

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien und Reagenzien

Material	Hersteller
ABC-Elite Kit Elite A: Avidin H Elite B: Biotinyl - Peroxydase	Vector/Camon (Wiesbaden, D)
Ammoniumnickelsulfat	Sigma (München, D)
BSA Rinderserum Albumin	Sigma (St.Louis, USA)
Diaminobenzidin (DAB)	Sigma (München, D)
Eisessig	Roth (Karlsruhe, D)
Ethanol, vergällt	Merck (Darmstadt, D)
Ethanol, unvergällt	Merck (Darmstadt, D)
Entellan <sup>®</sup>	Merck (Darmstadt, D)
Gelatine	Merck (Darmstadt, D)
Glutaraldehyd	Fluka (Neu-Ulm, D)
Heparin	Ratiopharm (Ulm, D)
Imidazol	Sigma (St.Louis, USA)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt, D)

Kaliumchromsulfat-12-hydrat	Merck (Darmstadt, D)
Ketavet Ò (Ketamin)	Curamed Pharma GmbH (Karlsruhe, D)
Longasteril <sup>®</sup> 70 mit Elektrolyten	Fresenius Kabi (Bad Homburg, D)
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Sigma (Heidelberg, D)
Natriumborhydrid (NaBH <sub>4</sub> )	Sigma (St.Louis, USA)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt, D)
Natriumdihydrogensulfat	Merck (Darmstadt, D)
Natriumhydroxid	Merck (Darmstadt, D)
Paraformaldehyd	Merck (Darmstadt, D)
Pferdeserum	Biochrom (Berlin, D)
Phenylhydrazin	Merck-Schuchardt (München, D)
Rompun	Bayer (Leverkusen, D)
Saccharose	Merck (Darmstadt, D)
Thimerosal	Sigma (St.Louis, USA)
Trishydroxymethylaminomethan	Sigma (St.Louis, USA)
Triton-X-100	Serva (Heidelberg, D)
Wasserstoffperoxid (30%)	Merck (Darmstadt, D)

Ziegenserum	Interchem
-------------	-----------

## 2.2 Puffer und Lösungen

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

Ammoniumnickelsulfat	3%	Ammoniumnickelsulfat in dH <sub>2</sub> O gelöst
----------------------	----	--

1. Antikörper-Lösung	10%	NGS in PBS
	0,3% v/v	Triton-X-100
	1% v/v	Natriumazid (10% in dH <sub>2</sub> O)
	1% v/v	Thimerosal (1% in dH <sub>2</sub> O)

2. Antikörper-Lösung	0,2% w/v	Rinderserum Albumin in PBS
	0,3% v/v	Triton-X-100
	1% v/v	Natriumazid (10% in dH <sub>2</sub> O)

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

DAB-Stocklösung	0,05 % w/v	DAB gelöst in dH <sub>2</sub> O
-----------------	------------	---------------------------------

Gefrierschutzlösung	30%	Saccharose in PBS
---------------------	-----	-------------------

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

Imidazol-Stocklösung	1M	Imidazol gelöst in dH <sub>2</sub> O
		auf pH 7,6 einstellen

Inkubationslösung	500 µl	Tris-Stocklösung ad 10 ml dH <sub>2</sub> O
	100 µl	Imidazol-Stocklösung
	100 µl	DAB-Stocklösung
	10%	Ammoniumnickelsulfat
	5%	Wasserstoffperoxid (0,3%)

PBS - Stammlösung	200g	Natriumchlorid (MW 58,4)
	5g	Kaliumchlorid (MW 74,5)
	35g	Natriumdihydrogenphosphat x H <sub>2</sub> O (MW 137,99)
	ca. 5g	Natriumhydroxid (MW 40,0)
	ca. 2l	Aqua bidest.
		auf pH 6,8 einstellen

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

Tris-Stocklösung	1 M	Trishydroxymethylaminomethan gelöst in dH <sub>2</sub> O
		auf pH 7,6 einstellen

Vorinkubationslösung	500 µl	Tris-Stocklösung auf 10 ml dH <sub>2</sub> O
	100 µl	Imidazol-Stocklösung
	100 µl	DAB-Stocklösung

**Perfusionslösungen**

Vorspüllösung		Longasteril®
---------------	--	--------------

Fixierungslösung	40 g	Paraformaldehyd
	750 ml	dH <sub>2</sub> O
	13,8 g	Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat
	2 ml	Glutaraldehyd 25%
	166,5 ml	gesättigte Pikrinsäure
	1 l	mit dH <sub>2</sub> O auffüllen
		auf pH 7,38 einstellen, filtrieren

Nachspüllösung	13,8 g	Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat
	50 g	Saccharose
	1 l	mit dH <sub>2</sub> O auffüllen
		auf pH 7,38 einstellen, filtrieren

**2.3 Verwendete Antikörper****2.3.1 Primäre Antikörper**

Antikörper		Verdünnung	Bezugsquelle
Anti-Calbindin D	Monoklonal Maus	1:1000	Sigma (St. Louis, USA)
Anti-Calretinin	Polyklonal Kaninchen	1:1000	Swant (Bellinzona, CH)
Anti-Glutamate-Decarboxylase 67	Polyklonal Kaninchen	1:200	Biotrend (Köln, D)

(GAD67)			
Anti-Neuropeptid Y (NPY)	Polyklonal Kaninchen	1:1000	Sigma (St. Louis, USA)
Anti-Parvalbumin	Polyklonal Kaninchen	1:1000	Swant (Bellinzona, CH)
Anti-Somatostatin	Polyklonal Kaninchen	1:2000	Dako (Carpinteria, USA)

### 2.3.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper		Verdünnung	Bezugsquelle
Pferd anti-Maus IgG- Biotiniliert		1:500	Vector (Burlingame, USA)
Ziege anti-Kaninchen IgG- Biotiniliert		1:500	Vector (Burlingame, USA)

## 2.4 Geräte und Apparaturen

CCD-Kamera, Leica

Kryostat, Frigocut 2800, Reichert-Jung

Laborwaagen, Sartorius, Göttingen

Mikroskop, Leica, Typ DMLB, Leica-Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar

pH-Meter, WTW, Modell 537, Weilheim

## 2.5 Versuchstiere

Für die in-situ-Untersuchungen wurde ein transgener Mäusestamm eines gemischten 129SWv, BALB/c und C57BL/6 Hintergrundes, bei dem das Gen für Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF) deletiert wurde [Ernfors et al, 1994], mit dem entsprechenden Wildtyp verglichen. Zur besseren Züchtung wurden CD1 Mäuse, wie von Pozzo-Miller et al. [1999] beschrieben, eingekreuzt. Gezüchtet und freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden diese Mäuse – im weiteren bezeichnet als BDNF  $-/-$  für die homozygot gendefizienten, BDNF  $+/-$  für die heterozygoten und BDNF  $+/+$  für den Wildtyp Mäuse - vom Institut der Physiologie der Humboldt Universität Berlin. Für die Züchtung wurden BDNF  $+/-$  Mäuse verpaart, da die *BDNF* $-/-$  Mäuse das geschlechtsfähige Alter nicht erreichten. Ab Beginn der zweiten Lebenswoche zeigten die *BDNF* $-/-$  Mäuse verglichen mit ihren gesunden Geschwistertieren eine Wachstumsretardierung. Die Knock-out Mäuse litten unter Koordinationsstörungen, hyperaktiven Phasen mit Kreisbewegungen und wiederholten tonischen Krampfanfällen. Die Lebenserwartung betrug maximal 21 Tage; daher wurde ein relativ früher Zeitpunkt der Hirnentnahme gewählt. Die heterozygoten Mäuse waren fertil und zeigten keine offensichtlichen Abnormalitäten. Die Haltung der 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 der Geburt wurde als P0 (Postnataltag 0) betrachtet. Die Mäuse wurden entsprechend Henneberger et al. [2000] vor Versuchsbeginn genotypisiert.



**Abbildung 3 - Foto eines BDNF  $+/+$  (braun) und  $-/-$  (weiß) P16 Geschwisterpaares**  
*Die BDNF Knock-out Mäuse sind eindeutig kleiner als ihre Wildtyp Geschwister*

## 2.6 Durchführung der Experimente - Immunhistochemie

### 2.6.1 Aufarbeitung der Gehirne

Für die immunhistochemischen Untersuchungen dienten 15 bis 16 Tage alte Mäuse des Genotyps *BDNF*  $-/-$  und der entsprechende Wildtyp. Die Gehirne wurden zur Aufbereitung wegen des großen Hirnvolumens mittels Perfusion fixiert. Hierzu wurden die Mäuse mit 0,1mg Ketamin 500 pro Gramm Körpergewicht (KGW) + 0,1  $\mu$ l Xylazin/g KGW narkotisiert. Die Narkoselösung wurde intraperitoneal injiziert und gleichzeitig Heparin (5 IE/g KGW; intraperitoneal) zur Vermeidung vorzeitiger Blutgerinnung gegeben. Der Brustkorb wurde danach 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 Perfusion erfolgte wie nachstehend angegeben:

<b>Zeitdauer</b>	<b>Lösung</b>	<b>Druck</b>
5 sec	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.

Nun wurden die Gehirne herauspräpariert, anschließend 4 bis 6 Stunden in 4% Paraformaldehydlösung fixiert und in die Gefrierschutzlösung überführt.

Nach Sättigung der Gehirne mit der Gefrierschutzlösung - zu erkennen am Absinken - konnten die Gehirne aufgefroren werden. Dies erfolgte in Hexan als Einfriermedium, das mit Hilfe von flüssigem Stickstoff auf eine Temperatur von  $-50^{\circ}\text{C}$  bis  $-60^{\circ}\text{C}$  gekühlt wurde. Jedes Gehirn wurde vorher auf ein entsprechend zugeschnittenes 1,5 mm dickes Korkplättchen in Position gebracht. Die Aufbewahrung der Gehirne erfolgte bei  $-25^{\circ}\text{C}$ .

### **2.6.2 Beschichtung der Objektträger**

Vorgereinigte Objektträger wurden für 3 Minuten in warme Gelatinelösung getaucht und anschließend 1 bis 2 Tage staubfrei bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Dabei wurden die Objektträger zum Abfließen der Lösung schräg gestellt.

### **2.6.3 ABC-DAB/Ni-Technik**

Die tiefgefrorenen Gehirne wurden in einer Dicke von 40 µm geschnitten und in PBS aufgenommen. Hierbei wurde 24-Loch-Platten verwendet.

Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Schnitte in 1% Natriumborhydrid für 5 Minuten reduziert und sofort erneut 2 x 15 Minuten in PBS gewaschen.

Nun wurde zum Blocken unspezifischer Proteinbindungsstellen und zur Zerstörung der endogenen Peroxidaseaktivität für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit Blocklösung inkubiert. Für die Blocklösung wurde je nach Spezies, in dem der Sekundärantikörper generiert wurde, Ziegenserum bzw. Pferdeserum verwendet. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper in der entsprechenden Verdünnung in der 1. Antikörperlösung für 36 Stunden bei 4°C.

Nach viermaligem Waschen mit PBS und Vorinkubation für eine Stunde in PBS-A bei Raumtemperatur wurden die Schnitte mit biotiniliertem Zweitantikörper in einer Verdünnung von 1:500 in der 2. Antikörperlösung über Nacht bei 4°C inkubiert.

Einem Waschschrift (4 x 5 Minuten) mit PBS zum Entfernen der ungebundenen Antikörper folgte eine einstündige Vorinkubation mit PBS-A bei Raumtemperatur und anschließend die Inkubation mit ABC-Komplex für 4 bis 6 Stunden ebenfalls bei Raumtemperatur.

Zur Entwicklung der Farbreaktion wurden die Schnitte nach Auswaschen des ABC-Komplexes mit PBS (4 x 5 Minuten) mit Vorinkubationslösung vorbehandelt. Nach 15 Minuten wurde Ammoniumnickelsulfat-Lösung (50 µl / 500 µl) zugegeben und die Reaktion mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gestartet (0,3%ig; 25 µl / 500 µl). Nach einer Entwicklungszeit von bis zu 3 Minuten wurde die Reaktion mit PBS gestoppt und anschließend 2x mit PBS gewaschen.

Die Schnitte wurden aus PBS mit Hilfe von feinen Pinseln auf Chromgelatinebeschichtete Objektträger aufgezogen. Nach Lufttrocknung für ca. 30 Minuten erfolgte eine Entwässerung der Schnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%,

90%, 96%, 2 x 100% für jeweils eine Minute) und in Xylol für 10 Minuten. Danach wurden die Schnitte mit Entellan<sup>®</sup> eingedeckt.

#### **2.6.4 Lichtmikroskopische Auswertung**

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Lichtmikroskops.

Eine angeschlossene Leica-Kamera ermöglichte die fotografische Dokumentation.

### **2.7 Quantitative Auswertung definierter neuronaler Subpopulationen**

Die einzelnen Hippocampusregionen Hilus, CA1, CA2 und CA3 Region und Subiculum wurden nach der jeweiligen immunzytochemischen Aufarbeitung untersucht, wobei coronale Serienschnitte von wenigstens 3 oder auch 4 Geschwisterpaaren verwendet wurden. Die verschiedenen Subtypen von Nervenzellen wurden in vergleichbaren Regionen von 90 000  $\mu\text{m}^2$  von BDNF -/- und Wildtyp Gehirnen anhand von 200fach vergrößerten Photographien quantifiziert. Im Bereich des Hilus des Hippocampus war die auszuzählende Fläche 45 000  $\mu\text{m}^2$  groß. Es wurden 12 Schnitte pro Gehirn und Region analysiert. Zellen, die immunhistologisch mit Parvalbumin markiert wurden waren in der CA1 und CA3 Region des Hippocampus so unregelmäßig verteilt, dass beide Regionen gemeinsam ausgezählt wurden.

### **2.8 Datenanalyse**

Die Daten werden als Mittelwert  $\pm$  der Standardabweichung gezeigt. Zur statistischen Analyse wurde Student's t Test verwandt. Ein p-Wert  $< 0,05$  wird als signifikant betrachtet.