

5 DISKUSSION

5.1 *In-vivo-Untersuchungen monoaminerger Neuronenpopulationen BDNF-gendefizienter Mäuse*

Trophische Effekte von BDNF auf serotonerge Neurone *in vitro* wurden bisher vielfach beschrieben [Eaton et al., 1995; Nishi et al., 1996; Galter und Unsicker, 1999]. Die Art der trophischen Wirkung wird jedoch unterschiedlich diskutiert. Während Eaton et al. [1995] und Nishi et al. [1996] BDNF in der Rolle als Überlebens- und Differenzierungsfaktor für serotonerge Neurone vermuteten, konnten Galter und Unsicker [1999] an Primärkulturen aus der Raphe der Ratte und Mamounas et al. [2000] *in vivo* zeigen, dass BDNF keinen Einfluss auf das Überleben serotonerger Neurone hat, aber deren Anzahl erhöht.

Während bisherige *in-vitro*- und *in-vivo*-Untersuchungen sich stets mit den Effekten einer zusätzlichen BDNF-Gabe befassten, sollte die vorliegende Arbeit dazu dienen, anhand einer Deletionsmutante die Auswirkungen des Fehlens von BDNF insbesondere auf die Entwicklung serotonerger Neurone zu untersuchen.

5.1.1 Die Entwicklung des serotonergen Systems in BDNF-gendefizienten Mäusen

Die immunhistochemische Detektion von Tryptophanhydroxylase mit anschließender quantitativer Erfassung der positiv gefärbten Zellen in den Raphe nuclei dorsalis et medianus zeigte in den BDNF^{-/-} Mäusen im Vergleich zum Wildtyp (BDNF^{+/+}) eine signifikant erhöhte Zahl serotonerger Neurone. Die zu erwartende erhöhte Anzahl an serotonergen Fasern ließ sich in den Projektionsgebieten (z.B. Vorderhirn) beider Kerne nachweisen. Entsprechend wurden erhöhte 5-HT-Gehalte in Striatum und Hippokampus der BDNF^{-/-} Mäuse gemessen. Der Hauptmetabolit von Serotonin, 5-Hydroxyindolessigsäure, war in allen gemessenen Regionen bei den BDNF^{-/-} Mäusen gegenüber den BDNF^{+/+} Mäusen signifikant erhöht.

In-vitro-Untersuchungen zeigten einen fördernden Effekt von BDNF auf die Entwicklung serotonerger Neurone [Galter und Unsicker, 1999]. Der darauf basierende Rückschluss, das Fehlen von endogenem BDNF müsse zu einer verzögerten Entwicklung des serotonergen Systems führen, konnte durch die Untersuchungen der BDNF^{-/-} Mäuse nicht bestätigt werden. Das Gegenteil ist der Fall, die BDNF^{-/-} Mäuse haben mehr serotonerge Neurone und höhere Serotoninspiegel. Dieses Ergebnis ist verschieden interpretierbar:

(1) Zum einen wäre die *Hochregulierung eines anderen Faktors* zur Kompensation des Fehlens von BDNF denkbar, da das serotonerge System sowohl bei der Hirnentwicklung als

auch im adulten Gehirn zu wichtig ist, um bei Ausfall eines trophischen Faktors eine mangelhafte oder gar fehlende Entwicklung zu riskieren. Für diese Theorie spricht die Erhöhung serotonerger Parameter in den BDNF^{-/-} Mäusen, die als Überkompensation bzw. mangelhafte Feinregulation gewertet werden kann. Als Kompensationsfaktoren wären die beiden anderen bekannten trophischen Faktoren des serotonergen Systems – Serotonin und S100 β – möglich. Da jedoch auch S100 β in den BDNF^{-/-} Mäusen eher vermindert synthetisiert wird – was für seine Abhängigkeit von BDNF spricht – ist dieser Faktor auszuschließen.

Eine weitere Möglichkeit ist die Kompensation durch andere Neurotrophine bzw. durch Wachstumsfaktoren, die nicht der Familie der Neurotrophine angehören, in Betracht zu ziehen. Die Behandlung mit Nerve Growth Factor (NGF) führte zu keiner Beeinflussung serotonerger Neurone *in vitro* [Azmitia et al., 1990; Lindholm et al., 1994, Galter und Unsicker, 1999]. Der NGF-Gehalt einzelner Hirnregionen in den BDNF^{-/-} Mäusen zeigte sich im Vergleich zu den BDNF^{+/+} Mäusen unverändert bzw. signifikant erniedrigt (Hippokampus), weshalb NGF als kompensatorischer Ersatzfaktor für das fehlende BDNF auszuschließen ist. Während Azmitia et al. [1990] und Lindholm et al. [1994] keinen Effekt von NT-3 auf serotonerger Neurone *in vitro* zeigen konnten, fanden Galter und Unsicker [1999] einen 2,2-fachen Anstieg der Anzahl serotonerger Neurone nach NT-3 Behandlung und zusätzlich einen 1,7-fachen Anstieg nach NT-4/5 Behandlung. Intrazerebelläre oder intrazerebroventrikuläre Injektionen von NT-3 scheinen ebenso wie BDNF den Serotonin-Metabolismus zu erhöhen, serotonerger Neuronen vor toxinvermittelten Verletzung zu schützen und das Aussprossen serotonerger Axone zu induzieren [Altar et al., 1994; Mamounas et al., 1995; Martin-Iverson et al., 1994; Siuciak et al., 1996]. Die Vermittlung dieser Effekte erfolgt über die auf serotonerger Neuronen des Nucleus raphe dorsalis exprimierten trkB- und trkC-Rezeptoren [Merlio et al., 1992]. Aufgrund dieser Untersuchungen erscheint eine Kompensation durch erhöhte Expression von NT-3 und/oder NT-4/5 als Reaktion auf das fehlende BDNF möglich.

(2) *BDNF ist kein trophischer Faktor für serotonerger und andere Neurone.* In BDNF^{-/-} Mäusen entwickeln sich serotonerger Neurone normal. Auch andere auf BDNF ansprechende Neurone in Retina, Kortex, Hippokampus und Cerebellum überlebten trotz Abwesenheit von BDNF, während Körnerzellen im Kleinhirn vermindert waren [Schwartz. et al., 1997]. Dagegen sind hohe Verluste an Neuronen des peripheren Nervensystems, wie z.B. in Spinal-, Trigeminall- und Vestibularganglien zu beobachten [Ernfors et al., 1994a; Jones et al., 1994].

Daraus kann geschlossen werden, dass BDNF für die normale Entwicklung des peripheren aber nicht des zentralen Nervensystems benötigt wird [Snider, 1994]. Möglicherweise dient BDNF im ZNS nicht als allgemeiner Überlebensfaktor wie im PNS, sondern wirkt überwiegend auf die Regulation der Synapsenformation und Zellmorphologie [McAllister et al., 1995 und 1996; Snider und Lichtman, 1996]. Eine Erklärung für die unterschiedlichen Befunde zwischen ZNS und PNS könnte in der höheren Komplexität der Neurone des ZNS liegen. Das Überleben der meisten Neurone des ZNS wird wahrscheinlich durch Kooperationen mehrerer verschiedener Neurotrophine (z.B. BDNF und NT-3) gesteuert [Snider, 1994]. Zudem sind noch andere Wachstumsfaktoren, die nicht der Neurotrophin-Familie angehören (z.B. ciliary neurotrophic factor (CNTF), insulin-like growth factors (IGF), fibroblast growth factors (FGF) u.a.) involviert [Snider, 1994]. Im PNS hingegen innerviert eine individuelle Zelle eines sympathischen Ganglions nur eine oder wenige Klassen von Zielzellen, welche beispielsweise NGF produzieren (*target-derived*) [Snider, 1994]. Da NGF von der Ganglienzelle benötigt wird, hängt ihr Überleben während einer kritischen Entwicklungsperiode von NGF ab.

(3) *BDNF ist nicht für die Entwicklung, sondern für die Aufrechterhaltung serotonerger Neurone im adulten Gehirn notwendig.* Aufgrund der geringen Lebenserwartung der BDNF^{-/-}-Mäuse sind Aussagen bezüglich der Auswirkungen des Fehlens von BDNF nur auf die Hirnentwicklung bezogen möglich. Studien an BDNF-heterozygoten Mäusen (BDNF^{+/-}) mit normaler Lebensdauer zeigten ab Beginn der 6. Lebenswoche eine zunehmende Aggressivität und chronische Hyperphagie mit resultierender Adipositas [Lyons et al., 1999] – Symptome, die im Zusammenhang mit dem serotonergen System stehen. In Übereinstimmung mit den Verhaltensabnormalitäten fand sich bei den BDNF^{+/-}-Mäusen durch den Verlust serotonerger Axone und der Verminderung der Serotoninspiegel eine Reduktion der serotonergen Neurotransmission. BDNF ist demnach also nicht für die Entwicklung, sondern zur Erhaltung der serotonerger Neurone notwendig [Lyons et al., 1999].

Aufgrund der in der vorliegenden Studie vorgenommenen Untersuchungen erscheint eine Kompensation des fehlenden BDNF in den BDNF^{-/-}-Mäusen am wahrscheinlichsten, da das serotonerge System zwar nicht die erwartete Unterentwicklung zeigte, aber dennoch eine Veränderung erkennbar war. BDNF wirkt vermutlich als Modulator bei der Entwicklung serotonerger Neurone und garantiert die Stabilität des serotonergen Systems im adulten Tier.

Neue Möglichkeiten werden sich durch die Entwicklung konditioneller knockout-Mäuse erschließen, bei denen die Expression des betreffenden Gens an- und abgeschaltet werden kann. Kürzlich sind konditionelle BDNF-knockout-Mäuse gezüchtet worden, bei denen jedoch das betreffende Gen bisher nur angeschaltet werden kann.

Mit Hilfe solcher Züchtungen lässt sich in Zukunft besser untersuchen, für welche Neuronenpopulationen und zu welchem Zeitpunkt die Anwesenheit von BDNF essentiell ist, da bei diesen Mäusen keine längerfristigen Kompensationsmechanismen greifen können.

5.1.2 Einfluss von BDNF auf die Entwicklung dopaminerger und noradrenerger Neurone

Bei der immunhistochemischen Darstellung von Tyrosinhydroxylase in Hirnarealen mit dopaminergen (Substantia nigra) oder noradrenergen (Locus coeruleus) Neuronen und den jeweiligen Innervationsgebieten ließen sich keine Unterschiede zwischen BDNF^{+/+} und BDNF^{-/-} Mäusen feststellen. Während sich dieser Befund sowohl durch HPLC-Messungen des Dopamingehaltes in verschiedenen Hirngebieten als auch durch die Immundetektion des Dopamintransporters (DAT) bestätigte, zeigte sich der Gehalt an Noradrenalin in Bulbus olfactorius und Striatum in den BDNF^{-/-} Mäusen signifikant erhöht.

Aus diesen Ergebnissen ist zu schließen, dass die noradrenergen, aber nicht die dopaminergen Neurone während der Entwicklung auf BDNF angewiesen sind. Als Ursache für die erhöhten Gehalte an Noradrenalin in den genannten Regionen, die zu den Innervationsgebieten noradrenerger Neurone gehören, kann ähnlich wie für das serotonerge System eine (Über-) Kompensation des fehlenden BDNF durch einen anderen Faktor angenommen werden.

Zellen im Locus coeruleus, der größten Ansammlung noradrenerger Neurone im Hirnstamm, exprimieren den trkB-Rezeptor in hohem Maße [Numan et al., 1998; King et al., 1999; Yamuy et al., 2000]. Diese Beobachtung führte zu der Vermutung, dass BDNF ein wichtiger Regulator der Funktion noradrenerger Neurone ist. *In-vitro*-Studien zeigten nach BDNF-Supplementierung ein vermehrtes Überleben noradrenerger Neurone [Friedman et al., 1993] und eine Hochregulation der Expression noradrenerger Marker [Sklair-Tavon et al., 1995]. In transgenen Mäusen mit Cre/loxP-vermittelter BDNF-Gendeletion (*conditional knock-outs*) [Rios et al., 2001], wurden im postnatalen Stadium keine Veränderungen in der Anzahl noradrenerger Neurone in Locus coeruleus und Nucleus tractus solitarius zwischen den BDNF-Mutanten und dem entsprechenden Wildtyp gefunden. Da bei den BDNF-Mutanten BDNF nur während der Entwicklung bis zum Alter von 2,5 Lebenswochen zur Verfügung steht, ist davon auszugehen, dass es nicht zur Aufrechterhaltung noradrenerger Neurone im

adulten Gehirn benötigt wird [Akbarian et al., 2002]. Anders als bei serotonergen Neuronen scheinen noradrenerge Neurone BDNF während ihrer Entwicklung zu benötigen, während das serotonerge System im adulten Tier von BDNF nur moduliert wird.

5.2 Die Rolle von BDNF und S100 β in vitro

5.2.1 Das Modell Zellkultur

Die Verwendung herkömmlicher Gen-Knockout-Modelle ist insofern kritisch zu betrachten, als das betreffende Protein von Anfang an nicht exprimiert wird und daher kompensatorische Regulationen eintreten können. Für die Untersuchung der Funktion spezifischer Proteine wird daher ergänzend mit reduzierten Systemen wie Zellkulturen gearbeitet.

In der Zellkultur werden physiologische Prozesse von Zellen außerhalb des Körpers aufrechterhalten. Der große Vorteil besteht in der Reduktion der komplexen *in-vivo*-Situation. Dadurch sind Zellkulturen gute Modelle für die Untersuchung der Effektivität neuronaler Wachstumsfaktoren sowohl für die Grundlagenforschung als auch für den therapeutischen Einsatz bei neurologischen Erkrankungen. Die Parameter sind u.a. das Überleben von Nervenzellen, der Transmittermetabolismus und die Morphologie.

An Zellkulturen erhobene Befunde können nicht isoliert betrachtet werden, da die Kultur von den physiologischen Bedingungen abweichen kann. Die Bedeutung bestimmter Erkenntnisse muss durch nachfolgende *in-vivo*-Experimente verifiziert werden. Dennoch belegen vergleichende *in-vitro*- und *in-vivo*-Experimente, z.B. zur Zelltyp spezifischen Expression von Kaliumkanälen, dass *in-vitro*- und *in-vivo*-Entwicklung annähernd vergleichbar sind, wie an Hippokampus-Primärkulturen gezeigt [Große et al., 2000].

Durch die Isolation und Dissoziation der Neurone erscheinen diese zu Kultivierungsbeginn als runde Gebilde. Bereits nach wenigen Stunden jedoch beginnen die Neurone zu wachsen und sich zu differenzieren. Ein wichtiges Differenzierungsmerkmal ist dabei die Ausbildung von Zytoplasmafortsätzen, deren Einteilung in Axone und Dendriten erfolgt. Nach ihrer Knospung wachsen sie an der Spitze mit sogenannten Wachstumskegeln, die sich aus schleierartigen Lamellipodien und fingerförmigen Filopodien zusammensetzen. Die Entscheidung, ob sich die auswachsenden Neuriten zu Dendriten oder zu einem Axon differenzieren fällt in kultivierten Hippokampus-Neuronen bereits nach ca. 24 Stunden in Kultur, indem ein Neurit stärkeres Wachstum zeigt als die übrigen. In dieser Zeit beginnt auch die Polarisierung der axonalen Proteine. Nach etwa fünf Tagen in Kultur erreichen die Neurone hinsichtlich des selektiven Transports und der polarisierten Verteilung der Proteine

an der Zelloberfläche das Stadium eines reifen Neurons [Dotti et al., 1988; Craig and Banker, 1994; Silverman et al., 2001]. Die Entwicklung serotonerger Raphe-Neurone in Kultur verläuft in einem ähnlichen zeitlichen Rahmen, sie sind nach ca. 6 Tagen in Kultur ausdifferenziert [Lauder et al., 1982].

Axone und Dendriten unterscheiden sich sowohl funktionell als auch morphologisch voneinander. Axone erstrecken sich oft über große Distanzen, an ihren Enden werden die Wachstumskegel zu Präsynapsen modifiziert. Dendriten hingegen wachsen nicht so lang aus und verzweigen sich oft extensiv unter der Bildung von sogenannten Dendritenbäumen. Bei Kontakt mit einem Axon formen die Dendriten postsynaptische Spezialisierungen, die mit der Präsynapse des Axons eine funktionsfähige Synapse bilden.

Die durch das Wachstum der Fortsätze bedingten Veränderungen des Aktinzytoskeletts werden durch verschiedene Rho-GTPasen, z.B. RhoA, Rac und Cdc42, gesteuert [Bradke und Dotti, 2000]. Die Aktivierung dieser Rho-GTPasen erfolgt in Axonen und Dendriten vermutlich über unterschiedliche Proteine und/oder Zelloberflächen-Rezeptoren. Die korrekte Sortierung von axonalen und dendritischen Proteinen ist für die neuronale Funktion entscheidend. Der Transport dieser Proteine entweder in das Axon oder die Dendriten erfolgt in Carrier-Vesikel entlang der Mikrotubuli.

5.2.2 BDNF und axonales Wachstum

Das axonale Filopodienwachstum wird durch BDNF reguliert [Yuan et al., 2003]. Die Effekte von BDNF werden dabei über seinen hochaffinen trkB-Rezeptor, die Proteinkinase A und Cdc42 vermittelt, wobei die Aktivierung von Cdc42 von einer hohen Proteinkinase A-Konzentration abhängt. Je nachdem, welche Rho-GTPase aktiviert wird, kommt es entweder zur Verlängerung oder zur Verkürzung der Filopodien.

Mögliche Einflüsse von Rho-Proteinen auf das Wachstum von Dendriten oder Axonen wurden bisher wenig untersucht, gleiches gilt für BDNF - welches wie oben erwähnt - funktionell an Rho-abhängige Signalkaskaden geknüpft ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde *in vitro* an zwei verschiedenen Neuronenpopulationen – Hippokampus- und serotonerger Raphe-Neuronen – gezeigt, dass BDNF und S100 β auf axonales und dendritisches Wachstum in Abhängigkeit der kultivierten Hirnregion differenziell wirken.

5.2.3 Einfluss von BDNF und S100 β auf die Morphologie der Dendriten in Primärkulturen von Raphe und Hippokampus

Raphe-Kulturen aus der Maus reagieren auf BDNF mit einer erhöhten Anzahl serotonerger Neurone. Damit wurden die Ergebnisse der Untersuchungen an entsprechenden Neuronen der Ratte bestätigt [Galter und Unsicker, 1999]. Untersuchungen von Galter und Unsicker [2000] an Raphe-Neuronen der Ratte zeigten ferner, dass die Erhöhung der Zellzahl durch eine Differenzierungsförderung serotonerger Neurone und nicht durch ein vermehrtes Überleben bzw. verminderte Apoptose bedingt ist, wie von Nishi et al. [1996] vermutet. Der Effekt von BDNF wird dabei durch seinen auf serotonerge Rapheneuronen lokalisierten, hochaffinen trkB-Rezeptor vermittelt [Madhav et al., 2001; Merlio et al., 1992], wie die gleichzeitige Behandlung mit BDNF und dem trkB-Inhibitor K252b zeigten [Galter und Unsicker, 2000]. Die Behandlung von Raphe-Kulturen mit S100 β hingegen führten zu keiner erhöhten Anzahl der serotonerger Neurone [Nishi et al., 1996].

Die morphometrischen Untersuchungen in der vorliegenden Studie wiesen auf Veränderungen an den Dendriten nach BDNF-Behandlung hin, wobei sowohl die Anzahl der Primärdendriten als auch deren Verzweigungen analysiert wurden. Die Wirkung von BDNF kann dabei wie folgt zusammengefasst werden:

- (1) *BDNF induziert die Aussprossung der Dendriten in vitro vermutlich ohne Spezifität für eine bestimmte Neuronenpopulation.*
- (2) *BDNF hat keinen Einfluss auf das Längenwachstum der Dendriten.*
- (3) *S100 β zeigt keine Wirkung auf die Morphologie der Dendriten hippocampaler und serotonerger Neurone.*
- (4) *Die gleichzeitige Behandlung von BDNF und S100 β wirkt sich hemmend auf das Längenwachstum der Dendriten aus.*

Die alleinige Behandlung mit BDNF führte sowohl bei serotonerger Raphe- als auch bei Hippokampus-Neuronen zu einer *erhöhten Anzahl der Dendriten*. Unter der kombinierten Behandlung mit BDNF und S100 β zeigte sich die Erhöhung der Dendritenanzahl nur bei den Hippokampus-Neuronen, jedoch nicht bei den serotonerger Neuronen. Dieser Befund deutet darauf hin, dass der BDNF-induzierte Effekt auf die Dendritenaussprossung in den serotonerger Neuronen durch die gleichzeitige S100 β -Zugabe gehemmt wird. Das geht

konform mit die Annahme von Nishi et al. [1996] von einer sequenziellen Wirkung der beiden Faktoren auf diese spezielle Neuronenpopulation (siehe Kapitel 1.5). Da bei den Hippokampus-Neuronen jener S100 β -vermittelte hemmende Effekt fehlt, ist davon auszugehen, dass die Interaktion von BDNF und S100 β spezifisch für serotonerge Neurone ist. Die alleinige Behandlung mit S100 β hatte keinen Effekt auf die Anzahl der Dendriten.

Hippokampus-Neurone reagierten auf die alleinige BDNF-Behandlung mit einer signifikanten Erhöhung der *Dendritenverzweigungen* – ein Effekt, der in der kombinierten Behandlung mit BDNF und S100 β nicht zu beobachten war. Bei den serotonergen Neuronen deuten sich diese Veränderungen nur tendenziell an. Da BDNF auf beide Neuronenpopulationen in gleicher Weise auf die Anzahl der Dendriten wirkt, sind die Unterschiede hinsichtlich der Dendritenverzweigungen vermutlich auf die unterschiedlichen Reifezustände der serotonergen und hippokampalen Neuronen bei Kultivierungsbeginn zurückzuführen. Zwar wurde schon bei der In-Kultur-Nahme der Neurone berücksichtigt, dass sich Hippokampus-Neurone später als Raphe-Neurone differenzieren, indem erstere am Embryonaltag E16 und letztere an E13 präpariert wurden. Trotzdem kann nicht davon ausgegangen werden, dass sie sich dadurch im exakt gleichen Entwicklungsstadium befinden. So ist denkbar, dass die Dendritenverzweigung in einem engeren Zeitrahmen initiiert wird als die Aussprossung der Dendriten und sich dadurch die Unterschiede zwischen den beiden Neuronenpopulationen erklären. Demnach kann vermutet werden, dass BDNF die Verzweigungen der Dendriten fördert und zwar ohne Spezifität für eine bestimmte Neuronenpopulation.

Weder BDNF noch S100 β allein beeinflussen die *mittlere Länge eines Dendriten*. Eine kombinierte Applikation von BDNF und S100 β bewirkte bei beiden Neuronenpopulationen eine signifikante Verringerung der Dendritenlänge gegenüber der alleinigen S100 β -Behandlung (hippokampale und serotonerge Neurone) bzw. gegenüber der alleinigen BDNF-Behandlung (hippokampale Neurone). Das könnte auf die von Nishi et al. [1996] beschriebene sequenzielle Wirkung der beiden Faktoren hinweisen. Wenn beide Faktoren gleichzeitig in hoher Konzentration vorhanden sind, könnte es zu einer gegenseitigen negativen Beeinflussung kommen.

5.2.4 Einfluss von BDNF und S100 β auf das axonale Wachstum in Primärkulturen von Raphe und Hippokampus

An Neuronen des Hippokampus wurden keine Effekte von BDNF und/oder S100 β hinsichtlich Länge und Verzweigungen der Axone beobachtet. Serotonerge Raphe-Neurone

hingegen zeigten bei ebenfalls unveränderter Axonlänge eine deutlich erhöhte Anzahl der Axonverzweigungen, jedoch nur unter der kombinierten Applikation von BDNF und S100 β . Daraus kann geschlossen werden, dass dieser Effekt zum einen populationspezifisch auf serotonerge Neurone beschränkt ist und zum anderen durch eine wechselseitige Beeinflussung von BDNF und S100 β bewirkt wird.

Untersuchungen von Nishi et al. [1996] zufolge, bewirkt S100 β an serotonergen Raphe-Neuronen eine Verlängerung der Neuriten. In der vorliegenden Studie vorgenommenen Untersuchungen zeigten diese Wirkung von S100 β weder an Axonen noch an den Dendriten. Das könnte zum einen in der unterschiedlich langen Kultivierungsdauer begründet sein. Nishi et al. führten die morphometrischen Untersuchungen an 4 Tage kultivierten Raphe-Neuronen durch, in der vorliegenden Arbeit betrug die Dauer der Kultivierung 6 Tage. Während bei der 4-tägigen Kultivierung die Differenzierung der Fortsätze noch nicht abgeschlossen und daher eine Unterscheidung zwischen Axon und Dendriten noch nicht möglich ist, befinden sich 6 Tage kultivierte Neurone bereits im ausdifferenzierten Stadium. Denkbar wäre somit ein akzeleriertes Wachstum der Neuriten unter S100 β -Behandlung zu einem bestimmten Entwicklungszeitpunkt, welches jedoch bis zum Erreichen des ausdifferenzierten Stadiums ausgeglichen wird – vielleicht durch eine Regulation des Längenwachstums der Fortsätze durch einen Kontrollfaktor. In diesem Zusammenhang ist der Umstand zu berücksichtigen, dass ein bestimmter Prozentsatz an Astrozyten in den neuronalen Primärkulturen vorhanden ist. Das von diesen Astrozyten gebildete S100 β könnte eventuell für das Neuritenwachstum bereits ausreichen oder neuronale Faktoren stimulieren eine verstärkte S100 β -Freisetzung. Neben der unterschiedlichen Kultivierungsdauer spielen auch Speziesunterschiede und die damit verbundenen Abweichungen in der Entwicklung eine Rolle. Die serotonergen Neuronen in der Studie von Nishi et al. stammten aus der Ratte vom Embryonaltag 14, die in der vorliegenden Arbeit aus der Maus vom Embryonaltag 13. Da von einem Entwicklungsvorsprung der Maus von ca. 2-3-Tagen ausgegangen wird, sind die serotonergen Neurone aus der Maus bereits bei Kultivierungsbeginn in einem weiter fortgeschrittenen Stadium als die der Ratte, was unterschiedliche Reaktionen erklären könnte.

5.2.5 Einfluss von BDNF auf Hippokampus-Neurone von BDNF^{-/-} und BDNF^{+/+} Mäusen *in vivo* und *in vitro*

Hippokampus-Neurone aus Primärkulturen von BDNF^{-/-} und BDNF^{+/+} Mäusen vom Embryonaltag E18 zeigten nach 6-tägiger Kultivierung keine Unterschiede im Dendriten- und

Axonenwachstum. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass sich die Neurone des Hippokampus in den BDNF^{-/-} Mäusen sowohl *in vivo* bis zu Beginn der Kultivierung als auch unter Kulturbedingungen normal entwickeln.

Der Hippokampus gehört zu den Innervationsgebieten serotonerger Neurone [Lauder et al., 1982] und ist daher schon während der neuronalen Entwicklung auf Serotonin angewiesen [Lauder, 1990; 1993]. Das die Entwicklung der hippokampalen Neurone in den BDNF^{-/-} Mäusen nicht beeinträchtigt ist, korreliert mit den *in vivo* Befunden der BDNF^{-/-} Mäuse vom Postnataltag P15, die eine vermehrte Anzahl und erhöhte Serotoningehalte zeigten. Das könnte bedeuten, dass (1) schon während der Entwicklung BDNF durch einen anderen Faktor ersetzt wird und dadurch die serotonerge Innervation in den Zielgebieten nicht beeinträchtigt ist; und (2) BDNF trotz starker Expression im Hippokampus für die Entwicklung und das Überleben hippokampaler Neurone - unabhängig von der serotonergen Innervation - keine größere Bedeutung zukommt. Letztere Vermutung wird durch die Beobachtungen anderer Autoren, nämlich dass BDNF eher auf der Ebene der synaptischen Transmission wirkt [Levine, 1996; Kang und Schuman, 1995] und dass es die Langzeit-Potenzierung (*long-term potentiation*, LTP) induziert [Figurov et al., 1996], bestärkt.

Die Zugabe von BDNF zu Hippokampus-Neuronen der BDNF^{-/-} und BDNF^{+/+} Mäuse führte weder im Vergleich zwischen den Genotypen noch zwischen behandelter und unbehandelter Gruppe jeweils eines Genotyps zu Unterschieden.

Da die Hippokampus-Neurone der BDNF^{-/-} Mäuse sich morphometrisch nicht von den BDNF^{+/+} Mäusen unterschieden und somit von einer normalen Entwicklung ausgegangen werden konnte, war keine unterschiedliche Reaktion auf exogenes BDNF zu erwarten. Überraschend war jedoch, dass auch im Vergleich zwischen der behandelten zur unbehandelten Gruppe innerhalb eines Genotyps keine Veränderungen vorlagen. Die Hippokampus-Neurone des BDNF-Mausstammes zeigten damit ein anderes Verhalten als die entsprechenden Neurone der NMRI-Linie, die unter BDNF-Behandlung eine Vermehrung der Anzahl und Verzweigungen der Dendriten aufwiesen (siehe Kapitel 5.2.1). Dieser scheinbare Widerspruch erklärt sich vermutlich aus dem Alter der Neurone bei Kultivierungsbeginn. Während die Kulturen der BDNF-Mäuse am Embryonaltag E18 angelegt wurden, erfolgte dies bei der NMRI-Linie an E16. BDNF wirkt demnach nur in einem eng begrenzten Zeitfenster während der Entwicklung auf die Zellmorphologie *in vitro*.

Das früheste Auftreten von BDNF und trkB in der Maus wurde am Embryonaltag E8 – also zum Zeitpunkt des Beginns der Neuronendifferenzierung – beschrieben [Klein et al., 1989,

1990, 1993; Maisonpierre et al., 1990; Martin-Zanca et al., 1990]. Dagegen wird das höchste Expressionsniveau von BDNF erst postnatal an P15 erreicht [Das et al., 2001].

Aus den Ergebnissen kann geschlossen werden, dass BDNF während der frühen Entwicklung der Neurone fördernd auf die Bildung und Verzweigung von Dendriten wirkt, in einem späteren Stadium aber andere Aufgaben, wie z.B. die schon erwähnte synaptische Transmission und die Induktion der Langzeit-Potenzierung übernimmt.

5.3 *BDNF fördert die Synthese von S100 β*

Basierend auf *in-vitro*-Untersuchungen von Nishi et al. [1996], die zeigen, dass BDNF über seinen astrozytär lokalisierten trkB-Rezeptor direkt die Erhöhung von S100 β in den Gliazellen bewirkt (siehe Kapitel 1.5; Abbildung 5), wurde weiterführend die Kompartimentierung, Synthese und Expression untersucht.

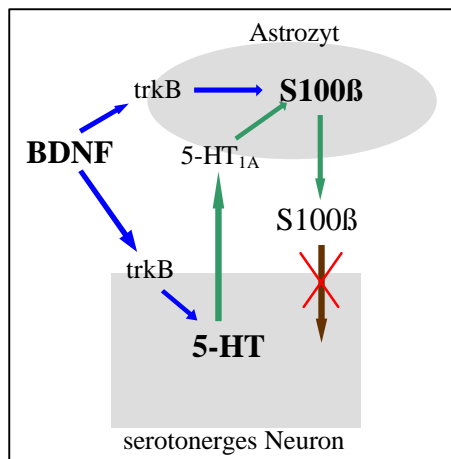
Wenig ist bekannt über die Freisetzungs- und Wirkungsmechanismen von S100 β sowie darüber, in welchem Zellkompartiment S100 β nach seiner Synthese gespeichert wird. Untersuchungen der vorliegenden Studie zur intrazellulären Verteilung von S100 β zeigten, dass es als gelöstes zytosolisches Protein vorliegt.

Astrozyten aus Primärkulturen reagierten auf die Stimulation mit exogenem BDNF mit einer Erhöhung des intrazellulären S100 β -Gehaltes. Eine erhöhte Freisetzung in den Extrazellulär-raum konnte dabei nicht beobachtet werden. Für die Freisetzung von S100 β aus den Astrozyten scheint daher ein weiterer neuro-glialer Mechanismus eine Rolle zu spielen. Ein möglicher Kandidat könnte Serotonin sein, da die Stimulation des astrozytären 5HT_{1A}-Rezeptors die Freisetzung von S100 β fördert [Whitaker-Azmitia et al., 1990]. BDNF würde also auf *direktem* Weg nur die Synthese – vermutlich über eine verstärkte Genexpression - von S100 β fördern und *indirekt* über eine Aktivierung anderer neuronaler Mechanismen, z.B. Freisetzung von Serotonin, eine vermehrte Freisetzung bewirken.

Auch *in vivo* lassen sich diese Theorien begrenzt nachvollziehen. In den BDNF^{-/-} Mäusen zeigte sich eine Verminderung der S100 β -Immunreaktivität in der Raphe-Region. Das bestätigt die *in vitro* erbrachten Befunde, dass BDNF die Synthese von S100 β fördert und fehlendes BDNF zu einer reduzierten S100 β -Synthese führt. Jedoch scheint der fördernde Effekt von BDNF auf die S100 β -Synthese auf die Raphe nuclei beschränkt zu sein, da alle anderen Hirnregionen der BDNF^{-/-} Mäuse keine Veränderung in der S100 β -Immunreaktivität im Vergleich zum Wildtyp (BDNF^{+/+}) zeigten. Da in der Raphe nuclei sich der Hauptanteil

der serotonergen Neurone befindet und diese sich in den BDNF-gendefizienten Mäusen gut entwickeln, scheint S100 β keinen essentiellen trophischen Einfluss während der Entwicklung auf serotonerge Neurone auszuüben. Die Hypothese von Nishi et al. [1996] wäre aufgrund der *in-vivo*-Ergebnisse wie folgt zu modifizieren:

Abbildung 32: S100 β ist kein essentieller trophischer Faktor für serotonerge Neurone



Während in serotonergen Neuronen BDNF über seinen hochaffinen trkB-Rezeptor Synthese und Freisetzung von 5-HT fördert, bewirkt es in den Astrozyten nur die vermehrte Synthese von S100 β , nicht jedoch seine Freisetzung. Diese erfolgt vermutlich über die Stimulation des 5-HT_{1A}-Rezeptors, der ebenfalls von Astrozyten exprimiert wird. *In vivo* kann eine trophische Wirkung von S100 β auf serotonerge Neurone nicht nachgewiesen werden, da vermindertes S100 β keine negativen Auswirkungen auf diese zu haben scheint. Auch *in vitro* sind keine Effekte von S100 β auf serotonerge Neurone zu beobachten.

➡ Förderung der Synthese

➡ Förderung der Freisetzung

✗ Fehrender Effekt auf serotonerge Neurone

5.4 BDNF-gendefiziente Mäuse zeigen verminderte Myelinisierung

In den BDNF^{-/-} Mäusen war eine Erhöhung der serotonergen und noradrenergen Marker, jedoch keine Veränderungen des dopaminergen Systems zu beobachten. Da diese Befunde nicht unbedingt mit der gezeigten Symptomatik und der geringen Lebenserwartung dieser Mäuse im Zusammenhang stehen, stellte sich die Frage, welche Veränderungen im zentralen Nervensystem die frühe Letalität begründen.

BDNF spielt eine Rolle bei der Myelinbildung, was durch verschiedene *in-vitro*- und *in-vivo*-Versuche aus der Literatur bekannt ist [Chan et al., 2001].

Im Vergleich zum Wildtyp (BDNF^{+/+}) konnte bei den BDNF^{-/-} Mäusen histologisch und immunhistochemisch eine drastische Reduktion des Myelins gezeigt werden. Eine Quantifizierung der Immunoreplika-Analyse ergab eine Verminderung des Myelin Basic Proteins um ca. 50%.

Im peripheren Nervensystem wird die Myelinbildung neben anderen Faktoren (z.B. Neureguline, ATP und Steroide) auch von BDNF und NT-3 moduliert [Cosgaya et al., 2002]. BDNF wirkt dabei über den von Schwann-Zellen exprimierten p75^{NTR}-Rezeptor und wahrscheinlich über seinen trkB-Rezeptor ohne Kinase-Aktivität (*truncated isoform*) verstärkend, während NT-3 über seinen trkC-Rezeptor die Myelinisierung hemmt. Das Entfernen

von endogenem BDNF oder des p75^{NTR}-Rezeptors hemmt die Myelinisierung in Kultur [Chan et al., 2001]. Diese Studien zeigen, dass die beiden Neurotrophine BDNF und NT-3 bei der Myelinbildung sowohl primär während der Entwicklung als auch sekundär nach Nervverletzungen eine wichtige Rolle spielen. Während der 1.Phase – der Proliferation der Schwann-Zellen - wird sowohl BDNF als auch NT-3 in hohem Maße exprimiert. Erst nach starker Expressionsverminderung von NT-3 kommt es zur Elongation und Myelinscheidenbildung (2.Phase). Der BDNF-Gehalt bleibt bis zum Beginn der Myelinisierung (3.Phase) konstant hoch, um anschließend ebenfalls herunterreguliert zu werden. Im Falle einer Verletzung reagieren proliferierende Schwann-Zellen sofort mit einer erneuten Hochregulierung von BDNF [Meyer et al., 1992] und p75^{NTR}-Rezeptor, um die Remyelinisierung zu fördern. Vermutet wird ferner, dass BDNF nicht nur von Neuronen, sondern auch von den Schwann-Zellen gebildet werden kann [Hemstead und Salzer, 2002].

Dieser für das PNS gut untersuchte Effekt der Neurotrophine ist vermutlich auch auf die Myelinisierung im ZNS übertragbar. So führte nach Nervverletzungen im Rückenmark die Instillation von BDNF und NT-3 zu einer erhöhten Proliferation der Oligodendrozyten [McTigue et al., 1998], was der 1. Phase der Myelinbildung im PNS entspricht. Cellerino et al. [1997] zeigten eine Hypomyelinisierung des Nervus opticus bei gleichgebliebener Anzahl der Axone an BDNF-gendefizienten Mäusen. In Übereinstimmung und ergänzend zu diesen Daten, zeigt die vorliegende Studie die Reduktion des Myelins und eines seiner Bestandteile, des Myelin Basic Proteins, im Gesamthirn der BDNF-gendefizienten Mäuse.

Als alternative Erklärung für den geringeren Myelingehalt der BDNF-gendefizienten Mäuse wäre die in der 2. Lebenswoche einsetzende Wachstumsredardation zu diskutieren, welche vor allem durch Probleme mit der Futteraufnahme verursacht wird. Der Prozess der Myelinisierung kann bei Mangelerkrankung empfindlich gestört werden [Chopra, 1991]. Bei den BDNF^{-/-} Mäusen zeigte sich jedoch im PNS, z.B. in Nervus facialis und Nervus ischiadicus, keine verminderte Myelinisierung [Cellerino et al., 1997]. Durch Malnutrition hervorgerufene Entwicklungsstörung der Myelinbildung würde jedoch ZNS und PNS in gleicher Weise betreffen [Chopra, 1991].

Ergänzt werden die Befunde der BDNF-gendefizienten Mäuse von *in-vitro*-Untersuchungen an primären Hippokampuskulturen. Nach mehrmaliger Behandlung dieser Kulturen mit BDNF zeigte sich eine deutliche Erhöhung der Proliferation und Differenzierung myelinbildender Oligodendrozyten.

Abschließend zeigen die Daten, dass sowohl im zentralen als auch im peripheren Nervensystem BDNF über die Oligodendrozyten bzw. Schwann-Zellen bei der Entwicklung des Myelins und der Remyelinisierung nach Verletzungen eine maßgebliche Rolle spielt. Die Myelinisierung ist bei den BDNF^{-/-} Mäusen so stark vermindert, dass die dadurch entstehende verzögerte oder fehlende neuronale Erregungsleitung mit zu dem frühen Sterben dieser Mäuse beitragen könnte.