

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Blottingapparatur

Easy Cast TM Elektrophoresesystem	AGS GmbH, Heidelberg
Feinwaage BP 210S	Sartorius AG, Göttingen
Leuchtkasten	Roth, Karlsruhe
Magnetrührer MR3001	Heidolph, Kehlheim
Mikrowellenherd (Modell M 706)	Philips, Hamburg
PCR-Thermocycler Gene Amp PCR System 2400	Perkin Elmer, Weiterstadt
Photometer GeneQuant II RNA/DNA	Pharmacia (Freiburg)
pH-Meter GPHR 1400A	Greisinger, Regenstauf
Präzisionsküvette aus Quarzglas SUPRASIL®	Hellma, Mühlheim
Stromversorgungsgerät EPS 3500	Pharmacia, Freiburg
Taumel-Wipptisch WT12	Biometra, Göttingen
TGGE-Gelkammer für Polyacrylamidgele	Qiagen, Hilden
Thermomixer 5436, Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Umluft-Trockenschrank UT 6000	Heraeus, Hanau
UV-Transilluminator TI 1	Biometra, Göttingen
Vortex REAX 2000	Heidolph, Kehlheim

2.1.2 Chemikalien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose (ultra pure)	Gibco BRL, Eggenstein

APS	Serva, Heidelberg
Borsäure, Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA	Sigma, Deisenhofen
Chloroform, Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
DMSO	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Promega, Mannheim
EDTA	Merck, Darmstadt
Essigsäure	J.T. Baker, Deventer, Holland
Ethanol (vergällt und unvergällt)	Merck, Darmstadt
Formaldehyd (37%ige Lösung)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycogen	Boehringer, Mannheim
Isopropanol	J.T. Baker, Deventer, Holland
Luminol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Magermilchpulver	ALDI
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol, Natriumcarbonat	Fluca, Neu-Ulm
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
p-Coumaric-acid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Repelcote VS	BDH, Poole, England
Restore Stripping Buffer	Pierce, Rockford
Roti [®] -Phenol/Chloroform-Lösung	Roth, Karlsruhe
Salpetersäure (65%), Salzsäure (37%, rauchend)	Merck, Darmstadt
SDS	Roth, Karlsruhe
Silbernitrat	Fluka, Neu-Ulm
TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin),	
Tris	Serva, Heidelberg
Triton x-100	Sigma, St. Louis, USA
Tween 20	Fluka, Neu-Ulm
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt

2.1.3 Häufig verwendete Lösungen

RT-PCR

DNA-Probenpuffer (für Agarosegele)	0,1% (w/v) Bromphenolblau 10mM EDTA (pH 8,0) 60% (v/v) Glycerin 100mM Tris-HCl (pH 8,0)
DNA-Probenpuffer (für Polyacrylamidgele)	0,1% (w/v) Bromphenolblau 10mM EDTA (pH 8,0) 60% (v/v) Glycerin 100mM Tris-HCl (pH 8,0) 0,05% (w/v) Xylencyanol
10x TBE-Puffer (pH8,3)	1M Borsäure 20mM EDTA 1M Tris
Laufpuffer für PAA-Gelelektrophorese	90ml 10x TBE-Puffer 50ml Glycerol ad 1,0l d H ₂ O
Lösung 1 für Silberfärbung	2%(v/v) Salpetersäure-Lösung
Lösung 2 für Silberfärbung	0,2% (w/v) Silbernitrat- Lösung
Lösung 3 für Silberfärbung	3,0% (w/v) Natriumcarbonat 0,02% (v/v) Formaldehyd 37%
Lösung 4 für Silberfärbung	1% (v/v) Essigsäure- Lösung
Lösung 5 für Silberfärbung	2% (v/v) Glycerol
Western Blot	
Golden Buffer	15mM Tris-HCl (pH 7,6) 1mM DTT 0,25M Saccharose 1mM Magnesiumchlorid 1,25 g/ml Pepstatin 10 g/ml Leupeptin 2,5 g/ml Aprotinin 2mM EDTA

II. MATERIAL UND METHODEN

	1mM EGTA
	0,1M Natriumorthovanadat
	50mM Natriumflourid
	2mM Natriumpyrophosphat
4xTrenngelpuffer (pH 8,8)	1,5mM Tris
	0,4% SDS
8xSammelgelpuffer (pH 6,8)	0,5mM Tris
	0,4% SDS
10xLaufpuffer	0,025M Glycerin
	0,192M Tris
	0,1% SDS
Laemmli-Puffer	0,625M Tris-HCl (pH 6,8)
	0,2 g SDS
	5 ml Glycerin
	0,5 ml Mercaptoethanol
	0,1 ml Bromphenolblau (1% Lsg. in Ethanol)
	2,4 ml dest. H ₂ O
5% Magermilchlösung	5g Magermilchpulver
	100ml 0,1% TBS-Tween
Blottingtransferpuffer	0,04 Tris
	0,306M Glycin
	20% (V/V) Ethanol
	0,01% SDS
	Aqua dest ad 1l
10xTBS	44g NaCl
	1M Tris HCL (pH 7,4)
0,1% TBS-T	1l 1xTBS
	1 ml Tween 20
Stripping-Puffer	125mM Tris-HCl pH 6,7
	0,7 ml Mercaptoethanol
	2% SDS
	Aqua dest. ad 100ml

2.1.4 Testkit

ECL-Kit Amersham
 RNAClean™ AGS, Heidelberg

2.1.5 Enzyme

Taq DNA Polymerase Appligene
 DNase I, RNase-frei Boehringer, Mannheim
 MMLV-RT, Rnasin® Ribonuclease Inhibitor Promega, Mannheim

2.1.6 Oligonukleotide für die Amplifizierung spezifischer mRNAs

Name	Sequenz (5'-3')	Genbank Acs.No	Sequenzposition
BDNF			
BD-F	CGACGTCCCTGGCTGACACTTTT	D10938	2296-2318
BD-R	AGTAAGGGCCCGAACATACGATTGG		2762-2786
NT-3			
NT-F	GGTCAGAATTCCAGCCGATGATTGC	M34643	308-332
NT-R	CAGCGCCAGCCTACGAGTTTGTTGT		767-791
β-Actin			
βA-F	CCCTAAGGCCAACCGTGAAAAGATG	V01217	1663-1687
βA-R	GAACCGCTCATTGCCGATAGTGATG		2535-2559

2.1.7 Molekulargewichtsmarker

Bezeichnung	Firma	Länge der Fragmente (bp)
phiX174 DNA/Hae III Marker	Promega, Mannheim	1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72

2.1.8 Antikörper

Akt, pAkt, MAP, pMAP, pRAF

Cell Signaling Biolabs

2.1.9 Tiere

Art

Alter

Herkunft

Wistar-Ratten

7 Tage

BgVV, Berlin

2.1.10 Sonstige Hilfs- und Verbrauchsmittel

GelBond® PAG Film (21.0 x 21.3cm)

Biozym, Hess. Oldendorf

Glasplatten (21.0 x 21.0cm)

Qiagen, Hilden

PCR-Reaktionsgefäße (0.2ml)

Biozym, Hess. Oldendorf

Pipettenspitzen (10, 200, 1000µl), Reaktionsgefäße Eppendorf, Hamburg
(0.5, 1.5, 2.0ml)

Filme

Hyperfilm ECL, Amersham

Kassette

Hypercassette, Amersham

Pipetten

Eppendorf, Hamburg

Nitrocellulosemembran

Hybond ECL

Schweißgerät Vacupack Plus

Krups

Spacer

Qiagen, Hilden

2.2 Methoden

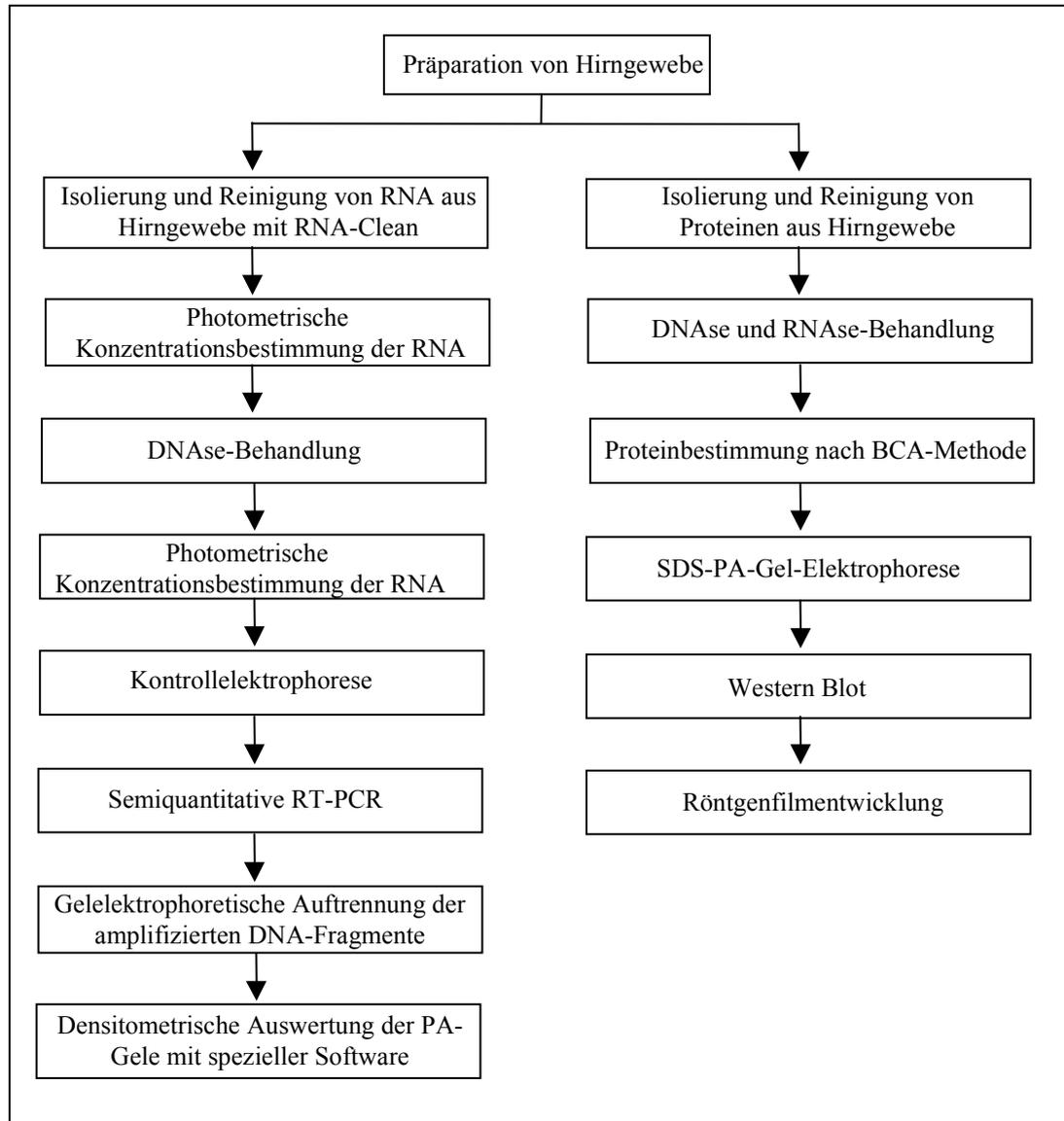


Abb.7: Schematische Darstellung der methodischen Arbeitsschritte zum Nachweis von Apoptose nach Phenobarbitalexposition: Die linke Hälfte des Flußdiagramms veranschaulicht den Ablauf der Nukleinsäureisolierung und Quantifizierung. Die rechte Hälfte zeigt die Arbeitsschritte der Proteinanalyse mittels Western Blot.

2.2.1 Präparation von Hirngewebe

Sieben Tage alte Wistar-Ratten, aus einem Wurf stammend, wurden für den Tierversuch verwendet. Das Geschlecht wurde nicht spezifiziert. Phenobarbital wurde in einer Dosis von 50 mg/kg als Einmalgabe intraperitoneal injiziert. Die Kontrollgruppe erhielt eine intraperitoneale Injektion von physiologischer Kochsalzlösung. Voruntersuchungen zeigten keinen Unterschied zwischen naiven Tieren und Tieren, die mit physiologischer Kochsalzlösung behandelt wurden. Die Ratten der verschiedenen Gruppen wurden überwiegend zur selben Zeit getötet und zu den jeweiligen Zeitpunkten vorher injiziert. Vielmehr als die zirkadiane Rhythmik war für die Versuche die molekulargenetische Homogenität der Tiere von Bedeutung.

Die Präparation der Gehirne fand in Abhängigkeit der zu erwartenden Effekte 6h, 12h und 24h nach der Medikamentengabe statt. Bei der Kontrollgruppe erfolgte die Präparation 6h nach der Injektion. Die Tiere wurden dekapitiert, die Kalotte geöffnet und das Gehirn stumpf abpräpariert. Unter genauer Kenntnis der Anatomie und zu Hilfenahme eines Atlas für die Anatomie des unreifen Gehirns der Ratte wurden unter der Lupenlampe die entsprechenden Regionen mit dem Skalpell präpariert. Die Gehirne wurden in sechs verschiedene Regionen geteilt: Thalamus, Striatum, Hippocampus, Cortex retrosplenialis, Cortex frontalis und Cerebellum. Thalamus und Striatum wurden jeweils noch in rechts und links unterteilt. Der Hypothalamus war im Resektat nicht enthalten.

Exemplarisch ausgewählt und untersucht wurde in dieser Arbeit hauptsächlich Thalamusgewebe, welches histologisch stark betroffen ist und somit die meisten Veränderungen zu erwarten waren. Andere Regionen wurden in dieser Arbeit nicht untersucht. Die gewonnenen Gewebe wurden in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und dann bei -80°C gelagert.

2.2.2 Isolierung und Reinigung von RNA aus Hirngewebe

Die Isolierung der RNA erfolgte nach dem Prinzip der sauren Guanidin Isothiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion. Die Gewebeprouben wurden mit RNA-Clean TM homogenisiert; pro 100 mg Gewebe wurden 2,0 ml RNA-Clean dazugegeben. Durch Zugabe von Chloroform (1/10 des Volumens) wurde die RNA extrahiert. Nach 5 min Inkubation auf Eis und der anschließenden Zentrifugation (10 min bei 14.000 rpm) wurde die obere wässrige Phase abpipettiert und das gleiche Volumen Isopropanol dazugegeben. Durch 15 min Inkubation bei -20°C und darauf folgender Zentrifugation (15 min, 14.000 rpm, 4°C) kam es zur Fällung der

RNA. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 70%igem Ethanol gereinigt und anschließend 5 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Dieser Reinigungsschritt wurde wiederholt und anschließend das Pellet 20 min an der Luft getrocknet, danach in 25 µl PCR-H₂O resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80° C gelagert.

2.2.3 RNA-Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der RNA- Konzentration wurde die Absorption photometrisch bei 260 nm (A260) gemessen, da Nukleinsäuren bei dieser Wellenlänge ihr Absorptionsmaximum besitzen. Eine Absorption von 1,0 bedeutet, dass ungefähr 40 µg/ml an RNA in der Nucleinsäurelösung vorhanden sind. Das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt bei einer Wellenlänge von 280 nm (A280). Der Quotient aus A260 und A280 ist ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäurepräparation und sollte für eine nicht verunreinigte Nukleinsäurelösung zwischen 1,6 und 2,0 liegen

2.2.4 DNase-Behandlung der RNA

Um eventuelle DNA-Verunreinigungen in der Nukleinsäurelösung zu entfernen, wurde die RNA-Lösung einer enzymatischen DNase-Behandlung mit der DNase I unterzogen.

Ansatz: 10 µl 5x RT-Puffer
5 µl DNase (=20 U)
20 µg RNA
ad 50 µl PCR- H₂O

Der Ansatz wird 1h bei 37°C inkubiert, dann 5 min auf Eis gestellt und zentrifugiert. Die Extraktion der RNA erfolgte im Anschluß mittels einer Phenol/Chloroform-Extraktion zur Entfernung der DNase I.

Lösungen: Roti-Phenol/Chloroform (25:24:1)
3M Natriumacetat (pH 5,2)
Glycogen (20mg/ml)
70% und 96% Ethanol

Dafür wurde ein Volumen Roti-Phenol/Chloroform dazugegeben, die Probe gemischt und 2 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Danach wurde die obere wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt, ein Volumenteil Chloroform zugegeben und wie oben zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde erneut abgenommen, das Volumen abgeschätzt und dann 1/10 Volumen Natriumacetat und 5 µl Glycogen dazugegeben. Der Gesamtansatz wurde nun mit 3 Volumenteilen 96% Ethanol überschichtet, sorgfältig gemischt und über Nacht bei -20°C gefällt.

Am folgenden Tag wird die Probe zur Bildung eines RNA-Pellets 20 min bei 14.000 rpm zentrifugiert und im Anschluß 2 Mal mit 70%igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wird 30 min an der Luft getrocknet, dann in 25 µl PCR- H_2O resuspendiert und für die photometrische RNA-Konzentrationsmessung und Überprüfung der Reinheit wie unter Punkt 2.2.3 vorbereitet.

2.2.5 RNA-Kontrollelektrophorese

Vor der PT-RCR wurde die DNase-behandelte RNA zuerst einer horizontalen Agarosegelelektrophorese unterzogen um die Intaktheit und Kontaminationsfreiheit der ribosomalen RNA zu überprüfen. Die Agarosegelelektrophorese ist ein auf elektrischen Feldkräften basierendes Verfahren wobei die Trennung der Moleküle im Gel streng nach der Molekülmasse (als Größe) erfolgt. Aufgrund ihres negativ geladenen Phosphatrückgrats sind die Nukleinsäuren in der Lage, im elektrischen Feld zum positiven Pol zu wandern.

Lösungen:

- Agarose
- Ethidiumbromid
- DNA-Probenpuffer
- 1x TAE-Puffer (pH 7,7)

Um ein 0,8 %iges Agarosegel zu erhalten wurden 0,8g Agarose in 100 ml 1x TAE-Puffer in der Mikrowelle erhitzt und die Gellösung ungefähr 0,5 cm dick in die Gelkammer gegossen. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Gel mit 1x TAE-Puffer als Laufpuffer überschichtet. Die Proben wurden wie folgt vorbereitet:

- 200 ng RNA
- 1 µl DNA-Probenpuffer

PCR- H₂O ad 10 µl

Zur Beseitigung von Sekundärstrukturen wurden die Proben vor dem Auftrag 10 min bei 70°C erhitzt. Die elektrophoretische Trennung erfolgte die ersten 15 Minuten bei einer Spannung von 50 V, danach ca. 45 min bei 80 V. Zum Färben wurde das Gel 20min in eine 0,0001% (w/v) Ethidiumbromidlösung gelegt. Anschließend wurde das Ergebnis mittels UV-Licht sichtbar gemacht.

2.2.6 Semiquantitative Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Mit Hilfe einer reversen Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase ist es möglich, den normalen genetischen Informationsfluß umzukehren und RNA in DNA umzuschreiben. Die Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht es nun, beliebige DNA-Abschnitte mit Hilfe von Oligonukleotidprimern zu amplifizieren und läßt somit Rückschlüsse auf die Genexpression auf mRNA-Ebene zu. Auch kann die Menge der spezifischen mRNA semiquantitativ bestimmt werden. Um diese Abschätzungen vornehmen zu können müssen sogenannte „Housekeeping-Gene“, wie zum Beispiel β -Actin, zusätzlich als interner Standard mit transkribiert und amplifiziert werden.

2.2.7 Reverse Transkription spezifischer Gene

Bei der reversen Transkription wird zur Ausgangs-RNA ein komplementärer DNA-Strang (cDNA) synthetisiert. Mittels der M-MLV-Reversen Transkriptase wurden die cDNAs der neurotrophen Faktoren BDNF und NT-3 mit β -Actin als Standard in einem Ansatz synthetisiert. Pro RT-Ansatz wurden 500 ng DNA-se behandelte Gesamt-RNA mit 2 µl Rückwärtsprimer des jeweiligen neurotrophen Faktors und des internen Standards gemischt, auf 10 µl mit dd H₂O aufgefüllt und 10 min bei 70 °C inkubiert. Im Anschluß wurde der Ansatz auf Eis gekühlt. Zu jedem Ansatz wurde ein Prämix aus folgenden Komponenten hinzugefügt und mit dd H₂O auf 25 µl aufgefüllt:

0,5 µl RNAsin
4 µl 5xRT Puffer
5 µl 2mM dNTP-Mix
1 µl M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/µl)

Bei 42°C wurden die Ansätze 1h revers transkribiert, die Reaktion wurde durch 10 minütige Inkubation bei 92°C gestoppt.

2.2.8 Polymerase-Kettenreaktion zur cDNA Amplifikation

Die PCR dient der enzymatischen Vermehrung spezifischer DNA-Sequenzen. Hierfür ist es notwendig, vom 5'- und vom 3'- Ende der zu amplifizierenden Sequenz DNA-Abschnitte zu kennen, die den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt flankieren (R- und F-Oligonukleotid-Primer).

Die PCR ist in drei Schritte unterteilt, die sich in genau definierten Zyklen wiederholen.

1. Zuerst erfolgt die Denaturierung der DNA
2. Gefolgt von der Anlagerung (Hybridisierung) spezifischer Primer (annealing) und
3. Schließlich die Verlängerung der einsträngigen DNA durch die DNA-Polymerase (extension) in 3'-Richtung.

Durch erneutes Erhitzen wird die doppelsträngige DNA getrennt und es kann sich ein neuer Zyklus mit Hybridisierung und DNA-Synthese anschließen.

Ein Standard- PCR-Ansatz mit einem Endvolumen von 50 µl enthielt folgende Komponenten:

5 µl 10xPCR-Puffer
5 µl 2mM dNTP-Mix
x µl cDNA-Lösung des jeweiligen neurotrophen Faktors
y ng F- und R-Primer des jeweiligen neurotrophen Faktors
z ng F- und R-Primer β-Aktin
1U Amplitaq DNA-Polymerase
ad 50 µl PCR- H₂O

Zur Steigerung der Effektivität und Spezifität der Amplifikation wurden auch PCR-Zusätze wie Dimethylsulfoxid (DMSO), bovines Serumalbumin (BSA), Ammoniumsulfat (NH₄SO₄) und Formamid getestet, wobei keine nennenswerten Effekte zu beobachten waren.

Die PCR erfolgte im sogenannten „hot start“ Verfahren, d.h. die Proben wurden bei einer Temperatur von 94°C in den Thermo-Cycler eingesetzt. Folgende PCR-Bedingungen wurden angewendet:

Initial 3 Minuten Denaturierung bei 94 °C, dann für 30 Zyklen Denaturierung 94°C/30 sec, 45 sec Hybridisierung bei 60 °C und 45 sec Synthese bei 72°C. Zum Schluß folgte ein zusätzlicher Syntheseschritt als endgültige Elongation für 7 min bei 72°C.

Eingesetzte Primer- und cDNA-Mengen der neurotrophen Faktoren BDNF und NT-3 und β -Aktin als interner Standard sind in folgender Tabelle zusammengefaßt:

Gen	Menge an cosynthetisierter cDNA	Menge an R-und F-Primern
BDNF	1 μ l unverdünnt	2 μ l / 10 μ M BDNF F-und R 2 μ l / 1 μ M β -Aktin F-und R
NT-3	1 μ l unverdünnt	2 μ l / 10 μ M BDNF F-und R μ l / 1 μ M β -Aktin F-und R

2.2.9 Gelelektrophoretische Auftrennung der amplifizierten DNA- Fragmente

Die Analyse der erhaltenen Amplifikate erfolgte mittels horizontaler Polyacrylamidgellelektrophorese (PAGE). Für ein 5% Polyacrylamidgel werden folgende Zutaten benötigt:

4,5 ml 10x TBE-Puffer (pH 8,3)

2,5 ml Glycerol

12,5 ml 20% Gellösung (32,33:1 Acrylamid : Piperzindiacrylamid)

ad 50 ml d H₂O

Polymerisation durch Zugabe von 100 μ l 30% APS und 45 μ l TEMED.

Die Gellösung wurde luftblasenfrei auf eine Gelfilmträgerfolie aufgebracht, welche zwischen zwei Glasplatten fixiert wurde. Nach einstündigem Auspolymerisieren wurden die mit 1 μ l 10x DNA-Probenpuffer versehenen und inkubierten (10 min/70°C) PCR-Produkte aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in einem TGGE-Elektrophoresesystem, in das das auf der Gelträgerfolie fixierte Gel eingesetzt wird. Die Pufferreservoirs werden mit PAGE-Laufpuffer aufgefüllt und die Elektrophorese mit einer Spannung von 450V, einer Stromstärke von 70 mA und einer Leistung von 10 W gestartet. Nach 15 Minuten, nachdem sich die beiden Farbstoffbanden des DNA-Probenpuffers optisch voneinander getrennt hatten, erfolgte die Auftrennung für ca. 120

Minuten bei 600V, 70mA und 25W.

2.2.10 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel auf dem Taumel-Wipptisch mit folgenden Lösungen inkubiert und jeweils danach dreimal für je 10s mit d H₂O gewaschen:

3 min Lösung 1

20 min Lösung 2

Lösng 3 wurde in 250 ml Portionen dazugegeben und gewechselt, sobald die Lösung „schlammig“ wurde. Bei deutlichem Sichtbarwerden der Nukleinsäurebanden wurde zum nächsten Waschschrift übergegangen.

2 min Lösung 4

3 min d H₂O

4 min Lösung 5

Nachfolgend wurde das Gel 1h im Trockenschrank bei 70°C getrocknet.

2.2.11 Densitometrische Auswertung von silbergefärbten Polyacrylamidgelen

Mit Hilfe des Softwareprogramms BioCapt wurden die silbergefärbten Polyacrylamidgele eingescannt und mit der BIO-PROFIL Image Analyse semiquantitativ ausgewertet. Ausgehend von der Annahme, dass β -Aktin in allen Geweben und Zellen gleichmäßig exprimiert wird, dient der relative Volumenanteil einer β -Aktin-Bande als interner Standard und entspricht somit dem 100%-Wert. Dann wurde für alle anderen Banden der jeweilige prozentuale Anteil, sowohl der, der Standardbanden zueinander, als auch der, der cDNA-Banden zu ihren jeweiligen Standardbanden bestimmt.

Zu den unterschiedlichen Zeitpunkten ergaben sich Änderungen der prozentualen Anteile des mRNA-Gehalts des jeweiligen neurotrophen Faktors bezogen auf den internen Standard.

2.2.12 Isolierung und Reinigung von Proteinen aus Hirngewebe

Materialien: Golden Buffer

Das bei -80°C tiefgefrorene Gewebe wurde im Kühlraum bei 4°C mit dem 10 fachen Volumen homogenisiert bis ein trübes Lysat entstand.

Die Proben wurden dann 10 min bei 1000g und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und erneut 20 min zentrifugiert. Im Überstand befand sich nun das Zytosol, im Pellet die Mitochondrien.

2.2.13 DNase- und RNase- Behandlung

Materialien: DNase
RNase

Um eventuelle DNA oder RNA-Verunreinigungen der Proteinlösung zu vermeiden, wurde die Probe einer DNase/RNase-Behandlung unterzogen.

RNase A wurde zu einer Endkonzentration von $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ dazugegeben, die DNase I zu einer Endkonzentration von $5\ \mu\text{g}/\text{ml}$.

Nach der Zugabe wurde die Probe geschwenkt und 20 min auf Eis inkubiert, anschließend 30 min bei 10.000g und 4°C zentrifugiert.

Der Überstand wurde abgenommen und für die Proteinbestimmung verwendet, das Pellet verworfen.

2.2.14 Proteinbestimmung nach BCA-Methode

Materialien: BCA-Kit

Die Proteinbestimmung nach der BCA-Methode beruht auf einer Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} durch Proteine in alkalischem Medium mit Hilfe von Bicinchoninsäure. Die Absorption des lila Reaktionsprodukts der entstandenen Kupfer-Kationen läßt sich bei 562 nm kolorimetrisch erfassen.

Es wurde jeweils eine dreifache Bestimmung der Proben in einer 96 Well Microtiterplatte

durchgeführt und die Extinktion im Wallac Multilabel Counter gemessen.

Anhand einer Standardreihe mit Proteinkonzentrationen von 0 bis 2 mg/ml kann aus der jeweiligen Extinktion die Konzentration errechnet werden.

2.2.15 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Materialien: 10x Laufpuffer
 Laemmlipuffer
 Rainbowmarker

Trenngel 8%	4ml 40% Acrylamid 5 ml 4x Trennpuffer pH 8,8 5,75 ml Aqua bidest 50 μ l TEMED orig 200 μ l 12.5% APS
Sammelgel 4,5%	1 ml Acrylamid 2,5 ml 4x Sammelpuffer pH 6,8 3,75 ml Aqua bidest 30 μ l TEMED orig 80 μ l 12,5% APS

Mittels einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden die Proteine in einer vertikalen Gelkammer mit Laufpuffer nach ihrer Größe aufgetrennt.

Zunächst wurde ein 8%iges Trenngel in die Gelkammer gegossen und mit einer Mischung aus Isopropanol und destilliertem Wasser überschichtet. Nach Polymerisierung des Trenngels wurde das Wasser entfernt und ein 4,5%iges Sammelgel gegossen. Die zu analysierenden Proteine wurden in Probenpuffer aufgenommen (Laemmlipuffer, s. Materialien), 5 Minuten bei 95°C erhitzt und auf das Gel aufgetragen. Zur Identifizierung der Banden wurde auf jedes Gel zusätzlich ein Molekulargewichtsmarker aufgetragen. Das Pufferreservoir wurde mit Laufpuffer gefüllt und die Elektrophorese für ca. 2 Stunden laufen gelassen (100 V Sammelgel, 160 V Trenngel). Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Proteine angefärbt und zur

weiteren Analyse auf eine Membran transferiert.

2.2.16 Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf Membranen

Materialien: Blottingtransferpuffer
TBS-Tween-Lösung

Nach 20 minütiger Inkubation in Transferpuffer wurden die aufgetrennten Proteine in einem Tank-Blot Verfahren auf Nitrozellulose-Membranen übertragen. Dazu wurde das Gel luftblasenfrei auf eine Nitrozellulose-Membran gelegt, welche dann zwischen je zwei mit Transferpuffer getränkte Whatman-Filterpapiere gelegt wurde. Dieses Sandwich wurde dann zwischen zwei Schaumstoffschichten so in die Blot-Apparatur eingespannt, dass die Membran der Anode zugewandt war. Der Proteintransfer erfolgte für 1,5 Stunden bei 150 mA, was einer Stromstärke von 0,8 mA/cm² entspricht. Zur Überprüfung der Bloteffizienz wurde die Membran mit Ponceau-Rot-Färbelösung gefärbt; die rotgefärbten Proteinbanden konnten im Anschluß durch Waschen mit 0,05% TBS-Tween wieder vollständig entfärbt werden.

2.2.17 Immunodetektion von Proteinen (Western Blot)

Materialien: Magermilchlösung
TBS-Tweenlösung
ECL-Kit

Zur Absättigung der auf der Nitrozellulosemembran vorhandenen Proteinbindungsstellen wurde die Membran für 2 Stunden in 5% ige Magermilch-Blockinglösung gelegt, geschüttelt und anschließend mit TBS-Tween gewaschen. Zur Immunodetektion der Proteine wurde die Membran mit einer entsprechenden Verdünnung des ersten Antikörpers (spezifisch für das zu analysierende Protein) in 5% BSA auf die Membran gegeben und bei 4°C über Nacht unter Schütteln inkubiert. Die Membran wurde dann erneut mit TBS-Tween gewaschen und bei Raumtemperatur für eine Stunde mit dem zweiten Antikörper, einem Meerrettichperoxidase konjugierten IgG-Antikörper, inkubiert.

2.2.18 Röntgenfilmentwicklung

Die gebundenen sekundären Antikörper wurden mittels Chemilumineszenz (ECL) nach Angaben des Herstellers detektiert. Die Peroxidase/Wasserstoffperoxid katalysierte Oxidation des Luminols führt zur Emission von Licht durch den folgenden Verfall des oxidierten, angeregten Luminols. Nach einminütiger Inkubationszeit wurde ein Röntgenfilm belichtet. Die Exposition des Films dauerte 30 sec bis 5 min und wurde in der Dunkelkammer vorgenommen.

2.2.19 Densitometrische Analyse

Die densitometrische Analyse der Blots wurde mit Hilfe des Bildanalyseprogramms TINA 2.09 g durchgeführt.