

II. Material

A. Lösungen

Produkt Name	Firma	Katalog #
5M Sodium Chloride Solution	Sigma	S-6316
Distilled Water DNase, RNase free	Gibco	Q4625
Hi-Density TBE Sample Buffer(5x)	Invitrogen	LC6678
NuPAGE 12% Bis-Tris Gel	Invitrogen	NP0341BOX
NuPAGE MES SDS Running Buffer (20X)	Invitrogen	NP0002
NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X)	Invitrogen	NP0007
NuPAGE® Transfer Buffer (20X)	Invitrogen	NP0006
TE Puffer (10x)	Sigma	T4415
Tris-Borate-EDTA Buffer (10x)	Sigma	T-4415

B. Substanzen

Bezeichnung	Firma	Katalog #
2-Mercaptoethanol	Sigma	M-3148
Agarose	Eurogentec	EP-0010-01
Albumin from bovine serum	Sigma	A2153
Aqua Poly/ Mount	Polysciences	#18606
Blotting Grade Blocker non-fat dry Milk	BioRad	170-6404
Ethidium Bromide Solution	Sigma	E-1510
Hi-Density TBE Sample Buffer (5x)	Invitrogen	LC6678
Liquid DAB	BioGenex	HK153-5KE
Natriumchlorid	Merck	1.06404
NuPAGE Sample Reducing Agent (10x)	Invitrogen	NP0004
Polyoxyethylene-sorbitan monolaurate (Tween20)	Sigma	P-5927
Rotihistol	Roth	6640.2
SDS ultra pure	Roth	2326.1
SeeBlue Plus 2	Invitrogen	LC5925
SuperSignal West Pico	PIERCE	#34077
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck	1.08382
Triton X-100	Fluka	93426
Trizmahydrochloride	Sigma	T3253

C. Kommerzielle Test Systeme (Kits)

Kit Name	Hersteller	Katalog #
Advantage RT for PCR-Kit	Eurogentec	K1402-1
DNAfree Kit	Ambion	1906
qPCR Core Kit	Eurogentec	RT-QP73-05
Total RNA Isolation Reagent	ABgene	AB-0303
Rneasy Micro kit	Qiagen	74004
PicoPure RNA isolation kit	Arcturus	KIT0204
Absolutely RNA Microprep Kit	Stratagene	400805
HistoGene LCM Frozen Section Staining Kit	Arcturus	KIT0401
Uracil-DNA Glycosylase	Eurogentec	ME-0610-03

D. Geräte

Gerätebezeichnung	Firma
ABI Prism 7700 & ABI Prism 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems
Box	Syngene
Centrifuge 5417R	Eppendorf
Geldoc	Bio-Rad
GenAmp PCR 9700	Applied Biosystems
Multipette Plus	Eppendorf
Mupid-exu (DNA Gelkammer)	Eurogentec
PR2003 DeltaRange (Feinwaage)	Mettler
Reference (Mikropipetten)	Eppendorf
Thermomixer 5436	Eppendorf
XCell II BlotModule (Transfer Kammer)	Invitrogen
XCell SureLock (Western Blot Kammer)	Invitrogen

E. Antikörper

Bezeichnung	Spezies	Western Blot (s. III.C. 2)	Immun-histo- chemie (s. III.D)	Firma	Katalog Nr.
Esel Serum	---			Chemicon	
Von Willebrand	Kaninchen		1/200	Dako	A0082
Occludin	Kaninchen		1/100	Zymed	OC-3F10
Laminin	Kaninchen		1/50	Dako	Z0097
FITC-RCA-1			1/20	Vector	FL-1081
FITC-UEA-1			1/100	Sigma	L-9006
Kaninchen IgG Cy3	Esel		1/100	Jackson Labs	
Kaninchen IgG	Ziege	1/20000		Biozol	ab6721
Ziege IgG	Esel	1/20000		Biozol	ab6885

Maus IgG	Ziege	1/20000		Biozol	ab6789
NrCAM	Maus			Biozol	ab24344
MAP1b	Maus	1/500		Biozol	ab11266
NCAM	Kaninchen	1/500		Biozol	ab9018
Aktin	Kaninchen	1/500		Biozol	ab1801
GPR37	Kaninchen		1/100	Biozol	ab13375
Neuronal Pentraxin II	Ziege	1/200		SantaCruz	sc-12125
Glutamate Rezeptor2	Kaninchen	1/1000		Chemicon	ab1768
CD44	Maus	1/500		Biozol	ab9524
CXCR2	Kaninchen	1200		Santa Cruz	sc-683
CXCR1	Kaninchen	1/200		Santa Cruz	sc-658
CXCr3	Ziege	1/100		Santa Cruz	sc-9902
CXCR5	Ziege	1/100		Santa Cruz	sc-8180
CXCL13	Ziege	1/100		Santa Cruz	sc-8181
CXCL10	Ziege	1/100		Santa Cruz	sc-1406
CCL2	Ziege	1/100		Santa Cruz	sc-1785
CCL3	Ziege	1/100		Santa Cruz	sc-1387
CCR1	Kaninchen	1/200		Santa Cruz	sc-7934
MOBP	Kaninchen	1/500		Santa Cruz	sc-25666
Kinesin 5B	Kaninchen	1/500		Biozol	ab5629

F. ELISA Kits

Bezeichnung	Firma	Katalog #
ELISA Quantikine® M Mouse		
TFN- α	R & D Systems	MTA00
IFN- γ	R & D Systems	MIF00
sVCAM-1	R & D Systems	MVC00
VEGF	R & D Systems	MMV00
KC	R & D Systems	MKC00
MIP-1 α	R & D Systems	MMA00
MIP-1 β	R & D Systems	Nr MB00
MIP-2	R & D Systems	MM200
Mouse JE/MCP-1	R & D Systems	MJE00
RANTES	R & D Systems	MMR00
IL-1 β	R & D Systems	MLB00
IL-4	R & D Systems	M4000
IL-6	R & D Systems	M6000
IL-10	R & D Systems	M1000
IL-12p40	R & D Systems	M1240
Mouse IL-18 Elisa Kit	Medical & Biological Lab	R&D 7625
Active MBP ELISA	Diagnostic Systems	DSL-10-58200i
Human Transferrin (Tf) ELISA	Alpha Diagnostics Intl.	1210
Human sCD44std ELISA	Bender MedSystems	BMS209/2

G. Software

Software Name	Hersteller
GeneTools	Syngene
GeneSnap	Syngene
GelDoc	BioRad
PrimerExpres	Applied Biosystems
SDS-Gene	Applied Biosystems

H. Verbrauchsmaterialien

Materialname	Firma
96-well Platten	Appliedbiosystems
CapSure Macro LCM Caps	Arcturus
Küvetten	Eppendorf

I. qRT-PCR Primer für die Analyse der muriner Genexpression

Gen	F-Primer	R-Primer	Sonde
CCL2	gagcatccacgtgttgct	tggtgaatgagtagcagcaggt	agccagatgcagttaacgcccact
CCL20	tggcaagcgtctgctcttc	tgctgctctgcctggct	gtgagccagcagtagccatgccc
CCL3	ccaagtctctcagcgcca	gcaaaggctgctggttca	agctgacaccccagctgctgc
CCL4	tcagcaccatgggctctg	ctgtgaagctgccgggag	ccctcccacttctgctgttctcttaca
CCL5	gcaagtgtccaatcttgca	cttctctctgggtggcaca	ttgtcactcgaaggaaccgccaagt
CCL6	ccagcgcgagagagtca	caagcaatgacctgttcca	agcacctgaagcaaggcccaga
CCL7	catgctgctatgtcaagaacaaa	aggacaccgactactgtgga	ccccaaagaggaatctcaagagctacagaagg
CCR1	aggcccagtgagggttcac	agaggcaaaattagccaagaagg	caccgtacctgtagccctatttccc
CCR2	cagtgccagtttctataggga	ccaaccgagacctctgc	cagcagatcgagtgagctctacattcactcc
CCR5	ccatgcaggcaacagagactc	cttctctccaacaaggcatagatg	tggaatgacacactgctgctaaaccc
CD11b	ctgcatgtccggaggaaatt	ccatcgtctgtggcaaacac	tggcgcaatgacagggctg
CD11c	ccaactaggtgacctccaagtact	aagatggcccgggtactca	tgacctggctctagaccatggccg
CD13	tccaccatcatcagcattgc	cggacaaagtccaaaccag	agcaacgtggctggccacc
CD14	cagccctctgtcccctca	gtctccatcccgcgta	ttcccgacctccaagtttagcgc
CD3g	cattgagctaaacataggcaccat	accaagagcaaggaagaagatgc	tccggctttatctcgctgaggtcatc
CD4	ctcagctgaaggaacgct	gccagaaccagcaaacgaag	ccactaccctcaagataccccaggtct
CD45	tgggactgctgagaagtgca	ggccgggagggtttcatt	cacaaaagcagatcgccagacaagggtca
CD68	caggcagcacagtggacatt	aagctttggcccaaggga	atggcgcagaattcatctctcgagagc
CD80	tgaagaccgaatctactggcaa	gggccacacttttagttccc	catgacaaagtggctgtctgtcattgc
CD86	tggccctcctctgtgat	ctggcctgctaggctgat	ctgctcatcattgtatgtcacaagaagccc
CD8beta	aagccggcccttctcag	caaccgtcgcgcagaagt	tcatgaatgtgaagccagaggacagtgac
Claudin11	gtatgtgccaccgcgag	caccgatccaacctgcgta	caccatcgtgagctttggctactcgc
COX2	cagaaccgattgcctctg	ttgaaggctcgggcagc	ttcaacacactctactggcaccccc
CX3CR1	gtgctccgcaactcgaa	gcaaaagctcatgataagcaagg	tcaacatcctgggctcgcctg
CXCL1	cctatcgcaatgagctgc	ctggatgttctgaggatcc	ctgtcagtcctgcagaccatggct
CXCL10	gacggtccgctgcaactg	agcttcctatggccctcatt	tactggccgctcatcgataggat
CXCL11	ggcgctgtcttgcac	aagcttctcgtactctgcat	ccccgggatgaagccgctca
CXCL12	ccctgccggtcttctga	caacaatctgaaggccacagttt	tcgccagagccaacgtcaagca
CXCL13	tggccagctgcctctctc	tccgatctatgatgttagaccga	aggccacggtattctggaagcccatt
CXCL2	gcttgagtgtgacgccc	aacttttgaccgcccctga	tgcgccagacagaagtcatagcca

CXCL4	ctggaggtgatcaaggcagg	cccattcttcagggtggct	ccactgtgcggtccccagctc
CXCL5	cgctaattggaggtgatccc	agacctcctctggttttcagttt	ccacagtgcctacggtggaagtc
CXCL7	atgtgtacaggccaggagtca	aacctccaagatttcatgacga	agtgtggctatcactccacatcagcaca
CXCL9	gaacggagatcaaacctgcc	tctttcccattcttcatcagc	tcttcacattgcccagctccggtct
CXCR1	cgtccatgccaccctgac	atgccacgcacacgaat	ctggcccgaagcgctacttggtta
CXCR2	cacctctttaaggcccaca	ggaagacaaggacgacagcg	atgaccgcgatggcccgtt
CXCR3	cacaggatttcagcctgaacttt	gcagcccagcaagaaga	cttctgccagccctctacagcctc
CXCR3ko	cccgcaactgtggtcgag	aacaacatccacatttgcctctg	tgctgcctcaatccgctgctctatg
CXCR4	ggtgatcctggtcatgggt	ctgacaggtgcagccggta	tgtccgtcatgctccttagcttctctgg
CXCR5	ccaggaaaacgaagcgga	ggtagtaggaagccccgat	tagagcctggtcactcccgtttcc
Cyclophilin	gctgaagcactacgggct	tgtggttatgagaactgtgagcc	ctgcattggccatgctcaccag
GapDH	tactggcatggccttc	cctgctcaccaccttctga	cctacccccaatgtgtccgctgtg
GFAP	cgagaaggtcgcttctg	tcctgggtgctcgaagctgg	cagttcagctgccagcgcctgtt
ICAM1	cggaagggagccaagtaactg	cgacgccgctcagaagaa	cggaagggagccaagtaactg
IL10	cactgctatgtgcctgctc	tgcttcccggctgtactgg	ccctgctgatcctcatgccagtc
IL12p40	tcagtgtcctgccaggagg	tttattctgctgccgtgctc	accctgccattgaactggcgtt
IL18	ttattgacaacacgctttactttatacct	tattccgtattactgcggtgtaca	cctggaatcagacaactttggccgac
IL1β	tcaggcaggcagtatcactca	ggaaggtccacgggaaaga	caggtagctgccacagcttctccaca
IL4	ctcatggagctgcagagactctt	cattcatgggtgcagcttatcga	gaatccaggcatcgaaaagccc
INOS	gtgacggcaaacatgacttcag	gccatcggcatctggtta	tggaattcacagctcatccggtacgc
IP10	ccctctcgcaaggacggt	caagcttccctatgccctc	tcactggcccgtcatcgatattgga
Occludin	tgaacagcccccaatgt	tggactgtcaactctttccgc	caggcacacaggacatgctcca
OX40L	tcttctctcctccggcaaag	tgaatagtgccatcctcaca	tccaatcaaagactcagaggagcagttacc
RGS-5	cccagaaaaggatctatgcc	tcctataaaattcagagcgcaca	atggagaaggattctctgccccgct
TGFbeta1	gagcccgaagcggacracta	gatggcgtgtgctggctc	aaagaggtcaccgcggtgtaattgt
TNFalpha	ctccaggcgtgtcctatgt	gaagagcgtgggtggccc	agcctcttctcattctgcttgggca
VCAM-1	aaaacgatcgctcaaatcgg	gggtactcgcagcccgtta	tccatggccctcacttcagca
VEGF	cttctgctctctgggtgca	tgggaccacttggcatgg	tggaccctggcttactgctgtacctcc

J. qRT-PCR Primer für die Analyse der humanen Genexpression

Gen	F-Primer	R-Primer	Sonde
AMPA2	ctgacacccacatcgacaa	aactgggagcagaaagcattagtg	tgccaagctgtttgccacctcca
CD34	gcaagccaccagagctattcc	tccagctgcggcgatt	ccctgctggctgtcttgggca
CD44	ggcgcagatcgatttgaatataac	ggcctccgtccgagaga	ccgctttgcaggtgtattccacgtg
CD68	gctacatggcgggtggagtaca	gaaagaatgatgctcgagttgct	tgtgtccttccccacgcagc
CDH 5	ccattttccagcagccttcta	ggaagaactggccttgc	aggcatagcattggatactccatccgc
CNPase	agagtgaagacgctcttcatct	acaccatcttggtgccatca	tgccaggaagcggcaagtccac
CXCL10	tggcattcaaggagtacctctct	tggcttgcaggaataattca	accgtacgctgtacctgcatcagca
CXCL11	caaggcttccccatgttca	tgggtacattatggaggcttc	aggacgctgtcttgcataggccctg
CXCL12	cagatgccatgccgatt	tcgggtcaatgcacacttgt	tcgaaagccatgttgcagagcc
CXCL13	cgacatctctgcttctcatgct	tggacacatctacacctcaagctt	tggtagcagcctctctccagtcca
CXCL9	ggcatcatcttctggttctg	gattgtaggtggatagctccctggt	agggtcgtgttctgcatcagca
CXCR3	ctgccgtccagtggtctt	atgttcaggtagcggcaaacg	ccctctgctggcctgcatca
CXCR5	ggtcaccctaccacatcgatcat	gagcattcagctgcaggtat	tcttggacaccctggcgaggc
cycloB	catctacgggtgagcgttcc	gatgaagaactgggagccgtt	acttcaaactgaagcactacgggctg
GABAR3b	accggagtggaaaggattga	agctcagtgcagctgaggtatgg	tccatcgtggagcaccgtctgg
Gapdh	gaaggtgaaggtcggagtc	gaagatgggtgatgggatttc	caagcttcccgttctcagcc
Glypican1	gccctgccctgactattgc	gacactctccacaccgatgt	aggaacctctggactccatggtgc
GPR37	ctctgggagtcaccaccttca	cagtttctgatcttctgtagtacatc	cgcttccgtgctgccaccaa
GSK3b	cagacgctcctgtgatttat	aacaagaggttctgctggtttaataatc	ccattccttggaaatctgccatcgg

HPRT-3'	gacccacgaagtgttgatata	ctgaagtattcattatagcaagggcat a	tgaaattccagacaagttt-mgb
HPRT-5'	gccctggcgtcgtgatt	tccatgaggaataaacaccccttc	ttgcatacctaatacattatgct-mgb
IBA-1	gcaattcctagacgatcccaaatat	attaagggtcaaacccatgtatttctct	atctgccctccaaactggaaggcttc
KIF5b	tgtgtcgttcagacctctca	gaacacccgatcaaatgcataag	ctgaagtgaaccgcgcgacaag
MAP1b	agtcgaagcctacgtcatcca	ttcgccctccccttcagt	agagagaagtcaccaaaggctctgccga
MBP	cacagcaagtaccatggacat	ccctgtcaccgccaaga	ccaaggcacagagacacgggc
NCAM	tgggctgtgcaaacaat	ggcgctggcagtt	cgacgcaaaggcccagca
RGS5	gagaaggcaaagcaaattatga ag	gtgatgtccttagtgaagtggtaaat	ttcattcaaacggaggctcctaaagagggtg
SorLA	ggaaataggagtgaagctgttatc g	cccgaaatgggatggaaaa	ccagttctaccacagccctgcggac
TBXA2R	ggactccgaggtggagatgat	tcatggcaggggggtt	tggcttcatcgcccagacagtgtct
Transferrin	cgagaggctcaagtgtgatgagt	catggcatcagcttccatt	ccaccgaagactgcatgccaa

III. Methoden

A. *Durchführung der MCAO*

Für die Versuche wurden männliche Mäuse des Stammes SVJ129 verwendet mit einem Gewicht von 20-25 g. Die Tiere wurden mit Halothan narkotisiert und anschließend die Operation durchgeführt.

Dazu wurde die linke Arteria Carotis Interna freigelegt und durch einen Schnitt vor der Arteria Rterygopalatine ein silikonisierter Faden eingeführt. Dadurch wurde die zerebrale Arterie verschlossen. Bei einer transienten MCAO, wurde die Maus nach 1h erneut narkotisiert, der Faden entfernt und der Operationsschnitt in der Arterie mit drei Stichen verschlossen.

B. *Molekularbiologische Methoden*

B. 1. RNA Extraktion

1.1. RNA Extraktion aus gefrorenem Maushirngewebe

Zur Extraktion der „Gesamt-RNA“ des Hirngewebes wurden pro 100 mg Gewebe 1 ml Total-RNA-Isolation-Reagenz hinzugegeben und die Gewebe mittels eines Ultraturax homogenisiert. Nach 5 Min. Inkubationszeit auf Eis wurden 200 µl Chloroform hinzugegeben und die Probe gemischt. Zur Trennung der wässrigen und phenolhaltigen Phase wurden die Proben nach 5 Min. Inkubation auf Eis bei 20.800 g und 4°C für 15 Min zentrifugiert. Nach Überführung der oberen wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß wurde die Phenol-Phase für eine weiterführende Proteinaufarbeitung im Kühlschrank aufbewahrt (s. III.C.1.1). Die RNA wurde aus der wässrigen Phase durch Zugabe eines gleichen Volumens Isopropanols und 10 Min. Inkubation auf Eis gefällt. Durch Zentrifugation bei 20.800 g bei 4°C für 10 Min wurde die RNA pelletiert. Der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurde die RNA zweimal mit 1 ml Ethanol (75 %) durch Zentrifugation bei 20.800 g bei 4°C für 5 Min. gewaschen. Danach wurde die RNA in 100 µl RNase freiem Wasser aufgenommen und bei 60°C für 5 Min. gelöst. Zur Stabilisierung wurde die RNA anschließend in 250 µl Ethanol (95 %) und 10 µl 3 M NaCl gefällt und bei – 80 °C gelagert.

1.2. RNA Extraktion aus Maus-Leukozyten

Zur Extraktion der RNA aus Leukozyten wurde das QIAamp RNA Blood Mini Kit verwendet.

Zur Trennung des Blutplasmas wurde das Blut bei 1600 rpm und 15°C für 10 Min. zentrifugiert und der so erhaltene Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die pelletierten Leukozyten wurden in 800 µl NaCl gelöst und die Erythrozyten durch Zugabe von 4 ml EL-Puffer, Inkubation für 15 Min. auf Eis und mehrmaliges Vortexen lysiert. Die Leukozyten wurden dann bei 400 g und 4°C für 10 Min. pelletiert und nach Abnahme des Überstandes mit 2 ml EL-Puffer nochmals gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Leukozyten in 600 µl RLT- Puffer durch mehrmaliges Pipettieren lysiert. Die Lösung wurde dann auf eine QIAshredder-spin-Säule gegeben und bei 20.800 g für 2 Min. zentrifugiert. Nach Zugabe von 600 µl 70 % Ethanol wurde die Lösung auf eine QIAamp-spin-Säule gegeben und die gebundene RNA durch Zentrifugation bei 8.000 g für 15s gereinigt.

Die RNA wurde dann nacheinander mit 700 µl RW1-Puffer und zweimalig mit 500 µl RPE-Puffer und Zentrifugation gewaschen. Nach einer letzten Zentrifugation für 3 Min. bei 20.800 g wurde die RNA durch Zugabe von 30 µl RNase freiem Wasser und Zentrifugation bei 8.000 g für 1Min. in ein neues Reaktionsgefäß eluiert. Die RNA wurde mittels des Ribogreen-Kits analysiert.

1.3. RNA Extraktion aus humanem post mortem Hirngewebe

Da die vorhandenen Gewebestücke für weitere Versuche verwendet wurden, wurden jeweils nur ca. 100 mg Gewebe mittels eines Cryostaten von den Blöcken abgetrennt und in einem gekühlten Reaktionsgefäß gesammelt. Nach Zugabe von 1 ml Total-RNA-Isolation-Reagenz wurde das Gewebe mittels Spritze mit einer 21 G-Kanüle homogenisiert. Danach wurde die Extraktion wie unter 1.1 beschrieben durchgeführt.

1.4. Laser-capture-Microdissection (LCM) von Blutgefäßen aus gefrorenen Hirnschnitten

Aus Schnitten von gefrorenen Gewebestücken wurden mittels der Laser-capture-Mikrodissektion Gefäße welche mit RCA-1 angefärbt wurden (s. III.D.1.3) mit Hilfe des Arcturus-LCM-Systems extrahiert. Dieses System funktioniert durch das

selektive Anhaften eines Klebefilms auf einem fixierten Gewebe. Dazu wird der auf einem Träger (Cap) befestigte Film durch einen Laserimpuls erhitzt und somit kurzzeitig auf das Gewebe gedrückt, wodurch die zu extrahierenden Zellen am Film haften und beim Abnehmen des Trägers vom restlichen Schnitt getrennt werden.

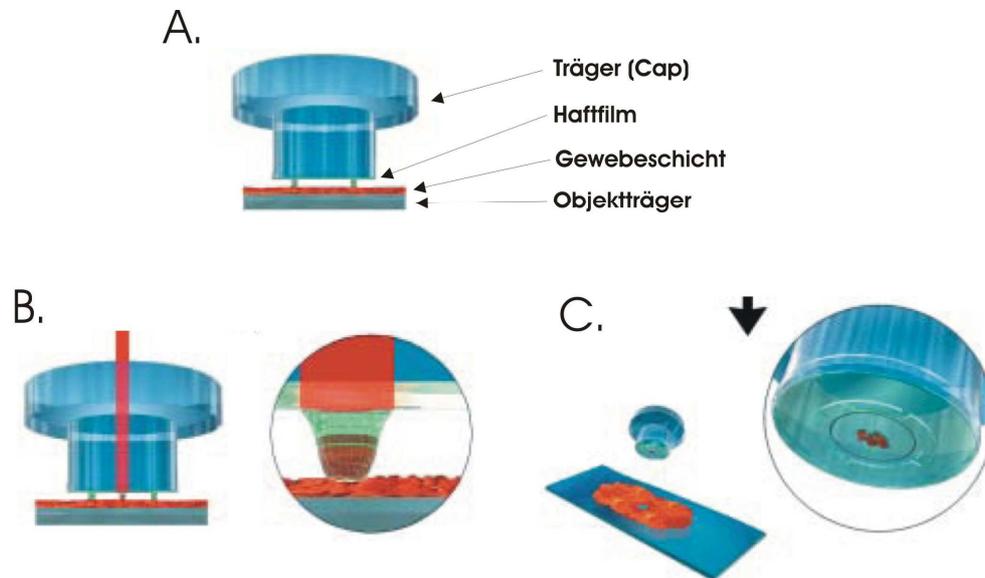


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Zellextraktion mittels des Arcturus-LCM-Systems. A. Über dem Schnitt wird ein Objektträger mit Klebefilm positioniert. B. Durch einen kurzen Laserimpuls wird der Film erhitzt und dadurch ausgestülpt. Dabei haftet er an den selektierten Zellen fest. C. Durch Abnehmen des Trägers werden die dissektierten Zellen abgenommen. (nach <http://www.arctur.com>)

Dazu wurden die gefärbten Schnitte im Fluoreszenz-Mikroskop fixiert und der Laser entsprechend justiert, so dass die Klebefläche der LCM-Objektfolie einen Haftdurchmesser von 10 - 13 μm hatte. Dann wurden die RCA-1 markierten Zellen selektioniert und von jedem Schnitt jeweils $\sim 200.000 \mu\text{m}^2$ Gefäße isoliert. Für die Genexpressionsanalyse, wurden von jeder Gewebeprobe drei Extraktionen durchgeführt und diese im zusammengeführt. Die Extraktion der RNA aus den gesammelten Proben wurde wie in III.B.1.5 beschrieben durchgeführt.

1.5. RNA-Extraktion aus LCM extrahierten Proben.

Die LCM-Objektträger mit den gesammelten Proben wurden auf ein 0,5 ml-Reaktionsgefäß gesteckt und mit 50 μl Extraktionspuffer für mindestens 30 Min. über Kopf bei RT inkubiert. Durch kurze Zentrifugation wurde die Probe gesammelt und durch Zugabe von 50 μl Ethanol (70%) wurde die RNA gefällt. Zum Binden der

RNA an die Membran wurde die komplette Probe auf die Säule gegeben und für 1 Min. bei 1.000 g zentrifugiert. Nach Waschen mit 100 µl W1-Puffer wurde ein DNase-Verdau durchgeführt (s. III.B.3.1(2)).

Nach erneutem Waschen mit 40 µl W1 und Zentrifugation für 1 Min. bei 8.000 g wurde die Probe zweimal mit 100 µl W2-Puffer gewaschen. Um sämtliche Pufferreste zu entfernen, wurden die Säulen erneut für 1 Min. bei 16.000 g zentrifugiert. Zur Elution wurden die Säulen auf ein frisches Reaktionsgefäß gesetzt und die Probe wurde mit 15 µl EB-Puffer bei 16.000 g für 1 Min. zentrifugiert.

B. 2. Analyse der RNA-Proben

2.1. RNA-Bestimmung mittels UV-Absorption

Zur Bestimmung der Menge an gelöster RNA wurden 2 µl der Probe in 98 µl RNase-freiem Wasser verdünnt und die Absorption dann in einer Küvette bei 260 nm und 280 nm gemessen. Aus diesen Daten wurde mittels der Formel 1 die Konzentration der RNA errechnet:

$$\text{Formel 1: } c[\mu\text{g} / \text{ml}] = A_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnung} \times 40\mu\text{g} / \text{ml}$$

Der Quotient $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ dieser Messung ergab einen Hinweis über die erfolgreiche Auftrennung von RNA und Proteinen. Bei einem Wert von 2 war die Aufreinigung optimal und bei Werten >1.5 war die Aufreinigung ausreichend.

2.2. RNA-Analyse mittels eines Bioanalyzers

Die Analyse von RNA mittels des Bioanalyzers unter Verwendung des RNA 6000 Nano Chips erlaubt sowohl eine genaue Bestimmung der RNA-Menge als auch Aussagen über die RNA-Qualität. Dabei erfolgt eine elektrophoretische Auftrennung der Proben durch ein Gel, welches vorher in die Kapillaren eines Chips aufgetragen wurde. Nach der Auftrennung erfolgt die fluorometrische Messung der verschiedenen RNA-Moleküle.

Zur Messung von 12 Proben wurden jeweils 9 µl des Gels in das Reservoir gegeben und der Chip befüllt. Anschließend wurden in die beiden zusätzlichen Reservoirs ebenfalls 9 µl Gel vorgelegt. Dann wurden alle Probenkammern und die

Kammer für den Marker mit 5 µl RNA Marker befüllt. Danach wurden die Proben bzw. die Standardleiter-Größenreferenzprobe mit den verschiedenen RNA-Größen und -Mengen zur Standardisierung in die einzelnen Kammern gegeben und durch 30 s Vortexen im Chip verteilt. Anschließend wurde der Chip gemessen und die Daten mittels der Software ausgewertet.

2.3. Qualitative Analyse der RNA mittels Gelelektrophorese

Zur Analyse der Proben mittels Gelelektrophorese wurden 3 µg RNA mit 5 x Ladepuffer gemischt und die Proben wurden in einem 1 % TBE-Gel mit Ethidiumbromiden (EtBr) elektrophoretisch in 1x TBE-Puffer getrennt. Dabei wurde das Gel mit 100 V für 45 Min. gefahren. Die Analyse des Gels erfolgte mittels des GelDoc-Systems. Dabei wird das Gel unter UV-Licht, welches das in die DNA oder RNA interkalierte EtBr anregt, fotografiert.

Die Qualität der Proben wurde anhand der Banden der 28 S- und 18 S-rRNA abgeschätzt. Dabei erwartet man bei gut erhaltener „Gesamt-RNA“, jeweils die 28 S-rRNA und die 18 S-rRNA zu erkennen und einen eher geringen Hintergrund. Bei zunehmender Degradation der RNA werden die rRNA-Banden schwächer und der Hintergrund nimmt zu.

B. 3. DNA-Methoden

3.1. DNA-Verdau

Um die Messung von DNA in der qRT-PCR Analyse auszuschliessen, wurde ein DNA-Verdau der RNA-Proben durchgeführt. Dies wurde bei Verwendung des „*Total-RNA-Isolation-Reagenzes*“ in der Lösung selbst oder bei der Aufreinigung mittels „RNeasy-Kits“ direkt auf der Säule durchgeführt.

(1) DNA-Verdau in Lösung (Ambion-Kit)

Zum Verdau wurden 5 µg DNA in 62,5 µl RNase freiem Wasser gelöst und nach Zugabe von 1 µl DNase1 und 10 x DNase-Puffer für 30 Min. bei 37°C verdaut. Das Ende der Reaktion wurde durch Zugabe von 6,25 µl „DNase-Inactivation-Reagenz“ und mehrmaliges kurzes Vortexen herbeigeführt. Nach 2 Min. Inkubation bei RT wurden die Proben für 1 Min bei 8.700 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

(2) DNA-Verdau auf der Säule (Qiagen-Kit / Arcturs-Kit)

Während der RNA-Extraktion mittels Silikasäulen wurden nach dem ersten Waschschrift – RW1 Puffer / W1 Puffer – jeweils 70 µl bzw. 40 µl auf die Säule pipettiert und die Säule für 15 Min. bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch Zentrifugation – 8.000g für 15 s - entfernt und die cDNA-Synthese, wie in 3.2 beschrieben, weiter durchgeführt.

3.2. cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese zur späteren Analyse mittels qRT-PCR wurde mit dem *Advantage RT for PCR* kit durchgeführt. Die Proben wurden in 5 µg Aliquots zusammen mit 2 µl Random-Hexamer-Primern und 3 µl Oligo-dT-Primern für 2 Min. bei 70°C denaturiert. Im Anschluss wurden die Proben auf Eis gestellt und 30,5 µl Mastermix hinzugegeben.

Reaktionsansatz:

20 µl	5x Reaktionspuffer
5 µl	dNTP-mix (je 10 mM)
2,5 µl	RNasin (40u/µl)
3 µl	MMLV reverse Transkriptase (200 u/µl)

Danach wurde die Probe für 1 h bei 42° C inkubiert und somit die Synthese vollzogen. Nach Inaktivierung des Enzyms durch 5 Min. Inkubation bei 95°C wurde die cDNA durch Zugabe von 4,66 µl Glyco-Blue, 15 µl 5M NaCl und 75 µl Isopropanol gefällt und bei 20.800 g für 10 Min pelletiert. Nach zweimaligem Waschen mit 150µl Ethanol (75 %) wurde das Pellet in 250 µl TE-Puffer aufgenommen und bei - 20°C gelagert.

B. 4. Qualitative ‘Real time’ – PCR (qRT-PCR)

4.1. Primer und Sondendesign

Die Auswahl der Primer und Sonden für die verschiedenen untersuchten Gene wurde mittels der Software “*Primer Express*” durchgeführt. Dazu wurde die kodierende Sequenz (CDS) der jeweiligen Gene in das Programm geladen und mit der Software wurden geeignete Sequenzen ermittelt. Aus diesen wurden dann Paare gewählt, die geringe 2D-Strukturen und Dimerbildungen aufwiesen.

Zum Testen der Paare wurden diese in einer Standard qRT-PCR-Reaktion (4.2) eingesetzt und die Produkte mittels eines Agarose-Gels aufgetrennt (s. 2.3). Durch Identifizierung einer einzelnen Bande auf dem Gel wurde sichergestellt, dass die gewählten Primer funktionierten.

4.2. qRT-PCR-Analyse

Zur Messung der relativen Genexpression wurde jede cDNA Probe im Doppelwert mit folgendem Ansatz gemischt und mittels der Abi7000 Taqman analysiert.

Reaktionsansatz:

1 µl	cDNA Probe
5 µl	10 x Reaktionspuffer
0,5 µl	Vorwärts /Rückwärts-Primer (30 µM)
0,25 µl	Taqman-Sonde (20 µM)
3,5 µl	MgCl ₂ (50 mM)
4 µl	dNTP (5 mM)
0,5 µl	Amp UNG (1 u/µl)
0,25 µl	Hot Goldstar (5 u/µl)
mit RNase freiem Wasser auf 50 µl aufgefüllt	

In diesem Ansatz ist zusätzlich zur Polymerase eine Uracil-N-Glykosilase enthalten. Diese wird verwendet, um eventuelle Verunreinigungen durch Produkte der vorhergehenden PCR-Reaktion vor der Amplifikation abzubauen.

Die entsprechenden Ansätze wurden gemischt und dann im Abi 7000 Taqman mit folgendem Programm prozessiert und die Daten gemessen:

Aktivierung der UNG-Glykosilase	2 Min. 50°C
zum Abbau von Verunreinigungen	
Aktivierung der Hot Goldstar Polymerase	10 Min. 95° C
40 Zyklen	
Denaturierung der Doppelstränge	15 Sek. 95°C
Annealing der Primer und Elongation	1 Min. 60°C

4.3. qRT-PCR-Auswertung nach Livak KJ (aus Livak KJ, Schmittgen KD 2001)

Zur Bestimmung der relativen Genexpression wurde die Zyklenzahl CT ermittelt bei der die logarithmische Phase der Amplifikation erreicht wurde. Die Differenz des

CT-Wertes jeder Probe zwischen dem Zielgen und dem gewählten Haushaltsgen wurde als ΔCT -Wert (normalisierte Genexpression) berechnet. Aus der Differenz der ΔCT -Werte einer zu analysierenden Probe und der Kalibrator-Probe ergibt sich der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Wert. Aus diesem Wert berechnet sich mit Formel 2 die Regulation der Genexpression als ein Vielfaches der Expression verglichen mit der Kontrollprobe.

Formel 2: $\text{Vielfaches} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$

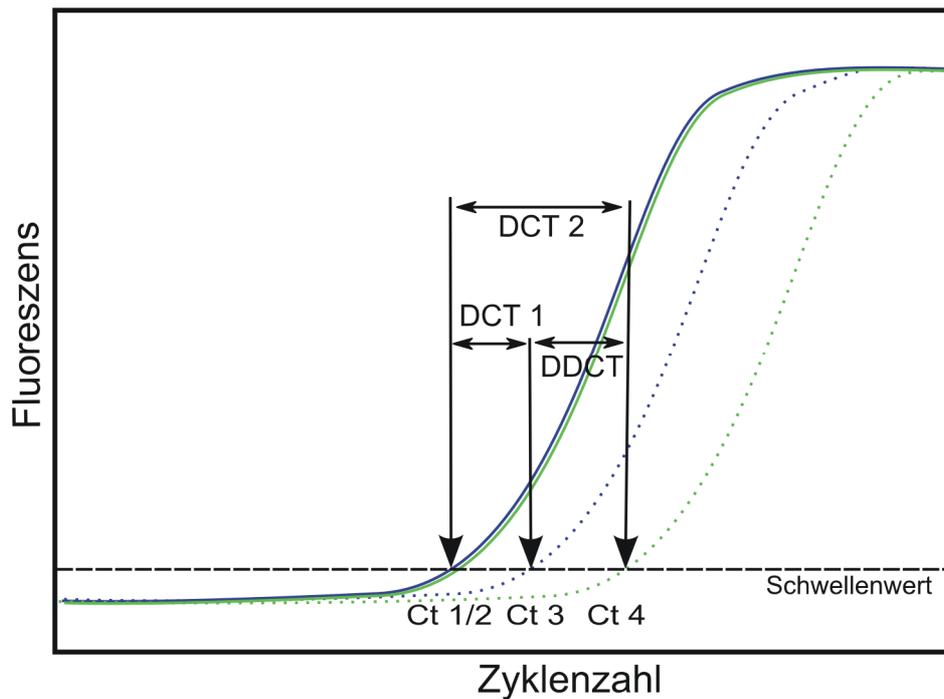


Abbildung 4: Auswertung real time PCR-Daten zweier Proben (blau und grün). Nach Bestimmung des Schwellenwertes im logarithmischen Bereich der PCR sind aus den Schnittpunkten der Proben die CT-Werte (1 - 4) abzulesen. Die Differenz zwischen dem CT des Referenzgenes (durchgezogene Linie) und des Zielgenes (gepunktete Linie) ergibt dabei jeweils den ΔCT -Wert einer Probe. Die Differenz der beiden ΔCT -Werte der zu vergleichenden Proben ergibt den $\Delta\Delta\text{CT}$ -Wert, welcher genau der Verschiebung des CT-Wertes des Zielgenes entspricht.

Als Kalibrator wurde in den Schlaganfall-Modellen jeweils die kontralaterale Seite verwendet, wohingegen bei den Versuchen mit humanem Alzheimer-Gewebe jeweils die nicht erkrankten Proben als Kalibrator verwendet wurden.

C. Proteinchemie

C. 1. Proteinextraktion

1.1. Proteinextraktion aus Gewebeproben

Waschpuffer

0,3 M Guanidinium-Hydrochlorid in Ethanol (95 %)

Die Proteinextraktion wurde an der aus der RNA-Extraktion gewonnenen Phenol-/Chloroform-Phase durchgeführt (s. B.1.1 und B.1.3). Durch Zugabe von 300 µl Ethanol und 3 Min. Inkubation bei RT wurde die enthaltene DNA aus der Proteinlösung gefällt und anschließend bei 1.960 g für 5 Min abzentrifugiert. Der Überstand wurde gleichmäßig auf zwei neue Reaktionsgefäße verteilt und zu jedem Aliquot wurden 750 µl Isopropanol gegeben. Nach kurzem Schwenken und Inkubation für 10 Min bei RT wurde der Protein-Niederschlag bei 11.900 g für 10 Min pelletiert. Das Pellet wurde dreimal durch Zugabe von 1 ml Waschpuffer Inkubation für 20 Min bei RT und Zentrifugation bei 7.500 g für 5 Min gewaschen. Nach Entfernen des Überstandes wurden die Pellets in der Speedvac getrocknet.

1.2. Lösen der Proteinpellets

Die getrockneten Proteinpellets wurden während einer zweistündigen Inkubation unter Schütteln bei 50°C in 100 µl Ameisensäure (70 %) gelöst. Nach Eindampfen über Nacht wurden die Proben in 200 µl 8M Harnstoff aufgenommen und durch 20 Min. Schütteln bei 50°C gelöst. Zur Unterstützung des Lösevorganges wurden die Proben für 30 s im Ultraschallbad behandelt und anschließend erneut 50 Min bei 50°C geschüttelt. Unlösliche Reste wurden bei 14.000 g für 2 Min abzentrifugiert und der Überstand wurde eingefroren.

1.3. Proteinbestimmung

Die Quantifizierung der Proteine wurde mittels des Protein-Assays (Bio-Rad) durchgeführt. Dazu wurden 5 µl Probe zu 795 µl „Assay Reagents“ gegeben und dieses Gemisch wurde für 5 Min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben im Biophotometer gemessen und aus den erhaltenen Werten die Proteinmenge bestimmt.

C. 2. Western Blot

2.1. SDS-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der Proteine mittels Gelelektrophorese wurden 6 µg Protein mit 4 x LDS-Proben-Puffer und 1% *Nupage Sample Reducing Agent* für 2 Min. bei 70° C denaturiert. Die Proben wurden dann auf ein 12 % NuPAGE Bis-Tris Gel aufgetragen und in NuPAGE MES SDS Running Buffer für 35 Min bei 200 V aufgetrennt.

2.2. Coomassie Färbung

Coomassie Stammlösung

1 Phast Blue R Tablette in

60% Methanol in dH₂O

0,1% (w/v) CuSO₄

Coomassie Waschlösung

30% Methanol

10% Essigsäure in dH₂O

Coomassie Färbelösung

1/10 Coomassie Stammlösung

9/19 Coomassie Waschlösung

Zur Färbung der aufgetrennten Proteine wurde das Gel in einer Coomassie-Waschlösung gewaschen und anschließend in der Coomassie Lösung für 1 h bei RT unter Schütteln gefärbt. Um den Hintergrund zu entfärben und die erwünschte Farbtintensivität der Proteinbanden zu erhalten, wurde das Gel in der Coomassie-Waschlösung entfärbt und dann eingescannt.

2.3. Western-Transfer

Zur Überführung der Proteinproben aus dem SDS-Gel auf eine Nitrocellulose-Membran, wurde das Gel auf die Membran übertragen und zwischen Filterpapier und Schwämmen in eine Transfer-Kassette eingesetzt und diese mit Transfer-Puffer +10% Methanol befüllt. Der Transfer wurde bei 30 V für 1 h durchgeführt.

2.4. Protein-Detektion

Zur Detektion der Proteine auf der Nitrocellulose-Membran wurde diese entweder mittels des WesternBreeze Kits (Invitrogen) gefärbt oder mittels des SuperSignal West Pico Kits chemoluminetratisch analysiert.

(1) **Western Breeze**

Die Membran wurde für 30 Min in Block-Puffer unter Schwenken inkubiert, um freie Bindungsstellen zu sättigen. Anschließend wurde die Membran zweimal für 5 Min in dH₂O gewaschen und dann für 1 h mit der primären Antikörper-Lösung inkubiert. Durch dreimaliges Waschen mit Antikörper-Waschlösung wurde der primäre Antikörper entfernt und die Membran für 30 Min mit Sekundär-Antikörper-Lösung inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen für 5 Min mit Antikörper-Waschlösung wurde die Membran unter fließendem Wasser gewaschen. Zur Detektion wurde die Membran anschließend in der Chromogen-Substrat-Lösung inkubiert, bis eine Bande sichtbar wurde (1 – 60 Min).

(2) **Supersignal**

10x TBS Puffer (Tris gepufferte Saline)

1 M TRIS-HCl; 0,2 M TRIS (Hydroxymethyl)-Aminomethan; 1,8 M NaCl

TBS-T (Phosphat gepufferte Saline)

1x TBS Puffer mit 0,05 % Tween-20

Blockpuffer

TBS Puffer mit 3 % BSA und 3 % Trockenmilchpuder

Antikörperlösung

Verdünnung des Antikörpers in TBS-T + 1% BSA; Verdünnung s. Material

Supersignal-Substratlösung (1 x)

Gleiche Teile Stabile-Peroxidase-Lösung und Luminol/Enhancer Solution

Nach Sättigung der Membran in Blockpuffer für 30 Min wurde die Membran für 1 h mit primärem Antikörper inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal mit PBS-T für ~ 5 Min. gewaschen und in sekundärem Antikörper für 1 h inkubiert.

Nach Entfernen des nicht gebundenen sekundären Antikörpers durch erneutes Waschen wurde die Membran für 5 Min. in Supersignal-Substratlösung inkubiert. Zur Auswertung wurde ein Bild der Membran mit der GeneSnap Software gemacht. Dabei wurden die Aufnahmen über einen Zeitraum von 1 – 10 Min. aufgenommen, bis die Banden eindeutig zu erkennen waren. Um eine quantitative Auswertung

durchzuführen, wurden die Bilder in die GeneTools-Software geladen und die Signalstärke der Banden miteinander verglichen.

D. Immunhistochemie

1.1. Färbung von Gewebeschnitten

TBS (Tris gepufferte Saline 10 x)

1 M TRIS-HCl; 0,2 M TRIS (Hydroxymethyl)-Aminomethan; 1,8 M NaCl

TBS+

1 x TBS; 1 % Triton X-100; 3 % Eselserum

Antikörperlösung

Verdünnung des Antikörpers in TBS; Verdünnung s. Material

Schnitte gefrorener Gewebeproben wurden für 1 h bei RT getrocknet und anschließend dreimal in TBS-Puffer für 5 Min. gewaschen. Anschließend wurden die Proben in 0,6 % H₂O₂ in TBS inkubiert und erneut dreimal in TBS gewaschen. Um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu blocken, wurden die Schnitte mit 100 µl TBS+ für 1 h inkubiert. Danach wurden 100 µl primärer Antikörperlösung auf die Schnitte gegeben und diese über Nacht bei 4° C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS zur Entfernung des primären Antikörpers und erneutem Blocken mit TBS+ wurden die Schnitte mit 100 µl sekundärer Antikörperlösung für 1 h bei RT inkubiert. Bei Verwendung eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers wurde der sekundäre Antikörper durch dreimaliges Waschen entfernt und die Schnitte mit Aqua-Polymount eingedeckt.

1.2. Biotinylierte sekundäre Antikörper

Bei Verwendung biotinylierter sekundärer Antikörper wurde wie folgt vorgegangen: Die Schnitte wurden zur Entfernung des sekundären Antikörpers dreimal in TBS gewaschen und mit 100 µl ABC-Elite-Lösung für 1 h bei RT inkubiert. Nach Entfernen der ABC-Lösung durch Waschen mit TBS wurde Liquid DAB Substrat-Lösung auf die Schnitte gegeben und die Färbereaktion beobachtet. Nach ausreichender Färbung wurde die Reaktion durch Waschen in TBS gestoppt. Die Schnitte wurden in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert (50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 96 % Isopropanol) und anschließend in Roti-Histol inkubiert. Zur Aufbewahrung wurden die Proben mit Roti-Kit eingedeckt.

1.3. RCA-1/ UEA-1-Färbung

Zur Färbung gefrorener humaner Gewebestücke wurden 5 µm dicke Schnitte gefertigt und auf Objektträger aufgezogen, welche bis zur weiteren Verarbeitung auf Trockeneis gelagert wurden. Nach kurzem Erwärmen auf dem Handrücken wurden die Schnitte für 30 s in 75 % Ethanol fixiert und anschließend für 1 Min. in RNase freiem Wasser gewaschen. Danach wurden 100 µl einer 1:20 Verdünnung RCA-1 oder einer 1:500 Verdünnung UEA-1 auf die Schnitte pipettiert und die Schnitte für 2 Min. inkubiert. Danach wurden die Schnitte erneut gewaschen und in einer Ethanol-Reihe je 30 s dehydriert (75 %, 95 % und 100 %). Zum Fixieren wurde der Schnitt für 5 Min. in Xylen inkubiert und abschließend 5 Min. an der Luft getrocknet.