

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Die heterozygoten Zuchtpaare der in dieser Arbeit vorgestellten Tiere entstammen den Jackson Laboratories (Bar Harbour, Maine). Fortgesetzt wurde die Zucht homozygoter Mutanten am Institut für Physiologie der Freien Universität Berlin bei natürlichem Tag-Nacht-Rhythmus sowie Wasser, Futter (pellets Altromin 1314) und Obst (Äpfel, Bananen, Gurken) ad libitum. Die Käfighaltung erfolgte hinsichtlich der Populationsdichte wie auch der Reinigungszeiten unter absolut identischen Bedingungen.

Die Gesamtzahl der in die Experimente einbezogenen Versuchstiere betrug 50, wovon 18 auf *nr*-Mutanten, 22 auf *Lc*-Mutanten, 6 auf *sg*-Mutanten und 4 auf *nr*-Wildtypen entfielen.

Alle an den Tieren vorgenommenen Eingriffe entsprachen den gesetzlichen Richtlinien und waren genehmigt (Aktenzeichen der behördlichen Genehmigung L 0287/93, angezeigt am 17.10.1993).

Tabelle 2.1 gibt Auskunft über Anzahl und Art der Mutanten, die auf die einzelnen Antigennachweise hin untersucht wurden. In die Auswertung miteinbezogen wurden Wildtypen des Stammes B6CBA, die von früheren Untersuchungen bereits zur Verfügung standen.

Tabelle 2.1: Versuchstiere

Versuchstiere	anti-Calbindin D-28k	anti-Parvalbumin
<i>nr/nr</i>	9	9
<i>Lc/+</i>	11	11
<i>sg/sg</i>	3	3
Wildtyp	2	2

Tab. 2.1: Anzahl der für die einzelnen immunocytochemischen Nachweismethoden verwendeten Tiere.

(*nr/nr* = Nervous-Mutante; *Lc/+* = Lurcher-Mutante; *sg/sg* = Staggerer-Mutante; anti-Calb = anti-Calbindin D-28k; anti-Parv = anti-Parvalbumin)

2.2 Antikörper

In den Untersuchungen wurden zwei verschiedene primäre Antikörper verwendet: anti-Calbindin D-28k (anti-Calb) und anti-Parvalbumin (anti-Parv). Bezogen wurden sie in Form eines lyophilisierten Pulvers.

2.2.1 anti-Calbindin D-28k

Anti-Calb ist ein monoklonaler Antikörper gegen das Calcium-bindende Protein Calb. Die Isolierung des Antigens erfolgte aus der Mukosa von Hühnerdarm (Wasserman & Taylor, 1966). Der Antikörper (Klon No. 300) ist ein Mäuse- Ig G, das durch Hybridisierung von Mäuse-Myelom-Zellen mit Milzzellen der Maus gewonnen wurde, nachdem man die Milzzellen zuvor mit Calb immunisierte. Der Vorteil dieses Klons ist, dass er keine Kreuzreaktivität mit anderen Calcium-bindenden Proteinen aufweist (Celio, 1990).

Bezogen wurde der Antikörper von Swiss Antibodies (Swant, Bellinzona, CH). Spezifikation und Potenz dieses Klons sind durch zahlreiche Tests gut belegt (Celio et al., 1990; Garcia-Segura et al., 1984; Kretsinger, 1981). Tabelle 2.2 zeigt die Inkubationsabfolge, mit der gleichbleibend qualitativ hochwertige Färbungen erzielt werden konnten.

Tabelle 2.2: anti-Calbindin D-28k

1. Antikörper	monoclonal mouse anti-Calb 1:6000
2. Antikörper	biotinylated rabbit anti-mouse 1:200
Komplex	Avidin Biotin HRP
Reaktion	DAB 3 min

Tab. 2.2: Inkubationsschritte zum immunocytochemischen Nachweis des Calcium-bindenden Proteins Calb. (DAB = Diaminobenzidin; HRP = Meerrettichperoxidase)

2.2.2 anti-Parvalbumin

Anti-Parv (Klon No. 235) ist ebenfalls ein monoklonaler Antikörper der Ig G Klasse, der gegen das Calcium-bindende Protein Parv gerichtet ist. Parv wurde aus Karpfenmuskulatur isoliert und mit Carbodiimide an Tetanustoxin gekoppelt. Der Antikörper stammt aus Mäusemilzzellen, die mit Myelomzellen fusioniert wurden (Celio et al., 1988). Die angewendete Methode entspricht der unter 2.2.1 beschriebenen.

Verwendet wurden Antikörper der Firma Swiss Antibodies (Swant, Bellinzona, CH), die ausgiebig spezifiziert sind (Celio et al., 1988).

Tabelle 2.3: anti-Parvalbumin

1. Antikörper	monoclonal mouse anti-Parv 1: 1000
2. Antikörper	biotinylated rabbit anti-mouse 1: 200
Komplex	Avidin Biotin HRP
Reaktion	DAB 3 min

Tab. 2.3: Inkubationsschritte zum immuncytochemischen Nachweis des Calcium-bindenden Proteins Parv. (DAB = Diaminobenzidin; HRP = Meerrettichperoxidase)

2.3 Immuncytochemie

2.3.1 Anästhesie

Die Anästhesie erfolgte durch die intraperitoneale Injektion einer letalen Dosis (1,75 g/kg Körpergewicht) Chloralhydrat (Merck, Darmstadt, D).

2.3.2 Perfusion

Das weitere Vorgehen erfolgte unter mikroskopischer Kontrolle (20-fache Vergrößerung). Initial wurden nach Freipräparation der intrathorakalen Organe 0,1 ml Heparin 25 000 (Liquemin, Roche) zur Gerinnungshemmung und 0,3 ml Natrium-Nitrit zur Vasodilatation intrakardial in den linken Ventrikel injiziert. Nach

Einschneiden des rechten Herzohres wurde die Perfusion mit auf 37 °C temperierter Saline begonnen und solange durchgeführt, bis kein Blutaustritt aus dem rechten Vorhof mehr zu erkennen war. Anschließend folgte die Fixierung mit einer 4%-igen Paraformaldehydlösung (Grundrezept siehe Appendix) ebenfalls über den linken Ventrikel. Erleichtert wurde die Perfusion durch den Einsatz eines Perfusors (B. Braun Melsungen AG, Typ 871162) , der die gleichmäßige Flußrate des Fixans gewährleistete. Das Perfusionsvolumen betrug 200 ml und die Zeit bei einer Geschwindigkeit des Perfusors von 601 ml/Stunde etwa 20 Minuten (min.). Während der Präparation und Perfusion musste sehr rasch vorgegangen werden, um die Herzaktion so lange wie möglich aufrechtzuerhalten. Nur durch eine intravitale Fixierung der Antigene können Artefakte, die durch postmortale Zellalterationen entstehen, vermieden werden.

Unmittelbar nach der Perfusion wurde das Gehirn unter dem Mikroskop (20-fache Vergrößerung) präpariert und bis zur Agareinbettung in Phosphatpuffer (PBS) (Grundrezept siehe Appendix) aufbewahrt.

2.3.3 Einbettung

Der Gehirnblock wurde zunächst manuell getrimmt und dann in Agar (Agar Agar Fluka, Rezept siehe Appendix) eingebettet, wodurch eine bessere Stabilität des Gewebes für den nachfolgenden Schneidevorgang erzielt werden konnte.

2.3.4 Vibratomschnitte

Die Schneidekammer des Vibratoms (Technical Products International, St. Louis, USA) wurde mit eisgekühltem PBS gefüllt und der Gehirnblock in die Vorrichtung eingespannt. Geschnitten wurde mit einer Geschwindigkeit von 0,6 mm/Sekunde und einer Vibrations-Frequenz von 60 Hz bei einer Vibrations-Amplitude von 0,8 mm. Die Schnitte wurden frei flottierend in einem mit PBS gefüllten Siebträger aufgefangen. Alle nachfolgenden Inkubationsschritte wurden ebenfalls an frei flottierenden Schnitten vorgenommen.

2.3.5 ABC-Methode

Diese Methode zählt zu den neueren Immunoperoxidase-Färbetechniken und zeichnet sich gegenüber anderen immunocytochemischen Methoden durch größere Sensitivität aus. Sie basiert auf der Fähigkeit des Glykoproteins Avidin, nichtimmunologisch vier Moleküle des Vitamins Biotin zu binden. Es werden drei Reagenzien verwendet: erster und zweiter Antikörper sowie der Strept-Avidin-Biotin-Komplex. Der erste Antikörper ist spezifisch für das Antigen und lokalisiert es. Der zweite Antikörper bindet an den ersten und ist dabei an Biotin gekoppelt. Das dritte Reagenz ist ein Komplex von an Avidin und Biotin konjugierter Meerrettichperoxidase (HRP). Die unbesetzten Stellen des Avidin-Moleküls gestatten das Binden an das Biotin des zweiten Antikörpers. Die Peroxidase und somit auch das Antigen werden mit Hilfe des Chromogens Diaminobenzidin (DAB) sichtbar gemacht. Die einzelnen Schritte sollen im Folgenden kurz dargestellt werden.

Inhibition endogener Peroxidase:

Das Chromogen kann nicht zwischen Avidin-Biotin gekoppelter und endogener, in der Gewebeprobe vorhandener Peroxidase unterscheiden, so dass hier Fehlmarkierungen entstehen können. Die höchste Aktivität endogener Peroxidase findet sich in roten und weißen Blutzellen. Sie kann durch massiven Substratüberschuß (H_2O_2) irreversibel gehemmt werden. Hierzu werden die Schnitte für 15 min. in 3% H_2O_2 und 10% Methanol in 0.01 M PBS-Puffer getaucht. Anschließend werden sie sorgfältig für 2x5 min. in Aqua destillata und danach für 5 min. in Trisphosphatpuffer (TBS) gewaschen.

Präinkubation:

Ziel der Präinkubation ist es, die unspezifische, das heißt die nicht auf Antigen-Antikörper Reaktionen beruhende Färbung des Gewebes zu verhindern. Die Ursache dieser Art von Färbung ist die unspezifische Bindung des ersten Antikörper an stark geladene Kollagen- und Bindegewebelemente der Gewebeprobe. Verhindert werden kann diese Adsorption durch Applikation einer Proteinlösung vor der Inkubation mit dem ersten Antikörper, wodurch die Ladungsträger neutralisiert werden. Diese Antikörper-freie Proteinlösung wird aus Serum der Tierspezies

gewonnen, aus der auch der zweite Antikörper stammt.

Man inkubiert für 30 min. in einer TBS-Lösung, die zuvor mit 10% Serum der Spezies des zweiten Antikörpers sowie 1% Rinderserumalbumin (BSA, Aurion) versetzt wurde. Danach werden die Schnitte direkt in den ersten Antikörper überführt.

Primärer Antikörper

Anhand zahlreicher Verdünnungsreihen mittels „checkerboard titration“ wurden diejenigen Verdünnungsstufen ermittelt, bei denen sich ein Maximum an spezifischer Färbung bei gleichzeitig minimaler Hintergrundfärbung erzielen läßt. Zu beachten ist dabei, dass nicht nur eine zu geringe Konzentration des ersten Antikörpers, sondern auch ein Überschuß zu verringerter Bindung des Antikörpers führen kann. Die optimalen Verdünnungen für die verwendeten Antikörper sind unter 2.2 erwähnt. Weitere Faktoren, die die Qualität des Ergebnisses wesentlich beeinflussen, sind Inkubationszeit und -temperatur. Die besten Ergebnisse wurden durch Inkubation über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer, die die Austrocknung der Schnitte verhindern sollte, erzielt. Zur gleichmäßigen Benetzung aller Schnittoberflächen wurde auf einem Rüttler inkubiert.

Kontrolle:

Parallel zu jedem Versuch wurden Kontrollen mitgeführt. Sie wurden nicht mit primärem Antikörper, sondern lediglich mit der entsprechenden Antiserenlösung (Rezept siehe Appendix) inkubiert. Dieser Kontrolllösung war Serum der Spezies, aus der der primäre Antikörper stammt, in identischer Verdünnung zugesetzt, um auch die unspezifische Bindung des zweiten Antikörpers an Serum des ersten Antikörpers trotz Präinkubation zu erfassen. Ziel war die Kontrolle der Spezifität, vor allem der Bindung des zweiten Antikörpers. Farbreaktionen in den Kontrollen können in erster Linie durch Bindung des zweiten Antikörpers bedingt sein, daneben auch durch unspezifische Proteinbindung sowie durch die Aktivität endogener Peroxidase. Nach der Inkubation wurden die Schnitte gründlich für 3x5 min. in TBS gewaschen, um überschüssige Antikörper zu eliminieren und dann erneut für 20 min. präinkubiert, um die Hintergrundfärbung weiter zu reduzieren.

Sekundärer Antikörper:

Mit dem zweiten, an Biotin gekoppelten Antikörper wurden die Schnitte für 60 min. auf dem Rüttler bei Zimmertemperatur inkubiert, was sich für eine gute Färbung als ausreichend erwiesen hat. Der zweite Antikörper wurde mit der gleichen Antiserenlösung wie der erste Antikörper verdünnt, jedoch in etwa zehn mal höherer Konzentration. Hierdurch sollte ein „cross-linking“ zweier primärer Antikörper durch die beiden F_{ab} Regionen des sekundären Antikörper ausgeschlossen werden.

Im Anschluß daran wurde wieder für 3x5 min. in TBS gewaschen und auch die Präinkubation für 20 min. wiederholt.

Strept-AB Komplex:

Dieser Komplex musste 30 min. vor seinem Einsatz angesetzt werden, damit sich genügend Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexe bilden konnten. Man ließ den Komplex dann ebenfalls für 30 min. inkubieren.

DAB-Reaktion (3,3 Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid):

Das Enzym Peroxidase bildet mit seinem Substrat Wasserstoffperoxid (H₂O₂) einen Komplex, wobei DAB als elektronenspendendes Chromogen fungiert. Das Enzym selbst wird dabei nicht verbraucht und kann mehrere Reaktionen katalysieren. Es kommt somit zur Amplifikation, was einen entscheidenden Vorteil enzymatischer Reaktionen gegenüber der Immunfluoreszenz darstellt. Die verwendete Lösung bestand aus 0,1% DAB und 0,01% H₂O₂ in TBS. Nach etwa 3 min. war die beabsichtigte Intensität erreicht und die weitere Farbreaktion wurde durch Waschen in TBS gestoppt. Da DAB karzinogen ist, musste es mit Natriumhypochlorid (Roth) neutralisiert werden.

Zuletzt wurden die Schnitte auf Gelatine-beschichtete Objektträger aufgezogen, auf einer Wärmeplatte bei mittlerer Temperatur getrocknet und anschließend unter Luftabschluß in Eukitt eingebettet.

2.4 Auswertung und Datenerhebung

2.4.1 Quantitativ

Bestimmung der Volumina der DCN

Verwendet wurden nur Präparate von Mutanten, bei denen alle konsekutiven Schnitte der DCN erhalten waren. Die Umrisse der DCN wurden bei einer Vergrößerung um den Faktor 10 durch das Objektiv und nochmals um den Faktor zehn durch das Okular mit Hilfe einer Camera lucida gezeichnet. Die Flächenbestimmung der so gewonnenen Zeichnungen erfolgte auf einem Digitalisieretablett, das über eine Rechereinheit (Kontron Mini-Mop, Zeiss) mit einem PC (HP, Software = Procom) verbunden war. Die Originalgröße der so ermittelten Flächen wurde anhand des Umrechnungsfaktors ($17424 \text{ mm}^2 = 1 \text{ mm}^2$) bestimmt. Über die Schnittdicke von $50 \mu\text{m}$ konnte das Volumen berechnet werden.

2.4.2 Statistik

Zur Bestimmung der Unterschiedswahrscheinlichkeit der Größenverteilung der Gesamtvolumina der DCN in Wildtypen und Mutanten wurde der Wilcoxon-Test für unabhängige Stichproben (Mann-Whitney-Test) ausgewählt.

Ergänzend wurde der T-Test durchgeführt.

2.4.3 Qualitativ

Photodokumentation

Alle dargestellten Mikrophotographien wurden mit Hilfe eines Zeiss Axioskop Mikroskops mit Photoeinrichtung aufgenommen. Die Dokumentation der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erfolgte anhand von Schwarz-Weiß-Mikrophotographien.