

6. Methoden

Falls nicht anders beschrieben, wurden die Methoden nach Sambrook und Russel (Sambrook und Russel, 2001) durchgeführt.

6.1 Mikrobiologische Techniken

6.1.1 Herstellung elektrokompenter Zellen

Für die Herstellung kompetenter Bakterien wurden zunächst 50 ml LB-Medium mit einer Kolonie DH10B Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Vier 1 l Kolben mit je 500 ml YT-Medium wurden mit je 2,5 ml Vorkultur angeimpft. Die Kulturen wurden bis zu einer Dichte von $OD_{600} = 0,6-0,8$ wachsen gelassen. Folgende Schritte wurden dann im Kühlraum und mit vorgekühltem Zentrifugationsrotor durchgeführt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (JA10, 4200 rpm, 20 min) und in 5 ml eiskaltem Wasser resuspendiert. Nachdem das Volumen mit eiskaltem H₂O auf 500 ml aufgefüllt wurde, wurde erneut abzentrifugiert. Die Zellen wurden dann in 500 ml 10% Glycerol resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 40 ml 10% Glycerol in 50 ml Falcon-Röhrchen resuspendiert und erneut abzentrifugiert (Heräus Kühlzentrifuge, 4200 rpm, 20 min, 4°C). Das Pellet wurde in 1-2 ml GYT-Medium resuspendiert. Alle Ansätze wurden vereinigt und zu Aliquots von je 100 µl aufgeteilt. 1,5 ml Eppendorfgefäße wurden vorgekühlt und die Zellen auf Trockeneis pipettiert. Die Zellen wurden dann auf ihre Transformationseffizienz getestet und bei -70°C gelagert.

6.1.2 Herstellung chemokompenter Bakterien nach Inoue (Inoue et al., 1990)

Eine Bakterienkolonie wurde über Nacht bei 37°C und 180 rpm in 3 ml LB-Medium inkubiert. Diese Kultur wurde am nächsten Abend in 250 ml SOB-Medium angeimpft und bei Raumtemperatur und 180 rpm über Nacht bis zu einer OD_{600} (optische Dichte bei 600 nm) von 0,6 inkubiert. Die Bakterien wurden sofort 10 min auf Eis gestellt und anschließend bei 2500 g und 0°C für 10 min abzentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde in 80 ml eiskaltem, sterilen TB (*transformation buffer*) luftblasenfrei resuspendiert, erneut wie oben 10 min auf Eis inkubiert und anschließend abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 20 ml eiskaltem TB vorsichtig resuspendiert und mit 1,5 ml DMSO (Endkonzentration 7%) versetzt. Die Bakteriensuspension wurde als 200 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Ab der zweiten Übernachts-Inkubation erfolgten alle Arbeiten auf Eis und im Kühlraum.

6.1.3 Transformation von Bakterien durch Elektroporation

Elektrokompente DH10B-Zellen wurden auf Eis aufgetaut, 1-2 µl eines Ligationsansatzes zu 20 µl Bakterien pipettiert und der gesamte Ansatz in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette transferiert. Die Zellen wurden elektroporiert (1,66 kV, 25µF, 200 µΩ) und nach Zugabe von 1 ml S.O.C Medium 1 h bei 37 °C geschüttelt. Durch Plattierung von 10 µl bzw. 990 µl des Transformationsansatzes auf

LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum konnten plasmidtragende Klone selektioniert werden.

6.1.4 Chemische Transformation von Bakterien

100 µl *E.coli* XL1-Blue und BL21 Zellen wurden per Hitzeschock-Transformation mit 1 µg plasmidischer DNA oder 10 µl eines Ligationsansatzes für 30 min auf Eis inkubiert, gefolgt von 40 sec bei 42°C und weiteren 2 min auf Eis. Nach Zugabe von 1 ml S.O.C Medium wurden die Zellen bei 37°C 30 min geschüttelt und anschließend auf Agar-Platten ausgestrichen.

6.2 Molekularbiologische Techniken

6.2.1 DNA

6.2.1.1 Isolierung plasmidischer DNA aus Bakterien

Von einer Agaroseplatte wurden einzelne Klone gepickt und in 2 ml (Übertagkulturen, 6-8 h) bzw. 5 ml (Übernachtulturen, 12-16 h) LB-Medium unter Zusatz der entsprechenden Antibiotika bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte nach zwei unterschiedlichen Protokollen:

Aufarbeitung mittels NaOH/SDS-Lyse

1,5 ml der Bakterienkultur wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, 30 sec bei 20000 g und RT zentrifugiert und mit dem Vortexmischer in 200 µl mit RNase versetzter Lösung P1 (Qiagen) resuspendiert. Dann wurden 200 µl Lösung P2 (Qiagen) zugegeben, durch vorsichtiges Umschwenken gemischt und maximal 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde durch Zugabe von 200 µl eisgekühlter Lösung P3 (Qiagen) und vorsichtiges Mischen die genomische DNA gefällt. Diese wurde dann 10 min bei 20000 g und RT zentrifugiert. Die DNA wurde aus dem resultierenden Überstand mit Hilfe einer Isopropanolfällung extrahiert und in 10-50 µl H₂O gelöst. Zur Verbesserung der Löslichkeit wurde dieser Ansatz 10 min bei 40°C inkubiert.

Aufarbeitung mittels Ionenaustauscher-Säule

Um eine besondere Reinheit der DNA zu erlangen wurden Ionenaustauschersäulen der Firma Qiagen aus dem Miniprep-Kit desselben Herstellers verwendet. Die Aufreinigung erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Zur Isolation größerer Mengen wurde das Midi- bzw. Maxipräparations-Kit der Firma Qiagen verwendet. Die DNA wurde bei -20°C gelagert.

6.2.1.2 Isolierung genomischer DNA aus Mausschwänzen

Zur Genotypisierung von Mäusen wurde von diesen eine ca. 1 cm lange Schwanzbiopsie genommen. Die Mäuse waren dafür mindestens 3 Wochen alt. Die Biopsie wurde über Nacht bei 55°C unter Schütteln in 0,5 ml TAIL-Puffer lysiert. Zu dem Lysat wurde am folgenden Tag 0,5 ml

Phenol/Chloroform zugegeben, 1 h geschüttelt, 15 min zentrifugiert (Eppendorf 5417, 14000 rpm) und dann die obere, wässrige Phase abgenommen. Dazu wurde ein gleiches Volumen Isopropanol gegeben und für 20 min invertiert. Die DNA wurde dann 5 min bei 14000 rpm abzentrifugiert, mit 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und schließlich in 50µl TE-Puffer resuspendiert.

6.2.1.3 PCR

Für die PCR-Ansätze und -Programme wurde folgendes Standardprotokoll verwendet: 1x PCR-Probenpuffer (MBI Fermentas), 20 µM Primer *for*, 20 µM Primer *rev*, 200 µM dNTPs (je Nukleotid), 30-50 ng *template*-DNA, 0,3 mM MgCl₂, 0,4 µl TaqTM Polymerase (MBI Fermentas) in 50 µl H₂O. Die Komponenten wurden auf Eis zusammenpipettiert, als letztes die Polymerase zugegeben und die Proben dann in den auf 94°C vorgeheizten PCR-Block gestellt (*simplified hot start*). Für mehrere PCR-Ansätze wurde ein Mastermix angesetzt, um Pipettierfehler zu vermeiden.

Es wurde folgendes Standardprogramm angewendet: 1. Prä-Denaturierung: 94°C (5 min), 2. Denaturierung: 94°C (30 sec), 3. Primer-Anlagerung T_{an} (30 sec), 4. Elongation: 72°C (1 min/kb Fragment), 5. 25-35x Wiederholung von Schritt 2-4, 6. Elongation: 72°C (10 min). T_{an} bezeichnet die spezifische Anlagerungstemperatur in °C der Primer *for* und *rev*, die nach folgender Faustregel errechnet wurde: (Anzahl CG-Nukleotide x 4) + (Anzahl AT-Nukleotide x 2) - 5. Die Reaktionsansätze wurden anschließend mit 5 µl 10x Probenpuffer versetzt und mittels DNA-Gelelektrophorese analysiert. Die längerfristige Lagerung erfolgte bei -20°C.

6.2.1.4 Genotypisierung des kompletten und konditionalen Arg3.1 knockouts

Die Genotypisierung der Mutation am Arg3.1 Genlokus erfolgte über PCR. Dabei kamen die Primer TDI1-3 zum Einsatz (vgl. Abb. 3.7) und folgende PCR-Programme: Prä-Denaturierung, 94°C, 5 min; 35 Zyklen: Denaturierung, 94°C, 30 sec; Annealing, 61°C, 30 sec; Elongation, 72°C, 1 min; abschließende Elongation, 72°C, 5 min. Die Fragmentlängen betragen ca. 220 (Wildtyp), 300 (Arg3.1^{fllox}) und 410 (Arg3.1) Nukleotide.

6.2.1.5 Restriktionsverdau plasmidischer DNA

DNA wurde je nach Enzym entsprechend den Herstellerangaben in dem geeigneten Puffer geschnitten. Plasmidische DNA wurde mit eineinhalbfachem Enzymüberschuss der für die DNA-Menge berechneten Enzymmenge 90 min bei 37°C restringiert. Berechnung der zu verwendenden Enzymmenge:

$$\frac{\text{Enzymeinheit in U}}{\mu\text{g DNA}} = \frac{\text{Länge } \lambda\text{-DNA}(48850\text{bp})}{\text{Länge der Proben-DNA}} \times \frac{\text{Anzahl Enzymschnittstellen in Proben-DNA}}{\text{Anzahl Enzymschnittstellen in } \lambda\text{-DNA}}$$

Die Enzyme wurden bei 65°C für 10 min inaktiviert und durch Phenol/Chloroform-Extraktion oder gelelektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente entfernt. Für den Einsatz in der Gelelektrophorese wurde die Reaktion durch Zugabe von 10x DNA-Probenpuffer abgestoppt.

6.2.1.6 DNA-Gelelektrophorese

Zur Analyse von DNA-Präparationen, Restriktionsverdau (analytisch) und zur Isolierung von DNA-Fragmenten (präparativ) wurde die DNA in horizontalen Agarosegelen ihrer Größe nach aufgetrennt. Dazu wurde Agarose in 1x TAE-Puffer unter Erhitzen gelöst und mit Ethidiiumbromid (Endkonzentration 0,5 µg/ml) versetzt. Die Konzentration des Agarosegels hing von der Größe der zu analysierenden DNA-Fragmente ab und betrug zwischen 0,5 und 2%. Als Laufpuffer wurde 1x TAE-Puffer verwendet. Die mit Ethidiiumbromid versetzten DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht dokumentiert. Analytische Gele wurden in der Geldokumentation (BioRad) fotografiert, bei präparativen Gelen wurden die gewünschten DNA-Banden mit einem Skalpell auf dem UV-Transilluminator (Herolab) ausgeschnitten.

6.2.1.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden mittels UV-Licht detektiert, die Banden mit einem Skalpell sauber ausgeschnitten und mit dem auf Glasmilch beruhenden System QIAexII (Qiagen) den Herstellerangaben entsprechend aus dem Agarose-Gel gelöst. Die DNA wurde in 20 -30 µl H₂O eluiert.

6.2.1.8 Phosphatasebehandlung von 5'-überhängenden Enden

Um eine Selbstligation bei religierbaren DNA-Enden zu verhindern, wurden diese mit alkalischer Phosphatase aus dem Kälberdarm (CIAP, *calf intestine alkaline phosphatase*) behandelt. Dabei wurde pro 1-20 pmol 5'-überhängender Enden 0,1 U Enzym in einem 50 µl Ansatz eingesetzt. Die Reaktion wurde bei 37°C für 1 h durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von EDTA und 30 min Inkubation bei 65°C inaktiviert und die DNA durch Phenol/Chloroform Extraktion oder per DNA-Gelelektrophorese aufgereinigt.

6.2.1.9 Ligation

50-200 ng Vektor DNA wurden mit der dreifachen molaren Menge Insert-DNA in Ligationpuffer (Roche) mit 1U T4-DNA-Ligase in einem Gesamtvolumen von 30µl ligiert. Sowohl Ligationen mit kohäsiven als auch mit nicht-kohäsiven Enden wurden über Nacht bei 15°C durchgeführt. Die Ansätze wurden anschließend komplett für die Transformation eingesetzt.

6.2.1.10 Konzentrationsbestimmung von DNA/RNA

Die Konzentration von DNA bzw. RNA in wässriger Lösung wurde im Photometer (Amersham Pharmacia) über die Absorption bestimmt. Als Maß für die Reinheit der Lösung wurde die Ratio $\text{Absorption}_{260\text{nm}}/\text{Absorption}_{280\text{nm}}$ bestimmt. Dabei entspricht eine $\text{OD}_{260\text{nm}} = 1$ ungefähr 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml einzelsträngiger RNA.

6.2.1.11 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzanalyse wurde nach der Dideoxyterminationsmethode nach Sanger durchgeführt (Sanger et al., 1977). Die Sequenzierungen wurden von Dr. W. Kullmann in der DNA-Sequenzierungseinrichtung des ZMNH beziehungsweise der Firma Invitek in Berlin vorgenommen.

6.2.1.12 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Doppelsträngige DNA-Fragmente wurden hitzedenaturiert und mit Hilfe des *Rediprime-labelling*-Kits nach Angaben des Herstellers (Amersham Pharmacia) radioaktiv mit α -[³²P]-dCTP markiert. Zur Reduktion nicht eingebauter Nukleotide wurde die so entstandene DNA-Sonde über eine Sephadex-G50 Säule nach Angaben des Herstellers (Roche) aufgereinigt. Aus der Probe wurde 1 μ l für eine Cherenkov-Messung abgenommen.

6.2.1.13 Klonierung des Vektors pGEX-PSD-95_(PDZ1-3,SH3)

Die Nukleotide 93-1654 der PSD-95 cDNA, die für die drei PDZ- sowie die SH3-Domäne kodieren, wurden durch PCR aus dem Vektor pMycGW-PSD-95 amplifiziert (Primer PSD-95 NcoI down und SH3 XhoI up), das Fragment NcoI und XhoI geschnitten und in den mit NcoI, XhoI linearisierten GST Expressionsvektor pGEX-KG ligiert. Das PSD-95_(PDZ1-3,SH3) Proteinfragment ist für die Bindung an die NR2 Untereinheiten ausreichend. Es wurde einem GST-Fusionsprotein mit dem kompletten PSD-95 vorgezogen, da dieses das gleiche Molekulargewicht wie die im Western Blot zu detektierende NR1-Untereinheit aufweist, was zu überlagernden Signalen und damit Detektionsschwierigkeiten im Western Blot führen kann.

6.2.1.14 Densitometrische Auswertung von DNA-Signalen in Agarosegelen

Für die Analyse der relativen Bandenstärken von PCR Produkten wurden mit Hilfe der Geldokumentation Photos der mit UV-Licht visualisierten DNA-Banden im Agarosegel gemacht. Diese wurden am Computer eingescannt und mit Hilfe der Software TINA 2.09g (raytest) ausgewertet. Die Software misst die Gesamtpixelintensität in einem manuell festgelegten Bereich. Der Bereich besaß für alle analysierten Banden die gleiche Größe. Für jedes Gelbild wurde ein Nullwert außerhalb der Banden genommen, der von den absoluten Intensitäten abgezogen wurde. Der Wert für das PCR Produkt, bei dem die cDNA des Kontrollansatzes von Wildtyp-Tieren als *template* eingesetzt wurde, wurde gleich 1 gesetzt und alle weiteren Werte in Relation dazu gesetzt.

6.2.2 RNA

6.2.2.1 Isolierung und Reinigung totaler RNA-Fractionen

Die Isolierung totaler RNA-Fractionen aus dem Vorderhirn bzw. dem Hippokampus von Mäusen wurde nach der Trizol-Methode und anschließend mit Hilfe des RNeasy Total RNA Kits der Firma

Qiagen durchgeführt. Dafür wurde das Tier über zervikale Dislokation getötet, das Gehirn auf Eis entnommen, das Zerebellum abgetrennt und das Vorderhirn entweder direkt prozessiert oder daraus die zwei Hippokampi präpariert. Die Hippokampi oder das Vorderhirn wurden in 1 ml Trizol™ (Invitrogen) aufgenommen. Die Präparation dauerte nicht länger als 1 min. Das Gewebe wurde durch sukzessives Passieren durch kleiner werdende Kanülen der Stärke 19→22→27 in Trizol™ homogenisiert. Die weitere Prozessierung wurde analog den Herstellerangaben der Firmen Invitrogen und Qiagen durchgeführt. Die Gesamt-RNA- Fraktionen wurden abschließend in 50 µl DEPC-H₂O gelöst und bei -80°C gelagert.

6.2.2.2 Auftrennung von RNA in Formaldehyd/Agarosegelen

Die Auftrennung von RNA erfolgte in vertikalen Agarosegelen. Diese enthalten 1,2 % Agarose in 1x MOPS-Puffer und 15 % Formaldehyd. 3 µg wurden in einem dreifachen Volumen RNA-Denaturierungspuffer aufgenommen, 15 min bei 65°C erhitzt, abzentrifugiert und auf Eis gestellt. Dem Ansatz wurde 1 µl DNA-Probenpuffer zugesetzt und die Lösung auf das Gel aufgetragen. Das Gel wurde anschließend unter UV dokumentiert.

6.2.2.3 Northern Blot

Falls ein Transfer der RNA auf eine Membran gewünscht wurde, um eine spätere Hybridisierung mit Sonden zu ermöglichen, wurde eine der Gelgröße entsprechende Nitrozellulosemembran zurechtgeschnitten und mit H₂O angefeuchtet und 5 min in 20x SSC inkubiert. Das Gel wurde dann auf einen Stapel mit 20x SSC getränktem 3MM Papier gelegt, die ihrerseits auf Saranfolie lagen. Dann wurden die Ränder der Frischhaltefolie umgeschlagen und die angefeuchtete Membran luftblasenfrei auf das Gel gelegt, so dass die Membran keinen Kontakt mit dem unter dem Gel liegenden Papier haben konnte. Sie wurde mit 2 in 2x SSC getränkten 3MM Papieren überschichtet. Diesem Aufbau wurde ein großer Stapel Saugpapier aufgelegt und mit einem Gewicht (300-500g) in seiner Position fixiert. Der Transfer der RNA aus dem Gel in die Membran, dem Kapillarsog folgend, lief über Nacht. Die Membran wurde anschließend in 2x SSC gewaschen und die RNA darauf in einem UV-Crosslinker (UVP) kovalent mit der Membran verknüpft. Die fixierte RNA konnte auf einem UV-Leuchttisch visualisiert und die Spuren markiert werden. Die Blotmembran konnte in Saranfolie eingeschlagen bei -80°C gelagert werden.

6.2.2.4 Hybridisierung der Northern Blot Membran

Die Blotmembran wurde mit 5x SSPE befeuchtet und in Hybridisierungsröhrchen (Schott) überführt, die ihrerseits mit 5x SSPE ausgewaschen wurden. Es wurden 10 ml Hybridisierungslösung dazugegeben und das Röhrchen unter konstanter Rotation in einem Hybridisierungsofen bei 42°C erhitzt, so dass die Membran in gleichmäßigen Kontakt mit der Hybridisierungslösung stand. Diese Prähybridisierung dauerte 60 min und anschließend wurde eine α -[³²P]-markierte hitzedenaturierte DNA-Sonde von 1-2 x 10⁶ cpm (nach der Cherenkov-Messung, s. 6.2.1.12) zugegeben und das Röhrchen über Nacht zur Hybridisierung bei 42°C weitergedreht. Am nächsten Tag wurde die

Blotmembran nacheinander 5 min bei RT in 2x SSC + 0,1% SDS, 30 min bei RT in 2x SSC + 0,1% SDS, 30 min bei 60°C in 2x SSC + 0,1% SDS und 30 min bei 60°C in 0,2x SSC + 0,1% SDS gewaschen. Die radioaktiv markierte Blotmembran wurde feucht in Saranfolie eingeschlagen und im Phosphoimager und anschließend per Autoradiographie analysiert.

6.2.2.5 *In situ* Hybridisierung an Gewebeschnitten

Für die *in situ* Hybridisierung wurde das „*Sure-site*“ Protokoll der Firma Novagen angewendet und wie nachfolgend beschrieben modifiziert.

6.2.2.5.1 Herstellung der Gehirnschnitte

Die Herstellung erfolgte am Kryostaten (Microm). Die Schnitte wurden koronal in einer Stärke von 16 µm angefertigt und auf bereits beschichtete Objektträger (SuperFrost, Roth) aufgezogen. Die Objektträger wurden luftgetrocknet, 2 x 15 min in 4% PFA fixiert, erneut getrocknet und bei -80°C gelagert.

6.2.2.5.2 *In vitro* Transkription

Die Herstellung der *sense*- und *antisense* Sonde erfolgte mittels Riboprobe Kit nach den Herstellerangaben. Dabei wurde linearisierte Plasmid-DNA mittels T7- oder SP6-Polymerase und in Anwesenheit von α -[³⁵S]-UTP *in vitro* in einem Gesamtvolumen von 20 µl transkribiert. Ungebundene Nukleotide wurden mittels Sephadex G50-Säulen rausgefiltert und der Transkriptionsmix in 10 µl 1M DTT, 20 µl 3M Natriumacetat pH5.2 und 10 µl t-RNA (10 mg/ml aus der Hefe) versetzt, mit 1M DTT auf 100 µl aufgefüllt und mit 2 Volumen 100% Ethanol für 10 sec auf Trockeneis gefällt. Die RNA wurde abzentrifugiert (15 min, 14000 rpm, Eppendorf 5417), das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und getrocknet.

6.2.2.5.3 Größenreduktion der RNA-Sonde

Um eine bessere Eintrittsmöglichkeit der Sonde in das Gewebe zu erreichen, wurde sie durch alkalische Hydrolyse in kleinere Fragmente aufgespalten. Diese Größenreduktion erfolgte nach dem „*Sure-site*“ Protokoll der Firma Novagen. Die reduzierte RNA wurde schließlich in 40 µl 1M DTT gelöst und in 400 µl Hybridisierungslösung aufgenommen. Dem Ansatz wurde 1 µl zur Messung der Markierungseffizienz im Szintillationsmessgerät entnommen. Die Sonde wurde dann in Hybridisierungslösung im Verhältnis 1:10 – 1:20 verdünnt.

6.2.2.5.4 Vorbereitung der Gehirnschnitte

Die Objektträger wurden aufgetaut, bei RT getrocknet und anschließend zur Acetylierung freier Aminogruppen zunächst mit 0,1 M Triethanolamin pH8 für 3 min inkubiert. Dann wurde unter Rühren 350 µl Essigsäure Anhydrid zugegeben, der Rührer gestoppt und die Objektträger für 10 min weiter

inkubiert. Die Schnitte wurden dann in einer aufsteigenden Ethanolreihe (30, 50, 80, 95, 100%) entwässert und getrocknet.

6.2.2.5.5 Hybridisierung

Die getrockneten Objektträger wurden mit 100 µl mit α -[³⁵S]-UTP markierter RNA-Sonde versetzter Hybridisierungslösung überschichtet und mit einem Deckglas luftblasenfrei abgedeckt. Die Ränder wurden mit DPX *Mounting Solution* luftdicht versiegelt. Die Hybridisierung fand in der Horizontalen bei 55°C für mindestens 18 h statt.

6.2.2.5.6 Waschen und Entwickeln

Das DPX wurde nach dem Abkühlen auf RT entfernt und die Objektträger in folgender Reihenfolge gewaschen. 20 min in 4x SSC bei RT unter Schütteln (→ entfernen der Deckgläser), 2 x 10 min in 4x SSC bei RT unter Schütteln, 30 in RNase-Puffer bei 37°C, 15 min in 2x SSC bei RT, 15 min in 1x SSC, 15 min in 0,5x SSC (diese SSC Schritte bei RT und unter Schütteln), 30 min in 0,1x SSC bei 55°C, 10 min in 0,1x SSC bei RT. Dem folgte eine Dehydratisierung für je 5 min in 70% und dann in 95% Ethanol bei RT. Abschließend wurden die Objektträger bei RT getrocknet, in einer Filmkassette befestigt und mit einem Autoradiographiefilm bedeckt. Die Exposition fand bei RT zunächst für 48 h statt.

6.2.2.6 *microarray*

Der Ablauf des *microarrays* ist in Abbildung 6.1 schematisch dargestellt und wurde wie folgt durchgeführt. Die im *microarray* eingesetzten RNA-Fraktionen wurden wie unter 6.2.2.1 beschrieben aus den Hippokampi je eines Tiers gewonnen und separat weiterbehandelt. Die RNA wurde zunächst in cDNA umgeschrieben, wobei das Protokoll etwas vom unter 6.2.3 beschriebenen abwich: zur Synthese des ersten cDNA Stranges wurden 4,5 µg RNA eingesetzt, mit 1 µl Oligo-dT-Primern in einem Gesamtvolumen von 10 µl versetzt und bei 70°C für 10 min inkubiert. Dem Ansatz wurden 4 µl 5x *First strand cDNA buffer* (Invitrogen), 2 µl 0,1M DTT, 1 µl 10mM dNTP und 1 µl Superscript II (Invitrogen) zugefügt und für 60 min bei 42°C inkubiert. Zur Synthese des zweiten Stranges wurde das Reaktionsgemisch mit 91 µl DEPC-H₂O, 30 µl 5x *Second strand buffer*, 3 µl 10mM dNTPs, 1 µl Ligase (10U/µl), 4 µl DNA Polymerase I (10U/µl), 1 µl RNaseH (2U/µl) versetzt, 2 h bei 16°C inkubiert, 2 µl T4 DNA Polymerase (10U/µl) zugesetzt und für weitere 5 min bei 16°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µl 0,5M EDTA gestoppt und der Ansatz bei -20°C über Nacht gelagert. Die Proteine wurden am nächsten Tag durch Zugabe von 162 µl Chloroform/Phenol und Zentrifugation (12000 x g, 2 min) aus dem Ansatz gefällt und die cDNA aus der wässrigen Phase durch Zugabe von 0,5x Vol 7,5M Ammoniumacetat und 2,5x Vol Ethanol präzipitiert und bei 12000 x g für 20 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, abzentrifugiert und getrocknet, in 24 µl H₂O aufgenommen und nach dem „*BioArray HighYield RNA Transcript Labeling Kit*“ der Firma Affymetrix in gelabelte cRNA revers transkribiert: 22 µl cDNA, 4 µl 10x *Reaction buffer*, 4 µl 10x Biotin-gelabelte Ribonukleotide, 4 µl 1M DTT, 4 µl RNase Inhibitor und 2 µl 20x T7

RNA Polymerase wurden bei 37°C für 8 h inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde dann mit DEPC-H₂O auf 100 µl aufgefüllt und mit 350 µl IVT cRNA *binding buffer* (Affymetrix) versetzt. Die cRNA wurde dann über das RNeasy Kit (Qiagen) aufgereinigt und im Anschluss daran die Konzentration bestimmt. 6 µg cRNA wurde anschließend unter Zugabe von 8 µl 5x *fragmentation buffer* (Affymetrix) in einem Gesamtvolumen von 40 µl (durch DEPC-H₂O) für 35 min bei 94°C fragmentiert und auf Eis gelagert bis zum Einsatz in der Hybridisierung mit dem Genchip MG74A (Affymetrix). Die Hybridisierung erfolgte nach Herstellerangaben und dauerte 17 h. Die Chips wurden in einem Agilent Gene Array ScannerTM gescannt und die Fluoreszenzwerte mit Hilfe der Affymetrix Software Microarray Suite 5.0 ausgewertet.

6.2.2.7 rtPCR

Die reverse Transkription von RNA in cDNA und anschließende Amplifikation der cDNA wurde nach dem *Two-Step* Verfahren durchgeführt, das heißt, in einem ersten Schritt wurde die cDNA synthetisiert, die dann als *template* für eine anschließende PCR eingesetzt wurde. Die reverse Transkription wurde mit der ThermoScriptTM Polymerase der Firma Invitrogen durchgeführt. Es wurden 4 µg Gesamt-RNA in einem Gesamtvolumen von 10 µl mit 1 µl Oligo-dT-Primern angesetzt, die in einem ersten Schritt für 5 min bei 65°C inkubierten und anschließend sofort auf Eis gestellt wurden. Diesem Ansatz wurden dann 10 µl eines Mastermixes zugegeben, der sich aus x mal 2 µl 10mM dNTP, 4 µl 5x cDNA *synthesis buffer*, 1 µl 0,1M DTT, 1 µl RNase OutTM, 1 µl H₂O, 1 µl ThermoScript (15U/µl) zusammensetzte. Der Ansatz wurde für 60 min auf 50°C (→ cDNA Synthese) und anschließend 5 min auf 85°C (Inaktivierung des Enzyms, Einzelstrangbildung) erhitzt. Die genomische RNA wurde abschließend durch Zugabe von 1 µl RNase H für 20 min bei 37°C verdaut und der cDNA tragende Gesamtansatz bis zum Einsatz in der PCR bei -20°C gelagert.

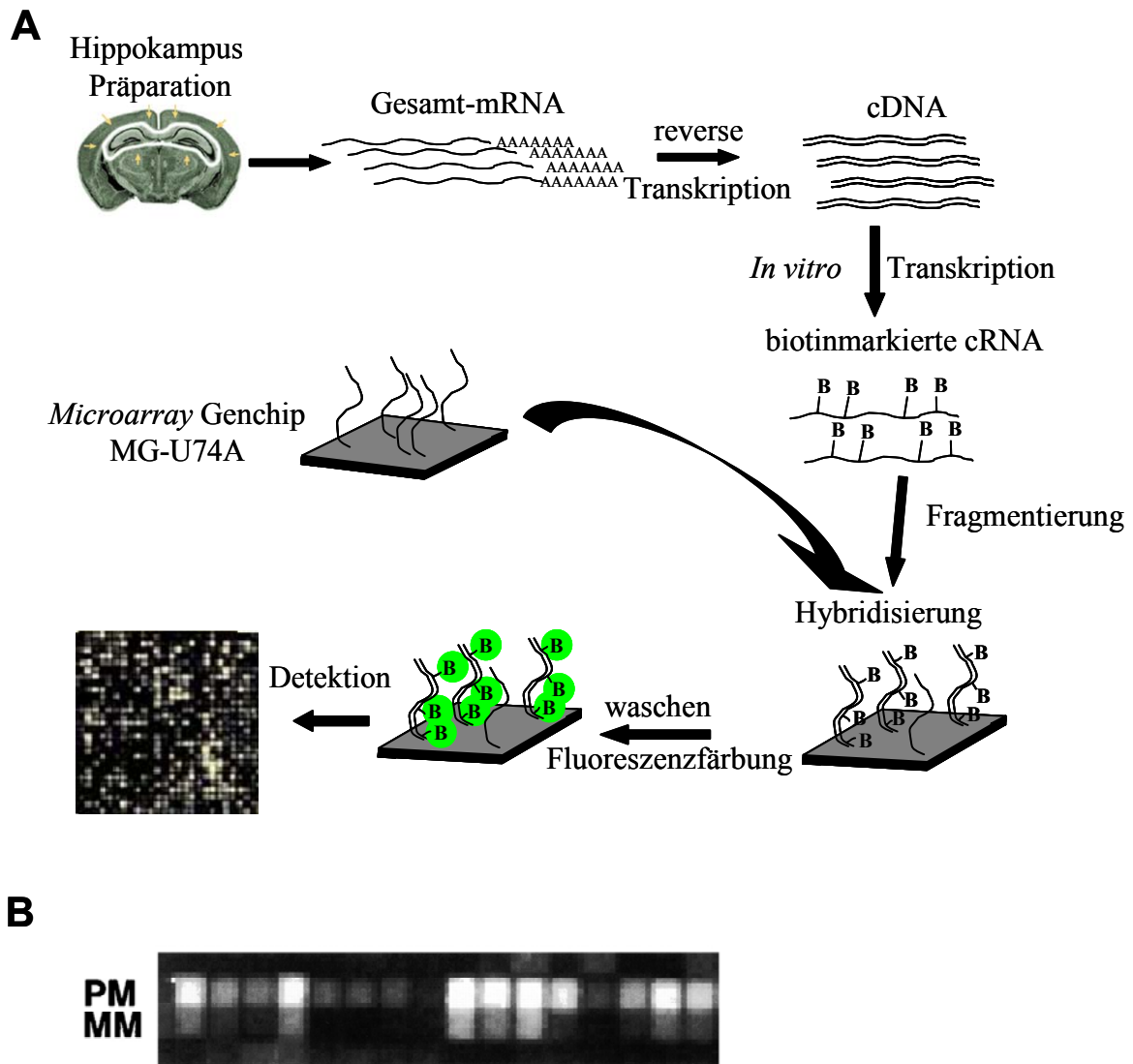


Abbildung 6.1: Vorbereitung und Durchführung eines *microarray-Screens*

(A) Die Gesamt-mRNA wurde von den Hippokampi je einer Wildtyp- und einer *knockout*-Maus 4 h nach Beginn neuronaler Aktivität (Kainat-induzierter Anfall) präpariert und für separate *Screens* eingesetzt. (B) Beispiel der Fluoreszenzintensitäten verschiedener Sequenzen eines Gens auf dem *microarray*-Chip. Dieses Beispiel-Gen wird, aufgrund der durchweg erhöhten Signalstärke in den PM Proben, als vorhanden eingestuft. PM, perfect match; MM, mismatch.

6.2.3 Proteine

Proteinpuffer wurden generell mit 1x Proteinase-Inhibitor-Cocktail der Firma Roche versetzt. Proteine wurden entweder auf Eis oder im Kühlraum (4°C) behandelt.

6.2.3.1 Immunhistochemische Färbungen mit DAB

Für immunhistochemische Färbungen wurden fixierte Gehirne am Vibratom koronal geschnitten (25 µm Schnittdicke). Alle folgenden Schritte fanden bei RT unter konstanter orbitaler Schüttelbewegung statt, wobei die Schnitte frei in der jeweiligen Lösung schwimmen konnten (*free floating*). Die Schnitte wurden in PBS bei 4°C bis zu 2 Wochen gelagert. Für die Färbungen wurden die Schnitte 4 x in 1x PBS gewaschen, durch eine Ethanolinkubation (je 5 min 10, 20, 40, 20, 10%) permeabilisiert und wieder mit PBS (5 min) gewaschen. Die endogenen Peroxidasen wurden durch eine 30 min Inkubation in einer 0,3% H₂O₂-Lösung inaktiviert. Nach einem erneuten Waschschrift (5 min) in PBS wurden die Schnitte für 60 min mit Blockierlösung inkubiert und anschließend mit dem 1. Antikörper in seiner jeweiligen Verdünnung in der Antikörperlösung über Nacht versetzt. Die Schnitte wurden am folgenden Tag 4 x mit PBS gewaschen und 1 h mit dem 2. Antikörper (1:1000 in Antikörperlösung) inkubiert. Nach erneutem Waschen (4 x 5 min mit PBS) wurden die Schnitte dann mit einer 1:1 gemischten Lösung der Komponenten A und B aus dem ABC-Elite Kit (Vector) für 90 min inkubiert. Die Komponentenlösung wurde 30 min vor der Inkubation angesetzt. Es folgte ein Waschschrift mit PBS und drei weitere mit 50mM Tris-HCl pH 7,6. Die Färbereaktion erfolgte dann durch Zugabe einer DAB-Färbelösung nach den Angaben des Herstellers (Roche). Die GFAP-Färbung wurde durch die Zugabe von 3% Ammoniumsulfat und 1% Imidazol verstärkt. Die Färbereaktion wurde unter der Stereolupe verfolgt und durch Überführen der Schnitte in 50 mM Tris-HCl pH 7,6 abgestoppt. Die Schnitte wurden dann ausgiebig gewaschen (50 mM Tris-HCl pH 7,6), auf Objektträger aufgezogen, über Nacht getrocknet, in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert und mit DPX *mounting solution* eingedeckelt.

6.2.3.2 Immunogoldfärbungen

Alle Schritte wurden unter *free floating* Bedingungen und bei RT durchgeführt (s. 6.2.3.1). Für die Immunogoldfärbung wurden die Tiere mit 4% PFA + 0,1% Glutaraldehyd perfundiert und die Hirne anschließend in der gleichen Lösung über Nacht nachfixiert. Es wurden dann 50 µm dicke Schnitte am Vibratom angefertigt, die in PBS gewaschen wurden und 15 min in 1% Natriumborohydrid/PBS inkubierten. Die Schnitte wurden 3 x in PBS gewaschen, in einer Ethanolreihe permeabilisiert (s. 6.2.3.1), 30 min in Blockierlösung blockiert und mit dem 1. Antikörper (anti-Arg3.1) über Nacht inkubiert. Die Schnitte wurden 2 x 5 min in Antikörperverdünnungslösung A, 2 x 5 min in Gold-Antikörperverdünnungslösung B gewaschen und dann mit dem 2. Antikörper („Goat Anti rabbit“, 1:30 in Antikörperverdünnungslösung B, Aurion Biotrend) für 2 h inkubiert. Danach wurden die Schnitte 3 x in der Antikörperverdünnungslösung B, 2 x in PBS gewaschen, 15 min in 2% Glutaraldehyd nachfixiert und über Nacht in PBS gelagert. Am nächsten Tag folgten ausgiebige Waschschriffe (3 x 5 min in PBS, 5 x 15 min in 150 mM Natriumacetat) bevor die Schnitte mit je einem Teil IntensEM (Amersham Pharmacia) und einem Teil Gummi arabicum (Aurion) für 1,5 h

inkubierten. Die Schnitte wurden dann 6 x 10 min in 150 mM Natriumacetat gewaschen, dann bei 4°C weiterbehandelt (10 min in 9 Teilen Goldchlorid + 0,5 Teile 3 M Acetatpuffer pH 5,3, 5 min 150 mM Natriumacetatpuffer, 15 min 100 mM Natriumthiosulfat in 0,2 M HEPES und 3 x 10 min in 200 mM HEPES) und wieder auf RT überführt. Dort wurden sie 30 min in 1 % Osmium auf Eis behandelt, mehrmals in PBS gewaschen, über Nacht bei 4°C gelagert und am nächsten Tag in einer Alkoholreihe entwässert. Die Schnitte wurden dann über Nacht bei RT in einer 1:1-Mischung aus Epon (Epoxyharz) und 100 % Ethanol (in PBS) bei RT für weitere 3 bis 5 h bei RT in Epon (Epoxyharz) ausgehärtet. Die Schnitte wurden dann zwischen zwei Blätter Overhead-Folie gelegt, mit Aluminiumfolie umwickelt, mit einem Gewicht beschwert und 48 h bei 60°C inkubiert. Das folgende Aufziehen auf Kupfergrids wurde von Saskia Siegel am ZMNH durchgeführt: Anfertigung von Ultradünnschnitten (60 nm) und Aufziehen auf Kupfergrids, Kontrastierung mit 5 % Uranylacetat, Waschen in PBS und Inkubation in Bleicitrat für 2 min. Die gewebebedeckten Grids wurden abermals gewaschen (3 x 5 min in PBS) und waren somit bereit für die elektronenmikroskopische Auswertung.

6.2.3.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Fixierte Gehirnschnitte wurden 3 x in PBS gewaschen und auf Objektträgern über Nacht getrocknet. Die Schnitte wurden rehydratisiert, 5 min in 20x Hämalaun-Lösung inkubiert, in H₂O gespült und in HCl-Ethanol differenziert bis keine Farbstoffwolken mehr abgegeben wurden. Dann wurden die Schnitte für 4 min in 40°C warmem H₂O gebläut, in H₂O gespült und anschließend in 0,3 % Eosin-Lösung gefärbt. Die Schnitte wurden dann in H₂O gewaschen, mittels einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydratisiert und in DPX *mounting solution* eingedeckelt.

6.2.3.4 Präparation von Gesamtgehirnextrakten

Für die Präparation der löslichen Proteinfractionen wurden die Mausgehirne auf Eis präpariert und das Zerebellum abgetrennt. Es wurden dann entweder die Hippokampi oder das gesamte Vorderhirn präpariert und mit Kanülen der Stärken 19G bis 27G in RIPA-Puffer auf Eis homogenisiert. Das Homogenat inkubierte 30 min auf Eis und wurde dann 30 min bei 14000 x g (Eppendorf 5417) abzentrifugiert. Der lösliche Überstand wurde abgenommen und sofort im Experiment eingesetzt.

6.2.3.5 PSD-Aufreinigung

Die Prozedur der PSD-Aufreinigung ist in Abbildung 6.2 detailliert dargestellt.

6.2.3.6 Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine

6.2.3.6.1 Expression rekombinanter Proteine in *E.coli*

Zur Proteinexpression wurden Plasmide, die für GST-Fusions-Proteine kodieren (pGEX-KG-Vektor), in den Protease-inhibierten *E.coli*-Stamm BL21 retransformiert. Plasmide für His-tag-Proteine (pQE-Vektoren) wurden in den *E.coli*-Stamm M15 retransformiert. Eine Bakterienkultur wurde durch Animpfen von 5 ml (*Small-Scale*) / 50 ml (*Large-Scale*) LB-Medium (generell unter Zugabe der

jeweiligen Antibiotika) mit einer Bakterienkolonie und Inkubation über Nacht bei 37°C und 250 U/min gezüchtet. Die Übernachtskulturen wurden 1:20 mit LB-Medium verdünnt und 1,5 h bei 37°C und 250 U/min inkubiert. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und für 3-5 h bei 37°C und 250 U/min betrieben. Anschließend wurden die Zellen 10 min bei 4°C und 3000 g abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und entweder sofort weiter verarbeitet oder bei -20°C (über Nacht) bzw. -80°C (mehrere Tage) gelagert. Um den Erfolg der Proteininduktion zu überprüfen, wurden verschiedene Proben vor, während und nach der Proteinexpression genommen, abzentrifugiert und in 50 µl SDS-Probenpuffer resuspendiert. Die Proben wurden dann mit Hilfe der SDS-PAGE analysiert.

6.2.3.6.2 Aufreinigung rekombinanter GST-Fusions-Proteine aus *E.coli*

Die Bakterien wurden in 5 ml eiskaltem SET-Puffer auf Eis resuspendiert, 30 min mit 0,3 mg/ml Lysozym bei 4°C unter ständigem Invertieren inkubiert und 6 x 10 sec sonifiziert. Anschließend wurden die unlöslichen Bestandteile 30 min bei 10000 g und 4°C abzentrifugiert und der Überstand entweder bei -80°C gelagert oder weiterverarbeitet. Die GST-Fusionsproteine wurden dann an einer GST-Matrix (Glutathion Sepharose 4B, Amersham Pharmacia) immobilisiert. Vor Gebrauch wurde die Matrix mit 1 ml SET-Puffer pro 500 µl Sepharose nach Herstellerangaben äquilibriert. Anschließend wurde die Matrix mit der Bakterienproteinlösung 1–2 h unter ständigem Invertieren bei 4°C inkubiert. Danach wurde das Gefäß 1 min stehen gelassen und eine weitere Minute bei 500 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Matrix gewaschen (3 x in 50 ml und fünfmal mit 1 ml eiskaltem SET-Puffer). Zur Kontrolle der Aufreinigung versetzte man 20 µl des an die Matrix gekoppelten Proteins mit 20 µl 2x SDS-Probenpuffer und analysierte die Proben über SDS-PAGE. Die Sepharose wurde sofort weiterbehandelt.

6.2.3.6.3 Aufreinigung von His₆-rekombinanten Proteinen aus *E.coli*

Die Aufreinigung von His₆-Proteinen erfolgte im Wesentlichen nach den Angaben des Herstellers (*QIAexpress Handbook*, Qiagen). Dabei wurden die Bakterien unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt und anschließend renaturiert. Dazu wurden die Zellen in 5 ml eiskaltem Lyse-Puffer B / g Bakteriensediment resuspendiert und 30 min bei 4°C unter ständigem Invertieren inkubiert. Das Zelldebris wurde dann 30 min bei 10000 g und 4°C abzentrifugiert und der Überstand entweder bei -80°C gelagert oder sofort weiterverarbeitet. Für die Kopplung des rekombinanten Proteins an Nickel-Acetat (NiAc)-Agarose (Qiagen) wurden sämtliche Schritte bei 4°C mit eiskalten Lösungen durchgeführt. Vor Gebrauch wurde die NiAc-Agarose (1 ml / 4 ml Lyse-Puffer) 3 x mit 20 ml Lyse-Puffer B (denaturierend) in einer Säule (*Superflow Columns*, Qiagen) äquilibriert. Dann wurde die Agarose 1 h und 20 min bei 4°C und unter ständigem Invertieren mit der Proteinlösung inkubiert. Die Agarose wurde in der Säule 3 x mit je 4 ml Lyse-Puffer B / ml Agarose gewaschen. Anschließend wurde 2 x mit je 4 ml Puffer C (denaturierend) /ml Agarose gewaschen. Es folgte die Renaturierung, bei der innerhalb von 2 h jeweils 10 ml Puffer D / ml Agarose mit absteigender Harnstoff-Konzentration (5, 4, 3, 2, 1, M) über die Säule gegeben wurde. Zur Elution von der Matrix wurde das renaturierte Protein 2 x mit 5 ml Puffer D + 1 M Urea + 0,5 M Imidazol / ml Agarose behandelt,

wobei sie jeweils 20 min bei 4°C mit dem Elutions-Puffer inkubiert wurde. Das eluierte Protein wurde über Nacht gegen 0,1 M NaHCO₃ / 0,5 M NaCl dialysiert und am nächsten Tag an eine aktivierte NHS-Sepharose Matrix gekoppelt. Dafür wurde die Sepharose Matrix äquilibriert (5 ml Matrix mit 45 ml eiskaltem HCl 2 x 10 min, abzentrifugieren, Matrix 10 min in 10 ml Kopplungspuffer). Über die äquilibrierte Matrix wurde dann das dialysierte Protein gegeben und über Nacht unter konstanter Rotation bei 4°C inkubiert. Die Matrix wurde dann abzentrifugiert, in Zyklen mit Tris-HCl pH 8,0 und NaAc-Puffer pH 4 alterierend je 5 min gewaschen und in 20 ml 0,1 M Tris-HCl + 20% Ethanol pH 8,0 bis zum Gebrauch bei 4°C aufbewahrt.

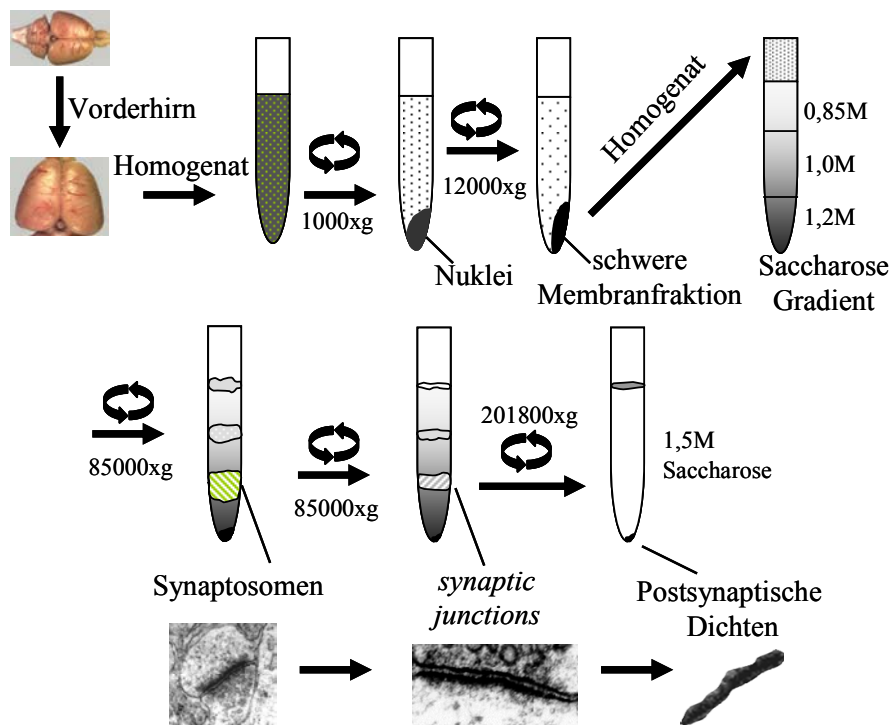


Abbildung 6.2: Skizzierte biochemische Aufreinigung postsynaptischer Dichten

Schematischer Ablauf einer PSD-Aufreinigung aus dem Vorderhirn von Mäusen. Die Synaptosomen, *synaptic junctions* und PSDs sind zusätzlich als elektronenmikroskopische Bilder dargestellt. Zur Isolierung subsynaptischer Kompartimente wurden die Vorderhirne von 10 Mäusen präpariert, gepoolt und in Lösung A (0,32 M Saccharose and 5 mM HEPES, pH 7,4) homogenisiert und 2 x zentrifugiert (1000 x g, je 10 min). Die beiden Überstände wurden gepoolt und bei 12000 x g für 15 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1,5 ml/g Lösung B (0,32 M Saccharose, 5 mM Tris-HCl, pH 8,1) resuspendiert und auf einen 1.2/1.0/0.85 M Saccharose Gradienten überschichtet. Die Synaptosomen konnten nach einer Zentrifugation bei 85000 x g für 2 h in der 1.2/1.0 M Interphase abgenommen werden und wurden in 1.5 ml/g 5 mM Tris-HCl resuspendiert. Die letzte Zentrifugation wurde mit den Synaptosomen wiederholt und die *synaptic junctions* wiederum in der 1.2/1.0 M Interphase abgenommen und in 60 ml/10g Lösung B und 60 ml/10g Lösung C (0,32 M Saccharose, 1% Triton X-100, 12 mM Tris-HCl, pH 8,1) resuspendiert. Diese Fraktion wurde für 15 min inkubiert und bei 32000 x g für 30 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 2.5 ml Lösung B aufgenommen, auf ein 1.5 M Saccharosekissen gelegt und für 2 h bei 201800 x g zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit dem Pellet einmal wiederholt. Die so entstandene PSD-T2 (= 2x Triton behandelt) Fraktion wurde in 150 µl 50 mM HEPES, pH 7.2 gelöst und bei -80°C gelagert.

6.2.3.7 Kopplung synthetischer Peptide an eine NHS-Matrix

Die synthetisierten Oligopeptide der C-terminalen 10 Aminosäuren von NR2A und GluR2 wurden von Dr. Hans-Jürgen Kreienkamp, UKE Hamburg, zur Verfügung gestellt. 1 mg der Oligopeptide (Sequenz: NR2A, KKMPESIDV; GluR2, CVYGIKSVKI) wurden in 0,5 ml Kopplungspuffer gelöst und zu 1 ml äquilibrierter NHS-Sepharose (nach Herstellerangaben) gegeben. Die Matrix inkubierte über Nacht bei 4°C unter konstanter Rotation. Freie Bindungsstellen wurden durch Inkubation der am nächsten Tag abzentrifugierten Matrix durch eine Inkubation mit 0,05 M Cystein in 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 für 1 h blockiert. Die Matrix wurde wie unter 6.2.3.6.1 beschrieben gewaschen, in 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 + 20% Ethanol aufgenommen und bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert.

6.2.3.8 Affinitätschromatographische Experimente

Die jeweiligen Matrizes wurden mit je 500 µl Proteinextrakt versetzt und entweder für 2 h oder über Nacht bei 4°C unter konstanter Rotation inkubiert. Die Matrizes wurden anschließend 1 min auf Eis abgesetzt und 1 min abzentrifugiert (Eppendorf 5417, 1000 rpm, 4°C). Dem folgten vier Waschschritte, 1 x in RIPA-Puffer, 3 x in 1x PBS. Die Matrix wurde abschließend in 50 µl 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen und bei -20°C bis zum Einsatz im Western Blot gelagert.

6.2.3.9 Co-Immunpräzipitierung

Für die Co-Immunpräzipitierung (Co-IP) wurde ein Arg3.1 spezifisches, aufgereinigtes Antiserum an eine Protein A-Sepharose Matrix gekoppelt. Dafür wurden 50 µg Protein A Sepharose *beads* (Fluka) in gleicher Menge RIPA-Puffer aufgenommen und äquilibriert. Nach dreimaligem Austausch des Puffers wurde die Matrix in 60 µl RIPA-Puffer aufgenommen. Zur Filterung unspezifischer Bindungspartner mit der Matrix wurden die *beads* mit 500 µl Vorderhirnextrakt bei 4°C für 20 min unter Rotation inkubiert. Die Beads wurden abzentrifugiert (Eppendorf 5417, 1000 rpm, 4°C), das Proteinextrakt abgenommen und mit 10 µl Arg3.1 Antiserum für 2 h bei 4°C unter Rotation inkubiert. Danach wurden 30 µl frische äquilibrierte *beads* zugegeben und für weitere 2 h bei 4°C rotiert. Die Matrix wurde anschließend 1 x in RIPA-Puffer und 3 x in 1x PBS gewaschen und schließlich in 50 µl 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen und bei -20°C bis zum Einsatz im Western Blot gelagert.

6.2.3.10 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Proteinbestimmungen wurden basierend auf der Bradford-Methode durchgeführt (Bradford, 1976). Zunächst wurde eine Eichgerade mit Hilfe eines BSA-Standards erstellt. Dazu wurden aufsteigende BSA-Konzentrationen von 0,5 µg/ml bis 5 µg/ml in PBS aus einer 0,5 mg/ml-Stammlösung hergestellt und davon jeweils 100 µl mit 700 µl PBS und 200 µl *Brilliant Blue Reagenz* (BioRad) versetzt und kurz durchmischt. Nach ca. 2 min wurde die Absorption bei 595 nm mit einem UV-Spektrometer (Ultraspec 3010 pro, Amersham Pharmacia) bestimmt. Anhand der so generierten Eichgerade wurde auf gleiche Weise die Konzentration der Proteinprobe bestimmt.

6.2.3.11 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine können mit Hilfe von SDS-PAGE ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Bei der hier angewandten diskontinuierlichen Gel-Elektrophorese handelte es sich um ein Zwei-Gel-System, bestehend aus einem niederprozentigen Sammelgel (pH 6,8), in dem die aufgetragenen Proteine in scharfen Banden gesammelt wurden und einem höherprozentigen Trenngel (pH 8, ebenso wie der Laufpuffer), in dem die Proteine entsprechend ihrer Größe aufgetrennt wurden. Es wurden vertikale Gelkammern (Biometra) und 10 bzw. 12 % Trenngele verwendet, die sich, wie die Sammelgele, nach Sambrook und Russel, 2001, zusammensetzten. Die aufzutragenden Proteinproben wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95°C denaturiert, 1 min bei RT und 20000 g abzentrifugiert und bis zum Auftragen auf Eis inkubiert. Die Strombedingungen während des Laufes lagen bei 15 mA im Sammelgel und 30 mA im Trenngel. Der Gelelektrophorese schloss sich entweder eine Coomassie-Färbung oder ein Western Blot Transfer an.

6.2.3.12 Coomassie-Färbung eines Protein-Gels

Der Farbstoff *Coomassie Brilliant Blue R250* (BioRad) färbt Proteine unspezifisch blau an. Nach der Elektrophorese wurde das Polyacrylamid-Gel ca. 30 min in Coomassie-Färbelösung gefärbt und anschließend in Entfärbelösung bei Raumtemperatur solange inkubiert, bis der Hintergrund entfärbt und die Proteinbanden gut zu erkennen waren. Das Gel wurde dann zwischen einem Gel-Blotting-Papier (Schleicher&Schüll) und Saranfolie 1,5 h bei 80°C unter Vakuum (*Gel Dryer*, GFL) getrocknet.

6.2.3.13 Western Blot

Um Proteine mit spezifischen Antikörpern zu detektieren, wurden sie nach der SDS-PAGE auf eine Nitrocellulosemembran (Schleicher&Schüll) transferiert („geblottet“). Dazu wurde eine Nitrocellulosemembran von gleicher Größe wie das Proteingel für 10 min im Transferpuffer inkubiert und auf das Polyacrylamid-Gel gelegt. Gel und Nitrocellulosemembran wurden zwischen zwei Gel-Blotting-Papiere eingespannt und in eine Blotting-Apparatur (BioRad) eingebaut. Der Transfer fand für 1,5 h bei konstanter Spannung von 100 V bei RT statt, wobei zwei Eiskammern die Puffertemperatur kühlten. Nach Beendigung des Transfers wurde die Nitrocellulosemembran kurz mit AquaDest gespült und 10 min mit Ponceau-Färbelösung (BioRad) angefärbt. Die Membran wurde mit AquaDest entfärbt und sofort weiterverarbeitet oder in Saranfolie eingewickelt und bei -20°C gelagert.

6.2.3.14 Detektion eines Western Blots

Unspezifische Bindungsstellen auf der Western Blot Membran wurden 1 h mit 5% Magermilchpulver in PBS-T blockiert. Nach dreimaligem Waschen (je 20 min) mit PBS-T wurden die Blots für 2 h bei RT mit 3–5 ml primärer Antikörperlösung (verdünnt in PBS-T) unter Schütteln inkubiert. Nach erneutem Waschen (3 x 20 min, PBS-T) wurde die Membran in 9 ml sekundärer Antikörperlösung (1:3000 in PBS-T, Vector Laboratories) für 1 h bei RT unter Schütteln inkubiert. Der Blot wurde erneut gewaschen (s.o.). Die Detektion erfolgte mittels Chemilumineszenz (Amersham Pharmacia)

nach Herstellerangaben. Dabei wurden X-Omat blue Filme (Kodak) für verschiedene Zeiträume zwischen 10 sec und 5 min aufgelegt und im Entwickler (Kodak) detektiert. Nach der Detektion wurde die Membran in Saranfolie bei -20°C aufbewahrt.

6.2.3.15 Western Blot stripping

Für eine erneute Detektion wurden die Erst- und Zweitantikörper folgendermaßen entfernt: Die Membran wurde in 50 ml Stripping-Puffer mit 350 µl β-Mercaptoethanol 2 x 15 min bei 50°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Membran 2 x 10 min mit 100 ml Stripping-Puffer ohne β-Mercaptoethanol und 3 x 10 min mit PBS-T gewaschen.

6.3 Tierversuche

Für die Tierversuche wurden ausschließlich Mäuse (*Mus musculus*) des Stammes C57Bl/6J verwendet. Falls nicht anders angegeben, wurden Männchen der kompletten oder konditionalen Arg3.1 *knockout*-Mauslinie und ihre Wildtyp-Geschwister im Alter von 2–5 Monaten verwendet. Die Tierversuche wurden von der Behörde für Arbeit, Gesundheit und Soziales der Hansestadt Hamburg (F27/01) sowie dem Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit der Stadt Berlin (G0241/02) genehmigt.

6.3.1 Induktion von epileptischen Anfällen

Zur Induktion eines generalisierten epileptischen Krampfes wurde den Mäusen Kainat (Ocean Produce) in der Dosis 25 mg/kg Körpergewicht in 1x PBS gelöst mit einer 22G Kanüle intraperitoneal injiziert. Kontrolltiere wurden mit einer ähnlichen Menge 1x PBS injiziert. Der Abbruch des Versuches bezog sich auf den Zeitraum, der seit dem Einsetzen des Krampfes vergangen ist. Die Tiere wurden (a) durch Dekapitation getötet und die Gehirne bzw. Hippokampi sofort auf Eis präpariert und je nach anschließender Methodik weiterbehandelt oder (b) intrakardial perfundiert (s. 6.3.2).

6.3.2 Perfusion von Mäusen

Die Mäuse wurden für 1 min durch CO₂ betäubt und die Bauchdecke geöffnet. Das Herz wurde freigelegt und eine an eine peristaltische Pumpe (Gilson) angeschlossene Kanüle in die linke Herzkammer geschoben und mit einer Klemme fixiert. Durch die Kanüle wurde zunächst 20 ml Heparinlösung (0,01% Heparin in PBS) und dann 150 ml 4% Paraformaldehyd (PFA) gepumpt. Das Öffnen des rechten Vorhofes im Herz verhinderte das Aufstauen der Lösungen. Diese Behandlung führte zur Fixierung des gesamten Körpers. Das Gehirn wurde entnommen und über Nacht bei 4°C in 4% PFA nachfixiert.

6.3.3 Mauszucht

Die Mauslinien wurden nach den Richtlinien der Banbury Konferenz gezüchtet (Banbury Konferenz, 1999). Dabei wurden Tiere ab einem Alter von 6–10 Wochen für höchstens 10 Monate verpaart. Die Verpaarungsstrategie ist in Abbildung 6.3 skizziert. Die Mauszucht wurde in der UKE Tierhaltung in Hamburg und am FEM in Berlin durchgeführt.

6.3.4 Verhaltensbiologische Experimente

6.3.4.1 *Morris water maze*

Versteckte Plattform. Das *Morris water maze* wurde in Anlehnung an das ursprüngliche Protokoll (Morris et al., 1982) mit männlichen und weiblichen Tieren durchgeführt. Dabei ergaben sich keine geschlechtsspezifischen Unterschiede, so dass die Daten gesammelt wurden. Die Tiere schwammen in einem runden Polypropylenbassin mit einem Durchmesser von 150 cm, das mit warmem Wasser ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) gefüllt und mit 1 l Milch eingetrübt wurde. Für das räumliche Training wurde eine quadratische Plattform (14 x 14 cm) 0,5 cm unter der Wasseroberfläche platziert. Der Raum war mit Orientierungshilfen an den Wänden ausgestattet (Abb. 3.16A) und wurde indirekt beleuchtet (4 x 40W, 12 lux). Die Akquisition erfolgte über 3 Tage, mit 6 Durchgängen pro Tag in einem Intervall von 60 min. Ein Durchgang dauert maximal 90 sec. Währenddessen wurde die Plattformlokalisierung nicht verändert. Die Mäuse wurden von 8 verschiedenen Positionen in das Bassin gesetzt. Nach Erreichen der Plattform blieben die Tiere 5 sec auf derselben sitzen und wurden dann über ein Metallgitter in ihren Heimkäfig überführt. In der sich anschließenden Umlernphase wurden die identischen Bedingungen für 2 Tage und mit einer neuen Plattformlokalisierung angewendet. Während des Testdurchgangs wurde die verbrachte Zeit in einem Quadranten (1/4 der gesamten Wasseroberfläche), in einem runden Gebiet um die ehemalige Plattformlokalisierung (12.5% der Oberfläche) gemessen und die Anzahl der exakten Überquerungen der Lokalisierung gezählt. Für jeden Parameter wurde der Wert der trainierten Region mit dem Mittelwert der äquivalenten Regionen in den beiden benachbarten Quadranten gewertet.

Sichtbare Plattform. Die Tiere wurden hier für 2 Tage analog der oben beschriebenen Akquisition trainiert, allerdings war die Plattform selber mit einer dreieckigen roten Fahne markiert.

Daten- und Strategieanalyse: Folgende Schwimmparameter wurden gemessen: Dauer bis zum Erreichen der Plattform, Länge des Schwimmpfades, Dauer der Bewegungslosigkeit (*floating*, Def.: Immobilität bei einer Geschwindigkeit < 0.06 m/s), und Schwimmgeschwindigkeit (exklusive *floating*). Für die Strategieanalyse wurden evaluiert: (a) Prozentualer Anteil der Zeit, den die Tiere in einem 10 cm breiten Korridor an der Wand verbringen, (b) durchschnittliche Entfernung vom Ziel, (c) kumulativer Suchfehler (Summe der Entfernungen zum Ziel, die ein mal pro sec gemessen wurde minus den Wert, der sich bei einem direkten Schwimmpfad ergibt, Gallagher et al., 1993), (d) Whishaw's error (Prozentualer Anteil des Schwimmpfades ausserhalb eines 16 cm breiten Korridores, der den Auslass- und Zielort verbindet), (e) Richtungsfehler (absoluter Winkel zwischen dem Vektor,

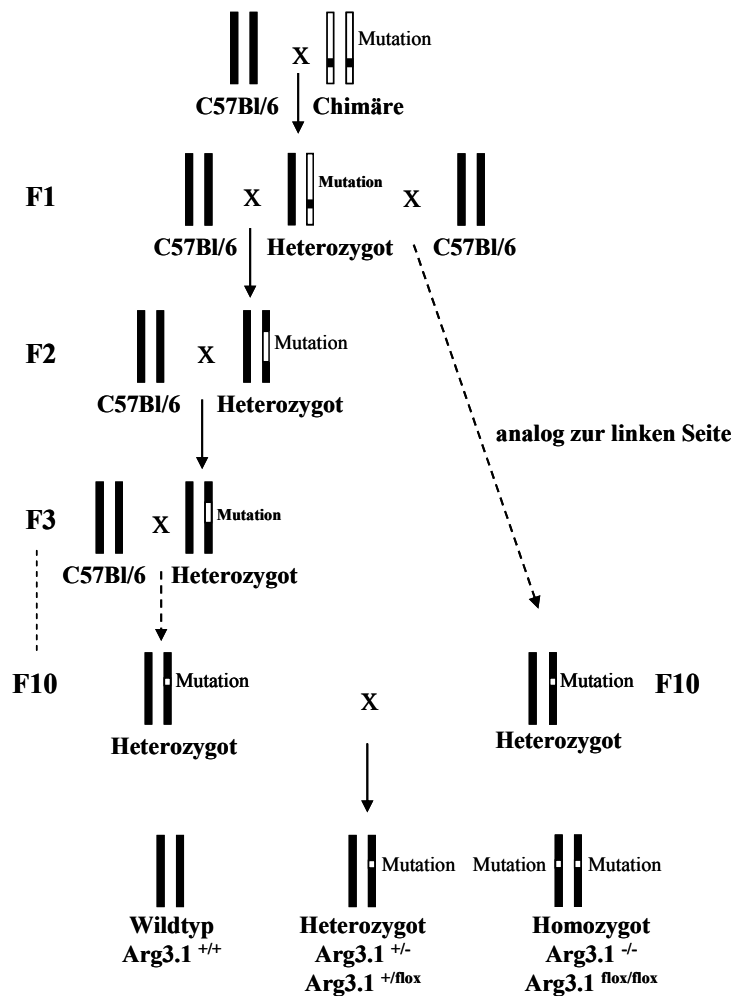


Abbildung 6.3: Erzeugung einer kongenen *Arg3.1* *knockout*-Linie

Zur Erzeugung der F1 Generation wurden die Chimären in Wildtyp-Tiere der Inzuchtlinie C57Bl/6 gekreuzt. Die Chimären gingen ihrerseits aus einer C57Bl/6 Blastozyste hervor, die mit einer homolog rekombinierten ES-Zelle aus dem Stamm 129SV injiziert und anschließend einer C57Bl/6 Amme eingepflanzt wurde. Die F1-Generation wurde 10-mal in den Stamm C57Bl/6 rückgekreuzt, um einen einheitlichen genetischen Hintergrund zu schaffen. Die so entstandene kongene Linie stellt eine neue Inzuchtlinie mit definiertem genetischen Hintergrund dar. Die Mutation selber wurde während dieser Verpaarungsstrategie im heterozygoten Zustand aufrechterhalten. Um homozygote Nachkommen für die funktionellen Studien sowohl der kompletten (*Arg3.1*^{-/-}) als auch der konditionalen (*Arg3.1*^{flox/flox}) *knockout*-Linie zu erhalten, wurden heterozygote Nachkommen ab F10 untereinander verpaart.

der vom Auslassort zur Position des Tieres zeigt und dem Vektor, der vom Auslass- zum Zielort zeigt), (f) Pfadeffizienz (Prozentualer Anteil des Pfades während dessen die Zielrichtung des Schwimmvektors $\geq 75\%$ ist), (g) Schwimmpfad parallel zur Wand (Prozentualer Anteil des Pfades an dem er eine kreisförmige Vektorkomponente aufweist (Vektorkomponente $\leq 25\%$), (h) spontane Genauigkeit (nachdem die Maus eine der Auslassort - Zielort entsprechenden Strecke zurückgelegt

hat, wird die tatsächliche Entfernung zum Ziel als 0% (Schwimmrichtung entgegengesetzt vom Zielort) oder 100% (im Ziel) beurteilt. Es wurde ferner die Ungenauigkeit des Pfades bestimmt (Summe aller entgegengesetzten Richtungsänderungen geteilt durch die zurückgelegte Strecke), Explorationsindex (% der abgesuchten Wasseroberfläche), Thigmotaxis (% der Gesamtschwimmdauer unmittelbar an der Wand) und Kreisen (Summe aller gleichen Richtungsänderungen geteilt durch die zurückgelegte Strecke). Anhand dieser Kriterien wurde jeder Schwimmpfad einer Strategie zugeordnet: *floating*, Thigmotaxis, zufallsorientiert (*random*), gezielt in einer Region (*scanning*), Kreisen (*circling*, *chaining*), fokussiertes Suchen (*focal searching*) und räumlich (*spatial*), d. h. in einem direkten Weg bis zum Ziel.

Videoaufzeichnung. Die Tiere wurden mit einer Videokamera gefilmt und die Bilder von einer Computersoftware aufgezeichnet (Noldus EthoVision 1.96 system, Noldus Information Technology). Dabei wurden xy Position des Tieres und die Ausmessungen der Bassins gespeichert und an ein Analyseprogramm (Wintrack 2.4, www.dpwolfer.ch/wintrack) weitergeleitet.

6.3.4.2 Furchtkonditionierung

Die Tiere wurden über 2 Tage für je 10 min pro Tag an die Konditionierungskammer gewöhnt. Während der Akquisition wurde ein Tier in die Konditionierungskammer (Box A, 25 x 17 x 23 cm, rote Beleuchtung < 5 lux) gesetzt und mit 5 zeitlich überlappenden (*delay*) oder getrennten (*trace*) Ton/Schock-Paarungen mit einem Intervall von 215 sec konfrontiert (s. Abb. 6.4). Jede Paarung bestand aus einem 15 sec Ton (2000 Hz, 98 dB) und einem 2 sec Elektroschock durch ein Fußgitter (0.26 mA). Während der gesamten Akquisition blieben die Tier in der Konditionierungskammer. Um die kontextabhängige Gedächtniskomponente zu messen, wurde das *freezing*-Verhalten (absolute Bewegungslosigkeit) per Videoanalyse 24 h später für 2 min in der Box A gemessen. 1 h später wurden die Tiere für 2 min in eine völlig neue Umgebung gesetzt (Box B, 20 x 10 x 23 cm, flacher Boden, Parfumdüft, helle und direkte Beleuchtung). Während der ersten Minute wurde nur das Verhalten als Reaktion auf den neuen Raum aufgezeichnet, während der zweiten wurde der Trainingston gespielt. Das tonabhängige Gedächtnis spiegelte sich in dem Verhältnis der *freezing*-Raten zwischen der ersten und zweiten Minute wider.

6.3.4.3 Offene Arena

Der Aufbau der Arena ist in Abbildung 6.5 gezeigt. Es handelte sich dabei um eine Fläche, der Größe des *Morris water maze* Bassins entsprechend. Die Tiere wurden einzeln an der Arenawand ausgesetzt und an 2 aufeinander folgenden Tagen für je 10 min darin belassen. Die Tiere wurden per Videokamera observiert und für die Auswertung wurde die gesamte Zeit in Paketen á 5 min aufgeteilt. Die Beleuchtung war indirekt (4 x 40W Glühlampen, 12 lux).

6.3.4.4 *Elevated O-Maze*

Der Aufbau der Apparatur ist in Abbildung 6.5 gezeigt. Die Tiere wurden einmalig in einen der geschlossenen Sektoren gesetzt und per Videoanalyse für 10 min observiert. Für die Analyse wurde die Zeit in zwei Pakete á 5 min aufgeteilt.

6.3.4.5 *Hell/Dunkel-Kammer*

Der Aufbau der Kammer ist in Abbildung 6.5 gezeigt. Das helle Kompartiment war mit 500 lux beleuchtet. Die Wände waren 20 cm hoch, der Durchgang zum dunklen Kompartiment 5 cm breit und 7,5 cm hoch. Die Tiere wurden in die Mitte des hellen Kompartiments gesetzt und für 10 min observiert.

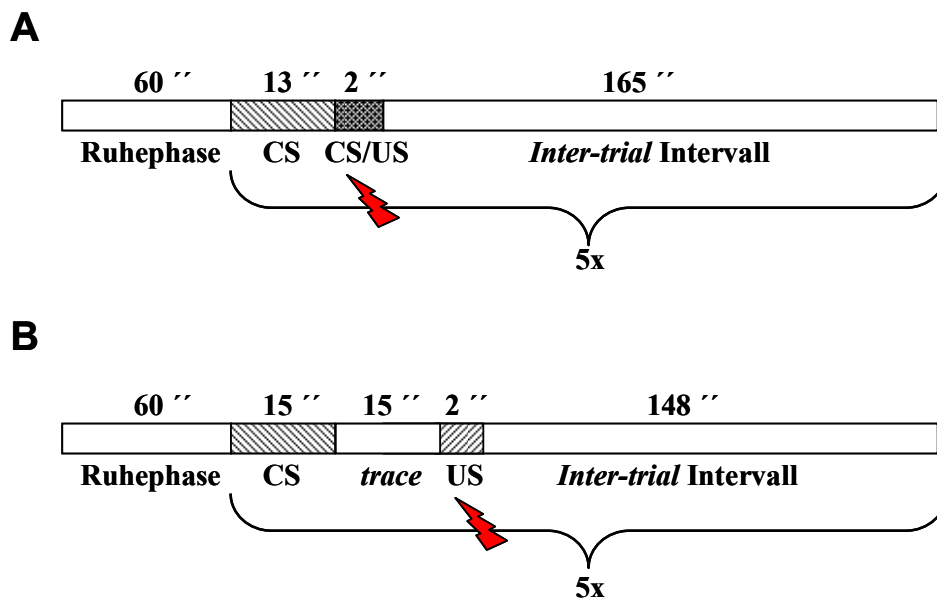


Abbildung 6.4: Protokoll der Furchtkonditionierung

(A) Die *delay* Furchtkonditionierung: CS und US sind zeitlich überlappend. (B) Die *trace* Furchtkonditionierung: zwischen CS und US liegt eine Pause (*trace*). CS, konditionierter Stimulus: akustisches Signal; US, unconditionierter Stimulus: elektrischer Stromstoß durch das Bodengitter.

6.3.4.6 *Statistik*

Der Strategievergleich im *Morris water maze* wurde anhand eines Chi²-tests durchgeführt. Die Präferenz für eine Zone im Testdurchgang des *Morris water maze* wurde gegen den mathematisch berechneten Wert mit einem *one-sample* t-Test analysiert. Für alle anderen Vergleiche wurde der ANOVA-Test angewendet. Zur Berechnung wurde das Computerprogramm Statview 5.0 (SAS Institute Inc.) verwendet.

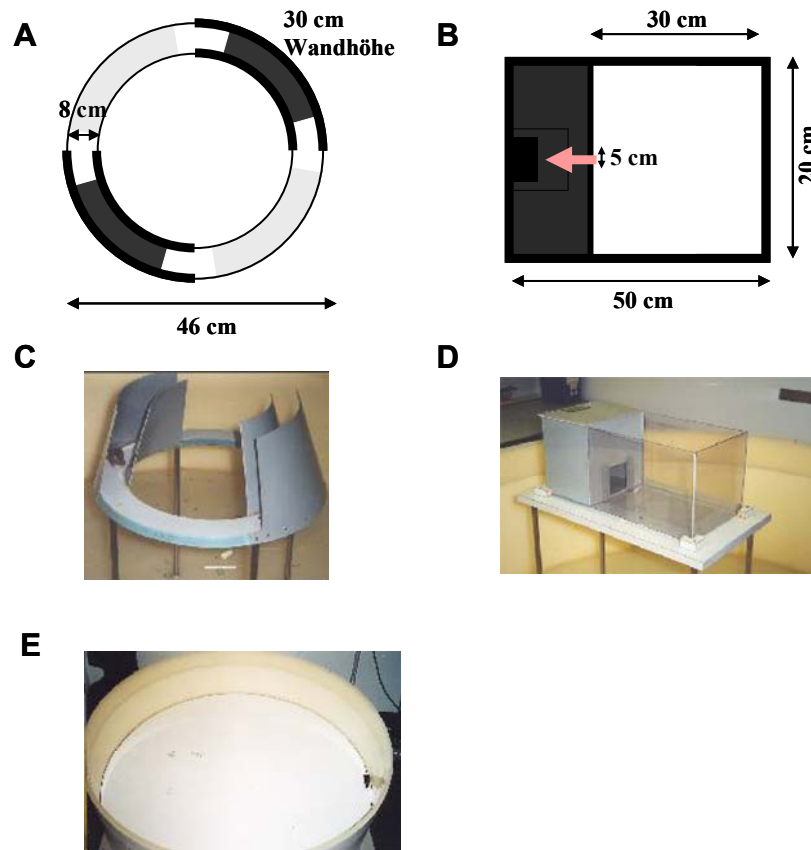


Abbildung 6.5: Aufbau verschiedener Verhaltensarenen

Skizzierter Aufbau (A, B) und Photodokumentation (C-E) des *Elevated O-maze* (A, C), Hell/Dunkel-Kammer (B, D) und der offenen Arena (E).