete Hirnschnitte auf spezielle Objektträger aufgebracht, welche mit 3-Aminopropyltriethoxysilan beschichtet waren. Diese wurden nach erfolgtem Deparaffinisieren (Tabelle 2.1.) in 10 mM Zitratpuffer bei 750 W in einer Mikrowelle behandelt [150]. Die Schnitte wurden nach zweimaligem Waschen in PBS über 15 Minuten in Wasserstoffperoxid (0,6%) bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach wiederholtem Waschen in PBS erfolgte die einstündige Inkubation in Ziegen Serum bei RT, gefolgt von zweimaligem Waschen in PBS. Die Inkubation mit den jeweiligen Antikörpern für aktivierte Caspase-3 (1:100), Antikörpern für IL-18 (1:200) oder für IL-18R α (1:200) fand über 12 Stunden bei 4 °C statt. Negativkontrollen wurden mit kompetitivem Peptidimmunogen erstellt. Auf die Behandlung mit den jeweiligen primären Antikörpern folgte ein wiederholtes Waschen mit PBS und die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (rabbit anti-goat, 1:200). Es folgten zweimaliges Waschen mit PBS, die Behandlung mit dem ABC-Kit und Färbung mit 0,05% Diaminobenzidin-Wasserstoffperoxid-Lösung. Die Gegenfärbung der positiven Zellen erfolgte nach dem Waschen mit dH₂O mit Mayers Hämalaun. Das Ausdifferenzieren der Schnitte geschah nach der Reinigung unter Leitungswasser mit Hilfe 0,09% HCl (v/v in 70% Ethanol). Es schlossen sich ein Waschgang in Leitungswasser und die Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe an. Nach dem Deckeln der Schnitte mit Permount Mounting Medium konnten sie unter dem Lichtmikroskop ausgewertet und photographisch dokumentiert werden.

2.2.3.4. Stereologisch-optische Dissektionsmethode

Die quantitative Auswertung der Präparate erfolgte mittels stereologischer Dissektionsmethode [151]. Hierbei wurden die koronaren Schnitte standardisiert mit Hilfe eines fixen Zählrahmens (0,05 x 0,05 mm, Dissektorhöhe 0,01-0,07 mm), welcher die zu zählende Fläche bestimmt und in das Okular des Mikroskops integriert war, in kleinere Einheiten aufgeteilt. Eine zuvor getroffene Festlegung bestimmte die jeweilige Größe und Anzahl der Zählraster für die entsprechenden Hirnareale, das Plazieren des Zählrasters über einer konkreten, funktionell zusammengehörigen Hirnregion erfolgte geblindet, dabei jedoch nicht überschneidend. Die jeweiligen betrachteten Hirnregionen sind in Abbildung 2.2. dargestellt. Die Dicke der Präparate musste zum Erfassen aller in einem solchen Bereich liegenden degenerierten Zellen mittels Durchfokussieren berücksichtigt werden und gab dann die Möglichkeit, unter Einbeziehen der verwandten Vergrößerung, ein Volumen und, in Zusammenhang mit den darin ermittelten degenerierten Zellen, eine Dichteberechnung vorzunehmen:

$$k = \frac{1 \text{ mm}}{N} \quad V = k^2 \times d \quad D = \frac{n}{V}$$

k = Kantenlänge eines Zählkästchens [mm]

N = Vergrößerung

V = Volumen [mm³]

d = Schnittdicke [mm]

D = Dichte $\left[\frac{n}{\text{mm}^3} \right]$

n = Anzahl der degenerierten Zellen

Die Auswertung aller ermittelten Dichtewerte der einzelnen Regionen ermöglichte durch Ermittlung eines einem Hirn entsprechenden Gesamtscores degenerierter Zellen einen direkten Vergleich der verschiedenen Versuchsgruppen [152].

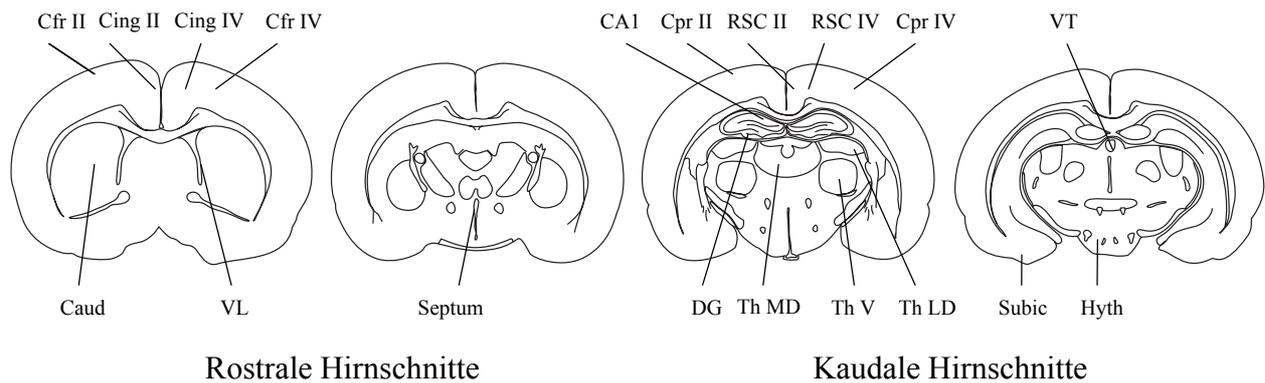


Abbildung: 2.2.: Schematische Darstellung der Verteilung der Hirnregionen.

Dargestellt sind die in den histologischen Methoden betrachteten Hirnregionen in rostralen und kaudalen koronaren Hirnschnitten.

Die Auswertung erfolgte an einem Durchlichtmikroskop, welches die Möglichkeit zur Epifluoreszenzmikroskopie bot, da die Auswertung Fluoro-Jade-B-gefärbter Präparate blaues Licht mit einer Extinktion von 450-490 nm und einer Emission von 515-565 nm erforderte. Positiv gefärbte, degenerierte Zellen erschienen als hellgrün leuchtende Zellen vor einem dunkelgrünen Hintergrund. Die für diese Färbung angefertigten Schnitte wurden bei 20facher Vergrößerung ausgewertet. Bei der Zählung mit Fluoro-Jade-B gefärbter Hirnschnitte von Mäusen wurden die einzelnen Hirnregionen nicht separat betrachtet. Die Ermittlung der Anzahl degenerierter Zellen fand hier jeweils bezogen auf eine Hemisphäre des Gewebsschnittes statt. Die Zählung der nach DeOlmos gefärbten Präparate erfolgte bei einfacher Durchlichtmikroskopie und 40facher Vergrößerung.

2.2.3.5. Statistische Auswertung der histologischen Arbeiten

Die Auszählung der histologischen Präparate erfolgte jeweils geblindet. Die Ergebnisse wurden in der Einheit: degenerierte Neurone pro Kubikmillimeter als numerische Dichtewerte angegeben. Von den insgesamt 17 bearbeiteten Hirnarealen wurden jeweils die Ergebnisse der Einzelzählungen gemittelt und mit Hilfe des Student's t-Test und des Programms GraphPad PRISM™ auf Signifikanz geprüft, um den Unterschied zwischen den Versuchsgruppen, die Standardabweichungen und Mittelwerte darstellen zu können.

2.2.4. Molekularbiologische Methoden

2.2.4.1. Arbeitsschritte der molekularbiologischen Verfahren

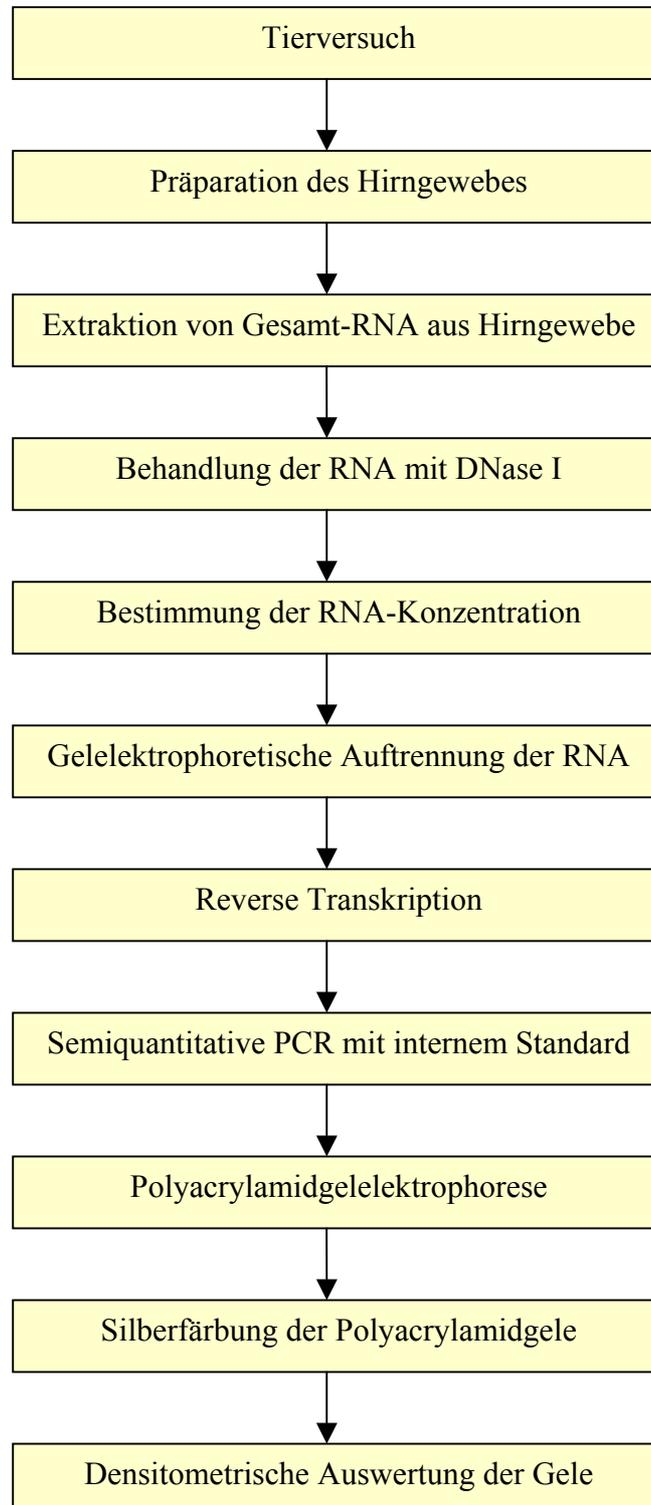


Abbildung 2.3.: Flussdiagramm zur Darstellung der molekularbiologischen Methoden.

2.2.4.2. Extraktion von Gesamt-RNA aus Hirngewebe

Die Extraktion der Gesamt-RNA wurde entsprechend dem Prinzip der Guanidinthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode vorgenommen [153]. Hierzu mussten jeweils etwa 20 bis 50 mg des tiefgefrorenen Gewebes einer Hirnregion in 0,5 ml peqGold RNAPure™ homogenisiert und bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert werden. Die Extraktion erfolgte, indem die Ansätze mit 100 µl Chloroform versetzt und nach 10-minütiger Lagerung bei RT mit 12000 Upm für 5 Minuten in einer Tischzentrifuge zentrifugiert wurden. Anschließend konnte die wässrige Oberphase in ein weiteres Gefäß überführt und 250 µl Isopropanol zugesetzt werden. Sedimentierte RNA erhielt man nach 15-minütiger Inkubation bei RT und Zentrifugieren mit 12000 Upm bei 4 °C für 10 Minuten. Diese Präzipitate wurden dann nach zweimaligem Waschen mit 4 °C kaltem, 75%igen Ethanol in 60 µl DEPC-H₂O resuspendiert. Konzentration und Reinheit der so gewonnenen Proben konnten nachfolgend mit Hilfe eines Aliquots bei 260 und 280 nm im UV-Spektralphotometer vermessen werden. Die Lagerung der extrahierten RNA erfolgte bei -80 °C.

2.2.4.3. RNA-Behandlung mit DNase I

Nach den oben beschriebenen Schritten war nicht sicher auszuschließen, dass die gewonnen Proben noch chromosomale DNA enthalten. Um diese vollständig zu entfernen, fand eine Behandlung mit DNase I statt. Hierzu wurde, gemäß nachfolgendem Schema (Tabelle 2.2.), für jede Probe ein Ansatz vorbereitet, welcher anschließend für eine Stunde bei 37 °C lagerte.

Komponente	Volumen	Endkonzentration
Gesamt-RNA	x µl	1 µg
DNase I (10 U/µl)	2 µl	0,8 U/µl
5x Reaktions-Puffer	5 µl	1 x
ddH ₂ O	ad 25,0 µl	-
Gesamtansatz	25,0 µl	-

Tabelle 2.2.: Ansatz DNase-Behandlung.

Es folgte die Entfernung der DNase I mit einem Volumen Roti®-Phenol/Chloroform. Eine wässrige Oberphase konnte nach erfolgtem Zentrifugieren bei 14000 Upm in der Tischzentrifuge für zwei Minuten bei 4 °C in einem neuen Gefäß mit $\frac{1}{10}$ Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2),

0,5 µl Glykogen (20 mg/ml) und dem dreifachen Volumen eiskaltem 96%igen Ethanol gemischt und bei -20 °C für 12 Stunden inkubiert werden. Bei erneutem Zentrifugieren der ausgefallenen RNA für 20 Minuten bei 14000 Upm und Raumtemperatur, sedimentierte diese und wurde nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem 75%igen Ethanol in 35 µl DEPC-H₂O wieder gelöst. Eine Konzentrationsbestimmung erfolgte anhand eines Aliquots photometrisch bei 260 und 280 nm im Spektralphotometer und beruhte auf dem Absorptionsmaximum der aromatischen Pyridin- und Pyrimidinringstrukturen der Nukleinsäurebasen bei 260 nm [154]. Proteine mit aromatischen Aminosäureresten zeigen ein Absorptionsmaximum bei 280 nm. Der Quotient der beiden gemessenen Werte sollte bei kontaminationsfreier RNA-Lösung bei 1,8-20 liegen. Die RNA-Integrität, welche die Intaktheit der RNA angibt, wurde gelelektrophoretisch geprüft. Die Lagerung der gewonnenen Proben bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei -80 °C.

2.2.4.4. Gelelektrophoretische Trennung der RNA

Zur Prüfung der Integrität der einzelnen RNA-Proben wurde jeweils ein Aliquot in einem 0,8%igen, nicht denaturierenden, horizontalen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Mit DEPC-H₂O wurden 250 ng der RNA-Proben auf ein Endvolumen von 9 µl verdünnt und mit 1 µl Auftragspuffer A versetzt. Um die Sekundärstruktur des Probenmaterials aufzuheben, wurde dieses vor dem Auftrag auf das Gel für 10 Minuten auf 70 °C erwärmt. Die Auftrennung im Gel, gelagert in 1x TAE-Puffer (pH 7,7), erfolgte für eine Stunde bei konstant 10 V/cm. Die folgende Färbung in 0,0001%iger Ethidiumbromidlösung für 30 Minuten ermöglichte nach anschließendem Entfärben in ddH₂O das Sichtbarmachen der RNA unter UV-Licht, was photographisch dokumentiert wurde.

2.2.4.5. Reverse Transkription

Das Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist für die Analyse der Genexpression auf RNA-Ebene geeignet, wenn die DNase I behandelte RNA-Matritze zuvor in cDNA umgeschrieben wird. Dies ist notwendig, da die für eine Amplifikation notwendige Taq-Polymerase die einzelsträngige RNA nicht als Vorlage nutzen kann. Der Vorgang wird als reverse Transkription bezeichnet und geschah mit Hilfe von *Moloney murine leukaemia virus transkriptase* (M-MLV-RT), einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, die zusammen mit folgendem Reaktionsansatz (Tabelle: 2.3.) für 10 Minuten bei 70 °C im PCR-Thermocycler inkubiert und nachfolgend 2 Minuten auf Eis gelagert wurde.

Komponente	Volumen	Endkonzentration
DNase I behandelte RNA	x μ l	500 ng
Oligo(dT) ₁₅ Primer	1 μ l	1,4 μ M
ddH ₂ O	ad 25,4 μ l	-
Gesamtansatz	25,4 μ l	

Tabelle 2.3.: Reaktionsansatz der reversen Transkription.

Im Anschluss wurden diesen Ansätzen jeweils 9,6 μ l des im Folgenden beschriebenen Master-Mix beigemischt (Tabelle 2.4.), im Thermocycler erfolgte dann bei 42 °C für eine Stunde die Inkubation.

Komponente	Volumen	Endkonzentration
10 mM dNTPs	1,1 μ l	0,3 mM
RNAsin (40 U/ μ l)	0,5 μ l	20 U
M-MLV-RT (200 U/ μ l)	1,0 μ l	200 U
5x Reaktionspuffer	7,0 μ l	1 x
Gesamtansatz	9,6 μ l	

Tabelle 2.4.: Master Mix für die reverse Transkription.

Die Inaktivierung der reversen Transkriptase wurde durch einen fünfminütigen Denaturierungsschritt bei 95 °C erreicht, an den sich eine Lagerung der Ansätze auf Eis für 5 Minuten anschloss.

2.2.4.6. PCR mit internem Standard

Eine interne, endogene Standardisierung ermöglichte eine quantitative Abschätzung der Expression spezifischer mRNA. Hierzu erfolgte eine Coamplifikation des Housekeeping-Gens Aktin zusätzlich zum eigentlich zu untersuchenden Gen. Das Amplifizieren von Housekeeping-Genen führte aufgrund der Tatsache, dass diese in den Zellen unabhängig vom Zeitpunkt immer quantitativ gleichmäßig stark exprimiert werden, zu einem konstanten Signal, welches als Vergleichsstandard diente und somit eine semiquantitative Abschätzung ermöglichte. Diese darf jedoch immer nur in der exponentiellen Phase der PCR erfolgen, da ab einer bestimmten Zyklenzahl eine Sättigungsphase erreicht wird, die keine sicheren Unterscheidungen mehr zulässt [155]. Um Spezifität, Effektivität und Präzision dieser Amplifizierung zu erhöhen und

eine unspezifische Primeranlagerung und Primeroligomerisierung zu verhindern, wurden die hier durchgeführten PCR-Schritte mit einem Heißstart begonnen, wobei eine PCR bereits bei einer Temperatur von 94 °C beginnt. Eine so durchgeführte PCR setzte sich aus verschiedenen Reaktionsschritten zusammen: der Denaturierung der cDNA-Matritze, der Hybridisierung der Primer mit der einsträngigen Matritze, was als Annealing bezeichnet wird, und der Extension, welche durch die DNA-Polymerase bewirkt wird und dem Verlängern der hybridisierten Primer entspricht. Die Gewährleistung optimaler Reaktionsbedingungen erforderte das individuelle Anpassen der Annealing-Temperatur und der Zyklenzahl für die Untersuchung der Gene der internen Standards sowie der zu untersuchenden Gene (Tabelle 2.5.).

Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	5 min	94 °C	1
Zyklische Denaturierung	45sec	94 °C	primerspezifisch
Primerannealing	1 min	primerspezifisch	
Primerextension	1 min	72 °C	
Finale Elongation	7 min	72 °C	1

Tabelle 2.5.: Durchführungsschema der semiquantitativen PCR.

Ein zuvor auf Eis vorbereiteter Master-Mix, bestehend aus 10x Taq DNA Polymerase-Puffer, dNTPs, Primern (Tabelle 2.10.), PCR-H₂O und Taq DNA Polymerase, wurde nachfolgend mit der jeweiligen cDNA versetzt und bei 94 °C in den Thermocycler gegeben. Die jeweiligen Sequenzen der Oligonukleotide wurden anhand von Publikationen gewählt und mit Hilfe der Software Primerdesign 4.0 entworfen. Die detaillierte Zusammensetzung der Ansätze wird im Folgenden beschrieben:

Caspase-1 (30 PCR-Zyklen)		
Annealing-Temperatur: 58 °C		
Komponente	Volumen	Endkonzentration
cDNA	1,5 µl	21,4 ng
10x Taq DNA Polymerase-Puffer	5,0 µl	1x
10 mM dNTPs	1,1 µl	0,22 mM
10 µM sense Primer (Caspase-1)	2,0 µl	0,4 µM
10 µM antisense Primer (Caspase-1)	2,0 µl	0,4 µM
2 µM sense Primer (β-Aktin)	1,0 µl	0,04 µM
2 µM antisense Primer (β-Aktin)	1,0 µl	0,04 µM
Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	0,3 µl	1,5 U
PCR-H ₂ O	36,1 µl	-
Gesamtansatz	50,0 µl	-

Tabelle 2.6.: PCR-Ansatz Caspase-1.

IL-1β (28 PCR-Zyklen)		
Annealing-Temperatur: 55 °C		
Komponente	Volumen	Endkonzentration
cDNA	1,5 µl	21,4 ng
10x Taq DNA Polymerase-Puffer	5,0 µl	1x
10 mM dNTPs	1,1 µl	0,22 mM
10 µM sense Primer (IL-1β)	2,0 µl	0,4 µM
10 µM antisense Primer (IL-1β)	2,0 µl	0,4 µM
2 µM sense Primer (β-Aktin)	1,0 µl	0,04 µM
2 µM antisense Primer (β-Aktin)	1,0 µl	0,04 µM
Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	0,3 µl	1,5 U
PCR-H ₂ O	36,1 µl	-
Gesamtansatz	50,0 µl	-

Tabelle 2.7.: PCR-Ansatz IL-1β.

IL-18 (28 PCR-Zyklen)		
Annealing-Temperatur: 55 °C		
Komponente	Volumen	Endkonzentration
cDNA	1,5 µl	21,4 ng
10x Taq DNA Polymerase-Puffer	5,0 µl	1x
10 mM dNTPs	1,1 µl	0,22 mM
10 µM sense Primer (IL-18)	2,0 µl	0,4 µM
10 µM antisense Primer (IL-18)	2,0 µl	0,4 µM
2 µM sense Primer (β-Aktin)	1,0 µl	0,04 µM
2 µM antisense Primer (β-Aktin)	1,0 µl	0,04 µM
Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	0,3 µl	1,5 U
PCR-H ₂ O	36,1 µl	-
Gesamtansatz	50,0 µl	-

Tabelle 2.8.: PCR-Ansatz IL-18.

IL-18Rα (31 PCR-Zyklen)		
Annealing-Temperatur: 58 °C		
Komponente	Volumen	Endkonzentration
cDNA	1,5 µl	21,4 ng
10x Taq DNA Polymerase-Puffer	5,0 µl	1x
10 mM dNTPs	1,1 µl	0,22 mM
10 µM sense Primer (IL-18R α)	2,0 µl	0,4 µM
10 µM antisense Primer (IL-18R α)	2,0 µl	0,4 µM
2 µM sense Primer (β-Aktin)	1,0 µl	0,04 µM
2 µM antisense Primer (β-Aktin)	1,0 µl	0,04 µM
Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	0,3 µl	1,5 U
PCR-H ₂ O	36,1 µl	-
Gesamtansatz	50,0 µl	-

Tabelle 2.9.: PCR-Ansatz IL-18R α .

Primer	Primer-Lokalisation	Sequenz (5'-3')	Größe (bp)	Genbank-Nummer
Casp-1	661-681 979-999	CCAGAGCACAAAGACTTCTGAC TGGTGTGAAGAGCAGAAAGC	339	NM_012762
IL-1 β	522-542 836-856	GACAGAACATAAGCCAACAAG GTCAACTATGTCCCGACCATT	335	NM_031512
IL-18	90-109 468-487	TGGAGACTTGGAAATCAGACC GGCAAGCTAGAAAGTGTCTCT	398	NM_019165
IL-18 α	1276-1296 1515-1535	CCAACGAAGAAGCCACAGACA CTCAGGATGACACTCTCTCAG	260	NM_008365
β -Aktin	1663-1687 2535-2559	CCCTAAGGCCAACCGTGAAAAGATG GAACCGCTCATTGCCGATAGTGATG	433 ^a / 897 ^b	V01217

Tabelle 2.10.: Sequenzen der für die semiquantitative RT-PCR verwandten Primer.

2.2.4.7. Nichtdenaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der kleinen Nukleinsäurefragmente dienten Polyacrylamidgele, die eine feinere Trennung als die bei der RNA-Auftrennung verwandten Agarosegele ermöglichen. Mit Hilfe von ethanolgereinigten Glasplatten wurden 1 mm starke horizontale Gele hergestellt, indem die Spacerplatte, welche mit aufgeklebten Auftragstaschen versehen war, gleichmäßig mit einem dünnen Film Silanlösung benetzt wurde, bevor die Spacer aufgelegt werden konnten. Der anderen Platte wurde mit Hilfe einiger Tropfen ddH₂O luftblasenfrei eine Gelfilmträgerfolie aufgebracht, bevor beide Platten zusammengefügt und eine zuvor vorbereitete Gellösung (Tabelle 2.11.) zwischen Spacerplatte und Trägerfolie gegeben werden konnte, welche horizontal innerhalb von 45 min auspolymerisierte.

Komponente	Volumen
5% PAGE-Lösung	50 ml
TEMED	45 μ l
30% APS	100 μ l

Tabelle 2.11.: Zusammensetzung des Polyacrylamidgels (5%).

Das Gel wurde anschließend für die Polyacrylamidgelelektrophorese verwandt, welche in einem TGGE-Elektrophoresesystem durchgeführte wurde. Dieses System enthielt zwei Pufferreservoirs und eine horizontale, regelbare Kühlplatte, welche mit einer Kühlung von konstant 15 °C einer widerstandbedingten Temperaturerhöhung entgegenwirkte. Auf die Kühlplatte musste hierfür zunächst 0,1%ige Triton-Lösung als Wärmeleiter aufgetragen und das durch die Trägerfolie fixierte Gel luftblasenfrei aufgebracht werden. Die elektrische Spannung zwischen den Pufferreservoirs und dem Gel wurde mittels puffergetränkter Baumwolltücher ermöglicht, eine Glasplatte diente als Verdunstungsschutz. Die Präelektrophorese erfolgte bei 10 W für 10 min. Jeweils 9 µl des PCR-Ansatzes wurden nach der PCR mit 1 µl Auftragspuffer P versetzt, für 10 min bei 70 °C inkubiert und anschließend für 2 min auf Eis gelagert, bevor jeweils 5 µl eines Ansatzes für die Elektrophorese in die Geltaschen aufgetragen wurden. Ein ebenfalls aufgetragener Molekulargewichtsstandard, zusammengesetzt aus 5 µl (20 ng/µl) phiX174 DNA/Hae III Marker und 0,5 µl Auftragspuffer P, diente der Größenabschätzung der verschiedenen cDNA-Fragmente. Die Elektrophorese wurde unter den Bedingungen der Präelektrophorese durchgeführt, wobei nach 15 min die Leistung für weitere 60-80 min auf 35 W angehoben wurde.

2.2.4.8. Silberfärbung der Polyacrylamidgele und densitometrische Auswertung

Mit der Silberfärbung von Polyacrylamidgelen ist es mit einer Nachweisgrenze von 0,03 ng/mm² möglich, Nukleinsäuren nachzuweisen, da diese zu einem veränderten Redoxpotenzial führen und sich das Silber abscheiden kann [156].

Die Durchführung der Silberfärbung des Gels erfolgte dem unten aufgeführten Protokoll (Tabelle 2.12.) entsprechend im Anschluss an die Elektrophorese in einer Plastikschaale auf dem Taumel-Wipptisch.

Komponente	Inkubationszeit
dH ₂ O	3x 2 min
2% Salpetersäure	3 min
dH ₂ O	2x 2 min
Färbelösung A	20 min
dH ₂ O	3x 2 min
Färbelösung B	2x 3 min
dH ₂ O	3x 2 min
1% Essigsäure	3 min
dH ₂ O	2x 2 min
2% Glycerol	5 min

Tabelle 2.12.: Arbeitsschritte und Komponenten der Silberfärbung 5%iger Polyacrylamidgele.

Mit einem weichen, dH₂O-getränktem Schwamm konnten überschüssige Silberniederschläge nach erfolgter Inkubation entfernt werden, das gefärbte Gel wurde für 60 min bei 70 °C getrocknet und im Anschluss daran unter UV-Licht mit Hilfe der Software BioDocAnalyse densitometrisch ausgewertet. Hierbei wurden Fläche und Intensität der silbergefärbten cDNA-Banden ermittelt und jeweils ein relativer Volumenanteil berechnet, welcher als Vergleichsmaß verwendet werden konnte. Aufgrund der hohen Sensitivität der PCR treten häufig Schwankungen der Amplifikationsrate zwischen den einzelnen Reaktionsgefäßen auf, was als *tube to tube variation* bezeichnet wird. Die Standardbanden können demnach, obwohl davon auszugehen ist, dass die Gene der verwandten internen Standards gleichmäßig exprimiert werden, sehr verschieden ausfallen. Die im Folgenden beschriebene Korrektur ermöglichte dennoch das Feststellen signifikanter Expressionsunterschiede.

Der Volumenanteil einer randomisiert gewählten Standardreihe von β -Aktin wurde zunächst 100% gleichgesetzt. Somit war es möglich, anhand dieser internen Standardbande für alle anderen Standardbanden einen prozentualen Anteil zu berechnen. Der so ermittelte interne Standard diente bei der Normalisierung der bearbeiteten Gene als Vergleichswert. Die mRNA-Gehalte konnten somit immer nur als prozentuale Angaben erfolgen, welche sich auf den gleich 100% gesetzten internen Standard bezogen. Signifikante Divergenzen der mRNA-Gehalte ergaben sich ebenso durch Unterschiede ihrer prozentualen Anteile.

2.2.5. Proteinchemische Methoden

2.2.5.1. Arbeitsschritte der proteinchemischen Verfahren

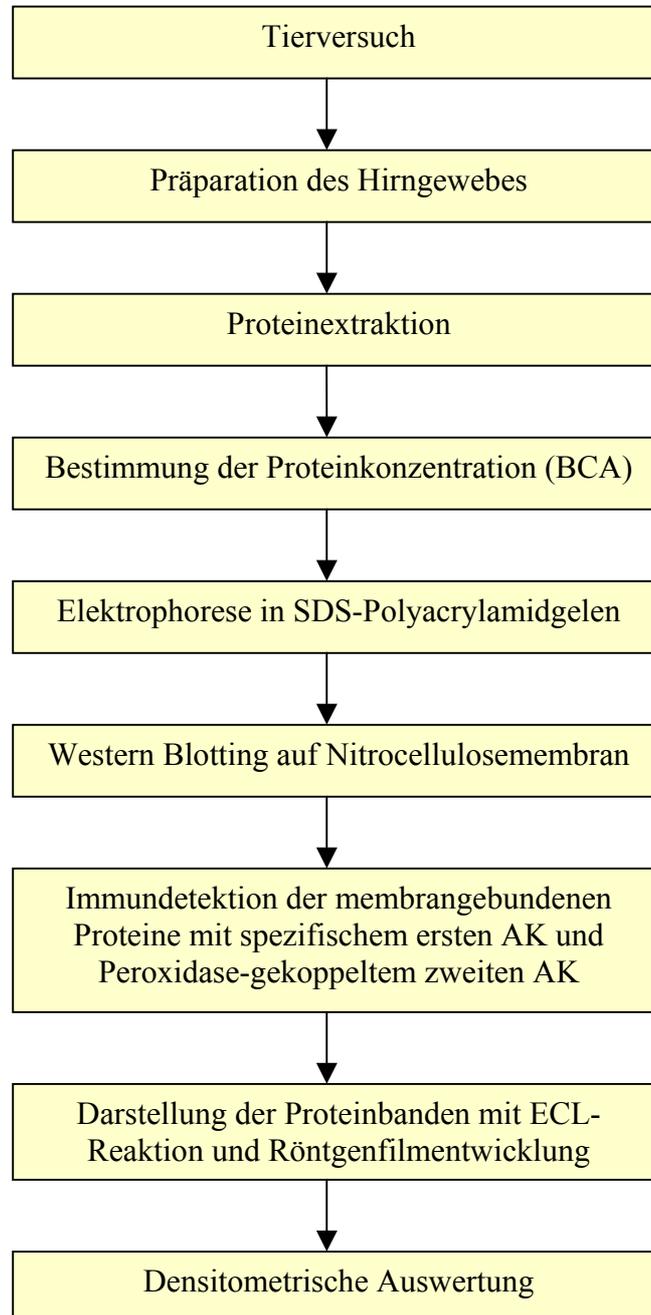


Abbildung 2.4.: Flussdiagramm zur Darstellung der proteinchemischen Methoden.

2.2.5.2. Proteinextraktion

Die quantitative Bestimmung von Proteinen im Hirngewebe erforderte zunächst deren Selektion, wofür im ersten Schritt 20-50 mg der jeweiligen, tiefgefrorenen Gewebeprobe in einem mit 100% Ethanol gereinigtem Glasröhrchen mit 300 µl RIPA-Puffer versehen und durch vier bis fünf vertikale Bewegungen eines mit 900 Upm rotierenden Homogenisationsstabes im Röhrchen mechanisch homogenisiert wurden. Die anschließende 10-minütige Zentrifugierung bei 3000 Upm und 4 °C führte zur Auftrennung in ein festes Sediment, bestehend aus nukleären Proteinen, und eine flüssige Oberphase, welche zytosolische und mitochondriale Fraktionen enthielt. Die Oberphase wurde nochmals bei 17000 Upm und 4 °C für 20 Minuten zentrifugiert, was zur Separierung einer zytosolische Proteine enthaltenden Oberphase führte, welche getrennt aufbewahrt wurde. Das entstandene feste Pellet enthielt den mitochondrialen Proteinanteil, der nach Lösung in 200 µl RIPA-Puffer ebenfalls bei -80 °C gelagert wurde.

Zur Sicherung der oben erwähnten nukleären Proteinfraction mussten dem festen Sediment 200 µl RIPA-Puffer zugegeben werden und eine zweimalige einminütige Lösung des Pellets in einem Ultraschallbad, unterbrochen von einer 30-minütigen Lagerung auf Eis erfolgen, worauf ein Zentrifugieren bei 4 °C und 20000 g für 15 Minuten folge. Das dabei entstandene Pellet enthielt Zelldetritus und konnte verworfen werden, im Überstand waren die nukleären Proteine enthalten, die bei -80 °C aufbewahrt wurden.

2.2.5.3. BCA-Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration

Mit Hilfe eines kolorimetrischen Micro-Bicinchoninsäure-Assay (BCA) erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentrationen der gewonnenen Proben. In alkalischer Lösung führen Peptidbindungen von Proteinen zu einer Reduktion von Cu^{2+} - zu Cu^{+} -Ionen, welche dann mit der im Assay enthaltenen Bicinchoninsäure einen lilafarbenen Chelatkomplex bilden. Dessen Absorption, gemessen bei 562 nm, stellt ein direktes Maß für die Proteinkonzentration der Probe dar.

Die Bestimmung erfolgte in 96-Wellplatten mit Hilfe einer BSA-Standardreihe in einem Konzentrationsbereich von 0,5 bis 100 µg/ml. Von den zytosolischen Fraktionen wurden 1:10-Verdünnungen angefertigt und je Probe 150 µl für eine dreifache Bestimmung in die Wellplatte pipettiert. Nachdem jeder Probe 150 µl BCAssay-Reagenz hinzugegeben wurden, konnte die Platte abgedeckt und für 10sec im Fluoreszenz-Plattenreader geschüttelt werden. Nach einer folgenden einstündigen Inkubation bei 37 °C und Abkühlung auf Raumtemperatur

wurden im Reader bei 570 nm die Absorptionen der einzelnen Proben gemessen, wobei als Leerwert mit BCAssay versetztes PBS diente. Die Berechnung der zytosolischen Proteinkonzentrationen erfolgte automatisch und orientiert an der gleichzeitig ermittelten BSA-Standardkurve.

2.2.5.4. Elektrophorese in SDS-Polyacrylamidgelen

Natriumdodecylsulfat (SDS) wird von Proteinen in der Regel in einem Verhältnis von 1:1,4 gebunden, so dass gestreckte Komplexe entstehen, deren Längen sich proportional zum Molekulargewicht der jeweiligen Proteine verhalten. Die positiven Ladungen der Proteine werden durch das negativ geladene SDS annähernd neutralisiert, was eine Protein-Auftrennung allein aufgrund der jeweiligen Molekulargewichte im SDS-Gel ermöglicht.

Die Herstellung der SDS-Gele erfolgte mit Hilfe zweier Glasplatten, von denen eine mit Abstandshaltern versehen war, und einer Mini-PROTEAN[®]-Gießvorrichtung. Die Gele bestanden aus einem ca. 5cm hohen und 2 mm starken Trenngel und einem darüberliegenden, ca. 2cm hohen Sammelgel, welches die Probenaschen enthielt. Das Gießen der Gele erfolgte schrittweise, indem zunächst die frisch angefertigte Trenngellösung 12,5% eingebracht und zur Reduktion der Oberflächenspannung mit Isopropanol überschichtet wurde. Bei Raumtemperatur fand innerhalb 30 Minuten die Polymerisation des Gels statt, so dass nach dem Entfernen des überschichteten Isopropanols die ebenfalls frisch angesetzte Lösung des Sammelgels und ein Probenkamm zum Anfertigen der Auftragstaschen eingebracht werden konnten. Das Auspolymerisieren des Sammelgels dauerte ebenfalls ca. 30 min.

Die angefertigten Gele wurden im Folgenden mit den Glasplatten in mit 1x Polyacrylamidgelelektrophorese-Puffer befüllte Elektrophoresekammern eingehängt, der Probenkamm wurde entfernt. Die Gelelektrophorese erfolgte nach dem Prinzip der denaturierenden, diskontinuierlichen Elektrophorese, wobei der Elektrophoresepuffer, die pH-Diskontinuität von 2 pH-Einheiten und die Acrylamidkonzentration des Gels zunächst eine Konzentration der Proteine im Sammelgel und dann ihre Auftrennung in einzelne Banden entsprechend der Proteingröße im Trenngel ermöglichten.

Für das Auftragen der Proben in die Geltaschen, war es nötig, die Proteinlösungen nach dem folgenden Schema (Tabelle 2.13.) mit Laemmli-Puffer zu versetzen [157].

Bestandteil	Volumen
Proteinprobenlösung	x μ l
Laemmli-Puffer	18 μ l
PCR-H ₂ O	ad 36 μ l
Gesamtvolumen	36 μ l

Tabelle 2.13.: Probenvorbereitung für den Auftrag auf das SDS-Gel (Proteinkonzentration entsprechend Endvolumen 25 μ g).

Die Proben wurden im Folgenden für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert, was zum Aufheben der Protein-Sekundärstrukturen führte und somit ein Wandern der Proteine während der Gelelektrophorese ermöglichte. Im Anschluss an eine 5-minütige Lagerung auf Eis wurden bestimmte Mengen der Proben und ein Molekulargewichtsstandard (Color Burst™ Electrophoresis Marker), welcher mit definierten Banden das Zuordnen der Proteingrößen ermöglichte, in die Taschen des Gels gegeben. Bei 100 V erfolgte zunächst für ca. 30 min das Durchwandern der Sammelgelphase. Hieran schloss sich die 40-60-minütige Auftrennung der Proteine im Trenngel bei 160 V an. Nach erfolgter Gelelektrophorese wurde das Trenngel für den sich anschließenden Western-Blot gewonnen.

2.2.5.5. Western Blotting

Die im Trenngel befindlichen, ihrer Größe nach aufgetrennten Proteine konnten mit Hilfe eines Semidry-Blotverfahrens im Trans-Blot-SD-System auf die Oberfläche einer Nitrocellulosemembran (Protean BA 83, 0,2 μ m) übertragen werden. Hierzu wurden die Trenngele für 20 min in einem Transferpuffer bei Raumtemperatur unter gleichmäßigem Schütteln inkubiert. Ein mit Transferpuffer getränktes Filterpapier wurde auf die Anode des Trans-Blot-SD-Systems aufgebracht und darüber eine ebenfalls im Transferpuffer inkubierte Nitrocellulosemembran positioniert. Anschließend konnte auf diese Membran luftblasenfrei das Trenngel aufgelegt und mit einem feuchten Filterpapier abgedeckt werden. Nach Auflegen der Anode wurde eine Spannung von 23 V bei 0,4 A für 45 min angelegt, was die vertikale Wanderung der positiv geladenen Proteine aus dem Trenngel in Richtung Nitrocellulosemembran bewirkte. Die Anordnung der aufgetrennten Banden wurde hierbei nicht beeinflusst.

Die Transfereffizienz wurde durch Anfärben mit Ponceau S kontrolliert, welches, ohne die nun auf der Membran gebundenen Proteine zu verändern, in zwei bis drei Waschgängen in TBST bei Raumtemperatur wieder entfernt wurde. Der Inkubation mit dem primären Antikörper ging eine

zweistündige Inkubation der Membranen in 5%iger Magermilchlösung voraus, welche in vier Waschschritten mit TBST wieder entfernt wurde. Dies trug zur Neutralisierung unspezifischer Proteinbindungen bei und gewährleistete somit die spezifische Bindung der Antikörper.

2.2.5.6. Immundetektion der membrangebundenen Proteine

Für die Immundetektion der Proteine waren spezifische, primäre Antikörper nötig, welche jeweils gegen das nachzuweisende Protein gerichtet waren (Tabelle 2.14.).

Protein	Caspase-1	IL-1 β	IL-18	IL-18R α	β -Aktin
Bezeichnung der Antikörper	Rabbit-polyclonal anti-caspase-1	Goat-polyclonal anti-IL-1 β	Goat-polyclonal anti-IL-18	Goat-polyclonal anti-IL-18R α	Mouse-monoclonal anti- β -Aktin
Hersteller	Upstate, Charlottesville, VA, USA	Santa Cruz Biotechnology Santa Cruz, USA	R&D Systems MN, USA	R&D Systems MN, USA	Sigma, St. Louis, USA
Verdünnung primärer AK	1:1000	1:200	1:200	1:200	1:8000

Tabelle 2.14.: Verwendete primäre Antikörper, Hersteller und Konzentrationen.

Die Membranen wurden über Nacht in definierter Verdünnung (Tabelle 2.14.) in 1% BSA/TBST bei 4 °C und leichtem Schütteln inkubiert und anschließend vierfach, jeweils 10 min bei Raumtemperatur in TBST gewaschen, um überschüssige, nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Im Anschluss daran fand die Inkubation mit dem entsprechenden sekundären Antikörper in jeweiliger Verdünnung (Tabelle 2.15.) mit 1% BSA/TBST für 1 Stunde bei Raumtemperatur und ständigem Schütteln statt.

Sekundärer Antikörper	Horseradish peroxidase-linked secondary antibody anti-rabbit	Horseradish peroxidase-linked secondary antibody anti-goat	Horseradish peroxidase-linked secondary antibody anti-mouse
Hersteller	Amersham, Biosciences, Bucks, UK	Vector Laboratories, Burlingame, CA	DAKO, Glostrup, Dänemark
Verdünnung sekundärer Antikörper	1:5000	1:10000	1:10000

Tabelle 2.15.: Verwendete sekundäre Antikörper, Hersteller und Konzentrationen.

Dieser zweite Antikörper war gegen den ersten gerichtet und mit einer Peroxidase konjugiert. Danach erfolgte zur Entfernung nichtgebundener sekundärer Antikörper das vierfache Waschen der Membranen in TBST für jeweils 10 Minuten.

Die gebundene Peroxidase konnte nun in Gegenwart von Wasserstoffperoxid ein zyklisches Diacylhydrazid (Luminol) zu einem instabilen und energiereichen Zwischenprodukt oxidieren, welches anschließend unter Lichtemission wieder in den zyklischen Grundzustand überging. Die emittierte Lichtmenge entsprach somit direkt proportional der Menge Peroxidase-gekoppelter sekundärer Antikörper, welche direkt mit der Menge primärer Antikörper und wiederum membrangebundener Proteine korrelierte. Für diese Substratinkubation wurden zunächst 1,8 µl H₂O₂ mit 3 ml der ECL-Lösung II vermischt. Dieser Mischung wurden nach starkem Schütteln 3 ml der ECL-Lösung I hinzugegeben und erneut kurz geschüttelt. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Luminollösung, fanden diese Schritte im abgedunkelten Raum statt. Die zuvor kurz luftgetrocknete und in einer Plastikbox befindliche Membran wurde nun gleichmäßig mit der Lösung bedeckt und unter leichter Agitation für etwa 1 min inkubiert, wobei diese Inkubationszeit individuell an die Aktivität der jeweiligen Antikörper angepasst werden musste. Im Anschluss hieran konnte die Membran aus der Substratlösung entfernt, abgetropft und luftblasen- und faltenfrei in Haushaltsfolie eingehüllt werden. Unter Rotlicht fand anschließend die Entwicklung mit Hilfe einer Filmkassette, eines Röntgenfilms und einer Röntgenfilm-Entwicklungsmaschine statt. Quantitativ konnten die so erhaltenen Proteinbanden schließlich mittels TINA 2.09g Software densitometrisch erfasst werden.

Um vergleichbare Werte zu erhalten, war bei jeder Membran ein Abgleichen gegen das interne Standardprotein β -Aktin notwendig. Hierfür mussten die an die Proteine gebundenen ersten und zweiten Antikörper in einem im Folgenden beschriebenen Stripping-Verfahren entfernt werden.

2.2.5.7. Entfernen gebundener Antikörper von membrangebundenen Proteinen

Nach zweimaligem Waschen in TBST für jeweils 10 min bei Raumtemperatur wurden die Membranen zum Entfernen der Antikörper für 1 Stunde bei 50 °C in Stripping-Puffer inkubiert. Anschließend wurden Rückstände dieser Lösung durch 4 Waschschrte, jeweils 10 min in TBST, entfernt und es konnte eine erneute, wie unter 2.5.5. beschriebene Immundetektion erfolgen.