

**Neuronale Plastizität im Hippocampus der Maus:
Die Rolle von Neurotrophinen und Cytokinen**

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Dr. Christian Porsche
aus München

Würzburg 2006

Eingereicht am: 07.11.2006

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. M. J. Müller

1. Gutachter: Prof. Dr. M. Sendtner

2. Gutachter: Prof. Dr. M. Heisenberg

Tag des Promotionskolloquiums: 07.03.2007

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Meinen Eltern

„Jeder sollte mit seinem Leben
die Welt ein kleines bisschen
besser machen.“

aus „Little Lord Fauntleroy“
von Frances Hodgson Burnett

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	5
1.1	Neuronale Plastizität	5
1.2	Hippocampus.....	7
1.3	Neurotrophe Faktoren und ihre Rezeptoren.....	10
1.3.1	Brain-derived neurotrophic factor (BDNF).....	12
1.3.2	Ciliary neurotrophic factor (CNTF), Leukemia inhibitory factor (LIF) und Cardiotrophin-1 (CT-1).....	14
1.3.3	Insulin-like growth factors (IGFs).....	16
1.4	Fragestellung	17
2	MATERIAL UND METHODEN	19
2.1	MATERIAL	19
2.1.1	Mauslinien.....	19
2.1.2	Bakterienstämme	20
2.1.3	Chemikalien und Reagenzien.....	21
2.1.4	Medien und Kulturreagenzien.....	21
2.1.4.1	Medien und Reagenzien für die Zellkultur	21
2.1.4.2	Medien und Reagenzien für die Bakterienkultur	21
2.1.5	Kits	22
2.1.6	Antikörper	22
2.1.7	Enzyme.....	24
2.1.8	Oligonukleotide.....	25
2.1.9	Marker	26
2.1.10	Hilfsmittel und Geräte.....	26
2.1.10.1	Hilfsmittel.....	26
2.1.10.2	Geräte	26
2.1.11	Programme	27
2.2	METHODEN	28
2.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	28
2.2.1.1	DNA-Isolierung.....	28
2.2.1.2	DNA-Konzentrationsbestimmung.....	28
2.2.1.3	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	28
2.2.1.4	Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren.....	29
2.2.1.5	Klonieren.....	30
2.2.1.6	Transformieren.....	30

2.2.1.7	Kultivieren.....	31
2.2.1.8	Plasmid-Isolierung	31
2.2.1.9	Schneiden mit Restriktionsenzymen	31
2.2.1.10	Sequenzieren	31
2.2.1.11	RNA-Isolierung.....	32
2.2.1.12	RNA-Konzentrationsbestimmung.....	33
2.2.1.13	Reverse Transkriptase (RT)-PCR.....	33
2.2.2	Protein-assoziierte Techniken	34
2.2.2.1	Herstellung von Antikörpern.....	34
2.2.2.2	Herstellung eines Präadsorptionsserums	35
2.2.2.3	Herstellung der Proteinlysate	35
2.2.2.4	Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bradford.....	36
2.2.2.5	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	37
2.2.2.6	Immunpräzipitation	37
2.2.2.7	Western Blot.....	39
2.2.3	Mauslinien und Maus-assoziierte Techniken	43
2.2.3.1	Mauslinien und ihre Genotypisierung	43
2.2.3.2	Maus-assoziierte Techniken	47
2.2.4	Herstellung verschiedener Gewebeschnitte	51
2.2.4.1	Präparation von Vibratomschnitten.....	52
2.2.4.2	Präparation von Gefrierschnitten	52
2.2.4.3	Präparation von Paraffinschnitten	52
2.2.4.4	Schnittpräparation für die Elektronenmikroskopie	53
2.2.5	Zellkulturtechniken	55
2.2.5.1	Allgemeine Zellkulturtechniken.....	55
2.2.5.2	Kultivierung neuraler Stammzellen	56
2.2.5.3	Kultivierung kortikaler Vorläuferzellen.....	58
2.2.6	Gewebe- und Zellfärbungen.....	58
2.2.6.1	Immunhistochemie/Immuncytochemie.....	58
2.2.6.2	Sonstige Färbungen	62
2.2.7	Mikroskopie und Auswertung.....	63
2.2.7.1	Allgemeines.....	63
2.2.7.2	Bromdesoxyuridin (BrdU)-Quantifizierung im Hippocampus	64
2.2.7.3	BDNF-Intensitätsmessung im Hippocampus	65
2.2.8	Physiologische Methoden	66
2.2.8.1	Bestimmung der Long-Term Potentiation (LTP) und Long-Term Depression (LTD).....	66

3	ERGEBNISSE.....	69
3.1	Charakterisierung des BDNF-Immunsersums	69
3.1.1	BDNF-Nachweis mittels Western Blot	70
3.1.2	BDNF-Nachweis mittels Immunhistochemie	73
3.2	BDNF-Untersuchungen an CNTF-defizienten Mäusen.....	77
3.2.1	BDNF-Nachweis mittels Immunhistochemie	77
3.2.2	BDNF-Nachweis mittels Western Blot	80
3.2.3	BDNF-Nachweis mittels BDNF-ELISA.....	83
3.3	Elektrophysiologische Untersuchungen an CNTF-defizienten Mäusen	84
3.3.1	Bestimmung der LTP bei CNTF-defizienten Mäusen	84
3.3.2	Bestimmung der LTD bei CNTF-defizienten Mäusen.....	86
3.4	Anatomische Untersuchungen an CNTF-defizienten Mäusen.....	87
3.4.1	Elektronenmikroskopische Bilder	87
3.4.2	Lokalisierung von CNTF	90
3.5	BDNF-Untersuchungen an konditionalen IGF1-Rezeptor-defizienten Mäusen	94
3.5.1	BDNF-Nachweis mittels Immunhistochemie	94
3.5.2	BDNF-Nachweis und Quantifizierung im Western Blot	95
3.6	BDNF-Untersuchungen an geflochten BDNF-Mäusen	99
3.6.1	Kontrolle des Gen-Konstruktes	99
3.6.2	BDNF-Nachweis mittels Western Blot	100
3.7	Untersuchungen der Proliferation von neuronalen Stammzellen und neuronalen Vorläuferzellen <i>in vivo</i>	103
3.8	Untersuchungen der Differenzierung neuronaler Stammzellen von CNTF-defizienten Zellen <i>in vitro</i>	105
3.9	Untersuchungen der Differenzierung cortikaler Vorläuferzellen.....	107
3.9.1	Cortikale Vorläuferzell-Kulturen und ihr Zusammensetzung.....	107
3.9.2	Expression der Cytokine CNTF, LIF und CT-1 <i>in vitro</i> und <i>in</i> <i>vivo</i>	110
3.9.3	Einfluß von CT-1 auf die Differenzierung cortikaler Vorläufer- zell-Kulturen.....	112
3.9.4	Einfluß von CT-1 auf die cortikale Entwicklung <i>in vivo</i>	115
4	DISKUSSION	118
4.1	Qualität des BDNF-Immunsersums.....	118
4.2	Keine Veränderungen hippocampalen BDNFs in CNTF-defizienten Mäusen	118
4.3	Einschränkung von LTP und LTD an CNTF-defizienten Mäusen	119
4.4	Morphologische Untersuchungen am Hippocampus CNTF-defizienter Mäuse	121

4.5	Rolle der IGFs bei der hippocampalen BDNF-Hochregulation durch Training	122
4.6	Floxed BDNF-Maus mit vergleichbarem hippocampalen BDNF-Gehalt	122
4.7	Neuroneogenese-Diskrepanzen an CNTF- und LIF-defizienten Mäusen	123
4.8	Veränderte Differenzierung neuraler Stammzellen unter CNTF-Einfluß	124
4.9	CT-1 vermittelt Astrozytogenese <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	125
5	ZUSAMMENFASSUNG	126
6	SUMMARY	127
7	LITERATURVERZEICHNIS	128
8	ANHANG	136
	Abkürzungsverzeichnis	136
	Abbildungsverzeichnis	138
	Tabellenverzeichnis	140
	Danksagung	141
	Lebenslauf	142
	Publikationen	143
	Erklärung	145

1 EINLEITUNG

Charles Darwin's Selektionstheorie, die oft in dem Satz: „Surviving of the fittest.“ zusammengefasst wird, betont die Wichtigkeit einer guten Anpassung an die Umwelt. Dabei ist diese „Anpassung“ völlig ungerichtet. Individuen kommen zur Welt und allein die Umwelt entscheidet – beispielsweise anhand der Tarnung vor Fressfeinden oder der Attraktivität für Fortpflanzungspartner – welche davon geeigneter sind als andere. Diejenigen, die als geeigneter angesehen werden haben eine größere Chance zu überleben bzw. sich fortzupflanzen und damit ihre Gene in die nächste Generation zu tragen. Die Ungeeigneten können nichts daran ändern, dass sie ungefragte Eigenschaften aufweisen.

Eine stets gefragte Eigenschaft ist die Lernfähigkeit, die damit immer einen Selektionsvorteil darstellt. Durch Lernen können allgemein, aber im Rahmen der gegebenen Möglichkeiten die Chancen verbessert werden. Durch Erkennen des Zusammenhanges: „Schlechte Nahrung – Krankheit“ und anschließendem Meiden derselben können beispielsweise die Überlebenschancen erhöht werden. Lernen ist damit eine wichtige Möglichkeit, um eine zielgerichtete Anpassung an die Umwelt noch zu Lebzeiten zu realisieren.

1.1 Neuronale Plastizität

Die Fähigkeit des Nervensystems sich an die ständigen Veränderungen in der Umwelt jeweils möglichst optimal anzupassen wird als neuronale oder synaptische Plastizität bezeichnet. Die neuronale Plastizität und ihre Folgen sind dabei in verschiedenen Focusebenen ablesbar: im Verhalten der Lebewesen, wie auch auf zellulärer und molekularer Ebene.

Im Pavlov'schen Testansatz der klassischen Konditionierung wird ein bedingter Stimulus, auf den normalerweise kein Reflex folgt, derart mit einem unbedingten Stimulus gekoppelt, dass bei Verabreichung des bedingten Stimulus die Reflexauslösung möglich ist. Ob der Reflex auch durch den bedingten Stimulus alleine ausgelöst wird, ist dabei vom jeweiligen Grad der Synchronizität der beiden Stimuli abhängig.

Die aktivitätsabhängige Modulation führt auf zellulärer Ebene beispielsweise zu einem Auf- und Abbau von Nervenzellverbindungen (Nägerl, U.V. et al. 2004). Derartige zelluläre Umbauprozesse werden dabei durch verschiedene Kaskaden auf molekularer Ebene initiiert, wobei diese Adaptation präsynaptische, perisynaptische und postsynaptische Komponenten beinhaltet.

Neuronale Plastizität ist dabei nicht nur während der Entwicklung, also bei Aufbau und Selektion eines geeigneten neuronalen Netzwerkes, grundlegend, sondern spielt auch im weiteren Verlauf des Lebens eine wichtige Rolle, da durch sie die Fähigkeit zu Lernen und zur Ausbildung eines Gedächtnisses erst ermöglicht wird.

Der spätere Nobelpreisträger Eric Kandel konnte an der Meeresschnecke *Aplysia californica* einige grundlegende Mechanismen der Ausbildung von Kurz- und Langzeitgedächtnis aufdecken, die auch auf Säugetiere übertragbar sind (Antonov, I. et al. 2003).

Kandel untersuchte dabei zunächst einfache Reflexe: so führte beispielsweise ein taktile Reiz an Siphonhaut oder Mantelrand der Schnecke jeweils zum Rückzug der Kiemen. Durch wiederholte Verabreichung des gleichen harmlosen, taktilen Reizes wurde ein Gewöhnungseffekt (Habituation) erreicht, d.h. auf den Reiz erfolgte nur noch eine abgeschwächte Reaktion. Andererseits wurde die Schnecke durch einen Elektroschock am Schwanz derart in allgemeine Alarmbereitschaft versetzt (Sensibilisierung), dass ein nachfolgender harmloser, taktile Reiz zu einem deutlich verstärkten Kiemenrückzug führte. Durch Kombination verschiedener Reize gelang es Kandel sogar ein Modell der klassischen Konditionierung an *Aplysia* nachzuweisen. Bei der Analyse der molekularen Vorgänge, die diesen Verhaltensänderungen zugrunde lagen, entdeckte Kandel eine biochemische Kaskade vom Reiz über den Second Messenger cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) und den Neurotransmitter Serotonin, die die elektrische Kopplung zwischen den Nervenzellen über Minuten verstärkte und so zur Ausbildung eines Kurzzeitgedächtnisses führte.

Für die Ausbildung eines Langzeitgedächtnisses ist die Synthese von Proteinen notwendig, damit länger überdauernde Veränderungen, wie beispielsweise die Entstehung neuer Synapsen, die den neuronalen Kontext unterstützen, vorgenommen werden können. In diesem Zusammenhang konnte CREB-1 (cAMP response element binding protein 1) als eine Art Hauptschalter für das Langzeitgedächtnis erkannt werden. CREB-1 ist dabei für die Aktivierung mehrerer Gene verantwortlich und bewirkt so die Produktion der entsprechenden Proteine.

Kandels Laborergebnisse unterstützen die These, dass Lernen eine funktionale Veränderung der Effektivität bereits vorhandener Verknüpfungen ist, was schon 1949 in der von Donald Hebb formulierten sog. Hebb'schen Regel angenommen wurde (Hebb, D.O. 1949):

„When an axon of cell A is near enough to excite a cell B and repeatedly or persistently takes part in firing it, some growth process or metabolic change

takes place in one or both cells such that A's efficiency, as one of the cells firing B, is increased.“

„Wenn ein Axon einer Zelle A nah genug ist, um eine Zelle B anzuregen und wiederholt oder dauerhaft daran teilnimmt sie anzufeuern, dann finden in einer oder in beiden Zellen Wachstumsprozesse oder Stoffwechselveränderungen statt, so dass A's Effektivität, als eine der Zellen, die B anfeuert, erhöht wird.“

Donald Hebb beschrieb damit die später von Eric Kandel belegten Grundlagen von Lernen und Gedächtnis. Heute weiß man, dass einfache Stoffwechselveränderungen für die Ausbildung eines Kurzzeitgedächtnisses ausreichen, während dagegen für die Ausbildung eines Langzeitgedächtnisses Wachstumsprozesse, die einer Proteinsynthese bedürfen, notwendig sind. Hebb schloss dabei präsynaptische, perisynaptische und postsynaptische Komponenten mit ein, die alle prinzipiell dazu geeignet sind, die Effektivität einer Zelle A zu erhöhen.

1.2 Hippocampus

Der Hippocampus ist eine Gehirnregion, die im Zusammenhang mit Lernen und Gedächtnis eine wichtige Rolle spielt und beim Mensch im Temporallappen lokalisiert ist. Die Funktionen des Hippocampus lassen sich am besten anhand des berühmten Falles des Patienten H.M. erklären.

H.M. wurden 1953 aufgrund unbehandelbarer epileptischer Anfälle Teile beider Temporallappen – jeweils mit Hippocampus und Amygdala – sowie Teile des multimodalen Assoziationscortex entfernt (Corkin, S. et al. 1997). Anschließend war der Patient zwar noch in der Lage Geschehnisse vor der Operation zu erinnern, konnte sich neue Fakten, Personen oder Episoden jedoch nicht mehr merken, würde sich heute sogar nicht mal selbst auf einem aktuellen Foto erkennen. Interessanterweise waren Intelligenzquotient, Wahrnehmungsleistungen, abstraktes Denken und das Kurzzeitgedächtnis bis 3 Minuten nicht beeinträchtigt. Auch das Lernvermögen für motorische Fertigkeiten und das Sprachvermögen waren nahezu vollständig intakt.

Daraus ist zu ersehen, dass es einerseits mit Kurz- und Langzeitgedächtnis relevante Unterschiede der Gedächtnisdauer gibt und andererseits generell verschiedene Arten von

Lern- bzw. Gedächtnisinhalten existieren, die offenbar auch von unterschiedlichen Gehirnregionen übernommen werden. Der Hippocampus ist nicht Sitz des Gedächtnisses, ist aber notwendig, um bestimmte Lerninhalte ins Langzeitgedächtnis transferieren zu können.

Die verschiedenen Regionen des Hippocampus und ihre Projektionen sind aus Abbildung 1-1 ersichtlich.

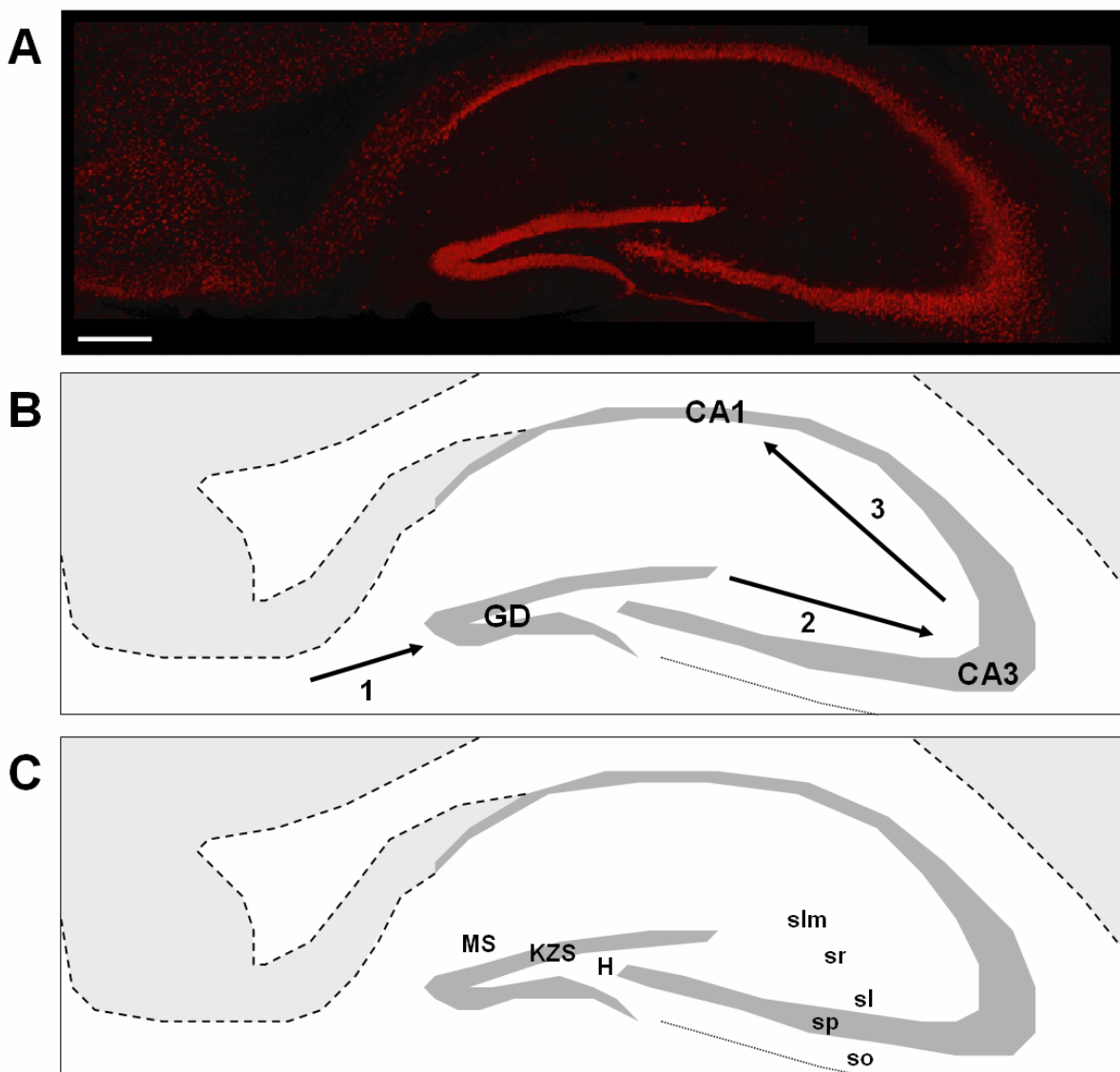


Abbildung 1-1 Hippocampus der Maus. neuN-Färbung in rot markiert Zellkerne adulten Neurons (A). Regionen mit den wichtigsten Projektionsfasern: 1=Tractus perforans, 2=Moosfasern und 3=Schaffer'sche Kollaterale (B). Zellschichten von Gyrus dentatus (GD) und Cornu ammonis (CA): MS=Molekularschicht, KZS=Körnerzellschicht, H=Hilus; so=Stratum oriens, sp=Stratum pyramidale, sl=Stratum lucidum, sr=Stratum radiatum, slm=Stratum lacunosum-moleculare (C). Maßstabsbalken = 300µm.

Die Fasern des Tractus perforans aus dem Entorhinalen Cortex enden an den Körnerzellen des Gyrus dentatus und bilden die Hauptafferenzen des Hippocampus. Die Körnerzellen des Gyrus dentatus entsenden die Moosfasern, die zu den Pyramidenzellen des Cornu ammonis (CA) des Hippocampus, genauer gesagt der CA3 Region führen. Dort nehmen die Schaffer'schen Kollateralen ihren Ursprung und projizieren zu den Pyramidenzellen der CA1-Region. Von der CA1-Region führen Fasern zum Subiculum und von dort wieder zum Entorhinalen Cortex, wo die Hauptafferenzen des Hippocampus ihren Ursprung hatten.

Der Gyrus dentatus besteht aus der Molekularschicht, der Körnerzellschicht und der innen liegenden polymorphen Zellschicht, die auch als Hilus bezeichnet wird. Die Zellschichten des Cornu ammonis (CA) von außen nach innen heißen: Stratum oriens, Stratum pyramidale, Stratum lucidum, Stratum radiatum und Stratum lacunosum-moleculare (Abbildung 1-1, C).

Die drei Hauptübertragungswege des Hippocampus sind in Abbildung 1-1 B als Pfeile dargestellt. Timothy Bliss und Terje Lomo entdeckten 1973, dass jeder dieser Übertragungswege bemerkenswert sensibel auf stattgefundene Aktivität reagiert. So lösten beispielsweise kurze hochfrequente Reizabfolgen bei allen drei Übertragungswegen eine Amplitudenerhöhung der excitatorischen postsynaptischen Potentiale (EPSP) aus, was man als Langzeitpotenzierung (Long-Term Potentiation, LTP) bezeichnete. Dabei ist generell frühe LTP („early LTP“) von später LTP („late LTP“) zu unterscheiden. Die beiden LTPs werden als Phasen aufgefasst, wobei die frühe LTP isoliert eigentlich einer kurzfristigen Potenzierung (Short-Term Potentiation, STP) gleichkommt und eher mit dem vergänglicheren Kurzzeitgedächtnis verglichen werden kann.

Die frühe LTP kann schon durch eine hochfrequente Reizabfolge ausgelöst werden, hält 1-3h an und benötigt keine neue Proteinsynthese. Die drei Übertragungswege unterscheiden sich bezüglich dieser Frühphase: Die LTP des Moosfaser-Übertragungsweges ist präsynaptisch induziert, genauer gesagt abhängig von präsynaptischem Ca^{2+} -Einstrom, der zur Aktivierung der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Adenylatcyclase führt und über Erhöhung des cAMP-Spiegels die Proteinkinase A (PKA) aktiviert. Dagegen ist die LTP der beiden anderen Übertragungswege postsynaptisch induziert, genauer gesagt in besonderem Maße abhängig von postsynaptischen NMDA-Rezeptoren (Kandel, E.R. et al. 2000).

In der Frühphase der LTP des Schaffer-Kollateral-Übertragungsweges wird durch ausreichend starke postsynaptische Depolarisierung der Mg^{2+} -Pfropfen der NMDA-Rezeptoren gelöst und damit der postsynaptische Ca^{2+} -Einstrom ermöglicht. Die anschließende Aktivierung Ca^{2+} -abhängiger Kinasen bewirkt zum einen die Erhöhung der Sensitivität und Anzahl von AMPA-Rezeptoren in der postsynaptischen Membran und zum anderen die Freisetzung von

retrograden Botenstoffen, die eine Steigerung der präsynaptischen Transmitterausschüttung auslösen.

An der LTP des Schaffer-Kollateral-Übertragungsweges sind zwei charakteristische Eigenheiten ablesbar: Kooperativität und Assoziativität. Zum einen bedarf es genügend präsynaptischer Power – beispielsweise der gemeinsamen Aktivität mehrerer afferenter Axone – damit der postsynaptische Mg^{2+} -Pfropfen der NMDA-Rezeptoren gelöst und der so wichtige Ca^{2+} -Einstrom in die CA1-Zelle ermöglicht wird, zum anderen ist die gleichzeitige Aktivität prä- und postsynaptischer Zellen für die Kopplung von großer Bedeutung, was auch die Kurzform der schon 1949 formulierten Hebb'schen Regel unterstreicht:

„Cells fire together wire together.“

– „Zellen, die zusammen feuern, werden miteinander verdrahtet.“

Die späte LTP, die erst zum eigentlichen morphologischen „Verdrahten“ führt, wird durch vier oder mehr hochfrequente Reizabfolgen ausgelöst, hält mindestens 24h an und benötigt mRNA- und neue Proteinsynthese. Die drei Hauptübertragungswege des Hippocampus ähneln sich bezüglich dieser Phase wieder sehr, da in allen Fällen der cAMP-PKA-MAPK (Mitogen-activated Proteinkinase)-CREB-Signalweg aktiviert wird, der durch Aktivierung bestimmter Gene die Proteinsynthese bzw. die Ausbildung neuer Synapsen initiiert.

Bei der Ausbildung von LTP können neurotrophe Faktoren beispielsweise als retrograde Botenstoffe beteiligt sein und in diesem Zusammenhang für Lernen und Gedächtnis eine entscheidende Rolle spielen.

1.3 Neurotrophe Faktoren und ihre Rezeptoren

NGF (Nerve growth factor) wurde Anfang der 50er Jahre von Rita Levi-Montalcini und Viktor Hamburger entdeckt und war für viele Jahrzehnte der Prototyp eines neurotrophen Faktors (Levi-Montalcini, R. and Hamburger, V. 1953; Levi-Montalcini, R. 1987).

Damals wurden neurotrophe Faktoren als Überlebensfaktoren für embryonale Nervenzellen definiert, die für bestimmte Zellpopulationen spezifisch sind und nur in sehr geringen Mengen ins jeweilige Zielgebiet abgegeben werden, so dass nicht alle Nervenzellen am Leben gehalten werden können. Mit dieser Regulation des Zelltodes durch äußere Faktoren wird

sichergestellt, dass die Zahl der Neuronen der Größe und den Anforderungen des Zielgebietes angeglichen wird (Neurotrophin-Hypothese).

Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass neurotrophe Faktoren auch im adulten Nervensystem beispielsweise im Zusammenhang mit neuronaler Plastizität eine entscheidende Rolle spielen, was als wesentliche Erweiterung ihres bisherigen Aufgabenbereichs aufgefasst werden kann.

In Tabelle 1-1 sind verschiedene neurotrophe Faktoren mit ihren zugehörigen Rezeptoren aufgelistet und in Gruppen geordnet dargestellt.

<i>Neurotrophe Faktoren</i>	<i>Rezeptoren</i>
Neurotrophine	
Nerve growth factor (NGF)	p75 ^{NTR} , TrkA
Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)	p75 ^{NTR} , TrkB
Neurotrophin-3 (NT-3)	p75 ^{NTR} , TrkC
Neurotrophin-4/5 (NT-4/5)	p75 ^{NTR} , TrkB
CNTF/LIF-Familie	
Ciliary neurotrophic factor (CNTF)	CNTFR α , LIFR β , gp130
Leukemia inhibitory factor (LIF)	LIFR β , gp130
Cardiotrophin-1 (CT-1)	LIFR β , gp130
Cardiotrophin-1-like cytokine (CLC)	LIFR β , gp130
Insulin-like growth factors	
Insulin-like growth factor-I (IGF-I)	IGFR-1
Insulin-like growth factor-II (IGF-II)	IGFR-1
Glial-derived neurotrophic factor und Verwandte	
Glial-derived neurotrophic factor (GDNF)	GFR α 1, c-ret
Neurturin (NTR)	GFR α 2, c-ret
Artemin	GFR α 3, c-ret
Persephin	GFR α 4, c-ret

Tabelle 1-1 Neurotrophe Faktoren und ihre Rezeptoren.

Bevor ausgewählte neurotrophe Faktoren etwas detaillierter besprochen werden, erfolgt zunächst ein grober Überblick über die Eigenheiten verschiedener Gruppen: Neurotrophine, GDNF-Familie und CNTF/LIF-Familie.

Neurotrophine werden zunächst als Proneurotrophine (Molekulargewicht: ~30kDa) produziert, bevor sie durch Abspaltung zu reifen Neurotrophinen (Molekulargewicht: ~14kDa) umgewandelt werden. Dabei haben Proneurotrophine ein anderes Bindungsverhalten als Neurotrophine. Es liegt ein Zwei-Rezeptor-System vor: Neurotrophine binden allesamt mit geringer Affinität an $p75^{\text{NTR}}$ und mit hoher Affinität an einen Trk (Tropomyosin related kinase)-Rezeptor, wobei der jeweilige Subtyp den Faktoren spezifisch zugeordnet ist. Nach Bindung des Faktors an ein zugehöriges Trk-Rezeptormolekül kommt es zur Dimerisierung der Rezeptoren und gegenseitigen Phosphorylierung an Tyrosinresten der beiden Kinase-Domänen, womit die intrazelluläre Signalvermittlung ihren Anfang nimmt.

Die Faktoren der **GDNF-Familie** gehören zur transforming growth factor β (TGF β)-Superfamilie, beinhalten sieben Cysteinreste und bilden Homodimere. Ähnlich wie Neurotrophine binden sie an einen Tyrosinkinase-Rezeptor. Dieser Rezeptor, bekannt als Ret, bildet Homodimere aus, doch es ist initial GFR α als dritter Partner des trimeren Rezeptorkomplexes nötig, um die intrazellulären Signalwege zu aktivieren.

Die **CNTF/LIF-Familie** umfasst Faktoren wie CNTF, LIF oder CT-1, wobei im Falle von CNTF ebenfalls ein trimere Rezeptorkomplex aus CNTFR α , LIFR β und gp130 das Signal in die Zelle weiterleitet. LIFR β und gp130, die auch anderen Vertretern dieser Gruppe als Rezeptoren dienen, bilden Heterodimere aus. Sie besitzen zwar keine eigene Tyrosinkinase-Aktivität, sind aber mit cytoplasmatischen Tyrosinkinasen der Jak-Familie assoziiert, die das Signal weiterleiten.

1.3.1 Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) wurde 1982 als zweites Mitglied der Neurotrophin Familie entdeckt und aus dem Schweinehirn isoliert (Barde, Y.-A. et al. 1982). Das menschliche BDNF-Gen liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 und besteht aus fünf Exons, wobei das Exon V für die Proteinstruktur des reifen BDNFs kodiert. Auf Ebene der Aminosäuresequenz hat BDNF zu ca. 50% Ähnlichkeit mit den anderen Neurotrophinen NGF, NT-3 und NT-4/5.

BDNF wird – wie alle Neurotrophine – zunächst als Proneurotrophin (proBDNF) produziert, bevor es durch Abspaltung zum reifen Neurotrophin (BDNF) umgewandelt werden kann (Chao, M.V. and Bothwell, M. 2002). ProBDNF wird wie BDNF sezerniert (Mowla, S.J. et al. 2001), weist aber ein anderes Bindungsverhalten innerhalb des Zwei-Rezeptor-System auf

als BDNF (Lee, R. et al. 2001). Dies ist von besonderer Wichtigkeit, da durch die unterschiedlichen, teilweise gegensätzlichen Wirkungen von proBDNF und BDNF bereits der Spaltung eine regulatorische Funktion zukommt (Lu, B. et al. 2005).

Während BDNF eine größere Affinität zu TrkB hat, bindet proBDNF mit höherer Wahrscheinlichkeit an p75^{NTR}. Während p75^{NTR} allen Neurotrophinen als Rezeptor dient und beispielsweise Apoptose vermittelt (Dechant, G. and Barde, Y.A. 1997), sind TrkB-Rezeptoren BDNF und NT-4/5 vorbehalten und für spezifischere Aufgaben zuständig.

Eine Reihe von Stimuli sind in der Lage die BDNF-Genregulation zu beeinflussen: Darunter elektrische Stimuli, die im Hippocampus LTP induzieren und zu erhöhter BDNF-Expression führen (Patterson, S.L. et al. 1992), wie auch körperliches Training, das im Hippocampus ebenfalls zu erhöhter BDNF-Expression führt (Neeper, S.A. et al. 1995). Interessanterweise unterliegen die BDNF-Level gewissen Schwankungen innerhalb des Östrogenzykluses, was auch mit Auswirkungen auf die neuronale Erregbarkeit korreliert (Scharfman, H.E. et al. 2003).

Das klassische Modell sieht vor, dass neurotrophe Faktoren – wie NGF – vom Zielgewebe sezerniert und retrograd bis zum Nervenzellkörper transportiert werden, um so das Überleben embryonaler Nervenzellpopulationen zu vermitteln. Dennoch gibt es Hinweise darauf, dass BDNF auch anterograd transportiert wird: BDNF-Protein kommt in Nerv-Terminalen vor, die die zugehörige mRNA nicht aufweisen (Conner, J.M. et al. 1997), wobei Unterbinden des axonalen Transportes zum Ausbleiben der weiteren BDNF-Zufuhr führt (Altar, C.A. et al. 1997; Altar, C.A. and DiStephano, P.S. 1998).

BDNF fördert das Überleben und Wachstum einer Reihe von Neuronen, zu denen Zellen des Spinalganglions (Acheson, A. et al. 1995) sowie hippocampale und corticale Neurone zählen (Huang, E.J. and Reichardt, L.F. 2001).

BDNF-defiziente Tiere sind ab dem dritten Postnataltag deutlich kleiner als ihre wildtypischen Geschwister, weisen unkoordinierte Bewegungen der Gliedmaßen und einen Neuronenverlust im Spinalganglion auf; sie sterben gewöhnlich zwischen der zweiten und vierten Woche nach der Geburt (Korte, M. et al. 1995).

Die ersten Untersuchungen zum Einfluß von BDNF auf die synaptische Übertragung wurden an *Xenopus*-Kulturen durchgeführt und zeigten, dass BDNF die Frequenz der excitatorischen postsynaptischen Signale steigert (Lohof, A.M. et al. 1993). Seither wurden viele Experimente zu diesem Thema durchgeführt, die – allgemein ausgedrückt – darlegten, dass BDNF excitatorische Synapsen verstärkt und inhibitorische Synapsen abschwächt.

Besonders hervorzuheben ist dabei die wichtige Rolle, die BDNF bei der Ausbildung von LTP im Hippocampus einnimmt. So weisen BDNF-defiziente Tiere eine deutliche Verminderung der LTP auf (Korte, M. et al. 1995), die durch BDNF-Ersatz in der CA1-Region kompensiert werden kann (Korte, M. et al. 1995; Korte, M. et al. 1996; Patterson, S.L. et al. 1996).

Wie es der große Einfluß von BDNF auf die Ausbildung von LTP im Hippocampus schon vermuten lässt, spielt BDNF auch in Bezug auf Lernen und Gedächtnisausbildung eine wichtige Rolle (Linnarsson, S. et al. 1997; Alonso, M. et al. 2002).

BDNF führt auch zu einer Steigerung der Neurogenese. Doch während manche Untersuchungen den primären Effekt von BDNF der Proliferation zuschreiben (Katoh-Semba, R. et al. 2002), weisen andere Experimente auf einen wichtigen Effekt auf das Überleben von Zellen hin (Lee, J. et al. 2002).

Darüberhinaus scheint BDNF auch bei einigen neurologischen und psychiatrischen Krankheitsbildern von Relevanz zu sein. So sind beispielsweise erhöhte hippocampale BDNF mRNA-Spiegel mit epileptischen Anfällen assoziiert (Ernfors, P. et al. 1991). Zudem spielt BDNF eine Rolle bei der Modulation der Schmerzempfindlichkeit (Kerr, B.J. et al. 1999). Verschiedenen Untersuchungen zufolge könnten BDNF-Veränderungen bei Morbus Alzheimer und Parkinson (Murer, M.G. et al. 2001), wie auch bei bipolaren Erkrankungen (Altar, C.A. 1999; Tsai, S.J. 2004) eine Rolle spielen.

1.3.2 Ciliary neurotrophic factor (CNTF), Leukemia inhibitory factor (LIF) und Cardiotrophin-1 (CT-1)

Die Wirkungsvermittlung über einen gemeinsamen Rezeptorkomplex für Ciliary neurotrophic factor (CNTF), Leukemia inhibitory factor (LIF) und Cardiotrophin-1 (CT-1) erklärt die überlappenden Funktionen dieser Faktoren und ist auch der Grund, weshalb sie hier zusammen besprochen werden.

CNTF wurde ursprünglich als ein Faktor beschrieben, der *in vitro* das Überleben parasympathischer Neurone aus dem Ciliarganglion von Hühnern vermittelt (Adler, R. et al. 1979). Als das zugehörige Protein aus Extrakten von Hühneraugen isoliert wurde, wurde klar, dass Extrakte von Ischiasnerven aus Ratten ein Protein beinhalten, das sehr ähnliche biochemische und biologische Eigenschaften aufwies (Manthorpe, M. et al. 1986). Das Protein

wurde isoliert und das zugehörige Gen kloniert (Lin, L.-F.H. et al. 1989; Stöckli, K.A. et al. 1989).

Zunächst wurde angenommen CNTF sei ein vom Ziel abstammender Neurotropher Faktor für Ciliarneurone und Motoneurone (Manthorpe, M. et al. 1980), der durch retrograden Transport vom Muskel zur jeweiligen Nervenzellpopulation gelangt, was die großen Mengen dieses Proteins in peripheren Nerven erklärte (Williams, L.R. et al. 1984). Es wurde auch tatsächlich CNTF mRNA in Skelettmuskeln von Ratten nachgewiesen (Ip, N.Y. et al. 1993), doch bald war klar, dass CNTF von myelinisierenden Schwann-Zellen gebildet wird (Friedman, B. et al. 1992; Sendtner, M. et al. 1992), die auch in den Muskelextrakten enthalten waren und die Produzenten der dort gemessenen CNTF mRNA waren.

Dabei fehlt CNTF das hydrophobe Signalpeptid, so dass es zumindest nicht auf klassischem Weg aus der Zelle freigesetzt werden kann. Bisher ist unklar, wie CNTF die Zelle verlässt. Nach Nervenläsionsexperimenten an adulten Ratten konnte CNTF extrazellulär in Verbindung mit Myelinabbauprodukten nachgewiesen werden (Sendtner, M. et al. 1992) und die hohe Konzentration vorort führte zur Vermutung, CNTF könne als „Läsionsfaktor“ fungieren. Zudem konnte nach Nervenläsionsexperimenten am Facialisnerven durch lokale Applikation von CNTF auf die proximalen Nervenstümpfe der Zelltod der zugehörigen Motoneuron-Zellkörper signifikant reduziert werden (Sendtner, M. et al. 1990), so dass CNTF auch als Überlebensfaktor für postnatale Motoneuronen aufgefasst werden kann.

CNTF-defiziente Tiere haben einen relativ unauffälligen Phänotyp. Vier Wochen nach der Geburt entwickelt sich ein geringgradiger Motoneuronenverlust, sie sind aber in Größe und Lebenserwartung mit ihren wildtypischen Geschwistern vergleichbar (Masu, Y. et al. 1993).

LIF-defiziente Mäuse fallen nicht durch einen neurologischen Phänotyp auf – führen auch zu keinerlei Veränderungen bei Motoneuronen – haben aber eine deutlich verminderte Anzahl von Stammzellen in Milz und Knochenmark (Escary, J.-L. et al. 1993).

CT-1-defiziente Tiere weisen einen relativ unauffälligen Phänotyp auf und sind in Größe und Lebenserwartung mit ihren wildtypischen Geschwistern vergleichbar. In der Zeitspanne zwischen dem embryonalen Tag 14 und der ersten postnatalen Woche kommt es zu einem signifikanten Motoneuronenverlust, wobei in der Folgezeit kein zusätzlicher Verlust auftritt (Oppenheim, R.W. et al. 2001).

Während das Fehlen der einzelnen Liganden – CNTF, LIF oder CT-1 – nicht mit massiven Phänotypen assoziiert ist, führt die Deletion der Rezeptorkomponenten CNTF α , LIFR β und gp130 zum Tod der Mäuse (DeChiara, T.M. et al. 1995; Li, M. et al. 1995; Yoshida, K. et al.

1996), was das Zusammenspiel der Faktoren am gemeinsamen Rezeptorkomplex unterstreicht.

Obwohl LIF-defiziente Tiere keine Veränderung der Motoneuronenzahl aufweisen, zeigen CNTF&LIF-defiziente Mäuse einen Motoneuronenverlust, der den von CNTF-defizienten Tieren übersteigt und auch mit einer vermehrten Muskelschwäche als funktionelles Korrelat einhergeht (Sendtner, M. et al. 1996). An Triple-knockout-Mäusen für CNTF, LIF und CT-1, CNTF&LIF-defizienten sowie CNTF&CT-1-defizienten Tieren wurde der individuelle Einfluß der jeweiligen Faktoren auf das Überleben und die Funktion von Motoneuronen näher untersucht und dabei die wichtige Rolle von LIF für das postnatale Überleben distaler Axone und die Größe motorischer Endplatten dargelegt (Holtmann, B. et al. 2005).

Welche Rolle CNTF, LIF und CT-1 für die Ausbildung neuronaler Plastizität im Hippocampus spielen, ist bisher jedoch noch ziemlich unklar.

1.3.3 Insulin-like growth factors (IGFs)

Insulin-like growth factors (IGFs) sind strukturell mit Insulin, entfernter auch mit Relaxin verwandt (LeRoith, D. and Roberts, C.T., Jr. 1993). Sie leiten sich von Vorläuferproteinen ab, die zwei Domänen aufweisen, die zu den A und B Ketten von Insulin homolog sind, wobei im Gegensatz zu Insulin die C Domäne der IGFs nicht entfernt wird.

Aufgrund der hohen IGF-Level in Körperflüssigkeiten und der somit relativ geringen Spezifität, wurden diese Faktoren nicht als Überlebensfaktoren für bestimmte Nervenzellpopulationen angesehen. Zudem ist die Expression von IGF1-Rezeptoren bei neuronalen und glialen Zellen im gesamten ZNS weit verbreitet (LeRoith, D. et al. 1993).

IGF-1 unterscheidet sich von anderen neurotrophen Faktoren durch seine Fähigkeit die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden (Reinhardt, R.R. and Bondy, C.A. 1994). IGF-1, das im Blut an bestimmte Bindungsproteine gekoppelt vorliegt, wäre daher in der Lage ins Gehirn zu gelangen und könnte dort direkt oder indirekt beispielsweise an der Ausbildung synaptischer Plastizität beteiligt sein.

1.4 Fragestellung

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit zwei zentralen Themenkomplexen:

- A) Neurotrophe Faktoren als Modulatoren synaptischer Plastizität und ihr Einfluß auf die BDNF-Regulation im Hippocampus
 - B) Neurotrophe Faktoren und ihr Einfluß auf Proliferation und Differenzierung in Hippocampus und Cortex
-

Vor Beginn der Arbeit hatten Untersuchungen bei CNTF-defizienten Mäusen einen reduzierten hippocampalen BDNF-Gehalt ergeben. Dies waren zum einen Reverse Transkriptase (RT)-PCR-Untersuchungen von Rudolf Götz, die an 12 Monate alten CNTF-defizienten Mäusen reduzierte BDNF mRNA-Level gezeigt hatten, die nur ca. 40% des Wertes wildtypischer Altersgenossen erreichten. Zum anderen hatte Stephan Wiese mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) von R&D Systems an 3 Monate alten CNTF-defizienten Tieren auf Proteinebene deutlich reduzierte BDNF-Level nachgewiesen, die statistisch hochsignifikant waren und nur ca. 30% des Wertes wildtypischer Altergenossen entsprachen.

Ziel der Arbeiten zum ersten Themenkomplex (A) war es, einen Beitrag zur Klärung der Bedeutung von CNTF und IGF für die Modulation synaptischer Plastizität und die BDNF-Regulation im Hippocampus zu leisten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden im Speziellen folgende Fragen bearbeitet, indem die anschließend genannten Untersuchungen durchgeführt wurden:

A-1) Welche Bedeutung hat CNTF als Modulator neuronaler Plastizität?

- Bestimmung von Menge und Lokalisation von BDNF im Hippocampus CNTF-defizienter Mäuse verglichen mit wildtypischen Geschwistertieren
- Genaue Lokalisierung von CNTF im Hippocampus

Zusätzlich wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Beiträge zu Untersuchungen geleistet, die in Kooperationen durchgeführt wurden:

- Vergleichende elektronenmikroskopische Untersuchung der Hippocampi von wildtypischen und CNTF-defizienten Mäusen (Esther Asan, Anatomie, Würzburg)

- Charakterisierung von LTP und LTD im Hippocampus CNTF-defizienter Mäuse (Martin Korte, MPI, Martinsried)

A-2) Welche Bedeutung hat IGF bei der BDNF-Regulation in Hippocampus?

- Untersuchung der BDNF-Regulation im Hippocampus IGF1-Rezeptor-defizienter Mäuse unter Normalbedingungen bzw. nach körperlichem Training (Laufradexperimente)

Im zweiten Themenkomplex (B) wurde der Einfluß neurotropher Faktoren auf Proliferation und Differenzierung von neuronalen Stammzellen in Hippocampus und Cortex untersucht. Die Untersuchungen lassen sich dabei in *in vivo*-Experimente bzw. *in vitro*-Experimente untergliedern, wobei die Fragestellungen B1 und B3 jeweils in Kooperation mit anderen Arbeitsgruppen untersucht wurden:

B-1) Welchen Einfluß haben CNTF und LIF auf die Proliferation im Gyrus dentatus *in vivo*? (Angelika Schmitt, Psychobiologie, Würzburg)

- BrdU-Inkorporationsexperimente und Bestimmung der Proliferationsrate im Gyrus dentatus CNTF-defizienter, LIF-defizienter und CNTF&LIF-defizienter Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen

B-2) Welchen Einfluß hat CNTF auf die Differenzierung neuraler Stammzellen *in vitro*?

- Untersuchung der Differenzierung CNTF-defizienter, neuraler Stammzellen (NSCs) im Vergleich mit wildtypischen NSCs

B-3) Welche Rolle spielt CT-1 bei der Differenzierung corticaler Vorläuferzellen *in vitro*? (Fanie Barnabé-Heider, Entwicklungsbiologie, Kanada)

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 Mauslinien

BDNF

Die BDNF-knock out Maus wurde von Korte et al. generiert und 1995 publiziert (Korte, M. et al. 1995). Durch homologe Rekombination wurde eine Neomycin-Kassette zwischen zwei *Apal*-Schnittstellen eingebracht, was zur Deletion eines Großteils der BDNF kodierenden Region führte.

floxed BDNF

Die floxed BDNF-Maus wurde bisher nicht publiziert, die genaue Lokalisation der loxP-Sites ist im Ergebnisteil beschrieben.

CNTF

Die CNTF-knock out Maus wurde 1993 von Masu et al. publiziert (Masu, Y. et al. 1993). Durch homologe Rekombination wurde eine Neomycin-Kassette 63bp downstream des Startcodons eingebracht, so dass fast das gesamte CNTF-Gen mit Ausnahme des 3'-untranslatierten Bereiches deletiert wurde.

LIF

Die LIF-knock out Maus wurde 1993 von Escary et al. publiziert (Escary, J.-L. et al. 1993). Die Maus wurde durch homologe Rekombination generiert, indem ein 3.301bp großes DNA-Fragment des Chromosoms 11 der Maus deletiert und durch ein LacZ-Reportergen sowie eine Neomycin-Kassette ersetzt wurde. Die Deletion betraf dabei alle Exons und Introns der beiden LIF-Formen, sowie 571bp des gemeinsamen 3'-untranslatierten Bereichs.

CT-1

Die CT-1-knock out Maus wurde von Oppenheim et al. 2001 publiziert (Oppenheim, R.W. et al. 2001). Durch homologe Rekombination wurde Exon 2 und die gesamte kodierende Region von Exon 3 deletiert und durch eine Neomycin-Kassette ersetzt.

floxed IGF-1-Rezeptor

Die floxed IGF-1-Rezeptor-Maus wurde bisher nicht publiziert, das zugehörige Genkonstrukt ist jedoch in Abbildung 2-1 beschrieben.

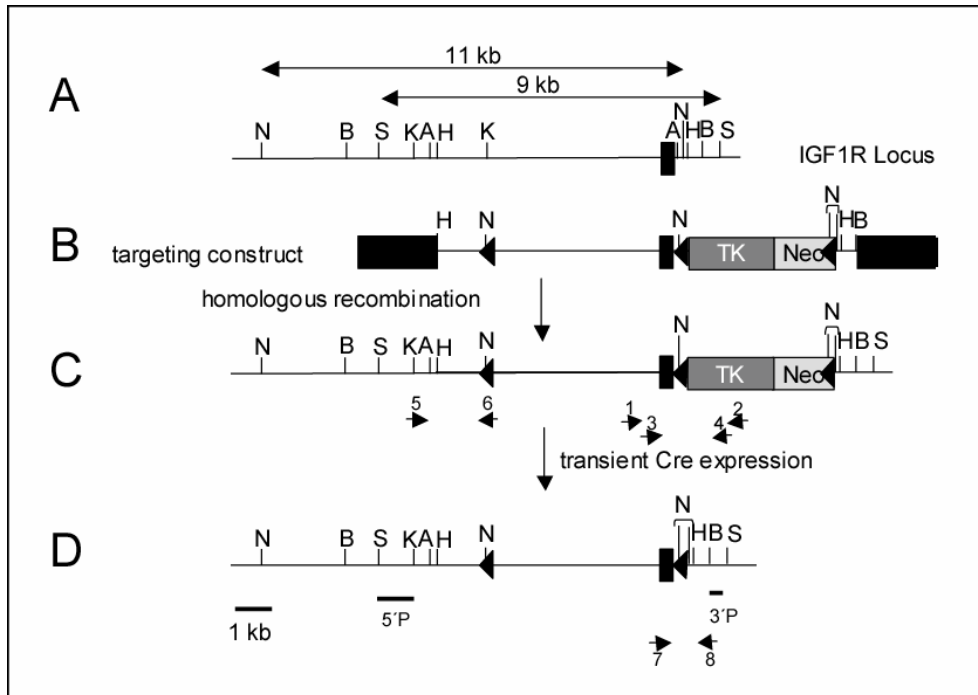


Abbildung 2-1 Genkonstrukt der floxed IGF-1-Rezeptor-Maus. Genlocus des IGF-1-Rezeptor-Gens mit Exon 3 als dunkles Rechteck (A), Targeting Konstrukt (B), homologer Rekombination (C) und dem gefloxed Exon 3 des IGF-1-Rezeptor Gens (D). N=NheI, B=BamHI, S=SacI, K=KpnI, A=AvrII, H=HindIII. Primer: 1=TKPROM2, 2=BAMP3, 3=TKPROM3, 4=BAMP4, 5=EXTLOXP, 6=loxP2, 7=X3SEQ2, 8=RECSEQ3

NFL-Cre

Die Mauslinie mit Nervenzell-spezifischer Expression der Cre Recombinase wurde 2002 von Schweizer et al. publiziert (Schweizer, U. et al. 2002). Die Cre Recombinase wird dabei unter Kontrolle des Promotors von Neurofilament L exprimiert, der etwa ab dem zwölften Embryonaltag aktiv ist.

2.1.2 Bakterienstämme

Kompetente Escherichia coli (HB101)

eigene Herstellung nach der Inoue-Methode (Inoue, H. et al. 1990)

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien wurden von folgenden Firmen bezogen: Aldrich, Applichem, BD, Calbiochem, CellConcepts, Chemicon, DeltaSelect, Fluka, Gibco, Invitrogen, J.T.Baker, Merck, R&D, Roche, Roth, Sigma und Qiagen.

2.1.4 Medien und Kulturreagenzien

2.1.4.1 Medien und Reagenzien für die Zellkultur

Neurobasal	Invitrogen
HBSS	Invitrogen
B27 Supplement	Invitrogen
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen
Glutamax	Invitrogen
bFGF	CellConcepts
mEGF	CellConcepts
DMSO	Sigma
PORN	Sigma
Laminin	Rupert Timpl, MPI, München
CNTF	eigene Herstellung
LIF	R&D Systems
CT-1	R&D Systems
p75-Antikörper (monoclonal, Ratte)	abcam (ab8876)

2.1.4.2 Medien und Reagenzien für die Bakterienkultur

SOC-Medium	Invitrogen
LB-Medium	Invitrogen
Ampicillin	Roth

2.1.5 Kits

TOPO TA Cloning [®]	Invitrogen
NucleoSpin [®] Plasmid	Macherey-Nagel
DyeEx [™] 2.0 Spin Kit (250)	Qiagen
SuperScript [™] First-Strand Synthesis System for RT-PCR	Invitrogen
Quantikine [®] Human BDNF Immunoassay	R&D Systems

2.1.6 Antikörper

Name	Antikörperart, Wirtstier	Verdünnung	Bezugsquelle mit Catalognr. (Cat) & evtl. Lotnr. (Lot)
BDNF-Immuns serum	polyclonal, Kaninchen	IHC 1:1.000 WB 1:2.000	selbst
beta-Aktin	monoclonal, Maus	WB 1:3000	Abcam Cat: ab6276
beta-III-Tubulin	monoclonal, Maus	IHC 1:500	Chemicon Cat: CBL412
BrdU (BU-33)	monoclonal, Maus	IHC 1:1000	Sigma Cat: B2531
CD44	monoclonal, Ratte	WB 1:500	Chemicon Cat: MAB2137; Lot: 25060164
cleaved Caspase 3	polyclonal, Kaninchen	IHC 1:500	Cell Signaling Cat: 9661
CNTF (4/68)	monoclonal, Maus	IHC 1:1000	selbst
CNTF (K10)	polyclonal, Kaninchen	IHC 1:1000	selbst
CT-1	polyclonal, Ziege	IHC 1:200 WB 1:500	R&D Systems Cat: AF438; Lot: CKO01
Doublecortin	polyclonal, Meerschweinchen	IHC 1:6000	Chemicon Cat: AB5910
Erk1/2	polyclonal, Kaninchen	WB 1:5000	Santa Cruz Cat: sc-93/ sc-154
GAD	polyclonal, Kaninchen	IHC 1:1000	Biotrend Cat: 4670-6504
Glast	polyclonal, Meerschweinchen	IHC 1:4000	Chemicon Cat: AB1782; Lot: 23081399
GFAP	monoclonal, Maus	IHC 1:500	Chemicon Cat: MAB3402; Lot: 507006006

Name	Antikörperart, Wirtstier	Verdünnung	Bezugsquelle mit Catalognr. (Cat) & evtl. Lotnr. (Lot)
GFAP	polyclonal, Kaninchen	IHC 1:300 WB 1:2000	Chemicon Cat: AB5804; Lot: 25010339
Islet1	monoclonal, Maus	IHC 1:1	selbst
MAP-2	monoclonal, Maus	IHC 1:300	Chemicon Cat: MAB3418; Lot: 22020726
Nestin	monoclonal, Maus	IHC 1:100	Chemicon Cat: MAB353
NeuN	monoclonal, Maus	IHC 1:500	Chemicon Cat: MAB377; Lot: 23031163
Neurofilament M	polyclonal, Kaninchen	WB 1:2000	Abcam Cat: ab9034
Parvalbumin	monoclonal, Maus	IHC 1:1000	Swant Cat: 235; Lot: 10-11 (F)
Pax6	monoclonal, Maus	IHC 1:10000	R&D Systems Cat: MAB1260
Pax6	polyclonal, Kaninchen	IHC 1:500	Covance Cat: PRB-278P
S100-beta (SH-B1)	monoclonal, Maus	IHC 1:1000	Sigma Cat: S 2532; Lot: 074K4820
Synaptophysin (C7.2)	monoclonal, Maus	IHC 1:200	Reinhard Jahn (Jahn, R. et al. 1985)
Synaptophysin (G96)	polyclonal, Kaninchen	IHC 1:200	Reinhard Jahn (Jahn, R. et al. 1985)
Tau	polyclonal, Kaninchen	IHC 1:400	Sigma Cat: T6402

Tabelle 2-1 Primärantikörper jeweils mit Name, Antikörperart, Wirtstier, Bezugsquelle, Catalognummer (Cat), Lotnummer (Lot) und jeweiliger Verdünnung für Immunhistochemie (IHC) bzw. Western Blot (WB).

Name	Wirtstier	Verdünnung	Bezugsquelle, Catalognr. (Cat)
biotinylierter anti-mouse	Ziege	IHC 1:400	Vector Laboratories, Cat: BA-9200
Cy 2 anti-mouse	Ziege	IHC 1:300	Jackson Immuno, Cat: 115-225-003
Cy 2 anti-rabbit	Ziege	IHC 1:300	Jackson Immuno, Cat: 111-225-144
Cy 3 anti-goat	Esel	IHC 1:300	Jackson Immuno, Cat: 705-165-003
Cy 3 anti-mouse	Ziege	IHC 1:300	Jackson Immuno, Cat: 115-165-003
Cy 3 anti-rabbit	Ziege	IHC 1:300	Jackson Immuno, Cat: 111-165-003
FITC anti-guinea pig	Kaninchen	IHC 1:40	Zymed Laboratories, Cat: 61-4611
Peroxidase anti-goat	Esel	WB 1:5000	Jackson Immuno, Cat: 705-035-147
Peroxidase anti-mouse	Ziege	WB 1:5000	Jackson Immuno, Cat: 115-035-16
Peroxidase anti-rabbit	Ziege	WB 1:5000	Jackson Immuno, Cat: 111-035-003
Peroxidase anti-rat	Ziege	WB 1:5000	Rockland, Cat: 612-103-120

Tabelle 2-2 Sekundärantikörper jeweils mit Name, Wirtstier, Bezugsquelle, Catalognummer (Cat) und jeweiliger Verdünnung für Immunhistochemie (IHC) bzw. Western Blot (WB).

2.1.7 Enzyme

Taq Polymerase	Biotherm
Platinum [®] Taq High Fidelity	Invitrogen
DNase I	Invitrogen
SuperScript [™] II Reverse Transkriptase	Invitrogen
Eco RI	MBI Fermentas
Apa I	MBI Fermentas
Big Dye Terminator	Invitrogen
Proteinase K	Roche
Trypsin	Sigma

Trypsin Inhibitor

Sigma

Protease Inhibitor Cocktail Tablette

Roche

(1ml der Lösung enthält: 0,02mg Pancreasextrakt, 0,02mg Chymotrypsin, 0,0005mg Thermolysin, 0,02mg Trypsin, 0,33mg Papain)

2.1.8 Oligonukleotide

Name	Sequenz	Genakzessions-Nr.
5'beta-actin	5'-GAC CTG ACA GAC TAC CTC AT-3'	NM_007393
3'beta-actin	5'-AGA CAG CAC TGT GTT GGC AT-3'	
BD2A	5'-GTG TCT ATC CTT ATG AAT CGC C-3'	NM_007540
BK01	5'-ATA AGG ACG CGG ACT TGT ACA-3'	
bdnf13	5'-GTT GCG TAA GCT GTC TGT GCA CTG TGC-3'	
bdnf14	5'-CAG ACT CAG AGG GCA CTT TGA TGG CTT G-3'	
BDNFf	5'-ATG ACC ATC CTT TTC CTT AC-3'	
BDNFr	5'-CAA CAT AAA TCC ACT ATC TTC-3'	
CNTF E1S	5'-GAG CAA TCA CCT CTG ACC CTT-3'	
CNTF 1A	5'-CAG GCT GGA TGA AGA CAG TAA G-3'	
CT1 S1	5'-ATG CAG GGC TAC CGG TGT CC-3'	NM_007795
CT1 A2	5'-CTC ACC CAC TCG CCA TAG AGG-3'	
CT1 A6	5'-AGC AAG TGG ATC TCT ATG AGC TG-3'	
LIF2	5'-ACC CCT GTA AAT GCC ACC TG-3'	NM_008501
LIFA4	5'-CTC TAA GCC TGA ACT CTC TCA TCC-3'	
RTL3	5'-CAA CGA CCA TTG CTG AGG AGG-3'	
REC SEQ	5'-CTA CTA GTT CAT GCC CAG AGC CCA G-3'	NM_010513
X3 SEQ	5'-CAG GAG TGT CCC TCA GGC TCC ATC-3'	
pMC-Cre	5'-GGT ATG CTC AGA AAA CGC C-3'	
NFL-SEQ	5'-TCG CAG GCT GCG TCA GGA G-3'	
5'neo	5'-AGC CGA TTG TCT GTT GTG CCC-3'	
3'neo	5'-GAT TCG CAG CGC ATC GCC TT-3'	
Primer T7	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'	

Tabelle 2-3 Oligonukleotide jeweils mit Namen, Sequenz und Genakzessionsnummer.

2.1.9 Marker

Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder	MBI Fermentas
Gene Ruler™ 1kb DNA Ladder	MBI Fermentas
Prestained Protein Ladder, ~10-180kDa	MBI Fermentas
LMW-Marker, ~10-100kDa	Amersham Pharmacia Biotech

2.1.10 Hilfsmittel und Geräte

2.1.10.1 Hilfsmittel

Pipetten
Einmalpipetten
Präparierbesteck

2.1.10.2 Geräte

Agarose-Gellaufkammer	PerfectBlue	Peqlab
Binokular	WILD M3B	Leica
Blotkammer	Fastblot B34	Biometra
Blotkammer		Bio Rad
Drehrad		neoLab
Elektronenmikroskop	LEO 912 AB	Zeiss
ELISA Image Reader		Lab Systems
Feinwaage	SAE 200	Bosch
Filmentwicklungsmaschine		Kodak
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 100	Zeiss
Inkubatoren		Nuaire
Kryostat		Leitz
Konfokales Mikroskop	Leica DM RE	Leica
LAS-Reader	LAS-3000	Fuji Film
Lichtmikroskop		Leica

Magnetrührer	Model L-81	Labinco, Niederlande
PAA-Gellaufkammer		Biometra
Paraffinschneidegerät		Reichert-Jung
PCR-Geräte	Mastercycler	Eppendorf
Perfusionspumpe		Ismatec
pH-Meter	pH537	WTW
Photometer		Eppendorf
Sequenziergerät		Applied Biosystems
Spannungsgerät		Pharmacia Biotech
Speed vac	Univapo 100H	Uni Equip
Sterile Werkbänke	LaminAir [®]	Heraeus
Thermomixer		Eppendorf
Ultraschallgerät	Sonoplus HD 60	Bandelin
Ultrazentrifuge		Beckman
UV-Transilluminator		NTAS
Vibratom	Leica VT 1000S	Leica
Vortexer	L46	GLW
Waage	MP-3000	Chyo
Wärmeplatte		Minitüb
Wasserbad		Memmert
Zentrifugen	5417 R, 5804 R, 5810 R	Eppendorf

2.1.11 Programme

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden folgende Programme verwendet: Adobe Illustrator, AIDA Software, Digi Trace (IMATEC Bildanalyseysteme GmbH, Deutschland), ELISA Image Reader, Graph Pad Prism, Leica Confocal Software und Photo Shop.

2.2 METHODEN

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 DNA-Isolierung

DNA wurde aus Mausgewebe, meist aus Schwanzspitzen isoliert. Dazu wurden ca. 0,5cm Schwanzspitze mit Lysispuffer und Proteinase K in einem Thermomixer bei +60°C über Nacht inkubiert.

Lysispuffer:	10mM	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (pH=7,5)
	100mM	Ethylenediaminetetraacetic Acid
	150mM	Natriumchlorid
	0,5%	Sodiumdodecylsulfat (SDS)

Mittels 5% SDS, 3M NaCl und Chloroform wurden die Nukleinsäuren von Lipiden und Proteinen abgetrennt und die DNA in 100% Ethanol ausgefällt. Die DNA wurde mit 70% Ethanol gewaschen und das abzentrifugierte Pellet in 10mM Tris aufgenommen und resuspendiert.

2.2.1.2 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentration wurde durch photometrische Messung der Absorption bei 260nm bestimmt. Der Quotient aus 260nm/280nm wurde zur Beurteilung der Reinheit der Probe herangezogen.

2.2.1.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, PCR) ist eine Methode zur in-vitro-Amplifikation eines definierten DNA-Fragments. Man nutzt dabei DNA-Polymerasen, die die Fähigkeit haben, einzelstängige DNA zu replizieren, wenn ein kurzer Abschnitt doppelsträngiger DNA mit einem freien 3'-OH-Ende vorliegt.

Bei der PCR werden 20-35 Zyklen durchlaufen, wobei jeder aus drei Phasen besteht.

In der ersten Phase wird die doppelstängige DNA bei 92-98°C in Einzelstränge zerlegt.

In der zweiten Phase erfolgt die Anlagerung, das Annealing der Primer, was je nach verwendetem Primerpaar sequenzspezifisch bei ca. 55-65°C erfolgt.

In der dritten Phase wird die Temperatur auf 72°C erhöht, was dem Aktivitätsoptimum der Taq-Polymerase entspricht, die die Synthese des komplementären DNA-Stranges übernimmt.

Wahl der Primer

Es werden synthetisch hergestellte Primer verwendet, die verschiedene Bedingungen erfüllen sollen. Sie sollen 20-23bp lang sein, einen C-G-Gehalt von 40-60% haben und auf C oder G enden. Die Annealingtemperatur (T_m) eines Primers kann mit der folgenden Formel berechnet werden, wobei „n“ für die Anzahl der jeweiligen Base steht:

$$T_m = [(C_n+G_n) \times 4 + (A_n+T_n) \times 2] \text{ } ^\circ\text{C}$$

2.2.1.4 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

PCR-Produkte wurden elektrophoretisch in Agarosegelen getrennt.

Die Agarosekonzentration des Gels richtete sich dabei nach der Größe der aufzutrennenden Fragmente, wobei für die Auftrennung großer Fragmente höhere Konzentrationen verwendet wurden. Die Agarosekonzentration betrug 0,8 - 2% in Tris-Essigsäure-EDTA (TAE)-Laufpuffer. In einem Erlenmeyerkolben wurde die benötigte Agarosemenge in TAE-Laufpuffer aufgeköcht und je 100ml 3µl Ethidiumbromid zugegeben.

50x TAE-Laufpuffer:	242g/l	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
	57,1ml/l	Eisessig
	50mM	Ethylenediaminetetraacetic Acid

Das Gel wurde in einer Gelschiene gegossen, dabei auf korrekte Lage des Kammes und Blasenfreiheit geachtet, bei Raumtemperatur ausgehärtet und anschließend in eine Laufkammer eingebracht.

Die Nukleinsäureproben wurden mit gefärbter Ladepuffer-Lösung versetzt, in die Geltaschen gefüllt und bei 80-100V 1h lang ihrer Größe nach aufgetrennt. Das Resultat wurde mit dem UV-Transilluminator bei 312nm ermittelt und als Foto festgehalten.

6x Ladepuffer-Lösung:		
	1x	TAE-Laufpuffer
	30%	Glycerin
	Flocken	Xylen Cyanol
	Flocken	Bromphenol-Blau

2.2.1.5 Klonieren

Beim Klonieren wird ein DNA-Fragment in einen Vektor – beispielsweise ein Plasmid – eingebracht. Das Standardverfahren beim Einbau von Fremd-DNA in einen Vektor besteht dabei aus zwei Schritten:

Im ersten Schritt werden Fremd-DNA und Vektor-DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen geschnitten und im zweiten Schritt mit Hilfe des Enzyms Ligase verknüpft.

Eine technische Vereinfachung ist das Topo-Cloning, ein Verfahren, das die Biotechnologiefirma Invitrogen entwickelt und auf den Markt gebracht hat. Beim Topo-Cloning liegt das Plasmid zunächst als geöffneter Ring vor, wobei der Ringschluß durch die Typ-I-DNA-Topoisomerase (Topo) verhindert wird, die an den Enden des gespaltenen Vektors kovalent gebunden vorliegt. Wenn aber der Topo-tragende Vektor mit Insert-DNA in Kontakt kommt, kann das Enzym seinen Reaktionsablauf fortsetzen, verknüpft Insert und Vektor und löst sich anschließend von der DNA ab. Das Topo-Cloning hat zwei entscheidende Vorteile: Zum einen kann Fremd-DNA mit beliebigen Enden in den Vektor eingebaut werden und zum anderen macht es eine anschließende Inkubation mit Ligase überflüssig.

Für das Klonieren wurde der pCR[®]2.1-TOPO[®] Vektor (3.900bp) des TOPO TA Cloning[®] Kit (Invitrogen) verwendet und der Vorgang anleitungsgemäß durchgeführt.

Das 454bp große BDNF-PCR-Fragment, flankiert durch die Primer BK01 und BD2A, wurde in den 3.900bp großen pCR[®]2.1-TOPO[®] Vektor eingebracht. Dazu wurden das PCR-Produkt, Salzlösung, steriles Wasser und TOPO-Vektor in einem 6µl-Ansatz zusammengebracht, geschüttelt und 5min bei RT inkubiert. Das Resultat wurde anschließend bei -20°C gelagert.

Klonierungsansatz:	3µl	PCR-Produkt
	1µl	Salzlösung
	1µl	Steriles Wasser
	1µl	TOPO-Vektor

2.2.1.6 Transformieren

Beim Transformieren wird ein Plasmid in Zellen eingebracht.

Es wurden kompetente Escherichia coli des Stammes HB101 verwendet, die mit 2µl der Klonierungsreaktion 5-30min auf Eis inkubiert wurden. Nach 30s Hitzeschock bei 42°C, wurde der Ansatz auf Eis gesetzt, anschließend 250µl SOC-Medium zugegeben und 1h bei 37°C und 300rpm auf einem Thermomixer inkubiert.

2.2.1.7 Kultivieren

Beim Kultivieren wurden Bakterien mit aufgenommenem Plasmid selektiert, da nur diese durch Plasmid-gekoppelte Ampicillin-Resistenz in der Lage waren, auf LB-Ampicillin-Agar-Medium zu überleben. In der Folge wurden einzelne Klone ausgewählt und vermehrt.

Zur Selektion wurden unterschiedliche Volumina (20µl und 50µl) des Transformationsansatzes auf LB-Ampicillin-Agar-Platten (Ampicillinkonzentration: 100µg/ml Medium) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Verschiedene separate Koloniepunkte wurden jeweils mit einer gelben Spitze aufgenommen, einzeln in 50ml Röhrchen mit 5ml LB-Medium und Ampicillin (100µg/ml) gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.1.8 Plasmid-Isolierung

Die Plasmid-Isolierung erfolgte mit dem NucleoSpin[®] Plasmid Kit (Macherey-Nagel) nach der Anleitung des Herstellers.

Von der LB-Kultur eines Bakterienklons wurden 2ml eingesetzt, die Zellen lysiert, die Lysate gereinigt und die Plasmid-DNA an eine Säule gebunden, bevor sie gewaschen, getrocknet, eluiert, in Wasser aufgenommen und resuspendiert wurde.

2.2.1.9 Schneiden mit Restriktionsenzymen

Durch Schneiden eines Plasmids mit Restriktionsenzymen und Auftrennung der Nukleinsäuren im Agarosegel kann der Erfolg der Klonierung und bei geeigneter Wahl des Restriktionsenzym auch die Ausrichtung des PCR-Produkts im Vektor beurteilt werden.

Das Schneiden eines Plasmids mit einem Restriktionsenzym erfolgte typischerweise in einem 10µl-Ansatz, bestehend aus dem jeweiligen Restriktionsenzym, dem zugehörigen Puffer, sterilem Wasser und 2µl des Plasmids. Diese Mischung wurde 1h bei 37°C inkubiert und die Größe der resultierenden Fragmente durch Agarosegelelektrophorese untersucht.

2.2.1.10 Sequenzieren

Beim Sequenzieren wird die Nukleotidsequenz einer Probe ausgehend von einer Primerbindungsstelle untersucht und in der vorliegenden Arbeit die Dideoxy- oder Kettenabbruch-Methode von Frederick Sanger (1977) mit Fluoreszenz-markierten Dideoxy-Nukleotiden angewandt.

Das Prinzip dieser Methode besteht darin, dass bei der Synthese des Komplementärstranges ausgehend von einer Primerbindungsstelle Fluoreszenz-markierte Dideoxy-Nukleotide eingebaut werden. Diese Fluoreszenz-markierten Dideoxy-Nukleotide führen zum Kettenabbruch und lassen über die Bestimmung der Kettenlänge in der anschließenden gelelektrophoretischen Auftrennung Rückschlüsse auf die komplementäre Base an dieser Position zu. Durch Verwendung von vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen, die jeweils einer Base zugeordnet sind, ist die Sequenzbestimmung in einem Ansatz möglich.

Die DNA wurde dazu mit dem jeweiligen Primer hybridisiert und anschließend mittels PCR amplifiziert, wobei jeder Nukleotidbase eine bestimmte Fluoreszenzfarbe zugeordnet war. Das PCR-Produkt wurde gereinigt, getrocknet und mittels Sequenziergel der Länge nach getrennt.

Für das Annealing des Primers und die Amplifikation der Probe wurden 750-1.000ng Plasmid-DNA, Primer, DNA-Polymerase und HPLC-Wasser in einem 20µl-Ansatz zusammengebracht.

Sequenzierungsansatz:	Plasmid-DNA (750-1000ng)
1,5µl	Primer (10pmol/µl)
2µl	Big Dye Terminator
2µl	half BD
xµl	HPLC-Wasser

Zur Reinigung des PCR-Produktes wurde der DyeExTM 2.0 Spin Kit (Qiagen) verwendet und anleitungskonform durchgeführt. Die Proben wurden anschließend mittels Speed vac getrocknet und bis zum Auftragen auf das Sequenziergel bei -20°C gelagert.

Die Auftrennung der Fragmente erfolgte innerhalb von 16h auf einem 5% Polyacrylamid und 8M Harnstoff Sequenziergel.

2.2.1.11 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung aus Gewebe wurde mittels TRIzol[®] Reagent (Invitrogen) dem Protokoll des Herstellers entsprechend durchgeführt.

Mit TRIzol[®] Reagent und Plastikstäbchen wurde das Gewebe homogenisiert. Anschließend wurden mit Chloroform die Nukleinsäuren von Proteinen und Lipiden abgetrennt, mit Isopropanol die RNA ausgefällt und mit 75% Ethanol gewaschen. Das RNA-Pellet wurde kurz getrocknet, in RNase-freiem DEPC-Wasser aufgenommen und resuspendiert.

2.2.1.12 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die RNA-Konzentration wurde durch photometrische Messung der Absorption bei 260nm bestimmt. Der Quotient aus 260nm/280nm wurde zur Beurteilung der Reinheit der Probe herangezogen.

2.2.1.13 Reverse Transkriptase (RT)-PCR

Bei der Reverse Transkriptase (RT)-PCR wird aus RNA durch Anlagerung geeigneter Primer und mittels des Enzyms Reverse Transkriptase cDNA synthetisiert, die in der Folge als Matrize für eine PCR dienen kann. Die angeschlossene PCR bezieht sich dabei auf den ursprünglichen mRNA-Level eines bestimmten Gens und schätzt so dessen Transkriptionsrate ab.

Die RT-PCR wurde mit dem SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) entsprechend dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Für das Annealing standen in diesem Kit mit dem Random Hexamer-Primer und dem Oligo(dT)₁₂₋₁₈-Primer zwei verschiedene Startpunkte für die Synthese des DNA-Stranges zur Verfügung. Es wurde der Random Hexamer-Primer verwendet und je Reaktion 4µg RNA eingesetzt, bevor durch Zugabe von RT die komplementäre cDNA synthetisiert werden konnte. Anschließende Zugabe von RNase H führte zum Abbau der RNA und machte die cDNA der nachfolgenden Anlagerung von Primern zugänglich.

Für die angeschlossene PCR wurden die Primer BDNFf und BDNFr verwendet und 2µl der jeweiligen cDNA-Probe für den 30µl-PCR-Ansatz eingesetzt.

2.2.2 Protein-assoziierte Techniken

2.2.2.1 Herstellung von Antikörpern

Allgemeine Unterschiede

Antikörper lassen sich in verschiedene Immunglobulinklassen unterteilen, wobei für immunchemische Methoden meist Antikörper der Klasse IgG verwendet werden.

Monoclonale Antikörper werden meistens durch Immunisierung von Mäusen oder seltener durch Immunisierung von Ratten gewonnen. Nach Fusion von Milzzellen mit Myelomzellen, werden Klone selektiert, die jeweils einen Antikörper produzieren, der gegen ein Epitop des Antigens gerichtet ist. Die durch Fusion entstehende Hybridomzelle hat die gewünschten Eigenschaften der beiden Ursprungszellen: Antikörperproduktion und Unsterblichkeit.

Polyclonale Antikörper werden oft aus Kaninchen gewonnen, für ihre Produktion eignen sich jedoch auch verschiedene andere Tiere. Polyclonale Antikörper werden hergestellt, indem man ein Tier mit einem Antigen immunisiert, das mit dessen Immunsystem bisher keinen Kontakt hatte und daher als „fremd“ eingestuft wird. Das Immunsystem dieses Tieres bildet gegen die fremde Substanz Antikörper, die gegen viele verschiedene Epitope des Antigens gerichtet sind. Die Antikörpertiter werden – zumindest anfangs – mit jeder erneuten Immunisierung höher.

Herstellung des BDNF-Immunsersums

Bevor das Kaninchen immunisiert wurde, wurde Blut abgenommen und daraus Serum isoliert. Dieses Präimmunsersum wurde bei Immunreaktionen alternativ zum Immunsersum verwendet, um die Spezifität der durch die Immunisierung erzeugten Antikörper für die Detektion des Agens belegen zu können.

Zur Herstellung des BDNF-Immunsersum wurde dem Kaninchen im Abstand von 6 Wochen rekombinantes BDNF injiziert, wobei für die Erstimmunisierung am 02.05.2002 1mg Protein und komplettes Freund's Adjuvans verwendet wurde und in den folgenden Immunisierungen (Boosts) jeweils 0,5mg Protein und inkomplettes Freund's Adjuvans zum Einsatz kam.

10 Tage nach jeder Immunisierung wurde Blut abgenommen und daraus – wie in der Folge beschrieben – das Serum isoliert.

Für die Isolierung des Serums wurde das Blut 10min bei 5.000rpm (3214g) und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein 50ml-Röhrchen überführt. Der Überstand wurde

nochmals 10min bei 5.000rpm und 4°C zentrifugiert und der nun klare, gelbliche Überstand abgenommen, aliquotiert, gefroren und bei -20°C gelagert.

2.2.2.2 Herstellung eines Präadsorptionsserums

Präadsorption des Antikörpers mit dem entsprechenden Antigen dient dem Nachweis der Spezifität der Detektion. Zur Herstellung eines Präadsorptionsserums wurden Antiseren bzw. Antikörper mit dem zugehörigen Antigen im gewünschten Puffer im molaren Verhältnis 1:5 gemischt und auf einem Drehrad über Nacht bei 4°C inkubiert.

Die gebildeten Komplexe wurden durch Ultrazentrifugation für 4h bei 25.000rpm und 4°C abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und als Negativkontrolle eingesetzt.

2.2.2.3 Herstellung der Proteinlysate

Die Herstellung der Proteinlysate erfolgte auf unterschiedliche Art und Weise:

Proteinlysate mit Extraktionspuffer

Puffer und Gewebeaufbereitung wurden leicht modifiziert von Kolbeck et al übernommen (Kolbeck, R. et al. 1999).

Extraktionspuffer:	0,05M	Natriumacetat (pH=4,0)
	1M	Natrimchlorid
	1%	Bovines Serumalbumin
	1%	Triton-X-100
	1	Protease Inhibitor Tablette (auf 10ml) mit Pankreasextrakt, Chymotrypsin, Thermo-lysin, Trypsin und Papain

Mit einer Feinwaage wurde das Gewicht des jeweiligen mit flüssigem Stickstoff gefrorenen Gewebes ermittelt und 20µl Extraktionspuffer pro mg Gewebe zugegeben. Mit einem Ultraschallstab wurde das Gewebe homogenisiert und anschließend 1h auf Eis gelagert. Es folgte ein zweiter Durchgang mit dem Ultraschallstab, der ca. 10s dauerte.

Das Gewebelysat wurde 15min bei 14.000rpm (20.800g) und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und als 1. Überstand verwahrt. Das Sediment wurde nochmals mit 10µl Extraktionspuffer pro mg Gewebe bedeckt, gevortext und nach 15min Zentrifugation (14.000rpm bei 4°C) das Sediment und der 2. Überstand separiert.

Der 2. Überstand wurde vor der Verwendung für den Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt; bei Verwendung für den Western Blot wurde er – wie der 1. Überstand und das Sediment – gefroren und bei -20°C gelagert.

Proteinlysate mit RIPA-Puffer

Das frische bzw. tiefgefrorene Gewebe wurde mit 100-200µl RIPA-Puffer bedeckt und bis zur sofortigen Bearbeitung bei 4°C gelagert.

RIPA-Puffer:	50mM	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (pH=7,5)
	150mM	Natriumchlorid
	1%	Nonylphenyl-polyethyleneglycol (NP-40)
	0,5%	Natrium-desoxycholat
	0,1%	Sodiumdodecylsulfat
	1	Protease Inhibitor Tablette (auf 10ml) mit Pankreasextrakt, Chymotrypsin, Thermo-lysin, Trypsin und Papain

Das Gewebe wurde im Eppendorf Gefäß mit einem Plastik-Homogenisator homogenisiert, gevortext und anschließend 15min bei 14.000rpm (20.800g) und 4°C zentrifugiert.

Sediment und Überstand wurden separiert, gefroren und bei -20°C gelagert. Das Einfrieren erfolgte entweder sofort oder nach der Proteinkonzentrationsbestimmung. Im letzteren Fall konnte der Überstand portioniert, mit Laemmli-Puffer – dessen Zusammensetzung im Kapitel Western Blot beschrieben ist – versetzt und aufgekocht für wiederholte spätere Analysen konserviert werden.

2.2.2.4 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bradford

Die Methode basiert auf der Bindung von Proteinen an den Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250. Diese Bindung verursacht eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 465nm nach 595nm, welche photometrisch detektiert werden kann.

Für die Messung wurden jeweils 1ml Bradford-Lösung mit einem entsprechenden Aliquot (1-3µl) der zu messenden Proteinlösung vermischt, 10-15min bei RT inkubiert und anschließend die Absorption bei 595nm mit dem Spektralphotometer ermittelt. Als Referenz diente eine Eichkurve aus Nullwert und verschiedenen Konzentrationen von Rinderserumalbumin.

Wenn die Proteine in RIPA-Puffer aufgenommen worden waren, wurde das entsprechende Volumen RIPA-Puffer auch dem Nullwert und den anderen Proben für die Eichkurve zugegeben, um den durch RIPA-Puffer induzierten Farbumschlag zu berücksichtigen.

2.2.2.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist eine Methode zur Bestimmung der Konzentration von Proteinen. Die zu untersuchende Substanz wird dabei zunächst an einem festen Träger konzentriert, an den vorher ihr spezifischer Reaktionspartner gekoppelt wurde. Ein in der Folge zugegebener Stoff bindet einerseits ebenfalls an die zu untersuchende Substanz und ist andererseits mit einem Enzym markiert, das einen kolorimetrischen Nachweis erlaubt. Durch Vergleich mit einer Referenzkurve gelingt so die Beurteilung der Konzentration der zu untersuchenden Substanz.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Quantikine[®] Human BDNF Immunoassay (R&D Systems) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die konservierte Struktur von BDNF erlaubte die Anwendung des Kits für Maus-Gewebe.

BDNF-spezifische monoclonale Antikörper waren an eine Mikrotiterplatte gekoppelt und führten zur Bindung des in einer zugegebenen Probe befindlichen BDNFs. Dieses BDNF wurde anschließend ebenfalls von einem Peroxidase-gekoppelten BDNF-spezifischen monoclonalen Antikörper gebunden („Sandwichverfahren“), bevor in 3 Waschdurchgängen ungebundene Antikörper entfernt wurden. Ein zugegebenes Substrat, ein 1:1-Gemisch aus Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin, führte zu einer Farbentwicklung, die nach 30min abgestoppt und mit einem ELISA-Image Reader bei 450nm gemessen wurde. Die BDNF-Konzentration der jeweiligen Probe war zur Farbentwicklung proportional und konnte durch Vergleich mit den BDNF-Standards ermittelt werden.

2.2.2.6 Immunpräzipitation

Als Immunpräzipitation wird die Ausfällung von Antigen-Antikörper-Komplexen bezeichnet. Die Präzipitatbildung hängt dabei von der Temperatur und dem pH-Wert ab.

Die Immunpräzipitation wurde im vorliegenden Fall unter Verwendung von Protein G Agarose (Roche) durchgeführt. Das aus Bakterienzellwänden isolierte Protein besitzt eine hohe Affinität zum F_c-Teil von Antikörpern, wodurch gebundene Antikörper mit ihrem Antigen aus einer Lösung gebunden und isoliert werden können.

Der gesamte Ablauf erfolgte auf Eis bzw. bei 4°C. Pro mg Gewebe wurde 20µl Niedrigsalz-Puffer zugegeben und das Gewebe mit dem Ultraschallstab homogenisiert. Die Proteinkonzentration wurde bestimmt, 400µg der Probe in ein frisches Eppendorf Gefäß überführt und mit Niedrigsalzpuffer auf 400µl Gesamtvolumen aufgefüllt.

Es wurde 5% Protein G Agarose zugegeben, 30min bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert und die im Rahmen des „Preclearing“ gebundenen Antikörper 5min bei 1.500 x g und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorf Gefäß überführt, Antikörper in einer Konzentration von 1µg/ml zugegeben und über Nacht bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert.

Um die Antikörper und ihre Antigene zu binden, wurde 5% Protein G Agarose zugegeben, 1h bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert und 1min bei 14.000rpm (20.800g) und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Im Sediment lagen die gewünschten Komplexe an Agarose gebunden vor und wurden durch 5 Waschschrte mit Hochsalz-Puffer gereinigt. Je Waschschrte wurde das Sediment mit 1ml Hochsalz-Puffer bedeckt, 1min bei 14.000rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen. Anschließend wurde 1 Waschschrte mit Nidrigsalz-Puffer durchgeführt, das Sediment mit Laemml-Puffer versetzt, für 5-10min bei 95°C inkubiert und dann gelelektrophoretisch aufgetrennt oder bei -20°C gelagert.

Nidrigsalz-Puffer:	50mM	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (ph=7,5)
	250mM	Natriumchlorid
	10%	Glycerol
	1%	Triton-X-100
	1,5mM	Magnesiumchlorid
	0,01%	β-Mercaptoethanol
	1mM	Natriumvanadat
	2,5mM	Natriumfluorid
	1	Protease Inhibitor Tablette (auf 10ml) mit Pankreasextrakt, Chymotrypsin, Thermo-lysin, Trypsin und Papain
	Hochsalz-Puffer:	50mM
500mM		Natriumchlorid
10%		Glycerol
1%		Triton-X-100
1,5mM		Magnesiumchlorid
0,01%		β-Mercaptoethanol
1mM		Natriumvanadat
2,5mM		Natriumfluorid

2.2.2.7 Western Blot

Ein Blot ist ein Verfahren, um Makromoleküle, die man zuvor in einem Gel elektrophoretisch getrennt hat, dauerhaft auf einer Membran zu fixieren. Handelt es sich hierbei um DNA, so wird dieser Vorgang nach seinem Entdecker Ed M. Southern (1975) benannt. In Anlehnung an diese Bezeichnung wird der Transfer von RNA auf eine Membran Northern Blot und der Transfer von Proteinen auf eine Membran Western Blot genannt.

Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Die Proteinauftrennung wurde mit Polyacrylamid-Gelen erreicht. Die Proteine wurden dabei zuerst in einem Sammelgel fokussiert und dann mit einem Trenngel ihrem Molekulargewicht nach separiert.

Gereinigte Glasplatten wurden passend aufeinander gelegt, durch Silikonspacer abgedichtet und mit Klammern unten und an den Seiten fixiert. Ein für die jeweilige Auftrennung geeignetes Trenngel wurde gemischt, der Plattenzwischenraum bis 1-1,5cm unterhalb der Oberkante damit befüllt, das noch flüssige Polyacrylamid-Gel mit 70% Ethanol beschichtet und in vertikaler Position 30min auspolymerisiert. Anschließend wurde die Beschichtung abgekippt, das Trenngel mit einem frisch gemischten Sammelgel bedeckt und der Kamm blasenfrei eingesetzt. Nach vollständiger Polymerisation wurden vorsichtig Kamm und Gummispacer entfernt, die Platten mit dem Gel in eine Laufkammer eingebracht und oben und unten mit SDS-Laufpuffer in Kontakt gebracht.

Die mit Laemmli-Puffer versetzten Proteinlysate wurden 5-10min bei 95°C denaturiert, bevor sie in die Taschen des Geles transferiert wurden. Zur Größenbestimmung wurde ein Proteinmarker mitgeführt. Die Elektrophorese erfolgte bei 40mA und 120V und war nach ca. 2h beendet.

4x Lower-Puffer:	1,5M	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (pH=8,7)
	0,4%	Sodiumdodecylsulfat
4x Upper-Puffer:	0,5M	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (pH=6,8)
	0,4%	Sodiumdodecylsulfat
5x SDS-Laufpuffer:	0,125M	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
	1,25M	Glycin
	0,5%	Sodiumdodecylsulfat

5x Laemmli-Puffer:	2%	Sodiumdodecylsulfat
	8%	Upper-Puffer
	2%	β -Mercaptoethanol
	60 μ g/ml	Bromphenol-Blau
	20%	Glycerol

	Trenngel				Sammelgel
	10%	12,5%	15%	20%	6%
40% PAA	5,3ml	6,7ml	8,0ml	10,7ml	1,5ml
4x Lower-Puffer	5,3ml	5,3ml	5,3ml	5,3ml	-
4x Upper-Puffer	-	-	-	-	1,25ml
Aqua dest.	10,7ml	9,3ml	8,0ml	5,3ml	7,1ml
APS	200 μ l	200 μ l	200 μ l	200 μ l	100 μ l
TEMED	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l

Proteintransfer

Der Proteintransfer erfolgte im semidry-Blot-Verfahren in einer geeigneten Blotkammer, wobei die mittels Gelelektrophorese getrennten Proteine vom Gel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen wurden.

Whatman-Papiere und Nitrocellulosemembran wurden auf die Größe des Trenngels zugeschnitten und in Western Blot-Puffer eingeweicht. Das Gel wurde in Wasser aus den Platten gelöst, das Sammelgel abgetrennt und die Blotkammer mit den einzelnen Schichten bestückt. Der Stapel bestand aus drei Stücken Whatman-Papier, der Nitrocellulosemembran, dem Trenngel und nochmals drei Stücken Whatman-Papier, die alle feucht und blasenfrei genau aufeinandergelegt wurden, bevor die Blotkammer geschlossen wurde. Der Proteintransfer erfolgte bei 100mA je Gel und dauerte ca. 1h.

Western Blot-Puffer:	48,5mM	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
	39mM	Glycin
	0,04%	Sodiumdodecylsulfat
	20%	Methanol

Ponceau-Färbung

Nach dem Blotten wurde die Membran zur Überprüfung des Proteintransfers 3-5min bei RT mit Ponceau-Lösung gefärbt. Anschließend wurde die Membran gründlich mit destilliertem Wasser gewaschen, die überschüssige rote Farbe entfernt und das mit Ponceau-Färbung erkannte Bandenmuster für die Dokumentation fotografiert.

Kolloidalfärbung

Zur Beurteilung der Vollständigkeit des Proteintransfers wurde das Gel einer Kolloidalfärbung unterzogen und so im Gel verbliebene Proteine erkannt.

Dazu wurde das Gel 2h in 10% Essigsäure und 30% Methanol inkubiert. Anschließend wurde es über Nacht in Kolloidalfärbelösung inkubiert und schließlich je nach gewünschtem Kontrast mit Wasser gewaschen.

Kolloidalfärbelösung:

10%	Ammoniumsulfat
10%	Phosphatpuffer
0,12%	Coomassie G-250
20%	Methanol

Immundetektion membrangebundener Proteine

Mit spezifischen Primärantikörpern konnten bestimmte Proteine auf der Membran identifiziert werden, deren Lokalisation durch einen Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper ermittelt wurde. Die Peroxidase katalysierte die Oxidation des zugegebenen 5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedions und löste damit eine Chemilumineszenz aus, die mittels LAS-Reader oder Röntgenfilmexposition zur Detektion der Proteine führte.

Die Membran wurde 90min bei RT oder über Nacht bei 4°C mit blockierender Lösung inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen und die hohe Affinität der Membran zu Proteinen herabzusetzen. Die blockierende Lösung bestand dabei aus Immunoblot-Puffer mit 5% Milchpulver, 1% Pferdeserum oder 3% Rinderserumalbumin.

Immunoblot-Puffer:

	Phosphate buffered saline
0,05%	Tween20
0,1%	Polyvinylpyrrolidone (PVP-40)

Im Anschluß wurde die Membran 1h bei RT mit dem Primärantikörper in Immunoblot-Puffer inkubiert, ehe drei Waschschrte mit Immunoblot-Puffer erfolgten. Nach Inkubation mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper in Immunoblot-Puffer 1h bei RT, wurden drei Waschschrte mit Immunoblot-Puffer durchgeführt, zwei Entwickler-Lösungen im Verhältnis 1:1 gemischt und die Membran 1min damit bedeckt.

Die entstehende Chemilumineszenz konnte auf zweierlei Art dokumentiert werden:

In einen Fall wurde die Membran in Folie eingeschlagen, in eine Expositions-kammer gelegt und mit Röntgenfilmen (Fuji Super RX 13x18cm) exponiert. Um eine optimale Detektion zu erzielen wurden verschiedene Expositionszeiten von 10s, 30s, 1min, 3min, 5min, 10min und 1h gewählt. Die Röntgenfilme wurden in einer Filmentwicklungs-maschine entwickelt.

Im anderen Fall wurde die Membran auf Folie gelegt und in den LAS-Reader eingebracht. Die im Zeitverlauf entstandene Signalstärke konnte auf dem Bildschirm abgelesen und so ein geeignetes Bild ausgewählt werden.

Entwickler -Lösung A:

0,1M	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (pH=8,3)
0,4mM	p-Coumarsäure
2,5mM	5-Amino-2,3-dihydro-1,4- phthalazinedion

Entwickler -Lösung B:

0,1M	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (pH=8,3)
30µl	30% H ₂ O ₂ auf 50ml

Entfernung proteingebundener Antikörper

Um eine Membran mit einem anderen Antikörper zu inkubieren, wurden mit diesem Verfahren alle an die Membran gebundenen Antikörper entfernt. Dazu wurde die Membran für 15min bei 70°C in Stripping-Puffer inkubiert und anschließend gründlich mit destilliertem Wasser gewaschen.

Stripping-Puffer:	2%	Sodiumdodecylsulfat
	62,5mM	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
	83µl	β-Mercaptoethanol

pH-Wert auf 6,7 einstellen

Anschließend konnte mit dem erneuten Blockieren der unspezifischen Bindungen fortgefahren werden.

Bestimmung der Bandenintensitäten

Die Bestimmung der Bandenintensitäten erfolgte mittels Aida Software. Zur Intensitätsmessung wurde ein Rechteck der Bandengröße angepasst und die unterschiedlichen Bandenintensitäten innerhalb der immer gleich bleibenden Rechtecksgröße ermittelt. Dabei wurde jeweils die Hintergrundintensität des jeweiligen Western Blots erfasst und von den Bandenintensitäten abgezogen.

Um entsprechende Proteinmengen miteinander vergleichen zu können, wurde jeweils die Intensität von Aktin als Beladungskontrolle mitbestimmt, was analog geschah. Die Bandenintensitäten wurden auf Aktin als Beladungskontrolle normalisiert und „arbitrary units“ generiert.

2.2.3 Mauslinien und Maus-assozierte Techniken

2.2.3.1 Mauslinien und ihre Genotypisierung

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene genetisch veränderte Mäuse untersucht. Dies beinhaltete sowohl klassische knock out-Mäuse, bei denen ein Gen ganz oder teilweise entfernt worden war, als auch konditionale knock out-Mäuse, bei denen das Fehlen des jeweiligen Gens von einem zelltypspezifischen Promotor abhing, so dass es nur in bestimmten Zellen zu einer Exzision des Gens kam.

Im Folgenden sind die verwendeten Mauslinien mit dem jeweiligen Genotypisierungsansatz kurz beschrieben:

BDNF knockout-Mauslinie

Zum Nachweis der Rekombination des BDNF-Gens wurden zwei Primerpaare verwendet:

BD2A und BK01 für die Amplifizierung des wt-Allels (Bandengröße ~ 450bp)

BD2A und 3'neo für die Amplifizierung des ko-Allels (Bandengröße ~ 420bp)

Wt-Ansatz und ko-Ansatz erfolgten separat. Der 30µl-Ansatz je 0,2ml PCR-Tube setzte sich wie folgt zusammen:

16,15 µl	Aqua ad iniectabilia
6 µl	Betaine 5fach
3 µl	PCR-Puffer 10fach
3 µl	dNTPs 2mM
0,3 µl	Primer 1 (BD2A)
0,3 µl	Primer 2 (wt: BK01 / ko: 3'neo)
0,25 µl	Taq Polymerase
1 µl	DNA-Probe

Das PCR-Programm umfaßte 35 Zyklen aus je 95°C für 30s, 60°C für 45s sowie 72° für 150s.

floxed BDNF-Mauslinie

Zum Nachweis der Rekombination des geflochten BDNF-Gens wurde ein Primerpaar verwendet:

bdnf13 und bdnf14 (wt-Bandengröße ~ 600bp / floxed-Bandengröße ~ 700bp)

Der 50µl-Ansatz je 0,2ml PCR-Tube setzte sich wie folgt zusammen:

31,8 µl	Aqua ad iniectabilia
10 µl	Betaine 5fach
5 µl	PCR-Puffer 10fach
1 µl	dNTPs 10mM
0,1 µl	Primer 1 100pmol (bdnf13)
0,1 µl	Primer 2 100pmol (bdnf14)
1 µl	Taq Polymerase
1 µl	DNA-Probe

Das PCR-Programm umfaßte 35 Zyklen aus je 95°C für 30s, 60°C für 45s sowie 72° für 150s.

CNTF knockout-Mauslinie

Zum Nachweis der Rekombination des CNTF-Gens wurden zwei Primerpaare verwendet:

CNTF E1S und CNTF 1A für die Amplifizierung des wt-Allels (Bandengröße ~320bp) bzw. des ko-Allels (Bandengröße ~ 1.400bp)

CNTF E1S und 5'neo für die Amplifizierung des ko-Allels (Bandengröße ~410bp)

Wt-Ansatz und ko-Ansatz erfolgten separat. Der 30µl-Ansatz je 0,2ml PCR-Tube setzte sich wie folgt zusammen:

16,15 µl	Aqua ad iniectabilia
6 µl	Betaine 5fach
3 µl	PCR-Puffer 10fach
3 µl	dNTPs 2mM
0,3 µl	Primer 1 (CNTF E1S)
0,3 µl	Primer 2 (wt: CNTF 1A / ko: 5'neo)
0,25 µl	Taq Polymerase
1 µl	DNA-Probe

Das PCR-Programm umfaßte 35 Zyklen aus je 94°C für 45s, 62°C für 30s sowie 72° für 90s.

LIF knockout-Mauslinie

Zum Nachweis der Rekombination des LIF-Gens wurden zwei Primerpaare verwendet:

LIF2 und RTL3 für die Amplifizierung des wt-Allels (Bandengröße ~ 920bp)

LIFA4 und 3'neo für die Amplifizierung des ko-Allels (Bandengröße ~ 500bp)

Wt-Ansatz und ko-Ansatz erfolgten separat. Der 30µl-Ansatz je 0,2ml PCR-Tube setzte sich wie folgt zusammen:

16,15 µl	Aqua ad iniectabilia
6 µl	Betaine 5fach
3 µl	PCR-Puffer 10fach
3 µl	2mM dNTPs
0,3 µl	20pmol Primer 1 (wt: LIF2 / ko: LIFA4)
0,3 µl	20pmol Primer 2 (wt: RTL3 / ko: 3'neo)
0,25 µl	Taq Polymerase
1 µl	DNA-Probe

Das PCR-Programm umfaßte 35 Zyklen aus je 95°C für 30s, 60°C für 45s sowie 72° für 150s.

CT-1 knockout-Mauslinie

Zum Nachweis der Rekombination des CT-1-Gens wurden zwei Primerpaare verwendet:

CT1 S1 und CT1 A2 für die Amplifizierung des wt-Allels (Bandengröße ~ 330bp)

CT1 A6 und 5'neo für die Amplifizierung des ko-Allels (Bandengröße ~ 630bp)

Wt-Ansatz und ko-Ansatz erfolgten separat. Der 30µl-Ansatz je 0,2ml PCR-Tube setzte sich wie folgt zusammen:

16,15 µl	Aqua ad iniectabilia
6 µl	Betaine 5fach
3 µl	PCR-Puffer 10fach
3 µl	dNTPs 2mM
0,3 µl	Primer 1 (wt: CT1 S1 / ko: CT1 A6)
0,3 µl	Primer 2 (wt: CT1 A2 / ko: 5'neo)
0,25 µl	Taq Polymerase
1 µl	DNA-Probe

Das PCR-Programm umfaßte 35 Zyklen aus je 95°C für 45s, 64°C für 30s sowie 72° für 60s.

floxed IGF-1-Rezeptor-Mauslinie

Zum Nachweis der Rekombination des gefloxten IGF-1-Rezeptor-Gens wurde ein Primerpaar verwendet:

REC SEQ und X3 SEQ (wt-Bandengröße ~ 500bp / floxed-Bandengröße ~ 600bp)

Der 50µl-Ansatz je 0,2ml PCR-Tube setzte sich wie folgt zusammen:

31,8 µl	Aqua ad iniectabilia
10 µl	Betaine 5fach
5 µl	PCR-Puffer 10fach
1 µl	dNTPs 10mM
0,1 µl	Primer 1 100pmol (REC SEQ)
0,1 µl	Primer 2 100pmol (X3 SEQ)
1 µl	Taq Polymerase
1 µl	DNA-Probe

Das PCR-Programm umfaßte 35 Zyklen aus je 95°C für 30s, 60°C für 45s sowie 72° für 150s.

Mauslinie mit Nervenzell-spezifischer Expression der Cre recombinase (NFL-Cre)

Zum Nachweis der NFL-Cre wurde ein Primerpaar verwendet:

PMC-Cre und NFL-SEQ (Cre-transgen mit Bandengröße ~ 250bp)

Der 50µl-Ansatz je 0,2ml PCR-Tube setzte sich wie folgt zusammen:

37,5 µl	Aqua ad iniectabilia
5 µl	PCR-Puffer 10fach
1 µl	dNTPs 10mM
5µl	Enhancer 60°C
0,1 µl	Primer 1 100pmol (PMC-Cre)
0,1 µl	Primer 2 100pmol (NFL-SEQ)
0,3 µl	Taq Polymerase
1 µl	DNA-Probe

Das PCR-Programm umfaßte 35 Zyklen aus je 95°C für 30s, 60°C für 45s sowie 72° für 150s.

2.2.3.2 Maus-assozierte Techniken

Altersbestimmung der Mausentwicklung

Bei der Mausentwicklung wurden Embryonaltage (E) und Postnaltage (P) gezählt. Zur Abschätzung einer Paarung wurden verpaarte Mäuseweibchen jeden Morgen einer Plaque-Kontrolle unterzogen. Bei Vorliegen eines Vaginalplaques wurde dieser Tag als E1 definiert, da die Paarung am Vortag bzw. in der Nacht erfolgte. Ab E11-E13 konnte palpatorisch und visuell ermittelt werden ob es zu einer Schwangerschaft gekommen war. Der Vormittag von E14 wurde als E13,5 gewertet und dieses Stadium für die Isolierung neuraler Stammzellen und cortikaler Vorläuferzellen bevorzugt.

Der Mäusenachwuchs wurden meist in der Nacht zwischen E19 und E20 geboren und der darauf folgende Tag galt als P1 (E20 = P1).

Intraperitoneale Injektion

Für die intraperitoneale Injektion wurde die Maus mit Daumen und Zeigefinger der linken Hand am Nackenfell gegriffen und so deren Kopfstellung fixiert. Der Schwanz wurde zwischen kleinem Finger und Handfläche eingeklemmt, um Bewegungen des Körpers ebenfalls zu vermeiden.

Der in dieser Stellung befindlichen Maus wurde im caudo-lateralen Bereich der gespannten Bauchdecke eine Spritze in den Bauchraum eingeführt und die gewünschte Menge der gewünschten Substanz appliziert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Bromdesoxyuridin (BrdU) und die Mischung eines Narkotikums intraperitoneal injiziert. BrdU wurde in der Konzentration 100µg/g Körpergewicht eingesetzt; die Mischung des Narkotikums bestand aus Ketamin (Ketanest[®]) 100µg/g Körpergewicht und Xylazin (Rompun[®]) 5µg/g Körpergewicht.

Betäuben und Töten

Betäubt wurde mit Diethyläther, welches der Maus in einem abgedeckten Glasbehälter verabreicht wurde. Nach anfänglicher Aktivitäts- und möglicher Erregungsphase traten nach ca. 10s tiefere Phasen der Narkose ein.

Die Mäuse wurden mittels cervikaler Dislokation, Decapitation oder Überdosierung eines Narkotikums getötet.

Cervikale Dislokation oder Genickbruch wurde nach kurzer Betäubung durchgeführt, indem die Maus auf dem Tisch liegend mit der Messerrückseite im Nackenbereich fixiert und durch Zug am Schwanz getötet wurde.

Decapitation oder Enthauptung wurde ebenfalls nach kurzer Betäubung durchgeführt und bestand aus der Enthauptung der Maus mit einer großen Schere.

Bei der Tötung mittels Überdosierung eines Narkotikums wurde der Maus 100µg Ketamin (Ketanest[®]) und 5µg Xylazin (Rompun[®]) pro g Körpergewicht intraperitoneal gespritzt und der Zustand der Maus durch Reflextestung kontrolliert.

Hippocampuspräparation

Nach Tötung und Präparation des Gehirns konnte die Präparation des Hippocampus erfolgen, was in Abbildung 2-2 veranschaulicht ist. Zunächst wurden die Hemisphären vorsichtig auseinander geschoben, was den Blick auf das Corpus callosum ermöglichte. Dieses wurde längs durchtrennt, wobei anteriore Anteile intakt blieben. Nach Beseitigung der Meningen

zwischen Cerebrum und Cerebellum konnten die Hemisphären nach antero-lateral aufgeklappt werden. Der anteriore Hippocampusanteil wurde mit einem Löffel unterfahren und der Hippocampus der Struktur folgend als Ganzes vorsichtig herausgelöst.

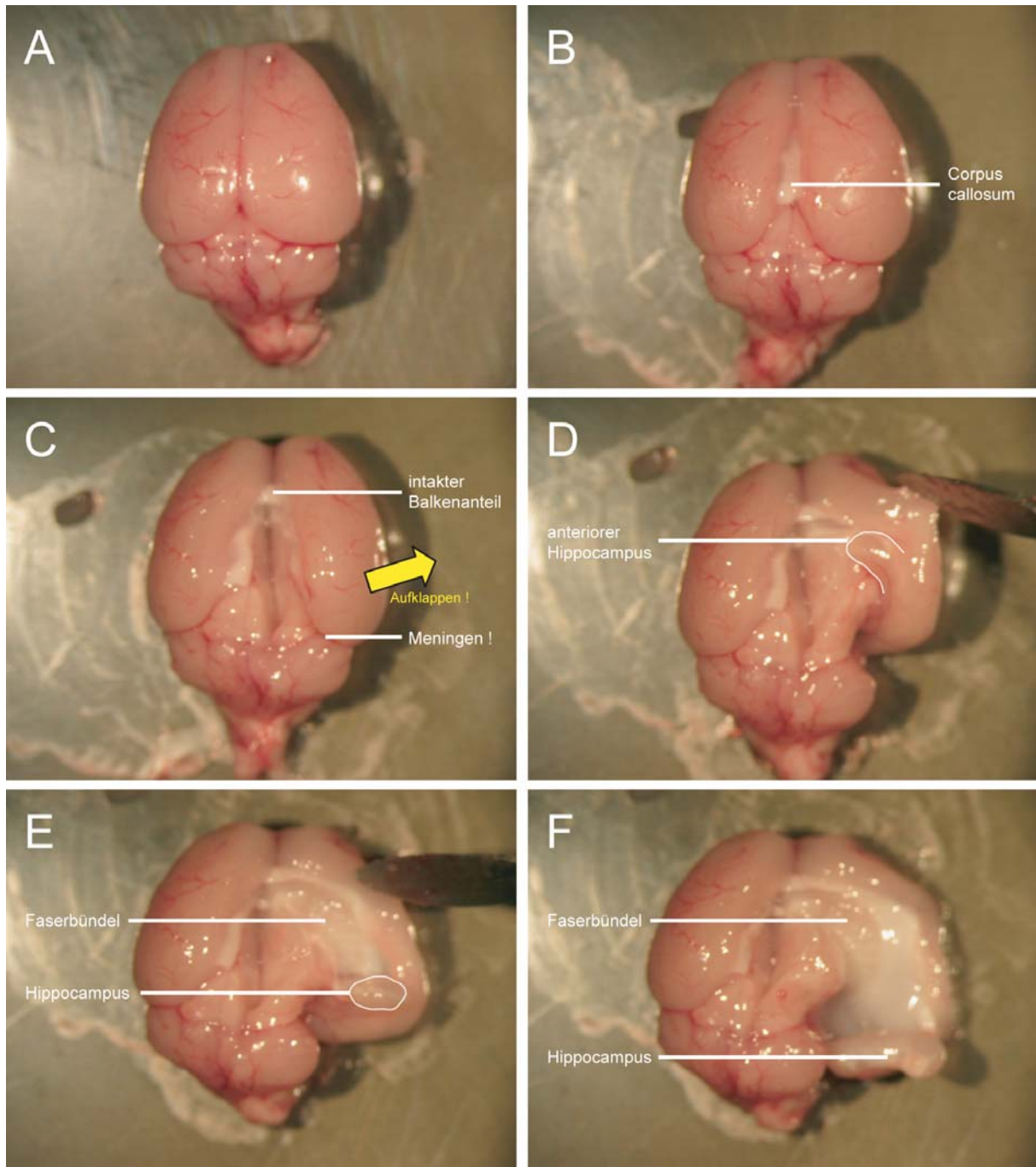


Abbildung 2-2 Schritte der Hippocampuspräparation. Frontalaufsicht (A), Auseinanderschieben der Hemisphären (B), Durchtrennen des Corpus callosum und Aufklappen nach antero-lateral (C), Unterfahren des anterioren Hippocampusanteils (D) und Herauslösen (E). Lagebeziehung und Struktur des Hippocampus (F).

Präparation zur Gewinnung von neuronalen Stammzellen

An E13,5 wurde das trächtige Mäuseweibchen mit Diethyläther kurz betäubt, getötet und ihr Uterus mit den Embryonen präpariert. Die Embryonen wurden freigelegt und einzeln präpariert.

Zur Bestimmung des jeweiligen Genotyps wurde die Schwanzspitze in Lysispuffer gegeben. Für die Gewinnung von neuronalen Stammzellen (engl. neural stem cells, NSCs) wurde die vordere Hälfte des Mausgehirns (Vorderhirn-Bläschen) isoliert (Abbildung 2-3) und in Hanks balanced salt solution (HBSS) auf Eis gelagert.

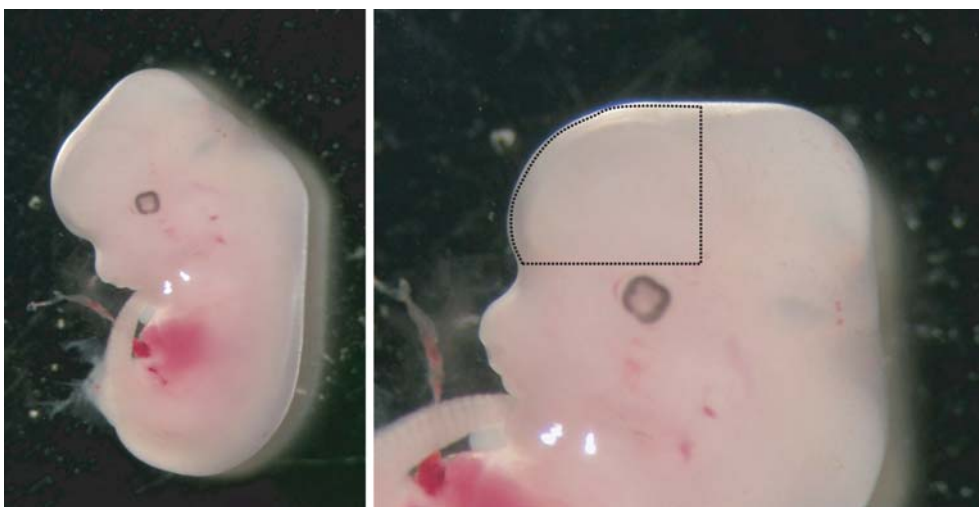


Abbildung 2-3 Region zur Präparation neuronaler Stammzellen.

Präparation des Cortex

An E12,5 - E13,5 wurde das trächtige Mäuseweibchen mit Diethyläther kurz betäubt, getötet und ihr Uterus mit den Embryonen präpariert und in kaltem HBSS gelagert. Die Embryonen wurden freigelegt, jeder in eine separate Schale mit kaltem HBSS gesetzt und einzeln präpariert.

Zur Bestimmung des jeweiligen Genotyps wurde die Schwanzspitze in Lysispuffer gegeben. Für die Präparation des Cortex wurde ein Embryo auf den Rücken gelegt und mit zwei Nadeln durch die Augen so an der Schale befestigt, dass die Region des Cortex für die weitere Präparation gut zugänglich war. Haut und Schädeldecke wurden entfernt und die beiden Hemisphären freigelegt. Der Bulbus olfactorius wurde abgetrennt und von dort startend die Meningen abgezogen. Der unbedeckte Cortex wurde isoliert und in Medium auf Eis gelagert.

Perfusion

Die Bauchdecke der narkotisierten Maus wurde eröffnet, das Zwerchfell beider Seiten durchtrennt, das Herz freigelegt und vom Pericard befreit. Die an die Pumpe angeschlossene Nadel wurde in den linken Ventrikel eingebracht, der rechte Vorhof eröffnet und die Pumpe aktiviert.

Für die Perfusion wurde 2%PFA in PBS, 4%PFA in PBS, Fixans 1 oder Fixans 2 verwendet.

Fixans 1:	0,1M	Cacodylat
	4%	PFA
	2%	Glutaraldehyd

pH auf 7,4 einstellen

Fixans 2:	0,12M	Phosphat-Puffer
	0,02mM	CaCl ₂
	1%	PFA
	1%	Glutaraldehyd

Eine gelungene Perfusion der Maus zeichnete sich durch Muskelkrämpfe, ein Entfärben der Leber und Steif-werden des Mausekörpers aus. Schaum im Nasenbereich der Maus wies auf eine Perforation des Lungenkreislaufs und somit eine misslungene Perfusion hin.

2.2.4 Herstellung verschiedener Gewebeschnitte

Unter dieser Überschrift werden in der vorliegenden Arbeit die unterschiedlichen Vorbedingungen berücksichtigt, die Perfusion, Fixierung des Gewebes, Erstellung der Schnitte und ihre Vorbehandlung umfassen.

Die mögliche Verwendung dieser Schnitte für die Immunhistochemie und deren Durchführung ist unter 2.2.6 beschrieben.

2.2.4.1 Präparation von Vibratomschnitten

Nach Betäubung mit Diethyläther wurde das Tier ca. 10min mit 4%PFA in PBS oder 2%PFA in PBS perfundiert. Das gewünschte Gewebe wurde präpariert und bis zu 24h im Kühlschrank nachfixiert, bevor es in PBS überführt wurde.

Anschließend wurde das Gewebe mit dem Vibratom geschnitten. Besonders fragiles Gewebe wurde zur Erhöhung der Stabilität vor dem Schneiden in 6% Agarose eingebettet. Beim Schneiden wurden je nach Gewebe Schnittdicken von 40-100µm gewählt, die frei schwimmenden Schnitte in PBS aufgenommen und im Kühlschrank gelagert.

2.2.4.2 Präparation von Gefrierschnitten

Nach Betäubung mit Diethyläther wurde das Tier ca. 10min mit 4%PFA in PBS oder 2%PFA in PBS perfundiert. Das gewünschte Gewebe wurde präpariert und bis zu 24h im Kühlschrank nachfixiert, bevor es nach kurzem Waschen mit PBS in 30% Sucrose umgesetzt wurde. Der Gefrierschutz der Sucrose war abgeschlossen, wenn das Gewebe auf den Boden des Behälters gesunken war.

Anschließend wurde das Gewebe je nach gewünschter Schnittdicke unterschiedlich weiterbehandelt.

Im Fall der dickeren Schnitte wurde das Gewebe in gekühltem Isopentan eingefroren, mit TissueTek® aufgeblickt und Schnitte der Dicke 40µm hergestellt, die in Puffer aufgenommen wurden. Die Schnitte konnten ca. 1 Woche bei 4°C gelagert werden.

Im Fall der dünneren Schnitte wurde das Gewebe mit TissueTek® in einem Plastikförmchen auf Trockeneis eingedeckt und dabei einerseits auf eine komplette Beschichtung und andererseits auf eine günstige Ausrichtung des Gewebes geachtet. Das Gewebe konnte bei -80°C gelagert oder gleich mit dem Kryostat geschnitten werden, wobei sich Schnittdicken von 10-14µm bewährten. Die Schnitte wurden mit dem Objektträger aufgenommen und in einem Behälter bei -20°C gelagert.

2.2.4.3 Präparation von Paraffinschnitten

Nach Betäubung mit Diethyläther wurde das Tier ca. 10min mit 4%PFA in PBS oder 2%PFA in PBS perfundiert. Das gewünschte Gewebe wurde präpariert, über Nacht im Kühlschrank nachfixiert und mehrfach in PBS gewaschen. Anschließend wurde es zugeschnitten, mit der

aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, über Chloroform in Paraffin überführt, schließlich in Paraffin eingelassen und die Blöcke bei 4°C ausgehärtet.

Es wurden Paraffinschnitte mit einer Schnittdicke von 7-13µm hergestellt, auf dem Wasserbad bei 45°C gestreckt, mit dem Objektträger aufgenommen und über Nacht im Brutschrank getrocknet.

Vor Beginn der Immunhistochemie wurden die Schnitte für 2x 15min in Xylol entparaffiniert und mit der absteigenden Alkoholreihe ins wässrige Milieu überführt, bevor sie 7min bei 37°C mit einer Protease-Lösung zur Demaskierung der PFA-Vernetzung inkubiert wurden.

Protease-Lösung:	25mg	Protease Typ 24
	60ml	Aqua dest.

15min Vorinkubation bei 37°C

Die Schnitte wurden mit 100% Ethanol gespült und auf einer Heizplatte getrocknet.

2.2.4.4 Schnittpräparation für die Elektronenmikroskopie

Die Schnitte für die Elektronenmikroskopie wurden mit zwei verschiedenen Puffern und auf unterschiedliche Art und Weise hergestellt. Dies erfolgte in Kooperation mit Esther Asan (Anatomie, Würzburg).

Präparation mit Standardverfahren

Nach Betäubung mit Diethyläther wurde das Tier ca. 10min mit Fixans 1 perfundiert. Das gewünschte Gewebe wurde präpariert und über Nacht bei 4°C nachfixiert.

Das Gehirn wurde mehrfach in PBS gewaschen, bevor Vibratomschnitte der gewünschten Gehirnregion angefertigt wurden (Schnittdicke 300µm). Die Schnitte wurden nochmals gründlich mit PBS gewaschen und anschließend 1h in 1% Osmiumtetroxyd in PBS gegeben. Nach dreimaligem Waschen in H₂O_{dd} wurden die Schnitte mit der aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und in Propylenoxid überführt; dabei wurden die Stationen 30%, 50% und 70% Ethanol jeweils 15min durchlaufen, die Schnitte 1-3h in 2% Uranylacetat in 70% Ethanol inkubiert, die Stationen 70%, 80%, 90% und 96% Ethanol jeweils 15min und 100% Ethanol 2x15min durchlaufen, ehe sie 2x30min in Propylenoxid inkubiert wurden.

Die Schnitte wurden in einen 1:1-Gemisch aus Propylenoxid und Epon 812 über Nacht belassen und anschließend 2x2h in frischem Epon 812 inkubiert. Mit einer Glasangel wurden die Schnitte vorsichtig aus dem Epon-Gefäß gefischt und zur Flacheinbettung auf eine

Kunststoffplatte gelegt, mit Folie beschichtet und Gewichten beschwert bei 60°C über Nacht gelagert.

Die gewünschte Gehirnregion wurde ausgeschnitten, mit einem Epon tropfen auf ein bereits ausgehärtetes Eponstück gesetzt und dies nochmals bei 60°C ausgehärtet. Nach dem Trimmen des Blockes konnten Semidünn- bzw. Ultradünnschnitte hergestellt werden. Letztere wurden auf Objektträgernetzchen aufgefangen, nach Standardmethoden kontrastiert (Reynolds, E.S. 1963) und in der Folge im Transmissionselektronenmikroskop betrachtet.

Präparation mit alternativem Verfahren

Die Präparatherstellung mit dem alternativen Verfahren (siehe S.51) orientierte sich an der Vorgehensweise von Chan-Palay (Chan-Palay, V. and Palay, S.L. 1974) und hatte den Zweck einer möglichst guten Darstellung von Astrozyten.

Nach Betäubung mit Diethyläther wurde das Tier – nach ca. 30sek Vorspülen mit 1% Heparin in PBS – ca. 10min mit Fixans 2 perfundiert und der Kopf des Tieres darin ca. 18h bei 4°C nachfixiert.

Entsprechende Gehirnregionen wurden präpariert und 3x5min in 0,12M Phosphatpuffer mit 0,02mM CaCl₂ und 8% Dextrose gewaschen. Anschließend wurde das Gewebe in 0,12M Phosphatpuffer mit 2% Osmiumtetroxyd und 7% Dextrose eingelegt und auf einem Schüttler bei niedriger Rotationsfrequenz 2-3h nachfixiert.

Die Gewebestücke wurden 2x2min mit kaltem 0,1M Natriumacetat gewaschen, 30min mit kaltem 0,5% Uranylacetat in Wasser auf Eis inkubiert und nochmals 2x2min mit kaltem 0,1M Natriumacetat gewaschen, bevor sie mit der aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und in Propylenoxid überführt wurden: dabei wurden die Stationen 50%, 70%, 80% und 95% Methanol jeweils 15min, 100% Methanol sogar 2x15min durchlaufen und die Gewebestücke 2x15min in Propylenoxid inkubiert.

Die Gewebestücke wurden in einen 1:1-Gemisch aus Propylenoxid und frischem Epon 812 zunächst 3h und in einem neuen Aufguß desselben auf einem Schüttler über Nacht belassen. Erneut wurde frisches Epon 812 bereitet und das Gewebe in diesem auf einem Schüttler 6h inkubiert. Die Gewebestücke wurden individuell eingebettet und die Blöcke zunächst über Nacht bei 37°C, dann 8h bei 45°C und schließlich 2 Tage bei 60°C auspolymerisiert. Nach dem Trimmen des Blockes wurden Semidünnschnitte angefertigt und mit Toluidinblau gefärbt. Sodann wurden Ultradünnschnitte der gewünschten Region hergestellt, auf Objektträgernetzchen aufgefangen, kontrastiert und elektronenmikroskopisch analysiert.

2.2.5 Zellkulturtechniken

2.2.5.1 Allgemeine Zellkulturtechniken

Bestimmen der Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer

Die Zellzahl einer Zellsuspension wurde mit der Neubauer Zählkammer ermittelt. Diese wurde mit 15µl einer homogenen Zellsuspension befüllt und das definierte Raster der Kammer ermöglichte die Bestimmung der Zellzahl in einem bekannten Volumen. Auf diese Weise wurde die bestehende Zellkonzentration der Suspension hochgerechnet und der notwendige Verdünnungsfaktor kalkuliert.

Beschichten der Platten

Acht viergeteilte Gewebekulturschalen (35/10mm, Greiner Bio-One) wurden zur Orientierung an der Unterseite mit einem Strich versehen und in eine Petrischale (145/20mm, Greiner Bio-One) gesetzt. Runde Deckgläser wurden mit 70% Ethanol bedeckt, abgeflammt und jeweils vier Stück einzeln in eine viergeteilte Gewebekulturschale gelegt. Jedes Deckglas wurde mit 100µl Poly-D,L-Ornithin (PORN) Lösung beschichtet und 1h im Inkubator oder über Nacht im Kühlschrank gelagert.

PORN-Lösung: 0,15M Boratpuffer (pH=8,35)
 0,5mg/ml Poly-D,L-Ornithin

Jedes Deckglas wurde dreimal mit 100µl Hanks balanced salt solution (HBSS) gewaschen, mit 100µl Laminin-Lösung beschichtet und für 1h im Inkubator oder über Nacht im Kühlschrank gelagert.

Laminin-Lösung: Hanks balanced salt solution
 2,5µg/ml Maus-Laminin

Anschließend wurde die Laminin-Lösung abgesaugt und die Deckgläser konnten mit HBSS bedeckt eine Woche gelagert werden.

Herstellen einer Panningplatte

Zur Herstellung einer Panningplatte wurde eine 24-Well-Platte mit 400µl Panning-Lösung je Well befüllt und für 20min bei RT inkubiert. Während dieser Zeit wurde der p75-Antikörper

an den Boden der Platte gebunden, mit dem die Rückenmarkszellen in der Folge selektiert werden konnten.

Panning-Lösung:	10mM	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (pH=9,5)
	1:5.000	p75-Antikörper (monoclonal, Ratte)

Die Platte wurde 3x mit HBSS gewaschen und dies bis zum unmittelbaren Gebrauch in den Wells belassen.

2.2.5.2 Kultivierung neuraler Stammzellen

Für die Kultivierung neuraler Stammzellen (engl. neural stem cells, NSCs) wurde jedem Eppendorf Gefäß mit 200µl HBSS und der präparierten Gehirnregion 20µl 1% Trypsin zugegeben und das Gewebe 10min bei 37°C dissoziiert. Die Reaktion wurde mit 20µl 1% Trypsin-Inhibitor abgestoppt, die Zellen trituriert, in warmem Medium aufgenommen und in Zellkulturflaschen in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre bei 37°C und 5% CO₂ gelagert. Um eine Differenzierung der Zellen zu vermeiden, wurden dem Medium b-FGF und EGF als Wachstumsfaktoren zugegeben.

NSC-Medium:		Neurobasal
	2%	B27 Supplement
	1%	Glutamax II
	1%	Penicillin/Streptomycin
	20ng/ml	basic-Fibroblastic growth factor (b-FGF)
	20ng/ml	Ependymal growth factor (EGF)

Die in der Zellkulturflasche frei schwimmenden Zellen bildeten größer werdende Zellverbände, sog. Neurosphären aus, die beim regelmäßigen Mediumwechsel (3x wöchentlich) mit dem Medium abgenommen und in ein 15ml Röhrchen überführt wurden. Die Zellen wurden 5min bei 400g sedimentiert, der Überstand aus verbrauchtem Medium abgesaugt, die Zellen trituriert und in frischem Medium aufgenommen. Bei jedem Auflösen des Zellverbandes wurde die Passagenummer (P) erhöht.

Kryokonservierung neuraler Stammzellen

Bei der Kryokonservierung der NSCs wurden die Zellen 5min bei 400g sedimentiert, das verbrauchte Medium abgenommen und die Zellen in frischem Medium und DMSO im Verhältnis 9:1 resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen (1,8ml, Nunc)

überführt und in Isopropanol schonend auf -80°C gekühlt. Die langfristige Lagerung der NSCs erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Die Zellen konnten wieder in Kultur genommen werden, indem sie aufgetaut und mit frischem Medium versehen wurden. Die Zellen wurden 5min bei 400g sedimentiert, der Überstand aus Medium und DMSO abgesaugt, die Zellen trituriert und in frischem Medium aufgenommen.

Kultivierung neuraler Stammzellen der CNTF knockout-Mauslinie

Mit der Kultivierung von NSCs der CNTF-Mauslinie wurde der Einfluß von CNTF auf deren Differenzierung untersucht. Bei der Herstellung des Differenzierungsmediums wurde daher auf die Zugabe von b-FGF und EGF verzichtet.

Differenzierungsmedium:	Neurobasal
2%	B27 Supplement
1%	Glutamax II
1%	Penicillin/Streptomycin

Für die Untersuchung wurden NSCs aus CNTFwt und aus CNTFko Tieren auf PORN und Laminin beschichteten Deckgläsern ausplattiert, 48h kultiviert, nach 2h, 24h und 48h mit 4% PFA in PBS fixiert, mittels Immuncytochemie gefärbt und miteinander verglichen. Als Kontrollen wurde dem Medium einerseits der CNTF-blockierende Antikörper K10 (1:1.000) und andererseits rekombinantes CNTF (20ng/ml Medium) zugegeben. Es wurde die Differenzierung folgender Gruppen miteinander verglichen:

CNTFwt-Zellen	Differenzierungsmedium
CNTFwt-Zellen	Differenzierungsmedium + K10
CNTFko-Zellen	Differenzierungsmedium
CNTFko-Zellen	Differenzierungsmedium + CNTF

Die Kultivierung der Zellen der CNTF-Mauslinie erfolgte dabei auf zwei verschiedene Arten:

Im einen Fall wurden 3-5 Neurosphären je Deckglas ausplattiert.

Im anderen Fall wurde eine Zellsuspension hergestellt, mittels Neubauer Zählkammer der Verdünnungsfaktor errechnet und 3.000 – 4.000 Zellen pro Deckglas ausplattiert.

2.2.5.3 Kultivierung kortikaler Vorläuferzellen

Diese Technik wurde im Rahmen einer Kooperation von Fanie Barnabé-Heider (Entwicklungsbiologie, Kanada) durchgeführt.

Die Zellen des Cortex, darunter kortikale Vorläuferzellen (engl. cortical precursor cells, CPCs), wurden mit einer sterilen Plastikpipette in Medium mechanisch dissoziiert, die Zellkonzentration der Zellsuspension bestimmt und die Zellen ausplattiert. Dabei wurden für die Immunhistochemie ca. 10.000 Zellen in 800µl Medium pro Kammer eines Vierkammerobjektträgers verwandt und für die Proteinbestimmung mittels Western-Blot 1.000.000 – 2.000.000 Zellen in 1,5ml Medium pro Kammer einer 6Well-Platte eingesetzt.

CPC-Medium:		Neurobasal
	2%	B27 Supplement
	1%	Penicillin/Streptomycin
	500µM	L-Glutamin
	40ng/ml	Fibroblastic growth factor 2

2.2.6 Gewebe- und Zellfärbungen

2.2.6.1 Immunhistochemie/Immuncytochemie

Prinzip der Immunhistochemie/Immuncytochemie ist die Detektion bestimmter Strukturen mittels Antikörpern und die Sichtbarmachung ihrer Lokalisation durch Fluorochrome oder Enzym-gekoppelte Farbreaktion.

Fluorochrome werden durch Licht bestimmter Wellenlänge angeregt, wodurch Elektronen auf ein höheres Energieniveau gehoben werden. Kehren die Elektronen auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück, emittieren sie Licht einer anderen spezifischen Wellenlänge. Mit einem Fluoreszenzmikroskop können Fluorochrome angeregt und ihre Lokalisation kann durch Lichtemission erkannt werden.

Für die Enzym-gekoppelte Farbreaktion wird ein geeignetes Enzym direkt oder indirekt an den spezifischen Antikörper gekoppelt. Durch Gabe des Substrates kann eine Farbreaktion erreicht werden, die über die Lokalisation Auskunft gibt und mit dem Lichtmikroskop sichtbar ist.

Prinzip der indirekte Immunfluoreszenzfärbung

Bei der indirekten Methode wird das Antigen von einem spezifischen, unkonjugierten Primärantikörper gebunden. Der Sekundärantikörper erkennt spezifisch Immunglobuline der Tierspezies, in der der Primärantikörper generiert wurde, und ist mit einem Fluorochrom konjugiert.

Der allgemeine Ablauf der indirekten Methode umfasst folgende Schritte:

- Waschen des fixierten Materials
- Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen
- Inkubation mit dem Primärantikörper
- Waschen
- Inkubation mit dem Sekundärantikörper
- Waschen
- Eindecken des Präparates

Prinzip der Avidin-Biotin-Komplex-Methode

Bei der Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC-Methode) wird das Antigen von einem spezifischen, unkonjugierten Primärantikörper gebunden. Es wird ein biotinylierter Brückenantikörper eingesetzt, der einerseits spezifisch Immunglobuline der Tierspezies erkennt, in der der Primärantikörper generiert wurde, und andererseits die Verbindung zum AB-Komplex herstellt. An den Komplex ist ein Enzym gekoppelt, dessen Aktivität für die Detektion zuständig ist.

Der allgemeine Ablauf der ABC-Methode umfasst folgende Schritte:

- Waschen des fixierten Materials
- Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen
- Inkubation mit dem Primärantikörper
- Waschen
- Inkubation mit dem biotinylierten Brückenantikörper
- Waschen
- Inkubation mit dem AB-Komplex
- Waschen
- Inkubation mit Substratlösung
- Waschen
- Eindecken des Präparates

Präparat-spezifische Unterschiede

Bei der Durchführung der Immunhistochemie/Immuncytochemie wurden Unterschiede gemacht, deren Gründe einerseits im Vorhaben der Optimierung und andererseits in den verschiedenen Zustandsformen der Präparate zu suchen sind.

So wurden zum einen die verwendeten Reagenzien und ihre Konzentration variiert. Die grundlegenden Puffer waren Phosphate buffered Saline (PBS) oder Tris buffered Saline (TBS). Als Substanzen zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen wurden 5% Ziegen Serum, 1-10% Pferdeserum 1-10% Rinderserumalbumin, oder 1% Milchpulver eingesetzt. Als Detergenzien dienten 0,05-0,1% Tween oder 0,05-0,5% Triton-X-100.

Zum anderen bestanden die Unterschiede in der Art der zu färbenden Präparate:

Die Immunhistochemie der **frei in Puffer schwimmenden Schnitte** (Vibratonschnitte und 40µm dicke Gefrierschnitte) wurde in einer 24-Well-Platte durchgeführt, die Schnitte anschließend auf Objektträger aufgezogen, mit 1,4-Diacabicyclo-[2.2.2.]octan (DABCO)-Lösung eingedeckt, mit VitroClud oder Nagellack versiegelt und bei 4°C gelagert.

DABCO-Lösung:		Phosphate buffered Saline
	75%	Glycerol
	2,5%	1,4-Diacabicyclo-[2.2.2.]octan

Für die Färbung der **auf Objektträgern fixierten Präparate** (Paraffinschnitte, 10-14µm dicke Gefrierschnitte und die CPC-Kulturen) wurden diese zunächst mit einem Fettstift umrandet, der eine lipophile Barriere schuf. Um die Austrocknung der Präparate zu vermeiden, wurde die Immunhistochemie in einer mit feuchten Papiertüchern ausgelegten sog. „feuchten Kammer“ durchgeführt. Anschließend wurden die Schnitte mit DABCO-Lösung eingedeckt, mit VitroClud oder Nagellack versiegelt und bei 4°C gelagert.

Die Färbung der **auf Deckgläsern fixierten Zellen** (NSCs) fand in viergeteilten Gewebekulturschalen (35/10mm, Greiner Bio-One) statt. Nach Ablauf der Immuncytochemie wurden die Deckgläser in destilliertes Wasser getaucht und die Zellen auf einem Objektträger in Mowiol®-Lösung eingedeckt. Dazu wurde das jeweilige Deckglas auf einem Mowioltropfen platziert und sinken gelassen. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

Mowiol®-Lösung:	40ml	Phosphate buffered Saline (pH=8,0)
	20ml	Glycerin
	10g	Mowiol®

BrdU-Detektion

Die BrdU-Detektion erfolgte in Kooperation mit Angelika Schmitt (Psychobiologie, Würzburg). Für die BrdU-Detektion wurden mit 4% PFA in PBS perfusionsfixierte oder immersionsfixierte Gehirne über Nacht nachfixiert und sodann in 30% Sucrose in PBS überführt. Es wurden Vibratomschnitte oder nach dem Einfrieren Kryoschnitte mit 40µm Dicke hergestellt, die in TBS gewaschen wurden, ehe sie einer bestimmten Vorbehandlung unterzogen wurden.

Im Rahmen der Vorbehandlung, die durch DNA-Denaturierung die BrdU-Detektion erst ermöglichte, wurden die Schnitte 30min bei 37°C mit 2N HCl-Lösung inkubiert und anschließend 10min in 0,1M Boratpuffer (pH=8,5) gewaschen.

Bei Verwendung für die Lichtmikroskopie hatte sich die Inkubation mit 50% Formamid und 2x SSC 2h bei 65°, gefolgt von zwei Waschschritten in TBS bewährt, die der Inkubation mit 2N HCl-Lösung vorangestellt wurde.

Es wurden zudem zwei unterschiedliche Nachweisverfahren verwendet:

Beim ersten Verfahren konnte nach der genannten Vorbehandlung und drei Waschschritten mit TBS der Ablauf der Immunhistochemie mit der Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen weitergeführt werden. Die BrdU-Detektion erfolgte dabei durch Fluorochrom-gekoppelte Sekundärantikörper.

Im anderen Verfahren wurde für die Detektion eine Peroxidase-verursachte Farbreaktion verwendet und daher eine zusätzliche Vorbehandlung nötig. Diese Vorbehandlung wurde der BrdU-Vorbehandlung vorangestellt, diente der Inaktivierung von Gewebseroxidasen und bestand in der Inkubation der Schnitte mit 0,6% H₂O₂ in TBS für 30min, gefolgt von drei Waschschritten mit TBS. Im späteren Verlauf wurde hierbei ein biotinylierter Sekundärantikörper verwendet und die Schnitte nach drei Waschschritten mit TBS 1-2h bei RT mit Avidin-Biotin-Komplex inkubiert. Nach drei Waschschritten mit TBS wurden die Schnitte zum Peroxidasenachweis 5min in Diaminobenzidin (DAB)-Lösung inkubiert, anschließend 3x mit TBS gewaschen, die Schnitte auf Objektträger gezogen und über Nacht getrocknet. Am nächsten Tag wurden sie mit DABCO eingedeckt, mit VitroClud versiegelt und bei 4°C gelagert.

DAB-Lösung:		Tris buffered Saline
	0,01%	Hydrogenperoxid
	0,04%	Nickelchlorid
	0,025%	Diaminobenzidin

Optimierte BDNF-Detektion

Für die Färbung mit dem BDNF-Immunsersum wurde folgendes Vorgehen als geeignet ermittelt:

Das präparierte Gehirn des zuvor mit 4% PFA in PBS perfundierten Tieres wurde nicht länger als 2h in Fixans nachfixiert, ehe es in PBS umgesetzt wurde. Es wurden Vibratomschnitte von 40µm Dicke hergestellt und diese in PBS gewaschen. Die Schnitte wurden zunächst 90min bei RT mit blockierender Lösung und anschließend 35-40h bei 4°C mit dem Primärantikörper – 1:1.000 in Antikörper-Puffer verdünnt – inkubiert. Es wurde 3-4x gründlich mit PBS gewaschen, bevor 90min bei RT mit dem Sekundärantikörper inkubiert wurde. Nach 3-4x gründlichem Waschen mit PBS wurden die Schnitte auf Objektträger aufgezogen, mit DABCO eingedeckt, mit VitroClud oder Nagellack versiegelt und bei 4°C gelagert.

Blockierende Lösung:		Phosphate buffered Saline
	5%	Ziegenserum
	0,5%	Triton-X-100
Antikörper-Puffer:		Phosphate buffered Saline
	1%	Ziegenserum
	0,1%	Triton-X-100
	0,05%	Natriumazid

2.2.6.2 Sonstige Färbungen

Färbung mit 4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride (DAPI)

4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride (DAPI) ist ein speziell an DNA bindendes Fluorochrom, das bei Anregung im Ultraviolett-Bereich (UV-Licht) blaues Licht emittiert.

Die Inkubation der Zellen mit DAPI erfolgte nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper. Nach dem ersten Waschschrift wurde DAPI in einer 1:2.000 Verdünnung in Puffer auf die Schnitte gegeben und dort 5-10min belassen, bevor überschüssiges DAPI und mögliche Reste des Sekundärantikörpers durch anschließende Waschschrift beseitigt wurden.

Färbung mit Propidiumjodid

Propidiumjodid ist ein speziell an DNA bindendes Fluorochrom, das zur Abschätzung der Apoptose verwendet wurde. Die Färbung mit Propidiumjodid äußerte sich in einer roten Färbung der Zellen und erfolgte nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper. Nach dem ersten Waschschrift wurde Propidiumjodid in einer 1:500 Verdünnung in Puffer auf die Schnitte gegeben und dort 20min belassen, bevor überschüssiges Propidiumjodid und mögliche Reste des Sekundärantikörpers durch anschließende Waschschrift beseitigt wurden.

2.2.7 Mikroskopie und Auswertung

2.2.7.1 Allgemeines

Durch Mikroskopie wurden Abbildungen der Objekte vergrößert, wobei die Gesamtvergrößerung dem Produkt aus primärer Objektiv- und sekundärer Okularvergrößerung entsprach.

Bei der Konfokal-Mikroskopie wurde auf die Einhaltung zweier Punkte besonders geachtet: Ermitteln der optimalen Betrachtungsebene und Einhalten einheitlicher Einstellungen.

Die optimale Betrachtungsebene war beispielsweise bei Vibratomschnitten die mittlere, am intensivsten gefärbte Ebene, während die Beurteilung der Fortsätze von Neurosphären nur durch Wahl einer Deckglas-nahen Ebene ermöglicht wurde.

Für alle Präparate, die innerhalb eines Färbedurchgangs hergestellt worden waren, kamen je Objektiv die gleichen Anregungsintensitäten für die verschiedenen Schnitte zum Einsatz, um nicht auf diesem Weg Intensitätsunterschiede zwischen den Präparaten zu generieren. Entsprechendes galt für die Einstellung von Blende und gewertetem Emissionsspektrum.

2.2.7.2 Bromdesoxyuridin (BrdU)-Quantifizierung im Hippocampus

Dieser Teil erfolgte in Kooperation mit Angelika Schmitt (Psychobiologie, Würzburg). Die Mäuse wurden 2x im Abstand von 2h mit BrdU injiziert, 48h nach der ersten Injektion perfundiert und die jeweilige Anzahl BrdU-positiver Zellen in der Körnerzellschicht (KZS) und Subgranulärzone (SGZ) des Gyrus dentatus ermittelt. Dabei wurde jeder sechste Schnitt des jeweiligen Versuchstieres zur Auswertung herangezogen und die gewünschte Region mit Hilfe eines Lichtmikroskops, einer Digitalkamera sowie der Software DigiTrace eingelesen.

Die Zählung der BrdU-positiven Zellen ist in Abbildung 2-4 veranschaulicht und erfolgte in einem verblindeten Verfahren. Die Fläche der jeweiligen KZS wurde vermessen und unter Berücksichtigung der Tatsache, dass nur jeder sechste Schnitt einer immunhistochemischen Färbung unterzogen worden war und die Schnittdicke 40µm betragen hatte, über folgende Formel das Volumen der KZS berechnet:

$$V_{KZS} [\text{mm}^3] = A_{KZS} [\text{mm}^2] \times 6 \times 0,04 \text{ mm}$$

Die Anzahl BrdU-positiver Zellen konnten so auf das Gesamtvolumen der KZS hochgerechnet und in Bezug zum Volumen der KZS angegeben werden.

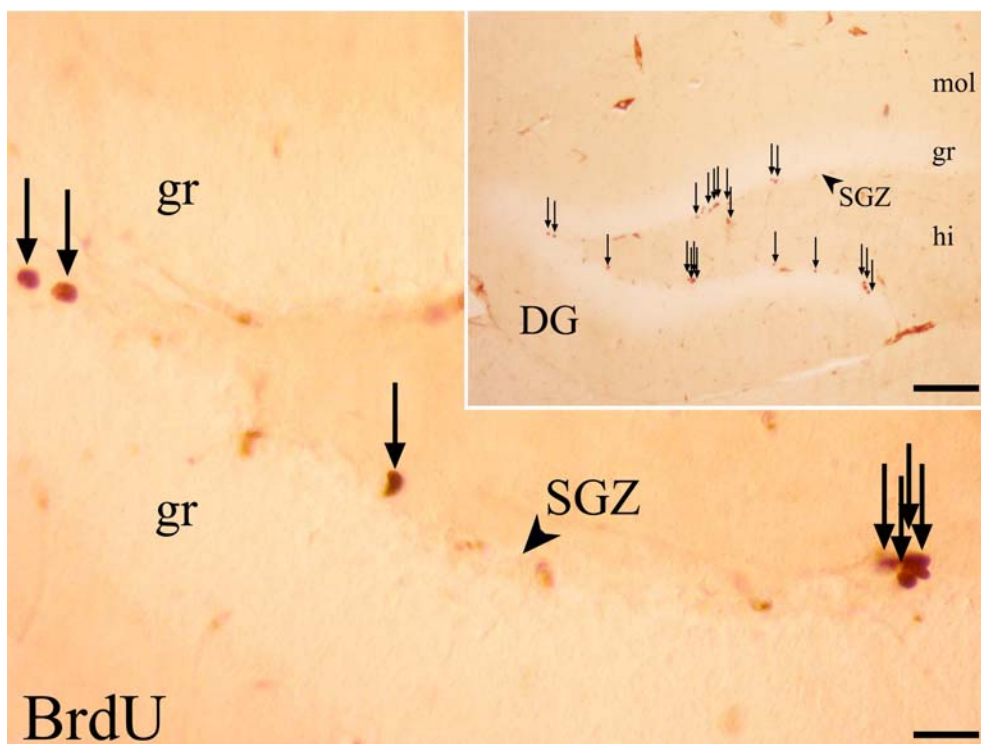


Abbildung 2-4 BrdU-Detektion im Gyrus dentatus. Überblicksbild (rechts oben) und vergrößerter Ausschnitt (links unten). BrdU-positiv gefärbte Zellen sind bräunlich und durch Pfeile gekennzeichnet. DG=Gyrus dentatus; SGZ=Subgranulärzone; mol=Stratum moleculare; gr=Stratum granulosum; hi=Hilus. Maßstabsbalken rechts oben = 200µm; Maßstabsbalken links unten = 35µm.

2.2.7.3 BDNF-Intensitätsmessung im Hippocampus

Die Intensitäten der BDNF-Immunfärbung wurden in einem standardisierten Verfahren im Hippocampus von CNTF-defizienten Tieren sowie wildtypischen Mäusen gleichen Alters ermittelt. Die Intensitätsmessung wurde dabei in entsprechenden Regionen vergleichend durchgeführt. Dabei wurden folgende Regionen des Hippocampus miteinbezogen, deren Lage in Abbildung 2-5 angegeben sind: oberer und unterer Flügel des Gyrus dentatus, CA4, CA3, Stratum radiatum von CA3, CA1 und Stratum radiatum von CA1, deren jeweilige Intensität um einen Referenzwert aus einer ventral davon gelegenen Gehirnregion reduziert wurde.

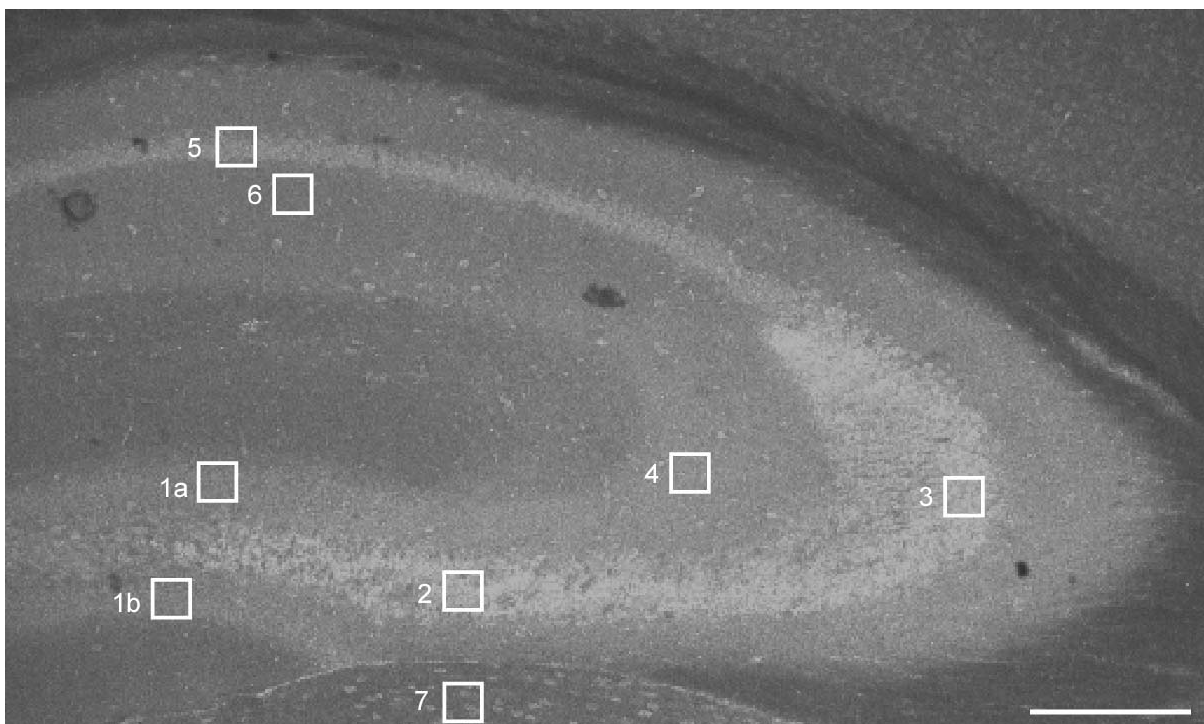


Abbildung 2-5 BDNF-Färbung des Hippocampus und Regionen der Intensitätsmessung. Gyrus dentatus (oberer Flügel 1a; unterer Flügel 1b), CA4 (2), CA3 (3), Stratum radiatum von CA3 (4), CA1 (5), Stratum radiatum von CA1 (6) und ventral davon gelegene Gehirnregion zur Ermittlung eines Referenzwertes (7). Maßstabsbalken = 200µm.

2.2.8 Physiologische Methoden

2.2.8.1 Bestimmung der Long-Term Potentiation (LTP) und Long-Term Depression (LTD)

Die Bestimmung der LTP und LTD wurde im Rahmen einer Kooperation mit Martin Korte (MPI, Martinsried) durchgeführt.

Vorbereitungen für die Messung

Nach kurzer Diethyläther-Narkose und Decapitation der Mäuse wurde das Gehirn präpariert und in eiskalter artificial cerebrospinal fluid (ACSF) zwischengelagert, die zur Regulation des pH-Wertes mit Carbogen begast wurde. Der Hippocampus wurde präpariert, auf ein Stück 2%ige Agarose gelegt und mittels eines Egg slicers in 400 μ m dicke Scheiben quer geschnitten. Die Hippocampusschnitte wurden mit Pinzetten vorsichtig separiert und in einer mit Carbogen begasten ACSF-Kammer ca. 90min bei Raumtemperatur gelagert. Zur Dokumentation der raschen und einheitlichen Bearbeitung der Mäuse wurde die Zeitdauer kontrolliert, die bis Erreichen der ACSF-Kammer benötigt wurde.

Einzelne Schnitte wurden in die Meßvorrichtungen eingebracht und die Elektroden so positioniert, dass die Stimulationselektrode in den Schaffer Kollateralen im Stratum radiatum der CA3-Region und die Detektionselektrode im Stratum radiatum der CA1-Region zu liegen kam, wie in Abbildung 2-6 veranschaulicht.

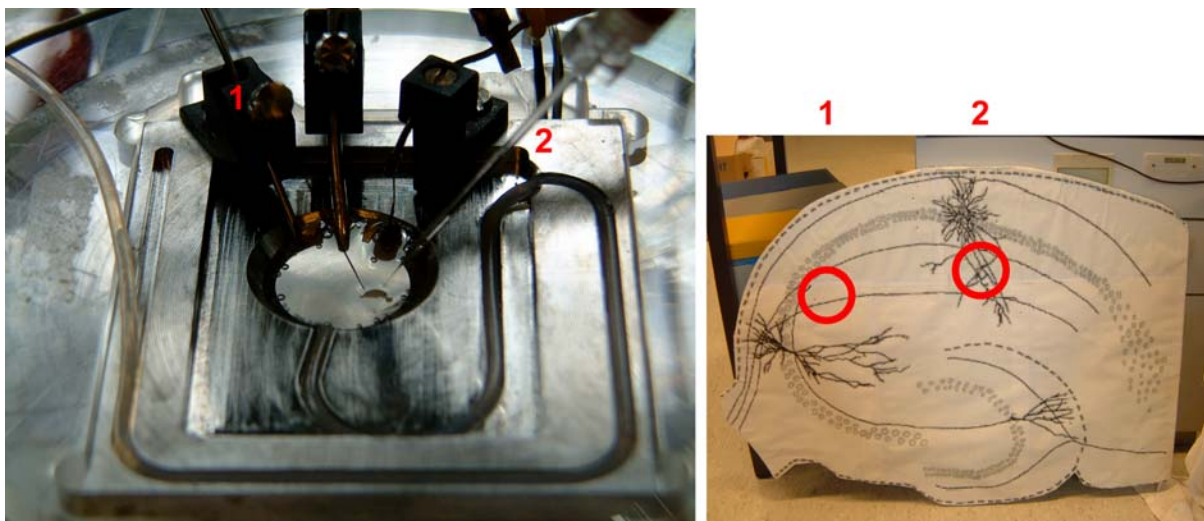


Abbildung 2-6 Stimmulations- und Messvorrichtung der Hippocampusschnitte im Schema (rechts) und in natura (links) mit Stimulationselektrode (1) und Detektionselektrode (2).

Zur Aufrechterhaltung des natriumreichen Extrazellulärraumes und zur Verbesserung der elektrischen Leitfähigkeit war die Detektionselektrode mit 3M NaCl gefüllt. Eine Indifferenzelektrode diente als Erdung. Während der gesamten Messung wurde der Schnitt mit frischer ACSF umspült, deren konstante Temperatur von 32°C von einem Sensor kontrolliert wurde.

Ablauf der Messung

Die verschiedenen Phasen der Messung sind in Abbildung 2-7 dargestellt.

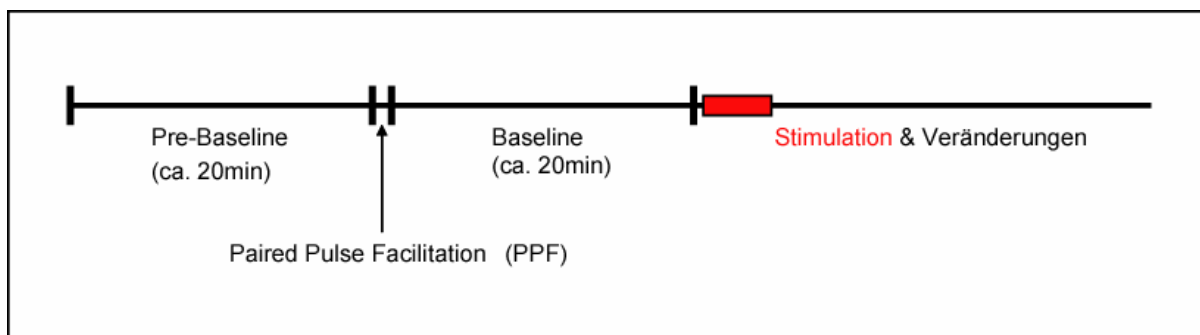


Abbildung 2-7 Verschiedene Phasen der LTP bzw. LTD-Messung.

Während Pre-Baseline und Baseline wurde die Reproduzierbarkeit der Signale ermittelt. Es wurden von der Reizelektrode im Abstand von 10s Teststimuli verabreicht und mit der Detektionselektrode deren excitatorische postsynaptische Potentiale (EPSPs) gemessen. Dabei sollten Amplitude und Steigung der Kurve über den gesamten Zeitraum relativ konstant bleiben. Die Baseline diente zudem als Bezugsgröße für die Veränderungen nach der LTP- bzw. LTD-Stimulierung.

Mittels Paired Pulse Facilitation (PPF) wurde die synaptische Übertragung untersucht. Dazu wurden zwei Teststimuli kurz nacheinander verabreicht und deren EPSP-Kurven verglichen. Wenn die zweite Kurve eine größere Amplitude als die erste aufwies, war die synaptische Übertragung nicht beeinträchtigt. Die Zeitdauer zwischen den beiden Reizen wurde ebenfalls variiert; das Intervall betrug 10ms, 20ms, 40ms, 80ms bzw. 160ms.

Nach Bestimmung der Baseline erfolgte die Stimulation mit dem gewünschten Protokoll. Abbildung 2-8 gibt einen Überblick über verschiedene Stimulationsprotokolle. Es kamen die Tetanus Stimulation und die Theta-Burst Stimulation (TBS) für die Untersuchung der LTP, sowie die Low Frequency-Stimulation (LFS) für die Untersuchung der LTD zum Einsatz.

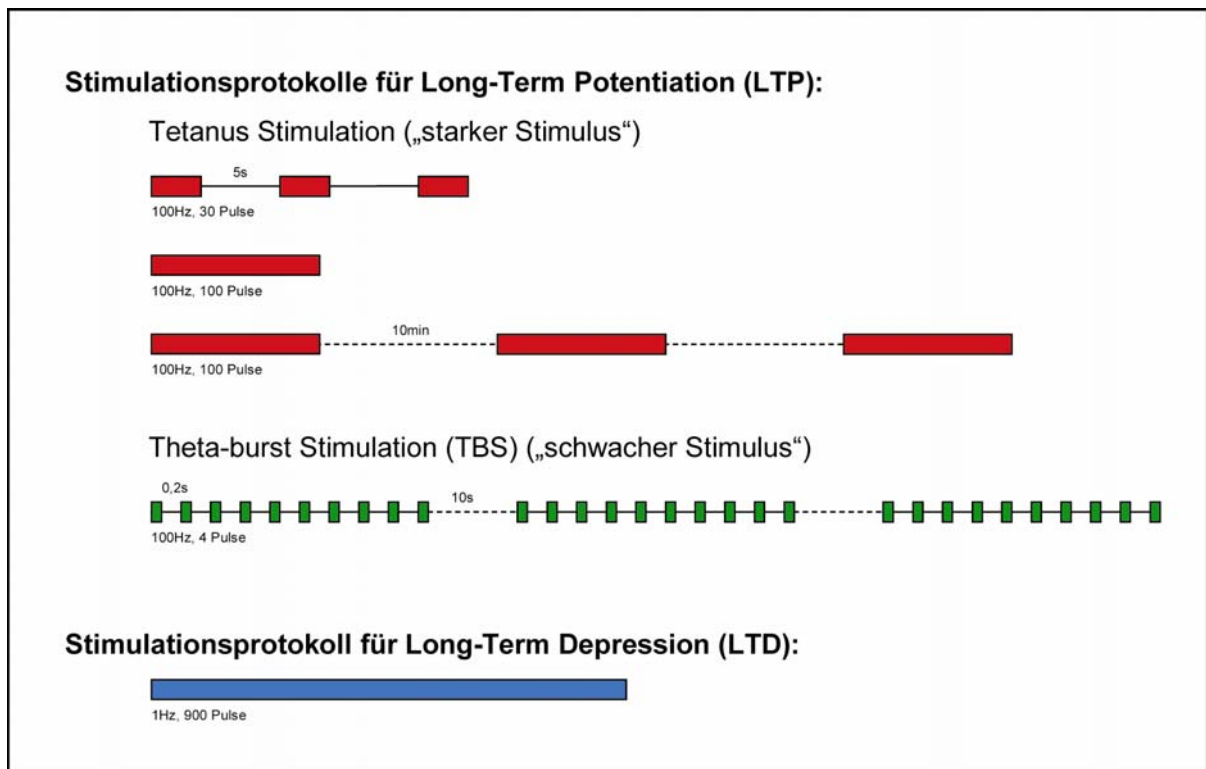


Abbildung 2-8 Verschiedene Stimulationsprotokolle für LTP und LTD.

Die Tetanus Stimulation bestand aus 100 Pulsen von 100Hz und wurde an 9 bzw. 7 Hippocampuschnitten aus CNTF-defizienten Mäusen bzw. wildtypischen Geschwistertieren durchgeführt; es wurden dazu 3 Mäuse je Gruppe verwendet.

Für die TBS wurden 3 CNTF-defiziente Mäuse und 3 wildtypische Geschwistertiere verwendet und die LTP an 19 Hippocampuschnitten je Gruppe gemessen.

Bei der LFS kamen 10 bzw. 11 Hippocampuschnitte aus CNTF-defizienten Mäusen bzw. wildtypischen Geschwistertieren zum Einsatz; die Tierzahl je Gruppe betrug 3.

3 ERGEBNISSE

3.1 Charakterisierung des BDNF-Immunsersums

Zahlreiche Arbeiten belegen die wichtige Rolle von BDNF für die Ausbildung von LTP (Korte, M. et al. 1995; Korte, M. et al. 1996; Patterson, S.L. et al. 1996) und Hippocampus-abhängiges Lernen (Linnarsson, S. et al. 1997; Monteggia, L.M. et al. 2004).

Schon vor einiger Zeit konnten in situ Hybridisierungs-Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen zeigen, dass BDNF im Hippocampus exprimiert wird (Wetmore, C. et al. 1990). Aufgrund von Erkenntnissen, dass der BDNF mRNA-Level nicht mit dem BDNF Protein-Level korrelieren muß (Silhol, M. et al. 2005), wurde die Generierung eines BDNF-Immunsersums zur Visualisierung und zum Nachweis des aussagekräftigeren BDNF-Proteins begonnen.

Dazu wurde ein Kaninchen in regelmäßigen Abständen mit rekombinantem BDNF immunisiert und jeweils 10 Tage später Blut abgenommen, woraus das Serum isoliert wurde (Details siehe Material und Methoden, S.34f). Die Erstimmunisierung fand am 02.05.2002 statt und ich übernahm die Charakterisierung der verschiedenen Chargen des BDNF-Immunsersums etwa 1 Jahr später mit der 11. Charge. Es wurden insgesamt 17 Nachimmunisierungen mit rekombinantem BDNF durchgeführt (zuletzt 03.05.2004) und in der Folge nur noch regelmäßig Blut abgenommen. Die nachfolgend gewonnenen Chargen tragen die Anzahl der Immunisierungen und wurden durch alphabetische Zusätze (17A, 17B, 17C usw.) voneinander unterschieden.

Meine erste Aufgabe war es das BDNF-Immunsersum zu charakterisieren und hinsichtlich seiner Bedingungen für die Anwendung im Western Blot und in der Immunhistochemie zu optimieren. Aufgrund der besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse verwendete ich vorwiegend das Serum der Charge 12 und 13.

3.1.1 BDNF-Nachweis mittels Western Blot

Zur optimalen Auftrennung von BDNF mittels Western Blot wurden 15%ige Polyacrylamid-Trenngele verwendet. Das BDNF-Immunsereum detektierte im Western Blot rekombinantes BDNF bis zu einer Menge von 0,5ng (Abbildung 3-1, links).

Für den BDNF-Nachweis in Hippocampuslysaten wurden zwei verschiedene Protokolle und Puffer zur Herstellung der Proteinlysate verglichen: Proteinlysate mit Extraktionspuffer bzw. mit RIPA-Puffer (Details siehe Material und Methoden S.35f).

Die Verwendung des Extraktionspuffers bei der Lysatherstellung stellte sich dabei als ungeeignet heraus und führte nicht zu nachweisbaren Banden bei 14kDa.

In mit RIPA-Puffer hergestellten Hippocampuslysaten konnte BDNF hingegen nachgewiesen werden (Abbildung 3-1, rechts). Die Verwendung von lobind Eppendorff Gefäßen, die eine besonders glatte Innenfläche aufweisen und aufgrund der klebrigen Eigenschaft des BDNFs zum Einsatz kamen, hatte dabei keinen zusätzlichen Vorteil beim BDNF-Nachweis.

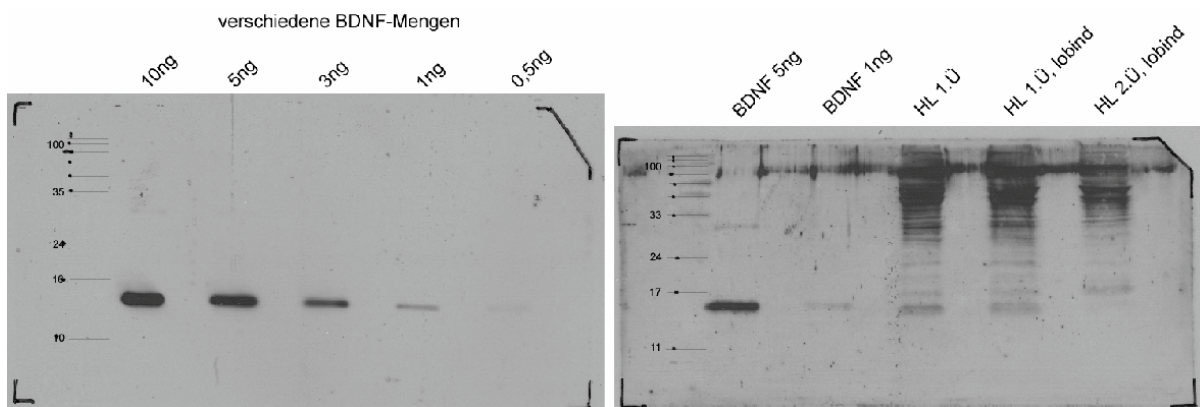


Abbildung 3-1 BDNF-Detektion im Western Blot. Das BDNF-Immunsereum detektierte rekombinantes BDNF bis zu einer Menge von 0,5ng (links). In mit RIPA-Puffer hergestelltem Hippocampuslysat war bei ca. 14kDa ebenfalls eine deutliche Bande erkennbar. (rechts). HL=Hippocampuslysate, 1.Ü=1. Überstand, 2.Ü=2. Überstand, lobind=spezielle Eppendorff Gefäße.

Zur Beurteilung der Spezifität des BDNF-Immunsersums wurden verschiedene Kontrollen durchgeführt, über die Abbildung 3-2 Aufschluß gibt.

Die BDNF-Immunsereen detektierten BDNF, während das Präimmunsersum BDNF weder pur noch im Hippocampuslysat erkennen konnte (Abbildung 3-2, A). Andere Neurotrophine, die auf Ebene der Aminosäuresequenz zu ca. 50% Ähnlichkeit mit BDNF aufweisen – wie NGF und NT-3 – wurden auch in größerer Menge nicht erkannt (Abbildung 3-2, B). In Hippocampuslysaten aus adulten Mäusen, die bezüglich BDNF heterozygot waren, konnte BDNF nachgewiesen werden, wobei entsprechende Banden in Hippocampuslysaten aus BDNF-defizienten Geschwistertieren fehlten (Abbildung 3-2, C). Dabei ist zu beachten, dass die zusätzlich detektierten Banden in Lysaten aus BDNF-defizienten Mäusen ebenfalls vorhanden waren und daher als unspezifisch gewertet werden müssen.

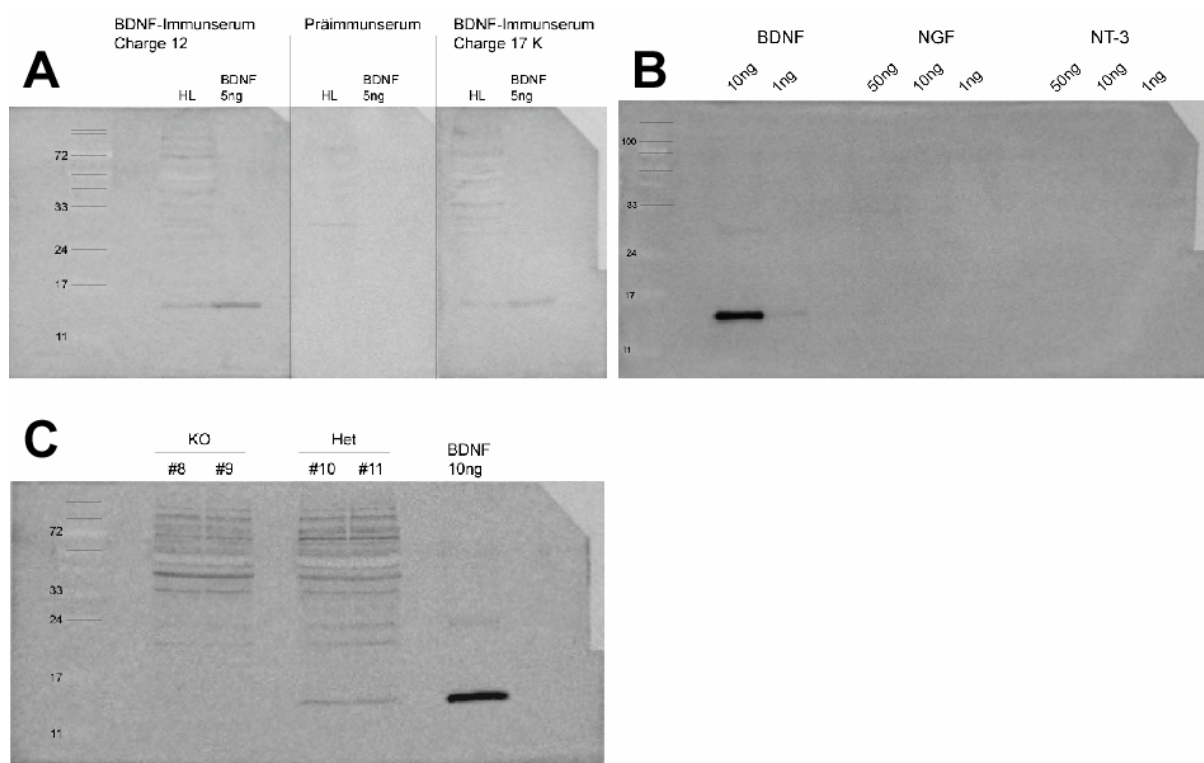


Abbildung 3-2 Spezifitätskontrollen des BDNF-Immunsersums. Das Präimmunsersum detektierte keine Bande in Höhe BDNF (A). Das BDNF-Immunsersum erkannte rekombinantes BDNF, nicht jedoch NGF oder NT-3 (B). Das BDNF-Immunsersum zeigte BDNF-Bande in Hippocampuslysaten von BDNF^{+/-} Mäusen (Het, #10 + #11), die jedoch bei Hippocampuslysaten von BDNF^{-/-} Mäusen (KO, #8 + #9) fehlte (C).

Um die Qualitätsentwicklung des BDNF-Immunsersums im Laufe der Zeit beurteilen zu können, wurden die verschiedenen nachfolgend gewonnenen Chargen des BDNF-Immunsersums im Hinblick auf ihre BDNF-Detektion jeweils an wildtypischem Hippocampuslysatsat und 1ng rekombinatem BDNF getestet. Charge 12 wurde dabei als Referenz bei allen Western Blots verwendet. Alle Chargen des BDNF-Immunsersums konnten BDNF sowohl als reines rekombinantes Protein als auch im Hippocampuslysatsat detektieren, wobei die Zahl und die Intensität unspezifischer Banden besonders innerhalb der verschiedenen durch alphabetische Zusätze differenzierten Versionen der 17. Charge zunahm (Abbildung 3-3).

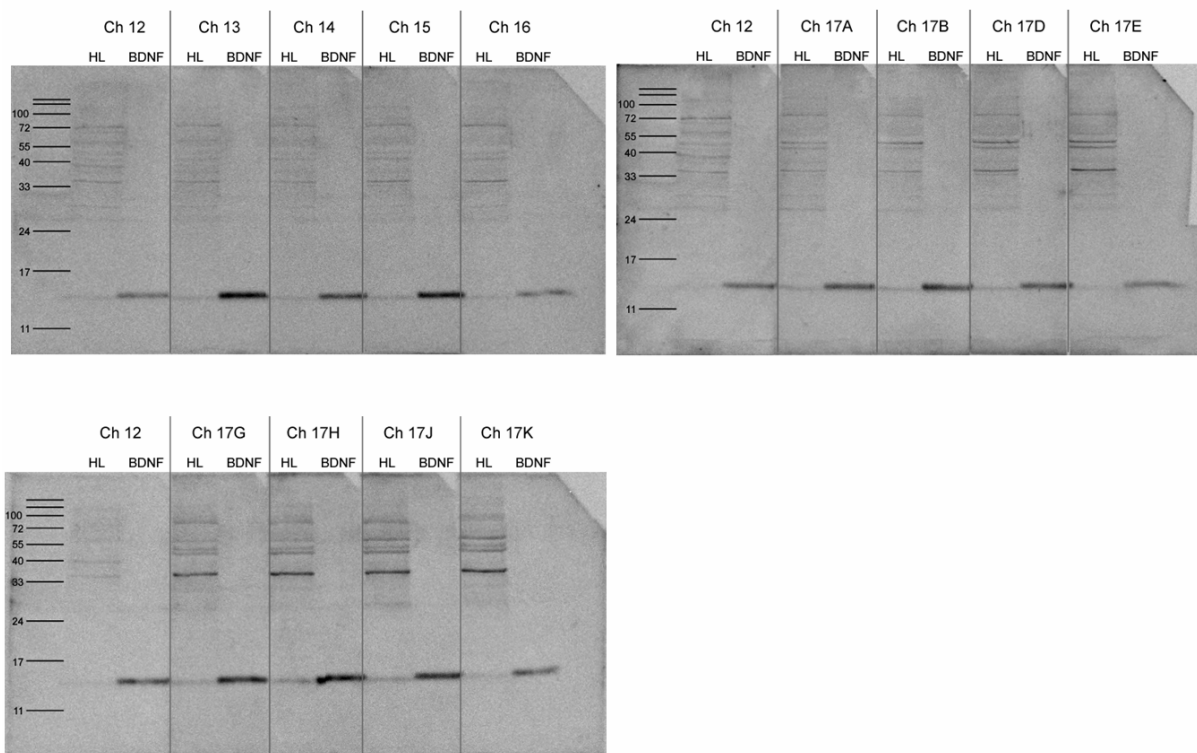


Abbildung 3-3 Vergleich verschiedener Chargen des BDNF-Immunsersums. Nach Ende der Nachimmunisierungen wurden die verschiedenen Chargen (Ch) durch alphabetische Zusätze unterschieden. Charge 12 dient hier als Referenz und ermöglicht so den Vergleich der Western Blots. Beschriftete Markerbanden ermöglichen die Einstufung der Höhe der unspezifischen zusätzlich detektierten Banden im Hippocampuslysatsat (HL). BDNF=1ng BDNF.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das BDNF-Immunsersum – nach Optimierung der Bedingungen – zur BDNF-Detektion in Western Blot-Untersuchung gut geeignet ist. Zu beachten sind jedoch die zusätzlich detektierten, unspezifischen Banden oberhalb von 14kDa.

3.1.2 BDNF-Nachweis mittels Immunhistochemie

Nach Einstufung der Spezifität des BDNF-Immunsersums via Western Blot-Untersuchungen war es das Ziel BDNF mittels Immunhistochemie zu detektieren und so nähere Hinweise über dessen Verteilung im Hippocampus wildtypischer Mäuse zu erhalten.

Dazu wurden adulte C57Bl/6-Mäuse perfundiert, die Gehirne präpariert und nachfixiert. Anschließend wurden 40µm-dicke Vibratomschnitte hergestellt und das optimierte Immunhistochemische Färbeprotokoll durchgeführt, ehe die Präparate mittels Konfokaler Mikroskopie betrachtet wurden (Details siehe Material und Methoden S.51f, 62).

Einen nochmaligen Überblick über die verschiedenen Regionen des Hippocampus ermöglicht Abbildung 1-1 (S.8).

Das BDNF-Immunsersum zeigte eine deutliche Färbung im Bereich der Pyramidenzellen der Regionen CA4 und CA3, sowie im Bereich der Moosfasern; die Körnerzellen des Gyrus dentatus waren von der Färbung nicht besonders betroffen. Die Negativkontrolle ohne Erstantikörper und das unspezifische Präimmunsersum dienten als Kontrollen und ergaben nur schwache Signale (Abbildung 3-4).

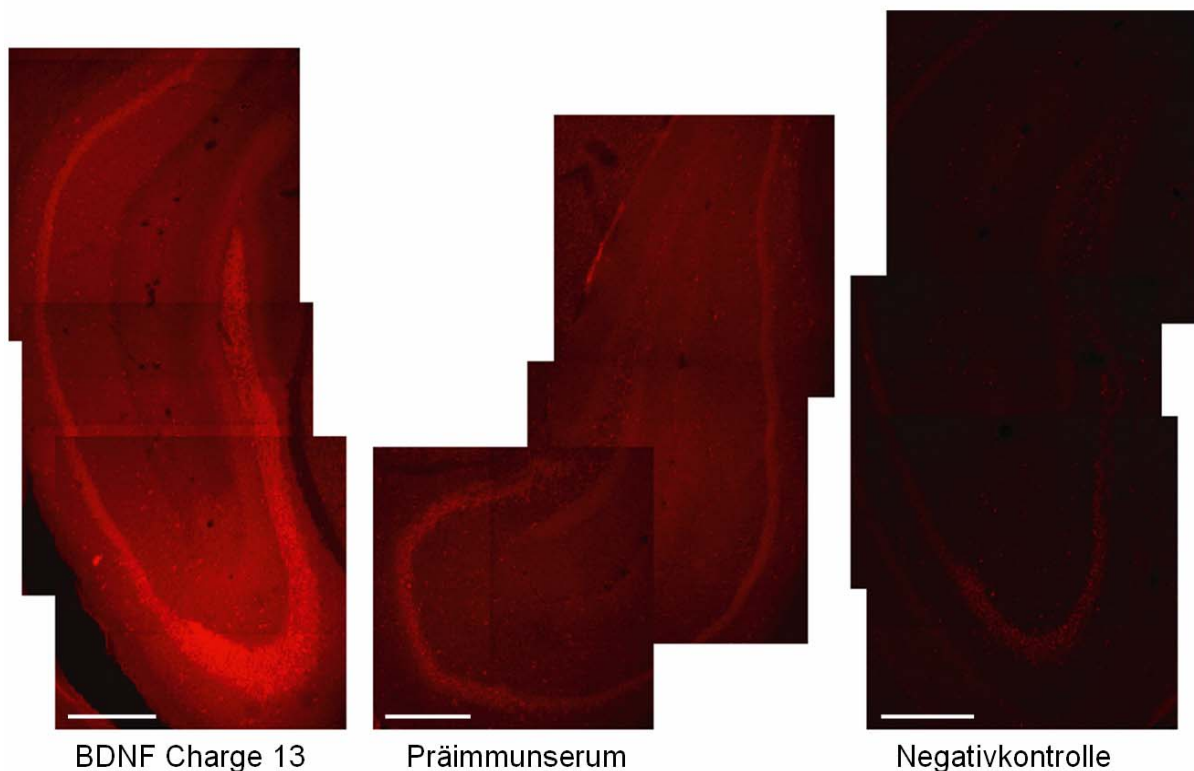


Abbildung 3-4 BDNF-Nachweis in der Immunhistochemie. BDNF-Färbung mittels BDNF-Immunsersum zeigt eine starke Intensität im Bereich der CA4- und CA3-Region, sowie im Bereich der Moosfasern (rechts). Als Kontrollen: Präimmunsersum (Mitte) und Negativkontrolle (rechts). Maßstabsbalken = 300µm.

Die Dauer der Postfixationszeit mit 4%PFA in PBS war dabei von großer Bedeutung. Abbildung 3-5 zeigt eine deutlich stärkere Färbung bei einer PFA-Postfixationszeit von 75min im Vergleich zu 45min bzw. 105min. Längere Postfixationszeiten, beispielsweise „über Nacht“, führten zu unbrauchbaren Ergebnissen.

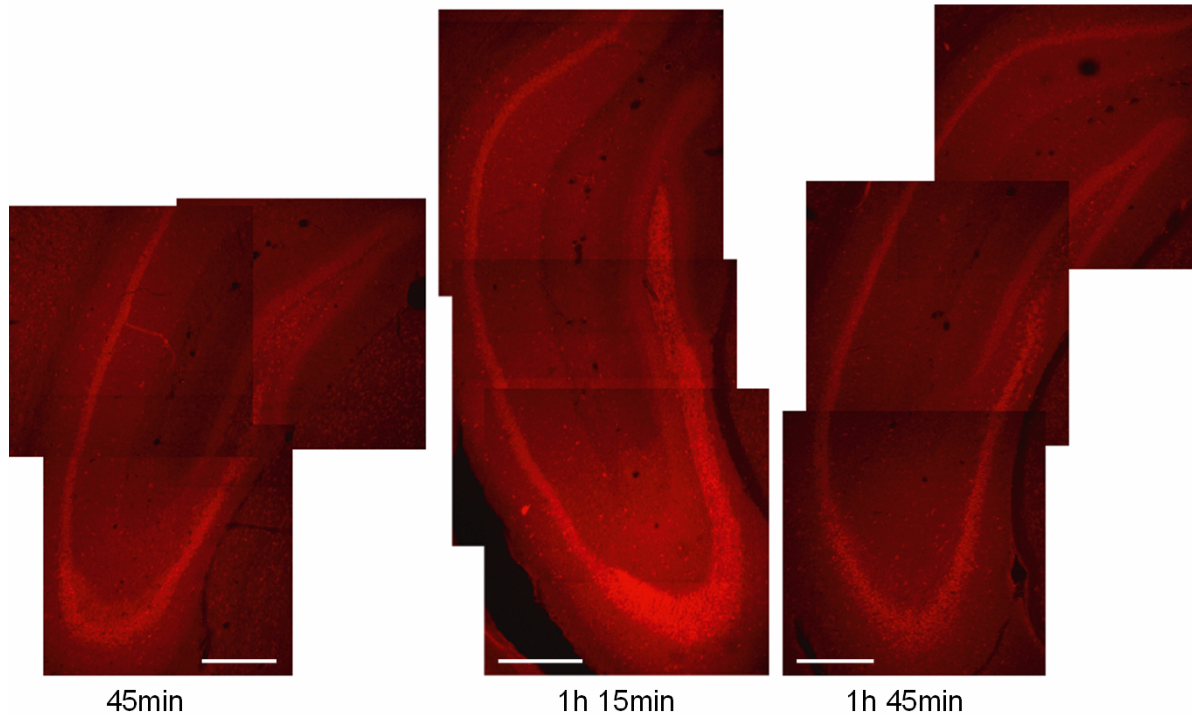


Abbildung 3-5 BDNF-Nachweis und der Einfluß der unterschiedlichen Nachfixierungszeiten mit 4%PFA. BDNF-Färbung ist bei einer Nachfixierungszeit von 1h 15min am intensivsten. Alle Präparate wurden mit dem BDNF-Immunsereum der Charge 13 gefärbt. Maßstabsbalken = 300µm.

Andere Chargen des BDNF-Immunsereums führten an Hippocampuschnitten desselben 75min postfixierten Mausgehirns zu ähnlichen Resultaten im Bezug auf die gefärbten Regionen (Abbildung 3-6). In wiederholten Experimenten zeigten sich trotz Einhaltung exakt entsprechender Durchführung gewisse interindividuelle Unterschiede hinsichtlich der Intensität der BDNF-Immundefärbung.

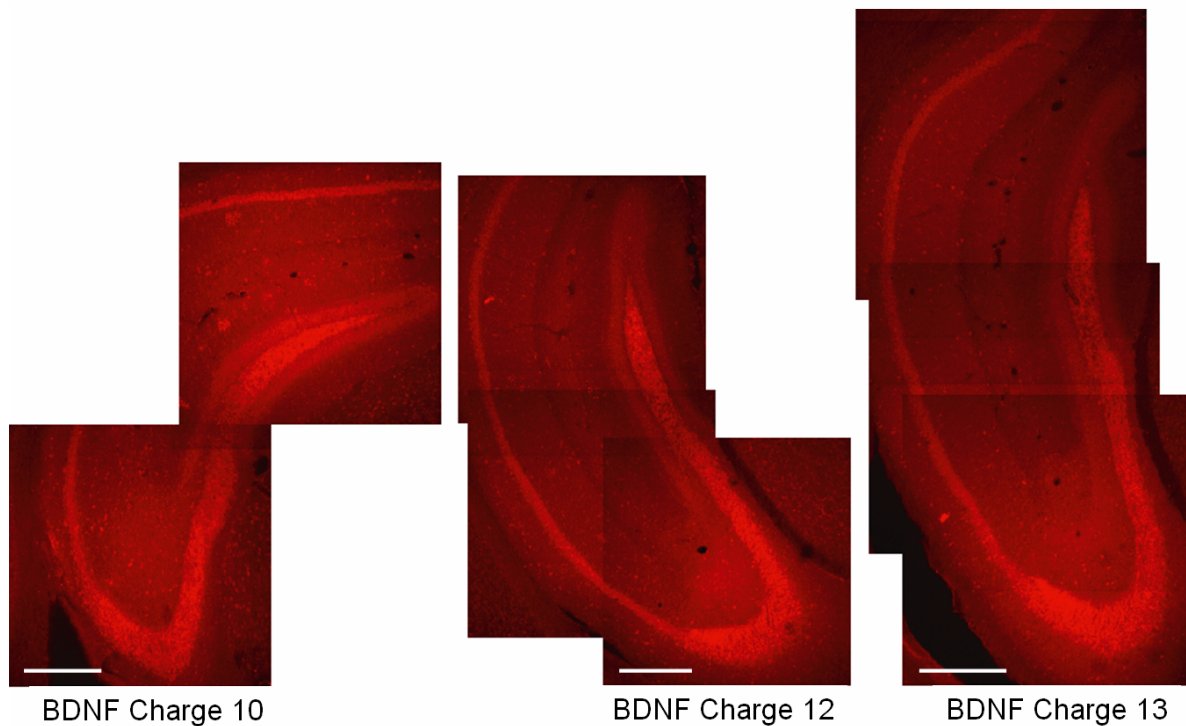


Abbildung 3-6 Verschiedene Chargen des BDNF-Immunsersums angewandt bei Hippocampusschnitten aus dem Gehirn derselben Wildtypmaus. Nachfixierungszeit: 1h 15min. Maßstabsbalken = 300µm.

Um die intensiv gefärbte Moosfaser- bzw. CA3-Region näher zu untersuchen, wurden Detailaufnahmen dieser Region angefertigt (Abbildung 3-7).

Das Überblicksbild zeigt die BDNF-Färbung des Hippocampus (Abbildung 3-7, A). Das schwarze Rechteck markiert die Region, die im nächsten Bild abgebildet ist (Abbildung 3-7, B); auch hier verweist ein längliches schwarzes Rechteck auf den Ausschnitt, der auf den nächsten Bildern in zwei unterschiedlichen Ebenen zu sehen ist (Abbildung 3-7, C1+C2).

Aus der Detailaufnahme zweier benachbarter Ebenen ist die Färbung der Moosfasern nachweisbar und es können Pakete mit BDNF-Protein über eine gewisse Länge des Axons detektiert werden.

Zusammenfassend ausgedrückt konnte mit den optimierten Färbebedingungen BDNF auch in der Immunhistochemie detektiert werden, wobei sich im Hippocampus wildtypischer Mäuse in der CA4- und CA3-Region, sowie im Bereich der Moosfasern die höchste Intensität zeigte.

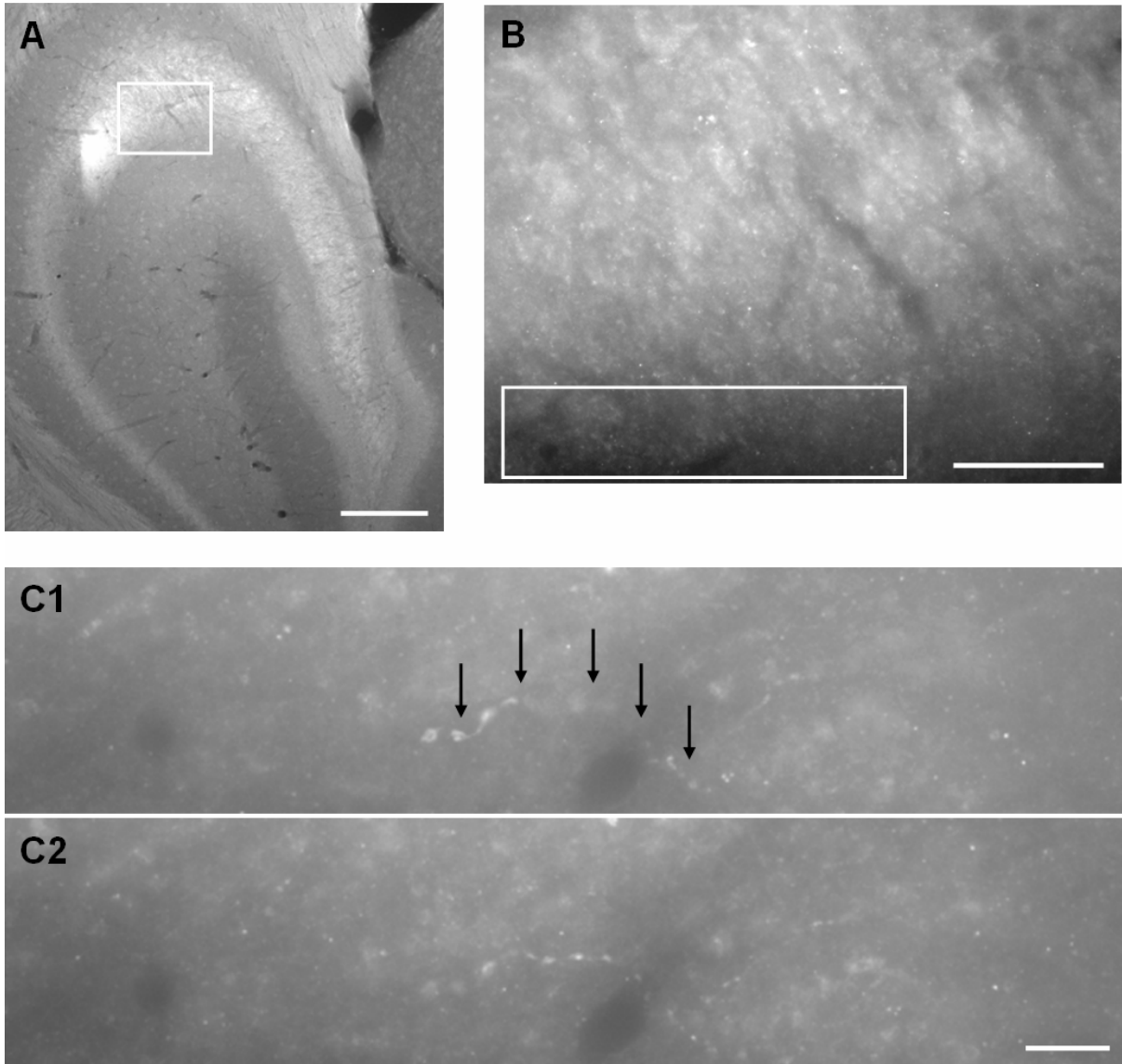


Abbildung 3-7 Detailaufnahme eines Axons. Hippocampusüberblick (A), mit Ausschnitt (B), mit Ausschnitten zweier verschiedener Ebenen, auf denen Pakete mit BDNF-Protein über eine gewisse Länge des Axons nachweisbar sind (C1+C2). Rechtecke markieren die jeweils im Folgebild vergrößerte Region. Pfeile in C1 unterstützen die optische Erfassung des Axons. Maßstabsbalken in A = 200 μ m; Maßstabsbalken in B = 50 μ m; Maßstabsbalken in C = 10 μ m.

3.2 BDNF-Untersuchungen an CNTF-defizienten Mäusen

Im vorherigen Kapitel konnten die Bedingungen des selbst hergestellten BDNF-Immunsersums für Western Blot-Untersuchungen und Immunhistochemie optimiert und die spezifische BDNF-Detektion des Serums nachgewiesen werden.

Zudem sollten im Rahmen dieser Arbeit die Ergebnisse der Vorarbeiten von Rudolf Götz und Stefan Wiese, die Hinweise auf verminderte BDNF-Level im Hippocampus CNTF-defizienter Tiere geliefert hatten, auf Proteinebene kontrolliert und verifiziert werden.

Es wurden dazu drei verschiedene Ansätze gewählt, um BDNF im Hippocampus von CNTF-defizienten Mäusen und wildtypischen Geschwistertieren zu vergleichen: Mittels BDNF-Immunsersum wurde erstens in der Immunhistochemie die Verteilung und der Gehalt von BDNF untersucht und zweitens in Western Blot-Untersuchungen der jeweilige BDNF-Gehalt ermittelt. Im dritten Ansatz wurden mittels Quantikine BDNF-ELISA ebenfalls die jeweiligen BDNF-Gehalte bestimmt.

3.2.1 BDNF-Nachweis mittels Immunhistochemie

Hippocampusschnitte adulter CNTF-defizienter Tiere und wildtypischer Mäuse wurden im beschriebenen Procedere mittels BDNF-Immunsersum gefärbt und auf Unterschiede untersucht.

Abbildung 3-8 zeigt exemplarisch die BDNF-Immunfärbung an Gehirnschnitten entsprechender Hippocampusabschnitte sowie die Kontrollen. Dabei wiesen die Hippocampusschnitte der beiden Genotypen die gleiche BDNF-Verteilung auf, die auch mit den im vorherigen Kapitel erzielten Ergebnissen übereinstimmte.

Die BDNF-Immunfärbung des wildtypischen Hippocampus ist aufgrund des höheren Hintergrundes intensiver, was auch in Ausschnitten verschiedener Regionen in Abbildung 3-9 der Fall ist.

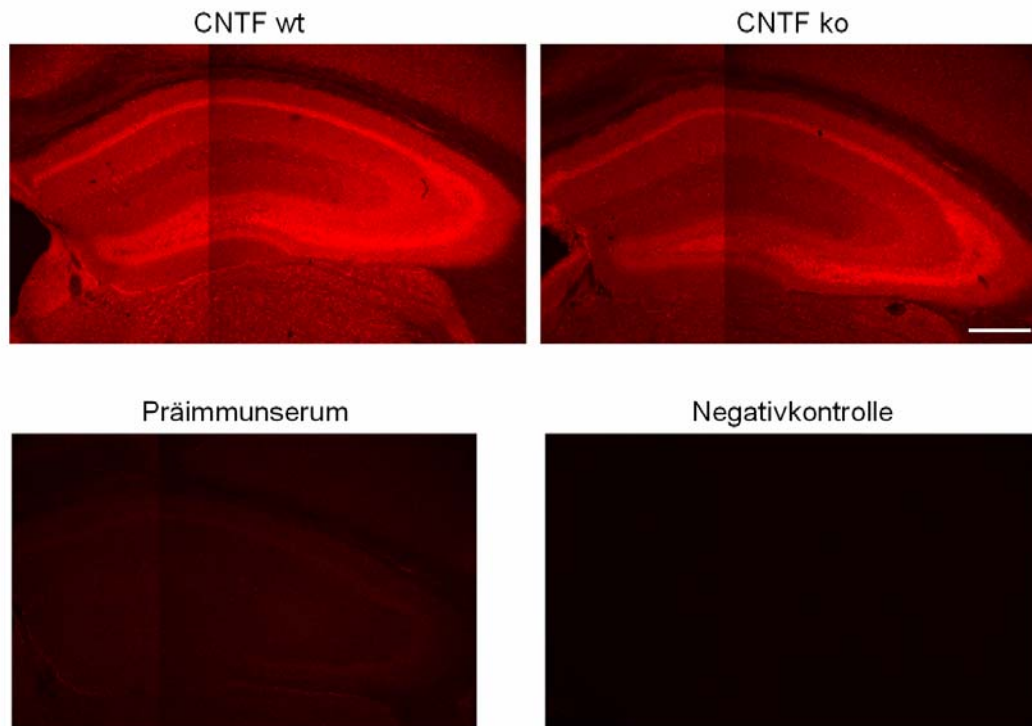


Abbildung 3-8 BDNF-Immunhistochemie an CNTF-defizienten Mäusen. BDNF-Färbung mit dem BDNF-Immunsereum (Charge 12) an Hippocampusschnitten aus CNTF-defizienten Mäusen (CNTFko) und wildtypischen Geschwistertieren (CNTFwt) ergab keine Unterschiede der BDNF-Verteilung zwischen den beiden Genotypen. Inkubation mit Präimmunserum bzw. ohne Primäranitkörper (Negativkontrolle) dienten als Kontrollen. Maßstabsbalken = 300µm.

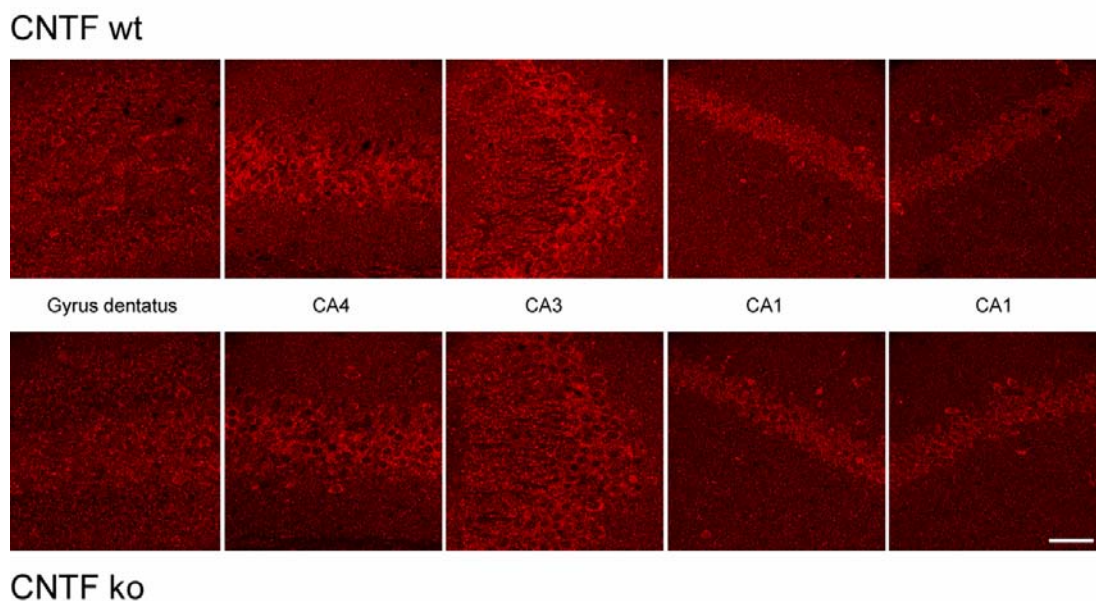


Abbildung 3-9 BDNF-Immunhistochemie an CNTF-defizienten Mäusen. BDNF-Färbung mit dem BDNF-Immunsereum (Charge 12) an Hippocampusschnitten von CNTF-defizienten Mäusen (CNTFko) und wildtypischen Geschwistertieren (CNTFwt). Ausschnitte der Präparate in Abbildung 3-8 im direkten Vergleich der entsprechenden Regionen (Gyrus dentatus, CA4, CA3 und zwei Regionen von CA1). Maßstabsbalken = 50µm.

Um die Unterschiede der BDNF-Immunfärbung zwischen CNTF-defizienten und wildtypischen Mäusen beurteilen zu können, wurde die Intensität jeweils in den verschiedenen Regionen in einem standardisierten Verfahren ermittelt (siehe Material und Methoden S.65).

Dabei waren in keiner Region statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen zu finden (Abbildung 3-10, A-G). Die höchsten Intensitäten wurden jeweils in der CA4- und CA3-Region gemessen. Die durchschnittlichen Referenzintensitäten waren zwischen den Gruppen sehr ähnlich, die einzelnen Referenzintensitäten waren jedoch in der Wildtyp-Gruppe breiter gestreut (Abbildung 3-10, H).

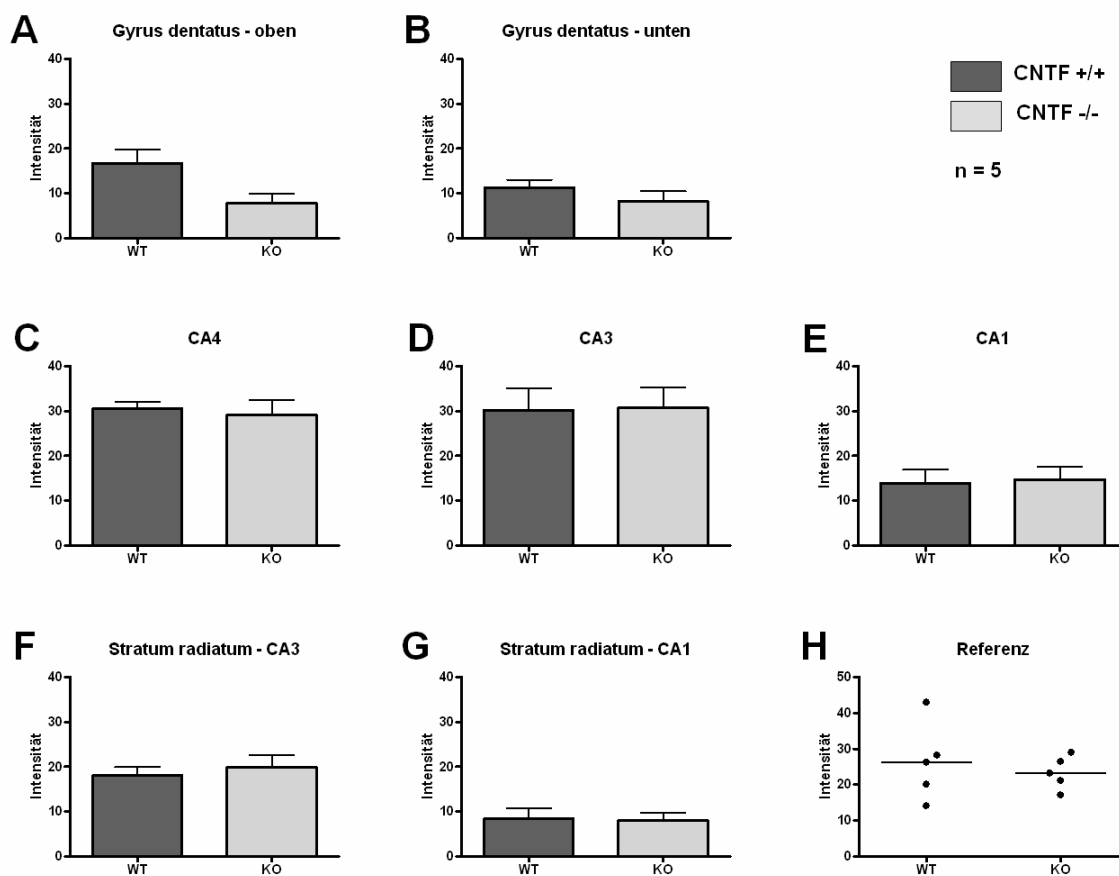


Abbildung 3-10 Intensitätsmessung der BDNF-Immunhistochemie an standardisierten Regionen im Hippocampus von CNTF-defizienten Mäusen (KO) und wildtypischen Geschwistertieren (WT) im Vergleich (A-G). Schwankungsbereich der jeweiligen Referenzintensitäten (H).

Zusammenfassend ausgedrückt konnten in der Immunhistochemie keine Unterschiede bezüglich Verteilung oder Gehalt an BDNF im Hippocampus CNTF-defizienter Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen festgestellt werden.

3.2.2 BDNF-Nachweis mittels Western Blot

Nachdem die Immunhistochemie keine Hinweise auf veränderte BDNF-Verteilung oder BDNF-Mengen im Hippocampus CNTF-defizienter Mäuse lieferte, wollten wir diese Aussage, die im Gegensatz zu den Vorarbeiten von Stefan Wiese stand, durch Western Blot-Untersuchungen untermauern.

Dazu wurden mit RIPA-Puffer gewonnene Hippocampuslysate von 2 bis 3 Monate alten CNTF-defizienten Mäusen und wildtypischen Geschwistertieren im Western Blot mittels BDNF-Immunsereum auf Unterschiede bezüglich ihres BDNF-Gehaltes untersucht. Die Bandenintensitäten wurden mittels Aida-Software ermittelt und über Aktin als Beladungskontrolle normalisiert (Details siehe Material und Methoden S.43).

Es konnten dabei keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen CNTF-defizienten und wildtypischen Mäusen ermittelt werden. In Abbildung 3-11 sind die verschiedenen Western Blot-Untersuchungen auch als Balkendiagramme und WT/KO-Ratios dargestellt und ausgewertet. Die Balkendiagramme verdeutlichen die Intensitätsunterschiede und spiegeln die normalisierten Intensitäten der einzelnen Western Blots als „arbitrary units“ wider. Die nebenstehenden Darstellungen der WT/KO-Ratios veranschaulichen den direkten Intensitätsvergleich der BDNF-Banden von Hippocampuslysaten der beiden Genotypen.

Zu beachten ist die starke Ähnlichkeit der entsprechenden Lysate in den ersten beiden Western Blot-Untersuchungen, wie es aus den zugehörigen Balkendiagrammen der BDNF-Intensitäten deutlich wird (Abbildung 3-11, A+B). Der dritte Western Blot zeigt dagegen ein heterogeneres Bild der BDNF-Intensitäten (Abbildung 3-11, C)

Abbildung 3-12 faßt die Ergebnisse der drei Western Blot-Untersuchungen zusammen und macht deutlich, dass zwischen Hippocampuslysaten aus CNTF-defizienten Mäusen und aus wildtypischen Geschwistertieren keine statistisch signifikanten Unterschiede bestehen. Die relativ großen Standardabweichungen resultieren aus den recht unterschiedlichen Intensitätswerten der verschiedenen Western Blot-Untersuchungen (Abbildung 3-12, A). Der Direktvergleich der Hippocampuslysate der beiden Genotypen in Form der WT/KO-Ratio unterstreicht einerseits die große Ähnlichkeit der BDNF-Gehalte und andererseits die geringe Schwankungsbreite (Abbildung 3-12, B). Es ist dabei zu bemerken, dass die drei deutlich abweichenden Werte alle aus dem dritten Western Blot stammten (vgl. Abbildung 3-11, C).

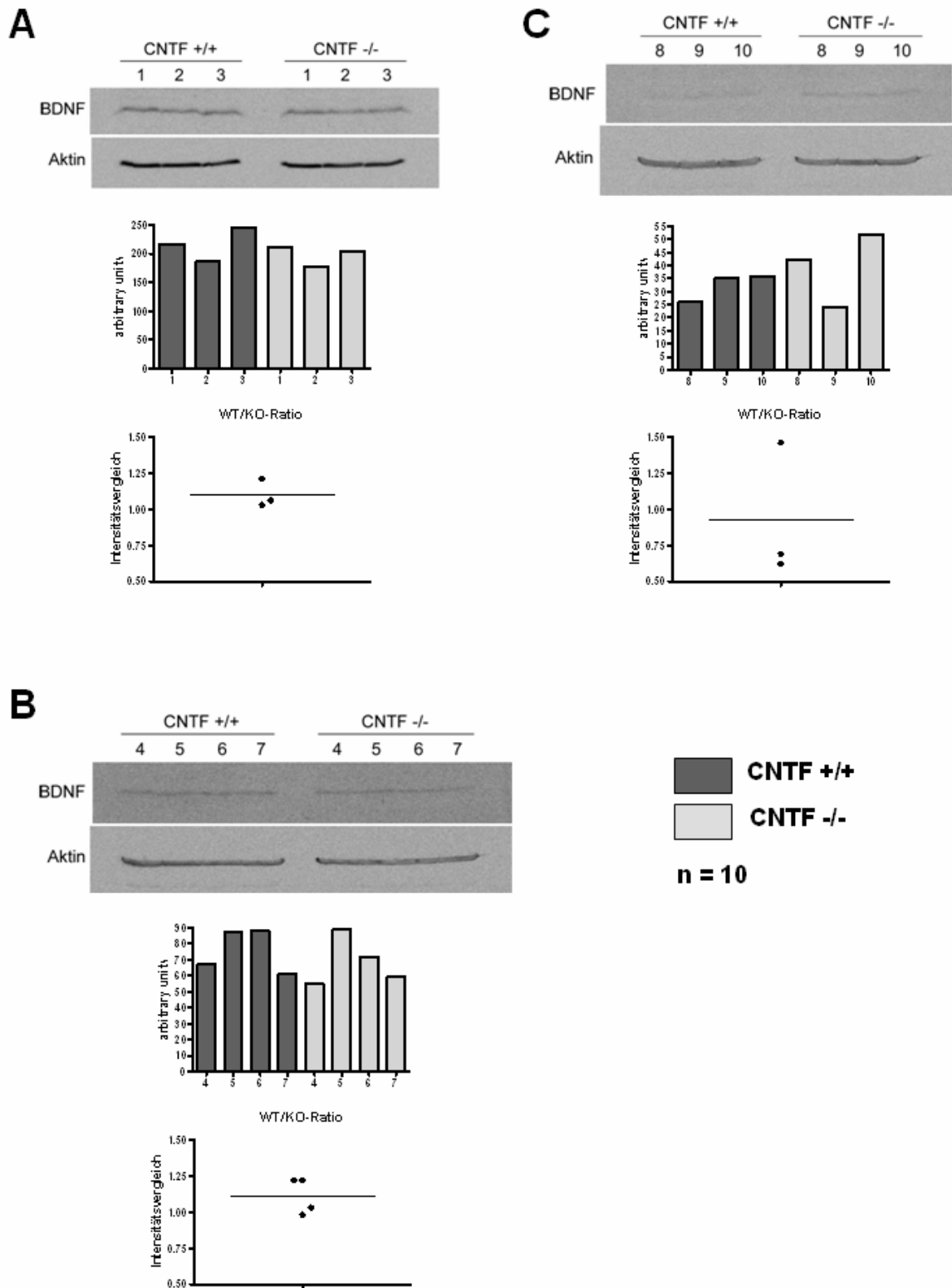


Abbildung 3-11 BDNF-Nachweis im Hippocampuslysate von CNTF-defizienten Mäusen und wildtypischen Geschwistertieren mittels Western Blot-Untersuchungen (A-C). Western Blots mit den zugehörigen Balkendiagrammen der normalisierten BDNF-Intensitäten sowie WT/KO-Ratio zum direkten Vergleich.

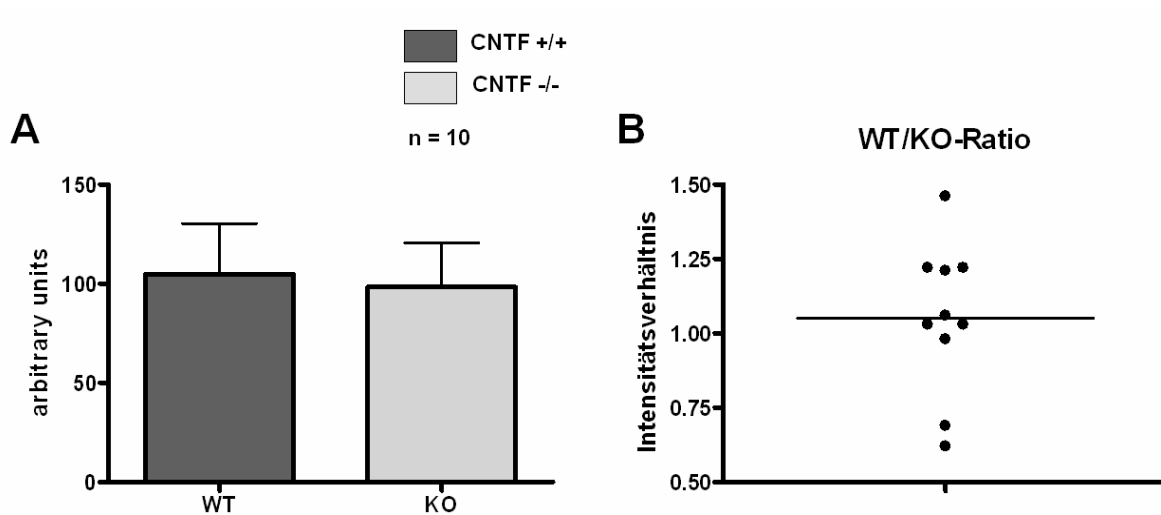


Abbildung 3-12 Vergleich der BDNF-Intensitäten von CNTF-defizienten Mäusen (KO) und wildtypischen Geschwistertieren (WT) im Balkendiagramm (A) und als WT/KO-Ratio im direkten Vergleich (B). Zusammenfassung der 10 Paarvergleiche (n=10) aus Abbildung 3-11.

Es konnten somit mit dem eigenen BDNF-Immenserum weder in der Immunhistochemie noch in Western Blot-Untersuchungen statistisch signifikante Unterschiede zwischen CNTF-defizienten Mäusen und wildtypischen Geschwistertieren bezüglich des hippocampalen BDNFs gefunden werden.

3.2.3 BDNF-Nachweis mittels BDNF-ELISA

Nachdem der Einsatz des eigenen BDNF-Immunsersums keinen veränderten BDNF-Gehalt im Hippocampus CNTF-defizienter Tiere ergeben hatte, wurde dieses Ergebnis zusätzlich durch Einsatz eines BDNF-ELISAs geprüft.

Die Bestimmung des BDNF-Gehaltes verschiedener Gewebe von CNTF-defizienten Mäusen und wildtypischen Geschwistertieren im Alter von 5 Monaten mittels BDNF-ELISA ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen. Der BDNF-Gehalt der unterschiedlichen Gewebe (Bulbus olfactorius, Hippocampus, Cortex und Cerebellum) wies dabei ähnliche Werte auf, die zwischen 20 und 25ng BDNF/g wet weight schwankten.

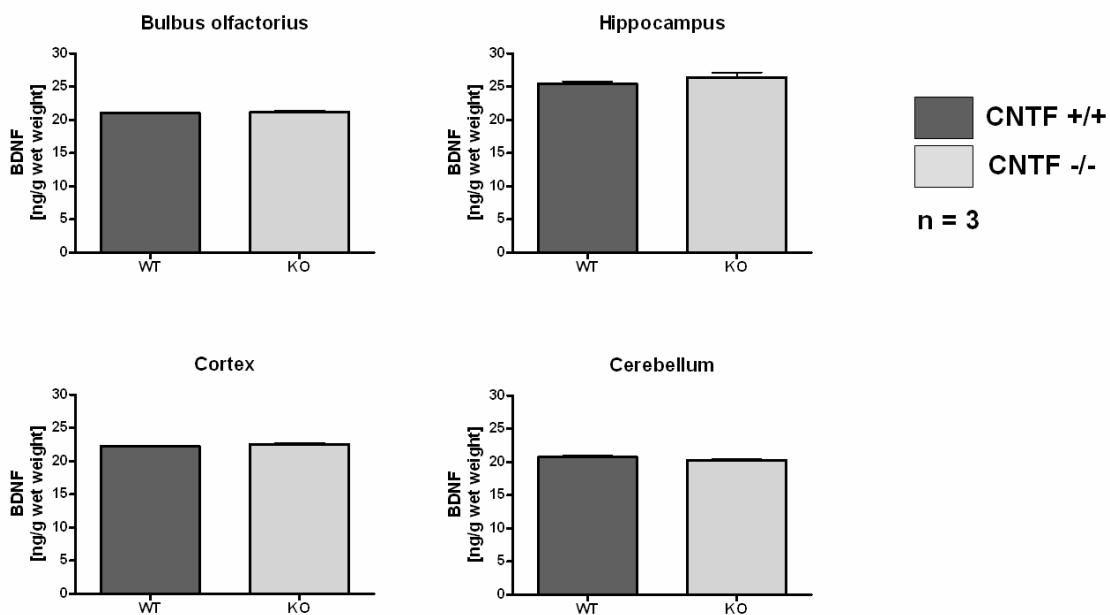


Abbildung 3-13 Bestimmung des BDNF-Gehaltes mittels BDNF-ELISA. Bestimmung des BDNF-Gehaltes an verschiedenen Geweben (Bulbus olfactorius, Hippocampus, Cortex und Cerebellum) von CNTF-defizienten Mäusen sowie wildtypischen Geschwistertieren mittels BDNF-ELISA.

Mit allen drei verwendeten Verfahren, Immunhistochemie, Western Blot-Untersuchung und BDNF-ELISA, konnte kein veränderter BDNF-Gehalt im Hippocampus CNTF-defizienter Tiere ermittelt werden.

3.3 Elektrophysiologische Untersuchungen an CNTF-defizienten Mäusen

Die Bestimmung der LTP und LTD an CNTF-defizienten Mäusen wurde in Kooperation mit Martin Korte (MPI, Martinsried) durchgeführt.

3.3.1 Bestimmung der LTP bei CNTF-defizienten Mäusen

In verschiedenen Untersuchungen konnte bereits die Rolle von BDNF für die Ausbildung von LTP im Hippocampus dargelegt werden (Korte, M. et al. 1995; Korte, M. et al. 1996), die auch bei heterozygot BDNF-defizienten Tieren (+/-) noch eine deutlich eingeschränkte LTP ergaben. Da sich in Vorarbeiten von Rudolf Götz und Stefan Wiese starke Hinweise dafür ergeben hatten, dass CNTF-defiziente Tiere im Vergleich zu ihren wildtypischen Altersgenossen einen deutlich geringeren hippocampalen BDNF-Gehalt aufweisen, wurden diese Tiere in einem parallelen Ansatz ebenfalls bezüglich ihrer LTP untersucht, wobei wir mit einer Einschränkung der LTP rechneten.

Die LTP wurde mit zwei unterschiedlichen Stimulationsprotokollen untersucht und jeweils an Hippocampuschnitten aus CNTF-defizienten Mäusen bzw. wildtypischen Geschwistertieren im Alter von 3 Monaten durchgeführt: Tetanus-Stimulation und TBS (Theta-burst stimulation).

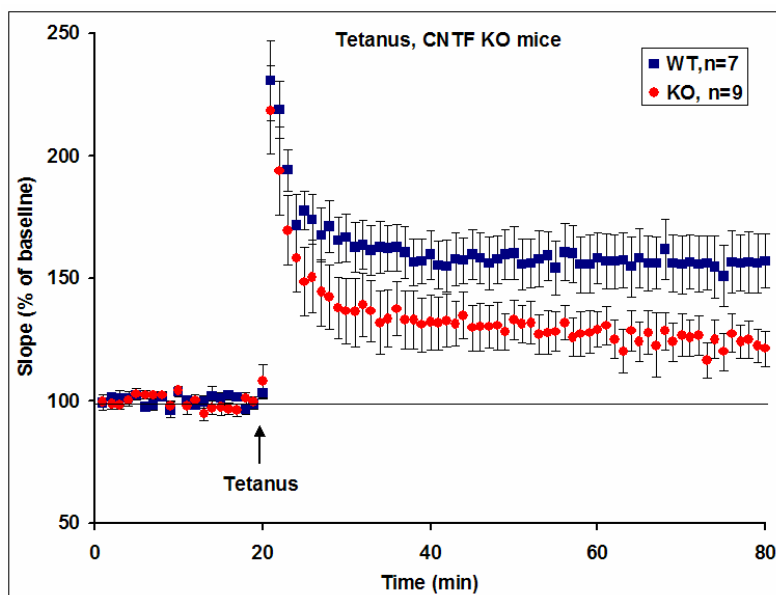


Abbildung 3-14 LTP-Untersuchungen an der CA1-Synapse CNTF-defizienter Mäuse unter Verwendung der Tetanus-Stimulation. Eingeschränkte Ausbildung von LTP bei CNTF-defizienten Mäusen (KO) im Vergleich zu wildtypischen Geschwistertieren (WT).

Die Tetanus-Stimulation bestand aus 3x30 Pulsen von 100Hz und resultierte in einer Steigerung der Amplitude auf 160% bei Wildtyp-Tieren 60min nach der Stimulation, während die Amplitude der CNTF-defizienten Geschwistertiere zum gleichen Zeitpunkt nur 130% des Ausgangswertes betrug (Abbildung 3-14).

Bei der TBS (Theta-burst stimulation) ergab sich bei Wildtyp-Tieren 180min nach der Stimulation eine Steigerung der Amplitude auf 150%, während die Amplitude der CNTF-defizienten Geschwistertiere zum gleichen Zeitpunkt nur 120% des Ausgangswertes betrug (Abbildung 3-15).

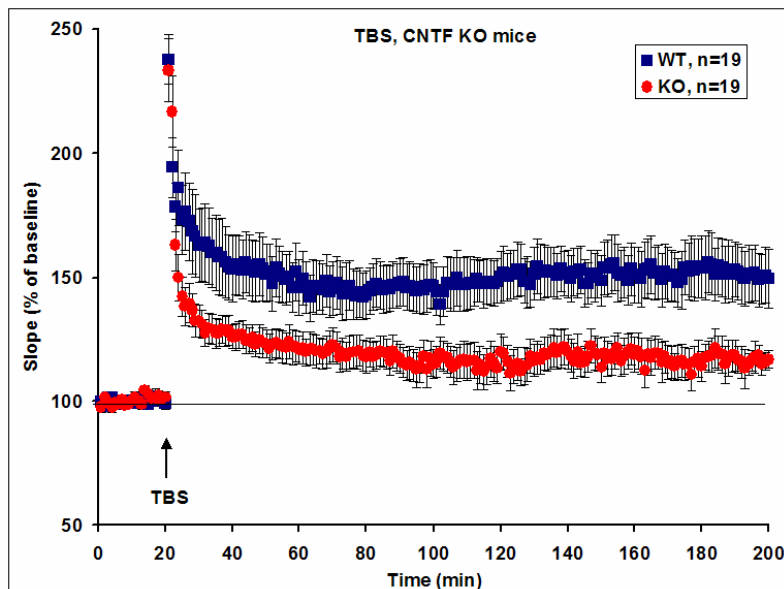


Abbildung 3-15 LTP-Untersuchungen an der CA1-Synapse CNTF-defizienter Mäuse unter Verwendung der TBS. Eingeschränkte Ausbildung von LTP bei CNTF-defizienten Mäusen (KO) im Vergleich zu wildtypischen Geschwistertieren (WT).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass bei beiden Stimulationsprotokollen, Tetanus-Stimulation und TBS, bei CNTF-defizienten Mäusen im Alter von 3 Monaten im Vergleich zu wildtypischen Geschwistertieren die Ausbildung von LTP stark eingeschränkt, aber nicht aufgehoben war.

3.3.2 Bestimmung der LTD bei CNTF-defizienten Mäusen

Nachdem die Untersuchungen an CNTF-defizienten Mäusen eine eingeschränkte Ausbildung der LTP ergeben hatten, war auch die Untersuchung der LTD an diesen Mäusen interessant, besonders da entsprechende Untersuchungen an BDNF-defizienten Tieren bisher fehlen.

Die LTD wurde mittels LFS (Low frequency stimulation; 900 Pulse mit 1Hz) provoziert und im Alter von 3 Wochen untersucht, da die LTD-Amplitude bei Wildtyptieren ab diesem Zeitpunkt immer kleiner wird und somit etwaige Unterschiede zwischen den Tieren zunehmend schlechter zu erfassen sind (Dudek, S.M. and Bear, M. 1993). Während Wildtyp-Tiere nach 80min eine Amplitude von 85% aufwiesen, zeigten ihre CNTF-defizienten Geschwistertiere eine Amplitude von 105% (Abbildung 3-16).

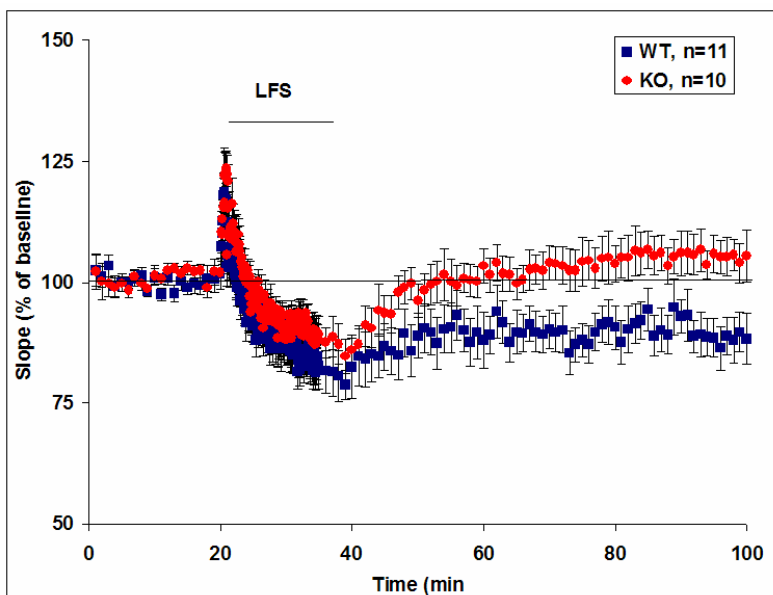


Abbildung 3-16 LTD-Untersuchungen an der CA1-Synapse CNTF-defizienter Mäuse unter Verwendung von LFS. Keine Ausbildung von LTD bei CNTF-defizienten Mäusen (KO) im Vergleich zu wildtypischen Geschwistertieren (WT).

Somit war bei CNTF-defizienten Mäusen nicht nur die Ausbildung von LTP, sondern auch die Ausbildung von LTD im Vergleich zu wildtypischen Geschwistertieren stark eingeschränkt.

3.4 Anatomische Untersuchungen an CNTF-defizienten Mäusen

Aufgrund der veränderten LTP und LTD bei CNTF-defizienten Mäusen im Vergleich zu wildtypischen Geschwistertieren waren der ultrastrukturelle Vergleich in der CA1-Region sowie die genaue Lokalisation von CNTF von besonderer Relevanz.

3.4.1 Elektronenmikroskopische Bilder

In der vorliegenden Arbeit sollten Grundlagen für die elektronenmikroskopische Analyse möglicher Unterschiede in der hippocampalen Synapsenmorphologie (Zahl und Fläche von Synapsen, perisynaptische Astrozytenfortsätze) zwischen CNTF-defizienten und wildtypischen Mäusen gelegt werden. Dies wurde in Kooperation mit Esther Asan (Anatomie, Würzburg) durchgeführt.

Die Herstellung von elektronenmikroskopischen Präparaten nach einer Standardmethode (siehe Material und Methoden S.53f) zeigte gute Erhaltung der Ultrastruktur von prä- und postsynaptischen Elementen, aber mangelhafte Strukturhaltung der osmotisch sehr empfindlichen, kleinen, perisynaptischen Astrozytenfortsätzen (nicht gezeigt).

Daher wurde eine schonende Einbettmethode nach Chan-Palay (Chan-Palay, V. and Palay, S.L. 1974) angewendet (siehe Material und Methoden S.54), die zu einer guten Strukturhaltung aller synaptischer Elemente bei beiden Genotypen führte.

Weder im Übersichtsbild des Hippocampus im Semidünnschnitt (Abbildung 3-17, A), noch im elektronenmikroskopischen Bild aus dem proximalen Stratum radiatum der CA1-Region zeigten sich bei qualitativer Analyse Unterschiede zwischen den Genotypen (Abbildung 3-17, B). Deutlich waren multiple asymmetrische Synapsen von mit Vesikeln gefüllten Axonterminalen an den Köpfen kleiner dendritischer Dornen zu erkennen (Pfeilköpfe in Abbildung 3-17, B und Abbildung 3-18), ebenso wie schmale, vielgestaltige Astrozytenfortsätze, die oft kleine Ausziehungen in den synaptischen Spalt zwischen Axonterminale und Dornenkopf hinein aufwiesen (As in Abbildung 3-17, B und Abbildung 3-18).

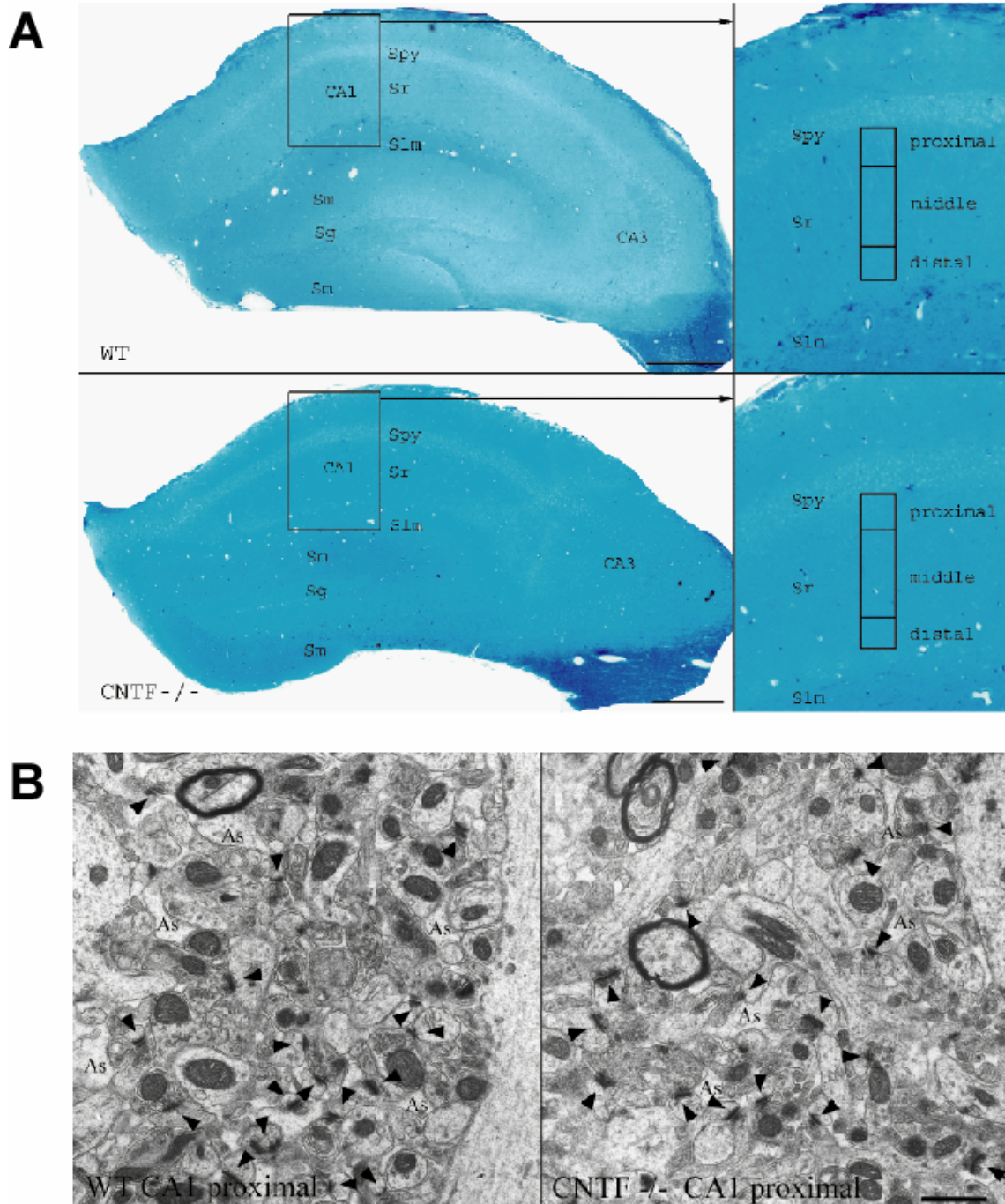


Abbildung 3-17 Hippocampus von CNTF-defizienten Mäusen und wildtypischen Geschwistertieren. Semidünnschnitte (A), und elektronenmikroskopische Aufnahmen (B) nach Präparation des Gewebes mit der Methode nach Chan-Palay (Chan-Palay, V. and Palay, S.L. 1974). Semidünnschnitte im Überblick (A, linke Bilder), Darstellung der verschiedenen analysierten Abschnitte des Stratum radiatum der CA1-Region (A, Boxen in den linken Bildern, rechts Vergrößerungen). Elektronenmikroskopische Aufnahmen des proximalen Stratum radiatum (B) zeigen keine qualitativen Unterschiede zwischen den Genotypen. SpY=Stratum pyramidale; Sr=Stratum radiatum; SIm=Stratum lacunosum moleculare; Sm=Stratum moleculare; Sg=Stratum granulosum; Pfeilspitzen markieren postsynaptische Dichte; As=Astrozyt. Maßstabsbalken in A = 300 μ m; Maßstabsbalken in B = 1 μ m.

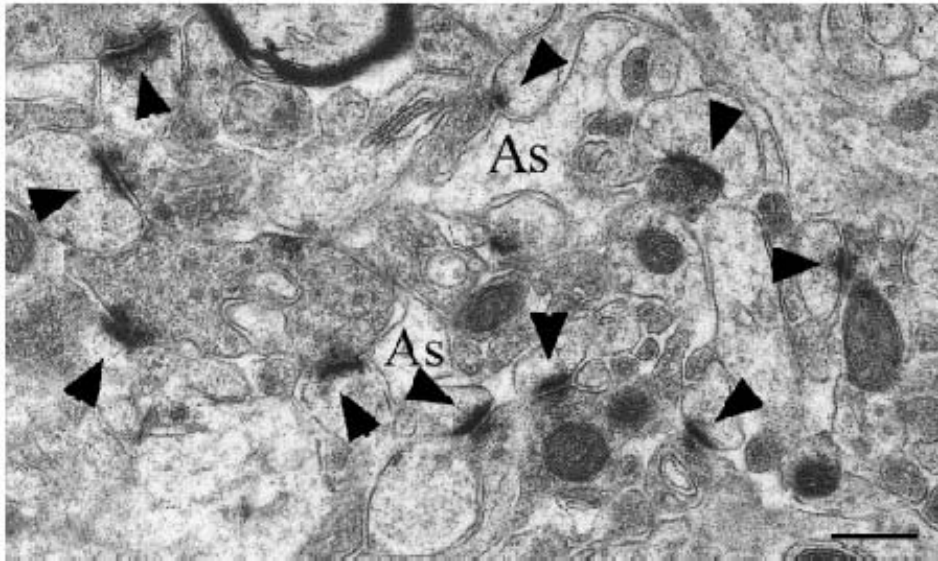


Abbildung 3-18 Elektronenmikroskopisches Bild nach Präparation des Gewebes mit der Methode nach Chan-Palay (Chan-Palay, V. and Palay, S.L. 1977). Ausschnittsvergrößerung aus Abbildung 3-17, B (CNTF-defizientes Tier, rechts) zur Veranschaulichung der schmalen, vielgestaltigen Astrozytenfortsätze, die oft kleine Ausziehungen in den synaptischen Spalt zwischen Axonterminale und Dornenkopf hinein aufweisen. Pfeilspitzen markieren postsynaptische Dichte; As=Astrozyt. Maßstabsbalken = 0,5 μ m.

Zusammenfassend ausgedrückt konnte in der vorliegenden Arbeit einerseits eine geeignete Methode der Schnittpräparation für die quantitative Analyse morphologischer Unterschiede ermittelt werden, andererseits konnten qualitativ auffällige morphologische Abweichungen in der CA1-Region CNTF-defizienter Mäuse ausgeschlossen werden. Aufbauend auf diese grundlegenden Vorarbeiten können in der Zukunft genauere, vergleichende Untersuchungen der CA1-Region mit dem Focus auf Zahl und Fläche von Synapsen sowie Lokalisation der Astrozyten erfolgen.

3.4.2 Lokalisierung von CNTF

Für die Modulation synaptischer Plastizität werden meistens präsynaptische und postsynaptische Komponenten verantwortlich gemacht. Neben den genannten wäre zusätzlich eine extra- oder perisynaptische Komponente denkbar. Astrozyten sind an der Signaltransmission im Bereich der Synapse in vielfacher Hinsicht beteiligt. Sie umgeben mit ihren Fortsätzen oft die synaptischen Partner (siehe Abbildung 3-18) und sind u.a. an der Elimination bzw. der Bereitstellung von Neurotransmittern und der Aufrechterhaltung des für Transmissionsvorgänge notwendigen ionalen Milieus beteiligt (Kandel, E.R. et al. 2000).

Es ist bekannt, dass CNTF von Astrozyten im Mausgehirn exprimiert wird (Dallner, C. et al. 2002), wobei der Nachweis der CNTF-Expression im Hippocampus bisher auf die Fimbria und das Stratum lacunosum moleculare beschränkt blieb.

Da sich reduzierte hippocampale BDNF-Level in CNTF-defizienten Mäusen in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigen ließen, diese Tiere aber eine eingeschränkte LTP und LTD aufwiesen, war eine Hypothese, dass CNTF im Hippocampus möglicherweise auch in Astrozyten des Stratum radiatum lokalisiert und über eine Beeinflussung der Funktion der perisynaptischen Astrozyten und/oder der synaptischen Partner an der Modulation synaptischer Plastizität beteiligt sein könnte.

Zur Ermittlung der Lokalisation von CNTF im Hippocampus wurden Hippocampusschnitte von CNTF-defizienten Mäusen als Negativkontrolle und von wildtypischen Geschwistertieren mittels Immunhistochemie mit dem CNTF-Antiserum K10 und einem GFAP-Antikörper untersucht.

Im Gyrus dentatus der Tiere zeigt sich eine deutliche K10 bzw. GFAP-Färbung, die in der Negativkontrolle ohne Primärantikörper fehlt (Abbildung 3-19, A). Die K10-Färbung war dabei in Hippocampusschnitten der CNTF-defizienten Maus in allen Regionen, Gyrus dentatus, CA3- und CA1-Region, schwächer als in Schnitten des wildtypischen Geschwister-tieres, wobei diese Abschwächung in geringerem Maße auch für GFAP galt (Abbildung 3-19, A+B; Abbildung 3-20, A).

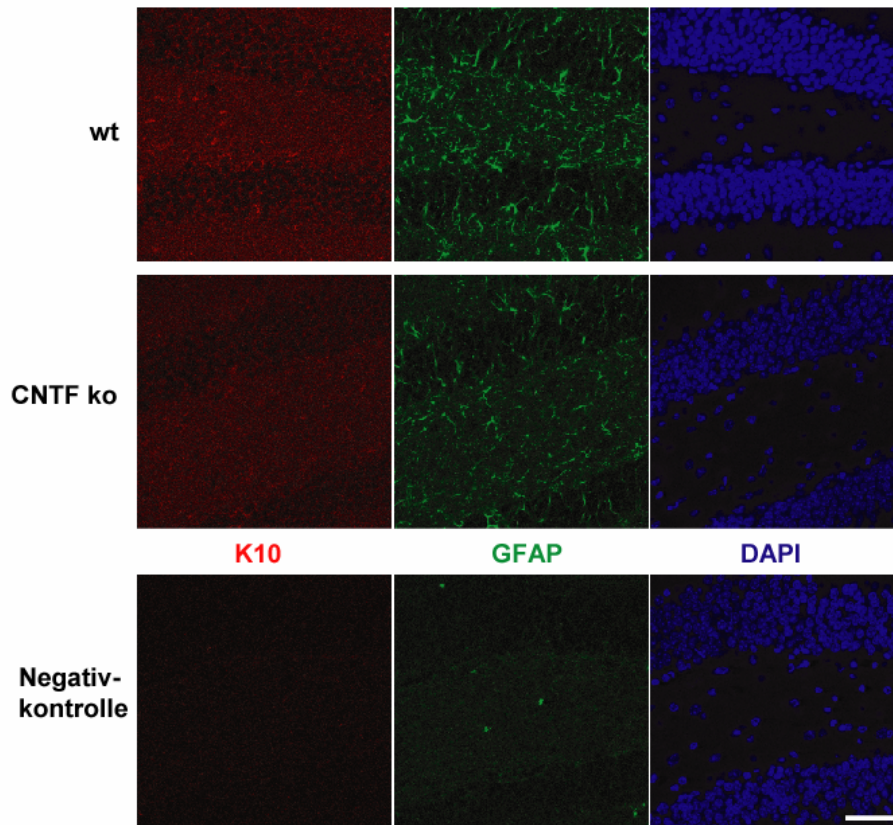
Dabei war die K10-Färbung mit der GFAP-Färbung teilweise kolokalisiert, zeigte aber auch eigenständige, unabhängige Färbung beispielsweise von Pyramidenzellen (Abbildung 3-20, A).

Sowohl in der CA3-Region als auch in der CA1-Region des Wildtyptieres fanden sich GFAP-reaktive Astrozyten, die auch Reaktivität für das CNTF-Antiserum zeigten (Abbildung 3-20,

B). Allerdings fand sich ein ähnliches Bild einer Doppelreaktivität für GFAP und das CNTF-Antiserum gelegentlich auch in beiden Hippocampusregionen von CNTF-defizienten Tieren (nicht gezeigt).

Zusammenfassend dargestellt konnte in der vorliegenden Arbeit keine eindeutig spezifische CNTF-Färbung in der grauen Substanz des Hippocampus gefunden werden. Dies schließt allerdings eine geringe, unter der Nachweisgrenze der immunhistochemischen Methode liegende oder möglicherweise aktivitätsabhängige, variable CNTF-Produktion in Astrozyten des Stratum radiatum oder anderer synaptischer Bereiche des Hippocampus nicht völlig aus.

A Gyrus dentatus



B CA1-Region

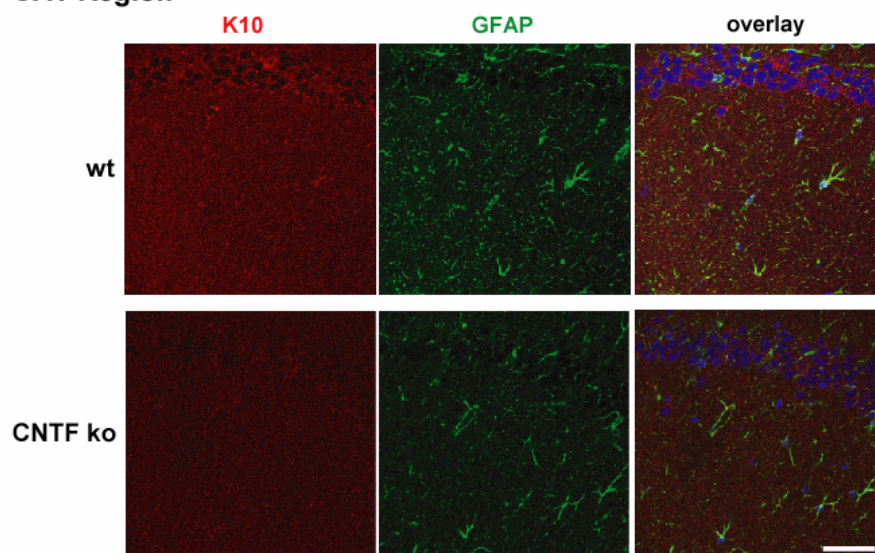


Abbildung 3-19 Lokalisierung von CNTF – Teil 1. Färbungsintensitäten im Gyrus dentatus von CNTF-defizienter Maus und wildtypischem Geschwistertier im Vergleich mit Negativkontrolle (A). Ausschnitte der CA1-Region zeigen geringere Färbintensitäten an CNTF-defizienter Maus im Vergleich zum wildtypischen Geschwistertier (B). Maßstabsbalken = 50µm.

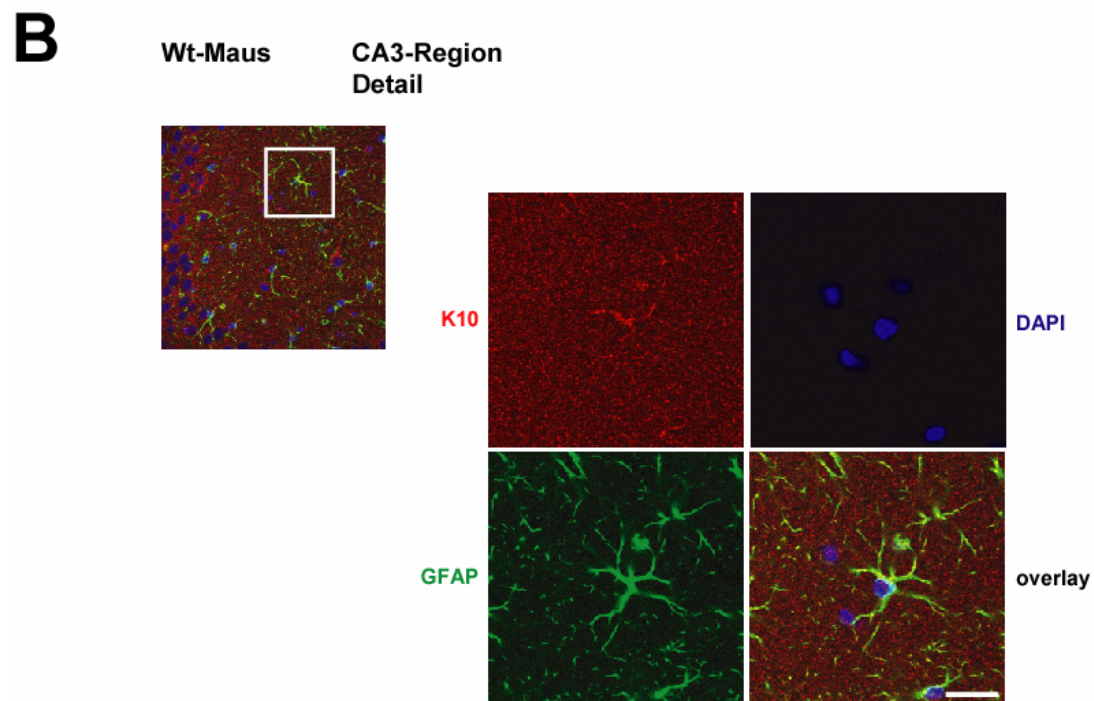
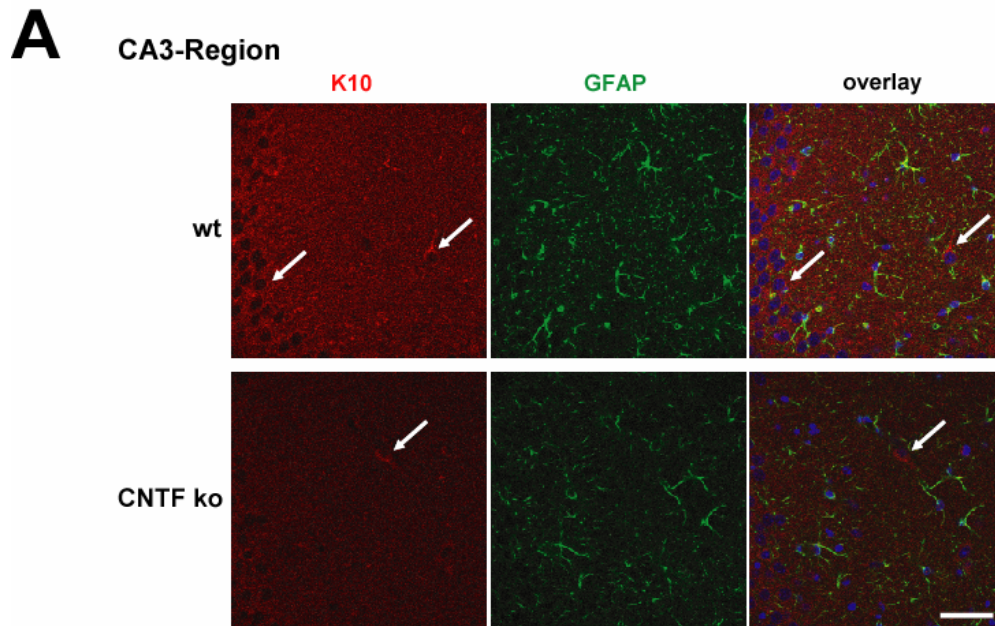


Abbildung 3-20 Lokalisierung von CNTF – Teil 2. Ausschnitte der CA3-Region belegen geringere Färbintensitäten bei CNTF-defizienter Maus im Vergleich zum wildtypischen Geschwistertier (A) Pfeile markieren die K10-gefärbten Strukturen in der CA3-Region. Detailaufnahme aus der CA3-Region einer wildtypischen Maus zeigt K10- und GFAP-Färbung (B). Es ist keine spezifische CNTF-Färbung im Stratum radiatum nachweisbar. Maßstabsbalken in A = 50 μ m; Maßstabsbalken in B = 20 μ m

3.5 BDNF-Untersuchungen an konditionalen IGF1-Rezeptor-defizienten Mäusen

In der zweiten Fragestellung des ersten Themenkomplexes sollte die mögliche Rolle von Insulin-like growth factor (IGF) als Modulator synaptischer Plastizität näher untersucht werden.

In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass körperliches Training zur BDNF-Hochregulation im Hippocampus führt (Neeper, S.A. et al. 1995; Johnson, R.A. et al. 2003; Griesbach, G.S. et al. 2004). IGF, der in der Lage ist, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden (Reinhardt, R.R. and Bondy, C.A. 1994), wird dabei als Vermittler in diesem Zusammenhang angenommen. IGF wird bei körperlichem Training vom Muskel ins Blut sezerniert, bindet nach Passage der Blut-Hirn-Schranke im Hippocampus an die entsprechenden Rezeptoren und könnte für die BDNF-Hochregulation verantwortlich sein.

Um diese Hypothese zu prüfen, wurden unter NFL-Promotor IGF1-Rezeptor-defiziente Mäuse und wildtypische Geschwistertiere jeweils mit und ohne einwöchiges Laufradtraining in der Immunhistochemie und im Western Blot mittels des BDNF-Immuserums bezüglich ihres BDNF-Gehaltes untersucht.

3.5.1 BDNF-Nachweis mittels Immunhistochemie

In Abbildung 3-21 sind BDNF-Immunfärbungen an Hippocampusschnitten der vier Gruppen exemplarisch gegenübergestellt. Die charakteristische BDNF-Färbung ist in den Methodenkontrollen nicht zu sehen. Es zeigte sich dabei keine veränderte BDNF-Verteilung bei unter NFL-Promotor IGF1-Rezeptor-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren. Auch durch einwöchiges Laufradtraining war in der Immunhistochemie keine Veränderung der Verteilung oder Intensität der BDNF-Immunreaktivität weder innerhalb der transgenen noch der wildtypischen Gruppe zu erkennen.

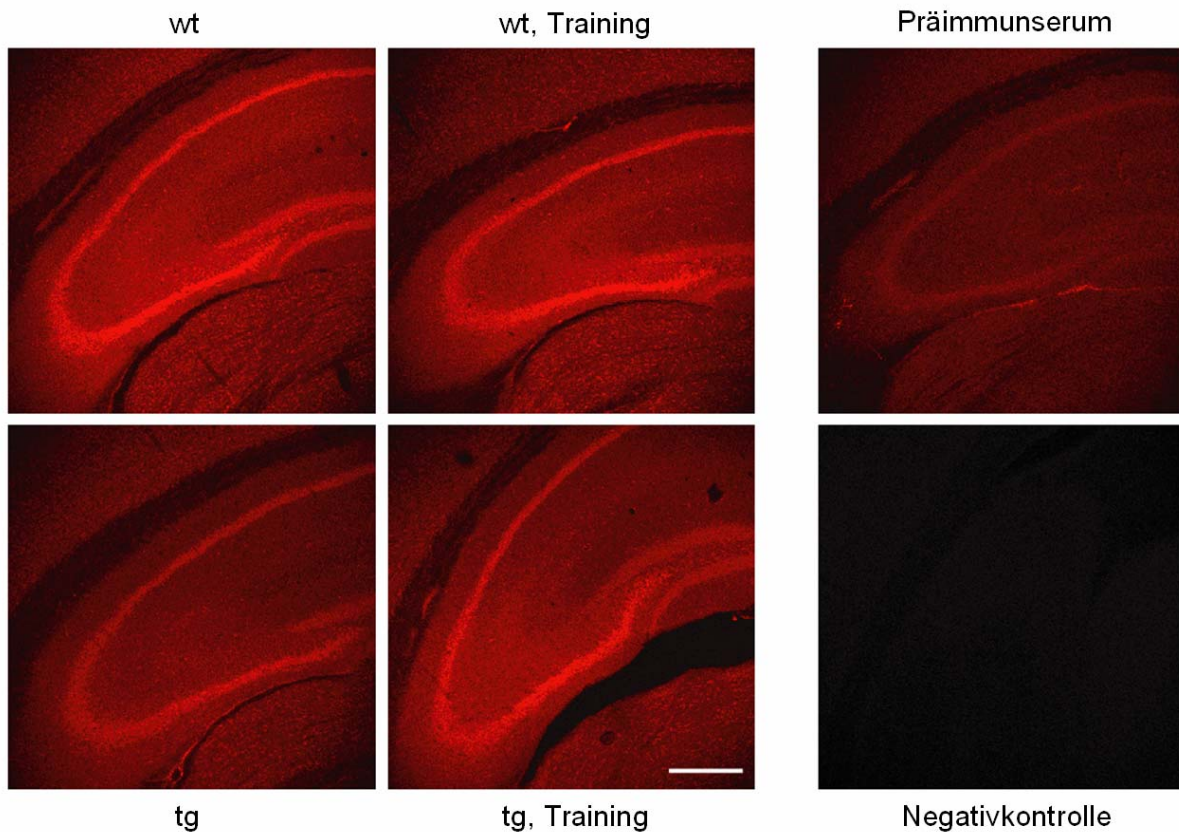


Abbildung 3-21 BDNF-Nachweis im Hippocampus von unter NFL-Promotor IGF1-Rezeptor-defizienten Mäusen (tg) und wildtypischen Geschwistertieren (wt) jeweils mit und ohne einwöchiges Laufradtraining mittels Immunhistochemie. In allen vier Gruppen ist die charakteristische BDNF-Färbung zu sehen, es sind jedoch keine Unterschiede zwischen den Gruppen nachweisbar. Präimmunserum-Kontrolle und Negativkontrolle (rechts). Maßstabsbalken = 300µm.

3.5.2 BDNF-Nachweis und Quantifizierung im Western Blot

Nachdem in der Immunhistochemie keine Unterschiede bezüglich hippocampaler BDNF-Verteilung nachweisbar waren, wurden Hippocampuslysate der vier Gruppen in Western Blot-Untersuchungen in puncto BDNF-Gehalt verglichen.

Zuerst wurden jedoch etwaige Seitenunterschiede des wildtypischen hippocampalen BDNF-Gehaltes mittels Western Blot untersucht, da die beiden Seiten des Hippocampus auch schwerpunktmäßig unterschiedliche Gedächtnisinhalte verarbeiten.

Dazu wurden 6 Wildtypmäuse in zwei Gruppen aufgeteilt, wobei einer Gruppe eine Woche Laufradtraining ermöglicht wurde. Anschließend wurden mit RIPA-Puffer Hippocampuslysate beider Seiten hergestellt, im Western Blot miteinander verglichen und die Intensitäten der BDNF-Banden über Aktin als Beladungskontrolle normalisiert. Während die rechtsseitige

BDNF-Bande im Western Blot oft deutlicher war, ließ sich dieser Trend in den quantitativen Auswertungen (Balkendiagramme) nicht bestätigen (Abbildung 3-22, A-C).

Das zusammenfassende Balkendiagramm der verschiedenen Hippocampuslysate zeigt höhere durchschnittliche BDNF-Level in den Trainingsgruppen verglichen mit den Gruppen ohne Training (Abbildung 3-22, D). Diese Unterschiede waren jedoch nicht statistisch signifikant, möglicherweise aufgrund der geringen Probenzahl. Seitenunterschiede waren ebenfalls nicht nachweisbar.

Obwohl in der vorherigen Untersuchung keine Seitendifferenz bezüglich BDNF nachgewiesen werden konnte, wurden im folgenden Experiment ausschließlich rechtsseitige Hippocampuslysate verwendet.

Dabei wurden mit RIPA-Puffer hergestellte Hippocampuslysate von unter NFL-Promotor IGF1-Rezeptor defizienten Mäusen und wildtypischen Geschwistertieren jeweils mit und ohne einwöchiges Laufradtraining im Alter von 4 bis 6 Monaten im Western Blot auf ihren BDNF-Gehalt untersucht. Es wurde die Intensität der jeweiligen BDNF-Bande gemessen, über Aktin als Beladungskontrolle normalisiert und die BDNF-Intensitäten der vier Gruppen als Balkendiagramme dargestellt (Abbildung 3-23, A-E).

Im zusammenfassenden Balkendiagramm der vier Gruppen konnte eine statistisch signifikante BDNF-Hochregulation im Hippocampus der Trainingsgruppen nachgewiesen werden (Abbildung 3-23, F). Interessant war, dass auch bei unter NFL-Promotor IGF1-Rezeptor defizienten Mäusen der BDNF-Gehalt in der Gruppe mit einwöchigem Laufradtraining im Vergleich zur Gruppe ohne Training statistisch signifikant erhöht war.

Zusammenfassend ausgedrückt konnten erstens keine Seitenunterschiede im hippocampalen BDNF-Gehalt nachgewiesen werden. Zweitens ergaben die Laufradexperimente mit unter NFL-Promotor IGF1-Rezeptor-defizienten Mäusen und wildtypischen Geschwistertieren eine statistisch signifikante BDNF-Hochregulation in beiden Trainingsgruppen.

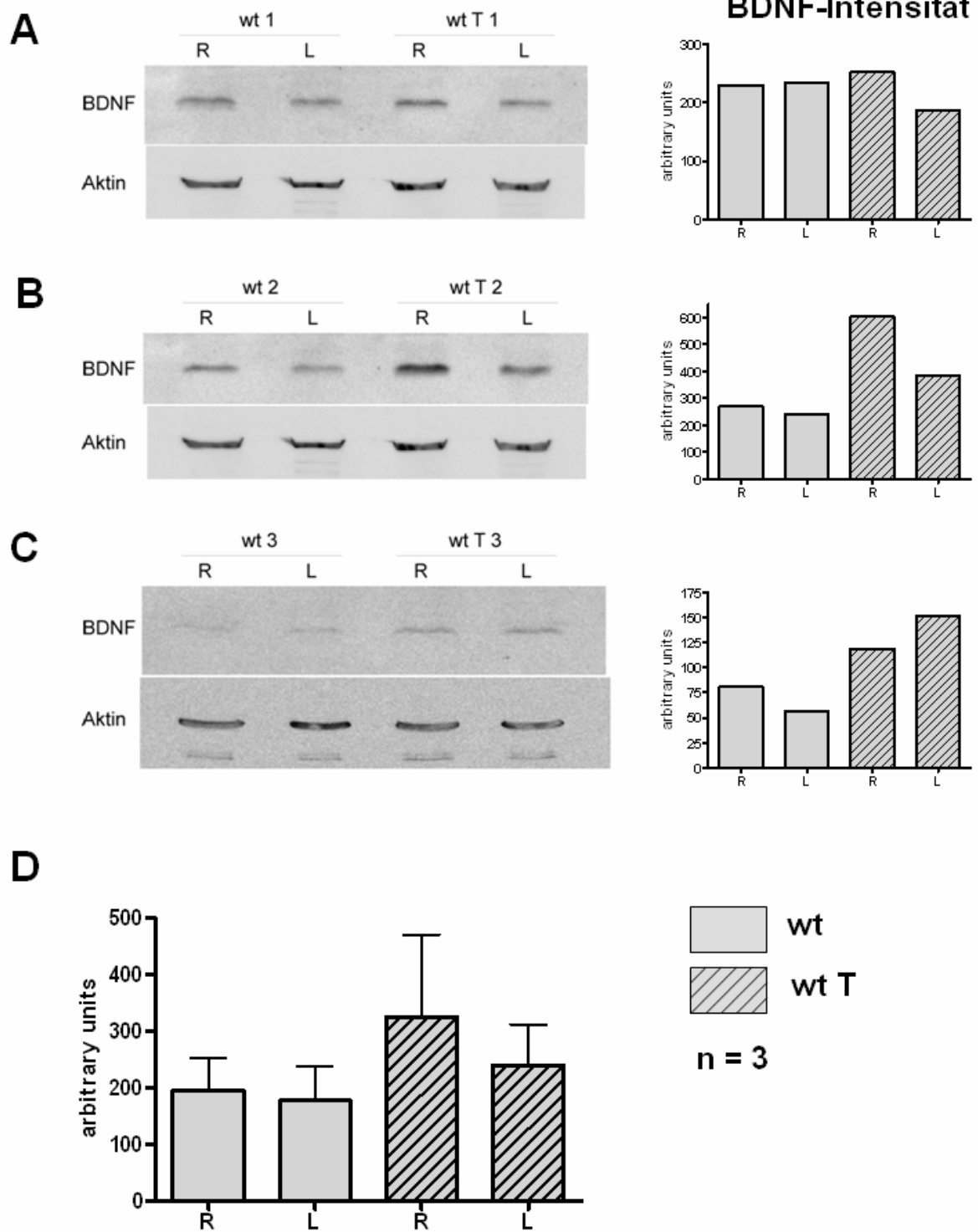


Abbildung 3-22 BDNF-Nachweis im Hippocampuslysate von wildtypischen Mäusen (wt) mit und ohne einwöchigem Lauftraining mittels Western Blot. Die Hippocampuslysate wurden dabei seitentrennt hergestellt und miteinander verglichen (A-C). Zusammenfassung der BDNF-Intensitäten der vier Gruppen im Balkendiagramm zeigt keine statistisch signifikanten Unterschiede (D). R=rechts; L=links; T=Training.

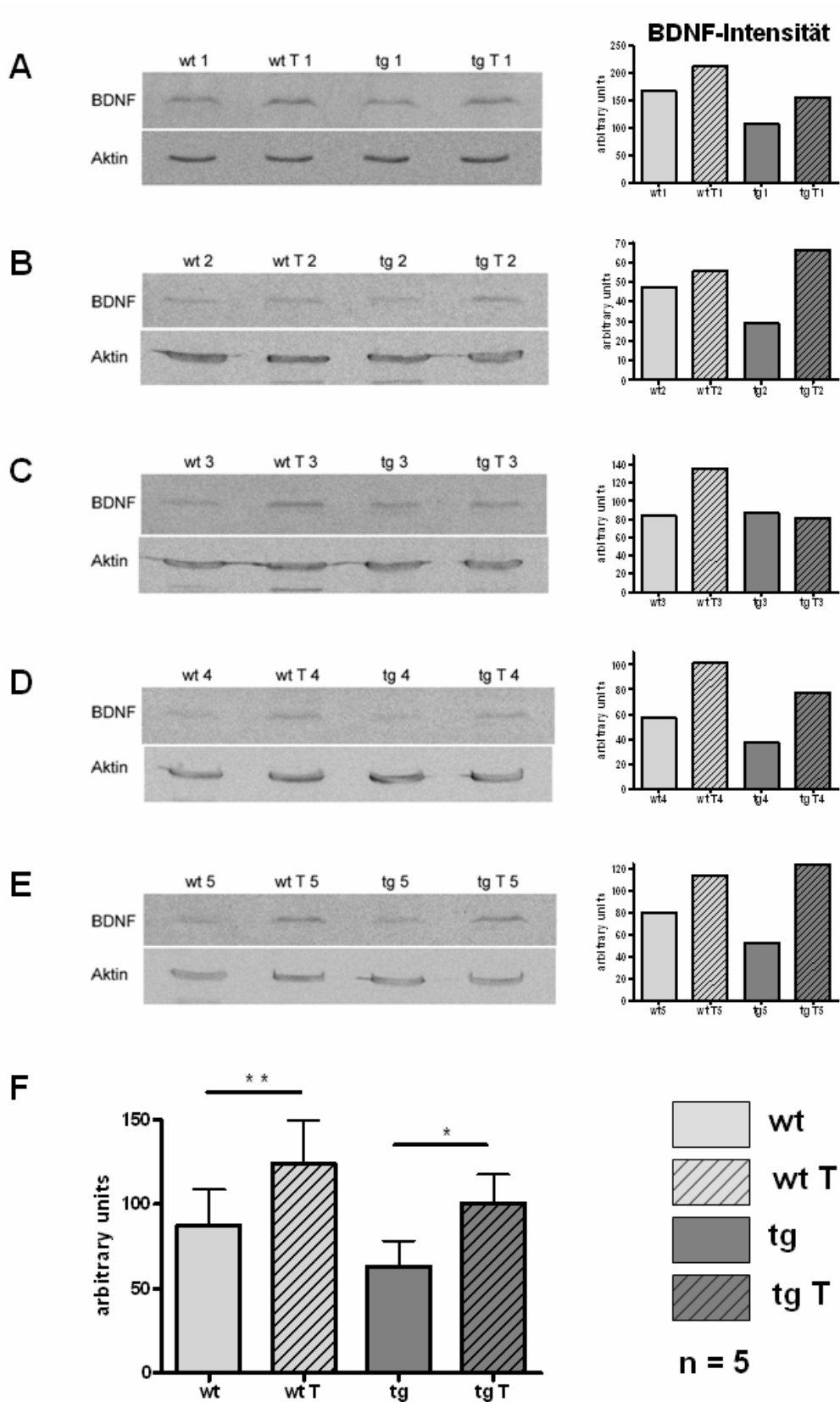


Abbildung 3-23 BDNF-Nachweis im Hippocampuslysate von unter NFL-Promotor IGF1-Rezeptor-defizienten Mäusen (tg) und wildtypischen Geschwistertieren (wt) jeweils mit und ohne einwöchiges Laufradtraining mittels Western Blot. Es wurden nur Hippocampuslysate der rechten Seite miteinander verglichen (A-E). Die BDNF-Intensitäten der vier Gruppen wurden als Balkendiagramm dargestellt und statistisch signifikante BDNF-Hochregulation in den Trainingsgruppen nachgewiesen (F). T=Training; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

3.6 BDNF-Untersuchungen an geflochten BDNF-Mäusen

Aufgrund persönlicher Mitteilung der Arbeitsgruppe Yves-Alain Barde, die auf einen verminderten hippocampalen BDNF-Gehalt bei geflochten BDNF-Mäusen hinwies, wurden mögliche fehlerhafte Positionen der loxP-Sites angenommen, die in der Folge theoretisch und praktisch kontrolliert wurden, um zu klären, ob diese Mauslinie für weiter Experimente überhaupt zu verwenden ist. Dazu wurden einerseits verschiedene Genotypen im Western Blot mittels BDNF-Immunsereum bezüglich ihres BDNF-Gehaltes untersucht und andererseits das zugehörige Genkonstrukt auf eventuelle Transkriptionsfehler kontrolliert.

3.6.1 Kontrolle des Gen-Konstruktes

Die durchgeführte Kontrolle des Gen-Konstruktes zeigte die loxP-Sites, die sich mit ca. 590 bzw. 910 Basenpaaren in ausreichendem Abstand vom Exon 2 des BDNF-Gens der Maus befinden (Abbildung 3-24). Somit dürfte in der konditionalen BDNF-knockout Maus weder die Transkription und Entstehung der 4261 Basenpaar-langen mRNA, noch die Translation der kodierenden 750 Basenpaare zum 249 Aminosäuren-langen unreifen Protein, das nach Spaltung zum 119 Aminosäuren-langen reifen Protein wird, beeinträchtigt sein.

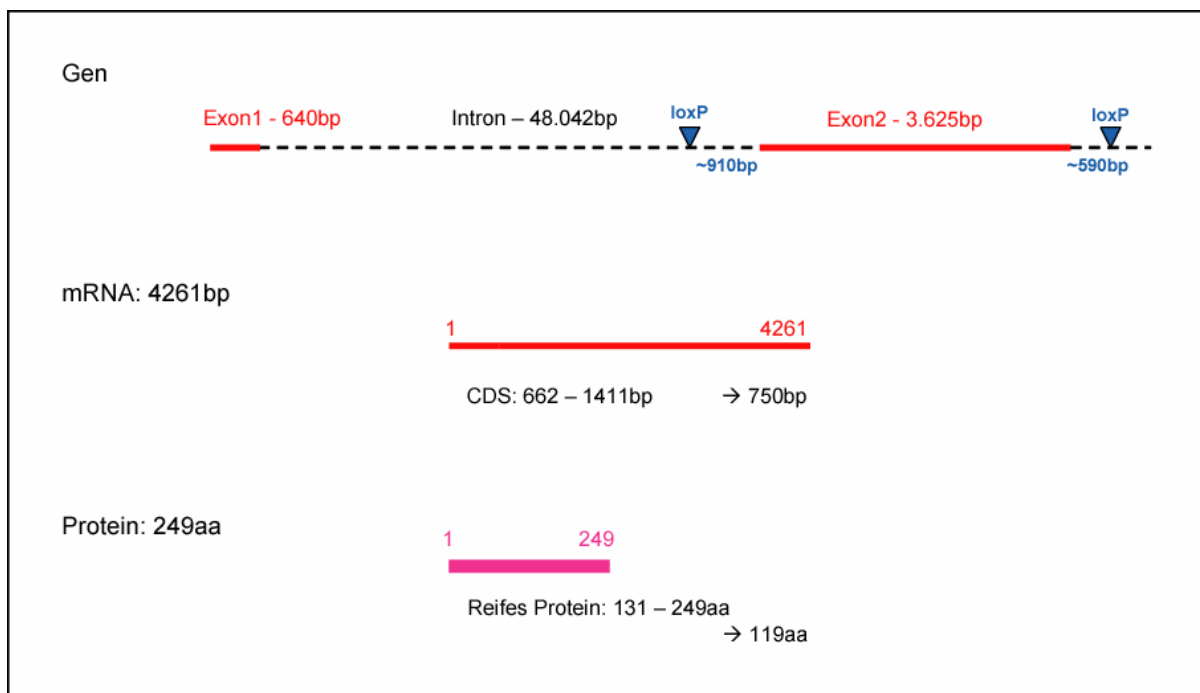


Abbildung 3-24 Gen-Konstrukt der geflochten BDNF-Maus mit Lage und Abstand der loxP-Sites vom Exon 2. Weg vom Gen zum reifen Protein.

In einer homozygot geflochten transgenen BDNF-Maus wird in Abhängigkeit vom jeweiligen zelltyp-spezifischen Promotor in jenen Zellen die Cre Rekombinase aktiviert, die das zwischen den loxP-Sites befindliche Stück ausschneidet, wodurch die komplette für die Proteinsynthese kodierende Sequenz eliminiert wird.

3.6.2 BDNF-Nachweis mittels Western Blot

Um die theoretischen Überlegungen in der Praxis nachzuweisen wurden in einem Vorabexperiment mit RIPA-Puffer hergestellte Hippocampuslysate verschiedener BDNF-Genotypen mittels Western Blot und BDNF-Immunsereum im Hinblick auf den jeweiligen BDNF-Gehalt untersucht. Die Intensitäten der BDNF-Banden wurden ermittelt, über Aktin als Beladungskontrolle normalisiert und miteinander verglichen.

Wie in Abbildung 3-25 dargelegt, zeigte sich verglichen mit dem hippocampalen BDNF-Gehalt einer C57Bl/6-Wildtypmaus (100%) ein auf ca. 70% eingeschränkter Wert bei einer heterozygot geflochten BDNF-Maus bzw. auf 30-40% eingeschränkte Werte bei zwei homozygot geflochten BDNF-Mäusen, die alle ein intaktes BDNF-Gen und somit ähnliche BDNF-Gehalte aufweisen müssten. Bei einer homozygot geflochten NFL-Cre-transgenen BDNF-Maus lag der Wert bei ca. 25%.

Um in dieser Frage eine statistische Auswertung zu ermöglichen, wurden Hippocampuslysate mehrerer Tiere der verschiedenen BDNF-Genotypen im Alter von 7 Monaten mittels Western Blot und BDNF-Immunsereum auf ihre BDNF-Gehalte untersucht. Herstellung der Hippocampuslysate und Auswertung erfolgten analog.

Es konnten zwischen C57Bl/6-Mäusen, homozygot geflochten (FF) und heterozygot geflochten (FW) BDNF-Mäusen keine statistisch signifikanten Unterschiede der hippocampalen BDNF-Gehalte festgestellt werden (Abbildung 3-26).

Dabei waren die durchschnittlichen BDNF-Werte der heterozygot und homozygot geflochten BDNF-Mäuse deutlich höher als die der C57Bl/6-Wildtypiere, wobei die Werte innerhalb der Gruppen sehr starken Schwankungen unterlagen, wie aus den einzelnen Balkendiagrammen der „arbitrary units“ hervorgeht (Abbildung 3-26, A-D). Die große Varianz der Werte in diesen Gruppen war sicher auch ein Grund, weshalb die relativ homogenen Werte der homozygot geflochten NFL-Cre-transgenen BDNF-Mäuse keine statistisch signifikanten Unterschiede zu homozygot bzw. heterozygot geflochten BDNF-Mäusen aufwiesen.

Das zusammenfassende Balkendiagramme stellt die BDNF-Intensitäten der wichtigsten Genotypen mit den jeweiligen Standardabweichungen dar (Abbildung 3-26, E).

Zusammenfassend ausgedrückt besteht kein statistisch signifikanter Unterschied der hippocampalen BDNF-Gehalte von C57Bl/6-Mäusen, homozygot geflochten (FF) und heterozygot geflochten (FW) BDNF-Mäusen. Die geflochte BDNF-Mauslinie kann damit für weitere Versuche verwendet werden.

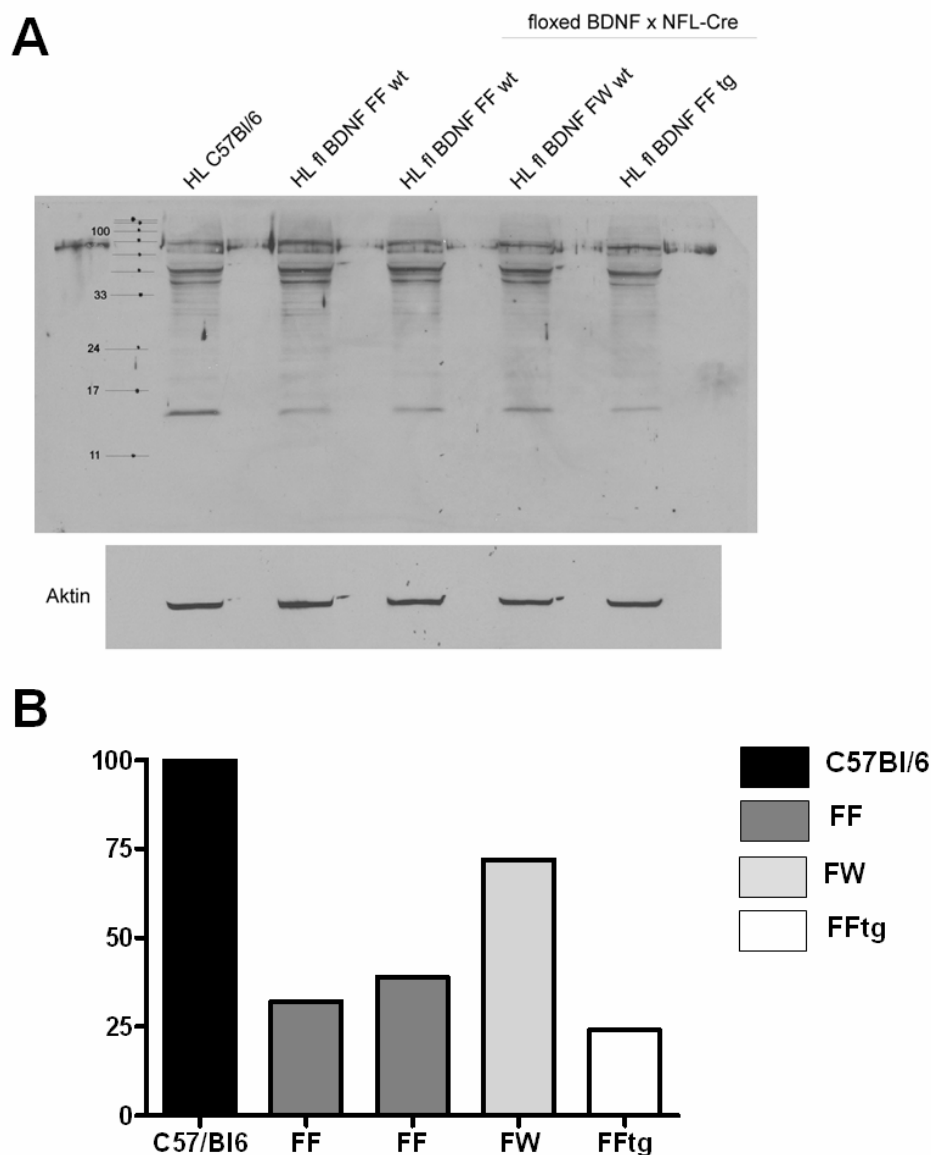


Abbildung 3-25 Vorabexperiment: BDNF-Nachweis und Quantifizierung im Hippocampuslysate bei verschiedenen Genotypen mittels Western Blot-Untersuchung zeigt stark unterschiedliche BDNF-Intensitäten (A). Balkendiagramm der über Aktin als Beladungskontrolle normalisierten BDNF-Intensitäten der verschiedenen Proben (B). HL=Hippocampuslysate; fl=geflocht; wt=wildtypisch; tg=transgen (NFL-Cre-positiv); FF=homozygot geflocht; FW=heterozygot geflocht; FFtg=homozygot geflocht & transgen.

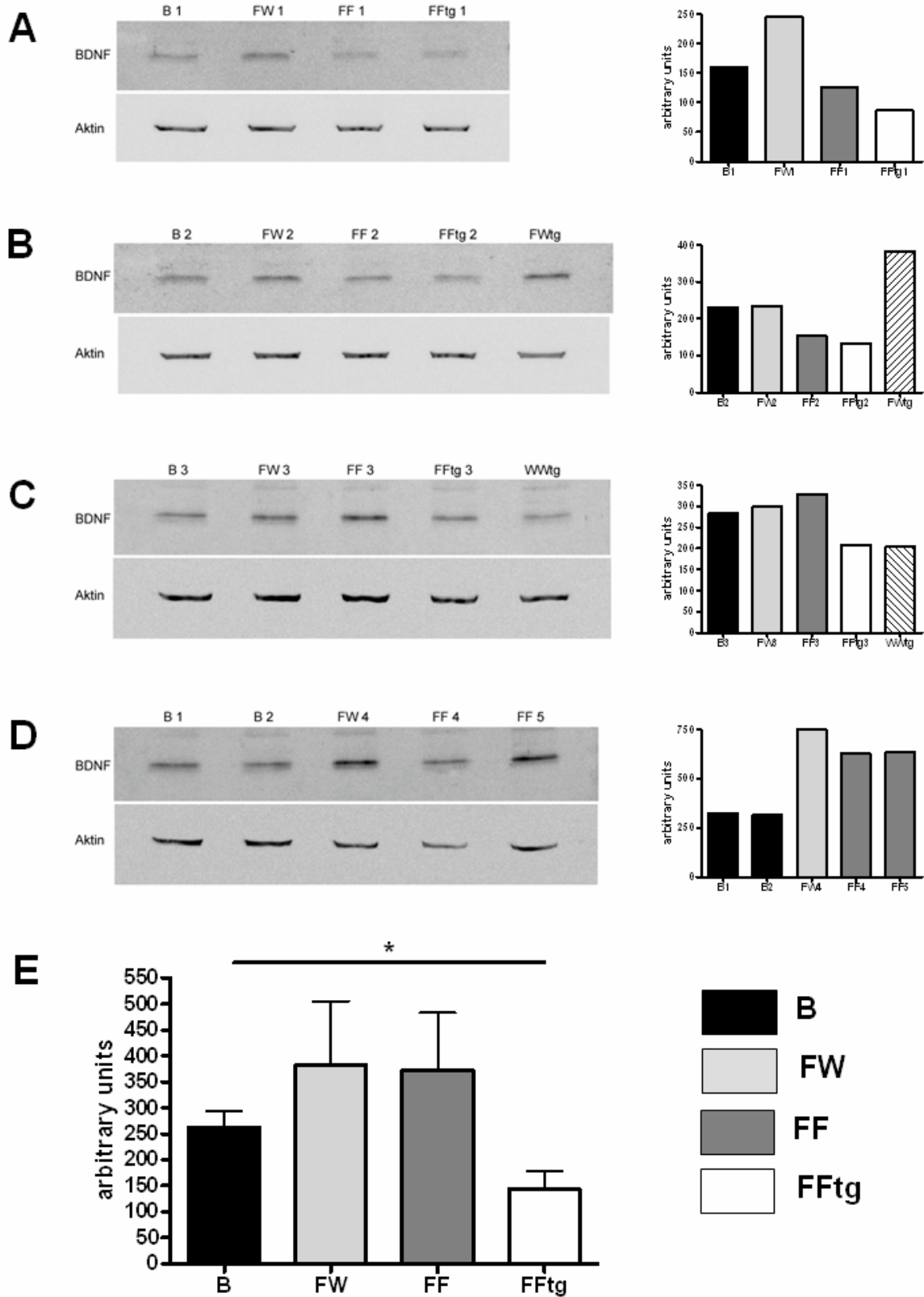


Abbildung 3-26 BDNF-Nachweis und Quantifizierung im Hippocampuslysate bei verschiedenen Genotypen mittels Western Blot (A-D). Balkendiagramm der BDNF-Intensitäten zeigt keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen C57Bl/6-Mäusen, homozygot geflochten und heterozygot geflochten BDNF-Mäusen (E). B=C57Bl/6; FF=homozygot geflocht; FW=heterozygot geflocht; FFtg=homozygot geflocht & transgen.

3.7 Untersuchungen der Proliferation von neuronalen Stammzellen und neuronalen Vorläuferzellen *in vivo*

Im zweiten Themenkomplex dieser Arbeit wurde der Einfluß neurotropher Faktoren auf Proliferation und Differenzierung von neuronalen Stammzellen in Hippocampus und Cortex untersucht.

Neurotrophe Faktoren sind nicht nur für das Überleben von Neuronen von Bedeutung, sondern spielen auch bei Proliferation und Differenzierung von Stammzellen eine Rolle und können in diesem Zusammenhang an der Entstehung des neuronalen Netzwerkes mitwirken.

Daher wurden mittels Bestimmung der BrdU-Inkorporation in 48h die Proliferationsraten in Körnerzellschicht (KZS) und Subgranulärzone (SGZ) des Gyrus dentatus verschiedener Genotypen abgeschätzt und auf das jeweilige KZS-Volumen bezogen. (Details siehe Material und Methoden S.48, 61, 64). Diese Untersuchungen wurden in Kooperation mit Angelika Schmitt (Psychobiologie, Würzburg) durchgeführt.

Es wurden 7 CNTF-defiziente, 8 CNTF-LIF-defiziente und 7 wildtypische Mäuse im Alter von 7 Monaten in Bezug auf die jeweiligen Proliferationsraten untersucht, wobei sich mit durchschnittlich rund 1100, 1700 bzw. 750 BrdU-positiven Zellen pro Kubikmillimeter Körnerzellschicht deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen ergaben.

So zeigten sowohl CNTF-LIF-defiziente als auch CNTF-defiziente Mäuse im Vergleich zu wildtypischen Tieren statistisch signifikant erhöhte Proliferationsraten in Bezug auf das Volumen der Körnerzellschicht. Zwischen CNTF-LIF-defizienten und CNTF-defizienten Tieren existierte zwar ein Trend (t-Test: $p=0,0789$), die Unterschiede ihrer Proliferationsraten waren jedoch nicht statistisch signifikant (Abbildung 3-27).

Zur Klärung des Einflusses von LIF wurden darüber hinaus 6 LIF-homozygot-defiziente, 4 LIF-heterozygot-defiziente sowie 6 wildtypische Geschwistertiere im Alter von 4 Monaten auf die jeweiligen Proliferationsraten untersucht.

Wie Abbildung 3-28 veranschaulicht, lagen die gerundeten durchschnittlichen Proliferationsraten der verschiedenen LIF-Genotypen zwischen 2000 und 2200 Zellen pro Kubikmillimeter Körnerzellschicht und wiesen somit keine statistisch signifikanten Unterschiede auf. Zudem waren diese Proliferationsraten im Vergleich zu den Proliferationsraten wildtypischer Mäuse im Alter von 7 Monaten deutlich erhöht.

Zusammenfassend ausgedrückt haben CNTF-defiziente und CNTF-LIF-defiziente Tiere erhöhte Proliferationsraten in Gyrus dentatus. LIF-Defizienz alleine hat keinen Einfluß auf die Proliferationsrate.

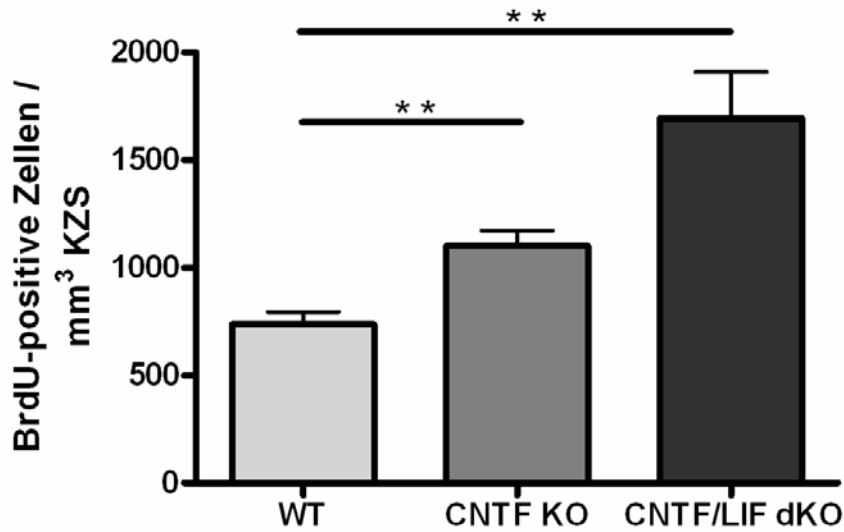


Abbildung 3-27 Proliferationsraten als BrdU-positive Zellen pro Kubikmillimeter Körnerzellschicht (KZS) von 7 Monate alten CNTF-defizienten (CNTF KO), CNTF-LIF-defizienten (CNTF/LIF dKO) und wildtypischen (WT) Mäusen. Wildtypische Mäuse unterscheiden sich statistisch signifikant von CNTF-defizienten und CNTF-LIF-defizienten Mäusen in ihrer Proliferationsrate (** $p < 0,01$). Zwischen CNTF-LIF-defizienten und CNTF-defizienten Tieren existiert lediglich ein statistischer Trend (t-Test: $p=0,0789$).

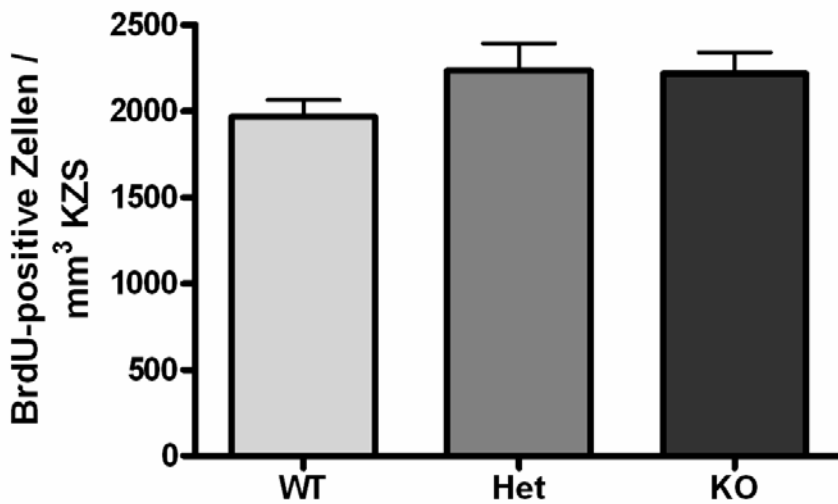


Abbildung 3-28 Proliferationsraten als BrdU-positive Zellen pro Kubikmillimeter Körnerzellschicht (KZS) von 4 Monate alten LIF-homozygot-defizienten (KO), LIF-heterozygot-defizienten (Het) und wildtypischen (WT) Mäusen. Es sind keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen nachweisbar.

3.8 Untersuchungen der Differenzierung neuraler Stammzellen von CNTF-defizienten Zellen *in vitro*

Die zweite Fragestellung des zweiten Themenkomplexes befasste sich mit dem Einfluß von CNTF auf die Differenzierung neuraler Stammzellen *in vitro*.

Dazu wurden an E13,5 neurale Stammzellen aus CNTF-defizienten Mäusen und wildtypischen Geschwistertieren gewonnen, kultiviert und in einem experimentellen Ansatz für 48h differenziert (Details siehe Material und Methoden S.50, 56f).

Neurosphären von CNTF-defizienten und wildtypischen neuralen Stammzellen wurden in insgesamt vier Gruppen für 48h differenziert, anschließend gefärbt und miteinander verglichen. Der Vergleich betraf einerseits CNTF-defiziente Neurosphären mit und ohne externe CNTF-Gabe und andererseits wildtypische Neurosphären mit und ohne CNTF-blockierenden Antikörper K10.

Dabei zeigten Neurosphären mit CNTF-Wirkung tendenziell längere und dichtere Fortsätze als Neurosphären ohne CNTF-Wirkung, was in Abbildung 3-29 exemplarisch illustriert ist. Während wildtypische Neuroshären nach 48h Differenzierung relativ lange und dichte Fortsätze aufwiesen (Abbildung 3-29, A), waren die Fortsätze bei Zugabe von CNTF-blockierendem Antikörper K10 nicht so lang und dicht (Abbildung 3-29, B). Bei CNTF-defizienten Neuroshären waren nach 48h Differenzierung wenige kurze Fortsätze zu sehen (Abbildung 3-29, C), denen relativ dichte Fortsätze bei externer Zugabe von CNTF gegenüberstanden (Abbildung 3-29, D).

Zusammenfassend ausgedrückt konnte der Einfluß von CNTF auf die Differenzierung von Neurosphären gezeigt werden.

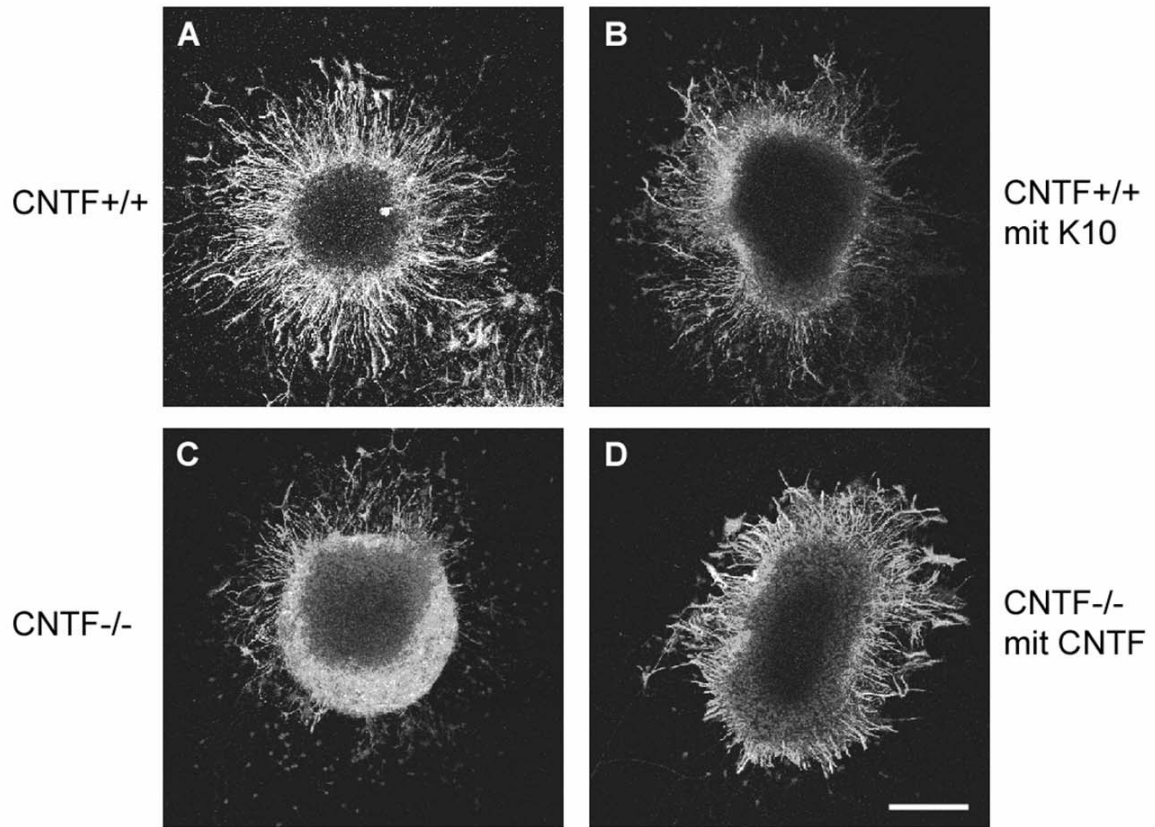


Abbildung 3-29 Neurosphären verschiedener Genotypen nach Differenzierung für 48h. Neurosphären von wildtypischen Tieren (A) mit Zugabe des CNTF-blockierenden Antikörpers K10 (B), sowie Neurosphären von CNTF-defizienten Tieren (C) mit externer Zugabe von CNTF (D). Maßstabsbalken = 150µm.

3.9 Untersuchungen der Differenzierung cortikaler Vorläuferzellen

Die dritte Fragestellung des zweiten Themenkomplexes befasste sich mit dem Einfluß von CT-1 auf die Differenzierung corticaler Vorläuferzellen und wurde in Kooperation mit Fanie Barnabé-Heider (Entwicklungsbiologie, Kanada) untersucht.

Bei der Entstehung des cerebralen Cortex läuft die Bildung der jeweiligen Zelltypen in bestimmten Entwicklungsphasen ab, wobei die Neurogenese der Gliogenese vorangestellt ist. Erstaunlicherweise lassen sich diese zeitlich genau gesteuerten Entwicklungsphasen auch *in vitro* mit isolierten embryonalen corticalen Stammzellen nachvollziehen (Qian, X. et al. 2000). Die genaue Regulation dieses Ablaufes ist jedoch bisher unbekannt.

3.9.1 Cortikale Vorläuferzell-Kulturen und ihr Zusammensetzung

Die diesen Untersuchungen zugrunde liegende Hypothese war wie folgt: Cortikale Vorläuferzellen bilden zunächst Neurone, die in der Folge einen Botenstoff sezernieren, der die corticalen Vorläuferzellen zur Bildung von Astrozyten veranlasst.

Um diese Hypothese zu prüfen, wurden Cortices präpariert, cortikale Vorläuferzellen kultiviert und differenziert (Details siehe Material und Methoden S.50, 58).

Wildtypische cortikale Vorläuferzellen zeigten in Kultur nach 6-Tagen beginnende Astrozytogenese, erkennbar an der aufgetretenen GFAP-Färbung (Abbildung 3-30, obere Reihe). Bei separater Zugabe der Cytokine CNTF, LIF und CT-1 waren zu den jeweiligen Zeitpunkten mehr GFAP-positive Zellen vorhanden (Abbildung 3-30, mittlere Reihe), was für eine frühere Induktion der Astrozytogenese durch die Cytokine sprach. Ein ähnliches Bild konnte auch durch Zugabe von Zellkulturüberstand von 4-Tage alten Wildtypkulturen ohne Faktoren erreicht werden (Abbildung 3-30, untere Reihe).

In verwandten Untersuchungen wurde gezeigt, dass das Auftreten von GFAP in den Kulturen, auch von CD44 und S100 β begleitet war, die als Marker für gliale Vorläuferzellen bzw. frühe Astrozyten das Auftreten von Astrozyten untermauern (Barnabe-Heider, F. et al. 2005).

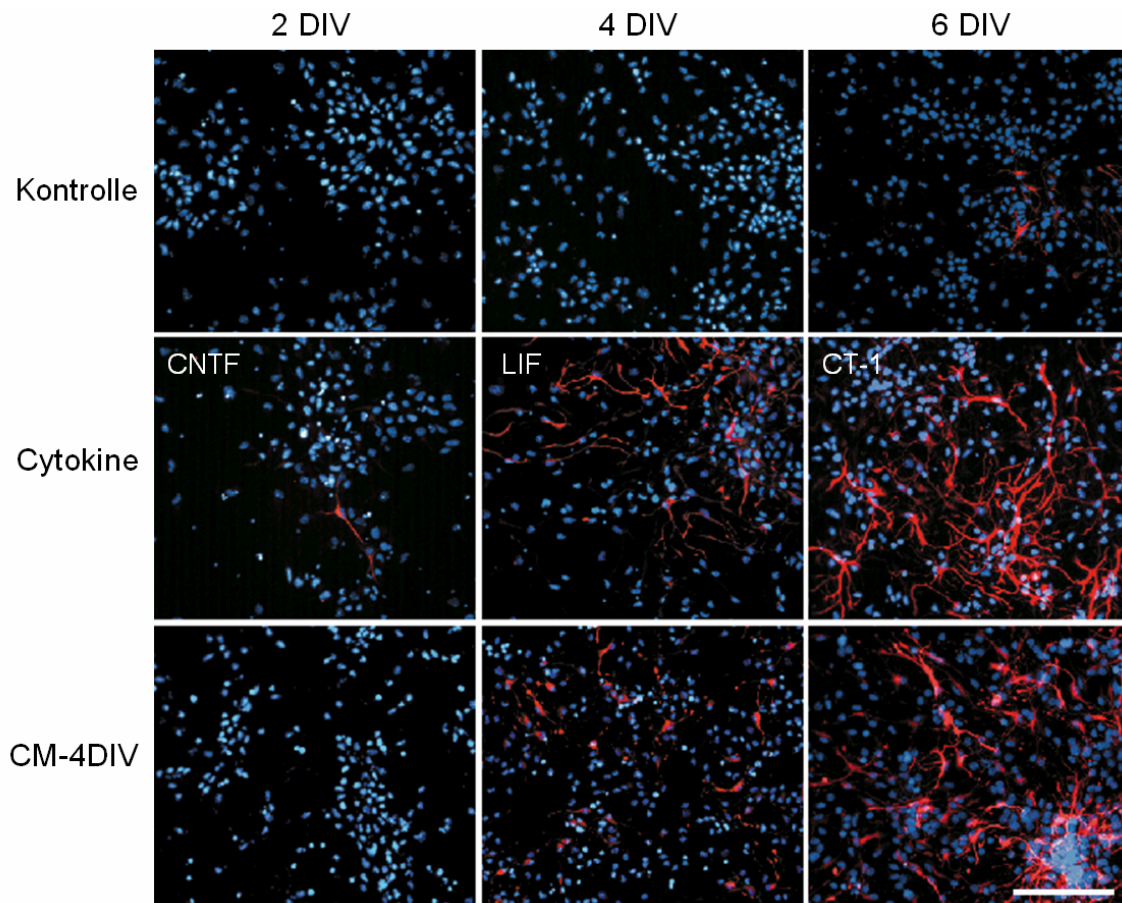


Abbildung 3-30 Kulturen cortikaler Vorläuferzellen 2, 4 bzw. 6 Tage in Kultur (DIV=days in vitro) ohne Faktoren (obere Reihe), mit Zugabe verschiedener Cytokine (mittlere Reihe) sowie mit Zugabe von Medium aus 4-Tage alten Kulturen (untere Reihe). Während erste Zeichen von Astrozytogenese bei wildtypischen cortikalen Vorläuferzell-Kulturen erst nach 6 Tagen zu sehen sind, ist dies bei Zugabe von Cytokinen bzw. CM-4DIV schon nach 2 bzw. 4 Tagen der Fall. Blaue Färbung=Hoechst; rote Färbung=GFAP; CM=Conditioned Medium; Maßstabsbalken = 100µm.

Um die Zusammensetzung der verschiedenen Vorläuferzell-Kulturen und etwaige Unterschiede aufzuklären, wurden Western Blot-Untersuchungen durchgeführt.

Zellextrakte von 6-Tage alten cortikalen Vorläuferzell-Kulturen zeigten nach Behandlung mit CNTF eine deutlich stärkere GFAP-Bande. Zugabe von konditioniertem Medium (CM), Medium aus 4-Tage alten Wildtypkulturen, führte im Vergleich zu wildtypischen Kontrollkulturen ohne Zusätze ebenfalls zu einer stärkeren GFAP-Bande. Die Bandenintensität von NFM (Neurofilament M) war dabei in allen Fällen gleich; ERKs (extracellular signal-related kinase) wurde als Beladungskontrolle verwendet (Abbildung 3-31 links).

Zur weiteren Eingrenzung des in konditioniertem Medium befindlichen induktiv wirksamen Agens wurde ein Teil der Medien erhitzt, was zur Denaturierung darin enthaltener Proteine

führte. Bei erhitzten Medien war die Steigerung der GFAP-Intensität gegenüber der wild-typischen Kontrollkultur ohne Zusatz von konditioniertem Medium nicht mehr gegeben: So zeigten Kulturen mit Zusatz von erhitztem CNTF und mit Zusatz von erhitztem konditioniertem Medium eine ähnliche GFAP-Intensität wie die Kontrollkultur. Die Kulturen mit Zugabe von CNTF bzw. konditioniertem Medium, die beide nicht erhitzt wurden, wiesen jedoch stärkere GFAP-Banden auf. Die Bandenintensität von β -III-Tubulin war in allen Fällen gleich (Abbildung 3-31 rechts).

Während die Bestimmung der ERKs-Intensität als Beladungskontrolle diente, war die Bestimmung von NFM bzw. β -III-Tubulin wichtig, um zu zeigen, dass sich die zugegebenen Zusätze zwar auf die Intensität astrozytärer Marker (GFAP) auswirkten, die Intensitäten neuronaler Marker (NFM, β -III-Tubulin) dabei jedoch unverändert blieben.

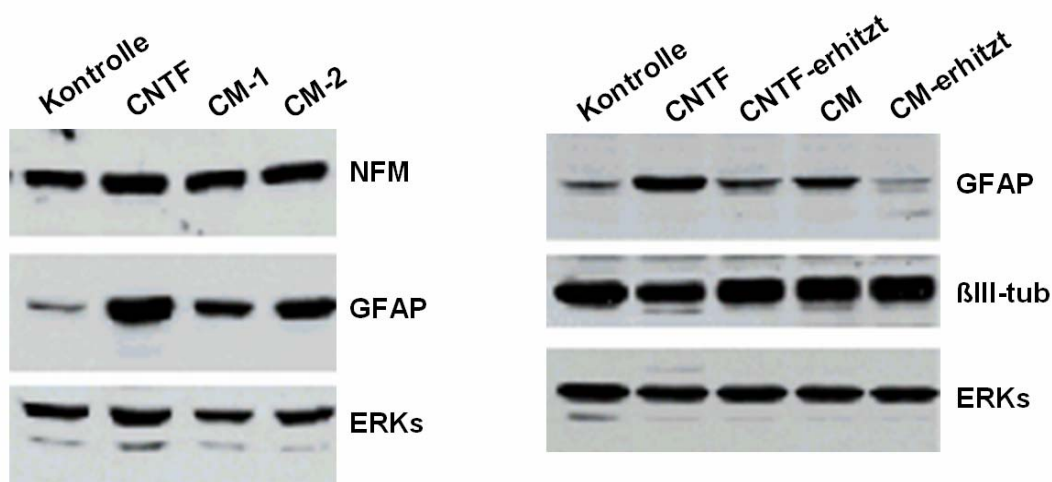


Abbildung 3-31 Western Blots von cortikalen Vorläuferzellkulturen. 6-Tages-Kulturen mit Zugabe von CNTF und konditioniertem Medium (CM) wiesen intensivere GFAP-Banden auf als Kulturen ohne Zusätze (links). Dieser Effekt war bei Zugabe von erhitztem CNTF oder erhitztem CM nicht mehr gegeben (rechts).

3.9.2 Expression der Cytokine CNTF, LIF und CT-1 *in vitro* und *in vivo*

Nachdem durch Zugabe der Cytokine CNTF, LIF und CT-1 deren Einfluß auf die Differenzierung der Vorläuferzell-Kulturen nachgewiesen werden konnte, wurde das Ausmaß der Transkription dieser Cytokine *in vitro* und *in vivo* kontrolliert.

Dazu wurde RNA aus den Kulturen bzw. aus reifen cortikalen Neuronen isoliert und RT-PCRs zur Quantifizierung der mRNAs für CNTF, LIF und CT-1 durchgeführt. Diese Untersuchungen belegten die Expression von mRNA aller drei Cytokine und zeigten eine besonders ausgeprägte Bandenintensität für CT-1 (Abbildung 3-32). GAPDH wurde als Ladungskontrolle und als DNA-Kontaminationskontrolle verwendet.

RT-PCRs wurden ebenfalls an mRNAs, die aus Cortices verschiedener Altersklassen (E12, E13 und E17,5) isoliert worden waren, durchgeführt. Dabei war im Alter von E17,5 eine deutliche CT-1 Bande nachweisbar (Abbildung 3-33). GAPDH diente auch hier als Kontrolle.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Expression der drei Cytokine CNTF, LIF und CT-1 in cortikalen Neuronen nachgewiesen werden konnte, wobei die Expression von CT-1 in diesem Entwicklungsstadium am ausgeprägtesten war. Daher wurde in der Folge der Einfluß von CT-1 auf die Differenzierung cortikaler Vorläuferzell-Kulturen untersucht.

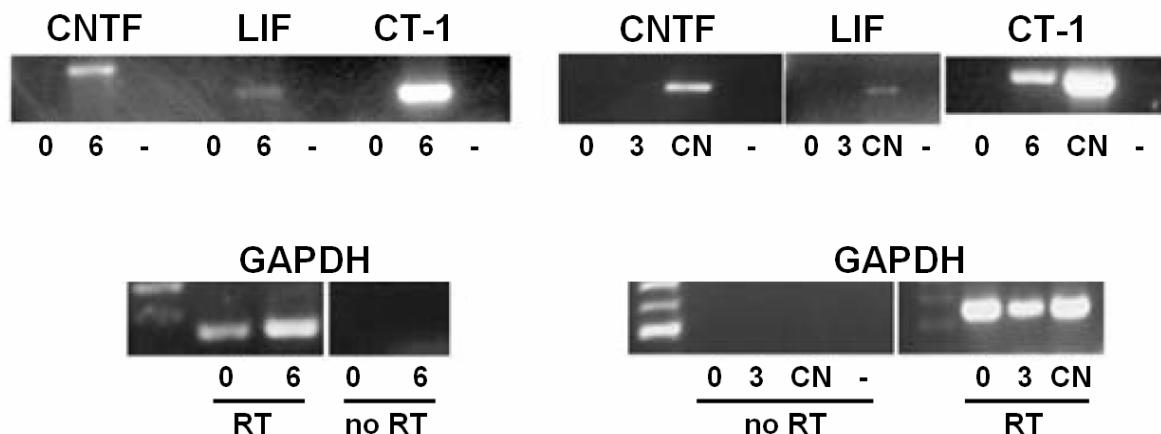


Abbildung 3-32 RT-PCRs für CNTF, LIF und CT-1 mRNAs isoliert aus frisch dissoziierten cortikalen Vorläuferzell-Kulturen (0), nach Kultivierung für 3 (3) bzw. 6 Tage (6) und aus entwickelten cortikalen Neuronen (CN). GAPDH wurde als Ladungskontrolle und DNA-Kontaminationskontrolle verwendet.

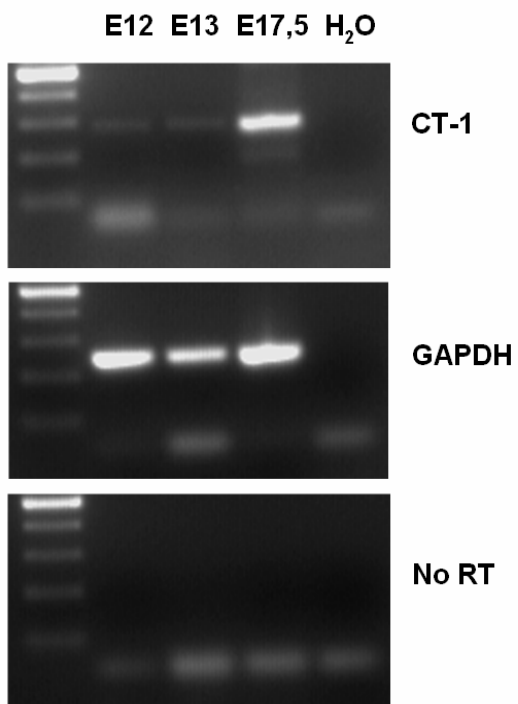


Abbildung 3-33 RT-PCR von aus Cortices isolierter RNA zeigte deutliche Cardiotrophin-1 (CT-1) Bande im Alter von E17,5. GAPDH wurde als Ladungskontrolle und DNA-Kontaminationskontrolle verwendet.

3.9.3 Einfluß von CT-1 auf die Differenzierung cortikaler Vorläuferzell-Kulturen

Um den Einfluß von CT-1 auf die Differenzierung näher zu untersuchen, wurden cortikale Vorläuferzell-Kulturen von CT-1 defizienten Mäusen erstellt und analysiert (Abbildung 3-34 und Abbildung 3-35).

In Western Blot-Untersuchungen konnte eine verminderte GFAP-Bandenintensität bei CT-1 defizienten Kulturen gegenüber wildtypischen Kulturen von Geschwistertieren gezeigt werden (Abbildung 3-34, A; Abbildung 3-35, A). Die GFAP-Bandenintensität von CT-1 heterozygoten Kulturen wies dabei starke Schwankungen auf, lag aber über der von CT-1 defizienten Kulturen (Abbildung 3-35, A – Hets 1-6). Die Intensität von NFM war für die verschiedenen Genotypen gleich; ERKs diente als Beladungskontrolle.

Die Differenzierung der verschiedenen Kulturen wurde auch mittels Immuncytochemie auf Unterschiede untersucht.

Dabei konnte gezeigt werden, dass in CT-1 defizienten Kulturen prozentual deutlich weniger GFAP-positive Zellen zu finden waren als in CT-1 heterozygoten oder wildtypischen Kulturen desselben Wurfes (Abbildung 3-34, B; Abbildung 3-35, B); dieser Unterschied war statistisch hochsignifikant ($p < 0,001$).

Demgegenüber waren in CT-1 defizienten Kulturen prozentual ähnlich viele Zellen HuD-positiv bzw. MAP2-positiv verglichen mit CT-1 heterozygoten oder wildtypischen Kulturen desselben Wurfes (Abbildung 3-34, C; Abbildung 3-35, B), so dass die Neuronenzahlen keine Unterschiede aufwiesen.

Zusammenfassend ausgedrückt konnten in CT-1 defizienten Kulturen deutlich weniger GFAP-positive Zellen nachgewiesen werden, was statistisch hochsignifikant war. Es konnte damit bestätigt werden, dass CT-1 bei der Induktion der Astrozytogenese *in vitro* eine wichtige Rolle spielt.

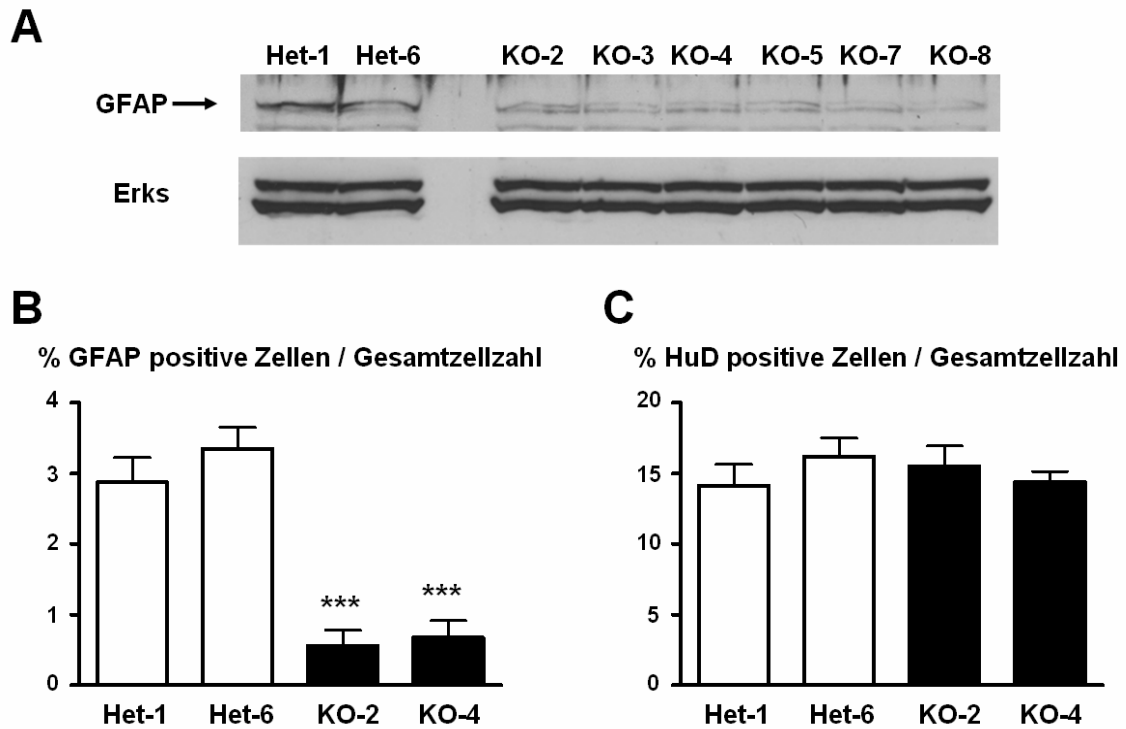


Abbildung 3-34 Cortikale Vorläuferzellkulturen von CT-1 defizienten Mäusen (1. Experiment). Western Blot zeigte deutlich reduzierte GFAP-Bande der CT-1 $-/-$ Tiere (KO) im Vergleich zu CT-1 $+/-$ Tiere (Het) (A). Quantifizierung der Zellen ergab eine statistisch signifikante Reduktion der GFAP-positiven Zellen in der KO-Gruppe (B) und keine Unterschiede im Bezug auf die HuD-positiven Zellen (C). *** $p < 0,001$

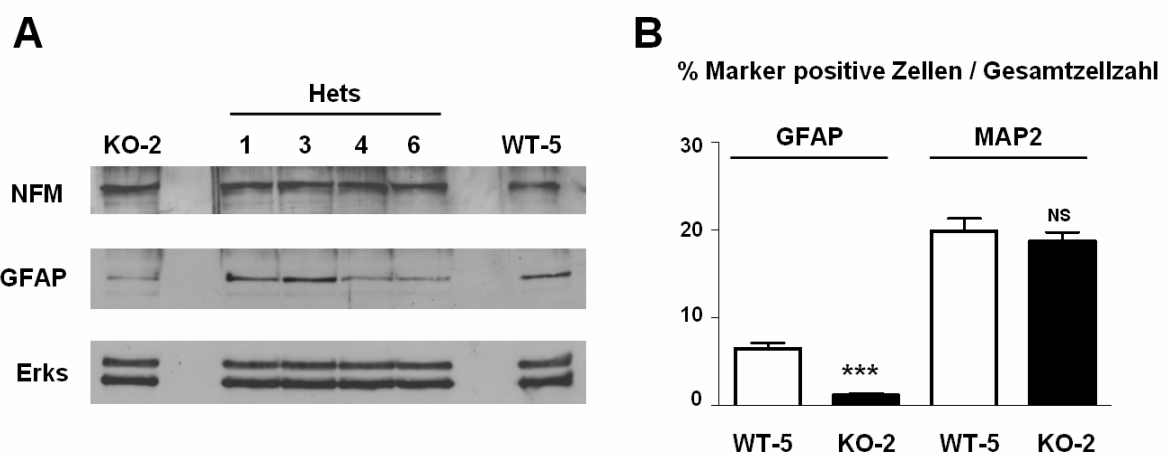


Abbildung 3-35 Cortikale Vorläuferzellkulturen von CT-1 defizienten Mäusen (2. Experiment). Western Blot zeigte deutlich reduzierte GFAP-Bande der CT-1 $-/-$ Tiere (KO) im Vergleich zu CT-1 $+/+$ Tiere (WT); die GFAP-Banden der CT-1 $+/-$ Tiere (Het) lagen dazwischen (A). Quantifizierung der Zahl immunreaktiver Zellen ergab eine statistisch signifikante Reduktion der GFAP-positiven Zellen der KOs und keine Unterschiede bei den MAP2-positiven Zellen (B). *** $p < 0,001$; NS=nicht signifikant.

Um zu testen, inwiefern das gliogene Potential allein CT-1 zuzuschreiben ist, wurde konditioniertes Medium von CT-1 defizienten, CT-1 heterozygoten und wildtypischen Kulturen isoliert und zu wildtypischen cortikalen Vorläuferzell-Kulturen zugegeben (Abbildung 3-36).

Es zeigte sich eine deutliche Steigerung der GFAP-Bandenintensität bei Kulturen mit Zugabe von konditioniertem Medium im Vergleich zu Kulturen ohne Zusätze. Jedoch wurden beim Vergleich zwischen Kulturen mit konditioniertem Medium unterschiedlicher CT-1 Genotypen keine Unterschiede in der GFAP-Intensität deutlich.

Die Zugabe von CT-1 führte zu einer deutlichen Steigerung der GFAP-Bandenintensität gegenüber der Situation ohne Zusätze. Die Bandenintensitäten für NFM waren nicht unterschiedlich; ERKs diente als Beladungskontrolle.

Zusammenfassend ausgedrückt konnte beim Vergleich zwischen Kulturen, denen konditioniertes Medium von unterschiedlichen CT-1 Genotypen zugeführt worden war, keine Unterschiede in der GFAP-Intensität nachgewiesen werden. Andere Cytokine, wie CNTF und LIF, die in konditioniertem Medium CT-1 defizienter Kulturen vorhanden waren, könnten zur Kompensation der mangelnden CT-1 Wirkung beigetragen haben.

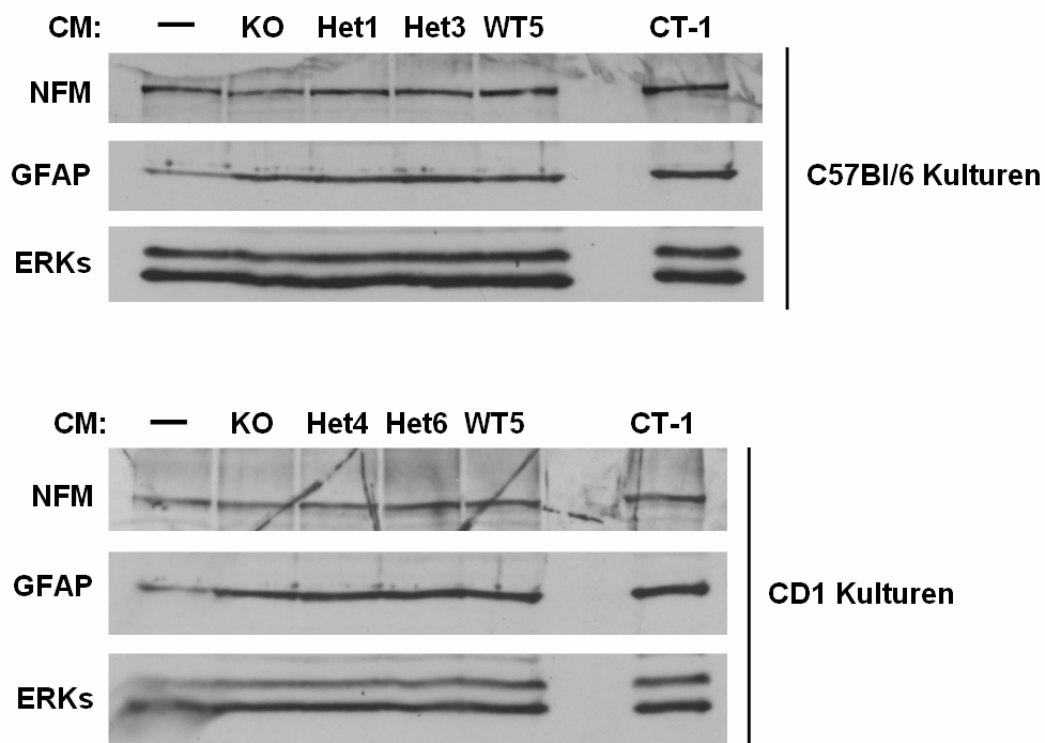


Abbildung 3-36 Western Blots von wildtypischen cortikalen Vorläuferzellkulturen mit konditioniertem Medium (CM) von CT-1 $-/-$ (KO), CT-1 $+/-$ (Het) und CT-1 $+/+$ (WT) Kulturen. Als Kontrollen Kulturen ohne Zusatz und mit CT-1. C57Bl/6 Kulturen (oben), CD1 Kulturen (unten). ERKs als Beladungskontrolle.

3.9.4 Einfluß von CT-1 auf die cortikale Entwicklung *in vivo*

Nachdem die wichtige Rolle von CT-1 bei der Differenzierung cortikaler Vorläuferzell-Kulturen nachgewiesen werden konnte, wurde der Einfluß von CT-1 auf die cortikale Entwicklung *in vivo* näher untersucht.

Dazu wurde CT-1 mittels Immunhistochemie in cortikalen Neuronen von E18 Gehirnen nachgewiesen. Die Spezifität der CT-1 Färbung konnte durch Einsatz einer Präadsorptionskontrolle bestätigt werden (Abbildung 3-37).

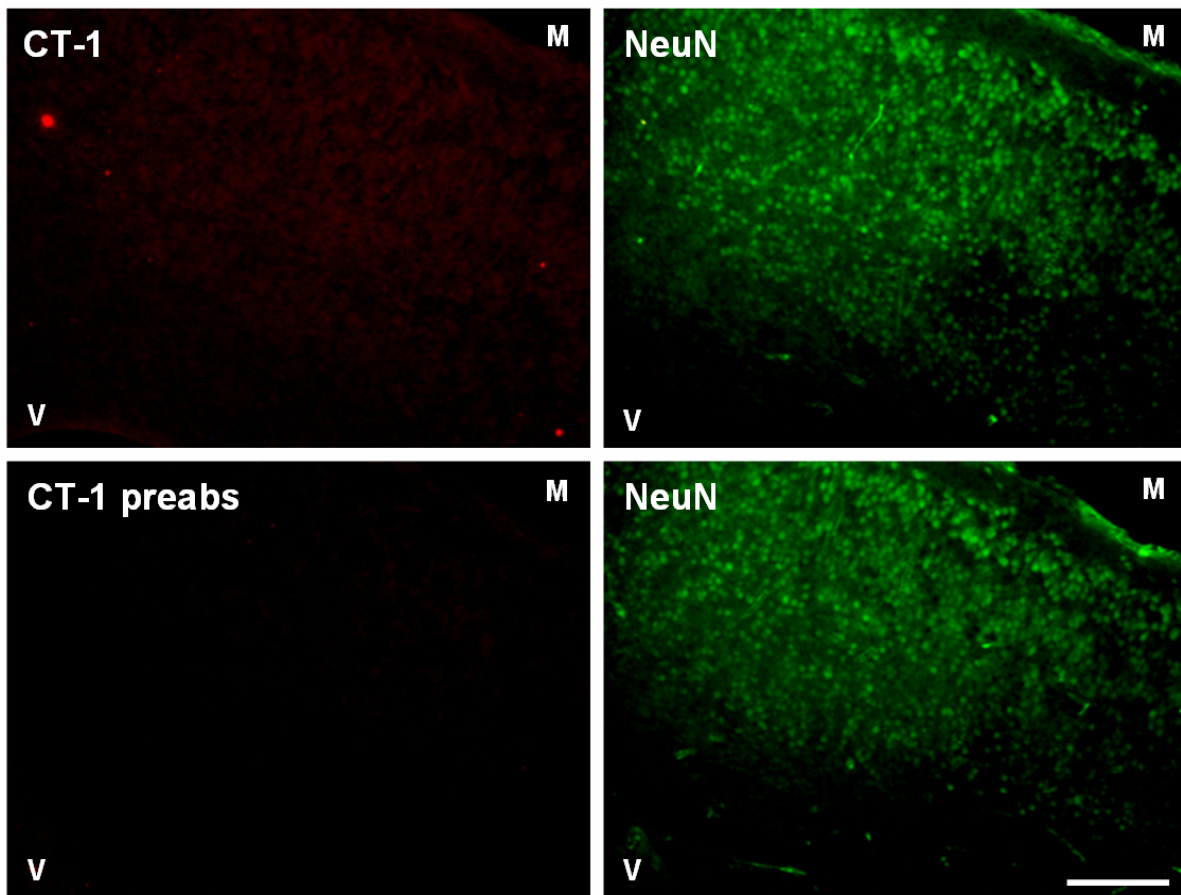


Abbildung 3-37 Immunhistochemie an E18-Gehirn. CT-1 konnte in cortikalen Neuronen nachgewiesen werden. CT-1 Präadsorptionskontrolle bestätigte die Spezifität des CT-1-Signals. M=Meningen, V=Ventrikel; Maßstabsbalken = 100µm.

Via Western Blot-Analyse wurden anschließend Cortices von CT-1 defizienten und wildtypischen Geschwistertieren im Alter von P0 bzw. P1 untersucht.

Dabei konnten verminderte Intensitäten für CD44 – ein Marker der bei astrozytärer Entwicklung dem Auftreten von GFAP vorangeht – und GFAP in CT-1 defizienten Cortices nachgewiesen werden (Abbildung 3-38). Die Intensitäten von NFM und ERKs waren alle gleich.

Die Immunhistochemie an CT-1 defizienten Mäusen im Alter von P3 zeigte ein deutlich geringeres Ausmaß cortikaler GFAP-Färbung als es bei wildtypischen Geschwistertieren der Fall war (Abbildung 3-39).

Somit konnte gezeigt werden, dass CT-1 bei der cortikalen Entwicklung *in vitro* und *in vivo* eine wichtige Rolle spielt. CT-1 wird dabei von Neuronen sezerniert und veranlasst cortikale Vorläuferzellen mit der Bildung von Astrozyten zu beginnen.

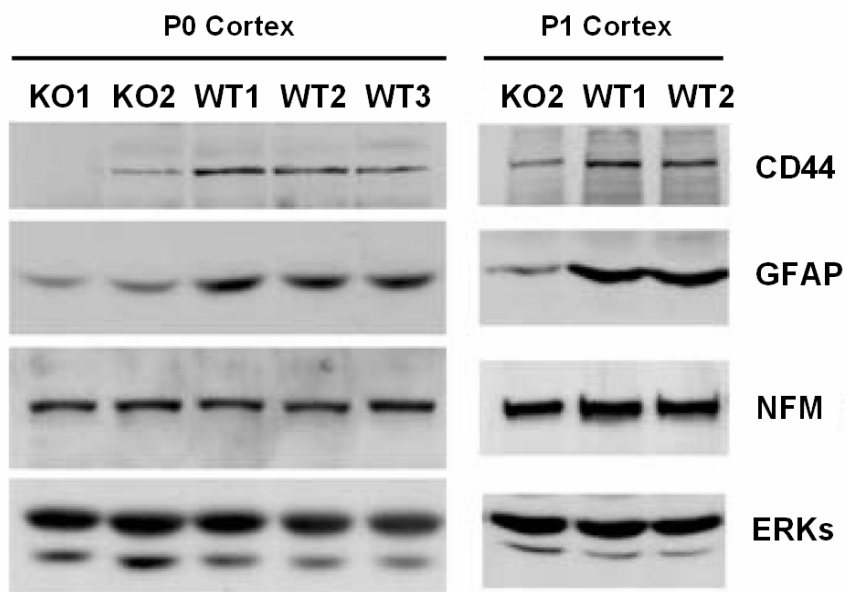


Abbildung 3-38 Western Blots von Cortices CT-1 defizienter Mäuse (KO) zeigten verminderte Bandenintensitäten für CD44 und GFAP im Vergleich zu Cortices wildtypischer Geschwistertiere.

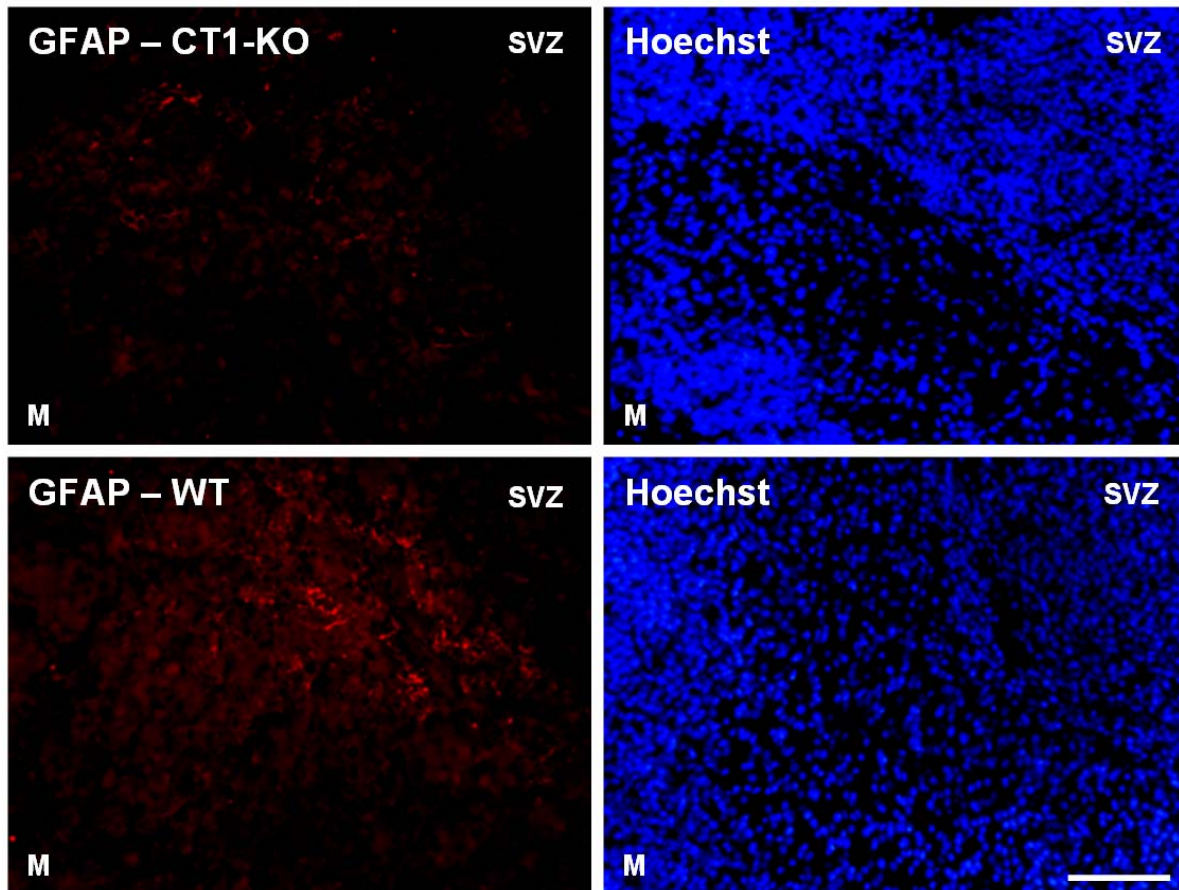


Abbildung 3-39 Immunhistochemie an P3-Gehirn zeigte reduzierte GFAP-Färbung im Cortex CT-1 defizienter Maus im Vergleich zu wildtypischem Geschwistertier. M=Meningen; SVZ=Subventrikuläre Zone; Maßstabsbalken = 100µm.

4 DISKUSSION

Neurotrophe Faktoren haben ein breites Aufgabenfeld. Seit längerem ist bekannt, dass besonders BDNF als Modulator der synaptischen Plastizität im Hippocampus eine zentrale Rolle spielt (Korte, M. et al. 1995; Korte, M. et al. 1996; Patterson, S.L. et al. 1996). Im ersten Themenkomplex der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwiefern andere neurotrophe Faktoren wie CNTF und IGF in diesem Zusammenhang relevant sind und direkt oder über die Regulation von BDNF auf die synaptische Plastizität Einfluß nehmen können.

4.1 Qualität des BDNF-Immunsersums

In Western Blot-Untersuchungen konnte das BDNF-Immunsorum BDNF sowohl als 0,5ng reines rekombinantes Protein als auch in wildtypischem Hippocampuslysate nachweisen. In wildtypischen Hippocampuslysaten traten dabei einige zusätzliche Banden auf, die mit dem Molekulargewicht von BDNF nicht im Einklang standen. Spezifitätskontrollen zeigten, dass diese zusätzlichen Banden in Hippocampuslysaten BDNF-defizienter Tiere ebenfalls vorhanden waren und somit als unspezifisch gewertet werden müssen.

In der Immunhistochemie ergab das BDNF-Immunsorum eine deutliche Färbung im Bereich der Pyramidenzellen der Regionen CA4 und CA3, sowie im Bereich der Moosfasern; die Körnerzellen des Gyrus dentatus waren von der Färbung nicht besonders betroffen. Diese Ergebnisse sind in guter Übereinstimmung mit Immunhistochemie-Resultaten anderer Gruppen, deren Färbung an Ratten eine ähnliche Region ergab, auch wenn dort die Körnerzellen stärker gefärbt waren als in unseren Arbeiten (Conner, J.M. et al. 1997).

Die Erfahrungen mit dem BDNF-Immunsorum in der Immunhistochemie zeigen die besondere Wichtigkeit einer relativ kurzen Nachfixierung (unter 2h), um gute, reproduzierbare Färbungen zu erzielen.

4.2 Keine Veränderungen hippocampalen BDNFs in CNTF-defizienten Mäusen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden CNTF-defiziente Mäuse und wildtypische Geschwistertiere bezüglich BDNF-Gehalt und Verteilung im Hippocampus untersucht, doch es konnten keinerlei statistisch signifikanten Unterschiede gefunden werden.

In der Immunhistochemie mit dem BDNF-Immunsereum zeigten Hippocampuspräparate der beiden Gruppen ein ähnliches Bild und es waren keine signifikanten Unterschiede bezüglich Intensität bzw. Verteilung von BDNF ersichtlich.

Western Blot-Untersuchungen mit dem BDNF-Immunsereum ergaben ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. Zwar traten im Verlauf der Arbeit mitunter auch Unterschiede der BDNF-Intensitäten zwischen Hippocampuslysaten der beiden Gruppen auf, doch waren diese Unterschiede einerseits relativ gering und andererseits selten.

Durch Untersuchungen mit dem BDNF-ELISA konnten an verschiedenen Gewebelysaten ebenfalls keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden. Dabei orientierte sich die Herstellung der Gewebelysate am veröffentlichten Protokoll von Kolbeck et al. (Kolbeck, R. et al. 1999), wobei wir zur Bestimmung des BDNF-Gehaltes einen kommerziellen ELISA verwendeten. Unsere Werte von 20-25ng BDNF/g Nassgewicht lagen deutlich unter den Werten in der Literatur, die im Hippocampus von drei Wochen alten Tieren ca. 300ng BDNF/g Nassgewicht bestimmt hatten (Kolbeck, R. et al. 1999). Zudem zeigten unsere Messungen an verschiedenen Geweben nur geringe Unterschiede, was von Ergebnissen der Literatur abwich (Kolbeck, R. et al. 1999). Ein Vergleich mit den Vorergebnissen aus der eigenen Arbeitsgruppe, die ebenfalls unter Verwendung des ELISAs entstanden und im wildtypischen Hippocampuslysate ca. 180pg BDNF/ μ g Protein fanden, kann aufgrund der verschiedenen Protokolle und Einheiten nicht erfolgen.

Die Ergebnisse deuten daraufhin, dass CNTF auf globale Regulationsvorgänge der BDNF-Produktion im Hippocampus keinen Einfluß hat. Lokale, auf bestimmte Regionen beschränkte Wirkungen, können aber nicht ausgeschlossen werden.

4.3 Einschränkung von LTP und LTD an CNTF-defizienten Mäusen

Die Bestimmung von LTP und LTD ermöglicht, an einer ausgewählten Nervenkontaktstelle Einblick in die synaptische Plastizität zu erhalten, die für Lernen und Gedächtnis sowie das daraus resultierende Verhalten von grundlegender Wichtigkeit ist.

Mit beiden in der vorliegenden Arbeit verwendeten Stimulationsprotokollen zur Untersuchung der LTP, Tetanus-Stimulation und TBS, zeigte sich die LTP-Amplitude bei CNTF-defizienten Mäusen im Alter von 3 Monaten im Vergleich zu wildtypischen Geschwistertieren stark eingeschränkt, war aber nicht komplett aufgehoben. Eine ähnliche Einschränkung der LTP wurde schon an BDNF-defizienten Mäusen festgestellt (Korte, M. et al. 1995), bei denen

ebenfalls eine geringe „Rest“-LTP-Amplitude insitierte. Zudem zeigten heterozygot BDNF-defiziente Tiere ein vergleichbares Ausmaß der LTP-Einschränkung wie ihre homozygot-defizienten Geschwistertiere, was unterstreicht, dass sich ein reduzierter hippocampaler BDNF-Gehalt auf ähnliche Weise auswirkt. Durch BDNF-Ersatz in der CA1-Region konnte die LTP-Einschränkung aufgehoben und somit die Ursache eindeutig dem Fehlen von BDNF zugeschrieben werden (Korte, M. et al. 1996; Patterson, S.L. et al. 1996).

Zudem ist zu beachten, dass die Bestimmung der LTP ein Testparadigma und somit auch vom jeweiligen Stimulationsprotokoll abhängig ist. Unter Verwendung verschiedener Stimulationsprotokolle konnten an der CA1-Synapse von konditional BDNF-defizienten Mäusen unterschiedliche Formen der LTP dargelegt werden (Zakharenko, S.S. et al. 2003), wobei eine präsynaptische BDNF-abhängige und eine postsynaptische BDNF-unabhängige Komponente unterschieden werden konnten. Zudem wäre eine extra- oder perisynaptische Komponente denkbar, die von außen den neuronalen Kontakt stabilisieren und beeinflussen könnte.

Die LTD wurde mittels LFS provoziert und im Alter von 3 Wochen untersucht. Dabei ergab sich bei Wildtyp-Tieren eine Amplitude von 85%, während ihre CNTF-defizienten Geschwistertiere eine Amplitude von 105% aufwiesen. Ein Vergleich mit Resultaten an BDNF-defizienten Mäusen ist nicht möglich, da derartige Untersuchungen noch ausstehen.

Aufgrund der elektrophysiologischen Ergebnisse im Hippocampus CNTF-defizienter Mäuse lag es nahe das Verhalten dieser Tiere genauer zu untersuchen. Daher wurde noch während der Durchführung der vorliegenden Arbeit von Hans-Peter Lipp (Zürich) damit begonnen, das Verhalten unserer CNTF-defizienten Mäuse systematisch zu untersuchen.

Dabei wurden 10 CNTF-defiziente Mäuse und 17 wildtypische Geschwistertiere in verschiedenen Testansätzen, die das open field-Experiment, den water-maze place navigation-Test, den emergence-Test, den novel object-Test, den O-maze-Test und den 8-arm radial maze-Test umfassten, auf Unterschiede bezüglich ihres Lernverhaltens untersucht. Die Tests wurden von den Mäusen nacheinander in der Altersspanne von 8 bis 11 Monaten durchlaufen wurden.

Interessanterweise konnten dabei keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen ermittelt werden, wobei die Anzahl der untersuchten Tiere mit insgesamt 27 Mäusen bisher noch relativ gering war.

Diese Ergebnisse unterscheiden sich deutlich von Verhaltensuntersuchungen an BDNF-defizienten Mäusen, die ein eingeschränktes Lernverhalten dieser Tieren ergaben (Linnarsson,

S. et al. 1997; Alonso, M. et al. 2002). Allerdings sind die Deletionen der beiden Gene mit stark unterschiedlichen phänotypischen Ausprägungen verbunden: Während BDNF-defiziente Mäuse etwa 3 Wochen nach der Geburt sterben (Korte, M. et al. 1995), entwickeln CNTF-defiziente Mäuse erst vier Wochen nach der Geburt einen geringgradigen Motoneuronenverlust sind aber in Größe und Lebenserwartung mit ihren wildtypischen Geschwistern vergleichbar (Masu, Y. et al. 1993).

Dennoch ist erstaunlich, dass die gefundene LTP-Einschränkung bei CNTF-defizienten Mäusen sich in den durchgeführten Verhaltensuntersuchungen nicht als nachweisbares Korrelat niederschlägt.

4.4 Morphologische Untersuchungen am Hippocampus CNTF-defizienter Mäuse

Aufgrund der elektrophysiologischen Untersuchungen einerseits, die eine eingeschränkte LTP und LTD bei CNTF-defizienten Mäusen festgestellt hatten, und der BDNF-Untersuchungen andererseits, die in der vorliegenden Arbeit keine Unterschiede bezüglich hippocampalem BDNF bei CNTF-defizienten Mäusen nachweisen konnten, interessierten wir uns zusätzlich für mögliche Strukturveränderungen, die Unterschiede in der synaptischen Plastizität bei diesen Mäusen erklären könnten.

Zum einen wurden in der vorliegenden Arbeit zwei verschiedene Verfahren der Schnittpräparation für die Elektronenmikroskopie miteinander verglichen. Bei Verwendung des alternative Verfahrens nach einem Protokoll von Chan-Palay konnte dabei eine sehr gute Darstellung der Astrozyten erreicht werden (Chan-Palay, V. and Palay, S.L. 1974). Zudem konnten damit keine augenscheinlichen Veränderungen der CA1-Region CNTF-defizienter Mäuse ausgemacht werden. Aufbauend auf diese grundlegenden Erkenntnisse können in der Zukunft elektronenmikroskopische Bilder der hippocampalen Synapsen zwischen Schaffer Kollateralen und CA1-Pyramidenzellen mit speziellem Focus auf Zahl und Fläche der Synapsen einerseits und Lokalisation der Astrozyten andererseits ausgewertet werden.

Zum anderen wurde die Lokalisation von CNTF im Hippocampus untersucht, mit dem Hintergrund, dass CNTF beispielsweise in Astrozyten lokalisiert und so als extra- oder perisynaptische Komponente an der BDNF-unabhängigen Modulation der synaptischen Plastizität beteiligt sein könnte. Eine spezifische CNTF-Färbung war im Stratum radiatum des Hippocampus jedoch nicht nachweisbar, was in guter Übereinstimmung mit der Literatur ist (Dallner, C. et al. 2002), wo CNTF-Reaktivität in Astrozyten innerhalb des Hippocampus

zwar im Stratum lacunosum-moleculare, nicht jedoch im Stratum radiatum identifiziert werden konnten.

4.5 Rolle der IGFs bei der hippocampalen BDNF-Hochregulation durch Training

In der vorliegenden Arbeit wurden Hippocampuslysate von selektiv unter NFL-Promotor IGF1-Rezeptor defizienten Mäusen und wildtypischen Geschwistertieren jeweils mit und ohne einwöchiges Laufradtraining im Alter von 4 bis 6 Monaten verwendet und die vier Gruppen im Western Blot auf ihren jeweiligen hippocampalen BDNF-Gehalt untersucht.

Einwöchiges Laufradtraining führte bei wildtypischen Mäusen zu hippocampaler BDNF-Hochregulation, die statistisch signifikant und in guter Übereinstimmung mit der Literatur war (Neeper, S.A. et al. 1995; Johnson, R.A. et al. 2003; Griesbach, G.S. et al. 2004).

Allerdings kam es auch bei unter NFL-Promotor IGF1-Rezeptor defizienten Mäusen in der Gruppe mit einwöchigem Laufradtraining zur BDNF-Hochregulation. Das Ausmaß der BDNF-Hochregulation in dieser Gruppe war dabei dem Ausmaß bei wildtypischen Mäusen vergleichbar, so dass der IGF1-Rezeptor in Pyramidenzellen des Hippocampus nicht als ursächlich für die BDNF-Hochregulation angesehen werden kann. Bei der Bewertung dieses Experimentes ist jedoch zu bedenken, dass der IGF1-Rezeptor nicht im gesamten Hippocampus fehlte und somit der Einfluß von IGF auf die Körnerzellen des Gyrus dentatus nicht ausgeschlossen werden kann.

Untersuchungen zur möglichen Seitendifferenz des hippocampalen BDNF-Gehaltes konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede aufdecken.

4.6 Floxed BDNF-Maus mit vergleichbarem hippocampalen BDNF-Gehalt

Aufgrund persönlicher Mitteilung der Arbeitsgruppe Yves-Alain Barde, die auf einen verminderten hippocampalen BDNF-Gehalt bei geflochten BDNF-Mäusen hingewiesen hatten, wurden mögliche fehlerhafte Positionen der loxP-Sites theoretisch und praktisch kontrolliert.

Dabei zeigte die Kontrolle des Gen-Konstruktes, dass sich die loxP-Sites in ausreichendem Abstand vom Exon 2 des BDNF-Gens der Maus befinden und somit in der konditionalen BDNF-knockout Maus weder Transkription noch Translation beeinträchtigen dürften.

Die Untersuchung der hippocampalen BDNF-Gehalte mehrerer Tiere mit den verschiedenen BDNF-Genotypen im Alter von 7 Monaten mittels Western Blot und BDNF-Immunsersum ergab relativ hohe durchschnittliche BDNF-Werte im Hippocampus heterozygot und homozygot gefloxter BDNF-Mäuse, die zudem einer breiten Streuung der Einzelwerte unterlagen. Dabei ist zu beachten, dass viele der Proben mit vergleichsweise hohen BDNF-Intensitäten von weiblichen Tieren stammten, bei denen der BDNF-Gehalt mit dem Östrogenzyklus gewissen Schwankungen unterworfen ist (Scharfman, H.E. et al. 2003).

Die ursprüngliche Annahme, dass geflochte BDNF-Mäuse niedrigere hippocampale BDNF-Level aufweisen als wildtypische Altersgenossen (C57Bl/6), konnte nicht bestätigt werden. Diese Mauslinie ist damit dazu geeignet, durch Verpaarung mit Mäusen mit zelltypspezifischer Aktivierung der Cre Rekombinase (z.B.: GFAP-Promotor oder NFL-Promotor) das BDNF-Gen in unterschiedlichen Zelltypen des Hippocampus zu deletieren und somit ein Modell herzustellen, das die Klärung wichtiger Fragen zur Rolle von BDNF im Hippocampus ermöglicht.

4.7 Neuroneogenese-Diskrepanzen an CNTF- und LIF-defizienten Mäusen

An verschiedenen Genotypen wurden mittels BrdU-Inkorporation die Neuroneogenese abgeschätzt und dazu die jeweiligen Proliferationsraten (Zeitfenster: 48h) in der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus bestimmt.

Im ersten Durchgang wurden zunächst an 7 CNTF-defizienten, 8 CNTF-LIF-defizienten und 7 wildtypischen Mäusen im Alter von 7 Monaten mit durchschnittlich rund 1100, 1700 bzw. 750 BrdU-positiven Zellen pro Kubikmillimeter Körnerzellschicht deutliche Unterschiede im Bezug auf die jeweiligen Proliferationsraten festgestellt. Während sowohl CNTF-LIF-defiziente als auch CNTF-defiziente Mäuse im Vergleich zu wildtypischen Tieren statistisch signifikant erhöhte Proliferationsraten im Bezug auf das Volumen der Körnerzellschicht zeigten, existierte zwischen CNTF-LIF-defizienten und CNTF-defizienten Tieren lediglich ein statistisch nicht signifikanter Trend.

Zur genaueren Klärung des Einflusses von LIF wurden im zweiten Durchgang 6 LIF-homozygot-defiziente, 4 LIF-heterozygot-defiziente sowie 6 wildtypische Geschwistertiere im Alter von 4 Monaten auf die jeweiligen Proliferationsraten untersucht, wobei die gerundeten durchschnittlichen Proliferationsraten der verschiedenen LIF-Genotypen zwischen

2000 und 2200 Zellen pro Kubikmillimeter Körnerzellschicht lagen und somit keine statistisch signifikanten Unterschiede aufwiesen.

Als Erklärung für die unterschiedlichen Proliferationsraten zwischen den Experimenten ist zum einen das unterschiedliche Alter der Tiere zu nennen, wobei bekannt ist, dass die Neuroneogenese mit zunehmendem Alter abnimmt (Kuhn, H.G. et al. 1996). Zum anderen ist zu bedenken, dass die beiden Durchgänge nicht gemeinsam bzw. unmittelbar hintereinander ausgewertet wurden und somit die mitunter grenzwertigen Entscheidungen beim Auszählen der BrdU-positiven Zellen zwar innerhalb eines Experimentes beurteilbar bleiben, beim Bezug auf das jeweils andere Experiment aber zu Abweichungen führen können.

Das alleinige Fehlen von LIF war ohne Einfluß auf die Proliferation. CNTF&LIF-knockout Mäuse wiesen jedoch im Vergleich zu CNTF-knockout Mäusen eine deutliche Steigerung der Proliferation auf. Diese Ergebnisse erinnern dabei an Motoneuronen-Untersuchungen mit diesen Faktoren, wo das Fehlen von LIF erst in Kombination mit dem Fehlen von CNTF einen Effekt auf Motoneuronen hatte (Sendtner, M. et al. 1996).

Die Tatsache, dass CNTF-defiziente Tiere im Vergleich zu wildtypischen Altersgenossen eine gesteigerte Proliferation im Gyrus dentatus aufweisen, macht verminderte hippocampale BDNF-Level dieser Tiere eher unwahrscheinlich. Es konnte nämlich bereits gezeigt werden, dass BDNF zu einer Steigerung der Proliferation führt (Lee, J. et al. 2002).

Das in dieser Arbeit verwendete BrdU-Injektionsprotokoll orientierte sich am Protokoll der Duman-Gruppe (Malberg, J.E. et al. 2000) und sah die Auszählung der nach 48h vorhandenen BrdU-positiven Zellen vor. Vergleiche zwischen den verschiedenen Untersuchungen in der Literatur sind dabei aufgrund der Verwendung unterschiedlicher Tierspezies, Injektionsprotokolle und Bezugsgrößen erschwert.

4.8 Veränderte Differenzierung neuraler Stammzellen unter CNTF-Einfluß

Schon vor einiger Zeit konnte gezeigt werden, dass CNTF bei der Astrozytendifferenzierung eine Rolle spielt (Hughes, S.M. et al. 1988).

Zur weiteren Ermittlung möglicher Wirkungen von CNTF auf die Differenzierung neuraler Stammzellen wurden Neurosphären von CNTF-defizienten und wildtypischen neuralen Stammzellen in insgesamt vier Gruppen für 48h differenziert. Der Vergleich betraf einerseits CNTF-defiziente Neurosphären mit und ohne externe CNTF-Gabe und andererseits wildtypische Neurosphären mit und ohne CNTF-blockierenden Antikörper K10. Dabei

zeigten Neurosphären mit CNTF-Wirkung tendenziell längere und dichtere Fortsätze als Neurosphären ohne CNTF-Wirkung.

4.9 CT-1 vermittelt Astrozytogenese *in vitro* und *in vivo*

Die Theorie, dass Cytokine für die Astrozytogenese eine wichtige Rolle spielen wurde bereits mehrfach bestätigt: CNTF, LIF und CT-1 vermitteln in Vorläuferzell-Kulturen Gliogenese über den gp130-JAK-STAT-Signalweg (Bonni, A. et al. 1997; Rajan, P. and McKay, R.D. 1998; Nakashima, K. et al. 1999b; Ochiai, W. et al. 2001). Dabei weisen CNTF-defiziente und LIF-defiziente Mäuse normale adulte Astrozytenzahlen auf (Barres, B.A. et al. 1996; Martin, A. et al. 2003), während dagegen gp130-defiziente und LIFR-defiziente Mäuse signifikant reduzierte Astrozytenzahlen im ZNS zeigen (Ware, C.B. et al. 1995; Koblar, S.A. et al. 1998; Nakashima, K. et al. 1999a). Hier wurde dargelegt, dass von Neuronen gebildetes CT-1 eine Schlüsselrolle in der Feedback-Regulation einnimmt und so die Umstellung von Neurogenese auf Gliogenese im Cortex bewerkstelligt. Im neonatalen Cortex CT-1-defizienter Mäuse wurden Astrozytenzahlen ermittelt, die zwar um 50%-70% gegenüber der Wildtyp-Situation reduziert waren, doch nicht an die Reduktion bei gp130-defizienten und LIFR-defizienten Tieren heranragten (Ware, C.B. et al. 1995; Koblar, S.A. et al. 1998; Nakashima, K. et al. 1999a). Diese Differenz ließe sich durch die Synthese anderer Cytokine – wie CNTF oder LIF – erklären, die ihre Wirkung über die gemeinsamen Rezeptorkomponenten gp130 und LIFR entfalten und so die CT-1-Wirkung ergänzen oder zumindest teilweise kompensieren könnten.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Neurotrophe Faktoren haben ein breites Aufgabenfeld und spielen eine wichtige Rolle als Überlebensfaktoren embryonaler Neurone, bei Proliferation und Differenzierung im Nervensystem sowie als Modulatoren synaptischer Plastizität.

Im ersten Themenkomplex der vorliegenden Arbeit wurden neurotrophe Faktoren als Modulatoren synaptischer Plastizität und ihr Einfluß auf die BDNF-Regulation im Hippocampus untersucht. Dabei wurde zunächst das selbsthergestellte polyclonale BDNF-Immunsereum für die Anwendung in der Immunhistochemie und im Western Blot optimiert, doch es konnten bezüglich BDNF keine Veränderungen in Hippocampi **CNTF**-defizienter Mäuse gegenüber Wildtyp-Tieren festgestellt werden. Die Ergebnisse der Voruntersuchungen, die im Hippocampus **CNTF**-defizienter Tiere verminderte BDNF-Level gezeigt hatten, konnten somit nicht verifiziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde an **CNTF**-defizienten Mäusen eine eingeschränkte LTP und LTD nachgewiesen. Zum besseren Verständnis der – laut LTP-Untersuchungen – veränderten Situation an der hippocampalen CA1-Synapse bei **CNTF**-defizienten Tieren wurden elektronenmikroskopische Bilder dieser Region angefertigt, deren Auswertung keine augenscheinlichen Unterschiede ergab. Im Stratum radiatum der CA1-Region war zudem keine spezifische **CNTF**-Färbung nachweisbar.

Zur Klärung der Frage, ob es **IGF**-vermittelt nach Training zu hippocampaler BDNF-Hochregulation kommt, wurden Laufradexperimente mit wildtypischen und konditionalen IGF1-Rezeptor-knockout Mäusen durchgeführt und die jeweiligen BDNF-Level untersucht. Dabei wurde BDNF durch Laufradtraining in beiden Genotypen in ähnlichem Maße hochreguliert, was für alternative Wege der BDNF-Hochregulation spricht.

Der zweite Themenkomplex befasste sich mit dem Einfluß neurotropher Faktoren auf die Proliferation und Differenzierung in Hippocampus und Cortex. BrdU-Inkorporationsexperimenten zeigten in der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus gesteigerte Proliferationsraten bei **CNTF**-defizienten und **CNTF&LIF**-defizienten Mäusen, wobei **LIF**-defiziente Tiere keine veränderten Proliferationsraten zeigten.

Untersuchungen an Kulturen cortikaler Vorläuferzellen bestätigten die Hypothese, wonach cortikale Vorläuferzellen zunächst Neurone bilden, die einen Faktor sezernieren, der auf die cortikalen Vorläuferzellen wirkt und sie zur Bildung von Astrozyten veranlasst. Es konnte gezeigt werden, dass **CT-1** der Hypothese folgend *in vitro* und *in vivo* für die Einleitung der Astrozytogenese im Cortex verantwortlich ist.

6 SUMMARY

Neurotrophic factors are central to many facets of CNS function. They act as survival factors during embryonic development, mediate proliferation, differentiation and survival also in the adult nervous system and play an important role for activity-dependent forms of synaptic plasticity.

The first part of this work was addressed to neurotrophic factors as modulators of synaptic plasticity and examined their role for BDNF-regulation within the hippocampal formation. Initially our polyclonal BDNF-immune serum was optimized for the use in immunohistochemistry and Western blot-analysis. No differences concerning BDNF-protein in hippocampi of **CNTF**-deficient mice compared with wildtype were found. Previous data, showing decreased hippocampal BDNF-level in **CNTF**-deficient mice, could therefore not be verified. Interestingly an impaired LTP and LTD was observed in **CNTF**-deficient mice. To understand the changed situation at hippocampal CA1-synapse in these mice, leading to an impaired LTP, we used electronmicroscopy, but no apparent differences were seen. In Stratum radiatum of CA1 region no specific **CNTF**-staining was detectable.

To address the question, whether **IGF** mediates the effect of physical training resulting in BDNF-upregulation within the hippocampus, we performed voluntary running experiments with conditional IGF1-receptor-knockout and with wildtype mice and analysed the BDNF-levels. It was shown that BDNF-upregulation after physical training occurred in both genotypes to a similar extent, suggesting alternative ways of BDNF-upregulation.

The second part dealt with the influence of neurotrophic factors on proliferation and differentiation in hippocampus and cortex. Via BrdU-incorporation experiments the different proliferation rates in the subgranular zone of the dentate gyrus were analysed. **CNTF**-deficient mice and **CNTF&LIF**-deficient mice showed increased proliferation rates compared with wildtype, whereas **LIF**-deficient mice had normal proliferation rates.

Precursor cells of the embryonic cortex sequentially generate neurons and then glial cells, but the mechanisms regulating this neurogenic-to-gliogenic transition were unclear. Using cortical precursor cultures, which temporally mimic this *in vivo* differentiation pattern, we demonstrated that cortical neurons synthesize and secrete the neurotrophic cytokine **CT-1**, which is essential for the timed genesis of astrocytes *in vitro*. Our data indicate that a similar phenomenon also occurs *in vivo*.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Acheson, A.; Conover, J.C.; Fandl, J.P.; DeChiara, T.M.; Russell, M.; Thadani, A.; Squinto, S.P.; Yancopoulos, G.D.; and Lindsay, R.M.:
A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death
Nature (1995) 374:450-453
- Adler, R.; Landa, K.B.; Manthorpe, M.; and Varon, S.:
Cholinergic neurotrophic factors: intraocular distribution of trophic activity for ciliary neurons
SCI (1979) 204:1434-1436
- Alonso, M.; Vianna, M.R.; Depino, A.M.; Mello e Souza, T.; Pereira, P.; Szapiro, G.; Viola, H.; Pitossi, F.; Izquierdo, I.; and Medina, J.H.:
BDNF-triggered events in the rat hippocampus are required for both short- and long-term memory formation
Hippocampus (2002) 12:551-560
- Altar, C.A.:
Neurotrophins and depression
Trends Pharmacol. Sci. (1999) 20:59-61
- Altar, C.A.; Cai, N.; Bliven, T.; Juhasz, M.; Conner, J.M.; Acheson, A.L.; Lindsay, R.M.; and Wiegand, S.J.:
Anterograde transport of Brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain
Nature (1997) 389:856-860
- Altar, C.A. and DiStephano, P.S.:
Neurotrophin trafficking by anterograde transport
Trends Neurosci. (1998) 21:433-437
- Antonov, I.; Antonova, I.; Kandel, E.R.; and Hawkins, R.D.:
Activity-dependent presynaptic facilitation and hebbian LTP are both required and interact during classical conditioning in Aplysia
Neuron (2003) 37:135-147
- Barde, Y.-A.; Edgar, D.; and Thoenen, H.:
Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain
EMBO J. (1982) 1:549-553
- Barnabe-Heider, F.; Wasylnka, J.A.; Fernandes, K.J.L.; Porsche, C.; Sendtner, M.; Kaplan, D.R.; and Miller, F.D.:
Evidence that embryonic neurons regulate the onset of cortical gliogenesis via cardiotrophin-1
Neuron (2005) 48:253-265
- Barres, B.A.; Burne, J.F.; Holtmann, B.; Thoenen, H.; Sendtner, M.; and Raff, M.C.:
Ciliary neurotrophic factor enhances the rate of oligodendrocyte generation.
Mol. Cell Neurosci. (1996) 8:146-156

- Bonni, A.; Sun, Y.; Nadal-Vicens, M.; Bhatt, A.; Frank, D.A.; Rozovsky, I.; Stahl, N.; Yancopoulos, G.D.; and Greenberg, M.E.:
Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway
SCI (1997) 278:477-483
- Chan-Palay, V. and Palay, S.L.:
Cerebellar Cortex - Cytology and Organisation
Berlin: Springer (1974)
- Chao, M.V. and Bothwell, M.:
Neurotrophins: to cleave or not to cleave
Neuron (2002) 33:9-12
- Conner, J.M.; Lauterborn, J.C.; Yan, Q.; Gall, C.M.; and Varon, S.:
Distribution of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Protein and mRNA in the normal adult rat CNS: Evidence for anterograde axonal Transport
J Neurosci (1997) 17:2295-2313
- Corkin, S.; Amaral, D.G.; Gonzalez, R.G.; Johnson, K.A.; and Hyman, B.T.:
H.M.'s medial temporal lobe lesion: findings from magnetic resonance imaging
J Neurosci (1997) 17:3964-3979
- Dallner, C.; Woods, A.G.; Deller, T.; Kirsch, M.; and Hofmann, H.-D.:
CNTF and CNTF receptor alpha are constitutively expressed by astrocytes in the mouse brain
Glia (2002) 37:374-378
- Dechant, G. and Barde, Y.A.:
Signalling through the neurotrophin receptor p75NTR
Current Opinion in Neurobiol. (1997) 7:413-418
- DeChiara, T.M.; Vejsada, R.; Poueymirou, W.T.; Acheson, A.; Suri, C.; Conover, J.C.; Friedman, B.; McClain, J.; Pan, L.; Stahl, N.; Ip, N.Y.; Kato, A.; and Yancopoulos, G.D.:
Mice lacking the CNTF receptor, unlike mice lacking CNTF, exhibit profound motor neuron deficits at birth.
Cell (1995) 83:313-322
- Dudek, S.M. and Bear, M.:
Bidirectional Long-Term Modification of Synaptic Effectiveness in the Adult and Immature Hippocampus
Journal of Neuroscience (1993) 13:2910-2918
- Ernfors, P.; Bengzon, J.; Kokaia, Z.; Persson, H.; and Lindvall, O.:
Increased levels of messenger RNAs for neurotrophic factors in the brain during kindling epileptogenesis
Neuron (1991) 7:165-176

- Escary, J.-L.; Perreau, J.; Duménil, D.; Ezine, S.; and Brûlet, P.:
Leukaemia inhibitory factor is necessary for maintenance of haematopoietic stem cells
and thymocyte stimulation
Nature (1993) 363:361-364
- Friedman, B.; Scherer, S.S.; Rudge, J.S.; Helgren, M.; Morrissey, D.; McClain, J.; Wang;
Wiegand, S.J.; Furth, M.E.; Lindsay, R.M.; and Ip, N.Y.:
Regulation of ciliary neurotrophic factor expression in myelin-related schwann cells in
vivo
Neuron (1992) 9:295-305
- Griesbach, G.S.; Hovda, D.A.; Molteni, R.; Wu, A.; and Gomez-Pinilla, F.:
Voluntary exercise following traumatic brain injury: brain-derived neurotrophic factor
upregulation and recovery of function
Neuroscience (2004) 125:129-139
- Hebb, D.O.:
The Organization of Behaviour
New York: John Wiley (1949)
- Holtmann, B.; Wiese, S.; Samsam, M.; Grohmann, K.; Pennica, D.; Martini, R.; and Sendtner,
M.:
Triple knock-out of CNTF, LIF, and CT-1 defines cooperative and distinct roles of
these neurotrophic factors for motoneuron maintenance and function
J Neurosci. (2005) 25:1778-1787
- Huang, E.J. and Reichardt, L.F.:
Neurotrophins: roles in neuronal development and function
Annu. Rev. Neurosci. (2001) 24:677-736
- Hughes, S.M.; Lillien, L.E.; Raff, M.C.; Rohrer, H.; and Sendtner, M.:
Ciliary neurotrophic factor induces type-2 astrocyte differentiation in culture
Nature (1988) 335:70-73
- Inoue, H.; Nojima, H.; and Okayama, H.:
High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids
Gene (1990) 96:23-28
- Ip, N.Y.; McClain, J.; Barrezueta, N.X.; Aldrich, T.H.; Pan, L.; Li, Y.P.; Wiegand, S.J.;
Friedman, B.; Davis, S.; and Yancopoulos, G.D.:
The alpha component of the cntf receptor is required for signaling and defines
potential cntf targets in the adult and during development
Neuron (1993) 10:89-102
- Jahn, R.; Schiebler, W.; Ouimet, C.; and Greengard, P.:
A 30,000-dalton membrane protein (p38) present in synaptic vesicles
Proc Natl Acad Sci U S A (1985) 82:4137-4141
- Johnson, R.A.; Rhodes, J.S.; Jeffrey, S.L.; Garland, T., Jr.; and Mitchell, G.S.:
Hippocampal brain-derived neurotrophic factor but not neurotrophin-3 increases more
in mice selected for increased voluntary wheel running
Neuroscience (2003) 121:1-7

- Kandel, E.R.; Schwartz, J.H.; and Jessell, T.M.:
Principles of neural science
McGraw-Hill (2000)
- Katoh-Semba, R.; Asano, T.; Ueda, H.; Morishita, R.; Takeuchi, I.K.; Inaguma, Y.; and Kato, K.:
Riluzole enhances expression of brain-derived neurotrophic factor with consequent proliferation of granule precursor cells in the rat hippocampus
FASEB J (2002) 16:1328-1330
- Kerr, B.J.; Bradbury, E.J.; Bennett, D.J.; Trivedi, P.M.; Dassan, P.; French, J.; Shelton, D.B.; McMahon, S.B.; and Thompson, S.W.:
Brain-derived neurotrophic factor modulates nociceptive sensory inputs and NMDA-evoked responses in the rat spinal cord
J Neurosci (1999) 19:5138-5148
- Koblar, S.A.; Turnley, A.M.; Classon, B.J.; Reid, K.L.; Ware, C.B.; Cheema, S.S.; Murphy, M.; and Bartlett, P.F.:
Neural precursor differentiation into astrocytes requires signaling through the leukemia inhibitory factor receptor
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1998) 95:3178-3181
- Kolbeck, R.; Bartke, I.; Eberle, W.; and Barde, Y.A.:
Brain-derived neurotrophic factor levels in the nervous system of wild-type and neurotrophin gene mutant mice
J. Neurochem. (1999) 72:1930-1938
- Korte, M.; Carroll, P.; Wolf, E.; Brem, G.; Thoenen, H.; and Bonhoeffer, T.:
Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92:8856-8860
- Korte, M.; Griesbeck, O.; Gravel, C.; Carroll, P.; Staiger, V.; Thoenen, H.; and Bonhoeffer, T.:
Virus-mediated gene transfer into hippocampal CA1 region restores long-term potentiation in brain-derived neurotrophic factor mutant mice
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1996) 93:12547-12552
- Kuhn, H.G.; Dickinson-Anson, H.; and Gage, F.H.:
Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation
J Neurosci (1996) 16:2027-2033
- Lee, J.; Duan, W.; and Mattson, M.P.:
Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice
J Neurochem (2002) 82:1367-1375
- Lee, R.; Kermani, P.; Teng, K.K.; and Hempstead, B.L.:
Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins
SCI (2001) 294:1945-1948

- LeRoith, D. and Roberts, C.T., Jr.:
Insulin-like growth factors
Ann. NY Acad. Sci. (1993) 692:1-9
- LeRoith, D.; Werner, H.; Faria, T.N.; Kato, H.; Adamo, M.; and Roberts, C.T., Jr.:
Insulin-like growth factor receptors: Implications for nervous system function
Ann. NY Acad. Sci. (1993) 692:22-32
- Levi-Montalcini, R.:
The nerve growth factor: thirty-five years later
EMBO J. (1987) 6:1145-1154
- Levi-Montalcini, R. and Hamburger, V.:
A diffusible agent of mouse sarcoma producing hyperplasia of sympathetic ganglia and hyperneurotization of viscera in the chick embryo
J. Exp. Zool. (1953) 123:233-278
- Li, M.; Sendtner, M.; and Smith, A.:
Essential function of LIF receptor in motor neurons
Nature (1995) 378:724-727
- Lin, L.-F.H.; Mismer, D.; Lile, J.D.; Armes, L.G.; Butler, E.T., III; Vannice, J.L.; and Collins, F.:
Purification, cloning, and expression of ciliary neurotrophic factor (CNTF)
SCI (1989) 246:1023-1025
- Linnarsson, S.; Bjorklund, A.; and Ernfors, P.:
Learning deficit in BDNF mutant mice
Eur J Neurosci (1997) 9:2581-2587
- Lohof, A.M.; Ip, N.Y.; and Poo, M.:
Potentiation of developing neuromuscular synapses by the neurotrophins NT-3 and BDNF
Nature (1993) 363:350-353
- Lu, B.; Pang, P.T.; and Woo, N.H.:
The yin and yang of neurotrophin action
Nat. Rev. Neurosci. (2005) 6:603-614
- Malberg, J.E.; Eisch, A.J.; Nestler, E.J.; and Duman, R.S.:
Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus
J Neurosci (2000) 20:9104-9110
- Manthorpe, M.; Skaper, S.; Adler, R.; Landa, K.; and Varon, S.:
Cholinergic neuronotrophic factors: fractionation properties of an extract from selected chick embryonic eye tissues
J. Neurochem. (1980) 34:69-75
- Manthorpe, M.; Skaper, S.D.; Williams, L.R.; and Varon, S.:
Purification of adult rat sciatic nerve ciliary neuronotrophic factor
Brain Res. (1986) 367:282-286

- Martin, A.; Hofmann, H.-D.; and Kirsch, M.:
Glial reactivity in CNTF-deficient mice after optic nerve lesion
J Neurosci (2003) 23:5416-5424
- Masu, Y.; Wolf, E.; Holtmann, B.; Sendtner, M.; Brem, G.; and Thoenen, H.:
Disruption of the CNTF gene results in motor neuron degeneration
Nature (1993) 365:27-32
- Monteggia, L.M.; Barrot, M.; Powell, C.M.; Berton, O.; Galanis, V.; Gemelli, T.; Meuth, S.;
Nagy, A.; Greene, R.W.; and Nestler, E.J.:
Essential role of brain-derived neurotrophic factor in adult hippocampal function
Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2004) 101:10827-10832
- Mowla, S.J.; Farhadi, H.F.; Pareek, S.; Atwal, J.K.; Morris, S.J.; Seidah, N.G.; and Murphy,
R.A.:
Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to Brain-derived
neurotrophic factor
J Biol Chem (2001) 276:12660-12666
- Murer, M.G.; Yan, Q.; and Raisman-Vozari, R.:
Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's
disease and Parkinson's disease
Prog. Neurobiol. (2001) 63:71-124
- Nägerl, U.V.; Eberhorn, N.; Cambridge, S.B.; and Bonhoeffer, T.:
Bidirectional activity-dependent morphological plasticity in hippocampal neurons
Neuron (2004) 44:759-767
- Nakashima, K.; Wiese, S.; Yanagisawa, M.; Arakawa, H.; Kimura, N.; Hisatsune, T.;
Yoshida, K.; Kishimoto, T.; Sendtner, M.; and Taga, T.:
Developmental requirement of gp130 signaling in neuronal survival and astrocyte
differentiation
J. Neurosci. (1999a) 19:5429-5434
- Nakashima, K.; Yanagisawa, M.; Arakawa, H.; Kimura, N.; Hisatsune, T.; Kawabata, M.;
Miyazono, K.; and Taga, T.:
Synergistic signaling in fetal brain by STAT3-Smad1 complex bridged by p300 [see
comments]
SCI (1999b) 284:479-482
- Neeper, S.A.; Gomez-Pinilla, F.; Choi, J.; and Cotman, C.:
Exercise and brain neurotrophins
Nature (1995) 373:109
- Ochiai, W.; Yanagisawa, M.; Takizawa, T.; Nakashima, K.; and Taga, T.:
Astrocyte differentiation of fetal neuroepithelial cells involving cardiotrophin-1-
induced activation of STAT3
Cytokine (2001) 14:264-271

- Oppenheim, R.W.; Wiese, S.; Prevette, D.; Armanini, M.; Wang, S.; Houenou, L.J.; Holtmann, B.; Gotz, R.; Pennica, D.; and Sendtner, M.:
Cardiotrophin-1, a muscle-derived cytokine, is required for the survival of subpopulations of developing motoneurons
J Neurosci. (2001) 21:1283-1291
- Patterson, S.L.; Abel, T.; Deuel, T.A.; Martin, K.C.; Rose, J.C.; and Kandel, E.R.:
Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice
Neuron (1996) 16:1137-1145
- Patterson, S.L.; Grover, L.M.; Schwartzkroin, P.A.; and Bothwell, M.:
Neurotrophin expression in rat hippocampal slices - a stimulus paradigm inducing LTP in CA1 evokes increases in BDNF and NT-3 mRNAs
Neuron (1992) 9:1081-1088
- Qian, X.; Shen, Q.; Goderie, S.K.; He, W.; Capela, A.; Davis, A.A.; and Temple, S.:
Timing of CNS cell generation: A programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells
Neuron (2000) 28:69-80
- Rajan, P. and McKay, R.D.:
Multiple routes to astrocytic differentiation in the CNS
J Neurosci (1998) 18:3620-3629
- Reinhardt, R.R. and Bondy, C.A.:
Insulin-like growth factors cross the blood-brain barrier.
Endocrinology (1994) 135:1753-1761
- Reynolds, E.S.:
The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy.
J Cell Biol (1963) 17:208-212
- Scharfman, H.E.; Mercurio, T.C.; Goodman, J.H.; Wilson, M.A.; and MacLusky, N.J.:
Hippocampal excitability increases during the estrous cycle in the rat: a potential role for Brain-derived neurotrophic factor
J Neurosci (2003) 23:11641-11652
- Schweizer, U.; Gunnarsen, J.; Karch, C.; Wiese, S.; Holtmann, B.; Takeda, K.; Akira, S.; and Sendtner, M.:
Conditional gene ablation of Stat3 reveals differential signaling requirements for survival of motoneurons during development and after nerve injury in the adult
J. Cell Biol. (2002) 156:287-297
- Sendtner, M.; Götz, R.; Holtmann, B.; Escary, J.-L.; Masu, Y.; Carroll, P.; Wolf, E.; Brehm, G.; Brulet, P.; and Thoenen, H.:
Cryptic physiological trophic support of motoneurons by LIF disclosed by double gene targeting of CNTF and LIF.
Current Biol. (1996) 6:686-694

- Sendtner, M.; Kreutzberg, G.W.; and Thoenen, H.:
Ciliary neurotrophic factor prevents the degeneration of motor neurons after axotomy
Nature (1990) 345:440-441
- Sendtner, M.; Stöckli, K.A.; and Thoenen, H.:
Synthesis and location of ciliary neurotrophic factor in the rat sciatic nerve of the adult rat after lesion and during regeneration
J. Cell Biol. (1992) 118:139-148
- Silhol, M.; Bonnichon, V.; Rage, F.; and Tapia-Arancibia, L.:
Age-related changes in Brain-derived neurotrophic factor and Tyrosine kinase receptor isoforms in the Hippocampus and Hypothalamus in male rats
Neuroscience (2005) 132:613-624
- Stöckli, K.A.; Lottspeich, F.; Sendtner, M.; Masiakowski, P.; Carroll, P.; Götz, R.; Lindholm, D.; and Thoenen, H.:
Molecular cloning, expression and regional distribution of rat ciliary neurotrophic factor
Nature (1989) 342:920-923
- Tsai, S.J.:
Is mania caused by overactivity of central brain-derived neurotrophic factor?
Med. Hypotheses (2004) 62:19-22
- Ware, C.B.; Horowitz, M.C.; Renshaw, B.R.; Hunt, J.S.; Liggitt, D.; Koblar, S.A.; Gliniak, B.C.; McKenna, H.J.; Papayannopoulou, T.; Thoma, B.; and Et al:
Targeted disruption of the low-affinity leukemia inhibitory factor receptor gene causes placental, skeletal, neural and metabolic defects and results in perinatal death
Development (1995) 121:1283-1299
- Wetmore, C.; Ernfors, P.; Persson, H.; and Olson, L.:
Localisation of Brain-derived Neurotrophic Factor mRNA to Neurons in the Brain by in Situ Hybridisation
Exp. Neurol. (1990) 109:141-152
- Williams, L.R.; Manthorpe, M.; Barbin, G.; Nieto-Sampedro, M.; Cotman, C.W.; and Varon, S.:
High ciliary neuronotrophic specific activity in rat peripheral nerve
Int. J. of Dev. Neurosci. (1984) 2:177-180
- Yoshida, K.; Taga, T.; Saito, M.; Suematsu, S.; Kumanogoh, A.; Tanaka, T.; Fujiwara, H.; Hirata, M.; Yamagami, T.; Nakahata, T.; Hirabayashi, T.; Yoneda, Y.; Tanaka, K.; Wang, W.Z.; Mori, C.; Shiota, K.; Yoshida, N.; and Kishimoto, T.:
Targeted disruption of gp130, a common signal transducer for the interleukin 6 family of cytokines, leads to myocardial and hematological disorders
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1996) 93:407-411
- Zakharenko, S.S.; Patterson, S.L.; Dragatsis, I.; Zeitlin, S.O.; Siegelbaum, S.A.; Kandel, E.R.; and Morozov, A.:
Presynaptic BDNF required for a presynaptic but not postsynaptic component of LTP at hippocampal CA1-CA3 synapses
Neuron (2003) 39:975-990

8 ANHANG

Abkürzungsverzeichnis

ABC-Methode	Avidin-Biotin-Komplex-Methode
ACSF	artificial cerebrospinal fluid
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionic acid
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovine Serum Albumin
CA	Cornu ammonis
cAMP	cyclic Adenosine monophosphate
CNTF	Ciliary neurotrophic factor
Cre	Cre Rekombinase
CREB-1	cAMP response element binding protein 1
CT-1	Cardiotrophin-1
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidin
DABCO	1,4-Diacabicyclo[2.2.2.]octan
DAPI	4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTPs	2'-Desoxyribonucleosid-5'triphosphate
E	Embryonaltag
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	ependymal growth factor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EPSP	Excitatoric postsynaptic potential
ERK	extracellular signal-related kinase
FGF	fibroblastic growth factor
fl	gefloxt
g	Normfallbeschleunigung (Erde)
GAD	Glutamic acid decarboxylase
GDNF	Glial-derived neurotrophic factor
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
h	Stunde
HBSS	Hanks balanced salt solution
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography

Hz	Hertz
Ig	Immunglobulin
IGF	Insulin-like growth factor
ko	knockout
KZS	Körnerzellschicht
LFS	Low frequency stimulation
LIF	Leukemia inhibitory factor
LTD	Long-Term Depression
LTP	Long-Term Potentiation
M	Molar oder Meningen
MAPK	Mitogen-activated Proteinkinase
min	Minute
mol	molar
mRNA	Messenger RNA
N	Normal
NFM	Neurofilament M
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NSC	neurale Stammzelle
NGF	Nerve growth factor
NP-40	Nonylphenyl-polyethylenglycol
NT-3	Neurotrophin-3
NT-4/5	Neurotrophin-4/5
P	Postnaltag oder Passagenummer
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyd
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PORN	Poly-D,L-Ornithin
PPF	Paired Pulse Facilitation
PVP	Polyvinylpyrrolidon
R	Receptor
RNA	Ribonucleic acid
rpm	rounds per minute
RT	Reverse Transcriptase oder Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Sodium dodecylsulfat
STP	Short-Term Potentiation
SVZ	Subventrikuläre Zone
TAE	Tris-Aceticacid-EDTA
Taq	Thermophilus aquaticus

TBS	Theta-burst stimulation oder Tris buffered saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylen diamin
Topo	DNA-Topoisomerase Typ-I
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trk	Tropomyosin related kinase
V	Volt
%	Prozent

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1	Hippocampus der Maus.....	8
Abbildung 2-1	Genkonstrukt der floxed IGF-1-Rezeptor-Maus.....	20
Abbildung 2-2	Schritte der Hippocampuspräparation.....	49
Abbildung 2-3	Region zur Präparation neuraler Stammzellen.....	50
Abbildung 2-4	BrdU-Detektion im Gyrus dentatus.....	64
Abbildung 2-5	BDNF-Färbung des Hippocampus und Regionen der Intensitätsmessung.....	65
Abbildung 2-6	Stimulations- und Messvorrichtung der Hippocampuschnitte.....	66
Abbildung 2-7	Verschiedene Phasen der LTP bzw. LTD-Messung.....	67
Abbildung 2-8	Verschiedene Stimulationsprotokolle für LTP und LTD.....	68
Abbildung 3-1	BDNF-Detektion im Western Blot.....	70
Abbildung 3-2	Spezifitätskontrollen des BDNF-Immuserums.....	71
Abbildung 3-3	Vergleich verschiedener Chargen des BDNF-Immuserums.....	72
Abbildung 3-4	BDNF-Nachweis in der Immunhistochemie.....	73
Abbildung 3-5	BDNF-Nachweis und der Einfluß der unterschiedlichen Nachfixierungszeiten mit 4%PFA.....	74
Abbildung 3-6	Verschiedene Chargen des BDNF-Immuserums angewandt bei Hippocampuschnitten aus dem Gehirn derselben Wildtypmaus. Nachfixierungszeit: 1h 15min.....	75
Abbildung 3-7	Detailaufnahme eines Axons.....	76
Abbildung 3-8	BDNF-Immunhistochemie an CNTF-defizienten Mäusen.....	78
Abbildung 3-9	BDNF-Immunhistochemie an CNTF-defizienten Mäusen: Ausschnitte.....	78
Abbildung 3-10	Intensitätsmessung der BDNF-Immunhistochemie an standardisierten Regionen im Hippocampus von CNTF-defizienten Mäusen.....	79

Abbildung 3-11	BDNF-Nachweis im Hippocampuslysate von CNTF-defizienten Mäusen mittels Western Blot-Untersuchungen.....	81
Abbildung 3-12	Vergleich der BDNF-Intensitäten von CNTF-defizienten Mäusen und wildtypischen Geschwistertieren.....	82
Abbildung 3-13	Bestimmung des BDNF-Gehaltes mittels BDNF-ELISA.....	83
Abbildung 3-14	LTP-Untersuchungen an der CA1-Synapse CNTF-defizienter Mäuse unter Verwendung der Tetanus-Stimulation.....	84
Abbildung 3-15	LTP-Untersuchungen an der CA1-Synapse CNTF-defizienter Mäuse unter Verwendung der TBS.....	85
Abbildung 3-16	LTD-Untersuchungen an der CA1-Synapse CNTF-defizienter Mäuse unter Verwendung von LFS.....	86
Abbildung 3-17	Hippocampus von CNTF-defizienten Mäusen und wildtypischen Geschwistertieren: Semidünnschnitte und elektronenmikroskopische Aufnahmen.....	88
Abbildung 3-18	Elektronenmikroskopisches Bild: Ausschnittsvergrößerung aus Abbildung 3-17, B.....	89
Abbildung 3-19	Lokalisierung von CNTF – Teil 1.....	92
Abbildung 3-20	Lokalisierung von CNTF – Teil 2.....	93
Abbildung 3-21	BDNF-Nachweis im Hippocampus von unter NFL-Promotor IGF1-Rezeptor-defizienten Mäusen und wildtypischen Geschwistertieren jeweils mit und ohne einwöchiges Laufradtraining mittels Immunhistochemie.....	95
Abbildung 3-22	BDNF-Nachweis im Hippocampuslysate von wildtypischen Mäusen mit und ohne einwöchigem Laufradtraining mittels Western Blot: Seitenvergleich.....	97
Abbildung 3-23	BDNF-Nachweis im Hippocampuslysate von unter NFL-Promotor IGF1-Rezeptor-defizienten Mäusen und wildtypischen Geschwistertieren jeweils mit und ohne einwöchiges Laufradtraining mittels Western Blot.....	98
Abbildung 3-24	Gen-Konstrukt der geflochten BDNF-Maus.....	99
Abbildung 3-25	Vorabexperiment: BDNF-Nachweis und Quantifizierung im Hippocampuslysate bei verschiedenen Genotypen mittels Western Blot-Untersuchung.....	101
Abbildung 3-26	BDNF-Nachweis und Quantifizierung im Hippocampuslysate bei verschiedenen Genotypen mittels Western Blot-Untersuchungen.....	102
Abbildung 3-27	Proliferationsraten als BrdU-positive Zellen pro Kubikmillimeter Körnerzellschicht von 7 Monate alten CNTF-defizienten, CNTF-LIF-defizienten und wildtypischen Mäusen.....	104
Abbildung 3-28	Proliferationsraten als BrdU-positive Zellen pro Kubikmillimeter Körnerzellschicht von 4 Monate alten LIF-homozygot-defizienten, LIF-heterozygot-defizienten und wildtypischen Mäusen.....	104
Abbildung 3-29	Neurosphären verschiedener Genotypen nach Differenzierung für 48h.....	106

Abbildung 3-30	Kulturen cortikaler Vorläuferzellen 2, 4 bzw. 6 Tage in Kultur ohne Faktoren, mit Zugabe verschiedener Cytokine sowie mit Zugabe von Medium aus 4-Tage alten Kulturen.....	108
Abbildung 3-31	Western Blots von cortikalen Vorläuferzellkulturen	109
Abbildung 3-32	RT-PCRs für CNTF, LIF und CT-1 mRNAs isoliert aus frisch dissoziierten cortikalen Vorläuferzell-Kulturen, nach Kultivierung für 3 bzw. 6 Tage und aus entwickelten cortikalen Neuronen	110
Abbildung 3-33	RT-PCR von aus Cortices isolierter RNA.....	111
Abbildung 3-34	Western Blot-Untersuchungen cortikaler Vorläuferzellkulturen von CT-1 defizienten Mäusen (1. Experiment).....	113
Abbildung 3-35	Western Blot-Untersuchungen cortikaler Vorläuferzellkulturen von CT-1 defizienten Mäusen (2. Experiment).....	113
Abbildung 3-36	Western Blots von wildtypischen cortikalen Vorläuferzellkulturen mit konditioniertem Medium	114
Abbildung 3-37	Immunhistochemie an E18-Gehirn	115
Abbildung 3-38	Western Blots von Cortices CT-1 defizienter Mäuse.....	116
Abbildung 3-39	Immunhistochemie an P3-Gehirn einer CT-1 defizienten Maus.....	117

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1	Neurotrophe Faktoren und ihre Rezeptoren	11
Tabelle 2-1	Primärantikörper.....	23
Tabelle 2-2	Sekundärantikörper	24
Tabelle 2-3	Oligonukleotide.....	25

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im neurobiologischen Forschungslabor der Universitätsklinik der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg angefertigt.

Bei Herrn Prof. Dr. Michael Sendtner bedanke ich mich für die Bereitstellung des Themas, seine Betreuung sowie seine Diskussionsbereitschaft und unermüdliche Unterstützung während der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Klaus-Viktor Toyka, Herrn Prof. Dr. Michael Sendtner, Herrn Prof. Dr. Klaus Thureau und Herrn Prof. Dr. Manfred Heckmann bin ich für ehrliche Einschätzungen und beratende Gespräche auch im Hinblick auf zukünftige Orientierungen sehr dankbar.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Stefan Wiese und Frau Priv.-Doz. Dr. Sibylle Jablonka danke ich für verschiedene allgemeine Hilfestellungen in Sachen Beratung und Organisation, Frau Dr. Bettina Holtmann für das stets wachsame Auge, das die von mir benötigten Mauslinien stets gut mitbetreute.

Frau Dr. Fanie Barnabé-Heider danke ich für die gemeinsame Laborarbeit und die Möglichkeit, eine Veröffentlichung zum gemeinsamen Abschluß zu bringen.

Frau Dr. Angelika Schmitt, Herrn Prof. Dr. Klaus-Peter Lesch, Frau Melanie Keß und Frau Ulrike Meyer danke ich für die nette Zusammenarbeit im Zusammenhang mit der Untersuchung von Neuroneogenese und Apoptose im Gyrus dentatus.

Frau Prof. Dr. Esther Asan, Frau Rita Herrmann und Frau Sieglinde Schenk danke ich für die Beratung, Zusammenarbeit und Einführung in die Elektronenmikroskopie.

Für Einblicke in die elektrophysiologischen Messungen der LTP und LTD und deren Durchführung bin ich Herrn Prof. Dr. Martin Korte und Herrn Volker Staiger sehr dankbar.

Für die gute Zusammenarbeit, Anregung beim Trouble shooting, gemeinsame Nutzung von Reagenzien und die Kameradschaft danke ich Herrn Dirk Pühringer, Frau Christine Schneider, Herrn Dr. Thomas Herrmann, Frau Dr. Catia Andreassi, Frau Dr. Natalja Funk, Herrn Florian Bender, Frau Helga Brunner, Frau Karin Urlaub, Herrn Murat Kaya, Frau Michaela Pfister und den anderen Mitarbeitern der neurobiologischen Forschungslabore.

Besonderer, alle Bereiche umfassender Dank gebührt Kathi, die mich durch aktive Mithilfe, aber auch durch Verständnis und bloße Anwesenheit sehr unterstützt hat.

Lebenslauf

Name: Dr. Christian Porsche
Geburtsdatum/-ort: 21.03.1974 in München
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1980-1984 Grundsule „Im sonnigen Winkel“ in Stuttgart
1984-1987 „Eberhard-Ludwig-Gymnasium“ in Stuttgart
1987-1994 „Gymnasium der Benediktiner Schäftlarn“ bei München
Abschluß mit dem Abitur

Hochschulausbildung:

10/1994-05/2001 Studium der Humanmedizin an der „Freien Universität“
und „Humboldt-Universität“ in Berlin
Studienaufenthalte am „Washington Hospital Center“,
USA, der „University of Pretoria“, Südafrika und der
„University of Newcastle upon Tyne“, England
08/2001 Aufnahme in das MD/PhD-Programm der „Julius-Maxi-
milians-Universität“ in Würzburg
05/2002 Medizinische Promotion über das Thema „Telomerase-
aktivität in malignen und benignen Nierentumoren“
05/2003 Approbation als Arzt
seit 05/2003 Arbeit am Institut für Klinische Neurobiologie über das
Thema „Neuronale Plastizität im Hippocampus der Maus:
Die Rolle von Neurotrophinen und Cytokinen“

Würzburg, den 03. September 2006

Publikationen

Originalarbeiten:

Müller, M.; Heicappell, R.; Krause, H.; Sachsinger, J.; Porsche, C.; Miller, K.
Telomerase activity in malignant and benign renal tumors
Eur Urol (1999) 35(3): 249-255

Porsche, C.; Walker, L.; Mendelow, A.D.; Birchall, D.
Evaluation of cross-sectional luminal morphology in carotid atherosclerotic disease by
use of spiral CT angiography
Stroke (2001) 32(11): 2511-2515

Porsche, C.; Walker, L.; Mendelow, A.D.; Birchall, D.
Assessment of vessel wall thickness in carotid atherosclerosis using spiral CT angio-
graphy
Eur J Vasc Endovasc Surg (2002) 23(5): 437-440

Grossmann, R.; Sokolova, O.; Schnurr, A.; Bonz, A.; Porsche, C.; Obergfell, A.;
Lengenfelder, B.; Walter, U.; Eigenthaler, M.
Variable extent of clopidogrel responsiveness in patients after coronary stenting
Thromb Haemost (2004) 92(6): 1201-1206

Barnabé-Heider, F.; Wasylnka, J.A.; Fernandes, K.J.; Porsche, C.; Sendtner, M.;
Kaplan, D.R.; Miller, F.D.
Evidence that embryonic neurons regulate the onset of cortical gliogenesis via cardio-
trophin-1
Neuron (2005) 48(2): 253-265

Abstracts:

Porsche, C.; Mendelow, A.D.; Birchall, D.
Untersuchung der Gefäßwanddicke an arteriosklerotierten Halsarterien mittels Spiral-
CT: Auswirkungen auf angiographische Stenosenmessung
Akt Neurol (2001) 28, P614
Poster auf dem 74. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Neurologie
(Aachen, September 2001)

Porsche, C.; Walker, L.; Mendelow, A.D.; Birchall, D.
Untersuchung der Lumenmorphologie von arteriosklerotierten Halsarterien mittels
Spiral-CT-Angiographie
Akt Neurol (2001) 28, V398
Vortrag auf dem 74. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Neurologie
(Aachen, September 2001)

Walker, L.; Birchall, D.; Porsche, C.; Mendelow, A.D.
Evaluation of Cross-Sectional Lumen Morphology in Carotid Atherosclerotic Disease
using Spiral CT Angiography
RSNA (2001) R11, 131-p
Poster at the Radiological Society of North America (Chicago, November 2001)

Birchall, D.; Porsche, C.; Mendelow, A.D.

Evaluation of Vessel Wall Thickness in Carotid Atherosclerotic Disease using Spiral CT: Implications for Angiographic Stenosis Measurement

RSNA (2001) R11, 133-p

Poster at the Radiological Society of North America (Chicago, November 2001)

Oral presentation:

Porsche, C.; Walker, L.; Mendelow, A.D.; Birchall, D.

Evaluation of Cross-Sectional Lumen Morphology in Carotid Atherosclerotic Disease using Spiral CT Angiography

Northern Radiology Annual Meeting (Newcastle, 2001)

Winner of the best proffered paper

Presented in absentia

Porsche, C.; Walker, L.; Mendelow, A.D.; Birchall, D.

Evaluation of Carotid Plaque Morphology using Spiral CT

British Society of Neuroradiology (Bristol, 2001)

Presented in absentia

Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die Dissertation „Neuronale Plastizität im Hippocampus der Maus: Die Rolle von Neurotrophinen und Cytokinen“ selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre weiterhin, dass diese Dissertation weder in gleicher Weise noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich erkläre zudem vom Fachbereich Humanmedizin der Freien Universität Berlin den Grad eines Doktors der Medizin (Dr. med.) verliehen bekommen zu haben.

Ich habe außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den 03. September 2006