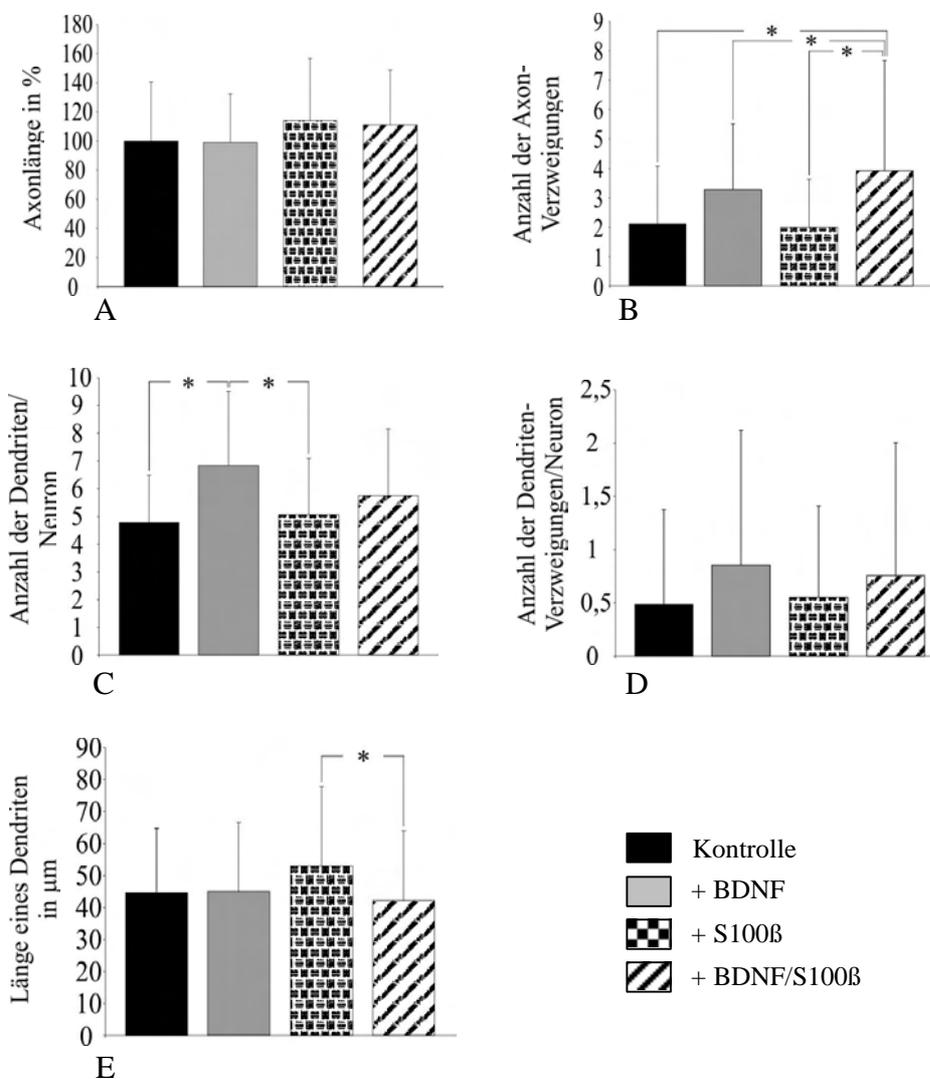


Abbildung 18:

Morphometrische Untersuchungen an kultivierten Raphe-Neuronen nach Behandlung mit BDNF, S100 β und BDNF + S100 β



Primärkulturen der Raphe vom Embryonaltag E13 wurden am 1. Tag *in vitro* behandelt und am 6. Tag fixiert. Die Identifizierung der serotonergen Neurone erfolgte mit einem Antikörper gegen Serotonin in der Doppelfärbung mit Antikörper gegen MAP-2. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung; mit Ausnahme der Axonlänge, deren Angabe aufgrund der Schwankungen zwischen den Versuchsansätzen in Prozent erfolgte. n=60 (Axone) bzw. n=90 (Dendriten)

A: durchschnittliche Gesamtlänge des Axons / Neuron (Angabe in %)

B: durchschnittliche Anzahl der Axonverzweigungen / Neuron

C: durchschnittliche Anzahl der Dendriten / Neuron

D: durchschnittliche Anzahl der Dendritenverzweigungen / Neuron

E: durchschnittliche Länge eines Dendriten (Angabe in μm)

Abbildung 19: Immunfluoreszenz-Darstellung serotonener Neurone in Kultur

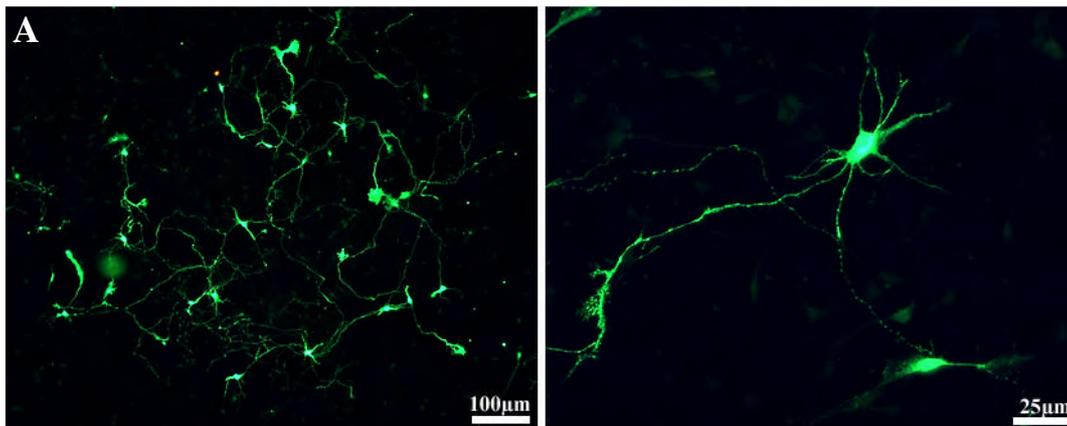


Abbildung 20: MAP-2- und Serotonin-Färbung in einem Neuron

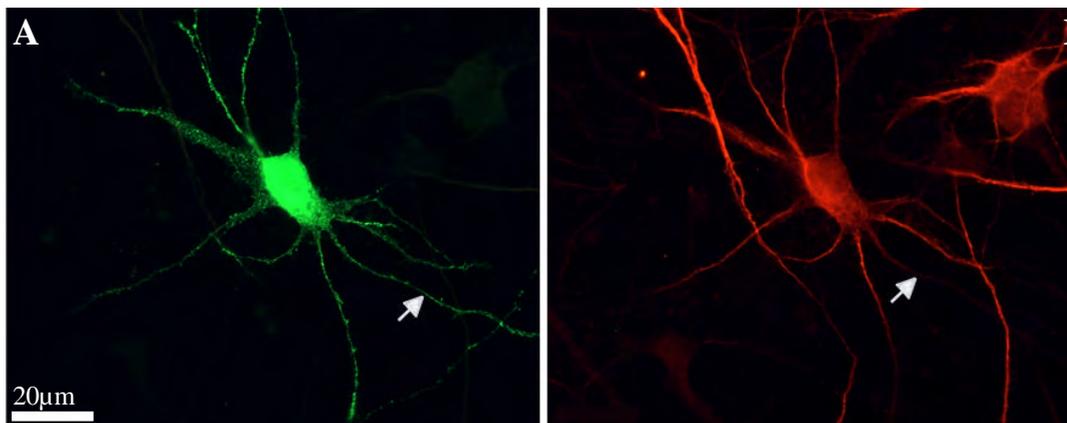
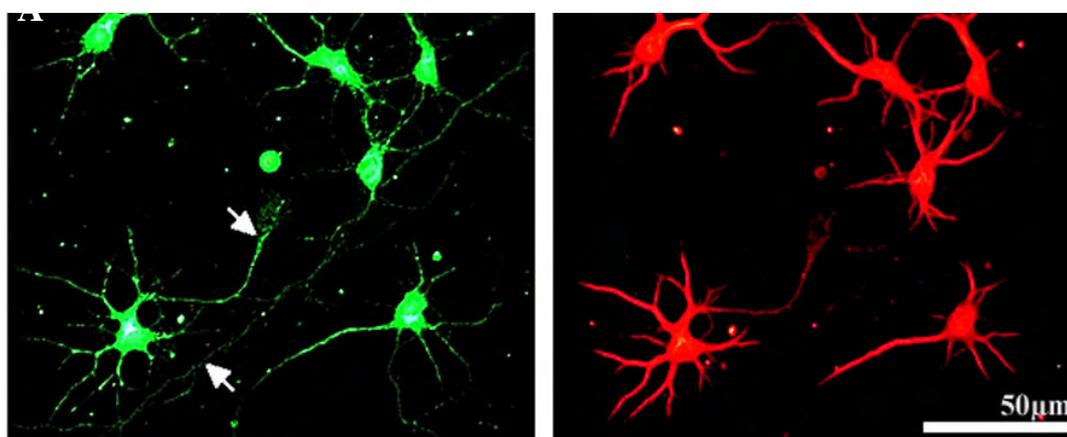


Abbildung 21: Spezifische Darstellung von Dendriten (MAP2) und Axonen (NFP200) hippocampaler Neurone mittels Doppel-Immunfluoreszenz



Zu den Abbildungen S.59:

Abbildung 19:

- A:** Ausschnitt aus einem Plättchen mit kultivierten Raphe-Neuronen für die Neuronenzählung; die serotonergen Neuronen sind grün fluoreszierend dargestellt;
B: Einzelnes serotonerges Neuron in 400-facher Vergrößerung.

Abbildung 20:

- A:** grün fluoreszierend gefärbtes serotonerges Neuron. Alle Fortsätze sind markiert, das Axon (Pfeil) ist nur anhand der fehlenden MAP-2 (siehe B) Färbung sicher zu identifizieren.
B: dasselbe Neuron in der rot fluoreszierenden MAP-2 Färbung. Während Soma und Dendriten deutlich markiert sind, ist das Axon (Pfeil) nur ansatzweise zu erkennen. Beachte, dass in der MAP-2 Färbung – entsprechend der Funktion von MAP-2 - auch nicht-serotonerge Neurone (oben rechts) erfasst werden.

Abbildung 21:

- A:** NFP-200, grün fluoreszierend, färbt als neuronaler Marker vor allem Soma und Axone (Pfeile);
B: In der MAP-2-Färbung sind im Gegensatz zur NFP-200 Färbung die Dendriten besser zu erkennen und die Axone nicht.

4.2.3 Effekte von BDNF auf hippocampale Neurone in Primärkultur

Serotonerge Neurone repräsentieren eine bestimmte Population innerhalb der Gesamtheit aller Nervenzellen. In Kapitel 4.2.2 wurde dargestellt, welche morphologischen Veränderungen diese Neurone nach der Behandlung mit trophischen Faktoren aufwiesen. Es stellte sich nun die Frage, ob sich diese morphologischen Veränderungen spezifisch an den serotonergen Neuronen zeigen oder ob alle Neurone in dieser Art und Weise auf BDNF bzw. S100 β reagieren. Für diesen Vergleich wurden Untersuchungen an hippocampalen Primärkulturen von Mäusen der NMRI-Linie vorgenommen. Die Neurone des Hippokampus boten sich hier zum einen wegen ihrer vielfältigen Anzahl unterschiedlicher Neuronenpopulationen, zum anderen wegen der lagebedingten guten Zugänglichkeit des Hippokampus, welche eine exakte Präparation und damit eine gute Reproduzierbarkeit erlaubte, an. Die Anlage der Kulturen erfolgte am Embryonaltag E16. Behandelt wurden die Zellen am 1. Tag *in vitro* jeweils mit BDNF, S100 β und der kombinierten Gabe BDNF + S100 β . Am 6. Tag *in vitro* wurden die Neuronen fixiert und mit Antikörper gegen MAP-2 (Dendritenmarker) und NFP-200 (Axonmarker) mittels Doppel-Immunfluoreszenz gefärbt (siehe **Abbildung 21**). Die Vermessung erfolgte an je 30 Neuronen/Bedingung und Versuch, wobei im Gegensatz zu den Raphekulturen nicht zwischen den einzelnen Neuronentypen unterschieden wurde. Der Vorteil war, dass dadurch ein breites Spektrum an funktionell unterschiedlichen Neuronen erfasst werden konnte, was jedoch Variabilität und damit hohe Standardabweichungen bedingte.

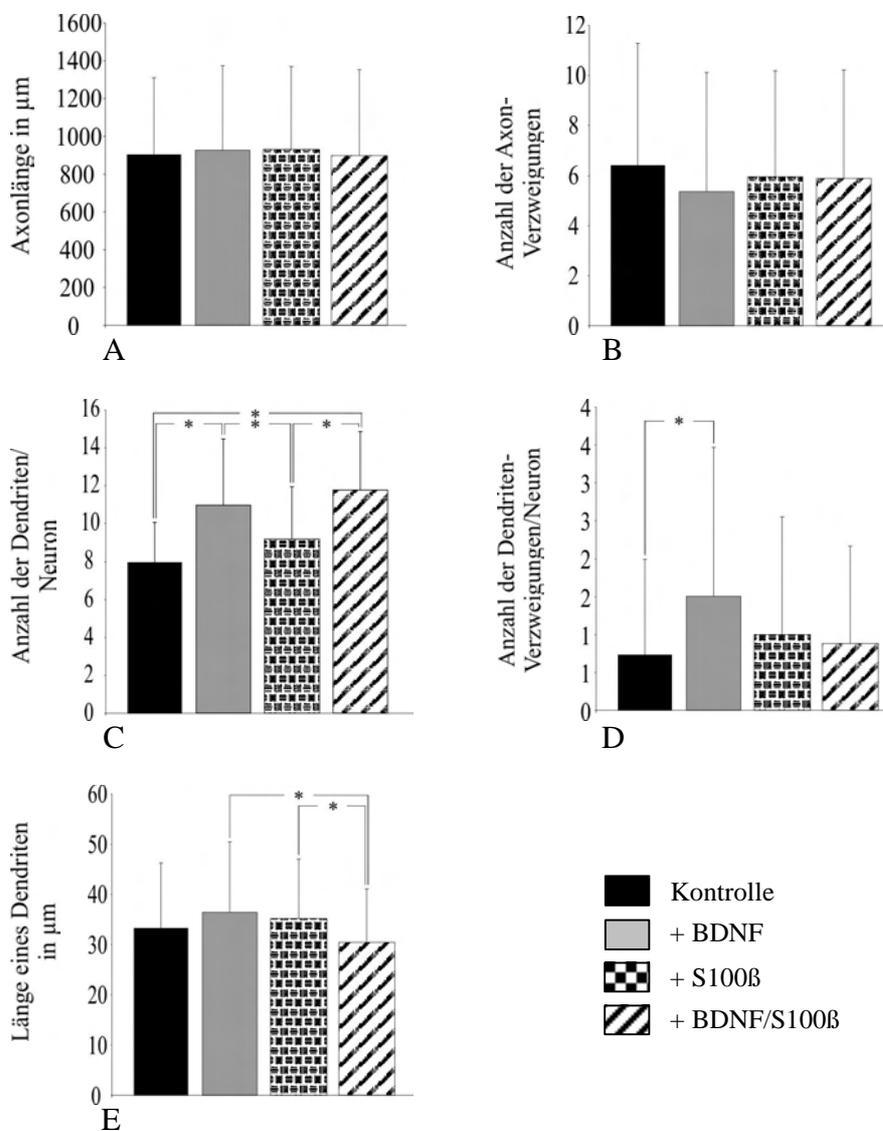
In **Abbildung 22** sind die errechneten Mittelwerte mit Standardabweichung der vermessenen Neurone grafisch dargestellt. Während sich axonal weder in der Länge noch in

der Anzahl der Verzweigungen Unterschiede zwischen den Gruppen zeigten, waren deutliche Effekte der zugegebenen Faktoren auf die Dendriten erkennbar.

So führte die Behandlung mit BDNF – unabhängig des Vorhandenseins von S100 β – zu einer höheren Anzahl der Dendriten/Neuron im Vergleich zur Kontrolle und zu S100 β -behandelten Neuronen. Auch zeigten die Neurone unter BDNF eine vermehrte dendritische Verzweigung, ein Effekt, der in der kombinierten Behandlung mit S100 β nicht vorhanden war. Die durchschnittliche Länge eines Dendriten wies in allen drei behandelten Gruppen keine nennenswerte Unterschiede zur Kontrolle auf. Der Vergleich jedoch untereinander erbrachte eine signifikante Reduktion der BDNF + S100 β behandelten Zellen gegenüber der alleinigen BDNF- und S100 β - Zugabe. Das heißt, dass weder BDNF noch S100 β die Länge der Dendriten beeinflussen, sich die kombinierte Gabe BDNF + S100 β jedoch eher hemmend auf das Dendritenwachstum auswirkt.

Abbildung 22:

Morphometrische Untersuchungen an kultivierten Hippokampus-Neuronen nach Behandlung mit BDNF, S100 β und BDNF+S100 β



Primärkulturen des Hippokampus vom Embryonaltag E16 wurden am 1. Tag in vitro behandelt und am 6. Tag fixiert. Die Darstellung der Dendriten und Axone erfolgte mit Antikörper gegen MAP-2 resp. NFP-200;

A: durchschnittliche Gesamtlänge des Axons / Neuron (Angabe in μm)

B: durchschnittliche Anzahl der Axonverzweigungen / Neuron

C: durchschnittliche Anzahl der Dendriten / Neuron

D: durchschnittliche Anzahl der Dendritenverzweigungen / Neuron

E: durchschnittliche Länge eines Dendriten (Angabe in μm)

Die Anzahl der Dendriten / Neuron war sowohl unter alleiniger BDNF-Behandlung als auch unter Zugabe von BDNF+S100 β signifikant gegenüber Kontrolle und S100 β -behandelten Zellen erhöht (C). Auch zeigte sich eine vergrößerte Anzahl der Dendritenverzweigungen unter BDNF-Behandlung gegenüber allen anderen Behandlungsgruppen (D). Die mittlere Länge eines Dendriten war bei den BDNF+S100 β behandelten Zellen signifikant gegenüber der alleinigen BDNF- und S100 β -Zugabe erhöht. Axonal zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen (A und B).

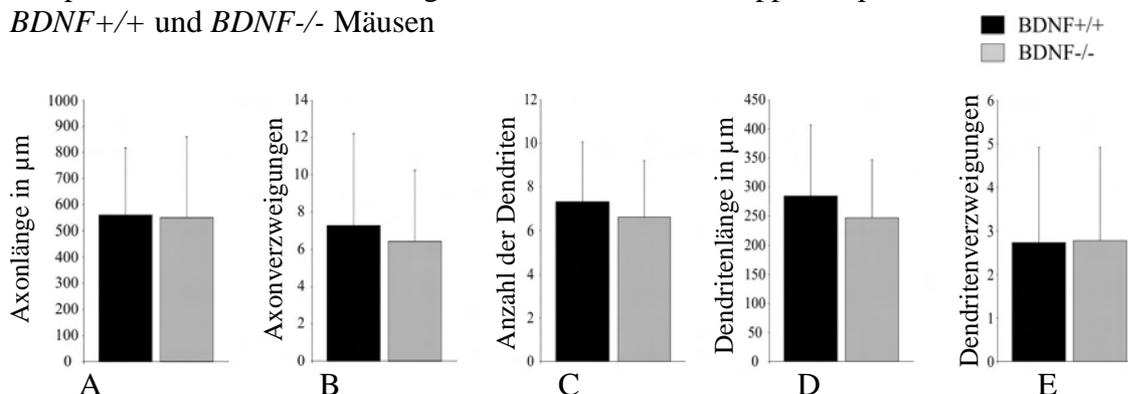
Mittelwerte \pm SD, n=60

4.2.4 Vergleich der Entwicklung hippocampaler Neurone von $BDNF^{+/+}$ und $BDNF^{-/-}$ Mäusen in Primärkulturen

Für die vorangegangenen Untersuchungen an hippocampalen Primärkulturen dienten die genetisch unveränderten NMRI-Mäuse, deren Neurone auf ein exogenes Agens in bestimmter Weise reagiert hatten. Interessant war es nun zu erfahren, wie sich die Neurone der $BDNF$ -gendifizienten Mäuse in Kultur verhalten würden. Hierzu erfolgte die individuelle Kultivierung der Hippokampi von Embryonen eines Muttertieres am Embryonaltag E18. Die individuelle Kultivierung war notwendig, da die Embryonen - aufgrund des höheren zeitlichen Aufwandes - erst nach der Anlage der Kulturen genotypisiert werden konnten. Bei der morphometrischen Analyse 6 Tage alter Kulturen zeigten sich weder in Hinsicht der axonalen noch der dendritischen Parameter Unterschiede zwischen $BDNF^{+/+}$ und $BDNF^{-/-}$ Mäusen (siehe **Abbildung 23a**), was auf eine normale Entwicklung der Neurone *in vivo* bis zum Entnahmenzeitpunkt und unter Kulturbedingungen schließen ließ.

Abbildung 23a:

Morphometrische Untersuchungen an kultivierten Hippokampus-Neuronen von $BDNF^{+/+}$ und $BDNF^{-/-}$ Mäusen



Hippokampale Neurone von $BDNF^{-/-}$ Mäusen zeigen eine normale Entwicklung unter Kulturbedingungen. Zellvermessung von Hippokampuskulturen vom Embryonaltag E18 der $BDNF^{+/+}$ und $BDNF^{-/-}$ Genotypen. Da zum Zeitpunkt der Gehirnentnahme der Genotyp noch nicht bekannt war, musste jedes Gehirn individuell aufgearbeitet und kultiviert werden. Die Zellen wurden am 6. Tag *in vitro* fixiert, mit MAP-2 (Dendritenmarker) und NFP 200 (Axonmarker) gefärbt und anschließend - bei zufälliger Auswahl der Neurone - vermessen. Mittelwerte \pm SD, n=30

A: mittlere Länge eines Axons (Angabe in μm);

B: Anzahl der Axonverzweigungen/Neuron;

C: Anzahl der Dendriten/Neuron;

D: Länge der Dendriten/Neuron (Angabe in μm);

E: Anzahl der Dendritenverzweigungen;

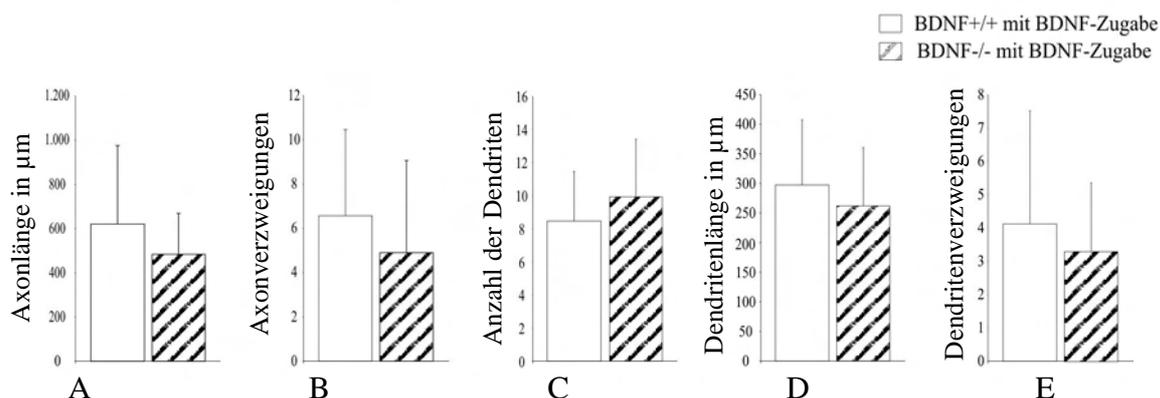
In einer weiteren Untersuchung erfolgte die Zugabe von BDNF, um festzustellen, in wieweit die hippocampalen Neurone der $BDNF^{-/-}$ Mäuse auf exogenes BDNF reagieren würden. Die

Zugabe von BDNF erfolgte wie üblich am 1. Tag *in vitro*, die Fixierung und immunhistochemische Färbung der Dendriten (MAP-2) und Axone (NFP 200) am 6. Tag in Kultur. Nach den Befunden der Neuronenvermessung ohne Behandlung überraschte es nicht, dass sich die Zellen beider Genotypen unter BDNF-Zugabe morphometrisch ähnlich verhielten (siehe **Abbildung 23b**).

Auch der Vergleich zwischen $BDNF^{+/+}$ bzw. $BDNF^{-/-}$ jeweils mit und ohne BDNF-Supplementierung zeigte hinsichtlich der vermessenen Parameter keine Unterschiede, was im Gegensatz zu den Ergebnissen der entsprechenden Untersuchungen der NMRI-Zelllinie stand und sich nur mit dem unterschiedlichen Alter der Gehirne bei Kultivierungsbeginn erklären lässt.

Abbildung 23b:

Morphometrische Untersuchungen kultivierter Hippokampus-Neurone von $BDNF^{+/+}$ und $BDNF^{-/-}$ Mäusen unter Zugabe von BDNF



Die Zugabe von exogenen BDNF zu Hippokampuskulturen der $BDNF^{-/-}$ Mäuse führte zu keinen veränderten morphometrischen Eigenschaften der Neurone im Vergleich zu Neuronen der $BDNF^{+/+}$ Kulturen, Mittelwerte \pm SD, n=30

A: mittlere Länge des Axons (Angabe in μm);

B: Anzahl der Axonverzweigungen/Neuron;

C: Anzahl der Dendriten/Neuron;

D: Länge der Dendriten/Neuron (Angabe in μm);

E: Anzahl der Dendritenverzweigungen;

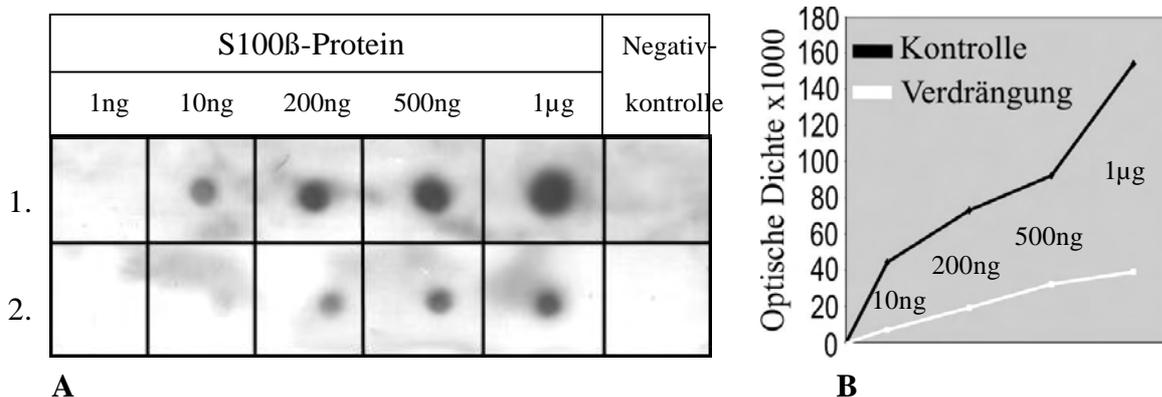
4.3 Einfluss von BDNF auf die Synthese und Freisetzung von S100 β

Es gilt als gesichert, dass S100 β im Gehirn vorwiegend von Astrozyten synthetisiert wird und in den Extrazellulärraum abgegeben wird. Der genaue Mechanismus dieser Freisetzung aus der Zelle und die Wirkungsweise von S100 β am Neuron ist jedoch noch unklar. Vermutet wird, dass BDNF eine Rolle bei der Induktion und/oder Freisetzung von S100 β spielt [Nishi et al., 1996].

4.3.1 Nachweis der Spezifität des Antikörpers gegen S100 β

Vor dem Beginn der Untersuchungen zu S100 β erfolgte die Überprüfung der Spezifität des Antikörpers. Hierfür wurde S100 β -Protein in verschiedenen Konzentrationen in Doppelbestimmung auf eine Nitrozellulosemembran im Auftropfverfahren aufgebracht. Die Inkubation erfolgte mit dem Antikörper gegen S100 β in einer Verdünnung von 1:10000, welcher vorher 6 Stunden bei Raumtemperatur mit 50 μ g/ml S100 β Protein vorinkubiert worden war (Peptidverdrängung). Zur Kontrolle erfolgte die Detektion von S100 β mit dem Antikörper in der angegebenen Verdünnung. Die **Abbildung 24** zeigt die Immundetektion mit Quantifizierung. Es war eine deutliche Verdrängung des Antikörpers vom Peptid vorhanden, was den Nachweis der Spezifität des Antikörpers erbrachte.

Abbildung 24: Nachweis der Spezifität des Antikörpers gegen S100 β



A: 1.: Kontrolle: Die Konzentrationsreihe des S100 β -Proteins wurde mit Antikörper gegen S100 β (Verdünnung 1:10000) detektiert.

2.: Verdrängung: Die Detektion des aufgetragenen S100 β -Proteins erfolgte mit peptidverdrängtem Antikörper

In den Reihen 1. und 2. waren jeweils die gleichen Proteinkonzentrationen in gleichen Volumina an S100 β aufgetragen worden. Bei einer Konzentration von 1 ng konnte S100 β noch nicht detektiert werden. Während bei 10 ng eine deutliche Immunreaktion in der Kontrolle sichtbar wurde, war sie bei der Verdrängung kaum wahrnehmbar. Auch in den folgenden höheren Konzentrationen war die Reihe 2 deutlich weniger immunreaktiv. Als Negativkontrolle diente 5 μ g Rinderserum-Albumin.

B: Die quantitative Erfassung der optischen Dichte zeigte eine Verdrängung durch das Peptid um bis zu 75% (bei der Konzentration von 1 μ g).

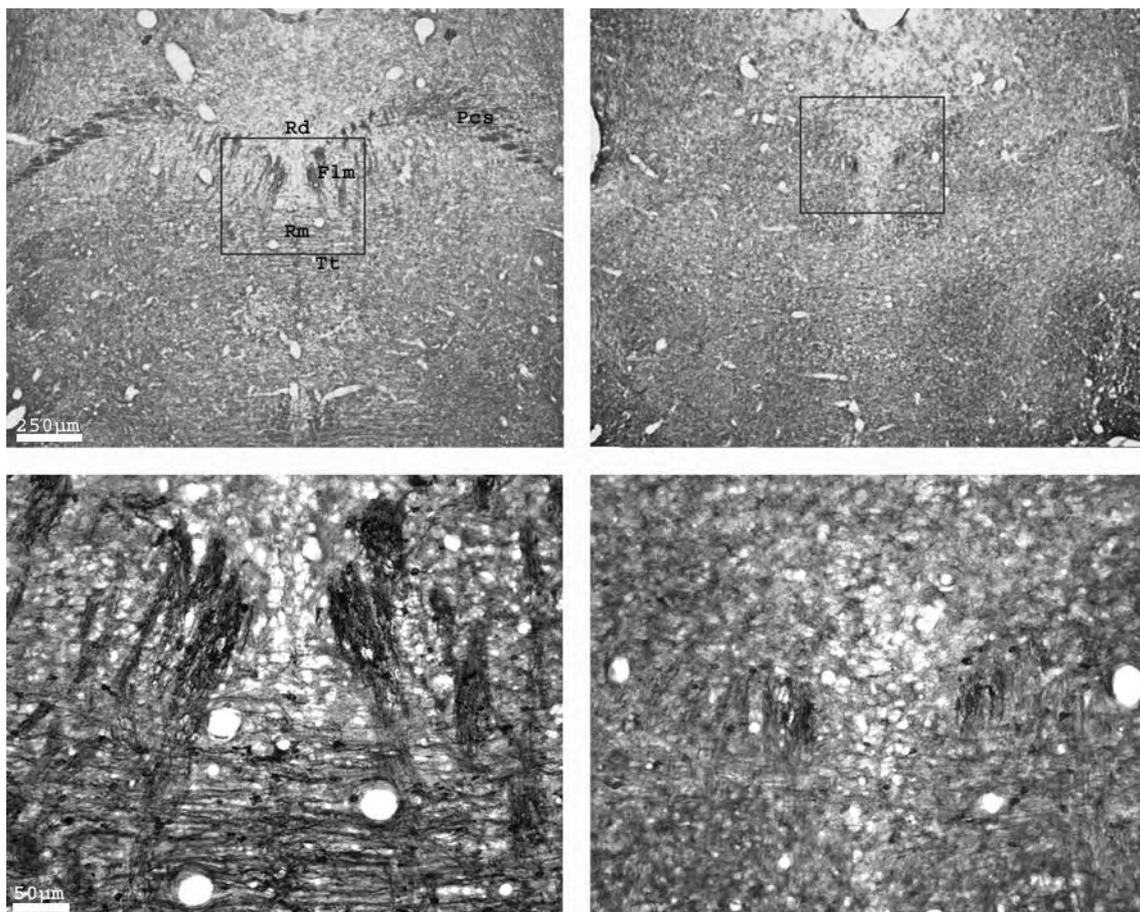
4.3.2 Immunhistochemischer Nachweis von S100 β in *BDNF*^{+/+} und *BDNF*^{-/-} Mäusen

Wenn BDNF die Synthese von S100 β in den Gliazellen fördert, müsste in den *BDNF*^{-/-} Mäusen der Gehalt an S100 β vermindert sein. Um diesen Nachweis zu führen, wurde S100 β (Antikörperverdünnung 1:2000) an Schnitten durch das Gesamthirn 16 Tage alter *BDNF*^{-/-} und *BDNF*^{+/+} Mäuse immunhistochemisch dargestellt. Dabei zeigte sich eine deutlich reduzierte Immunreaktion bei den *BDNF*^{-/-} Mäusen im Bereich der Raphe nuclei (siehe **Abbildung 25**), während in anderen Regionen keine Unterschiede zu den *BDNF*^{+/+} Mäusen zu finden waren. Das zeigte, dass das BDNF nicht in allen Regionen des Gehirnes die gleiche Wirkung auf die S100 β -Synthese zu haben scheint.

Aus der Immunhistochemie ging jedoch nicht hervor, ob die Anzahl der S100 β -exprimierenden Astrozyten oder nur S100 β bei gleichgebliebener Anzahl der Astrozyten vermindert war. Aus diesem Grund wurde eine weitere immunhistochemische Darstellung der Astrozyten mit einem Antikörper gegen das gliale fibrilläre saure Protein (*glial fibrillary acidic protein*, GFAP) in einer Verdünnung von 1:1000 durchgeführt. In der Raphe-Region war weder in den *BDNF*^{+/+} noch in den *BDNF*^{-/-} Mäusen eine nennenswerte Anzahl immunpositiver Zellen zu finden. In anderen Regionen wie z.B. im Hippokampus und im Cerebellum hingegen waren reichlich positive Zellen vorhanden, erwartungsgemäß ohne Unterschiede zwischen den Genotypen. GFAP wird nicht von allen Astrozyten exprimiert; demnach zählt der Hirnstamm - mit Ausnahme des Kleinhirns - zu den Regionen mit GFAP-armen Astrozyten. Da bisher kein anderer Marker bekannt ist, der ohne Ausnahme alle Astrozyten färbt, blieb die Frage offen, ob es sich um eine Astrozytenverminderung oder um eine verminderte S100 β -Expression handelte.

Abbildung 25:

Immunhistochemische Darstellung von S100 β in der Raphe nuclei von *BDNF*^{+/+} und *BDNF*^{-/-} Mäusen



Frontalschnitte von *BDNF*^{+/+} (links) und *BDNF*^{-/-} Mäusen (rechts) in Höhe der Raphe nuclei und Pedunculi cerebellares wurden mit einem monoklonalen Antikörper gegen S100 β gefärbt. Es eine deutliche Reduktion der die Fasertraktus begleitenden S100 β -immunpositiven Astrozyten in den *BDNF*^{-/-} Mäusen in diesen Regionen erkennbar.

Flm: Fasciculus longitudinalis medialis, **Rd:** Raphe dorsalis, **Rm:** Raphe medianus, **Tt:** Tectospinaltrakt, **Pcs:** Pedunculus cerebellaris superior

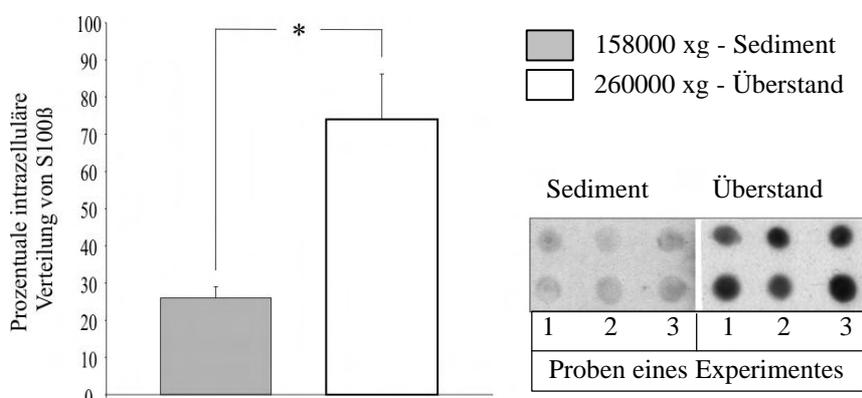
4.3.3 Intrazelluläre Verteilung von S100 β

Bevor der Einfluss von BDNF auf Synthese und Freisetzung von S100 β untersucht wurde, sollte zuerst der Frage nachgegangen werden, in welchem intrazellulären Kompartiment S100 β bis zu seiner Freisetzung gespeichert ist.

Mit Hilfe der glialen Zelllinie C6 erfolgte nach 10–14 tägiger Kultivierung die Aufarbeitung der Zellen in subzelluläre Fraktionen. Diese unterteilten sich in das *158000 xg - Sediment*, welches sich vorwiegend aus Zellkernen und größeren Zellkompartimenten und –organellen (Plasmamembran, Golgi-Apparat, Endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien, sekretorische Vesikel u.a.) zusammensetzte. Der dazugehörige Überstand bestand aus dem Zytosol mit den darin gelösten Proteinen und kleineren Zellkompartimenten (z.B. Lysosomen). Dieser Überstand wurde weiter in ein *260000 xg -Sediment* mit kleineren Zellkompartimenten und einen *260000 xg -Überstand* – bestehend aus Zytosol und zytosolischen Proteinen – unterteilt. Während die *158000 xg* – und *260000 xg -Sedimente* resuspendiert und anschließend in der Auftropftechnik direkt auf Nitrozellulosemembran übertragen wurden (siehe Kapitel 3.7.5), erfolgte aus dem *260000 xg -Überstand* zur Proteinkonzentration von S100 β eine Immunpräzipitation. Von dieser wurde des entstandene Sediment nach der Resuspension ebenfalls auf die Membran übertragen. Nach erfolgter Immundetektion von S100 β wurden die optische Dichte – ähnlich wie im Kapitel 4.3.2 – bestimmt und ausgewertet. Damit die detektierten Immunreaktivitäten quantitativ vergleichbar waren, wurden jeweils gleiche Mengen sowohl hinsichtlich das Resuspensionsvolumens als auch bezüglich des Auftragevolumens auf die Membran verwendet.

Das *158000 xg - Sediment* war gegenüber dem *260000 xg -Überstand* deutlich schwächer gefärbt (siehe **Abbildung 26**), während das *260000 xg -Sediment* keine immunpositive Reaktion zeigte. Demnach war davon auszugehen, dass der intrazelluläre Gehalt an S100 β sich überwiegend auf *158000 xg - Sediment* und *260000 xg -Überstand* verteilte und dass S100 β vor allem zytosolisch vorliegt.

Die Messung der optischen Dichte und Bestimmung des prozentualen Anteils erfolgte aus 3 verschiedenen Kultivierungen und jeweils 3 Proben / Kultivierung.

Abbildung 26:Intrazelluläre Verteilung von S100 β in C6-Zelllinien

C6-Zellen wurden nach 10-14 Tagen Wachstum in Kultur geerntet und subfraktioniert. Hierzu erfolgte nach der mechanischen Zellyse unter Schutz von Proteinase-Inhibitoren die Zentrifugation zum 158000 xg -Sediment. Der Überstand wurde weiter zentrifugiert zum 260000 xg -Sediment und 260000 xg - Überstand, der die zytosolischen Proteine enthält. Nach direkter Übertragung der Proben auf eine Nitrozellulosemembran in Doppelbestimmung erfolgte die Immundetektion von S100 β . Da das 260000 xg -Sediment keine Immunreaktion zeigte (nicht gezeigt), wurde nach Quantifizierung der Stärke der Immunreaktivität von 158000 xg - Sediment und 260000 xg - Überstand der prozentuale Anteil bestimmt. Aus 3 verschiedenen Kulturansätzen mit je 3 Proben (1, 2 und 3) ergab sich eine intrazelluläre Verteilung von S100 β von 74 % in der zytosolischen Fraktion und 26 % im 158000 xg - Sediment. Mittelwerte \pm SD, $p=6,8 \times 10^{-8}$

4.3.4 Einfluss von BDNF auf den Gehalt von S100 β

Es folgten Experimente an C6-Zelllinien und primären Gliakulturen in Hinsicht auf die Wirkung von exogenem BDNF auf den Gehalt von S100 β . BDNF vermittelt seine Effekte hauptsächlich über seinen Rezeptor Tyrosinkinase B (trkB), der auch auf Astrozyten vorkommt [Nishi et al., 1996].

Während die Untersuchungen an primären Gliakulturen stets einheitlich nach der im Kapitel 3.6. beschriebenen Art und Weise erfolgten, wurden für die Experimente an C6-Zellen verschiedene Versuchsansätze gewählt:

1. C6-Kulturen wurden am Tag nach dem Umsetzen (siehe Kapitel 3.2.6) unter serumfreien Bedingungen unter einmaliger Zugabe von BDNF gehalten. Nach konfluentem Wachstum (ca. 10-14 Tage) erfolgte die Subfraktionierung der Zellen. Das Medium wurde vorher entfernt und hochtourig zum Entfernen des Zelldetritus abzentrifugiert. Nach genauer Bestimmung des Volumens erfolgte die Immunpräzipitation mit S100 β mit prozentual gleichen Volumina der verschiedenen Proben.

2. C6-Kulturen wurden nach dem Umsetzen weiter in serumhaltigen Kulturmedium gehalten. Nach ausreichend dichtem Wachstum (Konfluenz) - bei Vorhandensein von Serum nach ca. 4-5 Tagen - , erfolgte der Wechsel zu serumfreien Medium bei gleichzeitiger Behandlung mit BDNF. Nach der 1., 2., 4. und 6. Stunde nach Behandlung wurden jeweils 200 µl des Mediums abgenommen und immunpräzipitiert. Nach 24 Stunden erfolgte die Subfraktionierung der Zellen, wobei das verbliebene Medium ebenfalls immunpräzipitiert wurde. Dieser Ansatz diente vor allem zur Untersuchung, ob BDNF kurz- oder langfristige Effekte auf die Freisetzung von S100β in das Medium ausübt.
3. C6-Kulturen wurden am Tag nach dem Umsetzen unter serumfreien Bedingungen unter Zugabe von BDNF gehalten. Nach konfluentem Wachstum erfolgte eine weitere BDNF-Substitution mit anschließender Subfraktionierung der Zellen 4 Stunden nach der Behandlung.

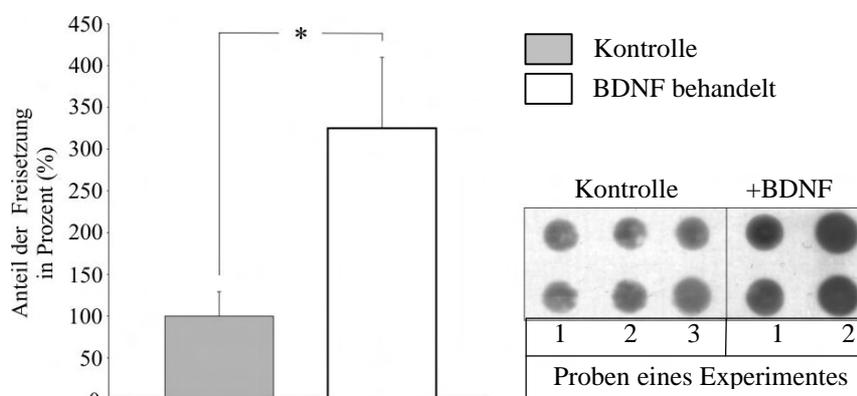
Nach der subfraktionierten Aufarbeitung der Zellen zeigte sich bei den primären Gliakulturen, dass die Immunreaktion von S100β in der zytosolischen Fraktion (*Überstand 2*) sich unter dem Einfluss von BDNF deutlich erhöhte (auf 324 % im Vergleich zur Kontrolle; siehe **Abbildung 27a**). Diese Erhöhung war bei den C6-Zellen nicht vorhanden.

Untersuchungen des Mediums auf seinen S100β-Gehalt zeigten, dass es sowohl von den C6-Zellen als auch von den primären Gliazellen freigesetzt wurde. Detaillierte Studien zur Wirkung von BDNF auf die Freisetzung von S100β wurden an C6-Zellen durchgeführt (siehe die verschiedenen Versuchsansätze). Trotz unterschiedlicher Stimulationsversuche - Kurz- und Langzeitstimulation, 1- oder 2-malige BDNF-Substitution in verschiedenen Zeitabständen – war keine vermehrte Freisetzung zu erreichen (siehe **Abbildung 27b**).

Auch die primären Gliazellen, die unter BDNF vermehrt S100β synthetisierten, wiesen keine verstärkte Immunreaktivität im Medium nach Immunpräzipitation auf (Daten nicht gezeigt).

Abbildung 27a:

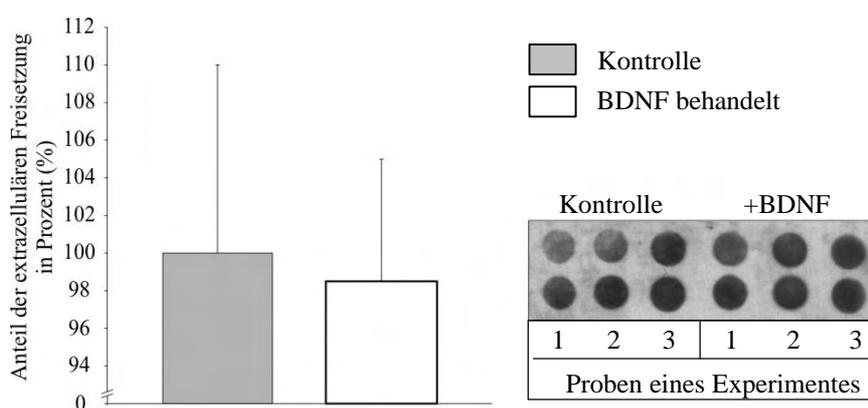
Erhöhung des zytosolischen S100 β -Gehaltes durch BDNF in primären Gliakulturen



Primäre Gliakulturen wurden nach Entfernen der Mikroglia mit BDNF behandelt, nach konfluentem Wachstum (ca. 4-6 Tage) geerntet und subzellulär aufgearbeitet. Während in allen anderen Fraktionen kein Unterschied zwischen der BDNF-behandelten und der Kontrollgruppe vorlag, zeigte die Immunpräzipitation des 260000 xg – Überstandes eine deutliche Erhöhung nach BDNF-Behandlung. Der Probenauftrag erfolgte wieder als Doppelbestimmung. Nach der Quantifizierung wurde der prozentuale Anteil der BDNF-behandelten Zellen zur Kontrolle bestimmt. Die grafische Darstellung zeigt eine Erhöhung um mehr als das Dreifache ($p < 0,05$). In Zellen der C6-Zelllinie konnte diese Stimulation durch BDNF nicht hervorgerufen werden. n=5 aus 2 Experimenten

Abbildung 27b:

Freisetzung von S100 β aus der Zelle lässt sich durch BDNF nicht stimulieren



Immunpräzipitation des Mediums behandelter Kulturen der C6-Zelllinie. Während gezeigt werden konnte, dass S100 β im Medium kultivierter Zellen vorhanden ist – also aus den Zellen freigesetzt wird – führte weder eine kurzzeitige (wenige Stunden) noch eine längere (bis zu 14 Tagen) BDNF-Behandlung zu einer erhöhten Freisetzung von S100 β . Die Proben wurden wieder jeweils doppelt aufgetragen. Die Quantifizierung erfolgte jeweils aus 3 verschiedenen Kulturansätzen mit je 3 Proben pro Bedingung. Die grafische Auswertung erfolgte in Prozent zur Kontrolle. Die Zellen der primären Gliakulturen reagierten ähnlich mit einer unveränderten S100 β -Freisetzung (Daten nicht gezeigt).

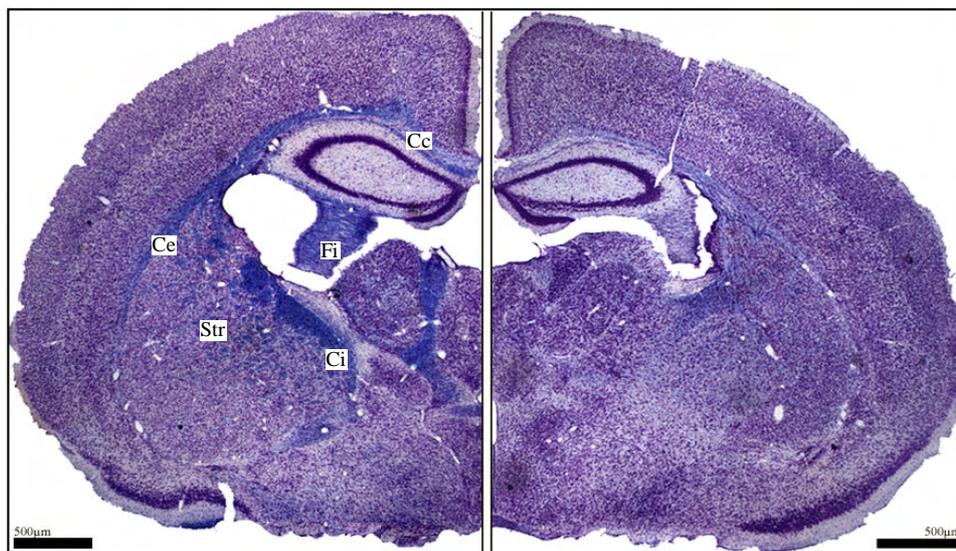
4.4 Untersuchungen des Myelingehtes im Gehirn von *BDNF*^{+/+} und *BDNF*^{-/-} Mäusen

Die Myelinscheide wird im Zentralnervensystem von den Oligodendrozyten gebildet und ist essentiell für eine schnelle und effektive Weiterleitung von Aktionspotentialen innerhalb des Axons (saltatorische Erregungsleitung). Während Lipide den Hauptbestandteil der Myelinscheide bilden, werden zur Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität Proteine benötigt. Zu den wichtigsten Proteinen des Myelins gehören Myelin Basic Protein und Proteolipidprotein. Die Information beider Proteine wird durch jeweils ein Gen verschlüsselt, aus dem durch alternatives Spleißen verschiedene Protein-Isoformen entstehen. Mutationen an Genen für die Expression von Proteinen, die am Aufbau der Myelinscheide beteiligt sind, führen zu verschiedenen demyelinisierenden Neuropathien.

4.4.1 Myelinscheidenfärbung nach Klüver-Barrera

Untersuchungen an *BDNF*^{-/-} Mäusen zeigten eine verringerte Myelinisierung des Nervus opticus [Cellerino et al., 1997] und damit auch, dass *BDNF* bei der Myelinisierung eine Rolle zu spielen scheint. Um zu prüfen, ob sich dieser Befund nur auf einzelne Axone bezieht oder generalisiert auftritt, wurden für eine erste Übersicht Frontalschnitte in Höhe des Hippokampus nach Klüver-Barrera – einer histologischen Myelinscheidenfärbung zur Anfärbung von Neurokeratin, einem Lipoprotein - gefärbt. Schon bei dieser wenig sensitiven Methode wurde eine starke Verringerung des blau gefärbten Myelins bei den *BDNF*^{-/-} Mäusen vor allen in den Regionen mit hoher Faserdichte deutlich (siehe **Abbildung 28**).

Abbildung 28: Klüver-Barrera-Färbung im Hippokampus von *BDNF*^{+/+} und *BDNF*^{-/-} Mäusen



Klüver-Barrera-Färbung, eine spezifische histologische Färbung, färbt mit Luxol-Fast-Blau das Myelin blau. In der Gegenfärbung wurden die Zellkerne mit Kresylviolett dargestellt. Es war deutlich eine reduzierte Färbung der myelinisierten Axone bei den *BDNF*^{-/-}-Mäusen erkennbar (s. besonders Corpus callosum (**Cc**), Capsulae interna et externa (**Ce** et **Ci**), Fimbria (**Fi**) sowie Striatum (**Str**)).

4.4.2 Myelin Basic Protein

Für eine im Vergleich zur Klüver-Barrera-Färbung differenziertere Untersuchung erfolgte die Immundetektion mit einem Antikörper gegen Myelin Basic Protein (MBP) in einer Verdünnung von 1:2000 für die Immunhistochemie und 1:4000 für die Immunoreplikalanalyse.

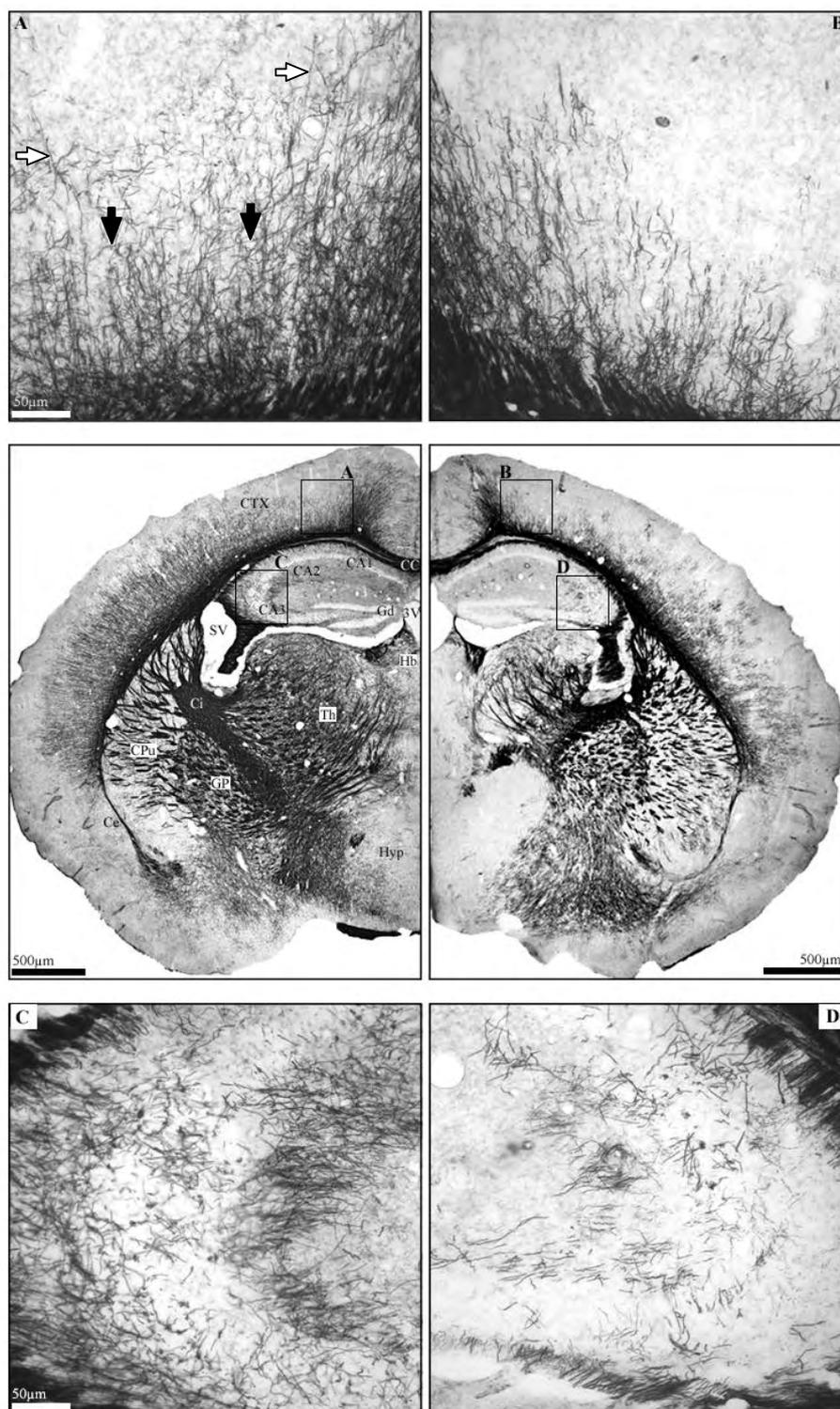
Der Vergleich der Schnitte von *BDNF*^{+/+} und *BDNF*^{-/-} Mäusen in Höhe des Hippokampus zeigte eine starke Reduktion der immunpositiven Fasern bei den *BDNF*^{-/-} Mäusen, welche schon in der Übersicht erkennbar war (siehe **Abbildung 29**, Mitte). Besonders auffällig zeigten sich die Unterschiede in Kortex und Hippokampus. Die Ausschnittsvergrößerung des Kortex (siehe **Abbildung 29**, A und B) verdeutlicht, dass die myelinisierten Fasern in Anzahl und Länge bei den *BDNF*^{-/-} Mäusen vermindert (weiße Pfeile) und myelinisierte Querfasern so gut wie nicht zu finden waren (schwarze Pfeile). Ebenso sind in der vergrößerten Ansicht der CA3-Region des Hippokampus drastische Myelinreduktionen erkennbar.

Für die Quantifizierung der Myelinreduktion wurde Myelin Basic Protein mittels Immunoreplika vom postnukleären Überstandes der Hirnhomogenate beider Genotypen analysiert. Um eine Bezugsgröße für die Quantifizierung zu definieren, wurde Synaptobrevin (Antikörperverdünnung 1:10000) bei einem Molekulargewicht von 18 kDa in den gleichen Proben nachgewiesen. Von diesem synaptischen Protein war bekannt, dass es keine Unterschiede zwischen *BDNF*^{+/+} und *BDNF*^{-/-} Mäusen gab. Die Quantifizierung erfolgte aus Immunoreplika-Analysen von insgesamt 3 verschiedenen Hirnhomogenaten/Genotyp 16 Tage alter Mäuse und 3 Immunoreplika-Analysen jedes Hirnhomogenates.

Aufgrund unterschiedlich aufgetragener Proteinkonzentrationen war eine deutliche Abstufung der Schwärzung bei dem immundetektierten Synaptobrevin, aber keine Unterschiede zwischen *BDNF*^{+/+} und *BDNF*^{-/-} zu finden. Demgegenüber war Myelin Basic Protein (27 kDa) bei 5 µg Protein der *BDNF*^{-/-} Mäuse so gut wie nicht detektierbar und bei 15 und 30 µg stark vermindert im Vergleich zu *BDNF*^{+/+} (siehe **Abbildung 30a**). Nach der Bestimmung der optische Dichte mittels TINA-Software (Version 2.09g) wurden die erhaltenen Werte von Myelin Basic Protein zu denen von Synaptobrevin in Relation gesetzt und in einer Sättigungskurve dargestellt (siehe **Abbildung 30b**). Dabei zeigte sich ein deutlich geringerer Anstieg der Kurve bei den *BDNF*^{-/-} Mäusen. Bei einer Proteinkonzentration von 30 µg - etwa bei Erreichen der Sättigung - betrug der Wert nur ca. die Hälfte des Wertes der *BDNF*^{+/+} Mäuse.

Abbildung 29:

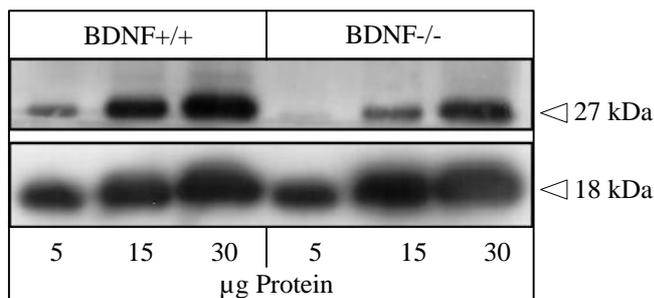
Immunhistochemische Darstellung von Myelin Basic Protein im Hippokampus von *BDNF*^{+/+} und *BDNF*^{-/-} Mäusen



Immunhistochemische Darstellung von Myelin Basic Protein (MBP). Frontalschnitte von *BDNF*^{+/+} (links) und *BDNF*^{-/-} (rechts) Mäusen in Höhe des Hippokampus wurden miteinander verglichen. Es zeigte sich eine deutlich schwächere Immunreaktivität bei den *BDNF*^{-/-} Mäusen, was auf einen reduzierten Anteil der myelinisierten Fasern hinwies. *CA*: Corpus ammonis; *CC*: Corpus callosum; *CTX*: NeoKortex; *Ce*: Capsula externa; *Ci*: Capsula interna; *CPu*: Caudataputamen; *Fi*: Fimbria; *Gd*: Gyrus dendatus; *GP*: Globus pallidus; *Hyp*: Hypothalamus; *SV*: Seitenventrikel; *Th*: Thalamus; *3V*: dritter Ventrikel

Abbildung 30a:

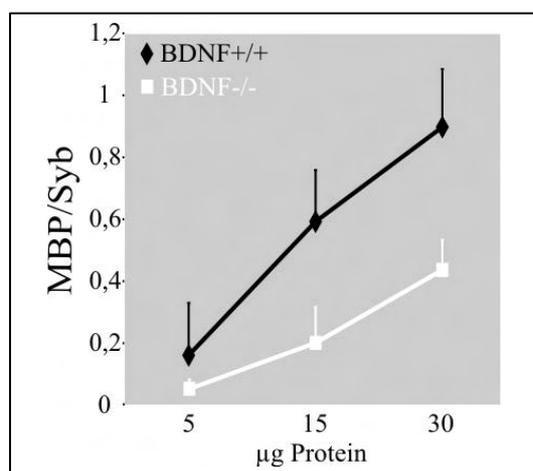
Immunoreplika-Analyse von Myelin Basic Protein in *BDNF*^{+/+} und *BDNF*^{-/-} Mäusen



Die Immundetektion von Myelin Basic Protein (27 kDa) und Synaptobrevin (18 kDa) unterschiedlicher Proteinkonzentration zeigte bei allen getesteten Proben vom Gesamthirn unveränderte Gehalte an Synaptobrevin – weshalb dieses auch als Referenzprotein diente – und eine deutliche Verminderung des Gehaltes an Myelin Basic Protein in den *BDNF*^{-/-} Mäusen.

Abbildung 30b:

Verhältnis zwischen Synaptobrevin und Myelin Basic Protein im Hirnhomogenat von *BDNF*^{+/+} und *BDNF*^{-/-} Mäusen



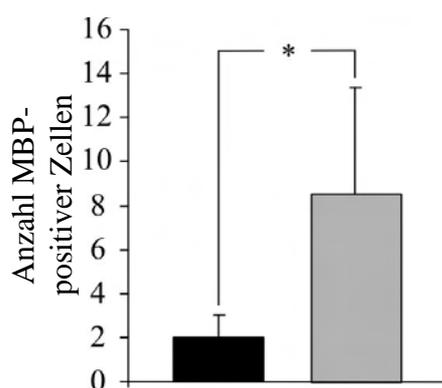
Mit einer speziellen Software (TINA) wurde von den belichteten Filmen die optische Dichte bestimmt und die Werte von Myelin Basic Protein und Synaptobrevin zueinander ins Verhältnis gesetzt. Aus diesen berechneten Werten wurde anhand der einzelnen Proteinkonzentrationen eine Sättigungskurve erstellt. Die Kurve von *BDNF*^{-/-} verläuft insgesamt deutlich flacher als die der *BDNF*^{+/+}. Die Sättigung von Myelin wurde ca. bei 30 µg Protein erreicht, an dieser Stelle betrug die optische Dichte bei den *BDNF*^{-/-} nur etwa die Hälfte des Wertes der *BDNF*^{+/+}. In der Grafik sind die Werte von jeweils 3 verschiedenen Gehirnen jedes Genotypes und 3 Immunoreplika-Analysen jedes einzelnen Gehirnes dargestellt.

In einem ersten Experiment zur Untersuchung der Rolle von BDNF bei der Myelinisierung *in vitro* wurden in Ergänzung der *in-vivo*-Untersuchungen primäre Hippokampus-Kulturen mit BDNF behandelt. Am 26. Tag *in vitro* wurden die Oligodendrozyten nach dem Fixieren mit dem Antikörper gegen Myelin Basic Protein (Verdünnung 1:5000) dargestellt. Die lange Kultivierungsdauer war nötig, da die Proliferation und Differenzierung der Oligodendrozyten zu Myelinbildnern in Kultur relativ langsam erfolgt, da im serumfreien Medium der neuronalen Kulturen die Proliferation der Gliazellen anfangs gehemmt wird.

Die Auszählung der gefärbten Zellen ergab einen signifikanten Anstieg der Oligodendrozyten unter BDNF-Behandlung (siehe **Abbildung 31**). Dieses Ergebnis korreliert mit dem *in-vivo*-Befund der BDNF-gendefizienten Mäuse und weist auf eine Rolle von BDNF bei der Myelinisierung im zentralen Nervensystem hin.

Abbildung 31

Quantifizierung der Oligodendrozyten in Primärkulturen des Hippokampus



Primäre Hippokampuskulturen wurden nach 26 Tagen Kultivierung und Behandlung mit BDNF (10 ng/ml an jeden 4. Tag) mit einem Antikörper gegen Myelin Basic Protein gefärbt. Die Auszählung der Zellen erfolgte von einer definierten Fläche von jeweils 3 Plättchen der BDNF-behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle.

Unter BDNF-Behandlung nahm die Anzahl der MBP-positiven Zellen deutlich zu ($p = 9,0 \times 10^{-6}$). Mittelwerte \pm SD; $n=3$