

Aus dem Fachbereich Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
und dem
Institut für Anatomie
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

***In-vivo-* und *in-vitro*-Untersuchungen zum Einfluss von
Brain-derived Neurotrophic Factor
auf die Entwicklung serotonerger Neurone im Gehirn der Maus**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Susann Hopf

Tierärztin

aus Erlabrunn / Erzgebirge

Berlin 2003

Journal-Nr.: 2780

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs für Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. L. Brunnberg

Erster Gutachter: Frau Prof. Dr. H. Fink

Zweiter Gutachter: Frau Prof. Dr. G. Ahnert-Hilger

Dritter Prüfer: Frau Prof. Dr. J. Plendl

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus): BDNF, serotonerges System, S100 β , in-vivo- und in-vitro-Entwicklung, Myelin Basic Protein

Tag der Promotion: 10.02 2004

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Kommunikation von Nervenzellen	1
1.2	Das serotonerge System	1
1.2.1	Die Rolle von Serotonin im Gehirn	2
1.2.2	Lokalisation und Innervationsgebiete serotonerger Neurone	3
1.2.3	Biosynthese und Metabolismus von Serotonin	4
1.2.4	Serotonin-Rezeptoren	5
1.3	Brain-derived Neurotrophic Factor	6
1.3.1	Bedeutung von BDNF	7
1.3.2	BDNF als trophischer Faktor für serotonerge Neurone	7
1.3.3	Neurotrophin-Rezeptoren	8
1.3.4	Wirkungsweise der Neurotrophine	9
1.4	Das gliale Protein S100 β	10
1.4.1	Bedeutung von S100 β	10
1.4.2	S100 β und Serotonin	11
1.5	Interaktionen von BDNF und S100 β auf serotonerge Neurone	12
1.6	Einfluss von BDNF auf die Myelinisierung	13
1.7	Fragestellung	13
2	MATERIAL	14
2.1	Chemikalien und Reagenzien	14
2.2	Geräte und Apparaturen	17
2.3	Puffer und Lösungen	18
2.3.1	Lösungen für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	18
2.3.2	Lösungen für die Immunhistochemie	18
2.3.3	Medien für die Zellkultur	20
2.3.4	Lösungen für die Immunzytochemie	21
2.3.5	Lösungen für die Protein-Analytik	22
2.4	Verwendete Antikörper	24
2.4.1	Primäre Antikörper	24
2.4.2	Sekundäre Antikörper	25
2.5	Versuchstiere	26
3	METHODEN	27
3.1	Charakterisierung und Genotypisierung der BDNF-gendefizienten Mäuse	27
3.1.1	Aufarbeitung des Gewebes	27
3.1.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	28
3.1.3	Agarosegel-Elektrophorese	29

3.2	Immunhistochemie	29
3.2.1	Aufarbeitung der Gehirne	29
3.2.2	ABC-DAB/Ni-Technik	30
3.2.3	Histologische Färbemethode nach Klüver-Barrera	31
3.2.4	Lichtmikroskopische Auswertung	32
3.3	Bestimmung der Gehalte monoaminerger Neurotransmitter mittels HPLC	32
3.3.1	Aufarbeitung der Gehirne	32
3.3.2	Bestimmung von Serotonin und 5-Hydroxyindolessigsäure	32
3.3.3	Bestimmung von Dopamin und Noradrenalin	33
3.4	Messungen der Gehalte an BDNF und NGF mittels ELISA	33
3.5	Neuronale Zellkulturen	35
3.5.1	Primärkulturen von Raphe-Neuronen	35
3.5.2	Primärkulturen von Hippokampus-Neuronen	36
3.5.3	Behandlung mit Wachstumsfaktoren	36
3.5.4	Serotoninsekretion	36
3.5.5	Immunzytochemie	37
3.5.6	Fotographische Dokumentation	37
3.5.7	Morphometrie und Statistik	37
3.6	Gliakulturen	38
3.6.1	Primärkulturen von Gliazellen	38
3.6.2	C6-Zelllinie	39
3.6.3	Behandlung mit BDNF	39
3.6.4	Subzelluläre Fraktionierung	39
3.6.5	Immunpräzipitation	40
3.7	Protein-Analytik	40
3.7.1	Aufarbeitung der Gehirne	40
3.7.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	40
3.7.3	Gelelektrophorese und Proteintransfer	41
3.7.4	Direktes Aufbringen von Proteinen auf Nitrozellulose	42
3.7.5	Immunoreplika	42
3.7.6	Semiquantifizierung immundetektierter Proteine	42
4	ERGEBNISSE	43
4.1	Vergleich serotonerger und catecholaminerger Neurone in BDNF+/+ und BDNF-/- Mäusen	43
4.1.1	HPLC-Messung der Monoaminspiegel	43
4.1.2	Immunhistochemische Untersuchungen an serotonergen Neuronen	45
4.1.3	Vergleich von Schlüsselenzymen der Monoaminsysteme in BDNF+/+ und BDNF-/- Mäusen	50
4.1.4	Gehalte von BDNF und NGF in verschiedenen Hirnregionen	53
4.2	Effekte von BDNF an Primärkulturen von Raphe und Hippokampus	54
4.2.1	Funktionelle Charakterisierung serotonerger Neurone aus Primärkulturen	54
4.2.2	Effekte von BDNF auf serotonerge Raphe-Neurone in Primärkulturen	56

4.2.3	Effekte von BDNF auf hippocampale Neurone in Primärkulturen	60
4.2.4	Vergleich der Entwicklung hippocampaler Neurone in Primärkulturen von BDNF ^{+/+} und BDNF ^{-/-} Mäusen	63
4.3	Einfluss von BDNF auf die Synthese und Freisetzung von S100 β	65
4.3.1	Nachweis der Spezifität des Antikörpers gegen S100 β	65
4.3.2	Immunhistochemischer Nachweis von S100 β in BDNF ^{+/+} und BDNF ^{-/-} Mäusen	66
4.3.3	Intrazelluläre Verteilung von S100 β	68
4.3.4	Einfluss von BDNF auf den Gehalt von S100 β	69
4.4	Untersuchungen des Myelingehtes in BDNF ^{+/+} und BDNF ^{-/-} Mäusen	72
4.4.1	Myelinscheidenfärbung nach Klüver-Barrera	72
4.4.2	Myelin Basic Protein	74
5	DISKUSSION	78
5.1	<i>In-vivo</i> -Untersuchungen monoaminerger Neuronenpopulationen BDNF-gendefizienter Mäuse	78
5.1.1	Die Entwicklung des serotonergen Systems in BDNF-gendefizienten Mäusen	78
5.1.2	Einfluss von BDNF auf die Entwicklung dopaminerger und noradrenerger Neurone	81
5.2	Die Rolle von BDNF und S100 β <i>in vitro</i>	82
5.2.1	Das Modell Zellkultur	82
5.2.2	BDNF und axonales Wachstum	83
5.2.3	Einfluss von BDNF und S100 β auf die Morphologie der Dendriten in Primärkulturen von Raphe und Hippokampus	84
5.2.4	Einfluss von BDNF und S100 β auf das axonale Wachstum in Primärkulturen von Raphe und Hippokampus	85
5.2.5	Einfluss von BDNF auf Hippokampus-Neurone von BDNF ^{-/-} und BDNF ^{+/+} Mäusen <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	86
5.3	BDNF fördert die Synthese von S100 β	88
5.4	BDNF-gendefiziente Mäuse zeigen verminderte Myelinisierung	89
6	ZUSAMMENFASSUNG	92
7	ABSTRACT	93
8	LITERATURVERZEICHNIS	94
9	TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS	103
	DANKSAGUNG	
	TABELLARISCHER LEBENS LAUF	
	SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	

DANKSAGUNG

Frau Professor Dr. G. Ahnert-Hilger gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas der Dissertation, für die zahlreichen Anregungen und Ihre jederzeit gewährte wissenschaftliche und persönliche Unterstützung.

Herrn Dr. T. Stroh danke ich für die gute Einführung und Einarbeitung in die Thematik.

Bei Frau Prof. Dr. H. Hörtnagl und Frau PD Dr. G. Große bedanke ich mich für die Anregungen und die konstruktive Kritik, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Frau Prof. Dr. Grantyn und Herrn Dr. T. Rothe gilt mein Dank für die unproblematische Bereitstellung der gendefizienten Mäuse.

Bei Herrn Prof. Dr. Hellweg bedanke ich mich für die Messung der Neurotrophinkonzentrationen.

Frau Prof. Dr. Fink danke ich für die Begutachtung der Arbeit und für die Vertretung vor dem Fachbereich Veterinärmedizin.

Mein Dank gilt ferner allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für das gute Arbeitsklima und ihre ständige Hilfsbereitschaft. Namentlich seien genannt: Markus, Ingrid, Thomas J., Sandra, Susanne, Ursel, Birgit, Carola, Anne und Sascha.

Weiterhin danke ich meinen Eltern für die Hilfe und liebevolle Unterstützung während meiner gesamten Ausbildung

Zum Schluss möchte ich mich bei Kourosch für sein Verständnis und seinen Beistand bedanken.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Susann Hopf
Geburtsdatum: 9. Januar 1971
Geburtsort: Erlabrunn / Erzgebirge
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Anschrift: Karl-Kunger-Str. 64, 12435 Berlin

Werdegang

1977-1987 6. Polytechnische Oberschule in Schwarzenberg
Abschluss: Mittlere Reife

1987-1990 Medizinische Fachschule in Aue;
Krankenhaus Erlabrunn
Abschluss: Krankenschwester

1990-1991 Tätigkeit als Krankenschwester,
Krankenhaus Erlabrunn

1991-1994 VHS-Kolleg in Berlin-Treptow
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

1994-1995 Studium der Chemie und Biologie,
Freie Universität Berlin

1995-2001 Studium der Veterinärmedizin
Freie Universität Berlin
Abschluss: Approbation als Tierärztin

seit 4/2001 Doktorandin am Institut für Anatomie, Universitätsklinikum der
Charité, Humboldt-Universität zu Berlin; Arbeitsgruppe Frau
Prof. Dr. G. Ahnert-Hilger