

3 METHODEN

3.1 Zellkultur

Zellkulturexperimente mit einer permanenten mikroglialen Zelllinie (BV-2 Zellen) stellen ein geeignetes Modellsystem dar, um komplexe zelluläre Vorgänge und Regulationsmechanismen vereinfacht zu betrachten und aufzuklären. Ergänzend zu den reinen *in vitro* Untersuchungen wurden zusätzlich *in vivo*-ähnliche Versuche mit der organotypischen hippokampalen Schnittkultur (OHSK) durchgeführt, um die funktionelle Bedeutung der mikroglial-vermittelten Neuroprotektion oder Neurodegeneration zu ergänzen bzw. zu bestätigen (siehe 3.4). Hier erfolgte sowohl der Einsatz von BV-2 Zellen als auch der von primären Mikrogliazellen. Die im Gewebeverband der OHSK erhaltenen Ergebnisse wurden abschließend in der Einzelzellkultur überprüft.

3.1.1 Kultivierung von BV-2 Mikrogliazellen

BV-2 Zellen wurden 1990 durch die Infektion primärer muriner Mikrogliazellen mit einem v-raf / v-myc onkogen tragenden Retrovirus (J2) von Blasi et al. generiert und immortalisiert (BLASI et al., 1990). Die morphologischen, immunphänotypischen und biochemischen Eigenschaften von BV-2 Zellen sind mit denen primärer Mikrogliazellen vergleichbar, weshalb sie sich gut als Modellsystem für funktionelle *in vitro* Studien eignen (LAURENZI et al., 2001). BV-2 Zellen zeigen nach ihrer Aktivierung, wie auch primäre Mikrogliazellen, eine amöboide Morphologie und sind phagozytosefähig (BOCCHINI et al., 1992). Weiterhin exprimieren sie typische mikrogliale Marker wie beispielsweise MHC-II-Moleküle, Rezeptoren für Fc- γ II/III, die Protease Cathepsin B, MIP-1, CD40 und die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-6 (SHAFER et al., 2003; RYAN et al., 1995; MURPHY et al., 1995; WOO et al., 2003).

Die Zellen wurden in DMEM in einem Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Bei Subkonvluenz wurden die adhären wachsenden Zellen mit einem sterilen Zellschaber vom Boden der Kulturflasche gelöst, zehnfach mit frischem Medium verdünnt und anschließend in Kulturflaschen neu ausgesät.

Kulturmedium für BV-2 Zellen:

DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) mit 3,7 g/l NaHCO₃, 4,5 g/l D-Glucose
10 % FKS (hitzeinaktiviert), 1 % L-Glutamin (200 mM),
100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin

3.1.2 Präparation und Kultivierung primärer Mikrogliazellen

Primärzellen sind Zellen, die frisch aus dem Gewebe isoliert wurden und im Regelfall unter Kulturbedingungen nur eine begrenzte Lebenserwartung besitzen. Für viele Fragestellungen zieht man Primärzellen den etablierten Zelllinien vor, weil gezeigt werden konnte, daß Primärzellen häufig auch

unter *in vitro*-Bedingungen die Aktivitäten und Funktionen widerspiegeln, die sie in ihrer physiologischen Umgebung zeigen. Für die Präparation primärer Mikrogliazellen wurden ein bis drei Tage alte Mäuse (P1-3) dekapitiert und nach Eröffnung der Schädelkalotte das Hirn unter sterilen Bedingungen entnommen und in eisgekühltes Präparationsmedium überführt. Unter dem Binokular wurden die Meningen mit Mikropinzetten entfernt. Das Gewebe wurde in eiskaltem Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freiem HBSS mit 4 mg/ml Trypsin enzymatisch und mit Hilfe der Scherung durch eine Pasteur-Pipette mechanisch dissoziiert und 10 min bei 300 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das aus zwei Kortices bestehende Pellet in 10 ml Mischkulturmedium resuspendiert, in Poly-L-Lysin-beschichtete Kulturflaschen überführt und diese bei 37°C, 5 % CO_2 im Brutschrank kultiviert.

Drei bis vier Tage nach der Präparation wurden die Zellen in den Kulturflaschen gewaschen. Hierfür wurde das alte Kulturmedium abgezogen, die Zellen zweimal mit kaltem HBSS mit Ca^{2+} und Mg^{2+} gewaschen und abschließend frisches Mischkulturmedium dazugegeben. Nach zehn bis zwölf Tagen erfolgte die Ernte der Mikrogliazellen. Die adhären wachsenden Mikrogliazellen wurden hierfür von dem homogenen, konfluenten Astrozyten-Fibroblasten-Zellrasen durch manuelles Schütteln der Kulturflaschen abgelöst und durch Aufnahme des Überstandes in 10 ml Kulturmedium in eine Einzelzellkultur überführt. Durch regelmäßiges Entfernen nicht-adhärenter Zellen im Überstand wurde nach 48 h eine Reinheit der Mikroglia-Einzelzellkultur von mehr als 96 % erreicht (HEPPNER et al., 1996).

Präparationsmedium:	HBSS (Hanks'balanced salts solution) mit Ca^{2+} und Mg^{2+}
Dissoziationsmedium:	HBSS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} + 4 mg/ml Trypsin (2,5 %)
Kulturmedium für die Mischkultur:	DMEM mit 4,5 g/l Glucose, 10 % FKS, 1 % L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin)
Kulturmedium für primäre Mikroglia:	DMEM mit 4,5 g/l Glucose, 2 % FKS, 1 % L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin)

Für die Beschichtung mit Poly-L-Lysin wurde 0,01 % Poly-L-Lysin in *a. dest.* (steril) gelöst und jeweils 5 ml des Ansatzes in einer Kulturflasche für 2 h bei 37°C inkubiert, anschließend wurden die Kulturflaschen zweimal mit sterilem Phosphatpuffer (PBS) gespült und konnten dann für den Versuch eingesetzt werden.

3.2 Klonierung eines antisense PARP-1- und eines antisense CD11a-Vektors

Die Versuchsschritte bis zum Erhalt eines antisense tragenden Klonierungsvektors sind in **Abbildung 3.1** schematisch dargestellt. Die verwendeten Methoden werden nachfolgend ausführlich erläutert.

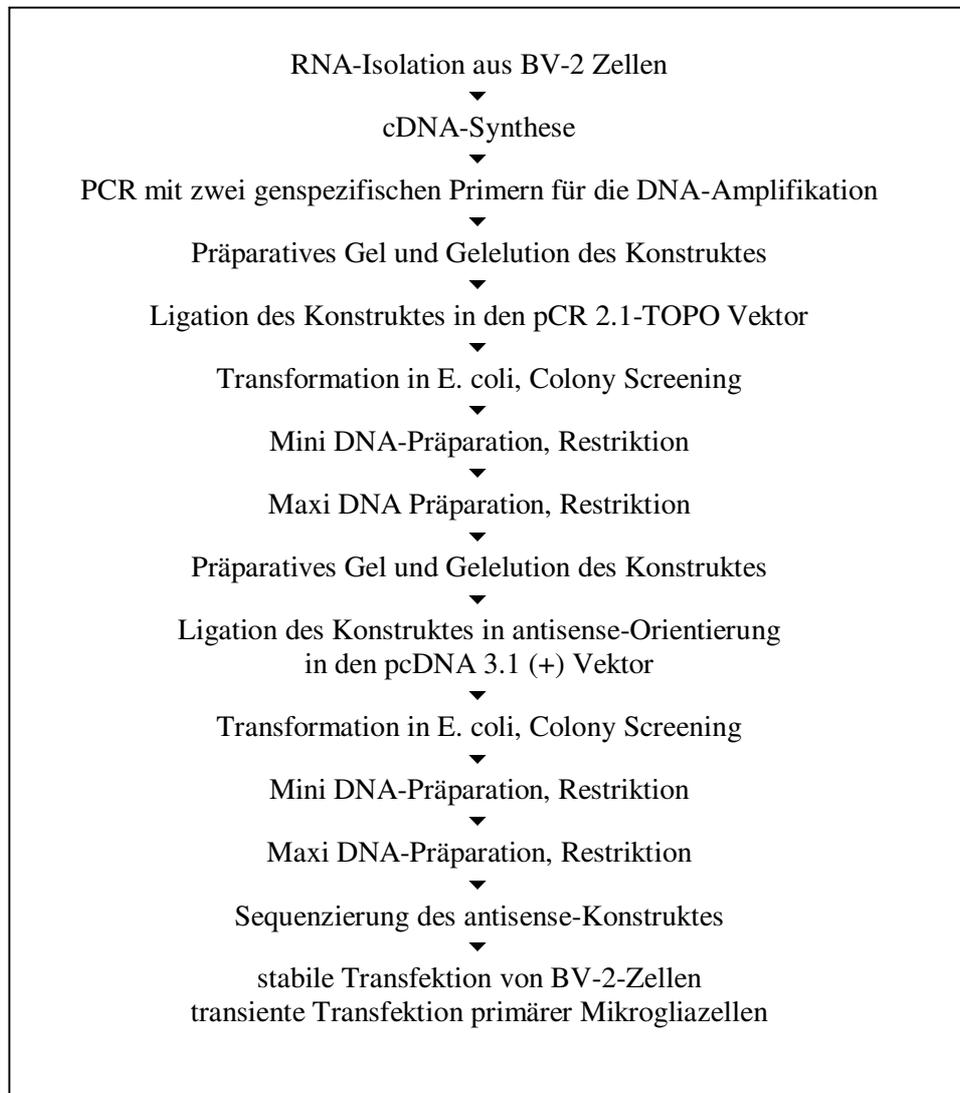


Abb. 3.1: Übersichtsschema zur Vektorkonstruktion

Durch Einklonieren einer gegen die mRNA des zu inhibierenden Zielmoleküls gerichteten antisense-Sequenz in den vielfachen Klonierungsbereich eines pcDNA3.1(+)-Vektors sollte die Expression des Zielproteins durch Behinderung der ribosomalen Translation der codierenden mRNA verhindert werden. Dazu wurde die entsprechende Ziel-Sequenz aus der Gesamt-RNA von BV-2 Mikrogliazellen mittels PCR amplifiziert, elektrophoretisch getrennt, aus dem Gel eluiert und in antisense-Orientierung in den pcDNA3.1(+)-Vektor ligiert. Mit dem erhaltenen antisense-Vektor wurden kompetente E.coli Zellen transformiert und selektiert. Aus der klonalen Kolonie wurde das Plasmid isoliert, elektrophoretisch getrennt, eluiert und schließlich in Mikrogliazellen mittels der Lipofectin-Methode transfiziert. Zur transienten Transfektion primärer Mikrogliazellen wurden Transfektionen mit

PAMAM-Dendrimern durchgeführt. Zuerst erfolgte die Klonierung eines antisense PARP-1-Vektors. Aufgrund der mit diesem Vektor erhaltenen Ergebnisse wurde daraufhin zu einem späteren Zeitpunkt ein antisense CD11a-Vektor hergestellt.

3.2.1 RNA-Isolierung aus BV-2 Zellen

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte aus BV-2 Mikrogliazellen unter Verwendung des RNeasy Midi Kits von Qiagen. RNA Moleküle ab einer Länge von 200 Basenpaaren werden mit dieser Methode selektiv durch Zentrifugation an eine aus Kieselgel bestehende Membran gebunden.

Die adhären wachsenden Mikrogliazellen wurden zunächst aus den Kulturflaschen mit einem sterilen Zellschaber abgelöst. Anschließend erfolgte eine Zellzählung (siehe 3.5.1). Die Zellen wurden dann mit sterilem PBS so eingestellt, daß sich eine Endzahl von ca. $1,5 \times 10^6$ Zellen pro Ansatz ergab. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 300 x g zentrifugiert und auf das Pellet 2 ml Lysepuffer RLT-Puffer gegeben. Nach dem Resuspendieren wurden die Zellen homogenisiert, indem die Proben 10 s gut gemischt und die Zellen fünf-bis zehnmal durch eine RNase freie Spritze mit kleiner Kanüle aufgezogen und herausdrückt wurden. Anschließend wurden 2 ml 70 % iger Ethanol, der die RNA-Bindung an die Membran erhöht, zum homogenisierten Lysat zugegeben und die Proben geschüttelt.

Alle folgenden Zentrifugationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur. Das Lysat wurde in eine RNeasy Midi Säule überführt und die Säulen für 10 min bei 3000 bis 5000 x g zentrifugiert. Nach Zugabe von 4 ml RW1-Waschpuffer auf die Säule erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 3000 bis 5000 x g. Anschließend wurden auf die Säule 2,5 ml RPE Waschpuffer gegeben und die Proben für 2 min bei 3000 bis 5000 x g zentrifugiert. Es wurden dann nochmals 2,5 ml RPE Waschpuffer auf die Säule gegeben und für 5 min bei 3000 bis 5000 x g zentrifugiert. Für die Elution der RNA wurden 150 µl RNase freies Wasser auf die Säule geben und die Säule in ein neues Zentrifugenröhrchen eingesetzt. Es erfolgten eine Inkubationszeit von einer Minute bei Raumtemperatur und anschließendes Zentrifugieren für 3 min bei 3000 bis 5000 x g. Die isolierte RNA wurde dann in ein steriles Eppendorfgefäß überführt und die Konzentration photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Ebenso wurde ein denaturierendes Formaldehyd-Agarose-Gel angefertigt, um die Qualität und Integrität der RNA zu überprüfen (siehe 3.2.2). Bis zur weiteren Verwendung wurden die RNA Proben bei -80°C aufbewahrt.

Pufferlösungen und Reagenzien des RNeasy Midi Kits:

Die genauen Zusammensetzungen der Pufferlösungen sind vom Hersteller nicht angegeben.

RLT	Lysepuffer, enthält hochdenaturierendes Guanidin Isocyanat=GITC, das sofort RNasen inaktiviert, enthält 0,143 mM β -ME
RW1	Waschpuffer, enthält hochdenaturierendes Guanidin Isocyanat=GITC,
RPE	Waschpuffer mit 4 Volumina Ethanol
RNase freies H ₂ O	zur Elution der RNA

3.2.2 RNA-Gelelektrophorese:

Zur Überprüfung der Integrität der isolierten RNA wurden die Proben auf ein denaturierendes Formaldehyd-Agarose-Gel aufgetragen. Für das Gel wurden zunächst 1,5 g Agarose in 110 ml DEPC-H₂O durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst und im Wasserbad auf 60°C abgekühlt. Anschließend wurden 25 ml 37 %iges Formaldehyd und 15 ml 10x MOPS-Puffer dazugegeben. Beide Lösungen wurden vorher im Wasserbad auf 60°C vorgewärmt.

Probenvorbereitung: 10 µg RNA
 4µl 5x RNA Ladepuffer
 1 µl Ethidiumbromid
 ad 16 µl DEPC H₂O

Die Proben wurden für 10 min bei 65°C inkubiert, dann auf Eis abgekühlt und anschließend auf das Gel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte über Nacht bei 25 bis 30 V in 1x MOPS-Puffer und wurde am nächsten Tag dokumentiert.

Verwendete Lösungen:

DEPC-H ₂ O	Milipore-H ₂ O, inkubiert mit 0,1 % (v/v) DEPC, autoklaviert
10x MOPS	100 mM MOPS, 50 mM NaAcetat, 10 mM EDTA in 1000 ml DEPC-H ₂ O, pH: 7,1
5x RNA Ladepuffer	30 % Formamid (deionisiert), 17,5 % Formaldehyd (37 %), 25 % Glycerol, 0,1 % Bromphenolblau, 0,1 % Xylencyanol, 1 mM EDTA, in 10 ml DEPC-H ₂ O
Ethidiumbromid	1 mg/ml (w/v) Ethidiumbromid in DEPC-H ₂ O
λ-Marker	Größenstandard, λ-Phagen DNA geschnitten mit Pst I

3.2.3 cDNA-Sythese

Die Synthese der cDNA aus der zuvor isolierten Gesamt-RNA wurde mit dem 1st-StrandTMcDNA Synthesis Kit von Clontech durchgeführt. Dabei wird die RNA revers in eine cDNA umgeschrieben, welche anschließend in einer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) vervielfältigt werden kann.

Zunächst wurden 2 µg RNA in ein Eppendorfgefäß überführt und dann mit DEPC Wasser auf ein Volumen von 12,5 µl aufgefüllt. Darauf wurden 1 µl Random-Hexamer-Primer-Gemisch gegeben. Der Ansatz wurde für 2 min bei 70°C auf dem Schüttler bei 350 rpm inkubiert und anschließend sofort auf Eis gestellt.

Es erfolgte anschließend die Zugabe von:

- 4 μ l 5x Reaktionspuffer
- 1 μ l dNTP-Mix
- 0,5 μ l Recombinanter RNase Inhibitor
- 1 μ l MMLV Reverse Transkriptase

Durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren wurden die Proben gemischt und dann anzentrifugiert. Es erfolgte eine Inkubation bei 42°C für eine Stunde auf dem Schüttler bei 300 rpm. Die Proben wurden bei 94°C für 5 min inkubiert, um die cDNA-Synthesereaktion abubrechen und um die Dnase-Aktivität zu unterbinden. Nach kurzem Anzentrifugieren der Proben wurden zu den Ansätzen 80 μ l DEPC-H₂O dazugegeben, um ein Endvolumen von 100 μ l zu erhalten. Die Proben wurden gemischt und erneut anzentrifugiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde die cDNA bei –80°C aufbewahrt.

Lösungen des dem 1st-StrandTMcDNA Synthesis Kits:

Random-Hexamer-Primer-Gemisch	20 μ M
5x Reaktionspuffer:	250 mM Tris-HCl, pH 8,3; 375 mM KCl, 15 mM MgCl
dNTP Mix	jeweils 10 mM
Recombinanter RNase Inhibitor	40 U/ μ l
MMLV Reverse Transkriptase	200 U/ μ l, MMLV: Moloney-Murine Leukemia Virus, recombinant

3.2.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

3.2.4.1 PCR mit zwei genspezifischen Primern für die DNA-Amplifikation

Zum Amplifizieren der DNA benötigt man für jeden Strang einen spezifischen Primer, der die Zielsequenz einrahmen soll. Um die cDNA zu überprüfen wurde, zunächst eine PCR mit β -Actin Primern durchgeführt. Zur Synthese des PARP-1- und des CD11a-Konstruktes wurden jeweils zwei spezielle Oligonucleotide verwendet. Der Primer X₁ für das PARP-1-Konstrukt besitzt am 5' Ende eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym Eco RI (Erkennungssequenz: GAATTC) und der Primer E₁ am 5' Ende eine Schnittstelle für das Enzym Xba I (Erkennungssequenz: TCTAgA).

Der Primer X₁ für das CD11a-Konstrukt besitzt am 5' Ende eine Restriktionsstelle für Not I (Erkennungssequenz: CggCCg) und der Primer E₁ am 5' Ende eine Schnittstelle für Xba I (Erkennungssequenz: TCTAgA). Alle genannten Restriktionsenzyme schneiden in der Weise, daß ein Fragment mit kohävasiven Enden entsteht, deren überstehende Basen sich wieder mit komplementären Sequenzen, die vom selben Enzym geschnitten wurden, zusammenlagern können.

β-Actin

X₁ 5' CTA ggC ACC Agg gTg TgA Tgg 3' Länge 21 mer
E₁ 5' CgT AgA Tgg gCA Cag TgT ggg 3' Länge: 21 mer

PARP-1

X₁ 5' gCT CTA gAA Agg ATg gCg gAg gCC TCg 3' Länge: 27 mer
E₁ 5' ggA ATT CCT TTT Tgg CCA CTT CAT CTg 3' Länge: 27 mer

CD11a

X₁ 5' gCT CTA gAT AAg CgC AgA TgA gTT TC 3' Länge: 26 mer
E₁ 5' ggC ggC CgC TTC ACA AAT TCC TCT ACA gg 3 Länge: 29 mer

3.2.4.2 Arbeitsprotokolle für die PCR

Die PCR dient zur selektiven Vervielfältigung von DNA-Sequenzen. Durch starkes Erhitzen des DNA-Doppelstranges trennen sich die beiden Stränge voneinander. Mit Hilfe der DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) lassen sich die dabei entstehenden Einzelstränge verdoppeln. Da in diesem Versuch als Ausgangsmaterial eine einsträngige cDNA eingesetzt wurde, begann der Amplifizierungsprozeß zunächst mit einer niedrigen Temperatur (siehe PCR Programm), damit sich die Primer anlagern konnten. Anschließend entstand mit Hilfe der Taq Polymerase eine doppelsträngige DNA. Diese wurde durch eine Temperaturerhöhung in Einzelstränge getrennt, und die beiden Primer konnten erneut ansetzen, um so die DNA-Sequenzen über mehrere Zyklen exponentiell zu vervielfältigen.

<p>PCR-Ansatz β-Actin:</p> <p>10 µl 10 x Pufferlösung 2 µl d-NTP-Mix 2 µl Primer X₁ 2 µl Primer E₁ 10 µl cDNA 0,5 µl Taq-Polymerase ad 100 µl <i>a. dest.</i></p>	<p>PCR-Programm β-Actin:</p> <p>1. 2 min 52°C 2. 30 s 72°C 3. 30 s 94°C 4. Schritt 1 bis 3 wird 39 x wiederholt 5. herunterkühlen auf 4°C</p>
--	--

<p>PCR-Ansatz PARP-1:</p> <p>10 µl 10 x Pufferlösung 2 µl d-NTP-Mix 3 µl Primer X₁ 3 µl Primer E₁ 10 µl cDNA 0,5 µl Taq-Polymerase ad 100 µl <i>a. dest.</i></p>	<p>PCR-Programm PARP-1:</p> <p>1. 2 min 68°C 2. 1 min 72°C 3. 30 s 94°C 4. Schritt 1 bis 3 wird 39 x wiederholt 5. herunterkühlen auf 4°C</p>
---	--

PCR-Ansatz CD11a:	PCR-Programm CD11a:
10 μ l 10 x Pufferlösung 2 μ l d-NTP-Mix 3 μ l Primer X ₁ 3 μ l Primer E ₁ 10 μ l cDNA 0,5 μ l Taq-Polymerase ad 100 μ l <i>a. dest.</i>	1. 2 min 64°C 2. 1 min 72°C 3. 30 s 94°C 4. Schritt 1 bis 3 wird 39 x wiederholt 5. herunterkühlen auf 4°C

10x Pufferlösung	100 mM Tris-HCl, pH 8,3; 500 mM KCl, 15 mM MgCl ₂ , 0,01 % (w/v) Gelatine
d-NTP-Mix	jeweils 10 mM
Primer X ₁ und Primer E ₁	0,02 μ mol
Taq-Polymerase	5 U/ μ l

Jeweils 15 μ l der in der PCR amplifizierten DNA wurden mit 6x XB-Ladepuffer auf ein Agarose Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 3.2.5). Anhand eines mitgeführten λ -DNA-Markers wurden nach dem Lauf die amplifizierten Banden des β -Actins (520 bp) und der beiden Konstrukte, PARP-1 (650bp) und CD11a (900bp), auf erfolgreiche Vervielfältigung und Größe auf dem Transilluminator überprüft und anschließend dokumentiert.

3.2.5 DNA-Gelelektrophorese:

Zur qualitativen DNA-Analyse wurden 2 %ige Agarose-Gele angefertigt. Hierfür wurde die entsprechende Menge Agarose je nach Gelgröße in 1x TAE-Puffer (SAMBROOK et al., 1989) in der Mikrowelle bis zum vollständigen Lösen der Agarose erhitzt. Die Flüssigkeit wurde bis auf ca. 50°C abgekühlt, bevor Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,4 μ g/ml) dazugegeben wurde. Die Proben wurden dann mit 0,2 Vol 6x XB-Ladepuffer versetzt. Die Gelläufe fanden bei 100 V für 1,5 bis 2 h in 1x TAE-Puffer statt.

Für präparative Gele wurde 1x TAE-Puffer mit 1 mmol/l Guanosin versetzt, um die DNA vor dem Abbau durch UV-Licht zu schützen (GRÜNDEMANN & SCHÖMIG, 1996).

Verwendete Lösungen:

1x TAE	40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA in 1000 ml Millipore-H ₂ O, pH 7,4
6x XB-Ladepuffer	0,25 % (w/v) Xylencyanol, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 30 % (v/v) Glycerin, in Millipore- H ₂ O
Ethidiumbromid	1 mg/ml (w/v) Ethidiumbromid in Millipore-H ₂ O

3.2.6 Präparative Gele und Geelution der Konstrukte

Zur Elution der Konstrukte aus dem präparativen Agarosegel wurde das QIAquick Gel Extraktions Kit von Qiagen verwendet. Die DNA wird dabei durch einen hohen Salzgehalt im Bindungspuffer und einen pH Wert von $\leq 7,5$ an die Kieselgelmembran der Aufreinigungssäule adsorbiert. Nach dem Gellauf wurden die Banden zunächst aus dem Gel auf dem Transilluminator ausgeschnitten. Die Gelstücke wurden dann in ein Eppendorfggefäß überführt und gewogen. Pro 100 mg Gel wurden 300 μ l Bindungspuffer QG dazugegeben. Die Gelstücke wurden 10 min bei 50°C vollständig aufgelöst und alle 2 bis 3 min gut gemischt. Anschließend wurde 1 Vol Isopropanol (auf 100 mg Gel 100 μ l Isopropanol) zu den DNA-Fragmenten gegeben, die kleiner als 500 bp oder größer als 4 kbp waren. Die Elutionssäule wurde in ein Sammelgefäß eingesetzt und die Probe auf die Säule gegeben und 1 min bei $\geq 10.000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde aus dem Sammelgefäß verworfen und 750 μ l Waschpuffer PE auf die Säule gegeben. Nach einer Zentrifugationszeit von 1 Minute bei $\geq 10.000 \times g$ wurde der Überstand aus dem Sammelgefäß entsorgt und nochmals 1 min bei $\geq 10.000 \times g$ zentrifugiert. Zur DNA-Elution wurde die Säule zunächst in ein neues Sammelgefäß gegeben. Dann wurden 30 μ l Elutionspuffer EB in die Mitte der Säule auf die Membran pipettiert, 1 Minute inkubiert und anschließend die Säule 1 min bei $\geq 10.000 \times g$ zentrifugiert.

Die eluierte DNA wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen und die Integrität in einem Agarosegel überprüft. Die DNA wurde bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C aufbewahrt.

Pufferlösungen und Reagenzien des QIAquick Gel Extraktions Kits:

Die genauen Zusammensetzungen der Pufferlösungen sind vom Hersteller nicht angegeben.

Puffer QG	Solubilisiert das Agarosegelstück und ermöglicht durch eine hohe Salzkonzentration und einen pH-Wert von $\leq 7,5$ die Bindung der DNA an die Membran der Säule
Waschpuffer PE	enthält Ethanol (96-100 %), entfernt Verunreinigungen, wie Salze, Enzyme, Agarose und Ethidiumbromid
Puffer EB	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0; Elution der DNA durch eine niedrige Salzkonzentration und einen basischen pH

3.2.7 Ligation der Konstrukte in den pCR 2.1-TOPO Klonierungsvektor

Die Ligation der eluierten antisense-Konstrukte wurde mit dem TOPO TA Cloning Kit von Invitrogen durchgeführt. Dabei können PCR Produkte, die mit der Taq-Polymerase in der PCR amplifiziert wurden, innerhalb eines 5 minütigen Ligationsschrittes direkt mit Hilfe des Enzyms Topoisomerase I in den pCR 2.1-TOPO Vektor (**Vektorkarte siehe Abbildung 3.2**) eingefügt werden. Durch das im Vektor enthaltene Ampicillinresistenzgen können transformierte E. coli Zellen anschließend selektioniert werden. Zusätzlich läßt sich eine Insertionsaktivierung mit dem X-gal-System nachweisen, da das Fragment in ein funktionelles β -Galactosidasegen im Vektor inkloniert wird. Alle

selektiven Antibiotikums Ampicillin und mit jeweils 40 µl X-gal und IPTG Vorbehandlung ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Lösungen des TOPO TA Cloning Kits:

pCR-TOPO Vektor

E.coli Zellen	Genotyp TOP 10F [']
SOC Medium	2 % Trypton, 0,5 % Yeast Extract, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glucose

Weitere Reagenzien:

2x YT-Flüssigmedium	16 g Bacto-Trypton, 10 g Bacto-Yeast Extract, 5 g NaCl ad 1000 ml Millipore-H ₂ O, pH 7,0
---------------------	---

Für die Herstellung von 2x YT-Agarplatten wurden zum oben angegebenen 2x YT-Medium noch 1,5 % Agar hinzugegeben. Das Medium wurde dann für 20 min bei 120°C autoklaviert, wobei sich die Agarose durch die hohen Temperaturen löste. Nach dem Abkühlen auf ca 50°C wurden 100 µg/ml steril filtriertes Ampicillin hinzugefügt und der Agar anschließend in sterile Petrischalen gegossen. Die Platten wurden ÜN getrocknet und konnten am nächsten Tag verwendet werden.

3.2.9 Colony Screening

Zur Analyse der gewachsenen Klone auf erfolgreiche Ligation des Inserts wurden farblose Einzelkolonien mit sterilen Zahnstochern von den selektiven Platten abgenommen und in verschließbare Röhrchen mit 4 ml 2x YT-Flüssigmedium, versetzt mit 100 µg/ml des Selektionsantibiotikums, überführt. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler bei 180 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden je 2 ml der Suspension abgenommen und Minipräparationen der Plasmid-DNA (siehe 3.2.10) durchgeführt.

3.2.10 DNA-Minipräparation

Die Plasmidaufreinigung erfolgte nach einem modifizierten Protokoll der Firma SEQLAB-Laccone. 2 ml der Übernachtskultur wurden für 10 min bei 4000 rpm abzentrifugiert und der Überstand vollständig abgenommen. Auf das Zellpellet wurden jeweils 100 µl RNase-haltiger Resuspensionspuffer RE gegeben und gut resuspendiert. 200 µl Lysispuffer LY wurden anschließend dazugegeben und das Eppendorfgefäß vorsichtig einmal über-Kopf-geschwenkt und für maximal 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 150 µl Neutralisationspuffer NE auf den Ansatz gegeben und das Reaktionsgefäß erneut vorsichtig einmal über-Kopf geschwenkt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden dann 30 min bei $\geq 10.000 \times g$ zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Nach der Zugabe von 2 Vol. absolutem Ethanol wurde der Ansatz gut gemischt und für 15 min bei $\geq 10.000 \times g$ und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet

wurde anschließend mit 1 ml 70 %igem Ethanol versetzt, kurz geschwenkt und und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden erneut für 5 min bei $\geq 10.000 \times g$ zentrifugiert und anschließend der Ethanolüberstand abpipettiert. Abschließend wurde das Pellet getrocknet und in 30 μ l Millipore-H₂O aufgenommen. Bis zur weiteren Verwendung wurde die isolierte DNA bei -20°C aufbewahrt.

Pufferlösungen des Plasmidaufreinigungskits:

RNase-haltiger Resuspensionspuffer RE: 50 mM Tris HCl, 10 mM EDTA,
100 μ g/ml RNase A, pH 8,0
Lysispuffer LY: 200 mM NaOH, 1% SDS
Neutralisationspuffer NE: 3 M CH₃COOK, pH 5,5

3.2.11 Restriktionsverdau

Um den Einbau der jeweiligen Konstrukte in den entsprechenden Vektor nachzuweisen, wurde die DNA nach der Isolierung mit spezifischen Restriktionsendonukleasen verdaut. Das PARP-1 Insert wurde hierfür mit den beiden Enzymen Eco RI und Xba I aus dem Vektor geschnitten. Für das CD11a-Konstrukt wurden die beiden Endonukleasen Xba I und Not I verwendet (siehe 3.2.4.1).

Restriktionsverdau PARP-1:	Restriktionsverdau CD11a:
ca. 1 μ g DNA 1 μ l Eco RI (20 U/ μ l) 1 μ l Xba I (10 U/ μ l) 2,5 μ l 10x Pufferlösung ad 25 μ l <i>a. bidest</i>	ca. 1 μ g DNA 1 μ l Not I ((10 U/ μ l) 1 μ l Xba I (10 U/ μ l) 2,5 μ l 10x Pufferlösung ad 25 μ l <i>a. bidest</i>
Pufferlösung: 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 100 mM NaCl, 100 μ g/ml BSA, pH 7,5	

Restriktionen fanden bei 37°C in einem Gesamtvolumen von 25 μ l statt. Der Ansatz wurde für 1 bis 2 h inkubiert und anschließend mit 0,2 Vol. 6x XB-Ladepuffer auf ein Agarose-Gel aufgetragen (siehe 3.2.5).

3.2.12 DNA-Maxipräparation

Die Plasmid-DNA-Präparation erfolgte mit Hilfe des NucleoBond Nucleinsäure Aufreinigungskits der Firma Clontech. Je 50 ml der über Nacht gewachsenen Bakterienkulturen wurden bei 6000 x g für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und auf das Pellet 12 ml Puffer S1 mit 100 µg/ml RNase gegeben und das Pellet resuspendiert. Auf die Suspension wurden darauffolgend 12 ml Puffer S2 gegeben, das Probenröhrchen vorsichtig geschwenkt und bei RT für 3 min inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von 12 ml Puffer S3. Nach vorsichtigem Schütteln wurde der Ansatz für 5 min auf Eis inkubiert und anschließend 20 min bei 12.000 x g bei 4°C zentrifugiert. Dann wurde der Überstand durch einen Nucleobond Faltenfilter gegeben und in einem neuen Röhrchen bis zur weiteren Verwendung aufgefangen. Anschließend erfolgte das Equilibrieren der AX 500 Maxi Säulen mit 6 ml Puffer N2. Nach Durchfluß von Puffer N2 wurde dieser verworfen und das gefilterte Lysat auf die Säule gegeben. Dann wurde die Säule mit zweimal 16 ml Puffer N3 gewaschen und der Durchfluß verworfen. Die Elution der Plasmid DNA erfolgte mit 15 ml Puffer N5. Die eluierte Plasmid DNA wurde mit 11 ml Isopropanol versetzt und anschließend gut geschüttelt, um die DNA zu präzipitieren. Dann wurde für 30 min bei 15.000 x g bei 4°C zentrifugiert und der Überstand vorsichtig entfernt. Auf das Präzipitat wurden 2 ml eiskalter 70 %iger Ethanol gegeben, das Röhrchen vorsichtig geschüttelt und erneut für 5 min bei 4°C und 15.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend vorsichtig abgezogen und das Pellet für 5 min bei RT getrocknet und abschließend in 200 µl 1x TE Puffer aufgenommen. Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde photometrisch bestimmt und die Intaktheit im Agarose-Gel bestimmt (siehe 3.2.5). Bis zur weiteren Verwendung wurde die isolierte DNA bei -20°C gelagert.

1x TE-Puffer: 10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5

Lösungen und Reagenzien des NucleoBond Nucleinsäure Aufreinigungskits:

Puffer S1	50 mM Tris HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A, pH 8,0
Puffer S2	200 mM NaOH, 1 % SDS
Puffer S3	2,8 M CH ₃ COOK, pH 5,1
Puffer N2	100 mM Tris, 15 % Ethanol, 900 mM KCl, 0,15 % Triton X-100, pH 6,3
Puffer N3	100 mM Tris, 15 % Ethanol, 1,15 M KCl, 0,15 % Triton X-100, pH 6,3
Puffer N5	100 mM Tris, 15 % Ethanol, 1 M KCl, 0,15 % Triton X-100, pH 8,5

3.2.13 Restriktionsverdau, präparative Gele und Geelution der Konstrukte

Nach der Isolierung der DNA wurden die Vektoren in Abhängigkeit des eingebauten Inserts mit den unter 3.2.11 genannten Restriktionsnukleasen erneut geschnitten. Das Protokoll für den Restriktionsverdau ist ebenfalls unter 3.2.11 ersichtlich.

Nach der Restriktion wurde die geschnittene Plasmid-DNA auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen (siehe 3.2.5). Die für die nachfolgende Ligation benötigten Banden (PARP-1: 650bp; CD11a: 900bp) wurden nach dem Gellauf ausgeschnitten und eluiert (siehe 3.2.6).

3.2.14 Ligation der Konstrukte in antisense-Orientierung in den pcDNA 3.1 (+) Vektor und Transformation des Ligationsansatzes in E. coli

Die Ligation der Inserts wurde mit der T4-DNA-Ligase durchgeführt. Diese Ligase ist in der Lage, zueinander kompatible 5'-Phosphat- mit 3'-OH-Enden kovalent zu verknüpfen. Die Ligation der Konstrukte erfolgte in antisense-Orientierung in den multiplen Klonierungsbereich eines pcDNA3.1(+)-Vektors (**Vektorkarte siehe Abbildung 3.3**) mit dem Ziel, die Expression des Zielproteins durch Behinderung der ribosomalen Translation der codierenden mRNA zu verhindern.

Protokoll des Ligationsansatzes:

200 ng linearisierte Vektor-DNA
 78 ng Fragment-DNA (PARP-1) bzw. 108 ng Fragment-DNA (CD11a)
 1 µl T4-DNA-Ligase (20 U/µl)
 2,5 µl Ligase-Puffer (50 mM Tris-HCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM DTT;
 1 mM ATP; 25 µg/ml BSA; pH: 7,8)
 ad 25 µl *a. dest.*

Die eingesetzte Menge an Vektor-DNA wurde mit 200 ng festgelegt und die benötigte Menge an Fragment-DNA für den Ligationsansatz nach folgender Formel berechnet:

$$X \text{ ng Fragment-DNA} = \frac{Y \text{ bp Fragment-DNA} \times 200 \text{ ng Vektor-DNA}}{\text{bp Vektor}}$$

Da das Verhältnis von Fragment zu linearisiertem Vektor ausschlaggebend für eine effiziente Ligation ist, wurde ein dreifacher Überschuß von Fragment-DNA zu linearisierter Vektor-DNA gewählt. Die Reaktion erfolgte über Nacht im Wasserbad bei 16°C. Zur Überprüfung der Ligation wurde ein Teil des Ligationsansatzes im Probegel aufgetrennt, der übrige Teil konnte zur Transformation von E. coli Zellen verwendet werden.

20 µl des Ligationsansatzes wurden auf kompetente E.coli Zellen (Genotyp TOP 10F', Invitrogen) gegeben. Das Transformationsprotokoll wurde, wie unter 3.2.8 beschrieben, durchgeführt. Jedoch wurde zu Beginn der gesamte Ligationsansatz (25 µl) auf kompetente E. coli Zellen gegeben.

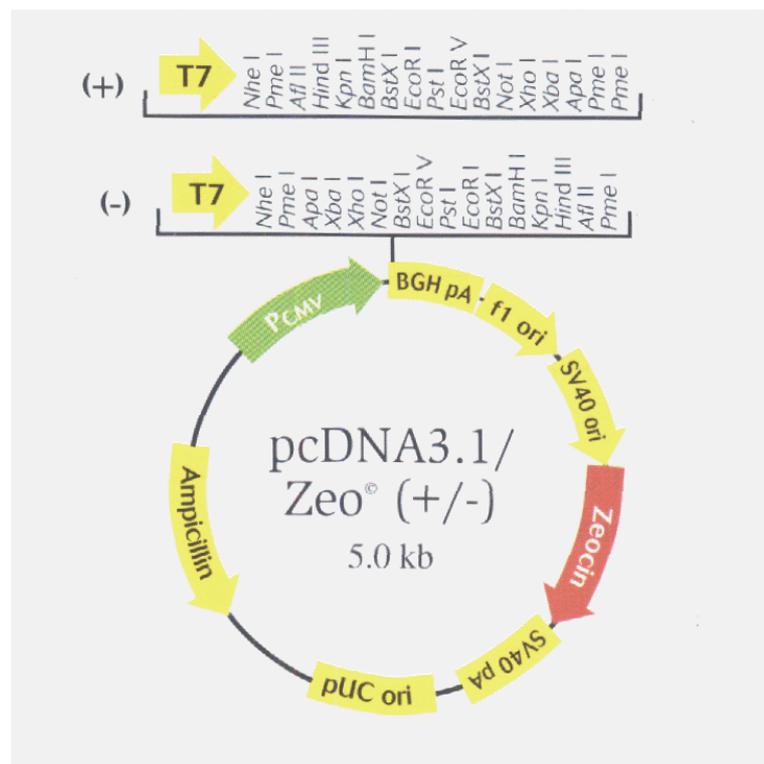


Abb. 3.3: Vektorkarte des pcDNA3.1(+)-Vektors von Invitrogen. Der Vektor enthält einen Cytomegalievirus Promotor (P_{CMV}) für eine beschleunigte und hohe Expression der eingefügten Gensequenz, einen großen multiplen Klonierungsbereich in vorwärts (+) und rückwärts (-) Orientierung, ein bovines Wachstumshormon, ein Polyadenylierungssignal (BGH_{pA}) und eine Transkriptionsterminierungssequenz um die mRNA-Stabilität zu verstärken, einen f1-Ursprung, um den Einzelstrang der sense-Strang-DNA zu erhalten, ein Ampicillin Resistenzgen mit pUC-Ursprung für die Selektion in *E. coli* und ein Zeocin-Resistenzgen zur Selektion eukaryotischen Zellen.

3.2.15 Colony Screening und DNA Präparationen

Zur Analyse der gewachsenen Klone auf eine erfolgreiche Ligation des Inserts wurden Einzelkolonien von den Platten abgenommen und in verschließbare Röhren mit 4 ml 2x YT-Flüssigmedium, versetzt mit 100 $\mu\text{g/ml}$ des Selektionsantibiotikums, überführt. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler bei 180 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden je 2 ml der Suspension abgenommen und Minipräparationen der Plasmid-DNA (siehe 3.2.10) durchgeführt. Um den Einbau der antisense-Konstrukte in den entsprechenden Vektor nachzuweisen, wurde die DNA nach der Isolierung mit spezifischen Restriktionsendonukleasen verdaut. Erfolgreich transformierte *E. coli* Zellen wurden in großem Maßstab in 2x YT-Medium mit Selektionsantibiotikum über Nacht bei 37°C angezogen. Für die Isolierung größerer Mengen an Gesamt-DNA wurde erneut, wie unter 3.2.12

beschrieben, eine Plasmid-DNA-Präparation durchgeführt. Das DNA-Pellet wurde am Ende der Aufarbeitung in 1x TE-Puffer aufgenommen.

3.2.16 Teilsequenzierung der Vektoren

Um die Insertion der DNA-Fragmente in die Vektoren zu bestätigen, wurden die Übergangsbereiche zwischen Ausgangsvektor und Insert von einer Seite ansequenziert. Die Sequenzierungen wurden von der Firma DLMBC in Berlin mit einem automatischen Sequenzierer (ABI 373) nach dem Sanger-Coulson-Verfahren (SANGER et al., 1977) mit dem T7 Standardprimer durchgeführt.

3.3 Transfektion von BV-2 Zellen und primärer Mikroglia

Bei der Transfektion wird fremde DNA in eine höhere Empfängerzelle eingebracht (IBELGAUFTS, 1993). Der in diesem Protokoll verwendete pcDNA 3.1(+) Plasmidvektor enthält dabei neben den einklonierten antisense-Konstrukten, die gegen das Enzym PARP-1 oder gegen das Integrin CD11a gerichtet waren (siehe 3.2), Sequenzen, die es ihm ermöglichen, sich in der Wirtszelle zu replizieren. Die Replikation der transfizierten DNA wird erreicht, indem die Fremd-DNA in das Genom der Wirtszelle integriert, so daß sie gemeinsam mit der DNA der Wirtszelle vor jeder Zellteilung repliziert wird (NICHOLL, 1995). Erfolgreich transfizierte Zellen konnten mit Zeocin selektioniert werden, da der Plasmidvektor ein Resistenzgen gegen dieses Antibiotikum enthält.

Die Transfektion der permanenten Zelllinie und der Primärzellen mit den antisense-tragenden Vektoren sollte dazu dienen, Informationen über das Aktivierungs- und Migrationsverhalten der Mikrogliazellen bei entsprechender Inhibierung des Enzyms PARP-1 oder des Integrins CD11a zu erhalten. Erfolgreich transfizierte Zellen wurden nachfolgend für Experimente mit den organotypischen hippokampalen Schnittkulturen (siehe 3.4) und für Zellkulturversuche (siehe 3.5) eingesetzt.

3.3.1 Transfektion von BV-2 Zellen mit Roti-Fect

Roti-Fect ist eine Liposomenformulierung eines polykationischen Lipids in Kombination mit einem neutralen Kolipid. Es kondensiert DNA in kompakte Strukturen (Roti-Fect/DNA-Komplexe) und bewirkt deren effiziente Aufnahme in Säugerzellen (DOKKA et al., 2000; LIU et al., 1997). Roti-Fect zeigt keine Hemmung durch Serum und weist eine geringe Toxizität auf, was einen Vorteil bei der Transfektion von sensitiven Zelllinien darstellt. Native BV-2 Zellen wurden mit dem unveränderten pcDNA3.1(+) Plasmidvektor stabil transfiziert. Diese Zellen dienten als Kontrollzellen in den nachfolgenden Versuchen. Ebenso wurden native BV-2 Zellen mit dem antisense PARP-1-Vektor oder dem antisense CD11a-Vektor stabil transfiziert.

BV-2 Zellen wurden in einer Dichte von 2×10^5 Zellen pro ml in DMEM + 2 % FCS + Antibiotika in Kulturflaschen ausgesät und für 24 h im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Am folgenden Tag wiesen die Zellen eine Konfluenz von ungefähr 80 % auf. Die eingefrorenen Lösungen der DNA und des Transfektionsreagenzes wurden zunächst auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig gemischt. Pro Ansatz wurden dann die zwei Lösungen wie folgt getrennt hergestellt:

12 µg DNA wurden mit DMEM Medium ohne Serum und Antibiotikazusätze auf ein Volumen von 360 µl aufgefüllt, und zu 60 µl Roti-fect wurden 300 µl DMEM ohne Serum und Antibiotika gegeben. Anschließend wurden beide Ansätze zusammengegeben und vorsichtig gemischt. Die Lösungen wurden für 20-40 min bei Raumtemperatur inkubiert, damit sich der DNA/Lipid-Komplex bilden konnte. Während der Komplexbildung wurden die Zellen zweimal mit vorgewärmten PBS gewaschen, und in die Kulturflaschen wurde anschließend 8 ml DMEM Medium mit 10 % FKS aber ohne Antibiotikazusatz überführt. Nach der Inkubationszeit von 20-40 min wurde der DNA/Lipid-Komplex mit einer Pipette auf die Zellen in der Kulturflasche gegeben und die Flaschen vorsichtig geschwenkt. Die Kulturflaschen wurden für 6 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Zeit erfolgte die Zugabe von 8 ml vollständigem Medium (DMEM + 10 %FKS + Antibiotika). Die Zellen wurden dann über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Transfektionsmedium durch frisches, vollständiges Medium ersetzt. Nach vier Tagen erfolgte eine zweiwöchige Selektion mit 100 µg/ml Zeocin (siehe 3.3.3).

3.3.2 Transfektion primärer Mikroglia mit Polyamidoamin (PAMAM) Dendrimeren

Die Transfektion primärer Mikrogliazellen erfolgte mit Polyamidoamin (PAMAM) Starburst Dendrimeren (siehe **Abbildung 3.4**). Von diesen synthetischen Polymeren gibt es verschiedene Generationen, die sich in ihrem Molekulargewicht, dem Durchmesser und der Anzahl der Oberflächengruppen (NH₂-Gruppen) unterscheiden. Die Moleküle besitzen eine baumartig verzweigte Struktur und bilden durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den negativ geladenen Phosphatgruppen der Nucleinsäure und den positiv geladenen Aminogruppen der Dendrimeroberfläche einen Komplex mit der DNA (EICHMAN et al., 2000; BIELINSKA et al, 1997). Durch ihre Fähigkeit, mit der DNA zu assoziieren und zu kondensieren, wird die DNA effizient in die Zelle eingeschleust. Die Aufnahme in die Zelle erfolgt über passiven Transport oder durch Endozytose.

PAMAM-Dendrimere werden als hoch effektive kationische Polymere und non-virale Vektoren eingesetzt. Sie lösen bei der Transfektion von Zellen keine Immunantwort aus und zeigen eine nur geringe Zytotoxizität. Damit stellen sie ein geeignetes System für den *in vivo* Gentransfer und gentherapeutische Anwendungen dar (DENNIG & DUNCAN, 2002; ESFAND & TOMALIA, 2001).

Zunächst wurde in Vorversuchen das optimale Verhältnis von DNA zu den PAMAM-Dendrimern ausgetestet:

Gesamt-DNA/50.000 Zellen	PAMAM/DNA Verhältnis (mol/mol)
5µg	5
10µg	2-5
50µg	1-2

Da ein Plasmidvektor mit einem antisense-Konstrukt gegen das Enzym PARP-1 verwendet worden war, mussten zunächst die Werte ermittelt werden, bei denen es zur stärksten Inhibition der PARP-1-Aktivität (siehe 3.3.4.2) kam. Für die Transfektionsversuche wurden schließlich 5 µg DNA auf 50.000 Zellen und die Dendrimere der vierten Generation in einem 5-fachen Überschuß eingesetzt. Die Transfektion primärer Mikroglia wurde wie folgt für Versuche mit der organotypischen hippocampalen Schnittkultur angesetzt:

200 µg DNA, die in 1 x TE-Puffer gelöst worden waren, wurden zunächst mit 283 µg PAMAM Dendrimern zusammengegeben. Anschließend wurde das Transfektionsgemisch auf 2×10^5 Zellen in DMEM + 2 % FCS ohne Antibiotika (Gesamtvolumen: 10 ml) gebracht und für 12 Stunden inkubiert. Danach wurden 10 ml vollständiges Medium (DMEM + 2 % FCS + Antibiotika) dazugegeben und die Zellen zusätzlich mit 10 µg/ml LPS aktiviert und für weitere 12 h inkubiert. Das alte Medium wurde dann vollständig entfernt und 20 ml frisches DMEM + 2 % FCS + Antibiotika ohne weitere LPS-Stimulation zu den Zellen gegeben und für 12 h inkubiert.

Die Zellen wurden anschließend für 48 h einer Kurzzeitselektion mit Zeocin (10 µg/ml) ausgesetzt (siehe 3.3.3). Gleichzeitig wurden die Zellen mit 20 µg/ml Mini Emerald vormarkiert (siehe 3.4.2). Nach den 48 h wurde ein Teil der Zellen auf ihre PARP-1-Aktivität getestet (siehe 3.3.4.2). Der andere Teil wurde aufgearbeitet und die Zellen auf die Schnittkulturen transferiert, um die Einwanderung zum Ort der Neurodegeneration und die Beteiligung am neuronalen Zelltod in der Schnittkultur zu analysieren (siehe 3.4.7).

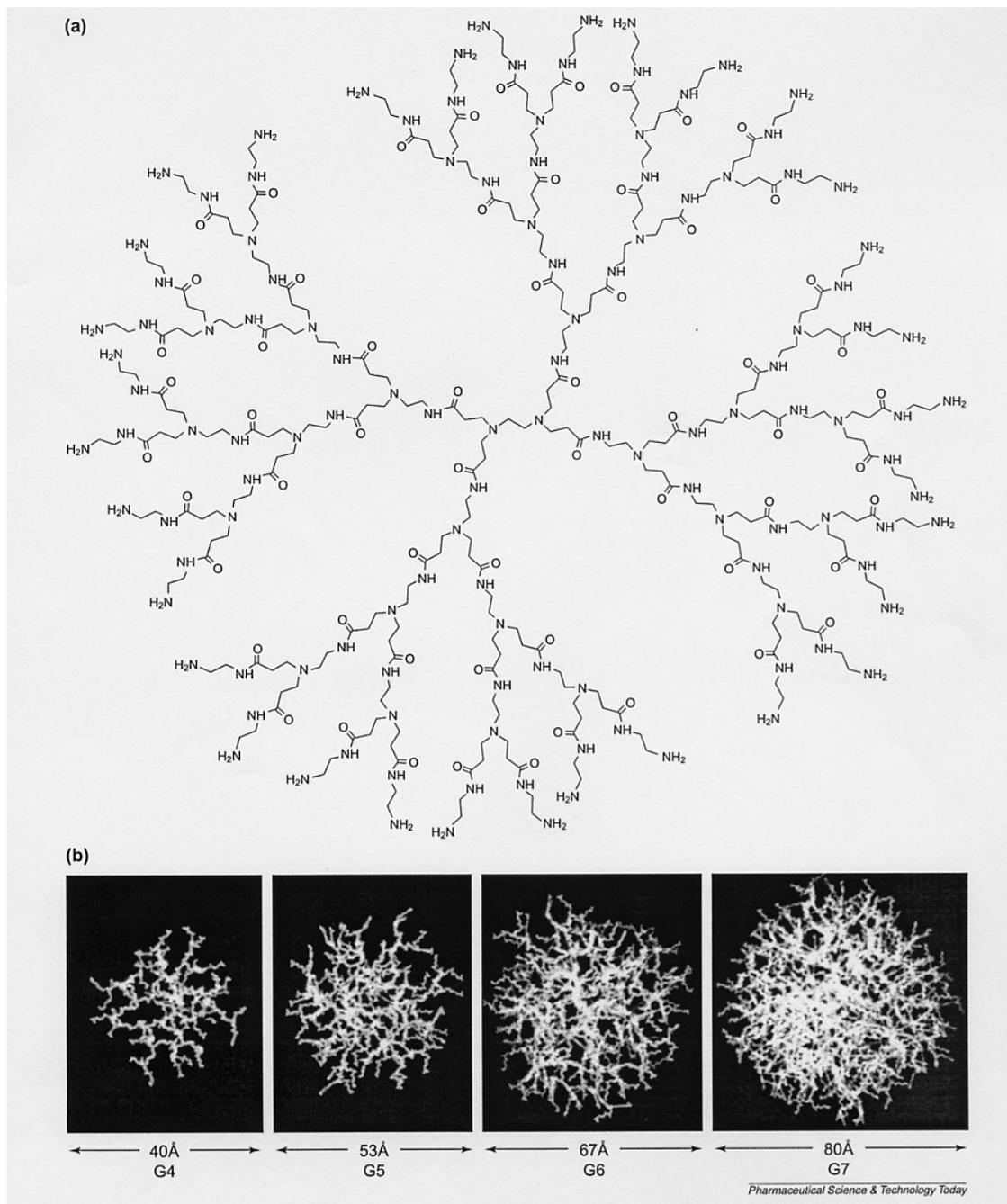


Abb 3.4: Strukturelle Charakteristik von Polyamidoamin (PAMAM) Dendrimern (EICHMAN et al., 2000). **a.:** Das Polymerwachstum geht von einem Initiator-molekül aus und verläuft von innen nach außen über eine Serie von Polymerisationsschritten. Mit zunehmender Generation nimmt die Verzweigung zu, ebenso wird durch die innere Höhlenbildung die Fähigkeit verstärkt, kleine Moleküle festzuhalten. Dendrimere besitzen eine große Anzahl primärer Aminoberflächengruppen, die es ihnen ermöglicht, elektrostatisch mit Nukleinsäuren zu interagieren. **b:** Modelldarstellungen von PAMAM Dendrimern der vierten bis siebten Generation (G4-G7).

3.3.3 Selektion mit Zeocin

Zeocin gehört zu den Antibiotika der Bleomycin/Phleomycin Familie, ist ein basisches und wasserlösliches Glycopeptid und wurde aus *Streptomyces verticillus* isoliert. Ein wichtiger Bestandteil des Moleküls ist der Kupfer-Chelat-Komplex, der zunächst inaktiv vorliegt. Wenn das Antibiotikum in die Zelle gelangt, wird das zweiwertige Kupfer-Kation (Cu^{2+}) durch zelleigene Sulfhydrylkomponenten in ein einwertiges Kation (Cu^{1+}) reduziert. Zeocin liegt dann aktiviert vor, bindet an die DNA und bewirkt ihre nachfolgende Spaltung, die mit dem Zelltod endet. Zeocin ist sowohl in Bakterien als auch in Säugerzellen wirksam.

Mit nativen BV-2 Zellen wurde vor der Transfektion eine Toxizitätskurve erstellt, da Zelllinien teilweise eine natürliche Resistenz gegen verschiedene Antibiotika besitzen. Hierfür wurden 1×10^5 Zellen in 6er-Lochplatten ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Am nächsten Tag wurde in das Medium Zeocin in verschiedenen Konzentrationen gegeben (0-500 $\mu\text{g/ml}$). Nach drei Tagen wurden die Zellen mit einem sterilen Zellschaber vom Boden der Lochplatten gelöst, mit Trypanblau angefärbt und in einer Neubauer Zählkammer gezählt (siehe 3.5.1). Durch die Ermittlung der Zellzahl der vitalen Zellen und der toten Zellen und den Vergleich der Gruppen untereinander konnte die minimale Konzentration an Zeocin bestimmt werden, die zu einem Zelltod führt. Die ermittelte Konzentration ermöglichte einerseits ein Überleben der transfizierten Zellen und bewirkte andererseits, daß nicht transfizierte Zellen abgetötet wurden. BV-2 Zellen wurden zum Erhalt einer stabil transfizierten Zelllinie für 2 Wochen mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Zeocin behandelt. Transient transfizierte primäre Mikrogliazellen wurden für 48 h mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Zeocin selektiert, da diese Zellen sensitiver auf das Antibiotikum reagierten.

3.3.4 Test auf Funktionalität der antisense-Konstrukte

Bevor die stabil oder transient transfizierten Mikrogliazellen in den nachfolgend beschriebenen Versuchen eingesetzt wurden, erfolgte die Überprüfung der Effektivität der eingebrachten antisense-Konstrukte. Getestet wurde dabei, ob eine verminderte oder fehlende Expression der zu inhibierenden Moleküle PARP-1 und CD11a nach Stimulation mit LPS, im Vergleich zu den mit dem Kontrollvektor transfizierten Zellen, vorlag.

3.3.4.1 Nachweis der PARP-1 Expression mit dem Immuno-Blotting Verfahren

Der Nachweis der PARP-1-Expression an den mit dem asPARP-1-Vektor transfizierten BV-2 Zellen und den Kontrollzellen erfolgte mit der Immuno-Blotting-Technik. Bei dieser Methode werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus einem Trenngel auf eine Membran übertragen. Dadurch wird eine Kopie des Gels produziert, wobei die Proteine auf dem Filter immobilisiert werden. Das ursprünglich im Gel enthaltene Trennmuster der Proteine sowie deren Immunreaktivität bleiben jedoch erhalten. Nach dem Transfer wird die Membran mit spezifischen Antikörpern behandelt, wodurch eine Identifikation und quantitative Bestimmung einzelner Proteine möglich ist.

Für die Zellernte wurden die BV-2 Zellen im Kulturmedium mit einem Zellschaber vom Kulturgefäß gelöst und in eiskaltem PBS aufgenommen und bei 300 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in PBS mit 1 mmol/l DTT aufgenommen. Die Lyse der Zellen wurde durch wiederholte Frier- und Auftauzyklen der Zellen erreicht. Die lysierten Proben konnten bei -20°C aufbewahrt werden.

Vor der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine mußte zunächst deren Konzentration bestimmt werden. Hierfür wurden die Proben 1:5 mit PBS verdünnt und in einer Dreifachbestimmung für die Proteinmessung eingesetzt. Zusätzlich wurde eine Proteinstandardreihe in einer Doppelbestimmung mitgeführt. Die Messung erfolgte in einer 96-Lochplatte. 25 µl der Probe oder des Standards wurden in die Lochplatte vorgelegt und anschließend mit 200 µl frisch angesetztem BCA-Reagenz versetzt. Die Ansätze wurden für 30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert, wobei sich nach der Inkubationszeit ein Farbumschlag von hellblau nach violett, je nach vorhandener Proteinmenge, zeigte. Die Extinktionsmessung erfolgte mit einem Plattenreader bei einer Wellenlänge von 562 nm. Die Berechnung der Proteinkonzentration wurde mit Hilfe der Extinktionen über eine Excel-Tabelle ermittelt.

BCA-Reagenz: 50 Vol BCA-Puffer + 1 Vol CuSO₄-Lösung

BSA-Eichreihe: 1 mg/ml (w/v) BSA-Stammlösung in Millipore-H₂O

Konzentrationen: 0, 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 µg/ml

Vor dem Gellauf wurden die lysierten Proben mit Probenpuffer (1/4 des Endvolumens) versetzt und 100 µg Protein pro Ansatz eingesetzt. Das Gel, bestehend aus einem Sammel- und Trenngel, setzte sich wie folgt zusammen:

	Sammelgel	Trenngel 12%
H ₂ O	3ml	4ml
Trenngelpuffer	-	2,5 ml
Sammelgelpuffer	1,25 ml (4 %)	-
37,5 % Acrylamid	700µl	3,2 ml
10% SDS	50 µl	100 µl
TEMED	13 µl	50 µl
10% APS	38 µl	30 µl

Als Molekulargewichtsmarker wurde ein Proteinmarker (wide range) mitgeführt. Sammelgele liefen ca. 30 min bei 50 V und Trenngele ca. 60 min bei 120 V in 10 x Elektrophoresepuffer.

Nach dem Gellauf wurden die Nitrozellulose-Membran sowie das Gel und das Blotpapier in Transfer-Puffer eingeweicht. Der Transfer, bei dem die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus einem Trenngel auf eine Membran übertragen werden, erfolgte dann für 30 min bei 15 V.

Für das Blockieren der unspezifischen Bindungen wurde die Membran zunächst nach dem Elektroblot mit 1x Blocking-Puffer auf dem Schüttler bei RT in Glasfärbeschälchen für 30 min inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal 5 min in PBT gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe des ersten Antikörpers, dem Anti-Poly(ADP-Ribose)-Antikörper (Kaninchen). Dieser wurde zuvor 1:1000 in PBT verdünnt. Die Membran wurde über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler bei 300 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal 5 min in PBT gewaschen und anschließend der zweite Antikörper, ein Peroxidase-markierter Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper, in einer 1:1000 Verdünnung (in PBT) dazugegeben. Die Inkubationszeit betrug 2 h bei RT auf dem Schüttler bei 300 rpm. Abschließend wurde die Membran dreimal 5 min in PBT gewaschen.

Für die Detektion, wurden zunächst 6 ml der ECL-Detektionslösung hergestellt, wobei die Lösungen 1 und 2 im Verhältnis 1:1 gemischt wurden. Die Membran wurde dann mit der ECL-Detektionslösung benetzt und für 1 min inkubiert. Die Lösung wurde entfernt und die Membran in eine Plastikfolie eingewickelt. Die Membran wurde anschließend zusammen mit einem Film für 1 min belichtet. Zum Entwickeln wurde der Film je 1 min in Entwicklerlösung und Fixierlösung gehalten und danach mit Wasser gespült und zum Trocknen aufgehängt. Die Membran wurde anschließend in eine Plastikfolie eingeschweißt und bei 4°C gelagert. Entwickelte Immunoblots wurden eingescannt und ausgewertet.

Verwendete Lösungen:

10x PBS:	100 mM Phosphat-Puffer, pH 7,4; 100 mM NaCl
PBT:	1x PBS; 0,1 % (v/v) Tween 20
Probenpuffer:	62,5 mM Tris, pH 6,8; 2 % SDS; 10 % Saccharose; 1 % MSH; 2 mM EGTA; 1 mM PMSF, 1 % Bromphenolblau
Trenngelpuffer:	1,5 M Tris, pH 8,8
Sammelgelpuffer:	0.5 M Tris, pH 6,8
10x Elektrophoresepuffer:	0,25 M Tris (Base), 1,92 M Glycin, 1 % SDS
Blotpuffer:	192 mM Glycin; 25 mM Tris; 20 % Methanol
1x Blocking-Puffer:	5 % FCS in PBT

3.3.4.2 Messung der PARP-1-Aktivität transfizierter Mikrogliazellen

Die Messung der Poly(ADP-ribosyl)ierungsreaktion erfolgte mittels radioaktiv markiertem NAD⁺. Durch Inkubation des Ansatzes mit ³²P-NAD⁺ konnte die Synthese proteingebundener polymerer ADP-Ribose mittels [³²P]-Einbau in Proteine quantifiziert werden (VIRAG & SZABÓ, 2001). Bei der Poly(ADP-ribosyl)ierung werden ADP-Ribose-Ketten aus dem vormarkierten NAD⁺ an Proteine synthetisiert, die anschließend durch Präzipitation mit Trichloressigsäure abgetrennt werden. Der Anteil präzipitierter [³²P]-Aktivität kann dann als Maß für die Poly-(ADP-ribosyl)ierung bzw. PARP-Aktivität verwendet werden und wurde mittels der Flüssigkeitsszintillationszählung ermittelt.

Für die Zellernte wurden die BV-2 Zellen im Kulturmedium mit einem Zellschaber vom Kulturgefäß gelöst und in eiskaltem PBS aufgenommen und bei 300 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 1 mmol/l DTT aufgenommen. Die Lyse der Zellen wurde durch wiederholte Frier- und Auftauzyklen der Zellen erreicht.

Auf 10 µg lysiertes Protein wurden 100 µl des Reaktionsmixes gegeben und der Ansatz für 30 min bei 25°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 25 µl TCA (Endkonz.: 20 % TCA). Die Proben wurden dann für 2 h bei 4°C inkubiert und anschließend für 10 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 4 ml Szintillationsflüssigkeit aufgenommen und im Szintillationszähler gemessen.

Reaktionsmix:

Phosphatpuffer (pH 7,8)	100 mM
NAD ⁺	200 µmol
MgCl ₂	10 mM
DTT	5 mM
³² P-NAD ⁺	50,000 d.p.m.
10 x 10 s ultraschallbehandelte DNA pro Reaktion	1 µg

3.3.4.3 Detektion der CD11a-Expression transfizierter BV-2 Zellen mit der Fluoreszenzdurchflußzytometrie

Bei der FACS (Fluorescence activated cell sorting) Analyse werden Zellen durch eine Fließkammer in Einzelzellsuspension gebracht und in Tröpfchenform an einen Laserstrahl weitergeleitet. Photomultiplikatoren messen die Streuung des Laserlichts. Neben Größe und Granularität (Kern/Plasma-Verhältnis) der Zellen kann auch deren Fluoreszenzintensität bestimmt werden. Die Intensität der Fluoreszenz korreliert in etwa mit der Antigendichte auf der Zelloberfläche.

Für die Messung der CD11a-Expression auf der Oberfläche transfizierter BV-2 Zellen wurde der direkt an Phycoerythrin (PE) gekoppelte Fluoreszenzantikörper CD11a verwendet. Der Farbstoff wird mit Laserlicht von 488 nm Wellenlänge angeregt und hat seinen Fluoreszenz-Emissionsgipfel im Rot-Bereich ($\lambda = 570$ nm). Mit Hilfe eines Histogramms können Zellen, die das Antigen exprimieren und

nach der Färbung rot fluoreszieren, von solchen unterschieden werden, die völlig antigen-negativ sind und keine Fluoreszenz ausstrahlen.

Für die FACS-Analyse wurden die BV-2 Zellen fixiert. Die in Kulturflaschen angezogenen Zellen wurden dafür mit einem Zellschaber gelöst und vor dem Versuch zunächst in der Zählkammer gezählt (siehe 3.5.1). Die Mindestzellzahl sollte 1×10^7 /ml betragen. Die Zellen wurden dann für 10 min bei RT und $300 \times g$ zentrifugiert. Für die nachfolgende Fixierung wurde der Überstand verworfen und auf das Pellet 1 ml 4 %iges Formaldehyd gegeben. Anschließend wurde das Pellet aufgelockert und für 15 min bei 4°C inkubiert. Um die Zellen zu waschen, wurde 1 ml PBS dazugegeben, vorsichtig gemischt und 5 min bei RT und $300 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und erneut 1 ml PBS auf das Pellet gegeben, vorsichtig gemischt und 5 min bei RT und $300 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen und abschließend auf das Zellpellet 1 ml FACS-Puffer mit dem Zusatz von 0,1 % Natriumacid gegeben. Die Zellsuspension konnte nach der Fixierung bis zu vier Wochen bei 4°C im Dunkeln gelagert werden.

Für die Messung am FACS-Gerät wurden 5×10^5 der zuvor fixierten Zellen in jeweils ein FACS-Röhrchen gegeben. Anschließend wurde 1 ml FACS-Puffer dazugegeben, vorsichtig gemischt und für 5 min bei $300 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und auf das Pellet 50 μl der Antikörperverdünnung gegeben. Der direkt an Phycoerythrin (PE) gekoppelte Fluoreszenzantikörper CD11a wurde vorher 1:100 mit FACS-Puffer verdünnt. In das Kontrollröhrchen, das zur Grundeinstellung der Zellen diente, wurde kein Antikörper gegeben. Die Ansätze wurden für 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml FACS Puffer erfolgte eine Zentrifugation der Zellen für 5 min bei RT und $300 \times g$. Der Überstand wurde verworfen und erneut 1 ml FACS-Puffer zum aufgelockerten Pellet hinzugegeben. Die Zellen wurden wiederum für 5 min bei RT und $300 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und abschließend wurden auf jeden Ansatz 300 μl FACS-Puffer gegeben. Die Proben waren dann meßbereit.

FACS-Puffer: Phosphatpuffer (PBS) versetzt mit 0,5 – 1,0 % BSA

Fixierlösung: 4 % Formaldehyd in PBS

3.4 Superkultivierung vormarkierter Mikrogliazellen auf organotypischen hippocampalen Schnittkulturen (OHSK)

3.4.1 Präparation und Kultivierung organotypischer hippocampaler Schnittkulturen

Zur Präparation von organotypischen hippocampalen Schnittkulturen (FROTSCHER et al., 1995a) wurden 10 Tage alte Mäuse (P10) dekapitiert und die Hirne unter sterilen Bedingungen entnommen. Anschließend wurde der den Hippokampus und entorhinalen Kortex enthaltende Hirnanteil nach rostral vom restlichen Neocortex und nach kaudal vom Hirnstamm und Kleinhirn abpräpariert und in eiskaltes Präparationsmedium überführt. Dann erfolgte das Aufkleben des Hirngewebes auf einen Sektionsblock. Mit einem Vibratom wurden 350 µm dicke Koronarschnitte angefertigt, wobei der Sektionsblock und das Hirngewebe mit Präparationsmedium bedeckt waren. Nach dem Schneiden wurden die Schnitte mit einer Pasteurpipette in Petrischalen überführt, die eiskaltes Präparationsmedium enthielten. Die Schnitte wurden dann unter dem Binokular mit Hilfe zweier Skalpelle so zurechtgeschnitten, daß sie nur noch den Hippokampus und den entorhinalen Kortex enthielten. Anschließend wurden je drei bis vier Schnitte mit einer Pasteurpipette auf eine Filtermembran (Porengröße 0,1 µm) transferiert und in die Vertiefung einer 6-Loch-Kulturschale mit auf 37°C vorgewärmtem Kulturmedium gebracht, wobei das Medium nur von unten direkten Kontakt mit dem hippocampalen Gewebe hatte. Die Inkubation der Schnittkulturen erfolgte bei 35°C, 5 % CO₂ und 95 % Raumluft im Brutschrank zunächst für 9 Tage. Diese Vorinkubation war notwendig, da in Vorarbeiten gezeigt werden konnte, daß während dieser Zeit eine Herunterregulation von Aktivitätsmarkern auf Mikrogliazellen in den inneren Schichten des Schnittes stattfindet (HAILER et al. 1996), da es zu einer Wiederherstellung organotypischer Bedingungen kommt. Vor Beginn der Kokultivierung mit externen Mikrogliazellen konnte so sichergestellt werden, daß die innere Zone der hippocampalen Schnitte sich nahezu wie unverletztes Gewebe verhielt und alle Zellkompartimente in ihrer ursprünglichen Architektur und teilweisen Funktionalität enthielt. Der Mediumwechsel der Schnittkulturen erfolgte direkt einen Tag nach der Präparation und anschließend jeden zweiten Tag.

Präpariermedium (steril):	HBSS, 10 % FK
Kulturmedium (steril):	1,0 ml Penicillin /Streptomycin (Stammlösung: 0,1 mg/ml) 1,2 ml Glucose 20 (Stammlösung: 200 mg/ml) 2 ml L-Glutamin (Stammlösung: 200 mM) 0,8 g MEM 25 MM Hepes 580 µl Natriumbikarbonat (Stammlösung: 0,075 %/ml) 500 µl Tris-Base (Stammlösung: 1 M) 80 µl Vitamin C (Stammlösung: 1 µg/ml) 100 µl Insulin (Stammlösung: 1 mg/ml) 25 ml Pferdeserum 25 ml HBSS ad 100 ml <i>a. bidest</i>

3.4.2 Vormarkierung der Mikrogliazellen

Zur Vormarkierung der Mikrogliazellen wurden entweder Mini Ruby oder Mini Emerald verwendet. Bei den beiden Substanzen handelt es sich jeweils um Dextrane mit einer Größe von 10 kDa, die mit Tetramethylrhodamin (Rotfluoreszenz, Absorptionsmaximum: 555 nm) oder Fluorescein (Grünfluoreszenz, Absorptionsmaximum: 494 nm) konjugiert und zusätzlich biotinyliert sind. Dextrane sind hydrophile Polysaccharide, die von den endogenen zellulären Glykosidasen nicht gespalten werden können, eine geringe Toxizität aufweisen und relativ inert sind. Auf Grund dieser Eigenschaften sind Dextrankonjugate gut für die Langzeitmarkierung von Zellen geeignet. Die fluoreszenzmarkierten Dextrane werden von Mikrogliazellen aktiv durch Pinozytose aufgenommen und können innerhalb der zytoplasmatischen Granula detektiert werden. Durch die hydrophilen Eigenschaften des Markers kommt es zu keinem Austritt des Farbstoffes aus intakten, vormarkierten Zellen und umliegendes Gewebe wird somit bei Kokultivierungsexperimenten nicht angefärbt.

Für die Vormarkierung wurden 20 µg/ml Mini Ruby oder 60 µg/ml Mini Emerald zum Medium hinzugegeben und die Zellen für 48 h darin inkubiert. Die Zellen wurden vor dem Transfer auf die Schnittkulturen zwei Mal mit PBS gewaschen und mikroskopisch auf ihren Anfärbegrad kontrolliert. Es erfolgte eine Zellzählung, und die Zellen wurden mit Kulturmedium auf eine Zellzahl von 2×10^7 /ml eingestellt. Sie standen dann für die Experimente in der Schnittkultur zur Verfügung.

3.4.3 Induktion der exzitotoxischen Schädigung mit NMDA und Transfer vormarkierter Mikrogliazellen auf die Schnittkulturen

9 Tage nach dem Anlegen der Schnittkulturen wurden diese bis auf die Kontrollen für 4 Stunden mit 5 μ M NMDA, einem NMDA-Rezeptor Agonisten, inkubiert und somit exzitotoxisch geschädigt. NMDA löst dabei eine neuronale Zellschädigung (Primärschaden) durch die Überaktivierung exzitatorischer Aminosäurerezeptoren, in diesem Fall der ionotropen Glutamaterezeptoren, aus. Nach der vierstündigen Schädigung mit NMDA wurden MR oder ME vormarkierte Mikrogliazellen (1×10^5 Zellen in 5 μ l) auf die Oberfläche der hippokampalen Schnittkulturen gebracht. 1, 2 und 3 Tage nach NMDA-Läsion wurde die Migration der Mikrogliazellen zum Ort der Neurodegeneration (siehe 3.4.5) bzw. der neuronale Zelltod (siehe 3.4.6) zunächst im intakten Schnitt fluoreszenz- und lichtmikroskopisch dokumentiert. Die Schnitte wurden dann fixiert und gefriereschnitten (siehe 3.4.4).

3.4.4 Fixierung und Kryostatschnitte

Die Fixierung der Schnittkulturen erfolgte 12 Tage nach der Präparation bzw. 3 Tage nach der Kokultivierung mit extern transferierten, vormarkierten Mikrogliazellen. Hierfür wurde zunächst das Kulturmedium mit einer Pasteurpipette vollständig aus den Einsätzen abgezogen. Dann wurden 2 ml Immunfixativ mit dem Zusatz von 0,1 % Glutaraldehyd in die Vertiefungen gegeben und die Schnitte 1 h bei RT auf dem Schüttler bei 300 rpm inkubiert. Nach dem Entfernen des Immunfixativs wurden die Schnitte zweimal für jeweils 10 min auf dem Schüttler mit 0,1 M Phosphatpuffer gewaschen. Anschließend wurden 2 ml Immunfixativ (ohne Glutaraldehyd) auf die Schnittkulturen gegeben und diese 2 h auf dem Schüttler bei RT fixiert. Das Immunfixativ wurde erneut abgezogen und 0,1 M Phosphatpuffer in die Einsätze gegeben, um die Schnitte ÜN bei RT auf dem Schüttler zu waschen. Am nächsten Tag wurde der 0,1 M Phosphatpuffer durch frischen ersetzt und die Schnittkulturen nochmals für 30 min bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Abschließend wurden die fixierten Schnitte in eine 0,8 M Saccharoselösung überführt, wodurch sie in ihrer Dichte dem Gefriermedium angeglichen wurden. Durch diese Behandlung wird beim nachfolgenden Schneidevorgang ein besserer Gewebeerhalt garantiert. Bis zur Anfertigung der Kryostatschnitte wurden die Schnitte bei 4°C aufbewahrt.

Nach einer Lagerung der Gewebeschnitte von mindestens 14 Tagen in der 0,8 M Saccharoselösung wurden am Kryostaten bei -30°C 14 μ m dicke Schnitte angefertigt. Die Dünnschnitte wurden sofort auf gelatinierte Objektträger aufgebracht und über Nacht bei RT getrocknet. Ab dem nachfolgenden Tag wurden sie bis zur Dokumentation und statistischen Auswertung der immunhistochemischen Versuche bei 4°C aufbewahrt.

Immunfixativ :	350 ml <i>a. bidest.</i> , 40 g Paraformaldehyd, auf 75°C erhitzen und einige Tropfen NaOH zugeben, bis die Lösung klar wird 150 ml gesättigte Pikrinsäure, 500 ml 0,2 M Phosphatpuffer
0,1 M Phosphatpuffer:	21,71 g Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O, 2,62 g Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O ad 1000 ml <i>a. bidest.</i>

3.4.5 Untersuchungen zum neuronalen Zelltod

Für die Untersuchungen zum neuronalen Zelltod durch Mikrogliazellen nach exzitotoxischer Schädigung wurden sowohl native BV-2 Zellen als auch BV-2 Zellen, die mit dem Kontrollvektor- oder dem antisense PARP-1-Vektor stabil transfiziert worden waren (siehe 3.3.1), eingesetzt. Zu einem späteren Zeitpunkt wurde dieser Versuch mit primären Mikrogliazellen wiederholt (siehe 3.4.7). Mikrogliazellen wurden zunächst mit dem grünen Fluoreszenzfarbstoff Mini Emerald (ME) vormarkiert (siehe 3.4.2) und 1×10^5 Zellen in 5 μ l Medium auf die Oberfläche der hippokampalen Schnittkulturen gebracht, die zuvor mit NMDA geschädigt worden waren. (siehe 3.4.3). Kontrollgruppen wurden nicht mit NMDA behandelt. Zusätzlich bestand eine Versuchsgruppe aus Schnittkulturen, die mit dem unspezifischen PARP-Inhibitor 3-Aminobenzamid (3-ABA) behandelt worden waren. Eine Stunde vor der NMDA-Schädigung, sowie während und nach der Schädigung, wurde 1mM 3-ABA zum Medium hinzugefügt und die Schnitte darin inkubiert. Drei Tage nach dem Transfer der externen Mikrogliazellen wurden die Schnitte mit Propidiumjodid (PI) gefärbt.

3.4.5.1 Färbung der Schnittkulturen mit Propidiumjodid

Propidiumjodid (PI) ist ein roter Fluoreszenzfarbstoff, der durch die geschädigten Membranen toter Zellen gelangt. Er interkaliert mit den Basenpaaren der DNA und färbt auf diese Weise die Zellen rot an. PI wurde in einer Konzentration von 5 μ g/ml direkt in das Kulturmedium unter die Membran, auf der die Hirnschnitte kultiviert worden waren, gegeben und für 10 min im Brutschrank inkubiert. Jeder Zellkultureinsatz wurde dann dreimal in frisches Kulturmedium, das sich in Petrischalen befand, eingetaucht, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Danach wurden die Kultureinsätze in eine neue 6-Lochplatte mit frischem Kulturmedium überführt. Anschließend wurden die Hirnschnitte unter dem inversen Fluoreszenz- und Durchlichtmikroskop betrachtet und die kompletten, lebenden Schnitte digital dokumentiert. Die Schnitte wurden nachfolgend fixiert und gefriereschnitten (siehe 3.4.4).

3.4.5.2 Analyse und statistische Auswertung der Neurodegeneration

Da zu Beginn sechs Schnitte pro Versuchsgruppe angelegt worden waren und pro Schnitt nach der Fixierung fünf Gefrierschnitte angefertigt wurden, ergab sich am Ende eine Zahl von 30 zu untersuchenden Schnitten. Die Ermittlung des neuronalen Zelltodes wurde im Hippokampus auf den

Gyrus dentatus (DG) und das Cornu ammonis (CA) beschränkt. Die Schnitte wurden mit einem 20-fach vergrößernden Objektiv untersucht und dokumentiert. Alle Aufnahmen wurden im Schwarz/Weiß Modus erstellt und als Bitmaps gespeichert. Die Bilder wurden in Corel draw/Photopaint 9 in den RGB-Modus umgewandelt und für Kolokalisationen die Rot- und Grünfluoreszenzen übereinandergelagert. Durch dieses Verfahren konnte die Anzahl toter neuronaler Zellen (PI⁺), toter Mikrogliazellen (MR⁺ und ME⁺) und vitaler Mikrogliazellen (ME⁺) aus den mittlern Schichten der Schnittkulturen ermittelt werden. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte unter Anwendung des t-Tests.

3.4.6 Untersuchungen zur Migration von BV-2 Zellen

Neben der Induktion des neuronalen Zelltodes durch Mikrogliazellen sollte weiterhin untersucht werden, ob die spezifisch transfizierten Mikrogliazellen im Vergleich zu Kontrollzellen eine Veränderung im gerichteten Einwandern zu den Läsionsorten zeigen. Hierfür wurden sowohl BV-2 Zellen, als auch zu einem späteren Zeitpunkt, primäre Mikrogliazellen eingesetzt (siehe 3.4.7) und mit dem roten Fluoreszenzfarbstoff Mini Ruby (MR) vormarkiert (siehe 3.4.2). 1×10^5 Zellen wurden auf die Oberfläche der hippokampalen Schnittkulturen mit und ohne NMDA-Läsion transferiert (siehe 3.4.3). Für die Untersuchungen zum Migrationsverhalten der Mikrogliazellen nach exzitotoxischer Schädigung wurden sowohl native BV-2 Zellen als auch BV-2 Zellen, die mit dem Kontrollvektor- oder dem antisense PARP-1-Vektor stabil transfiziert worden waren (siehe 3.3.1), eingesetzt. 1×10^5 Zellen wurden in 5 μ l Medium auf die Oberfläche der hippokampalen Schnittkulturen gebracht, die zuvor mit NMDA geschädigt worden waren. (siehe 3.4.3). Kontrollgruppen wurden nicht mit NMDA behandelt. Zusätzlich bestand eine Versuchsgruppe aus Schnittkulturen, die mit dem unspezifischen PARP-Inhibitor 3-Aminobenzamid (3-ABA) behandelt worden waren. Eine Stunde vor der NMDA-Schädigung, sowie während und nach der Schädigung, wurde 1mM 3-ABA zum Medium hinzugefügt und die Schnitte wurden darin inkubiert.

Untersuchungen zum Migrationsverhalten wurden zu einem späteren Zeitpunkt ebenso an BV-2 Zellen durchgeführt, die stabil mit dem antisense CD11a-Vektor transfiziert worden waren (siehe 3.3.1). Als Kontrolle dienten hier wiederum native BV-2 Zellen und Kontrollvektor-transfizierte BV-2 Zellen. Auch hier wurden MR vormarkierte Mikrogliazellen auf Schnittkulturen mit und ohne NMDA-Schädigung transferiert (siehe 3.4.3).

Bei beiden Versuchen wurde die Migration der Mikrogliazellen zum Ort der neuronalen Schädigung zunächst im intakten Schnitt fluoreszenz- und lichtmikroskopisch über drei Tage unter dem inversen Fluoreszenz- und Durchlichtmikroskop betrachtet und digital dokumentiert. Anschließend wurden die Schnitte nach Fixierung am Kryostaten geschnitten und auf Objektträger aufgebracht (siehe 3.4.4).

3.4.6.1 Färbung der Kryostatschnitte mit *Griffonia simplicifolia* isolectin B4

Zur Doppelfärbung der Mikrogliazellen wurden die Kryostatschnitte mit *Griffonia simplicifolia* isolectin B4 (IB4)-FITC (1:40 in 0,1 M PB, pH = 6,8 und 0,5 % Triton X-100) gefärbt. Lectine sind pflanzliche Proteine mit hoher Affinität zu spezifischen Zuckerresten an Zellmembranen. (IB4)-FITC eignet sich sehr gut, um Mikrogliazellen spezifisch anzufärben und weiterhin, um Untersuchungen zur Struktur, Bewegung und Proliferation dieser Zellen durchzuführen (DAILEY & WAITE, 1999). Für die Färbung mit (IB4)-FITC wurden die Präparate zunächst dreimal 5 min in 0,1 M Phosphatpuffer (PB) gewaschen, um Einbettmittelreste des Gefrierschneidens zu entfernen. Anschließend erfolgte für 30 min das Blockieren der unspezifischen Bindungen mit Pferdeserum (1:10 verdünnt in 0,1 M PB). Die Präparate wurden dreimal 10 min in 0,1 M PB gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte getrocknet und mit einem Fettstift umrandet. 20 µl des (IB4)-FITC-Antikörpers wurden auf die Schnitte gegeben und diese dann für 3 Stunden in einer feuchten Kammer bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Präparate wurden anschließend dreimal 10 min in 0,1 M PB gewaschen. Abschließend erfolgte das Eindecken der Präparate mit Immu-Mount. Die Präparate wurden über Nacht im Dunkeln getrocknet und konnten ab dem nächsten Tag fluoreszenzmikroskopisch bei Rhodamin- oder FITC-Fluoreszenz untersucht werden.

3.4.6.2 Analyse und statistische Auswertung der regionspezifischen Migration

Die spezifische Migration in das Gebiet der Neurodegeneration wurde nach Heppner et al. ausgewertet (HEPPNER et al., 1998). Da zu Beginn sechs Schnitte pro Versuchsgruppe angelegt worden waren (siehe 3.4.1) und pro Schnitt nach der Fixierung fünf Gefrierschnitte angefertigt wurden (siehe 3.4.4), ergab sich am Ende eine Zahl von 30 zu untersuchenden Schnitten. Die Einwanderung der Mikrogliazellen wurde auf zwei spezifischen Regionen des Hippokampus beschränkt: den Gyrus dentatus (DG) und das Cornu ammonis (CA). Die Schnitte wurden mit einem Objektiv mit 20-facher Vergrößerung dokumentiert. Alle Aufnahmen wurden im Schwarz/Weiß Modus erstellt und als Bitmaps gespeichert. Die Bilder wurden über das Corel Draw/Photopaint 9 Programm in den RGB-Modus umgewandelt und für Kolokalisationen die Rot- und Grünfluoreszenzen übereinandergelagert. Die doppelt gefärbten Mikrogliazellen (MR⁺ und IB4⁺) wurden dann ausgezählt. MR⁺ und IB4⁺ Mikrogliazellen, die sich innerhalb der neuronalen Zellschichten befanden, wurden als spezifisch eingewanderte Zellen definiert. Doppelt gefärbte Mikrogliazellen, die sich außerhalb dieser Regionen befanden, wurden als nicht spezifisch eingewanderte Zellen vermerkt. Für die Auswertung wurde das Verhältnis von spezifisch eingewanderten zu nicht spezifisch migrierenden Mikrogliazellen ermittelt und die Daten statistisch unter Anwendung des t-Tests ausgewertet.

3.4.7 Untersuchungen zur Migration primärer Mikrogliazellen und deren Induktion des neuronalen Zelltodes

Abschließend wurden die Versuche am Schnittkulturmodell, die bislang aus der Kokultivierung von BV-2 Zellen auf organotypischen hippocampalen Schnittkulturen bestanden, mit primären Mikrogliazellen wiederholt.

Für die Untersuchungen wurden sowohl native Mikrogliazellen als auch Mikrogliazellen, die mit dem Kontrollvektor oder dem antisense PARP-1-Vektor transient transfiziert worden waren (siehe 3.3.2), eingesetzt. Primäre Zellen wurden zunächst mit dem grünen Fluoreszenzfarbstoff Mini Emerald (ME) vormarkiert (siehe 3.4.2) und 1×10^5 Zellen auf die Oberfläche der hippocampalen Schnittkulturen gebracht, die zuvor mit NMDA geschädigt worden waren. (siehe 3.4.3). Kontrollgruppen wurden nicht mit NMDA behandelt. Zusätzlich bestand eine Versuchsgruppe aus Schnittkulturen, die mit dem unspezifischen PARP-Inhibitor 3-Aminobenzamid (3-ABA) behandelt worden waren. Eine Stunde vor der NMDA-Schädigung, sowie während und nach der Schädigung, wurde 1mM 3-ABA zum Medium hinzugefügt und die Schnitte wurden darin inkubiert. Die Migration der Mikrogliazellen zum Ort der neuronalen Schädigung wurde zunächst im intakten Schnitt fluoreszenz- und lichtmikroskopisch über drei Tage unter dem inversen Fluoreszenz- und Durchlichtmikroskop betrachtet und digital dokumentiert.

Neben dem Migrationsverhalten sollte weiterhin untersucht werden, ob die spezifisch transfizierten Mikrogliazellen einen Einfluß auf die Neurodegeneration ausüben. Hierfür wurden die Schnitte am dritten Tag nach dem Transfer der ME vormarkierten Zellen mit Propidiumiodid (PI) gefärbt (siehe 3.4.5.1). Anschließend wurden die Schnitte nach Fixierung am Kryostaten geschnitten und auf Objektträger aufgezogen (siehe 3.4.4).

Die spezifische Migration in das Gebiet der Neurodegeneration wurde, wie unter 3.4.5.2 beschrieben, ausgewertet. ME⁺ Mikrogliazellen, die sich innerhalb der neuronalen Zellschichten befanden, wurden als spezifisch eingewanderte Zellen definiert. ME⁺gefärbte Mikrogliazellen, die sich außerhalb dieser Regionen befanden, wurden als nicht spezifisch eingewanderte Zellen vermerkt. Für die Auswertung wurde das Verhältnis von spezifisch eingewanderten zu nicht spezifisch migrierenden Mikrogliazellen ermittelt und die Daten statistisch unter Anwendung des t-Tests ausgewertet. Zusätzlich konnte durch die Färbung mit PI die Anzahl toter neuronaler Zellen (PI⁺), toter Mikrogliazellen (MR⁺ und ME⁺) und vitaler Mikrogliazellen (ME⁺) ermittelt werden. Die Analyse des neuronalen Zelltodes wurde auf den Gyrus dentatus (DG) und das Cornu ammonis (CA) beschränkt und, wie unter 3.4.5.2 beschrieben, ausgewertet.

3.5 Versuche am Zellkulturmodell

3.5.1 Zellzahlbestimmung und Vitalitätstests an BV-2 Zellen

Um die Anzahl an vitalen Zellen in der Zellkultur zu bestimmen, wurden die Zellen aus den Kulturflaschen mit einem Zellschaber abgelöst und im Medium mit Trypanblau angefärbt. Dieser Farbstoff wird durch die Plasmamembran lebender Zellen energieabhängig ein- und ausgeschleust. Vitale Zellen werden nicht angefärbt, während das Zytoplasma toter Zellen eine intensive Blaufärbung zeigt. Gleiche Volumina der Zellsuspension und der Trypanblaulösung wurden zusammengegeben, gemischt und in einem Haemocytometer mit einer Einteilung nach Neubauer gezählt. Die Zahl der Zellen wurde in den äußeren vier Quadranten bestimmt und die Zellkonzentration je Milliliter wie folgt bestimmt: Zellzahl x 2 (Verdünnungsfaktor bei Trypanblaufärbung) x 10⁴.

Um das Verhältnis von aktivierten zu ramifizierten bzw. adhären Zellen zu ermitteln, wurden zunächst die Überstände mit den aktivierten Zellen aus den Kulturflaschen abgenommen, die darin enthaltenen Zellen eingengt, mit Trypanblau gefärbt und in der Zählkammer gezählt. Anschließend wurden die Kulturflaschen mit 10 ml PBS gefüllt und die adhären wachsenden Zellen mit dem Zellschaber abgelöst. Die Zellen wurden wiederum mit Trypanblau angefärbt und die Zellzahl ermittelt.

3.5.2 Messung von Adhäsionsmolekülen mit der FACS-Analyse

Die Messung der Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche von BV-2 Zellen wurde mit der Fluoreszenzdurchflußzytometrie durchgeführt (3.3.4.3). Adhäsionsmoleküle werden vermehrt nach der Aktivierung von Mikrogliazellen gebildet. Ihr Nachweis stellt somit eine geeignete Methode dar, um den Grad der Zellaktivierung zu bestimmen.

Kontrollvektor- und asPARP-1-transfizierte BV-2 Zellen wurden mit und ohne LPS-Stimulation auf die Expression der Adhäsionsmoleküle CD11a, CD11b, CD18 und ICAM-1 untersucht. Es wurden dabei Fluoreszenzantikörper verwendet, die direkt an Phycoerythrin (PE) gekoppelt waren. Weiterhin wurde untersucht, ob die Expression des Adhäsionsmoleküls CD11a in nativen BV-2 Zellen mit und ohne LPS-Stimulation von der Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B abhängig ist. Hierfür wurden die Zellen für 24 h mit 20 μ M BAY 11-7085, einem Inhibitor der I- κ B-Phosphorylierung behandelt (RELIC et al., 2002; KOEDEL et al., 2000). Zudem wurden native BV-2 Zellen für 24 h mit 1 mM des endogenen PARP-Inhibitors 3-Aminobenzamid (3-ABA) inkubiert (TAKAHASHI & GREENBERG, 1999; LAM, 1997), um Beobachtungen an asPARP-1-transfizierten Zellen zu ergänzen und zu vergleichen.

3.5.3 Kernisolationen aus BV-2 Zellen

Kernisolationen wurden durchgeführt, um den PARP-1-Proteingehalt und das Translokationsverhalten von NF- κ B in nativen oder mit LPS stimulierten BV-2 Zellen zu untersuchen. Diese Zellen wurden für 24 h mit 20 mM BAY 11-7085 und für 24 h mit 1 mM des endogenen PARP-Inhibitors 3-Aminobenzamid (3-ABA) inkubiert. Weiterhin wurden Kernisolate von BV-2 Zellen, die mit dem Kontrollvektor transfiziert worden waren, für Ko-Immünpräzipitationsexperimente mit und ohne LPS-Stimulation eingesetzt. Hier wurden ebenso die Zellen für 24 h mit 20 μ M BAY 7085 und für 24 h mit 1 mM 3-ABA inkubiert (siehe 3.5.5). Zur Bestimmung der Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B in Kontrollvektor- und antisense PARP-1-transfizierten Zellen wurden ebenfalls Lysate isolierter Nuklei eingesetzt.

Die Zellkerne aus BV-2 Zellen wurden nach einem modifizierten Protokoll von Emig et al. präpariert (EMIG et al., 1995). Zuerst wurde aus konfluent mit BV-2 Zellen bewachsenen Kulturflaschen (Gesamtzellzahl ca. 5×10^8) das Medium entfernt und durch eiskalten PBS ersetzt. Die Zellen wurden in PBS mit einem Zellschaber vom Boden der Kulturflasche gelöst und für 10 min bei 300 g zentrifugiert. Die Zellpellets wurden jeweils in 5 ml hypotonen Puffer aufgenommen und 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellmembranen wurden mit sechs Stößen im Dounce-Homogenisator aufgebrochen und weitere 5 ml des hypotonen Puffers zugegeben. Unter intensivem Mischen wurden 300 μ l einer 10 % NP40 Lösung zugegeben (Endkonz. 0.3 % NP40) und der Ansatz für 10 min auf Eis inkubiert. Die Suspensionen wurden auf ein gleiches Volumen (10 ml) von 1 M Saccharose in hypotonem Puffer überschichtet und für 10 min bei 1600 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml hypotonem Puffer aufgenommen. Die Suspensionen wurden auf ein gleiches Volumen (10 ml) von 1 M Saccharose in hypotonem Puffer überschichtet und für 10 min bei 1600 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml hypotonem Puffer aufgenommen. Die Suspensionen wurden in Eppendorfgefäße überführt und für 5 min bei 1600 x g zentrifugiert. Die Pellets wurden dann in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20°C gelagert. Eine Färbung eines Aliquots mit Trypanblau zeigte eine sehr saubere Kernfraktion.

Für den Einsatz im Immuno-Blot wurden die Zellkerne in PBS mit 1 mmol/l DTT aufgenommen und durch wiederholte Frier- und Auftauzyklen lysiert. Es erfolgte die Proteinbestimmung, die Auftrennung des Lysats in einem 12 %igen SDS-Gel und der Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (siehe 3.3.4.1). Für den Immunoassay wurden als Erstantikörper anti-PARP-1 Antikörper aus Kaninchen, anti-NF- κ B Antikörper aus Maus oder anti-HMG-1(Y) Antikörper aus Maus auf die Membran gegeben. Für die Reaktion mit dem Zweitantikörper wurden entweder ein Meerrettich Peroxidase (HRP = horseradish peroxidase)-konjugierter anti-Kaninchen IgG aus Esel oder ein HRP-konjugierter anti-Maus IgG aus Esel verwendet. Die Detektion der Banden erfolgte mit dem ECL-Detektionskit (siehe 3.3.4.1).

Hypotoner Puffer: 10 mM Hepes, pH 7,5; 24 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 5 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM Na₄P₂O₇, 50 µM Dephostatin in DMSO, 0.5 mM PMSF in Ethanol, 10 µM Pepstatin in Methanol, 2.5 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Aprotinin

3.5.4 Northern Blot Analyse

Bei der Northern Blot Technik wird RNA gelelektrophoretisch aufgetrennt, anschließend auf eine Nylonmembran übertragen und dort immobilisiert. Der Nachweis spezifischer RNA-Moleküle erfolgt durch Hybridisierung der Filter mit einer geeigneten, markierten „Gensonde“, z.B. einer der RNA komplementären DNA (cDNA).

Für die Northern Blot Analyse wurde in dieser Arbeit mit einem Protokoll von Sambrook et al. gearbeitet (SAMBROOK et al., 1989). Zunächst wurde eine Isolierung der Gesamt RNA aus BV-2 Zellen unter Verwendung des Rneasy Midi Kits von Qiagen durchgeführt (siehe 3.2.1). Jeweils 20 µg RNA wurden in einem Formaldehyd-Agarose-Gel aufgetrennt (siehe 3.2.2). Das Gel wurde für die alkalische Hydrolyse 30 min in 1x Hydrolysepuffer inkubiert und anschließend mit 10x SSC für zweimal 30 min neutralisiert. Dann wurde die RNA über Nacht in 20x SSC auf eine Hybond N Nylonmembran geblottet. Der Transfer wurde auf dem UV-Illuminator überprüft und die Membran 5 min in 2x SSC zum Entsalzen inkubiert. Für die Prähybridisierung wurde die Membran 1 bis 2 h bei 65°C in Rollerflaschen mit 10 ml des Prähybridisierungsmixes im Hybridisierungssofen inkubiert. Für die Markierung der Proben wurde der Random Prime DNA Labeling Kit der Firma Boehringer verwendet. 10–50 ng CD11a-DNA wurden mit *a. dest.* auf ein Endvolumen von 11 µl aufgefüllt, 10 min in heißem Wasser denaturiert, abzentrifugiert und auf Eis gestellt. Anschließend wurden 4 µl der High-Prime-Lösung und 5 µl ³²P-markiertes dCTP hinzugegeben. Die Proben wurden 30 min bei 37°C inkubiert und abzentrifugiert. Nicht aufgenommene Nuclide wurden mit Hilfe einer QuickSpin Sephadex G-50 Säule entfernt. Die Proben wurden für 10 min bei 95°C denaturiert und abzentrifugiert. Die Hybridisierung wurde nach der Markierung der CD11a-cDNA Proben mit ³²P-dCTP (3000 mCi/mmol = 10 µCi/µl) durchgeführt. Zunächst wurde der Prähybridisierungsmix entfernt und dann der auf 65°C vorgewärmte Hybridisierungsmix und die denaturierten Proben zur Membran dazugegeben. Der Ansatz wurde über Nacht bei 65°C im Hybridisierungssofen inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran in der Rollerflasche gewaschen. Der erste Waschschrift erfolgte mit 5x SSC mit 1 % SDS. Die Lösung wurde entfernt und die Membran dann zweimal 30 min bei 65°C in 2x SSC mit 0,1 % SDS inkubiert. Abschließend erfolgte der letzte Waschvorgang in 0,5x SSC mit 0,1 % SDS für zweimal 30 min bei 65°C. Die Membran wurde getrocknet und die Signalintensität des hybridisierten Filters als Bande auf einem Röntgenfilm nachgewiesen.

Verwendete Lösungen:

20x SSC:	3 M NaCl, 0,3 M Na ₃ Citrate, pH 7,0 mit 1 M HCl in 0,1 % (v/v) DEPC-H ₂ O
10 % SDS:	in DEPC-H ₂ O, filtriert
10x Hydrolysepuffer:	0,5 M NaOH, 0,1 M NaCl in DEPC-H ₂ O
Hybridisierungsmix:	5x SSC, 1 % SDS, 10 % Dextransulfat (50 % (w/v) Einfrierlösung) 0,1 mg/ml Heparin (12,5 mg/ml Einfrierlösung) in DEPC-H ₂ O
Prehybridisierungsmix:	Hybridisierungsmix + 0,1 mg/ml Heringssperma DNA (10 mg/ml Einfrierlösung), + 0,1 mg/ml E.coli RNA (50 mg/ml Einfrierlösung)

3.5.5 Ko-Immunpräzipitationsexperimente

Bei der Immunpräzipitation (IP) wird ein bestimmtes Antigen aus einer Vielzahl von Antigenen aus einer Lösung isoliert. Im Präzipitat wird das Antigen dann über das Molekulargewicht in der SDS-Gelelektrophorese bestimmt. Die IP eignet sich für Ko-Präzipitationen und den Nachweis von Proteininteraktionen.

Für die Präabsorption wurden die Kernlysate mit Protein A-Sepharose (1:1 äquilibriert mit Tris/HCl pH 8,0; 150 mM NaCl, 0,1 % BSA) für 1 h bei 4°C inkubiert und der Ansatz anschließend für 30 sec bei 10.000 x g zentrifugiert. Die Präabsorptionsreaktion dient dazu, Proteine zu entfernen, die unspezifisch an die A-Sepharose binden.

Nach der Zentrifugation wurde der Überstand für die Immunpräzipitation eingesetzt, die nach einem modifizierten Protokoll von Zwilling et al. durchgeführt wurden (ZWILLING et al., 1995): Für die erste Antikörperreaktion wurden 100 µg Protein aus dem aufgereinigten Lysat, 100 µl Tris/NaCl Puffer, 0,1 % BSA und 1,0 µg des primären Antikörpers (1 µg anti-PARP-Antikörper aus Kaninchen, anti-NF-κB-Antikörper aus Maus oder anti-HMG-1(Y)-Antikörper aus Maus für 1 h bei 4°C in einem Gesamtvolumen von 200 µl inkubiert.

Für die Reaktion mit dem Zweitantikörper wurden 1,0 µg Meerrettich Peroxidase (HRP = Horseradish peroxidase)-konjugierter anti-Kaninchen IgG aus Esel oder 1,0 µg HRP-konjugierter anti-Maus IgG aus Esel hinzugegeben und für eine weitere Stunde bei 4°C inkubiert.

Für die Immunpräzipitation wurden 20 µl Protein A-Sepharose (1:1 äquilibriert mit Tris/HCl pH 8,0; 150 mM NaCl, 0,1 % BSA) hinzugefügt und für 1 h bei 4°C inkubiert. Als Kontrollen dienten Ansätze, die nur mit dem Zweitantikörper und der Protein A-Sepharose inkubiert worden waren. Die Sepharose wurde bei 12.000 x g für 30 s zentrifugiert und fünfmal mit Tris-Puffer gewaschen. Die Sepharose gebundenen Proteine wurden in einem 12 %igen SDS Gel getrennt, auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und entweder mit einem anti-PARP IgG aus Kaninchen, einem anti-

NF- κ B IgG aus Maus oder einem anti-HMG-1(Y) IgG aus Maus inkubiert und dann mit Hilfe des ECL-Kits detektiert (siehe 3.3.4.1).

Kontrollgruppen, die nur den Zweitantikörper und die Protein A-Sepharose enthielten, zeigten keine sichtbaren Banden im Gel.

Tris/NaCl Puffer: 50 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, pH 8,0

Tris/NaCl Puffer: 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,8

3.5.6 Bestimmung der gesamtzellulären Proteinexpression in transfizierten BV-2 Zellen mit dem Immuno-Blotting-Verfahren

Die gesamtzelluläre Expression der PARP-1, von NF- κ B und von HMG-1(Y) wurde in Kontrollvektor- und antisense PARP-1-transfizierten BV-2 Mikrogliazellen bestimmt. Für den Einsatz im Immuno-Blot wurden die Zellen in PBS mit 1 mmol/l DTT aufgenommen und durch wiederholte Frier- und Auftauzyklen lysiert. Es erfolgte die Proteinbestimmung, die Auftrennung des Lysats in einem 12 %igen SDS-Gel und der Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (siehe 3.3.4.1). Für den Immunoassay wurden als Erstantikörper anti-PARP-1 IgG aus Kaninchen, anti-NF- κ B IgG aus Maus oder anti-HMG-1(Y) IgG aus Maus auf die Membran gegeben. Für die Reaktion mit dem Zweitantikörper wurden entweder Meerrettich Peroxidase (HRP = Horseradish peroxidase)-konjugierter anti-Kaninchen IgG aus Esel oder HRP-konjugierter anti-Maus IgG aus Esel verwendet. Die Detektion der Banden erfolgte mit dem ECL-Detektionskit (siehe 3.3.4.1).

3.6 Statistische Verfahren

Zur Auswertung der regionspezifischen Migration der Mikrogliazellen, zum neuronalen Zelltod und bei der Bestimmung der Expression von Adhäsionsmolekülen wurden zunächst die Mittelwerte aus den Ergebnissen gebildet und anschließend die Standardabweichungen der Mittelwerte berechnet. Weiterhin wurde mit dem t-Test der Frage nachgegangen, inwieweit sich die durchschnittlichen Werte eines Versuchs signifikant voneinander unterscheiden .

Die Standardabweichung ist eine Größe, die von der Zahl der Beobachtungen nicht wesentlich beeinflusst wird. Sie wurde nach folgender Formel berechnet:

$$s^2 = \frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}$$

Die Prüfung der Signifikanz zweier Mittelwerte unter Berücksichtigung der Vergrößerung von t entsprechend der Zahl der Freiheitsgrade wird als t -Test bezeichnet. Sind die Stichproben ungleich groß, so ist die Summe der Freiheitsgrade gleich $n_1 + n_2 - 2$. In der t -Tafel wird der t -Wert, der dieser Summe entspricht, aufgesucht und der Differenzfehler mit diesem t -Wert multipliziert, um die Grenzdifferenzen zu erhalten.

Zunächst wird nach der folgenden Formel der Fehler der Differenz berechnet:

$$s_d = \sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}$$

Anschließend wird der t -Wert für die entsprechenden Freiheitsgrade bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % ermittelt.

Die kleinste signifikante Differenz zweier Mittelwerte, die als Grenzdifferenz (GD) bezeichnet wird, ergibt sich aus der Formel:

$$GD = t \times s_d$$

Die Nullhypothese lautet, daß sich die beiden Mittelwerte aus einem Versuch nicht signifikant voneinander unterscheiden. Ist GD nun kleiner als die Differenz der beiden verglichenen Mittelwerte, so besteht ein signifikanter Unterschied, und die Nullhypothese ist mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % abzulehnen. Liegt für GD ein größerer Wert vor, so besteht zwischen den beiden Mittelwerten kein signifikanter Unterschied, und die Nullhypothese kann angenommen werden.

Für die statistische Auswertung der Daten wurde in der vorliegenden Arbeit das Software Programm Sigma-Plot verwendet.