

2 MATERIAL

2.1 Chemikalien und Reagenzien

ABC-Elite Kit	Vector/Camon (Wiesbaden)
Elite A <small>Avidin H</small>	
Elite B <small>Biotinyl-Peroxydase</small>	
Acrylamid Stammlösung (30%)	Roth (Karlsruhe)
Agarose GTQ	Merck (Darmstadt)
Ammoniumpersulfat	Sigma (München)
Ammoniumnickelsulfat	Sigma (München)
B27 Supplement	Gibco Life Technologies (Eggenstein)
BCA <small>Natrium-Bicincholinsäure-4,4-di-carboxy-2,2-Bichinolin</small>	Sigma (St.Louis, USA)
BDNF <small>Brain-derived Neurotrophic Factor</small>	Dunn-Labortechnik (Asbach)
Bisacrylamid Stammlösung (2%)	Roth (Karlsruhe)
BSA <small>Rinderserum-Albumin</small>	Sigma (München)
Collagen	Sigma (München)
Diaminobenzidin (DAB)	Sigma (München)
DMEM <small>„Dulbecco`s Modified Eagle Medium“ ohne Glutamin</small>	Biochrom (Berlin)
DMSO <small>Dimethylsulfoxid</small>	Roth (Karlsruhe)
ECL TM <small>Enhanced Chemiluminescence</small>	Amersham (Freiburg)
EDTA <small>Ethylendiamintetraacetat</small>	Roth (Karlsruhe)
Ethanol, vergällt	Merck (Darmstadt)
Ethanol, unvergällt	Merck (Darmstadt)
Eisessig	Roth (Karlsruhe)
Entellan [®]	Merck (Darmstadt)
Gelatine	Merck (Darmstadt)
Glutamin	Biochrom (Berlin)
Glutaraldehyd	Fluka (Neu-Ulm)
Hanks gepufferte Salzlösung	Biochrom (Berlin)
Heparin	Ratiopharm (Ulm)
HEPES <small>N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure</small>	Sigma (München)
Hybond C <small>Nitrozellulose Membran</small>	Amersham (Freiburg)

Imidazol	Sigma (München)
Immu-Mount [®]	Shandon (Pittsburgh, USA)
Isopropanol	Roth (Karlsruhe)
Kaliumchromsulfat-12-hydrat	Merck (Darmstadt)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)
Kälberserum, fetales	Biochrom (Berlin)
Ketavet [®] (Ketamin)	Curamed Pharma GmbH (Karlsruhe)
LMW Low Molecular Weight Marker	Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden)
Longasteril [®] 70 mit Elektrolyten	Fresenius (Bad Homburg)
Magermilchpulver	Glücksklee (München)
Methanol	Merck (Darmstadt)
Multifly [®] Set	Sarstedt (Nümbrecht)
Natriumazid (NaN ₃)	Serva (Heidelberg)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Boehringer Mannheim
Natriumborhydrid (NaBH ₄)	Sigma (St.Louis, USA)
Natriumglutamat	Sigma (München)
Natriumhydroxid	Merck (Darmstadt)
Neurobasal-Medium (NBM)	Gibco Life Technologies (Eggenstein)
Paraformaldehyd	Merck (Darmstadt)
Penicillin / Streptomycin	Biochrom (Berlin)
Pferdeserum	Biochrom (Berlin)
Phenylhydrazin	Merck-Schuchardt (München)
Pikrinsäure	Sigma (München)
Poly-L-Lysin	Sigma (München)
Ponceau S	Sigma (St.Louis, USA)
Primer	BioTez (Berlin)
Proteinase K	Roth (Karlsruhe)
Protein G Sepharose	Amersham (Freiburg)

Proteinase Inhibitoren:

Aprotinin	Boehringer Mannheim
Leupeptin	Boehringer Mannheim
Pepstatin	Boehringer Mannheim
PMSF <small>Phenylmethylsulfonylfluorid</small>	Boehringer Mannheim
RedTaq™ DNA Polymerase	Sigma (München)
RNase	Roth (Karlsruhe)
Rompun® (Xylazin)	Bayer (Leverkusen)
Saccharose	Merck (Darmstadt)
Serotonin <small>Hydrochlorid</small>	Sigma (München)
TEMED <small>Tetramethylethyldiamin</small>	Sigma (München)
Thimerosal	Sigma (München)
Tissue Freezing Medium™	Leica (Nussloch)
Tris <small>Trishydroxymethylaminomethan</small>	Merck (Darmstadt)
Triton-X-100	Roth (Karlsruhe)
Tween 20	Merck (Darmstadt)
Wasserstoffperoxid (30%)	Merck (Darmstadt)
Xylol	J.T. Baker (Deventer, Holland)
Ziegenserum	Invitrogen (Mannheim)

2.2 Geräte und Apparaturen

- Beckman LS 6500, Liquid Szintillation Counter, Krefeld
- Brutschrank, Heraeus, Modell BBD 6220, Hanau
- CBM-10A Communications Bus Module, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan
- Digitaler Elektrochemischer Amperometrischer Detektor (DECADE), Antec Leyden BV, Niederlande
- Dounce-Homogenizer
- ELISA Reader MR5000, Dynatech, Ashford, Großbritannien
- Homogenizer, Heidolph RZR 2021
- Kryostat, Frigocut 2800, Reichert-Jung
- Kulturschalen, Nunc, 4, 6, 24 well Multidish, Roskilde, Dänemark
- Laborwaagen, Sartorius, Göttingen
- LC-0AD Liquid Chromatograph, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan
- Mikroskop, Leica, Typ DMLB, Leica-Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar
- Mini-Protean[®] 3 Electrophoresis Cell, Bio-RAD, Hercules, CA, USA
- pH-Meter, WTW, Modell 537, Weilheim
- Power Pac 200 power supply, Bio-Rad, Hercules, CA, USA
- Sonicator, Baudelin *electronic*, Berlin
- Spektrophotometer, Beckman, Fullerton, USA
- Stereolupe Stemi SV 11, Zeiss, Jena
- sterile Werkbank, Heraeus Instruments, Herasafe Typ HS 18/2
- Sterilfilter, Nalgene, Hereford, U.K.
- Trans-Blot SD semi-dry electrophoretic cell, Bio-Rad, Hercules, CA, USA
- VT-03 Electrochemical Flowcell, Antec Leyden, Niederlande
- Zentrifugen: Beckman L-70 Ultrazentrifuge, Rotor TLA 120.1, Krefeld
Eppendorf Zentrifuge 5402, Eppendorf AG, Hamburg

2.3 *Puffer und Lösungen*

2.3.1 **Lösungen für die Polymerase-Kettenreaktion**

Agarosegel

2%	Agarose in 1x Elektrophorese-Puffer
0,0074%	1%iges Ethidiumbromid (=7,4µl auf 100ml)

BE-Puffer

5 mM	Tris
	mit HCl auf pH 8,5 einstellen

Elektrophorese-Puffer (10x)

400 mM	Tris-Acetat
10 mM	EDTA
	mit Eisessig auf pH 8,0 einstellen

Schwanz-Auflöse-Puffer

0,4 ml	1M Tris-HCl, pH 7,5
8 ml	0,5 M EDTA, pH 8,0
1 ml	SDS, 20% w/v
29 ml	dH ₂ O, steril
0,8 ml	RNase, 1% w/v in TE-Puffer

TE-Puffer

10 mM	Tris-HCl, pH 8,0
1 mM	EDTA

2.3.2 **Lösungen für die Immunhistochemie**

ABC-Komplex

0,2% w/v	Rinderserum-Albumin in PBS
0,1% v/v	Elite A
0,1% v/v	Elite B

Lösung für primären Antikörper

10%	Zienserum in PBS
0,3% v/v	Triton-X-100
1% v/v	Natriumazid-Stock (10% in dH ₂ O)
1% v/v	Thimerosal-Stock (1% in dH ₂ O)

Lösung für sekundären Antikörper

0,2% w/v	Rinderserum Albumin in PBS
0,3% v/v	Triton-X-100
1% v/v	Natriumazid-Stock (10% in dH ₂ O)

Blocklösung

10%	Ziegen- bzw. Pferdeserum in PBS
0,3% v/v	Triton-X-100
0,005% v/v	Phenylhydrazin

Chromgelatinelösung

15 g	Gelatine
1,76 g	Kaliumchromsulfat-12-hydrat in 630 ml dH ₂ O bei 70°C lösen
300 ml	Ethanol (100%)
70 ml	Eisessig; filtrieren

Gefrierschutzlösung für Hirnschnitte

400g	0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4
300g	Saccharose
300g	Ethylenglykol mit HCl auf pH 7,4 einstellen

Phosphatpuffer (PBS)

140 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
10 mM	Na ₂ HPO ₄
1,8 mM	KH ₂ PO ₄ mit HCl auf pH 7,4 einstellen

Perfusionsfixierung

Vorspüllösung

Longasteril®

Fixierungslösung

750 ml dH₂O

40 g Paraformaldehyd

13,8 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat

2 ml Glutaraldehyd 25%

166,5 ml gesättigte Pikrinsäure

auffüllen auf 1 l dH₂O

mit NaOH auf pH 7,38 einstellen, filtrieren

Nachspüllösung

13,8 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat

50 g Saccharose

auffüllen auf 1 l dH₂O

mit NaOH auf pH 7,38 einstellen, filtrieren

Vorinkubationslösung

50 mM Tris-Puffer, pH 7,6 (HCl)

10 mM Imidazol Stocklösung (1M gelöst in dH₂O, pH 7,6 mit HCl)

10 µl/ml DAB-Stocklösung (50 mg gelöst in dH₂O)

2.3.3 Medien für die Zellkultur

Dissoziationsmedium

50 ml fetales Kälberserum

5 ml Penicillin / Streptomycin (10 000 IE / 10 000 µg/ml)

5 ml L-Glutamin

50 IE Insulin

5 ml 1M HEPES

4 g Glucose

mit DMEM auf 500ml auffüllen

Kulturmedium für neuronale Primärkulturen

485 ml	Neurobasal-Medium
10 ml	B27-Supplement
5 ml	Penicillin / Streptomycin (10 000 IE / 10 000 µg/ml)
1,25 ml	L-Glutamin

Startermedium für neuronale Primärkulturen

25 µl	100 mM Natriumglutamat
	in 100 ml Kulturmedium

Kulturmedium für Astrozyten-Primärkulturen und C6-Zelllinie

50 ml	fetales Kälberserum
5 ml	Penicillin / Streptomycin (10 000 IE / 10 000 µg/ml)
5 ml	L-Glutamin
	mit DMEM auf 500ml auffüllen

Serumfreies Kulturmedium für Astrozyten-Primärkulturen und C6-Zelllinie

5 ml	Penicillin / Streptomycin (10 000 IE / 10 000 µg/ml)
5 ml	L-Glutamin
	mit DMEM auf 500ml auffüllen

2.3.4 Lösungen für die Immunzytochemie**Blocklösung**

2 %	Rinderserum-Albumin
5 %	Ziegenserum
0,1 %	Triton X-100
	in PBS

Antikörper-Lösung

2 %	Rinderserum-Albumin
0,1 %	Triton X-100
	in PBS

2.3.5 Lösungen für die Protein-Analytik

Antikörper-Lösung

1,5% w/v Rinderserum Albumin in TS-Puffer

Blocklösung

5% w/v Magermilchpulver in TS-Puffer

0,1% v/v Tween 20

Chlornaphtolentwicklung

2 ml α -Chlornaphtol 3 mg/ml in DMSO

10 ml TS-Puffer

10 μ l Wasserstoffperoxid (30%)

Elektrophoresepuffer (10x)

30 g Tris

144 g Glycin

10 g SDS

auf 1 Liter dH₂O auffüllen

Homogenisierungspuffer

320 mM Saccharose

4 mM HEPES

mit NaOH auf pH 7,4 einstellen

Lösungen für Proteinbestimmungstest

Lösung A 1% (w/v) BCA-Na₂ (Natriumsalz der Bichinoninsäure)

1,7% (w/v) Na₂CO₃

0,16% (w/v) Na₂-Tartrat

0,4% (w/v) NaOH

0,95% (w/v) NaHCO₃

auf pH 11,25 einstellen

Lösung B: 4% (w/v) CuSO₄ x 5H₂O

Ponceau-S Lösung

0,5% w/v Ponceau S

3% v/v Trichloressigsäure

Probenpuffer nach Laemmli (3x)

4,5 g SDS
12,48 g Sammelgel-Puffer (4x)
1,5 ml 0,1 M w/v EDTA
15 g Saccharose
5 ml 1,5 M DTT
800 μ l Bromphenolblau (4 mg/ml)
auf 50 ml dH₂O auffüllen
mit HCl auf pH 7,0 einstellen

Puffer für den Proteintransfer (Semi-dry-Verfahren)

29 g Glycin
5,8 g Tris
0,379 g SDS
200 ml Methanol
auf 1 Liter dH₂O auffüllen

Sammelgel-Puffer (4x)

500 mM Tris, mit HCl auf pH 6,8 einstellen
0,4 % SDS

Trenngel-Puffer (4x)

1,5 M Tris, mit HCl auf pH 8,8 einstellen
0,4 % SDS

Tris-Puffer (TS)

20 mM Tris
150 mM NaCl
mit HCl auf pH 7,5 einstellen

2.4 *Verwendete Antikörper*

2.4.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle
Anti-Serotonin Polyklonal Huhn	R.W. Veh Institut für Anatomie der Charité, Berlin
Polyklonal Kaninchen	Sigma, St. Louis (USA)
Anti-Serotonintransporter Polyklonal Meerschweinchen	Calbiochem, San Diego (USA)
Anti-Tryptophanhydroxylase Monoklonal Maus	Sigma, St. Louis (USA)
Anti-Tyrosinhydroxylase Polyklonal Kaninchen	Sigma, St. Louis (USA)
Anti-Dopamintransporter Monoklonal Ratte	Chemicon, Temecula (USA)
Anti-Myelin Basic Protein Monoklonal Maus	Sigma, St. Louis (USA)
Anti-Synaptobrevin Monoklonal Maus	Synaptic Systems, Göttingen
Anti-S100 β Monoklonal Maus	Sigma, St. Louis (USA)
Anti-MAP-2 Monoklonal Maus	Chemicon, Temecula (USA)
Anti-NFP 200 Monoklonal Maus	Chemicon, Temecula (USA)

Anti-VMAT 2 Polyklonal Kaninchen	Synaptic Systems, Göttingen
Anti-VGLUT 2 Polyklonal Kaninchen	Synaptic Systems, Göttingen
Anti-VGLUT 3 Polyklonal Kaninchen	Synaptic Systems, Göttingen

2.4.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle
Ziege anti-Kaninchen IgG biotinyliert	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Ziege anti-Meerschweinchen IgG biotinyliert	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Pferd anti-Maus IgG biotinyliert	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Ziege anti-Kaninchen IgG Peroxidase-gekoppelt	Dianova, Heidelberg
Pferd anti-Maus IgG Peroxidase-gekoppelt	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Ziege anti-Huhn IgG Alexa-Green-gekoppelt	Molecular Probes, Leiden, NL
Ziege anti-Maus IgG Alexa-Red-gekoppelt	Molecular Probes, Leiden, NL
Ziege anti-Kaninchen IgG CY-2-gekoppelt	Molecular Probes, Leiden, NL
Ziege anti-Maus IgG Alexa-Red-gekoppelt	Molecular Probes, Leiden, NL

2.5 Versuchstiere

Für die *in-situ*-Untersuchungen wurde ein transgener Mausstamm (C57BL/6), bei dem das Gen für Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF) deletiert wurde [Ernfors et al, 1994a], mit dem entsprechenden Wildtyp verglichen. Gezüchtet und freundlichst zur Verfügung gestellt wurden diese Mäuse – im weiteren bezeichnet als *BDNF*^{-/-} für die homozygot gendefizienten, *BDNF*^{+/-} für die heterozygoten und *BDNF*^{+/+} für den Wildtyp – am Institut für Physiologie der Charité Berlin, Arbeitsgruppe Frau Prof. Dr. R. Grantyn.

Für die *in-vitro*-Untersuchungen wurden die Embryonen terminiert verpaarter, trächtiger Mäuse des oben beschriebenen Mausstammes sowie der Linie NMRI (Naval Medical Research Institute, Fa. Winkelmann, Hannover) verwendet.

Die Haltung aller Tiere erfolgte unter kontrolliert pathogenfreien Bedingungen mit einem Lichtzyklus von 12 Stunden, wobei die Tiere ständigen Zugang zu Futter und Wasser hatten.

Die Verpaarung der Mäuse erfolgte stets über Nacht. Der Tag nach der Verpaarung wurde als E0 (Embryonaltag 0), der Tag der Geburt als P0 (Postnataltag 0) betrachtet.

2 METHODEN

3.1 Charakterisierung und Genotypisierung des *BDNF*-Mausstamms

Für die Züchtung wurden heterozygote (*BDNF*^{+/-}) Mäuse verpaart, da die homozygoten *BDNF*^{-/-} Mäuse das geschlechtsfähige Alter nicht erreichten. Im Vergleich zu den gesunden Wurfgeschwistern zeigten die *BDNF*^{-/-} Mäuse etwa ab Beginn der zweiten Lebenswoche eine Wachstumsretardation. Die Tiere litten unter Koordinationsstörungen, hyperaktiven Phasen mit Kreisbewegungen und wiederholten tonischen Krampfanfällen. Die Lebenserwartung betrug maximal 21 Tage. Die heterozygoten Mäuse waren fertil und zeigten keine offensichtlichen Abnormalitäten.

Der Genotyp wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) nach der Methode von Henneberger et al. [2000] festgestellt.

Die PCR ist ein Verfahren zur Erzeugung vieler Kopien eines spezifischen DNA-Fragments. Für die Sequenzen links und rechts des zu amplifizierenden Fragmentes, die bekannt sein müssen, werden künstlich Primer (Oligonukleotide) hergestellt. Durch Erhitzen wird die DNA in ihre beiden Einzelstränge getrennt (Denaturierung), die beiden Primern hybridisieren an den jeweils komplementären Basensträngen der DNA und eine hitzebeständige DNA-Polymerase ergänzt die fehlenden Stücke komplementär zur Vorlage in Syntheserichtung 5' → 3' (Elongation). Das Ergebnis sind zwei identische DNA-Doppelstränge. Dieses Verfahren wird so lange wiederholt bis genügend Kopien vorliegen.

3.1.1 Aufarbeitung des Gewebes

Für die DNA-Präparation wurde ein 0,3 cm langes Gewebestück der Schwanzspitze nach der Entnahme in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß zum mechanischen Aufbrechen der Zellmembranen für mindestens 15 Minuten bei – 80°C tiefgefroren. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 550 µl Schwanz-Auflöse-Puffer unter Zusatz von 50 µl Proteinase K (10 mg/ml, frisch gelöst in TE-Puffer) bei einer Temperatur von 56°C. Nach Auflösung des Gewebes wurde die Probe für 10 Minuten zentrifugiert und anschließend 500 µl des wässrigen Überstandes in 500 µl Isopropanol überführt. Durch leichtes Schwenken des Reaktionsgefäßes wurde die DNA ausgefällt. Nach einminütiger Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das resultierende DNA-Sediment mit 1 ml eiskaltem Ethanol gewaschen. Es folgte eine weitere Zentrifugation für 10 Minuten. Alle Zentrifugationsschritte

erfolgten bei 13600 xg in einer Eppendorf-Tischzentrifuge bei Raumtemperatur. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Sediment ca. 10 Minuten luftgetrocknet. Unter Zugabe von 50 µl BE-Puffer (siehe Kapitel 2.3.1) wurde die DNA für 5 Minuten bei 65°C resuspendiert und anschließend mittels Spektrophotometer die Extinktion gemessen. Zum Erreichen der Endkonzentration der DNA von 250 ng/50 µl wurde die Probe je nach ermittelter Extinktion mit TE-Puffer (siehe Kapitel 2.3.1) verdünnt.

3.1.2 Polymerase-Kettenreaktion

Ansatz für die PCR einer Probe (auf Eis):

1 µl	gelöste DNA
5 µl	10x Puffer mit Magnesium
1 µl	10 mM dNTP
1 µl	50 µM Primer BKO-1
1 µl	50 µM Primer 3'-neo
2 µl	50 µM Primer BD-2
1,25 µl	RedTaq – Polymerase, 1U/µl
	mit sterilen dH ₂ O auf 50 µl auffüllen

Abbildung 6: Primersequenzen

Primer	Sequenz
BKO-1	5'-ATA AGG ACG CGG ACT TGT ACA-3'
BD-2A	5'-GTG TCT ATC CTT ATG AAT CGC-3'
3'-neo	5'-GAT TCG CAG CGC ATC GCC TT-3'

Sequenzen der PCR-Primer zur Genotypisierung der *BDNF*^{+/+} (Primer BKO-1 und BD-2A) und *BDNF*^{-/-} Mäuse (Primer 3'-neo und BD-2A) nach Kolbeck et al. [1999].

Die PCR wurde in einem Thermocycler folgendermaßen durchgeführt.:

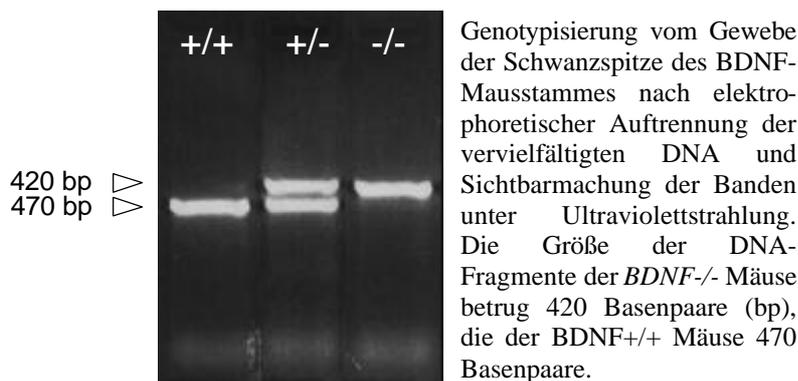
1. Phase:	Initiale Denaturierung:	94°C	5 min	30 Zyklen
	Hybridisierung:	58,5°C	30 sec	
	Elongation:	72°C	60 sec	
2. Phase:	Denaturierung:	94°C	30 sec	
	Hybridisierung:	58,5°C	30 sec	
	Elongation:	72°C	60 sec	
3. Phase:	Finale Elongation:	72°C	5 min	

3.1.3 Agarosegel-Elektrophorese

Nach Beendigung der PCR wurden 15 µl der amplifizierten DNA in Agarosegel unter Zusatz von Ethidiumbromid elektrophoretisch aufgetrennt (30 min) und anschließend die Banden unter Ultraviolettstrahlung sichtbar gemacht und fotografiert.

Abbildung 7:

Genotypisierung des BDNF-Mausstammes



3.2. Immunhistochemie

3.2.1 Aufarbeitung der Gehirne

Für die immunhistochemischen Untersuchungen dienten 15 bis 19 Tage alte Mäuse der Genotypen *BDNF*^{-/-} und der entsprechende Wildtyp (*BDNF*^{+/+}). Die Aufarbeitung der Gehirne erforderte aufgrund des großen Hirnvolumens eine Perfusionsfixation. Unter Narkose (0,1 mg Ketamin 500/g Körpergewicht (KGW) + 0,1 µl Xylazin/g KGW; intraperitoneal) und Heparinisierung (5 IE/g KGW; intraperitoneal) zur Vermeidung vorzeitiger Blutgerinnung wurde den Mäusen der Brustkorb eröffnet und eine 21G Kanüle (Multifly[®]-Set) - verbunden mit einem Perfusionssystem - in die linke Herzkammer positioniert. Gleichzeitig mit Beginn der Perfusion erfolgte zum Druckausgleich die Eröffnung des rechten Vorhofes. Die nachstehende **Tabelle 2** zeigt die Durchführung der Perfusion hinsichtlich der Dauer, der verwendeten Lösungen (Zusammensetzung s. Kapitel 2.3.2) und der jeweiligen angewendeten Drücke.

Tabelle 2: Durchführung der Perfusion

Zeitdauer	Lösung	Druck
5 s	Vorspüllösung	100 Torr
5 min	Fixationslösung	100 Torr
5 min	Fixationslösung	20 Torr
5 min	Nachspüllösung	50 Torr

Im Anschluss an die Perfusion wurden die Köpfe über Nacht in Nachspüllösung unter Zusatz von 1% Paraformaldehyd nachfixiert. Am folgenden Tag wurden die Gehirne freipräpariert und in Gefrierschutzlösung (30% w/v Saccharose in PBS) überführt. Nach Sättigung mit der Gefrierschutzlösung konnten die Gehirne aufgefroren werden. Dies erfolgte in Hexan als Einfriermedium, welches mit Hilfe von flüssigem Stickstoff auf eine Temperatur von – 50 bis – 60°C gekühlt wurde. Jedes Gehirn wurde vorher auf ein entsprechend zugeschnittenes 1,5 mm dickes Korkplättchen mit einem ca. 2 mm dicken Agarosestückchen in Position gebracht. Als Vermittler diente hierbei Tissue Freezing Medium™. Die Aufbewahrung der Gehirne erfolgte bei – 25°C, für längere Lagerungszeiten bei – 80°C.

Beschichtung der Objektträger

Vorgereinigte Objektträger wurden für 3 Minuten in warme Chromgelatinelösung getaucht und anschließend 1 bis 2 Tage staubfrei bei Raumtemperatur luftgetrocknet.

3.2.2 ABC-DAB/Ni-Technik

Das Prinzip der immunhistochemischen Detektion beruht auf der Bindung eines spezifischen primären Antikörpers an sein Epitop, einer Sequenz von 8-10 Aminosäuren des darzustellenden Proteins. Im Falle eines monoklonalen Antikörpers handelt es sich hierbei um ein einziges Epitop, während ein polyklonaler Antikörper unterschiedliche Epitope erkennt. Nach Bindung eines enzymgekoppelten sekundären Antikörpers, der gegen den primären gerichtet ist, wird durch Substratzugabe eine Farbreaktion induziert.

Die tiefgefrorenen Gehirne wurden in einer Dicke von 20 bis 25 µm mit einem Kryostaten geschnitten und in PBS aufgenommen. Hierbei wurden für die Färbung einzelner Schnitte 24-Loch-Platten und für Gehirnserien 10 ml Schnappdeckel-Gläschen verwendet. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Schnitte zum Blocken unspezifischer Proteinbindungsstellen und zur Zerstörung der endogenen Peroxidaseaktivität 30 Minuten bei Raumtemperatur mit Blocklösung inkubiert. Für die Blocklösung wurde entweder Ziegen- oder Pferdeserum verwendet - je nach Spezies, in dem der Sekundärantikörper generiert worden war. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper in der entsprechenden Verdünnung für mindestens 24 Stunden bei 4°C. Nach viermaligem Waschen und Vorinkubation für eine Stunde in PBS-A (0,2 % w/v Rinderserum-Albumin in PBS) bei Raumtemperatur wurden die Schnitte mit biotin-gekoppeltem sekundären Antikörper in einer Verdünnung von 1:2000 über Nacht bei 4°C inkubiert. Einem Waschschrift (4x 5 Minuten)

mit PBS zum Entfernen ungebundener Antikörpermoleküle folgte eine einstündige Vorinkubation mit PBS-A und anschließend die Inkubation mit ABC-Komplex für 4 bis 6 Stunden bei Raumtemperatur. Für die Farbreaktion wurden die Schnitte nach Auswaschen des ABC-Komplexes mit PBS (4x 5 Minuten) mit Vorinkubationslösung inkubiert. Nach 15 Minuten wurde 3%ige Ammoniumnickelsulfat-Lösung (100 µl/ml) zugegeben und die Reaktion mit H₂O₂ gestartet (0,3%ig; 50 µl/ml). Nach einer Entwicklungszeit von bis zu 3 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von PBS gestoppt und die Schnitte noch 2x mit PBS gewaschen. Die Schnitte wurden aus PBS mit Hilfe von feinen Pinseln auf Chromgelatine-beschichtete Objektträger aufgezogen. Nach Lufttrocknung (ca. 30 Minuten) erfolgte die Entwässerung der Schnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 90%, 96%, 2x 100% für jeweils eine Minute) und in Xylol für 10 Minuten. Aus Xylol heraus wurden die Schnitte mit Entellan[®] eingedeckt.

Bei jeder Färbung wurde zur Kontrolle ein Schnitt unter Weglassen des primären Antikörpers mitgeführt.

3.2.3 Histologische Färbemethode nach Klüver-Barrera

Die Klüver-Barrera-Färbung ist eine histologische Spezialfärbung. Der Farbstoff Luxolblau (*Luxol fast blue*) zeigt eine hohe Affinität zu dem im Myelin enthaltenen Neurokeratin und stellt somit – mit begrenzter Sensitivität - myelinisierte Fasern dar, Kresylviolett färbt die Zellkerne an.

Einzelne flotierende Schnitte in einer 24-Lochplatte wurden über Nacht in 70% Ethanol bei Raumtemperatur und anschließend für je 5 Minuten in 80% und 96% Ethanol entwässert. Zu jedem Schnitt wurde 0,5 ml Luxol fast blue (0,1% w/v in 96% Ethanol) zugegeben und über Nacht bei 60°C inkubiert. Nach Waschen in doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) und PBS für jeweils 3 Minuten erfolgte eine 3-minütige Inkubation mit 0,05% Lithiumcarbonat (LiCO₃). Anschließend wurden die Schnitte für 3 Minuten mit 70% Ethanol behandelt und noch 2x mit PBS gewaschen. Aus dem PBS heraus wurden die Schnitte auf Chromgelatine-beschichtete Objektträger aufgezogen und nach dem Trocknen mit Kresylviolett gegengefärbt. Hierzu folgte einem 2-minütigen Waschschriff mit ddH₂O eine 30-minütige Färbung mit Kresylviolett (0,2 % w/v in 100 mM Essigsäure, pH 4,0, gefiltert). Nach Waschen mit ddH₂O und entwässern der Schnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 90%, 96% und 2x 100% für jeweils eine Minute) und 10 Minuten in Xylol wurden die Schnitte mit Entellan[®] eingedeckt.

3.2.4 Lichtmikroskopische Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines kombinierten Fluoreszenz- und Lichtmikroskops. Eine angeschlossene Leica-Kamera ermöglichte die fotografische Dokumentation.

3.3 Bestimmung der Gehalte monoaminerger Neurotransmitter mittels HPLC

Die HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) ist eine Trennmethode, die auf die unterschiedliche Verteilung eines Probengemisches zwischen zwei Phasen beruht (mobile und stationäre Phase). Als stationäre Phase dient ein relativ polares Material mit hoher spezifischer Oberfläche, die mobile Phase ist relativ apolar. Die Trennung erfolgt unter hohem Druck (300 bar bei einem Fluss von üblicherweise 1 ml/min) durch unterschiedliche Adsorption der verschiedenen Molekülsorten im Probengemisch an der stationären Phase.

3.3.1 Aufarbeitung der Gehirne

Terminiert verpaarten, trächtigen BDNF^{+/-} Mäusen wurde am Gestationstag E16 nach der Tötung durch Dislokation des Atlantookzipitalgelenks der Uterus entfernt und in eiskalte physiologische Kochsalzlösung überführt. Von jedem Embryo wurde sowohl das Gehirn als auch - zum Feststellen des Genotyps - die Schwanzspitze entnommen. Die Gehirne wurden auf Trockeneis eingefroren und bei - 80°C gelagert.

Von 16 Tage alten Mäusen der Genotypen BDNF^{-/-}, ^{+/-}, und ^{+/+} wurden nach der Dekapitation die Gehirne entnommen und ebenfalls auf Trockeneis eingefroren. Auf einer - 15°C kalte Platte erfolgte die Präparation der eingefrorenen Gehirne in fünf verschiedene Regionen (Bulbus olfactorius, Frontalkortex, Striatum, Hippokampus und Hypothalamus). Die Proben wurde einzeln abgewogen und bei - 80°C aufbewahrt.

3.3.2 Bestimmung von Serotonin (5-HT) und 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA)

Mobile Phase	0,1 M Natriumacetat
	0,1 mM EDTA
	5 % Methanol
	pH 4,5 (Einstellung mit NaOH)
Stationäre Phase	Sperisorb ODS – 2,5 µm, 250 x 4,6 mm
Injektionsvolumen	20 µl
Säulentemperatur	35°C
Flussrate	1,0 ml/min
Elektrochemischer Detektor	Arbeitselektrode: Carbonsglas

Referenzelektrode. 3 M KCl

Potential: + 0,65 V

Die Gewebe wurden jeweils 10- bis 20-fach mit 0,1 M Perchlorsäure (PCA) mit 0,4 mM NaHSO₃ versetzt und per Ultraschall homogenisiert. Nach Zentrifugation (13600 xg, 20 min, 4°C) wurden 20 µl des Überstandes direkt in das HPLC-System injiziert.

3.3.3 Bestimmung von Dopamin und Noradrenalin

Mobile Phase	0,1 M Natriumphosphat
	0,1 mM EDTA
	0,5 mM Octansulfonsäure
	5 % Methanol
	pH 4,7 (Einstellung mit NaOH)
Stationäre Phase	Merck Lichrospher 100 RP- 18,5 µm, 125 x 4,0 mm
Injektionsvolumen	20 µl
Säulentemperatur	35°C
Flußrate	0,8 ml/min
Elektrochemischer Detektor	Arbeitselektrode: Carbonsglas
	Referenzelektrode. 3 M KCl
	Potential: + 0,65 V

Die Gewebe wurden mit einem Ultraschall-Homogenisator in 10-20-fachen Volumen an 0.1 M Perchloroessigsäure (PCA) mit 0.4 mM NaHSO₃ homogenisiert und 20 min zentrifugiert. Vom Überstand wurden 300 µl mit 30 µl 10⁻⁷ M internen Standard (DHBA, 3,4-Dihydroxybenzylaminhydrobromid) und 1 ml 1% Al₂O₃ in Tris/HCl (pH 8,6) versetzt, bei 4°C für 10 min geschüttelt und anschließend für 90 Sekunden zentrifugiert. Dieser Überstand wurde verworfen und das Sediment mit 1 ml H₂O gewaschen und 90 Sekunden zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 300 µl 0,1 M PCA versetzt, bei 4°C für 10 min geschüttelt und 90 Sekunden zentrifugiert. Von dem Überstand wurden 20 µl in das HPLC-System injiziert [Sperk, 1982]. Alle genannten Zentrifugationsschritte erfolgten bei 13600 xg und 4°C.

3.4 Messungen der Gehalte an BDNF und NGF mittels ELISA

Die Bestimmung der BDNF- und NGF- Gehalte erfolgte in der Klinik für Psychiatrie der Freien Universität Berlin und wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Hellweg für die vorliegende Studie zur Verfügung gestellt.

In Gewebshomogenaten von Hippokampus, Frontalkortex und Striatum wurden die endogenen Gehalte an BDNF und NGF bestimmt. Jede Gewebeprobe wurde in 10-20-fachem Volumen Auflösungspuffer (0,1 M Tris-HCl, pH 7,0; 0,4 M NaCl; 0,1% NaN₃ unter Zusatz von Proteinaseinhibitoren) mittels Ultraschall homogenisiert und bis zur Analyse bei – 80°C aufbewahrt. Die Gehalte an NGF wurden mittels fluorimetrischen ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) mit einer Detektionsgrenze von 15 fg NGF bestimmt [Hellweg et al., 1989].

Die Gehalte an BDNF wurden mit einem kommerziellen ELISA-Test (Promega Inc.) gemessen, jedoch angepasst an die fluorimetrische Technik wie für die NGF-Messung [Hellweg et al., 2001]. Hierzu wurden schwarze 96-Loch Mikrotiterplatten (Dynatech microfluor[®]) mit primären Antikörper gegen BDNF (monoklonal, Verdünnung 1:750) in Carbonatpuffer (pH 9,6) beschichtet. Nach Inkubation für 12 Stunden bei 4°C wurde 4x mit Waschpuffer gewaschen [Hellweg et al., 1989; Hellweg et al., 1996]. Die Gewebshomogenate wurden zentrifugiert und die Überstände mit dem gleichen Volumen an 0,1% NP-40 gemischt. Je 50 µl pro Probe und ein Standard wurden in Vierfachbestimmungen in die Löcher der Mikrotiterplatte pipettiert und für 12 Stunden bei 4°C inkubiert. Nach 4x waschen erfolgte die Inkubation mit einem zweiten primären Antikörper anti-BDNF (polyklonal-Huhn, 1:500 in Standard-/Konjugationspuffer) für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Nach 4x Waschen wurde ein sekundärer, alkalische Phosphatase gekoppelter anti-Huhn IgY-Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 in Standard-/Konjugationspuffer zugegeben und für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 4x waschen mit Waschpuffer und 2x waschen mit Substratpuffer (0.1 M Natriumphosphat, pH 8,7; 1 mM MgCl₂) wurde die Enzymreaktion mit 50 µl/Loch 1 mM AttoPhos[®] Substrat (Boehringer Mannheim) gestartet. Die Reaktion wurde gestoppt, die Akkumulation der Fluoreszenzmission bei einer Wellenlänge von 440 nm angeregt und bei 550 nm mit einem Mikrotiterplatten-Fluorometer (Labsystems Fluoroskan II) gemessen. Bei jeder Messung wurde der Hintergrundwert subtrahiert und die erhaltenen Werte der Enzymaktivität mit den Standards verglichen. Die ELISA-Werte der Gehirnproben wurden anhand der Regressionskurve für den BDNF-Standard, der unter gleichen Bedingungen inkubiert wurde, bestimmt. Der BDNF-Gehalt wurde als Äquivalent zum rekombinanten humanen BDNF ausgedrückt. Die Detektionsgrenze des Tests lag bei 1 pg/ml.

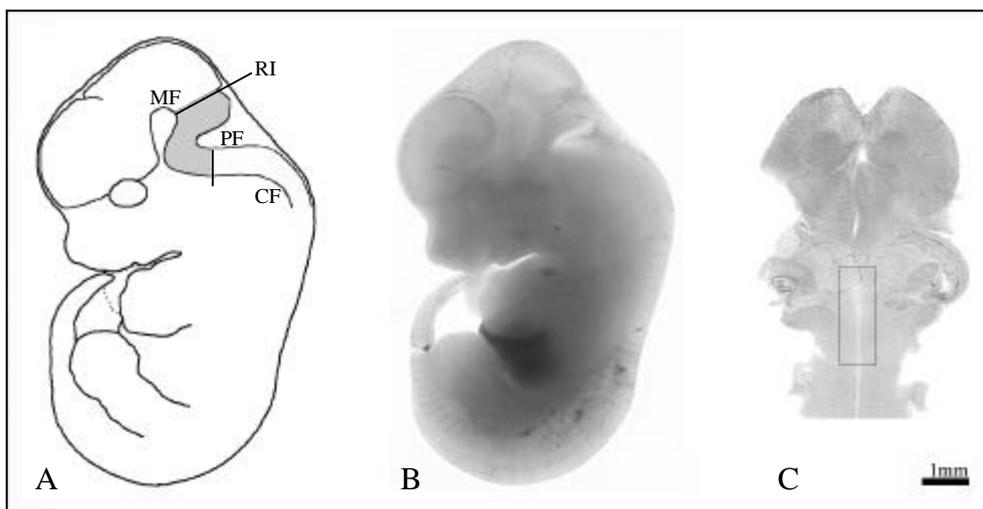
Die Angabe der ermittelten Werte erfolgte in pg/mg Gewebe (Feuchtgewicht). Um den Einfluss möglicher Varianzen zwischen den Experimenten zu minimieren wurden die Werte in Prozent zur Kontrolle angegeben.

3.5 Neuronale Zellkulturen

3.5.1 Primärkulturen von Raphe-Neuronen

Die Präparation der Gehirne erfolgte am Embryonaltag E13. Nach Tötung der Mutter durch Dislokation des Atlantookzipitalgelenks wurde der Uterus entfernt und in Puffer aufgenommen (0,6% w/v Glucose in PBS, sterilfiltriert). Unter sterilen Bedingungen sind die Gehirne mit Hilfe einer Stereolupe herauspräpariert und in frischen Puffer (0,6% w/v Glucose in PBS) überführt worden. Nach vorsichtiger Entfernung der Meningen wurde die dorsale Suture des Neuralrohres eröffnet, ein Gewebestreifen von ca. 1,0 mm Breite und 1,5 mm Länge entlang der Mittellinie des Mes- und Rhombenzephalons freipräpariert und in Kulturmedium (auf Eis) aufgenommen (siehe **Abbildung 8**).

Abbildung 8: 13 Tage alter Mausembryo mit präpariertem Gehirn



A: Schema des Embryos (**B**) mit gekennzeichnete Lage des Gehirns und grau markiertem Hirnstamm; **C:** präpariertes Gehirn nach Eröffnung der dorsalen Suture mit gekennzeichneten Ausschnitt der Raphe.

MF- Mittelhirnbeuge, **RI-** Isthmus des Rhombenzephalons, **PF-** Brückenbeuge, **CF-** Halsbeuge.

Primärkulturen von Raphe-Neuronen wurden nach einem modifizierten Protokoll von Brewer [1995] für serumfreie Kulturen angelegt. Nach 2x waschen mit 0,6% w/v Glucose in PBS durch Zentrifugation (80 x g) wurden die Zellen mechanisch mittels einer feuerpolierten Pasteurpipette in Dissoziationsmedium vereinzelt. Die Zellen wurden dann für 2 min bei 80 xg bei Raumtemperatur zentrifugiert, in Startermedium redissoziiert und nach der Zählung in einer Neubauer-Kammer mit einer Dichte von $1,5 \times 10^5$ Zellen/ml in 24-Loch Platten ausgesät. Die mit Glasplättchen vorbereiteten Platten waren vorher mit Poly-L-Lysin (0,5% in PBS, steril) über Nacht bei Raumtemperatur beschichtet und – nach 2x waschen mit PBS –

mindestens 2 Stunden im Brutschrank mit Dissoziationsmedium mit 1 % Collagen inkubiert worden.

Die Primärkulturen wurden im Brutschrank bei 37°C, 10% CO₂-Gehalt und 95% Luftfeuchtigkeit 6 Tage gehalten.

3.5.2 Primärkulturen von Hippokampus-Neuronen

Die Präparation erfolgte am Embryonaltag E16 aufgrund der späteren Differenzierung von Hippokampus-Neuronen im Vergleich zu serotonergen Neuronen der Raphe. Es wurden die gleichen Medien verwendet. Nach Präparation der Hippokampi wurden die Primärkulturen in der oben beschriebenen Art und Weise angelegt. Die Zelldichte betrug abweichend von den Raphe-Kulturen 8×10^4 Zellen/ml.

3.5.3 Behandlung mit Wachstumsfaktoren

Die Behandlung der Kulturen mit verschiedenen Wachstumsfaktoren erfolgte am 1.Tag *in-vitro* (24 Stunden nach Kultivierungsbeginn) und eine eventuelle 2. und 3. Behandlung an jeden 3. darauffolgenden Tag (4. und 7. Tag). In der nachstehenden **Tabelle 3** sind die Faktoren in der verwendeten Dosierung angegeben.

Tabelle 3:

Dosierung und Bezugsquelle der verwendeten trophischen Faktoren

Faktor	Dosierung	Bezugsquelle
BDNF	50 ng/ml	Dunn-Labortechnik, Asbach
S100β	10 ng/ml	Calbiochem, San Diego, USA

3.5.4 Serotoninsekretion

Primärkulturen von Raphe-Neuronen wurden am 9. Tag *in-vitro* nach Entfernen des Mediums in frisches Kulturmedium für neuronale Primärkulturen mit Zusatz von 40 nM [³H]Serotonin und 1 mM Ascorbinsäure für 2 Stunden bei 37°C, 10 % CO₂-Gehalt und 95 % Luftfeuchtigkeit vorbeladen. Einem Waschschrift (3x) mit Krebs-HEPES-Puffer folgte eine Zwischeninkubation für 10 min bei 36°C mit Krebs-HEPES-Puffer, der 0,2 % BSA enthielt. Anschließend wurde der Puffer durch frischen Krebs-HEPES-Puffer ersetzt. Dieser enthielt für die Stimulation der Sekretion einen auf 50 mM erhöhten K⁺- Gehalt – bei gleichzeitig entsprechend verminderten Gehalt an Na⁺. Die Stimulation erfolgte mit 100 µl des Puffers für 5 min bei 36°C. Der [³H]Serotoningehalt wurde sowohl im Überstand als auch in den Zellen

mittels Flüssigkeits-Szintillation bestimmt. Die Zellen wurden hierfür für 10 min bei 42°C mit 150 µl 0,4% Triton X-100 lysiert und das in den Zellen verbliebenen [³H]Serotonin gemessen. Die Angaben erfolgten in Prozent des sezernierten [³H] Serotonins zu dem vor Beginn der Stimulation in den Zellen vorhandenen [³H]Serotonins.

3.5.5 Immunzytochemie

Die kultivierten Raphe- und Hippokampusneurone wurden am 6. Tag *in vitro* mit eiskaltem Paraformaldehyd (4 % in PBS; pH 7,4; filtriert) bei Raumtemperatur für 15 Minuten fixiert und anschließend 3x für 5 Minuten mit PBS gewaschen. Zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen wurden die Zellen für 1 Stunde mit Blocklösung bei Raumtemperatur vorinkubiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte für 24 Stunden bei 4°C in Blocklösung in einer feuchten Kammer. Im Anschluss daran wurden die Zellen 2x für 10 min mit PBS gewaschen. Als sekundäre Antikörper dienten grün fluoreszenzmarkiertes (CY-2) anti-Kaninchen IgG in einer Verdünnung von 1:400 und rot fluoreszenzmarkiertes (Alexa-Red) anti-Maus IgG in einer Verdünnung von 1:300. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgte in Antikörper-Lösung (siehe Kapitel 2.3.4) für 2 Stunden bei Raumtemperatur in einer abgedunkelten feuchten Kammer. Ungebundene Antikörpermoleküle wurden 2x für 10 min mit PBS abgewaschen und die Zellen in Immu-Mount[®] auf Objektträgern eingebettet.

Bei jeder Färbung wurde zur Kontrolle eventueller unspezifischer Bindungen des sekundären Antikörpers ein Plättchen unter Weglassen des primären Antikörpers mitgeführt.

3.5.6 Fotografische Dokumentation

Die Auswertung und Dokumentation erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops mit angeschlossener, computergestützter Leica-Kamera und dazugehöriger Software. Die unterschiedlichen der Markierung von Proteinen dienenden Chromogene erforderten die Verwendung verschiedener Mikroskopeinstellungen. Die Anregung der Farbstoffe erfolgte mit einer Quecksilberdampfampe und einem Filter zur Anregung einer Wellenlänge von 470-490 nm für grün-markierte Fluoreszenz und einem Filter zur Anregung einer Wellenlänge von 520-550 nm für rot-markierte Fluoreszenz. Für die gleichzeitige Anregung beider Fluoreszenzfarbstoffe wurde ein Rot/Grün-Mischfilter verwendet.

3.5.7 Morphometrie und Statistik

In Raphekulturen wurden die serotonergen Neurone mit Antikörpern gegen Serotonin (5-HT) grün (Kaninchen anti-Serotonin; Sigma; 1:2000) und die Dendriten mit Antikörper gegen

MAP-2 (Maus anti-MAP-2; 1:1000) rot in einer Doppel-Immunfluoreszenz gefärbt. Die Dendriten wurden in der MAP-2-Färbung vermessen, die Axone in der 5-HT-Färbung.

Für die hippokampalen Neurone diente MAP-2 als dendritischer und NFP 200 als axonaler Marker.

Die Axon- und Dendritenparameter wurde mittels NeuroLucida-Software, Version 3, bestimmt. Mit diesem Programm konnten sowohl die Anzahl und Länge der Dendriten bzw. Axone als auch die Anzahl und Länge der Dendriten- bzw. Axonverzweigungen gemessen werden.

Die erhaltenen Daten wurden in MS Excel 2000 aufbereitet und anschließend statistisch ausgewertet. Für den Vergleich zweier Gruppen wurde der students t-Test, für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen ein one-way ANOVA (Analysis of Variance) mit anschließendem post-hoc-Test nach Dunn's method bzw. der Tukey-Test angewendet. Als statistisch signifikant wurden Werte mit $p < 0,05$ mit * gekennzeichnet.

3.6 Gliakulturen

3.6.1 Primärkulturen von Gliazellen

Gehirne von 2-3 Tage alten Mäusen (P1-2) der Linie NMRI wurden unter sterilen Bedingungen herauspräpariert und in eisgekühlter Hanks gepufferter Salzlösung aufgenommen. Nach Entfernen der Hirnhäute wurden je 2 Gehirne in ein 15 ml Falcon-Reaktionsgefäß überführt und in Kulturmedium mit einer feuerpolierten Pasteurpipette homogenisiert. Einem Waschschrift durch Zentrifugation (10 min, 80 xg, 4°C) folgte eine weitere Vereinzelung der Zellen mit einer feuerpolierten Pasteurpipette. Nach einer weiteren Zentrifugation (10 min, 80 xg, 4°C) wurden die Zellen resuspendiert und in Poly-L-Lysin beschichtete 6-Loch-Kulturschalen ausgesät. Die Zellen wurden bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ gehalten. Durch kräftiges Klopfen der Schalen auf festem Untergrund erfolgte nach zwei bis drei Tagen die Ablösung von Mikroglia und Zelldetritus aus dem Zellverband. Das Medium wurde entfernt und der verbleibende Zellrasen mit Trypsin vom Untergrund abgelöst, gewaschen, zentrifugiert (3 min, 80 xg, 4°C) und mit serumhaltigen Kulturmedium nach Zellzählung in einer Neubauer-Zählkammer in einer Dichte von 8×10^4 Zellen/ml ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte in der nun rein vorliegenden Mischkultur aus Astrozyten und Oligodendrozyten ein erneuter Mediumwechsel zu serumfreiem Kulturmedium.

3.6.2 C6-Zelllinie

Verwendet wurde eine C6-Zelllinie aus einem Astrozytom der Ratte (*Rattus norvegicus*). Für dauerhafte Lagerung erfolgte die Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff (- 196°C). Aus diesem heraus wurden bei Bedarf Kulturen auf Schalen von 100 mm Durchmesser in Kulturmedium mit Serumzusatz angelegt und nach konfluentem Wachstum (2-3 Tage) bei 37°C, 10 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit geerntet, gewaschen und in einer Verdünnung von 1:8 auf 6-Loch-Kulturschalen erneut ausgesät. Am folgenden Tag (oder je nach Versuchsansatz auch später) wurde das serumhaltige Medium entfernt und Kulturmedium ohne Serumzusatz zugefügt.

3.6.3 Behandlung mit BDNF

Die Behandlung der Kulturen erfolgte für gewöhnlich zusammen mit dem Wechsel von serumhaltigen zu serumfreien Medium mit BDNF in einer Konzentration von 50 ng/ml.

3.6.4 Subzelluläre Fraktionierung

Je nach Versuchsansatz erfolgte nach unterschiedlich langer Wachstumsdauer der primären Astrozytenkulturen und der Zellen der C6-Zelllinie die subzelluläre Fraktionierung. Hierzu wurden die Zellen nach Abpipettieren des Mediums 1x mit PBS gewaschen und anschließend unter Hinzufügen von 2 ml PBS/Loch durch mechanisches Abschaben geerntet. Dies und alle nachfolgenden Schritte erfolgten auf Eis. Nach Zentrifugation (1300 xg, 4°C, 2 min) und Verwerfen des Überstandes erfolgte unter Zugabe von HEPES-Puffer (4 mM; pH 7,4 mit HCl) mit den Proteinase-Inhibitoren Aprotinin (1%, Stock: 2 mg/ml in dH₂O), Leupeptin (1%, Stock: 1 mg/ml dH₂O), Pepstatin (1%, Stock: 1 mg/ml DMSO) und PMSF (1%, Stock: 100 nM in Ethanol) die Homogenisierung der Zellsuspension durch 20-fache Passage durch eine 27G-Kanüle. Dieses Homogenat wurde bei 15800 xg und 4°C für 15 min zentrifugiert. Das Sediment – bestehend aus Zellkernen und großen Zellbestandteilen – wurde in HEPES-Puffer resuspendiert und unter Zusatz von 3x Lämmli bei 95°C denaturiert. Die sich im Überstand befindliche postnukleäre Fraktion wurde für 30 min und 4°C bei 260000 xg in einer Beckmann-Ultrazentrifuge (Rotor TLA 120.1) zentrifugiert. Das resultierende Sediment bestand zum überwiegenden Teil aus Synaptosomen und wurde ebenfalls in HEPES-Puffer resuspendiert und in Probenpuffer nach Lämmli [1970] denaturiert. Der Überstand, welcher die zytosolischen Proteine beinhaltete, sowie das aufbewahrte Medium wurden zwecks Erhöhung der S100β-Konzentration mit monoklonalem Antikörper gegen S100β immunpräzipitiert.

3.6.5 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation dient zur Isolierung/Aufreinigung eines einzelnen Proteins aus einem Proteingemisch. Ein Antikörper, der spezifisch gegen das gewünschte Protein gerichtet ist, wird an eine unlösliche, inerte Trägersubstanz (Protein G Sepharose) gekoppelt. Der F_c-Teil des Antikörpers bindet adhäsiv an Protein G, das seinerseits kovalent mit der Sepharose verbunden ist.

200 µl Probe wurde mit 2 µl monoklonalen Antikörper gegen S100β (entspricht einer IgG-Konzentration von ca. 20 µg) versetzt und für mindestens 12 Stunden inkubiert. Im Anschluß daran wurden die entstandenen Präzipitate eine Stunde mit Protein G Sepharose inkubiert. Alle Inkubationsschritte erfolgten bei 4°C auf einem Schüttler. Nach Zentrifugation (320 xg, 1 min) verblieb der an der Sepharose gekoppelte Antigen-Antikörper-Komplex im Sediment, die nichtpräzipitierten Proteine der Lösung im Überstand. Das Sediment wurde noch 3x gewaschen, anschließend in 1x Laemmli aufgenommen und mittels direktem Aufbringen auf Nitrozellulose-Membran immundetektiert (*Dotblot*-Verfahren).

3.7 Protein-Analytik

3.7.1 Aufarbeitung der Gehirne

Die Gehirne wurden sofort nach Tötung des Tieres auf Eis herauspräpariert und in Homogenisierungspuffer (10 ml/g Gewebe) unter Zusatz der Proteinase-Inhibitoren Aprotinin (1%, Stock: 2 mg/ml in dH₂O), Leupeptin (1%, Stock: 1 mg/ml dH₂O), Pepstatin (1%, Stock: 1 mg/ml DMSO), PMSF (1%, Stock: 100 nM in Ethanol) zum Schutz vor Proteinverdau überführt. Ein Dounce-Homogenisator diente zum Homogenisieren der Probe. Anschließend erfolgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 15800 xg und 4°C. Der Überstand wurde abgenommen und zur Denaturierung der Proteine mit 3x Laemmli versetzt und 5 min bei 95°C erhitzt. Die Aufbewahrung der Proben erfolgte bei -25°C.

3.7.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Bichinoninsäure (BCA)-Methode nach Smith et al. [1985]. Diese Methode beruht auf der Reduktion von Cu²⁺ zu Cu⁺ durch Proteine im alkalischen Milieu (Biuret-Reaktion). Das reduzierte Kupfer bildet mit dem wasserlöslichen Natriumsalz der Bichinoninsäure einen violetten Komplex, der sein Absorptionsmaximum bei 562 nm hat.

Über Verdünnungsreihen wurde eine Standardkurve von 50 bis 400 µg/ml BSA hergestellt. Das BSA wurde dazu in 0,4% Triton-X-100 angesetzt, welches als Leerwert mit aufgetragen

wurde. Die Standardwerte, Triton-X-100 sowie die Proben wurden in Doppelbestimmungen in eine 96-Loch Mikrotiter Platte (20 μ l / Loch) pipettiert. Dazu wurden pro Loch 200 μ l der BCA-Reaktionslösung gegeben (eine Mischung aus Lösung A und B im Verhältnis 50:1; siehe Kapitel 2.3.5). Die Mikrotiter-Platte wurde dann für 30 min bei 60°C im Wasserbad inkubiert und nach 10 min Abkühlungszeit die Absorption bei 550 nm in einem ELISA-Reader gemessen. Die Protein-Konzentrationen der Proben wurden anhand der Standardkurve bestimmt.

3.7.3 Gelelektrophorese und Proteintransfer

Tabelle 4: Zusammensetzung der Gele

	Sammelgel 3,75%	Trenngel		
		10%	12%	15%
Sammelgel-Puffer	1ml			
Trenngel-Puffer		1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml
Acrylamid Stammlösung	0,5ml	2,0 ml	2,4 ml	3,0 ml
Bisacrylamid Stammlösung	0,2ml	0,8 ml	0,96 ml	1,3 ml
H ₂ O	2,3ml	1,7 ml	1,14 ml	0,2 ml
TEMED	5,2 μ l		16 μ l	
Ammoniumper- sulfat; 10% w/v	42 μ l		150 μ l	

Die Proteinproben wurden in einer eindimensionalen Gelelektrophorese in einem diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgel (siehe **Tabelle 4**) aufgetrennt. Die Trennung der Proteine erfolgte vertikal in Richtung Anode mit einer angelegten Spannung von 80 V für das Sammelgel und 160 V für das Trenngel bis das im Lämmli enthaltene Bromphenolblau das Ende des Gels erreichte hatte.

Die aufgetrennten Proteine wurden elektrophoretisch vom Gel auf Hybond-C-Nitrozellulose Membran transferiert und so immobilisiert. Dies erfolgte im Halbfeucht-Verfahren (*semi-dry*) in einer Trans-Blot SD Elektrophoresekammer unter Verwendung von *Semi-dry*-Puffer (siehe Kapitel 2.3.5) mit einer Stromstärke von 300 mA/Gel für 40 min. Anschließend wurden die Membranen in Ponceau-S-Lösung gebracht, um die Banden der Marker-Proteine sichtbar zu machen und die Integrität der übrigen Proteine zu testen. Überschüssiges Ponceau-S wurde

mit H₂O abgewaschen. Die Banden der Marker-Proteine dienten als Anhaltspunkte für die Molekulargewichte der Proteine.

3.7.4 Direktes Aufbringen von Proteinen auf Nitrozellulose

Eine definierte Menge der Probe wurde mittels einer Präzisionspipette direkt – unter Umgehung einer elektrophoretischen Auftrennung - auf die Nitrozellulose-Membran aufgetropft, getrocknet und weiter nach 3.7.6. verfahren.

3.7.5 Immunoreplika

Nach Blocken der unspezifischen Proteinbindungsstellen für eine Stunde bei Raumtemperatur mit Blocklösung erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper bei 4°C für mindestens 12 h in Antikörper-Lösung. Ungebundene Antikörper wurden mit Blocklösung 4x 15 min abgewaschen. Die Inkubation mit dem an Meerrettich-Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 erfolgte bei Raumtemperatur für 1 Stunde in Antikörper-Lösung (siehe Kapitel 2.3.5). Anschließend wurden die Membranstreifen 3x 10 min in TS-Puffer (siehe Kapitel 2.3.5) gewaschen. Alle Inkubations- und Waschschrte wurden auf einem Schüttler durchgeführt. Zur Aktivierung der Meerrettich-Peroxidase wurden die Membranstreifen für 1 min mit ECL-Lösung benetzt und in der Dunkelkammer ein ECL-Film aufgelegt. An den Stellen antikörpermarkierter Proteinbanden färbte sich der Film durch ausgesendetes Licht (Chemilumineszens) nach seiner Entwicklung schwarz.

3.7.6 Semiquantifizierung immundetektierter Proteine

Um eine zahlengestützte Aussage des Gehaltes an gesuchtem Protein in der Probe treffen zu können, wurde bei jeder Immunoreplika-Analyse zusätzlich ein sogenanntes Referenzprotein (Synaptobrevin) detektiert. Synaptobrevin – ein synaptisches Protein an der präsynaptischen Membran – wird bereits embryonal exprimiert und zeigt keine Unterschiede zwischen BDNF^{+/+} und BDNF^{-/-} Mäusen [Becher et al., 1999].

Mit Hilfe einer speziellen Software – TINA, Version 2.09g - wurde nach Einscannen des Films der Grad der Schwarzfärbung (optische Dichte, OD) der einzelnen Banden vermessen und das Verhältnis zwischen Synaptobrevin und dem gesuchten Protein ermittelt. Dies ermöglichte den Vergleich der verschiedenen Proben miteinander und die grafische Darstellung.

Bei Proteinen, die durch direktes Aufbringen der Probe auf Nitrozellulose-Membran immundetektiert wurden, erfolgte die Auswertung ebenfalls mit der oben genannten Software.