

4 ERGEBNISSE

4.1 *Vergleich serotonerger und catecholaminerger Neurone an BDNF^{+/+} und BDNF^{-/-} Mäusen in vivo*

Untersuchungen an Raphe-Zellkulturen der Ratte [Galter und Unsicker, 1999] zeigten einen fördernden Effekt von BDNF auf die Entwicklung serotonerger Neurone. Um die Wirkungen von BDNF *in vivo* näher klassifizieren zu können, wurde ein BDNF gendefizienter Mausstamm entwickelt [Ernfors et al., 1994a].

Mithilfe dieser Mäuse wurden die Auswirkungen von fehlendem endogenem BDNF hinsichtlich bestimmter Neuronenpopulationen untersucht. Dazu erfolgte der Vergleich von *BDNF^{+/+}* und *BDNF^{-/-}* Mäusen bezüglich serotonerger und anderer monoaminerger Neurone.

4.1.1 HPLC-Messung der Monoaminspiegel

Mittels HPLC wurden die monoaminergen Neurotransmitter Serotonin, Dopamin und Noradrenalin sowie 5-Hydroxyindolessigsäure - der Hauptmetabolit von Serotonin - bestimmt. Serotonin wird durch die mitochondriale Monoaminoxidase A in 5-Hydroxyindolacetaldehyd oxidiert, welches anschließend entweder durch eine Aldehyddehydrogenase in 5-Hydroxyindolessigsäure oder durch eine Alkoholdehydrogenase in 5-Hydroxy-tryptophol umgewandelt wird.

Die Bestimmung der Gehalte an Serotonin (5-HT), 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA), Dopamin (DA) und Noradrenalin (NA) erfolgte in verschiedenen Hirnregionen von 16 Tage alten Mäusen.

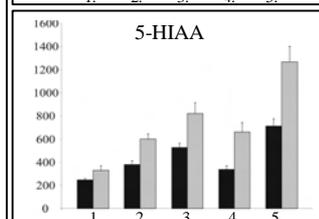
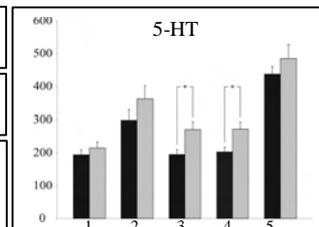
Während der Gehalt an Serotonin nur in Striatum und Hippokampus signifikant erhöht war ($p < 0,05$), wies 5-Hydroxyindolessigsäure in allen gemessenen Regionen höhere Werte auf (siehe **Tabelle 5**), was auf eine erhöhte Umsatzrate von Serotonin hindeutet.

Noradrenalin war bei den *BDNF^{-/-}* Mäusen in Bulbus olfactorius und Striatum im Vergleich zu den *BDNF^{+/+}* Mäusen ebenfalls erhöht ($p < 0,001$), während in den übrigen Regionen keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen zu finden waren. Der Gehalt von Dopamin war in den *BDNF^{-/-}* Mäusen in allen gemessenen Regionen unverändert zu den *BDNF^{+/+}* (siehe **Tabelle 6**).

Tabelle 5:

Serotonin- und 5-Hydroxyindolessigsäuregehalte in verschiedenen Hirnregionen

	5-HT		5-HIAA	
	<i>BDNF</i> ^{+/+}	<i>BDNF</i> ^{-/-}	<i>BDNF</i> ^{+/+}	<i>BDNF</i> ^{-/-}
1. Bulbus olfact.	194 ± 15	215 ± 18	247 ± 13	330 ± 38 ^a
2. Frontalcortex	299 ± 31	363 ± 40	380 ± 34	601 ± 44 ^a
3. Striatum	195 ± 15	271 ± 23 ^c	528 ± 37	821 ± 94 ^b
4. Hippocampus	203 ± 14	272 ± 21 ^a	338 ± 31	661 ± 82 ^b
5. Hypothalamus	438 ± 23	486 ± 43	713 ± 62	1268 ± 134 ^b



HPLC-Messungen des Serotoningehaltes (5-HT) von Gehirnen 16 Tage alter Mäuse zeigten einen leichten Anstieg bei den *BDNF*^{-/-} Mäusen in allen gemessenen Hirnregionen, signifikant war der Unterschied in Striatum und Hippocampus. Der Hauptmetabolit von Serotonin 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA) war in allen Regionen signifikant erhöht.

n=12 bzw. n=6 bei Frontalcortex; Mittelwerte in pg/mg Gewebe ± Standard Error of Mean (SEM); * p < 0,05

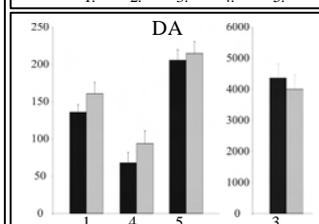
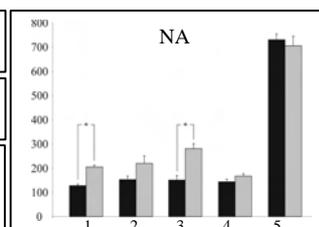
■ *BDNF*^{+/+}

■ *BDNF*^{-/-}

Tabelle 6:

Noradrenalin- und Dopamingehalte in verschiedenen Hirnregionen

	NA		DA	
	<i>BDNF</i> ^{+/+}	<i>BDNF</i> ^{-/-}	<i>BDNF</i> ^{+/+}	<i>BDNF</i> ^{-/-}
1. Bulbus olfact.	128 ± 6,4	205 ± 7,6 ^b	136 ± 10	161 ± 15
2. Frontalcortex	153 ± 14	220 ± 31	--	--
3. Striatum	151 ± 18	281 ± 20 ^b	4364 ± 462	4005 ± 467
4. Hippocampus	144 ± 11	167 ± 10	68 ± 14	94 ± 17
5. Hypothalamus	731 ± 24	706 ± 39	206 ± 14	215 ± 16



Ergebnisse der HPLC-Messungen der Gehalte an Noradrenalin (NA) und Dopamin (DA). Noradrenalin war im Bulbus olfactorius und Striatum bei den *BDNF*^{-/-} im Vergleich zu den *BDNF*^{+/+} Mäusen signifikant höher, während der Dopamingehalt keine Unterschiede zwischen beiden Genotypen zeigte.

n=12, Mittelwerte in pg/mg Gewebe ± SEM; * p < 0,05.

■ *BDNF*^{+/+}

■ *BDNF*^{-/-}

4.1.2 Immunhistochemische Untersuchungen an serotonergen Neuronen

Zu den phänotypischen Merkmalen serotonerger Neurone gehört neben der Aufnahme von 5,7-Dihydroxytryptamin das Vorhandensein von Tryptophanhydroxylase. Tryptophanhydroxylase ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Serotoninsynthese. Es katalysiert die Reaktion der Aminosäure Tryptophan zu 5-Hydroxytryptophan, welches durch die aromatische L-Amino-Decarboxylase zu Serotonin (5-Hydroxytryptamin) umgesetzt wird.

Hirnschnitte von *BDNF*^{+/+} und *BDNF*^{-/-} Mäusen in Höhe der Raphe nuclei wurden mit einem Antikörper gegen Tryptophanhydroxylase (TPH) in einer Verdünnung von 1:1000 immunhistochemisch gefärbt (siehe **Abbildungen 9a** und **9b**). Für einen Vergleich der Zellzahlen erfolgte die Auszählung aller TPH-positiven Zellen in 3 vergleichbaren Schnitten aus je 2 Gehirnen von *BDNF*^{+/+} und *BDNF*^{-/-} (siehe **Abbildung 9b**). Die Anzahl der Zellen in den Schnitten der *BDNF*^{-/-} Mäuse wurde in Prozent zur Kontrolle (Anzahl der Zellen von *BDNF*^{+/+}) angegeben. Dabei zeigte sich eine Erhöhung der TPH-positiven Zellen in den *BDNF*^{-/-} Mäusen um 25%. Dies korrelierte mit den Ergebnissen der HPLC-Untersuchungen der Innervationsgebiete serotonerger Neurone, die eine signifikante Erhöhung von Serotonin in Striatum und Hippokampus, sowie eine erhöhte Umsatzrate von Serotonin in allen Regionen ergab.

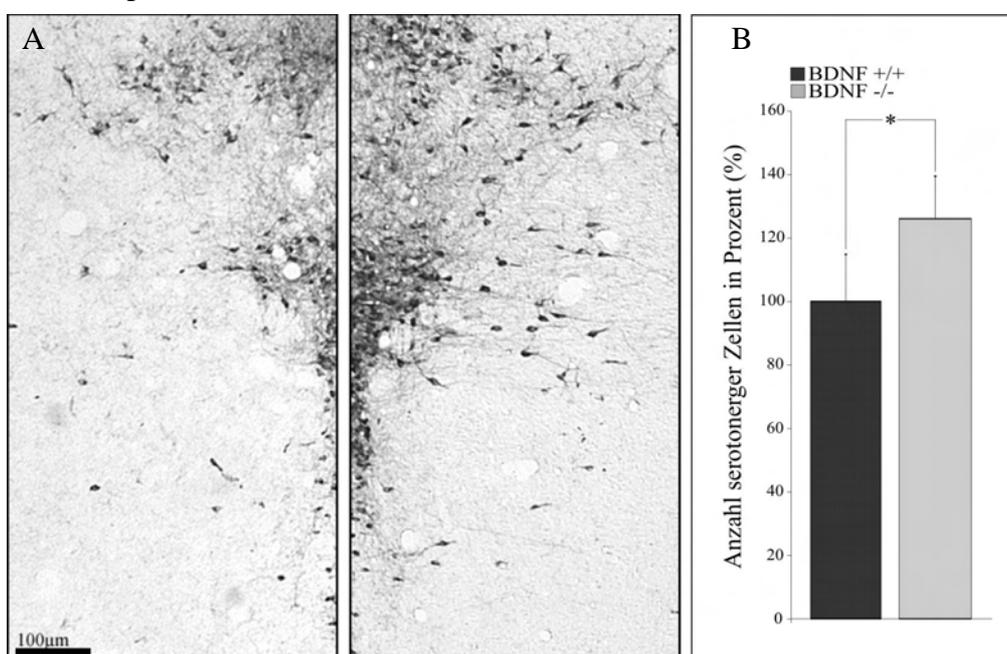
Das Vorhandensein des Serotonintransporters (SERT) ist ein weiteres Merkmal serotonerger Neurone. Entsprechend seiner Funktion ist der Serotonintransporter vorwiegend an präsynaptischen Axonendigungen lokalisiert, wo er Serotonin aktiv vom synaptischen Spalt zurück in die Zelle transportiert.

Die immunhistochemische Darstellung des Serotonintransporters an Schnitten der Raphe nuclei erfolgte mit einem Antikörper gegen SERT in einer Verdünnung von 1:50000. Wie die erhöhte Zahl serotonerger Neurone in den *BDNF*^{-/-} Mäusen erwarten ließ, zeigte sich eine verstärkte Immunreaktion von SERT aufgrund der vermehrten Anzahl der serotonergen Axone (siehe **Abbildung 10**).

Ebenso ließ die Detektion von Serotonin (Kaninchen anti-Serotonin 1:5000, Sigma) in Schnittserien durch das gesamte Gehirn eine verstärkte und vermehrte Faserzeichnung in den *BDNF*^{-/-} Mäusen besonders im Vorderhirn erkennen (siehe **Abbildung 11**). Dieses Ergebnis passte zu den höheren Gehalte an Serotonin und der erhöhten Anzahl serotonerger Neurone in der Raphe in den *BDNF*^{-/-} Mäusen.

Abbildung 9a:

Immunhistochemische Darstellung und Quantifizierung TPH-positiver Zellen in der Raphe nuclei

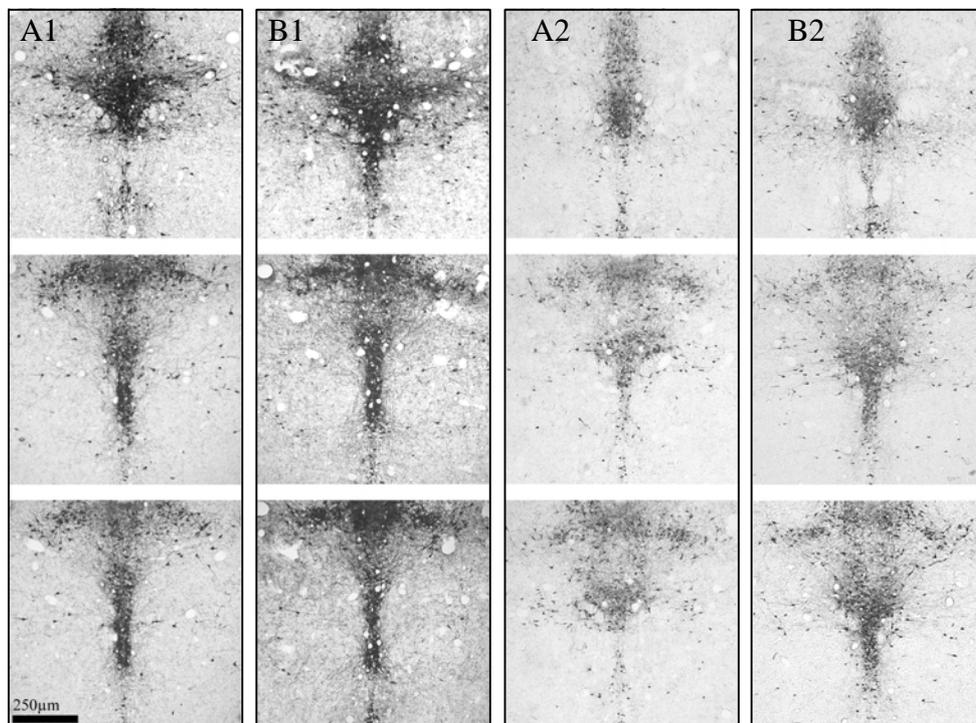


A: Immunhistochemische Darstellung von Tryptophanhydroxylase in den Nuclei raphe dorsales von *BDNF* +/+ (links) und *BDNF* -/- (rechts) Mäusen. In zwei verschiedenen Gehirnen jedes Genotyps wurde die Anzahl der Tryptophanhydroxylase positiven Zellen in je drei vergleichbaren Schnitten zwischen beiden Genotypen bestimmt.

B: Die Darstellung der ermittelten Zellzahlen zeigte eine Erhöhung der TPH-positiven Zellen in den *BDNF* -/- Mäusen um 25 % gegenüber den *BDNF* +/+ (* $p < 0,05$). Die Anzahl der Zellen der *BDNF* -/- Mäuse wurden in Prozent zur Kontrolle (*BDNF* +/+) ausgedrückt.

Abbildung 9b:

Schnitte ausgezählter TPH-positiver Zellen in *BDNF*^{+/+} und *BDNF*^{-/-} Mäusen im Vergleich

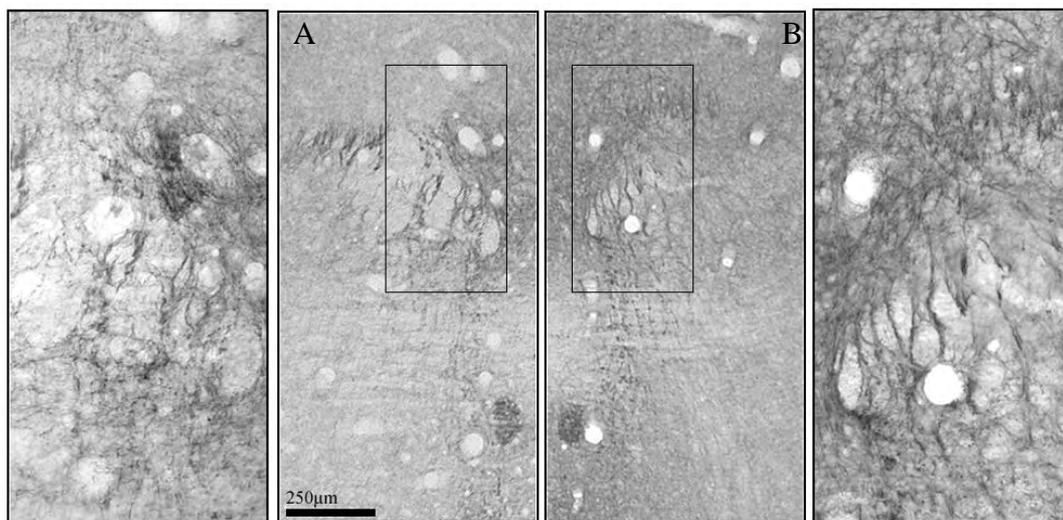


A1/A2: ausgezählte Schnitte der *BDNF*^{+/+} Mäuse;

B1/B2: jeweils zu den *BDNF*^{+/+} vergleichbare, ausgezählte Schnitte der *BDNF*^{-/-} Mäuse

Abbildung 10:

Immunhistochemische Darstellung des Serotonintransporters (SERT) in der Raphe nuclei in *BDNF*^{+/+} und *BDNF*^{-/-} Mäusen



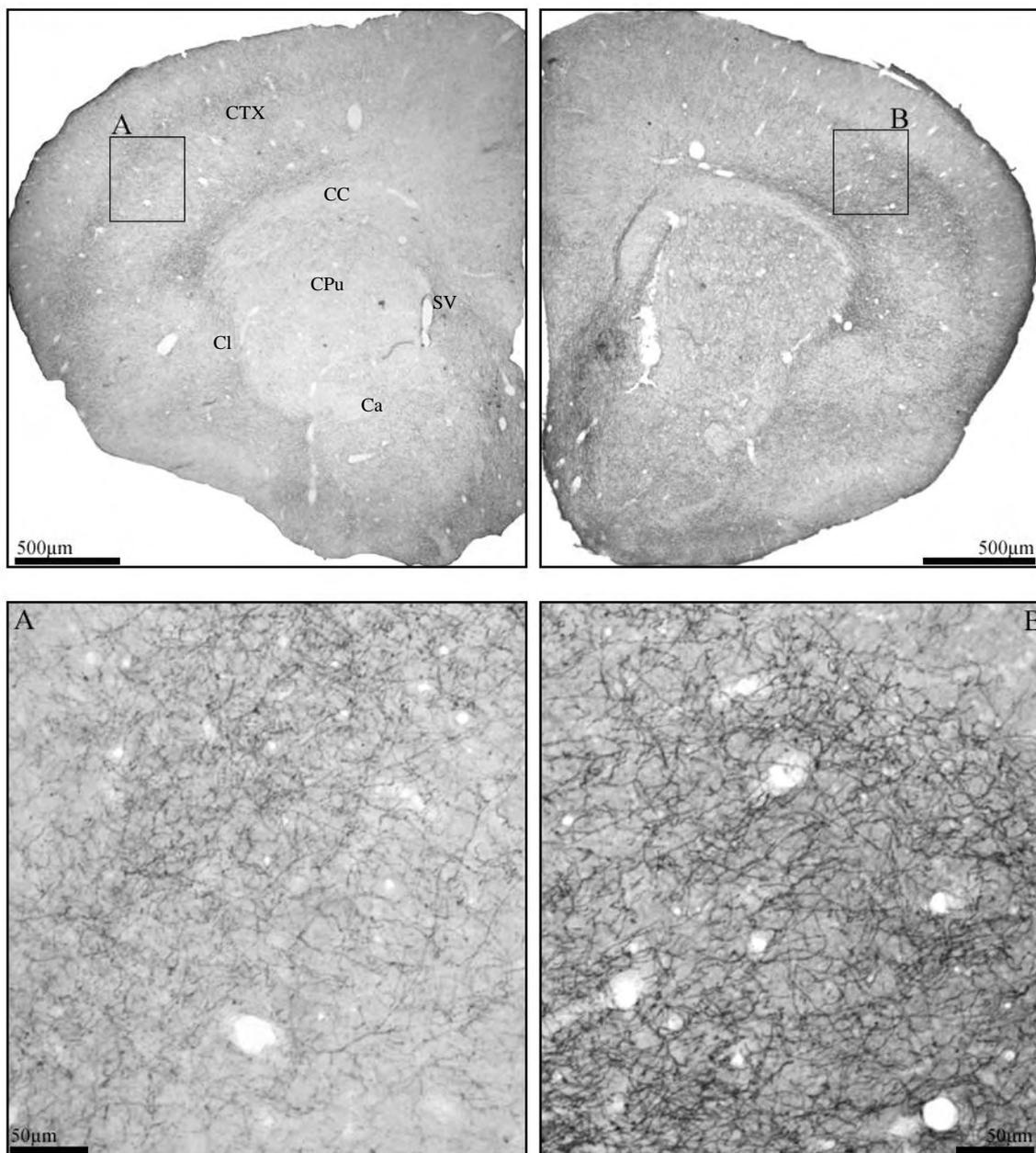
A: *BDNF*^{+/+} mit Ausschnittsvergrößerung links

B: *BDNF*^{-/-} mit Ausschnittsvergrößerung rechts.

Die Immunreaktivität des Serotonintransporters war in den *BDNF*^{-/-} Mäusen erhöht, was auf eine vermehrte Faserdichte hinwies, in Übereinstimmung mit der erhöhten Anzahl serotonerger Neurone.

Abbildung 11:

Immunhistochemische Darstellung von serotonergen Fasern im Frontalkortex, *BDNF*^{+/+} und *BDNF*^{-/-} im Vergleich



Frontalschnitte von *BDNF*^{+/+} (links) und *BDNF*^{-/-} Mäusen (rechts) wurden mit einem polyklonalen Antikörper gegen Serotonin gefärbt. In *BDNF*^{-/-} Mäusen erscheinen die serotonergen Fasern hinsichtlich Anzahl und Dicke gegenüber den *BDNF*^{+/+} Mäusen erhöht.

Ca: Commissura anterior; *CC*: Corpus callosum; *Cl*: Claustrum; *CPu*: Caudataputamen; *CTX*: Neokortex; *SV*: Seitenventrikel

4.1.3 Vergleich von Schlüsselenzymen der Monoaminsysteme in *BDNF*^{+/+} und *BDNF*^{-/-} Mäusen

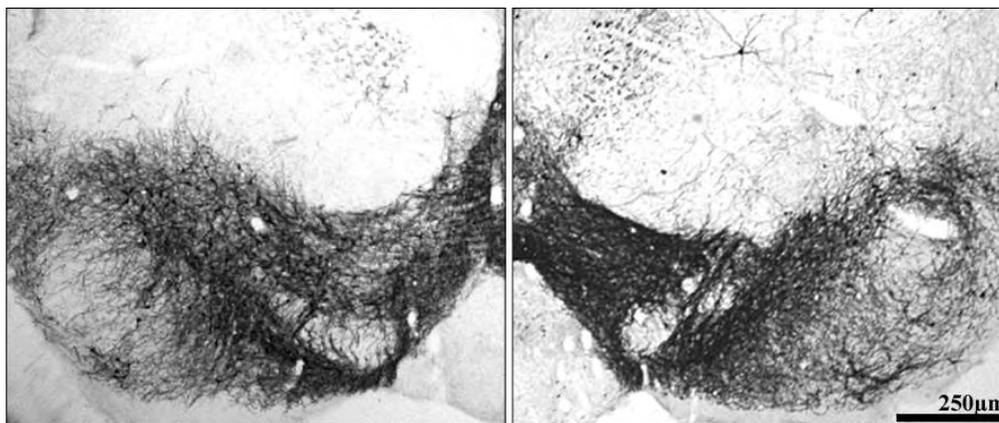
Weiterführend wurden Parameter catecholaminerger Neurone und allgemeine Merkmale monoaminerger Neurone in *BDNF*^{+/+} und *BDNF*^{-/-} Mäusen vergleichend untersucht.

Tyrosinhydroxylase - das erste und geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Katecholamin-Synthese - katalysiert die Hydroxylierung der Aminosäure Tyrosin zu L-Dopa (Dihydroxyphenylalanin), aus dem in einem weiteren Schritt durch eine Decarboxylase Dopamin gebildet wird.

An frontalen Hirnschnitten der *BDNF*^{+/+} und *BDNF*^{-/-} Mäuse mit einem Antikörper gegen Tyrosinhydroxylase (Verdünnung 1:2000) wurden verschiedene Regionen wie z.B. Substantia nigra (dopaminerg) und Locus coeruleus (noradrenerg) immunhistochemisch erfasst. Es fanden sich in keiner Region Unterschiede zwischen *BDNF*^{+/+} und *BDNF*^{-/-}; exemplarisch sind in **Abbildung 12** vergleichbare Schnitte aus der Substantia nigra dargestellt. Auch in der Immunoreplika-Analyse vom postnukleären Überstand des Gehirnhomogenats beider Genotypen konnte dies bestätigt werden (siehe **Abbildung 13-A**).

Abbildung 12:

Immunhistochemische Darstellung von Tyrosinhydroxylase in der Substantia nigra, *BDNF*^{+/+} und *BDNF*^{-/-} im Vergleich



Frontalschnitte von *BDNF*^{+/+}(links) und *BDNF*^{-/-} Mäusen (rechts) in Höhe der Substantia nigra wurden mit einem polyklonalen Antikörper gegen Tyrosinhydroxylase gefärbt. Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen.

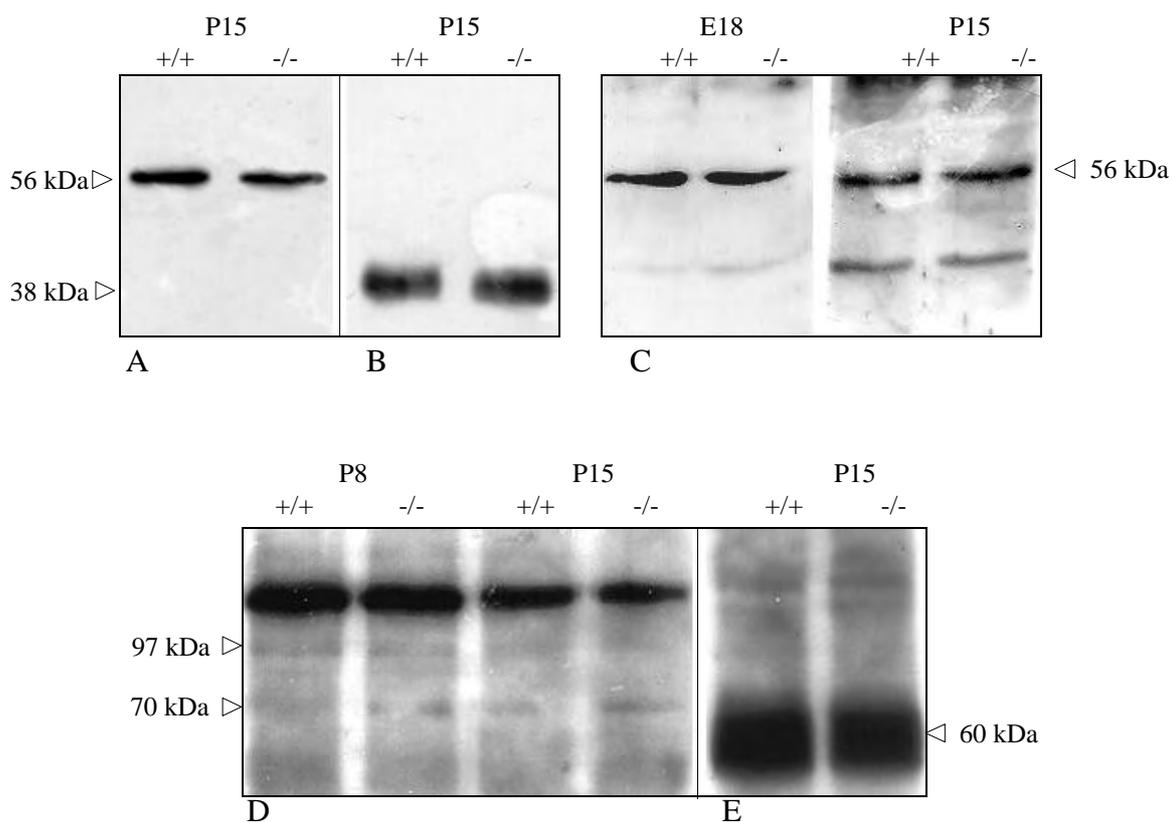
Ein spezifischer Marker des dopaminergen Systems ist der Dopamintransporter (DAT), der ähnlich wie der Serotonintransporter (siehe Kapitel 4.1.2) Dopamin aus dem Extrazellulärraum in das Zytosol dopaminergener Neurone transportiert. Der Nachweis erfolgte mittels Immunoreplika-Analyse vom postnukleären Überstand des Gehirnhomogenats beider Genotypen mit einem Antikörper gegen DAT (Verdünnung 1:10000). Es konnten auch hier keine Unterschiede zwischen *BDNF*^{+/+} und *BDNF*^{-/-} Mäusen gefunden werden, was den Ergebnissen mit der Tyrosinhydroxylase entsprach (siehe **Abbildung 13-B**).

Weiterhin wurden verschiedene vesikuläre Transporter per Immunoreplika analysiert. Vesikuläre Transporter sind in die Membran synaptischer Vesikel integriert. Mit einem Antikörper gegen VMAT 2 (1:4000) wurden sowohl embryonale als auch juvenile Stadien detektiert. Am Embryonaltag E18 ist schon eine deutliche Immunreaktion vorhanden, jedoch zeigten sich weder in diesem Stadium noch an P15 Unterschiede zwischen *BDNF*^{+/+} und *BDNF*^{-/-} (siehe **Abbildung 13-C**).

Von dem vesikulären Glutamattransporter ist kürzlich ein dritter Subtyp (VGLUT 3) charakterisiert worden [Takamori et al., 2002]. Bei Ratten kommt VGLUT 3 am häufigsten in der Raphe nuclei vor und ist dort auf einigen Neuronen mit Serotonin kolokalisiert [Gras et al., 2002]. Aufgrund dieser Verbindung mit dem serotonergen System wurde im postnukleären Überstand von Hirnhomogenaten der *BDNF*^{+/+} und *BDNF*^{-/-} Mäuse an den Postnataltagen P8 und P15 VGLUT 3 (anti-VGLUT 3, Verdünnung 1:4000, C-Terminus) detektiert. Unterschiede zwischen *BDNF*^{+/+} und *BDNF*^{-/-} Mäusen bestanden dabei nicht, jedoch eine im Gegensatz zu P15 stärkere Immunreaktion an P8 (siehe **Abbildung 13-D** und **-E**).

Abbildung 13:

Immunoreplika-Analyse von Tyrosinhydroxylase und verschiedenen Neurotransmittertransportern



A: anti-Tyrosinhydroxylase, 56 kDa;

B: anti-Dopamintransporter, 38 kDa;

C: anti-VMAT-2, 56 kDa;

D: anti-VGLUT-3, 70 kDa;

E: anti VGLUT-2, 60 kDa

Da der überwiegende Anteil an VGLUT-3 stark glykosyliert vorliegt, ist die stärkste Immunreaktion nicht bei 70 kDa (unterer Pfeil), sondern oberhalb von 97 kDa (oberer Pfeil) zu finden.

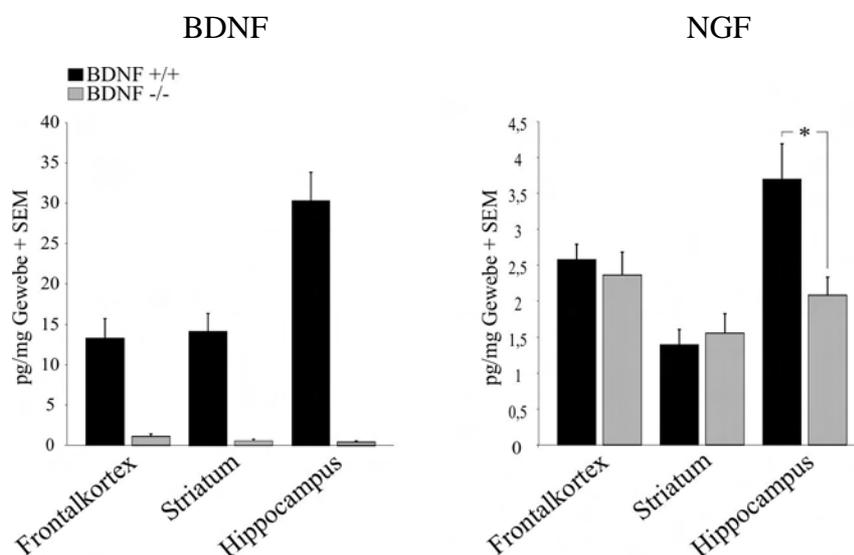
4.1.4 Gehalte von BDNF und NGF in verschiedenen Hirnregionen

Um den Nachweis zu erbringen, dass in den *BDNF*^{-/-} Mäusen tatsächlich kein BDNF synthetisiert wurde, erfolgten Bestimmungen des endogenen BDNF-Gehaltes in verschiedenen Hirnregionen mittels fluorimetrischem ELISA. Von insgesamt 12 Gehirnen jedes Genotypes wurden die Gehalte in Frontalkortex, Hippokampus und Striatum bestimmt. Wie in **Abbildung 14** ersichtlich ist, war in den *BDNF*^{-/-} Mäusen kaum endogenes BDNF zu detektieren.

Zusätzlich erfolgte die Bestimmung des Gehaltes des Nervenwachstumsfaktors NGF (*Nerve Growth Factor*), um eine eventuelle Hochregulation zur Kompensation des Fehlens von BDNF festzustellen. In Frontalkortex und Striatum zeigten sich keine Unterschiede zwischen *BDNF*^{+/+} und *BDNF*^{-/-}, während überraschenderweise im Hippokampus in den *BDNF*^{-/-} Mäusen NGF signifikant ($p=0,025$) erniedrigt war (siehe **Abbildung 15**).

Abbildung 14:

Endogene BDNF- und NGF-Gehalte verschiedener Hirnregionen in *BDNF*^{+/+} und *BDNF*^{-/-} Mäusen



Die Bestimmung von BDNF und NGF erfolgte von Gewebshomogenaten verschiedener Hirnregionen mittels fluorimetrischen ELISA. Wie zu erwarten, war in den *BDNF*^{-/-} Mäusen kaum endogenes BDNF vorhanden. Während im Hippokampus der Gehalt an NGF in den *BDNF*^{-/-} Mäusen signifikant (* $p < 0,05$) erniedrigt war, wurden in Frontalkortex und Striatum keine Unterschiede zwischen *BDNF*^{+/+} und *BDNF*^{-/-} gemessen. Mittelwerte in pg/mg Gewebe \pm SEM, n=12.

4.2 Effekte von BDNF an Primärkulturen von Raphe und Hippokampus

Aus der Literatur war bekannt, dass die Zugabe von BDNF zu Primärkulturen der Raphe aus der Ratte eine Steigerung der Anzahl serotonerger Neurone um mindestens das Doppelte bewirkt [Galter und Unsicker, 1999].

Für weiterführende Experimente an Primärkulturen der Raphe aus der Maus (Linie NMRI) sollte daher zunächst nachgewiesen werden, ob sich die serotonergen Neurone dort ähnlich verhalten. Um serotonergen Neurone in einem möglichst frühen Entwicklungsstadium zu kultivieren, erfolgte die Präparation der Raphe am Embryonaltag E13.

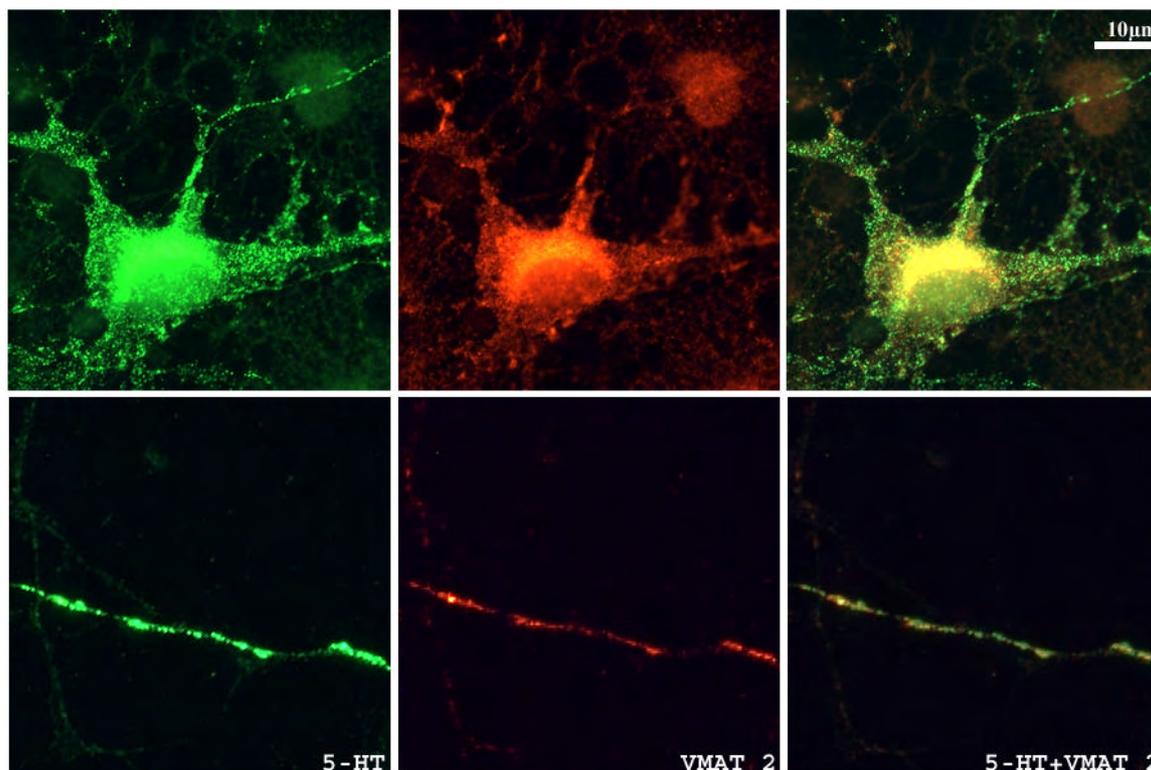
4.2.1 Funktionelle Charakterisierung serotonerger Neurone aus Primärkulturen

Zunächst wurde überprüft, ob serotonerge Neurone aus der Raphe der Maus in Kultur Charakteristika serotonerger Neurone *in vivo* entwickelten.

Der Transport von Serotonin vom Zytosol in die Vesikel erfolgt im Zentralnervensystem über dem vesikulären Monoamintransporter VMAT 2. Für den Nachweis funktionsfähiger Kulturen wurde das Vorhandensein von VMAT 2 (Antikörperverdünnung 1:2000) in einer Doppelfärbung mit Serotonin immunzytochemisch getestet. Es zeigte sich eine Kolokalisation der serotonergen Neurone mit VMAT 2 sowohl in den Zellsomata und auch axonal, wobei nicht alle immunpositiven Zellkörper auch axonal doppelt gefärbt waren (siehe **Abbildung 15**, Raphe-Primärkultur am 6. Tag *in vitro*, Präparation am Embryonaltag E13)

Für die Überprüfung der Funktionsfähigkeit der serotonergen Neurone wurden die Zellen mit radioaktiven Serotonin vorbeladen, das über den Serotonintransporter in den Intrazellulärraum und vom Zytosol über VMAT 2 in die Vesikel gelangte. Die Zugabe von mit Kalium angereichertem Medium führte zu einer Depolarisation der Zellen, worauf eine Transmitterausschüttung erfolgte. Durch Messung der Radioaktivität im Überstand und in den Zellen konnte die prozentual freigesetzte Menge an Serotonin ermittelt werden. Es zeigte sich eine mit ca. 50 % deutlich höhere Ausschüttung von radioaktivem Serotonin bei den kaliumstimulierten Neuronen als bei der Kontrolle, wo nur ca. 10 % des gesamten zugesetzten Serotonins sezerniert wurden (siehe **Abbildung 16**).

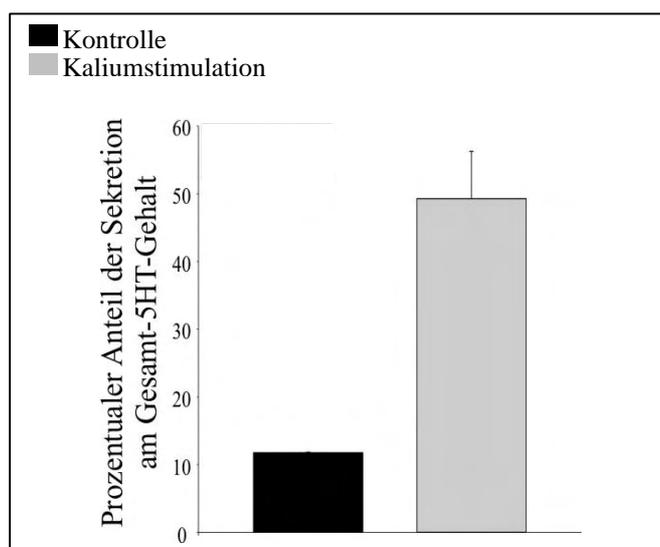
Damit war der Nachweis erbracht, dass die Funktionsfähigkeit der serotonergen Neurone durch die Kultivierung erhalten geblieben war.

Abbildung 15: Serotonerge Neurone in der Doppelfärbung mit VMAT 2

Raphe-Primärkulturen vom Embryonaltag E13 wurden am 6. Tag *in vitro* fixiert und die serotonergen Neurone (grün) und VMAT 2 (rot) in der Doppel-Immunfluoreszenz dargestellt. Sowohl in den Zellsomata als auch axonal ist eine deutliche Kolo-kalisation erkennbar.

Abbildung 16:

Nachweis der Funktionsfähigkeit serotonerger Neurone in Raphe-Primärkulturen



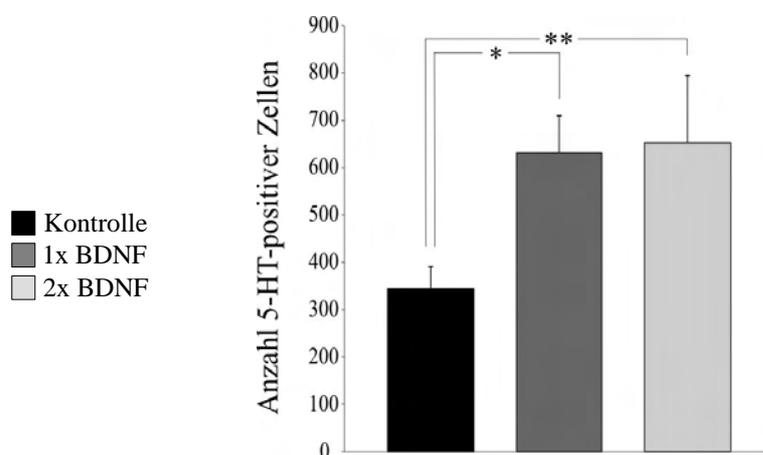
Durch eine stimulierte Freisetzung von radioaktiv markierten Serotonin wurde nachgewiesen, dass die Neurone in der Kultur erregbar und somit funktionsfähig waren.

4.2.2 Effekte von BDNF auf serotonerge Raphe-Neurone in Primärkultur

Die Anzahl der serotonerge Neurone der Maus unter BDNF-Zugabe war nach 6 Tagen in Kultur um etwa das Doppelte erhöht (siehe **Abbildung 17**). Während sich dieser Effekt schon bei der einmaligen Behandlung am 1. Tag der Kultivierung zeigte, führte eine 2. Behandlung am 4. Tag zu keiner weiteren Steigerung.

Abbildung 17:

Behandlung kultivierter Raphe-Neurone mit BDNF führt zu einem Anstieg der Anzahl der serotonergen Neurone



Primärkulturen der Raphe wurden am 1. Tag *in vitro* bzw. zusätzlich am 4. Tag mit 50 ng/ml BDNF behandelt und bis zum 6. Tag kultiviert. Die Zellzählung erfolgte aus 2 Experimenten und insgesamt 6 ausgezählten Plättchen pro Bedingung. Die einmalige Behandlung mit BDNF führte im Vergleich zur Kontrolle zu einer nahezu doppelt so hohen Anzahl der serotonergen Neurone ($*p=9,5 \times 10^{-5}$), die zweimalige Behandlung brachte keine weitere nennenswerte Steigerung ($**p=3,2 \times 10^{-4}$). Werte sind angegeben in Anzahl der serotonergen Zellen; Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD), $n=6$

Die Zugabe von BDNF hat auf serotonerge Neuronen der Maus einen ähnlichen Effekt wie auf entsprechende Kulturen der Ratte. Es stellte sich als nächstes die Frage, ob sich die BDNF-Wirkung auf die Anzahl der Neuronen beschränkt oder auch deren Morphologie beeinflusst. Aus diesem Grund erfolgte die Vermessung serotonerger Axone und Dendriten von BDNF-behandelten Raphe-Primärkulturen mit Neurolucida-Software. Da die zweimalige Behandlung mit BDNF auf die Anzahl der Neuronen keinen größeren Effekt zeigte als die einmalige, wurde bei den morphometrischen Untersuchungen auf eine 2. Zugabe verzichtet.

Die Zellen wurden am 1. Tag in Kultur - unter Mitführung einer unbehandelten Kontrollgruppe - mit BDNF behandelt und am 6. Tag mit Antikörper gegen MAP-2 (Mikrotubuli-

assoziiertes Protein 2; 1:1000) als neuronaler Dendritenmarker und gegen 5-HT (polyklonal Kaninchen, 1:2000) zum Erkennen der serotonergen Neurone doppelmarkiert (siehe **Abbildung 20**).

Neben BDNF soll auch das gliale Protein S100 β auf serotonerge Neurone eine trophische Wirkung im Sinne einer Neuritenverlängerung ausüben [Azmitia et al., 1990].

Für eine differenziertere Untersuchung, ob sich die Verlängerung der Neuriten auf die Dendriten, das Axon oder auf beide Fortsatztypen bezieht, erfolgte die Vermessung der serotonergen Neurone an S100 β -behandelten Kulturen. Zusätzlich wurden die Neurone unter der kombinierten Behandlung von BDNF + S100 β vermessen, um eine eventuelle fördernde oder hemmende gegenseitige Beeinflussung feststellen zu können.

Die grafische Darstellung (siehe **Abbildung 18**) zeigt die Mittelwerte mit Standardabweichung von insgesamt 60 vermessenen Neuronen aus zwei Versuchsansätzen (Axone, A und B) bzw. 90 vermessenen Neuronen aus drei Versuchsansätzen (Dendriten, C-E). Hinsichtlich der Axonlänge zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (A), während sich unter der kombinierten Behandlung BDNF + S100 β die Axone stärker verzweigten. Dieser Effekt deutete sich bei der alleinigen Zugabe von BDNF tendenziell an, war aber erst in der kombinierten Behandlung mit S100 β signifikant gegenüber den anderen Versuchsgruppen (B). An den Dendriten zeigten sich im Trend ebenfalls stärkere Verzweigungen nach BDNF- und BDNF + S100 β -Zugabe, jedoch ohne statistische Signifikanz (D). Weiterhin konnte an den Dendriten eine deutliche Erhöhung der Anzahl der Dendriten nach BDNF-Zugabe beobachtet werden (C). Dieser Dendritenzuwachs wurde von S100 β in der kombinierten Behandlung allerdings zum Teil wieder aufgehoben, was auf eine gegenseitige Hemmung bei gleichzeitiger Applikation hinwies. Die mittlere Länge eines Dendriten blieb bei allen behandelten Gruppen gegenüber der Kontrolle unverändert (E). Zwischen der alleinigen S100 β -Behandlung und der Kombination BDNF + S100 β zeigte sich dagegen bei letzteren eine signifikante Verringerung der Länge eines Dendriten. Der schon bei der Anzahl der Dendriten vermutete hemmende Effekt der kombinierten BDNF + S100 β -Behandlung konnte also auch bei der mittleren Länge eines Dendriten beobachtet werden.