

## **2 Material und Methoden**

### 2.1 Der experimentelle Aufbau

- **Experiment 1:**

**Die Auswirkung einer reizreichen Lebensumgebung auf die Neurogenese und die Morphologie des Moosfasertraktes**

Das Leben in einer reizreichen Umgebung ist schon seit langem dafür bekannt, die Plastizität neuroanatomischer Strukturen zu induzieren (Rosenzweig 1966; Rosenzweig and Bennett 1996). Der Reizreichtum besteht darin, dass die Tiere in größeren Käfigen mehr Möglichkeit zur physischen Aktivität haben. Wechselnde Objekte und Tunnelsystemen und das Leben in größeren Gruppen bieten mehr Möglichkeit zur Exploration und sozialen Interaktion. Kempermann und Kollegen konnten zeigen, dass diese reizreichen Lebensbedingungen, die sich durch die Kombination von komplexer unbelebter und sozialer Stimulation gestaltet, die Zahl der neugeborenen Neuronen und deren Überleben steigert (Kempermann, Kuhn et al. 1997). Im hier dargestellten Experiment wurde der Effekt dieser Lebensbedingungen auf die Moosfaserverteilung untersucht.

- **Experiment 2:**

**Auswirkungen einer durch epileptische Aktivität maximal stimulierten Neurogenese auf die Morphologie des Moosfasertraktes zu verschiedenen Zeitpunkten nach Kainatinjektion**

Neurogenese wurde durch epileptische Aktivität, einem bekanntermaßen sehr starken Stimulus der Vorläuferzellproliferation, stimuliert. Ausgelöst wurden diese durch die intraperitoneale Injektion des Glutamatagonisten Kainat. Bisherige Studien konnten zeigen, dass durch Kainatinjektion bedingte Anfälle zu einer vielfachen Steigerung der Proliferation führen (Parent, Yu et al. 1997; Gray and Sundstrom 1998; Nakagawa, Aimi et al. 2000). Die Effekte dieser verstärkten Proliferation auf die Morphologie des Moosfasertraktes wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion von Kainat untersucht.

- **Experiment 3:**

**Untersuchung der Zusammenhänge zwischen Morphologie des Moosfasertraktes, adulter Neurogenese und Verhalten an rekombinant ingezüchteten Mäusestämmen**

Die Morphologie des Moosfasertraktes mehrerer rekombinant ingezüchteter Mäusestämmen und deren Progenitorstämme wurde untersucht, und die Ergebnisse dieser morphometrischen Untersuchung in Bezug zu Ergebnissen einer früheren Studie (siehe oben) gesetzt (Kempermann and Gage 2002). Mit Hilfe von Korrelationsanalysen konnten die Zusammenhänge zwischen der Morphologie des Moosfasertraktes, der adulten Neurogenese und dem Abschneiden im „Morris Wasserlabyrinth“ herausgestellt werden.

## **2.2 Versuchstiere**

Experiment 1: Das Hirngewebe lag zu Versuchsbeginn bereits vor. Die Hirnschnitte wurden für die Arbeit „Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice“ angefertigt (Brandt, Jessberger et al. 2003). Es konnte direkt immunhistochemischen Färbungen unterzogen werden.

Experiment 2: Für die Zeitreihenuntersuchung des Moosfasertraktes wurden insgesamt 48 weibliche Mäuse verwendet. Davon waren 36 Mäuse des Stamms C57BL/6, die von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen worden waren. 12 Mäuse waren transgene Tiere des Stamms C57BL/6, die ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) unter Kontrolle der neuralen Enhancerregion des Nestin-Promoters exprimieren. Das Alter der Mäuse betrug zu Beginn des Experiments zwischen 8 und 10 Wochen.

Experiment 3: Das Hirngewebe lag zu Versuchsbeginn bereit vor. Ein Teil des Gewebes wurde im Rahmen der Arbeit „Genetic determinants of adult hippocampal neurogenesis correlate with acquisition, but not probe trial performance, in the water maze task“ (Kempermann and Gage 2002) verarbeitet und ausgewertet. Es konnte direkt immunhistochemischen

Färbungen unterzogen werden. Es wurden 67 Mäuse von 13 verschiedenen Inzuchtstämmen verwendet. Die Progenitorstämme waren C57BL/6 und DBA, aus denen in den 1970er Jahren die rekombinanten Inzuchtstämme des Satzes BXD gezüchtet worden waren.

### **2.2.1** *Exkurs: Rekombinante Inzuchtstämme*

Das Zuchtschema zur Erzeugung rekombinanter Inzuchtstämme (RI) beginnt mit einem Outcrossing zwischen zwei bekannten Inzuchtstämmen, die als Progenitorstämme bezeichnet werden. In diesem Fall waren die Progenitorstämme C57BL/6 und DBA. Die resultierenden F1-Hybriden werden untereinander verpaart (Intercrossing), um eine große Anzahl von F2-Tieren zu erzeugen. Die F2-Tiere werden nun jeweils in zufälliger Weise miteinander verpaart. Jedes Paar dient dabei als Begründer eines neuen Inzuchtstammes. Folglich müssen die Nachkommen jedes gesetzten F2-Paares getrennt gehalten werden. Jeweils zwei dieser Tiere werden in zufälliger Weise ausgesucht, um die erste Generation einer konsekutiven Bruder x Schwester Inzuchtung zu begründen. Zwanzig aufeinander folgende Generationen Vollgeschwisterverpaarung müssen mit den Nachkommen jedes einzelnen F2-Paares durchgeführt werden, um den resultierenden Stamm als RI-Stamm bezeichnen zu können. Das beschriebene Zuchtschema wird für eine bestimmte Kombination an Progenitorstämmen eine breite Palette neuer RI-Stämme erzeugen. Unterschiedliche RI-Stämme, die mit denselben Progenitorstämmen erzeugt wurden, werden denselben RI-Stammsets zugesprochen. Jeder Stamm eines bestimmten RI-Sets wird vielfach rekombinierte Chromosomen tragen, die jeweils aus Fragmenten beider Progenitorstämme zusammengesetzt sind. Wichtigerweise trägt jeder einzelne Stamm des RI-Sets ein einheitliches Muster an Rekombinationen, das bei der weiteren Propagierung des Stammes durch Vollgeschwisterpaarung stabil vererbt wird (Taylor 1989; Silver 1995).

## 2.3 Versuchsaufbau und –bedingungen

### 2.3.1 Experimentelles Design

#### Experiment 1

Die Tiere wurden zufällig zwei unterschiedlichen experimentellen Bedingungen zugeordnet. Diese unterschieden sich in den Lebensbedingungen. Die Tiere der Enriched-Gruppe lebte in einer reizreichen Umgebung, Tiere der Kontrollgruppe unter Standardlaborbedingungen (siehe unten).

#### Experiment 2

Die Tiere wurden zufällig ausgewählt und zwei unterschiedlichen experimentellen Bedingungen ausgesetzt. Tiere der Anfall-Gruppe erhielten eine intraperitoneale Injektion des Glutamatagonisten Kainat (KA, Sigma). Die Dosis betrug 35 mg/kg. Zwischen 10 und 25 Minuten nach der Injektion entwickelte sich bei den Tieren ein Status epilepticus mit tonisch-klonischen Anfallserscheinungen. Die epileptische Aktivität dauerte zwischen 30 und 60 Minuten an. Danach wurde keine wiederkehrende Anfallsaktivität beobachtet. Tiere der Kontroll-Gruppe erhielten hingegen eine Injektion steriler physiologischer Kochsalzlösung. Nach dieser Injektion wurden die Tiere zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Gruppe 1: 7 Tage, Gruppe 2: 15 Tage und Gruppe 3: 28 Tage) perfundiert. Jeweils 24 Stunden, bevor die Tiere getötet wurden, erhielten sie eine einmalige Injektion des Thymidinanalogons BrdU.

Gruppe 1 bestand aus 12 weiblichen Mäusen. Sechs Tiere wurden zufällig der Kontrollgruppe und sechs Tiere der Anfallsgruppe zugeordnet. Ein Tier starb während des Anfalls. Gruppe 2 bestand aus 18 Tieren. Ebenso wie in Gruppe 1 wurden die Tiere zufällig den unterschiedlichen experimentellen Bedingungen zugeordnet (Kontrollgruppe: N = 9, Anfallgruppe N = 9). Gruppe 3 bestand aus 18 Tieren. 12 Tiere wurden der Anfallgruppe zugeordnet, sechs der Kontrollgruppe. Drei Tiere starben während der Krampfanfälle.

### Experiment 3

Bei allen Tieren wurde die Größe und Verteilung der Unterfelder des Moosfasertraktes analysiert. Die resultierenden Daten konnten mit Hilfe von Korrelationsanalysen zu bereits vorhandenen Daten zu den Zahlen der Neurogenese und dem Abschneiden im Morris Wasserlabyrinthtest in Bezug gesetzt werden (Kempermann and Gage 2002).

#### *2.3.2 Allgemeine Tierhaltungsbedingungen*

##### Experiment 1

Wie in 2.2 bereits beschrieben, lag das Gewebe dieses Experiments bereits vor.

Die Tiere wurden zwei unterschiedlichen Lebensbedingungen zugeordnet. Tiere der Enriched-Gruppe (ENR) wurden in geräumigen, eigens angefertigten Tierkäfigen mit einer Grundfläche von 80 cm x 80 cm (Werkstatt des MDC, Hr. Kagelmaker, MDC) gemeinsam gehalten (Kempermann, Kuhn et al. 1997). Objekte zur Exploration und Kunststoffröhren, zu einem Tunnelsystem in drei Dimensionen zusammengefügt, wurden im Tierkäfig platziert. Die räumliche Konfiguration des Tunnelsystems wurde 2-3mal wöchentlich verändert. Handelsübliche Papierhandtücher, die von den Tieren zum Nestbau benutzt werden, wurden 2-3-mal wöchentlich in den Käfig gelegt und die alten entfernt. Die Mäuse reagierten auf die Umgestaltung im Allgemeinen für eine kurze Zeitdauer mit einer deutlichen Steigerung ihrer explorativen Aktivität, während sie sich in der Zwischenzeit der Hellphasen vor allem in Nestern und im Tunnelsystem aufhielten. Sie waren für die gesamte Dauer des Experiments im selben Raum untergebracht und bekamen Wasser und Nahrung ad libitum.

Der Raum war abgedunkelt, die Hellphase mit künstlicher Beleuchtung währte von 6-18 Uhr, die Dunkelphase von 18-6 Uhr. Die Tierkäfige wurden wöchentlich mit Haushaltsreiniger und klarem Wasser gesäubert und die Streu ausgetauscht.

Tiere der Kontrollgruppe (CTL) lebten unter Standardlaborbedingungen. Sie wurden jeweils zu dritt oder zu viert in Standardtierkäfigen untergebracht, die

nur Streu und den üblichen Träger für Futter und Wasser enthielten Die Pflege und Ernährung der Mäuse der Kontrollgruppe unterschied sich nicht von derjenigen der anderen Gruppen.

### Experiment 2 und 3

Alle Mäuse lebten unter Standardbedingungen. Die Lebensbedingungen entsprachen denen der CTL des Experiments 1.

#### 2.3.3 *BrdU*

2-Bromo-5-desoxyuridin (BrdU, Sigma, Deisenhofen), ein Analogon des Thymidin, konkurriert nach systemischer Gabe während der Synthesephase des Zellzyklus mit Thymidin um den Einbau in die DNA. Die Bioverfügbarkeit ist kurz und liegt bei ungefähr zwei Stunden. Daher werden durch die Injektion von BrdU Zellen markiert, die sich in diesem Zeitfenster teilen. Die markierten Zellen können mit immunhistochemischen Färbemethoden sichtbar gemacht werden. (Nowakowski, Lewin et al. 1989; Kuhn, Dickinson-Anson et al. 1996).

## 2.4 Gewebepräparation

### 2.4.1 *Narkose*

Die Mäuse wurden durch Perfusion in tiefer Narkose nach einer intraperitoneal applizierten Überdosis des Injektionsnarkotikums Ketamin getötet.

### 2.4.2 *Perfusion*

Zur Auswaschung des in zentralnervösen Gefäßen befindlichen Blutes und zur Fixierung des Gewebes wurde der große Kreislauf der Mäuse mit frisch hergestelltem 4% Paraformaldehyd in kaltem 0,1M Phosphatpuffer gespült. Dazu wurden die Mäuse zunächst sternotomiert und der linke Ventrikel des Herzens mit einer Kanüle punktiert. Über ein angehängtes Infusionsbesteck

wurde mit Hilfe einer Pumpe zunächst physiologische Kochsalzlösung und dann 100ml der Paraformaldehydlösung über die Aorta durch den Kreislauf gespült.

#### *2.4.3 Entnahme des Gehirns*

Im Anschluss an die Perfusion wurden die Mäuse dekapitiert. Der Schädelknochen wurde durchschnitten und das komplette Gehirn aus der Schädelhöhle gehoben.

#### *2.4.4 Postfixation, Sucrose*

Die Gehirne wurden für 24 Stunden in Paraformaldehydlösung postfixiert. Danach wurden sie in 30 % Sucroslösung überführt und darin bei 4°C für weiter 48 Stunden belassen. Dadurch wird dem Gewebe osmotisch Wasser entzogen und eine Zerstörung der Zellen beim Einfrieren verhindert.

#### *2.4.5 Anfertigung von Schnittserien.*

Durch koronare Schnitte wurden den Gehirnen vor Anfertigung der Schnittserien das Kleinhirn und der Bulbus olfactorius entfernt. Die Gehirne wurden auf einem mit Trockeneis gekühlten Kupferblock tiefgefroren und mit dem Schlittenmikrotom (Leica) in 40 µm dicke Scheiben geschnitten. Die Schnittserien wurden in CPS-Puffer (bestehend aus 25% Ethylenglycol, 25% Glycerin and 0,05 M Phosphatpuffer) überführt und bei 4°C gekühlt aufbewahrt.

#### *2.4.6 Durchführung immunhistochemischer Färbemethoden*

Die immunhistochemische Färbung wurde als sogenannte „free-floating“ Technik durchgeführt. Dabei wurde die Hirnschnittserie eines Tiers in ein Netz überführt. Dieses Netz, in dem die Schnitte frei schwimmen, kann in die verschiedenen für die Färbung notwendigen Lösungen gesetzt werden. In diesen Experimenten wurden zwei unterschiedliche Varianten immunhistochemischer Färbemethoden durchgeführt. Zum einen die Immunfluoreszenzfärbung, deren spätere Betrachtung unter dem

Fluoreszenzmikroskop beziehungsweise unter dem konfokalen Lasermikroskop erfolgt. Zum anderen wurde die Peroxidase-Methode verwendet. Die Betrachtung des Reaktionsprodukts kann unter dem Lichtmikroskop erfolgen. Die einzelnen Schritte dieser Färbungstechniken werden im Folgenden aufgeführt:

Zunächst wurden die Schnitte für zweimal 5 Minuten in TRIS-gepufferter Kochsalzlösung (TBS) gewaschen. Die immunhistochemische Detektion von BrdU erfordert eine Vorbehandlung, wodurch die DNA denaturiert und eine Bindung zwischen anti-BrdU-Antikörpern und dem in die DNA integrierten BrdU ermöglicht wird. Dies wird durch eine dreißigminütige Inkubation des Gewebes in 2N HCl Lösung bei 37°C erreicht. Es folgten zwei Waschschrte, erst ein zehnminütiger in 0,1M Boratpuffer (pH 8,5, Raumtemperatur), dann ein sechzigminütiger in TBS-Pufferlösung, die etwa alle 5 Minuten ausgetauscht wurde. Um eine Bindung zwischen den Antikörpern und den intrazellulär lokalisierten Antigenen zu ermöglichen, müssen trennende lipophile Membranen zerstört werden. Dazu wurde das Detergens Triton X-100 verwendet. Um unspezifische Antikörperbindungen abzusättigen und damit den unspezifischen Hintergrund einer immunhistochemischen Färbung zu reduzieren, kann das Gewebe mit Serum der Spezies, aus welcher der Sekundärantikörper gewonnen wurde, hier vom Esel, vorbehandelt werden. Aus diesen Gründen ging der Antikörperinkubation eine 30 minütige Inkubation des Gewebes in TBS-plus (bestehend aus 96 Vol% TBS, 1 Vol% Triton X-100 10% und 3 Vol% Eselserum) voraus. Zur Antigendetektion wurden spezifische Antikörper gegen die weiter unten beschriebenen Antigene (Primärantikörper) verwendet. Die Antikörper wurden in TBS-plus verdünnt, und das Gewebe wurde in dieser Lösung bei 4°C für 24 Stunden (Peroxidase-Methode) beziehungsweise 48 Stunden (Immunfluoreszenzfärbung) unter ständigem Schütteln inkubiert. Nach der Auswaschung nicht spezifisch gebundener Primärantikörper mit TBS (2-mal 15 Minuten) und der Absättigung unspezifischer Bindungsplätze mit TBS-plus (30 Minuten Inkubation) wurde das Gewebe in Sekundärantikörper TBS-plus-Lösung überführt. Die Inkubation



erfolgte bei Raumtemperatur für 4 Stunden. Nicht spezifisch gebundene Sekundärantikörper wurden mit TBS ausgewaschen (8-mal 5 Minuten).

Bei der Fluoreszenzfärbetechnik können die an die Sekundärantikörper gebundenen fluoreszierenden Farbstoffe unmittelbar detektiert werden. Davor wurden die Gewebeschnitte auf einen beschichteten Objektträger aufgezogen und luftgetrocknet. Anschließend wurden sie, um ein vorzeitig Ausbleichen zu verhindern mit PVA-DABCO (10% Polyvinylalkohol und 25% Glycerin in TBS mit 2,5% Diazabicyclo-Oktan) überschichtet und mit einem Deckgläschen abgedeckt.

Die Peroxidasemethode verwendet keine fluoreszierenden, sondern biotinylierte Sekundärantikörper. Die große Affinität des Biotins zu Avidin wird genutzt, um an den Sekundärantikörper eine Peroxidase zu koppeln (ABC-Kit, Vectastain, VectorLabs). Dieser Peroxidase wird als Chromogen Diaminobenzidin (DAB, Sigma) mit Nickel als Reaktionssubstrat angeboten. Das entstandene Reaktionsprodukt ist von braunschwarzer Farbe.

#### *2.4.7 Verwendete Antikörper*

##### *2.4.7.1 Primärantikörper*

Zur spezifischen Bindung von BrdU wurde ein monoklonaler Antikörper aus der Ratte in einer Verdünnung von 1:500 verwendet (Harlan Seralab, Leicestershire, England). NeuN (Neuronal Nuclei) ist ein neuronales Protein in nukleärer Lokalisation und gilt als spezifischer Marker reifer Nervenzellen (Mullen, Buck et al. 1992). Es wurde ein monoklonaler Maus-Antikörper gegen NeuN (Chemicon, Hofheim, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:100 benutzt. Zur Bindung von Calretinin, einem kalziumbindenden Protein, welches postmitotisch in unreifen Körnerzellen exprimiert wird, wurden folgende Primärantikörper aus Maus (Swant, 1:250), Ziege (Chemicon, Hofheim, Deutschland; 1:250) und Kaninchen (Swant, 1:250) verwendet. Zur Visualisierung des Moosfasertraktes wurde ein Antikörper aus dem Kaninchen gegen Synaptoporin in der Verdünnung 1:50 verwendet (SynapticSystems).

#### 2.4.7.2 Sekundärantikörper

Die für die Immunfluoreszenz verwendeten Sekundärantikörper wurden von den Jackson Laboratorien (Dianova, Hamburg) bezogen und in einer Verdünnung von 1:250 verwendet. Benutzt wurden Antikörper aus Eselserum, die entweder gegen das Fc-Fragment des Antikörpern aus Ratte, Maus oder Kaninchen gerichtet und entweder mit FITC, Rhodamine-X oder CY-5 konjugiert sind. Für die Peroxidase Methode wurden biotinylierte Antikörper verwendet (Dianova, Hamburg).

### 2.5 Morphometrie des Moosfasertraktes

Durch die immunhistochemische Färbung gegen das präsynaptische Vesikelprotein Synaptoporin wurde der Moosfasertrakt sichtbar gemacht. Es wurde die Größe dreier Moosfaserbereiche (Hilus, suprapyramidale Moosfaserprojektion und infrapyramidale Moosfaserprojektion) bestimmt. Diese wurden an jedem 6. Schnitt bei Experiment 1, 3 und zum Zeitpunkt T1 des Experiments 2 und an jedem 4. Schnitt zum Zeitpunkt T2 und T3 des Experiments 2 analysiert. Zur Durchführung der morphometrischen Bestimmung wurde ein Lichtmikroskop (Leica) mit einer Kamera (Hitachi) verbunden und an einen PC angeschlossen. Die Grenzen des auf den Bildschirm projizierten Bildes des Moosfaserfeldes wurden unter Verwendung der Software StereoInvestigator (Microbrightfield) umfahren, welche anschließend die Berechnung der markierten Fläche durchführte. Um das Volumen der jeweiligen Moosfaserprojektion zu bestimmen, wurde die Summe der gemessenen Flächengrößen erst mit 40 (der Dicke des histologischen Schnitts) und dann mit 4 (T2, T3) oder 6 (T1, Experiment 1 und 3) multipliziert, da jeder vierte beziehungsweise sechste Schnitt ausgemessen wurde.

### 2.6 Statistik

Die statistische Auswertungen wurden mit Hilfe der Software StatView 5.0.1 für Macintosh (SAS Institute) durchgeführt. Unterschiede zwischen Gruppen

wurden bei einem P-Wert  $< 0,05$  als signifikant angesehen. Alle im Text angegebenen Zahlen, sind der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler.