

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Immunhistochemische Quantifizierung von Glutamat Decarboxylase mit 67 kDa (GAD67) – positiven Interneuronen

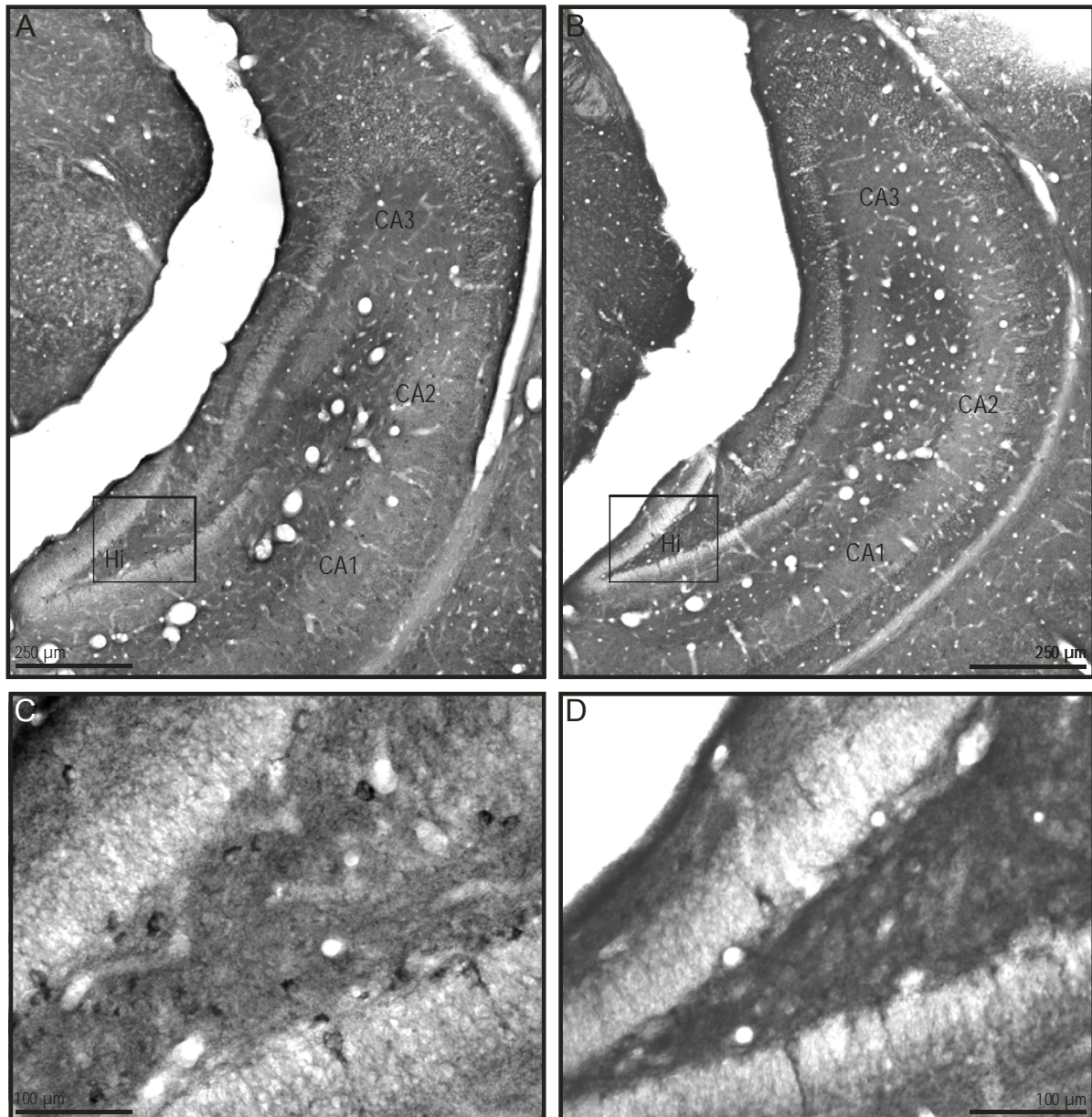
Um festzustellen, ob durch den BDNF Mangel GABAerge Interneurone reduziert sind, wurde im Hippocampus von BDNF Knock-out Mäusen und Wildtyp Tieren eine immunzytochemische Quantifizierung von GAD67-positiven Nervenzellen durchgeführt.

Zur Analyse wurden coronale Hirnschnitte aus der Hippocampusregion von P16 Mäusen verglichen. Die in Abbildung 4 dargestellten immunzytochemischen Färbungen gegen GAD67 zeigen einen Überblick über den Hippocampus und im Detail die Hilusregion.

Bei lichtmikroskopischer Untersuchung sind bei der durchgeführten immunzytochemischen Färbung eine entsprechende Anzahl an Neuronen im Hilus bei den Knock-out Mäusen, sowie den BDNF +/- Geschwistertieren zu erkennen.

Das Fehlen eines offensichtlichen Unterschiedes bei der immunzytochemischen Färbung weist auf eine vergleichbare Dichte GABAerger Interneurone im Hippocampus hin.

Aufgrund der hohen Dichte GABAerger Neurone in dieser Region und der Überlagerung der immunzytochemisch markierten Fasern der Neurone war eine Quantifizierung nicht möglich. Die vergleichbare Markierungsdichte kann jedoch als Indiz genommen werden, dass sich GABAerge Interneurone in BDNF -/- Mäusen normal entwickeln. Andere Ergebnisse aus unserem Labor bestätigen dies in Blot-Darstellungen von GABA [Große et al., 2005]. In der Diskussion wird darauf genauer eingegangen.



**Abbildung 4 - Immunzytochemische Darstellung von GAD67:**

Coronale Hirnschnitte von **BDNF+/+** (A/C) und **BDNF -/-** (B/D) Mäusen aus der Hippocampusregion wurden mit einem polyklonalen Erstantikörper gegen GAD67 und biotiniertem Ziege-gegen-Kaninchen IgG Zweitantikörper immunzytochemisch mittels der ABC-DAB/Ni-Technik markiert und verglichen. Gezeigt ist die ganze Hippocampusformation und vergrößert der Hilus. Bemerkenswert ist, dass das Vorkommen GAD67-positiver Neurone bei den Wildtyp- und den **BDNF -/-** Mäusen fast identisch ist.

**CA1:** CA1 Region, **CA2:** CA2 Region, **CA3:** CA3 Region, **Hi:** Hilus

Nach Analyse der GAD67 immunreaktiven Zellen ließ sich feststellen, dass die Dichte GABAerger Interneurone im Hippocampus von BDNF +/+ und -/- Geschwistertieren vergleichbar ist, und es wurde die Dichte folgender Interneurone untersucht:

### 3.2 Immunhistochemische Quantifizierung von NPY – positiven Interneuronen

Coronale Serienschritte des Gehirns von P16-Geschwisterpaaren wurden mit einem Antikörper gegen NPY gefärbt. Anschließend wurden die NPY-positiven Nervenzellen in den einzelnen Regionen ausgezählt.

Die in Abbildung 5 dargestellten Färbungen mit einem Antikörper gegen NPY stammen von P16 BDNF +/+ und BDNF -/- Geschwistertieren. Die Aufnahmen zeigen den gesamten Hippocampus, die Hilusregion und Details der CA1-Region.

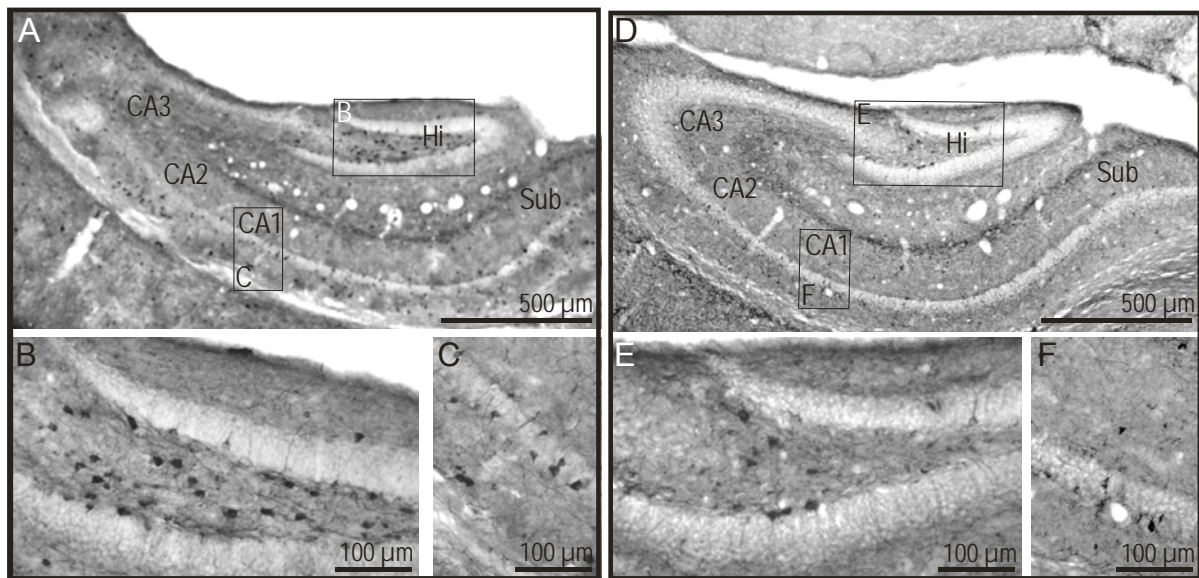
In der Abbildung 6 wird die Dichte der NPY-positiven Neurone für die entsprechend untersuchte Hirnregion in BDNF +/+ und BDNF -/- Tieren gezeigt. Es wurden jeweils 3 Geschwisterpaare untersucht. Von jedem Tier wurden 12 Schnitte pro Gehirn verwendet. Im einzelnen Schnitt wurden die NPY-positiven Nervenzellen in der jeweiligen Region in einem Bereich von 90 000  $\mu\text{m}^2$  gezählt. Im Hilus wurde nur ein 45 000  $\mu\text{m}^2$  großer Bereich ausgezählt.

Bei BDNF Knock-out Mäusen war im Hilus des Hippocampus die Dichte an NPY immunreaktiver - Zellen, angegeben in Neuronen pro Abschnitt, im Vergleich zu den Wildtypmäusen drastisch reduziert. In der CA1-, sowie CA3 Region konnte eine moderate, jedoch ebenfalls signifikante Verminderung der Dichte von NPY positiven Zellen gefunden wurde.

Diese Daten weisen darauf hin, dass durch BDNF die Menge an NPY- Neuronen in Abhängigkeit von der Hirnregion signifikant reduziert wird.

**Tabelle 1: Mittelwerte der Anzahl NPY positiver Nervenzellen pro definierte Fläche  $\pm$  der Standardabweichung**

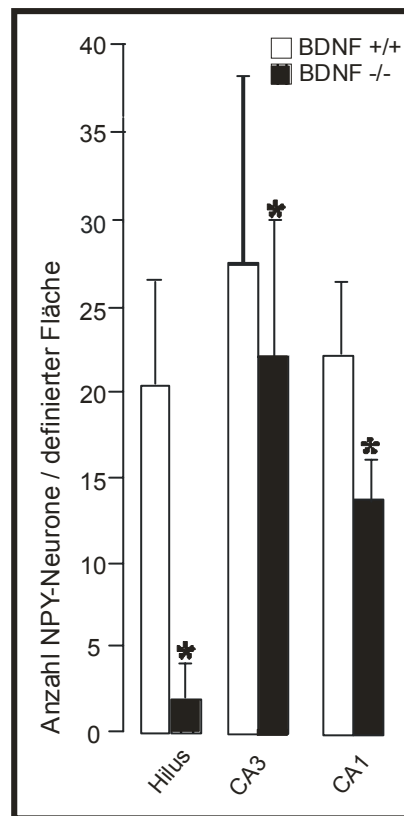
	BDNF +/+	BDNF -/-
Hilus	20,5 $\pm$ 6,1	2 $\pm$ 2,1
CA3	27,7 $\pm$ 10,8	22,1 $\pm$ 7,9
CA1	22 $\pm$ 4,2	13,6 $\pm$ 2,4



**Abbildung 5 - Immunzytochemische Darstellung von NPY:**

Coronale Serienschnitte von **BDNF+/+** (A/B/C) und **BDNF-/-** (D/E/F) Mäusen aus der Hippocampusregion wurden mit einem polyklonalen Erstantikörper gegen NPY und biotiniertem Ziege-gegen-Kaninchen IgG Zweitantikörper immunzytochemisch mittels der ABC-DAB/Ni-Technik markiert und verglichen. Die mikroskopischen Aufnahmen stammen von P16 BDNF +/+ und BDNF -/- Geschwistertieren und zeigen den gesamten Hippocampus, den Hilus und Details der CA1 Region. Der stärkste Unterschied findet sich im Hilus, wo bei BDNF -/- Mäusen die Dichte der Neuronen stark reduziert ist.

**Sub:** Subiculum, **CA1:** CA1 Region, **CA2:** CA2 Region, **CA3:** CA3 Region, **Hi:** Hilus



**Abbildung 6 - Anzahl NPY immunreaktiver Nervenzellen pro definierter Fläche**

Die Anzahl NPY positiver Nervenzellen wurde in der Hilusregion in einem Bereich von 45 000  $\mu\text{m}^2$ , der CA3-Region und der CA1-Region in einem Bereich von je 90 000  $\mu\text{m}^2$  bei BDNF +/+ und BDNF -/- Mäusen ermittelt.

Die Werte ergeben sich aus jeweils 3 Geschwisterpaaren und werden als Mittelwert  $\pm$  der Standardabweichung gezeigt. Zur statistischen Analyse wurde der Student's t-Test verwendet.

\*  $p$ -Wert < 0,05 = signifikant

### 3.3 Immunhistochemische Quantifizierung von Somatostatin – positiven Interneuronen

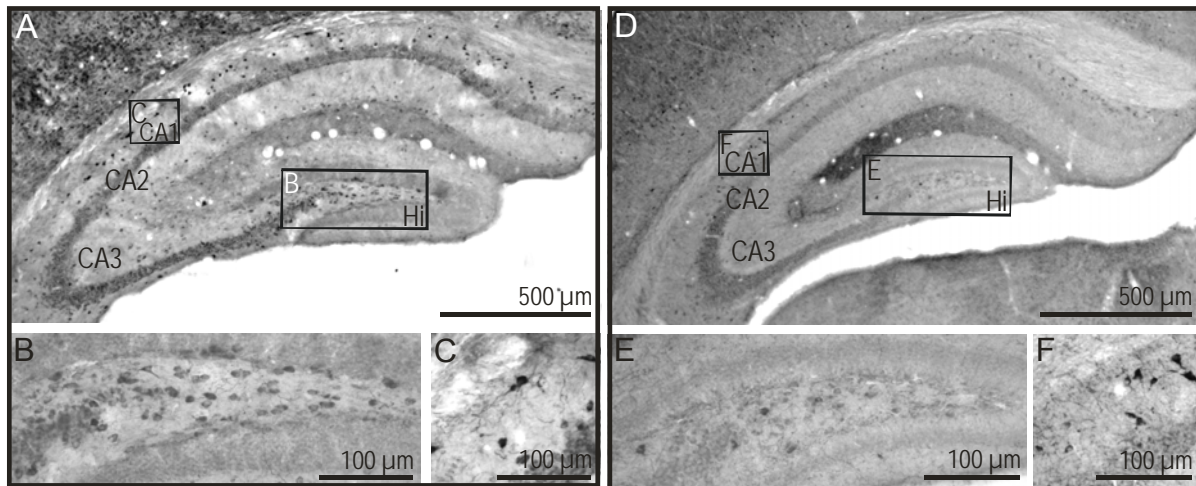
Zur quantitativen Auswertung Somatostatin-positiver Neurone im Hippocampus von BDNF +/+ und BDNF -/- Mäusen wurden coronale Serienschritte dieser Region von P16 Geschwistern mit einem polyklonalen Antikörper gegen Somatostatin gefärbt und die Somatostatin-positiven Zellen wurden in jedem Schnitt gezählt. Die mikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 7 zeigen die immunzytochemische Darstellung von Somatostatin von P16 BDNF +/+ und BDNF -/- Geschwister-Tieren; den gesamten Hippocampus und Details der Hilusregion, sowie der CA1 Region. In der Abbildung 8 wird die Dichte der Somatostatin-positiven Nervenzellen in der jeweilig benannten Hirnregion bei BDNF +/+ (leerer Balken) und BDNF -/- (schwarzer Balken) gezeigt.

Die Werte ergeben sich aus jeweils 3 Geschwisterpaaren  $\pm$  der Standardabweichung. Je Tier wurden 12 Schnitte pro Gehirn untersucht. In jedem Schnitt wurden die Somatostatin-positiven Neurone in der jeweiligen Region in einem Bereich von 90 000  $\mu\text{m}^2$  gezählt. Im Hilus wurde ein 45 000  $\mu\text{m}^2$  großer Bereich ausgezählt.

Das Fehlen von BDNF verursacht eine starke Reduktion der Dichte von Somatostatin - immunreaktiven Zellen vor allem in der Hilusregion des Hippocampus, aber auch in der CA3 Region. Die Dichte von Somatostatin positiven Neuronen in der CA1 Region von BDNF -/- Mäusen war dagegen nicht verändert. Im Subiculum ließ sich eine höhere Dichte an Somatostatin positiven Neuronen nachweisen.

**Tabelle 2: Mittelwerte der Anzahl Somatostatin positiver Nervenzellen pro definierte Fläche  $\pm$  der Standardabweichung**

	BDNF +/+	BDNF -/-
Hilus	24,3 $\pm$ 5,6	8,4 $\pm$ 2,9
CA3	51,3 $\pm$ 10,8	28,1 $\pm$ 15,3
CA1	10,9 $\pm$ 3,5	9,8 $\pm$ 3,6
Subiculum	26,1 $\pm$ 1,4	32,7 $\pm$ 2,5



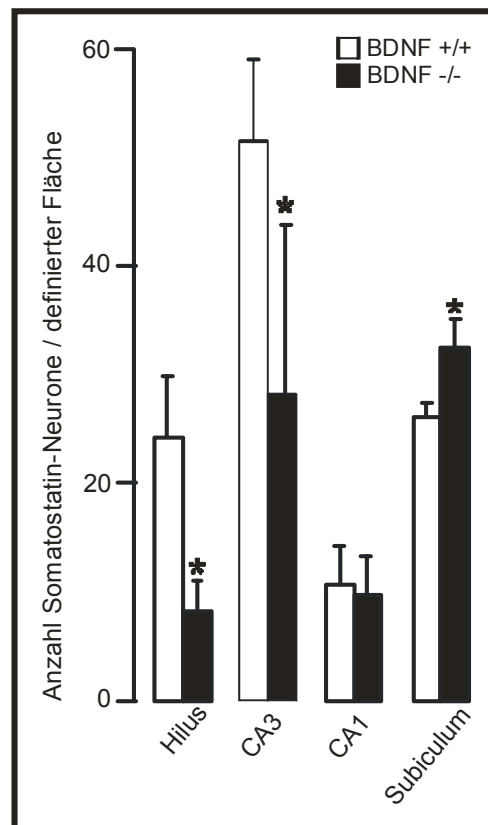
**Abbildung 7 - Immunzytochemische Darstellung von Somatostatin:**

Coronale Serienschnitte von **BDNF+/+** (A/B/C) und **BDNF -/-** (D/E/F) Mäusen aus der Hippocampusformation wurden mit einem polyklonalen Erstantikörper gegen Somatostatin und biotiniliertem Ziege-gegen-Kaninchen IgG Zweitantikörper immunzytochemisch mittels der ABC-DAB/Ni-Technik markiert und verglichen.

Die mikroskopischen Aufnahmen stammen von P16 BDNF +/+ und BDNF -/- Geschwistern und zeigen den gesamten Hippocampus, den Hilus und Details der CA1 Region.

Bei BDNF -/- Mäusen ist die Anzahl an Neuronen in den Regionen Hilus und CA3 vermindert, jedoch in der CA1 Region unverändert.

**CA1:** CA1 Region, **CA2:** CA2 Region, **CA3:** CA3 Region, **Hi:** Hilus



**Abbildung 8 - Anzahl Somatostatin immunreaktiver Nervenzellen pro definierter Fläche**

Die Anzahl Somatostatin positiver Nervenzellen wurde in der Hilusregion in einem Bereich von  $45\ 000\ \mu\text{m}^2$ , der CA3-, der CA1-Region und der Subiculumregion in einem Bereich von je  $90\ 000\ \mu\text{m}^2$  bei BDNF +/+ und BDNF -/- Mäusen ermittelt.

Die Werte ergeben sich aus jeweils 3 Geschwisterpaaren und werden als Mittelwert  $\pm$  der Standardabweichung gezeigt. Zur statistischen Analyse wurde Student's t-Test verwendet.

\* p-Wert < 0,05 = signifikant



### 3.4 Immunhistochemische Quantifizierung von Parvalbumin – positiven Interneuronen

Parvalbumin exprimierende Zellen bilden ebenfalls eine Untergruppe GABAerger Neurone. Ihre strukturellen Charakteristika sind denen identisch, die für hemmende hippocampale Nervenzellen bekannt sind. Sie spielen eine Rolle in verschiedenen hemmenden Regelkreisen: anterograder, wie retrograder Hemmung und Enthemmung [Nitsch et al., 1990].

Zur quantitativen Auswertung der Parvalbumin-positiven Neurone im Hippocampus von BDNF  $+/+$  und BDNF  $-/-$  Mäusen wurden coronale Serienschritte des Hippocampus von P15 Geschwistertieren mit einem polyklonalen Antikörper gegen Parvalbumin gefärbt und die Parvalbumin-positiven Neurone wurden in jedem Schnitt gezählt. Die mikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 9 sind immunzytochemische Darstellungen von Parvalbumin von P15 BDNF  $+/+$  und BDNF  $-/-$  Geschwistertieren und zeigen als Übersicht den Hippocampus und Details der Hilusregion und der Subiculum Region. Abbildung 10 zeigt graphisch die Anzahl an Parvalbumin-positiven Neuronen in der jeweiligen Hippocampusregion bei BDNF  $+/+$  (leerer Balken) und BDNF  $-/-$  (schwarzer Balken).

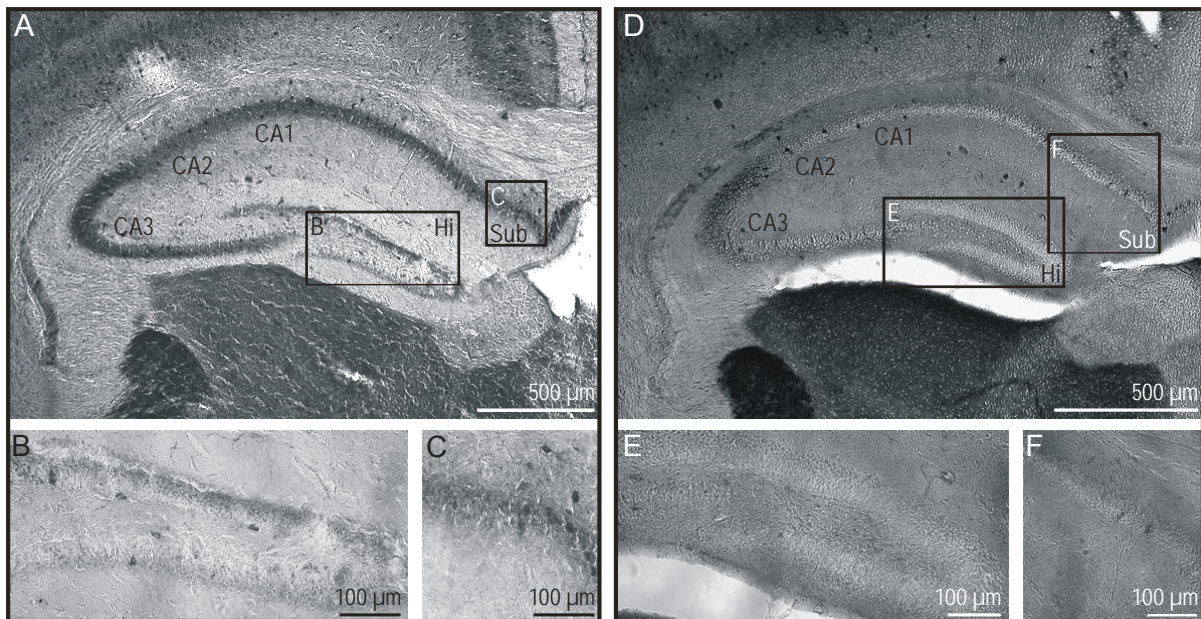
Die Werte ergeben sich aus jeweils 3 Geschwisterpaaren  $\pm$  der Standardabweichung. Je Tier wurden 12 Schnitte pro Gehirn verwendet. In jedem Schnitt wurden die Parvalbumin-positiven Nervenzellen in der jeweiligen Region in einem Bereich von 90 000  $\mu\text{m}^2$  gezählt. Im Hilus wurde ein 45 000  $\mu\text{m}^2$  großer Bereich ausgezählt.

Bei BDNF  $-/-$  Mäusen ist die Anzahl an Neuronen in den Regionen Hilus und CA1/CA3 vermindert, jedoch in der Subiculum Region unverändert.

Die Dichte von Parvalbumin immunreaktiven Zellen war bei BDNF  $-/-$  Mäusen verglichen mit den Wildtyp-Geschwistertieren ebenfalls in den verschiedenen Hippocampus Regionen signifikant reduziert. Innerhalb des Hippocampus trat in der CA1/CA3 Region eine über 50%ige Reduktion durch den BDNF Mangel auf. Überraschenderweise konnte im benachbarten Subiculum keine Veränderungen bei den Parvalbumin positiven Neuronen beobachtet werden.

**Tabelle 3: Mittelwerte der Anzahl Parvalbumin positiver Nervenzellen pro definierte Fläche  $\pm$  der Standardabweichung**

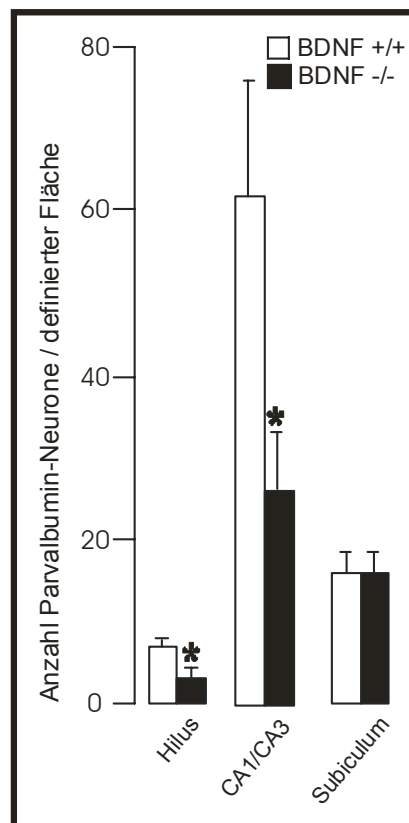
	BDNF +/+	BDNF -/-
Hilus	6,7 $\pm$ 1,1	2,7 $\pm$ 1,6
CA1 / CA3	62,4 $\pm$ 13,6	26,4 $\pm$ 6,6
Subiculum	15,8 $\pm$ 2,7	15,8 $\pm$ 2,3



**Abbildung 9 - Immunzytochemische Darstellung von Parvalbumin:**

Coronale Serienschnitte von **BDNF+/+** (A/B/C) und **BDNF-/-** (D/E/F) Mäusen aus der Hippocampusregion wurden mit einem polyklonalen Erstantikörper gegen Parvalbumin und biotiniliertem Ziege-gegen-Kaninchen IgG Zweitantikörper immunzytochemisch mittels der ABC-DAB/Ni-Technik markiert und verglichen. Die mikroskopischen Aufnahmen stammen von P16 BDNF +/+ und BDNF -/- Geschwistertieren und zeigen den Hippocampus, den Hilus und Details der Subiculum Region. Bei BDNF -/- Mäusen ist die Anzahl an Neuronen in den Regionen Hilus und CA1/CA3 vermindert, jedoch in der Subiculum Region unverändert.

**Sub:** Subiculum, **CA1:** CA1 Region, **CA2:** CA2 Region, **CA3:** CA3 Region, **Hi:** Hilus



**Abbildung 10 - Anzahl Parvalbumin immunreaktiver Nervenzellen pro definierter Fläche**

Die Anzahl Parvalbumin positiver Nervenzellen wurde in der Hilusregion in einem Bereich von  $45\ 000\ \mu\text{m}^2$ , der CA1- und der CA3-Region, sowie der Subiculumregion in einem Bereich von je  $90\ 000\ \mu\text{m}^2$  bei BDNF +/+ und BDNF -/- Mäusen ermittelt.

Die Werte ergeben sich aus jeweils 3 Geschwisterpaaren und werden als Mittelwert  $\pm$  der Standardabweichung gezeigt. Zur statistischen Analyse wurde Student's t-Test verwendet.

- $p\text{-Wert} < 0,05 = \text{signifikant}$

### 3.5 Immunhistochemische Quantifizierung von Calretinin – positiven Interneuronen

Zur quantitativen Auswertung der Calretinin-positiven Neurone im Hippocampus von BDNF +/+ und BDNF -/- Mäusen wurden coronale Serienschritte des Hippocampus von P15 Geschwistern mit einem polyklonalen Antikörper gegen Calretinin gefärbt und die Calretinin-positiven Neurone wurden in jedem Schnitt gezählt.

Die mikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 11 zeigen die immunzytochemische Darstellung von Calretinin von P15 BDNF +/+ und BDNF -/- Geschwistertieren als Übersicht den ganzen Hippocampus sowie Details des Hilus und der Subiculum-Region. Die Menge Calretinin-positiver Neurone in der jeweils benannten Hippocampusregion bei BDNF +/+ (leerer Balken) und BDNF -/- (schwarzer Balken) wird in Abbildung 12 dargestellt.

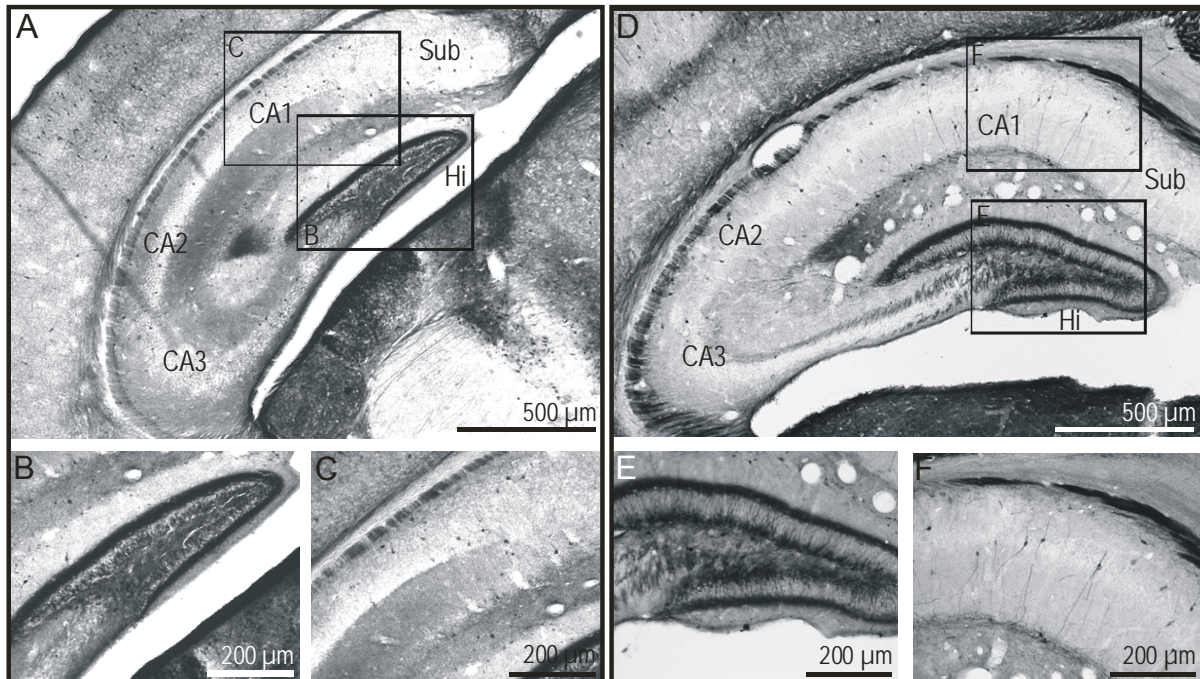
Die Werte ergeben sich aus jeweils 3 Geschwisterpaaren  $\pm$  der Standardabweichung. Von jedem Tier wurden 12 Schnitte pro Gehirn untersucht. In jedem Schnitt wurden die Calretinin-positiven Nervenzellen in der jeweiligen Region in einem Bereich von 90 000  $\mu\text{m}^2$  gezählt. Im Hilus wurde nur ein 45 000  $\mu\text{m}^2$  großer Abschnitt ausgezählt.

Bei BDNF -/- Mäusen war die Dichte von Calretinin markierten Neuronen in allen untersuchten Regionen unverändert oder gestiegen. Die Tendenz eines Anstiegs wurde im Hilus des Gyrus dentatus, sowie etwas stärker in der CA3 Region beobachtet, jedoch erhielt man signifikante Werte nur in der CA1 Region des Hippocampus.

Eine reduzierte Dicke des Kortex wurde bei allen Präparationen von BDNF -/- Mäusen beobachtet und könnte die höhere Dichte von Calretinin positiven Zellen erklären, unter der Annahme, dass deren totale Anzahl als Reaktion auf die BDNF Verarmung konstant bleibt.

**Tabelle 4: Mittelwerte der Anzahl Calretinin positiver Nervenzellen pro definierte Fläche  $\pm$  der Standardabweichung**

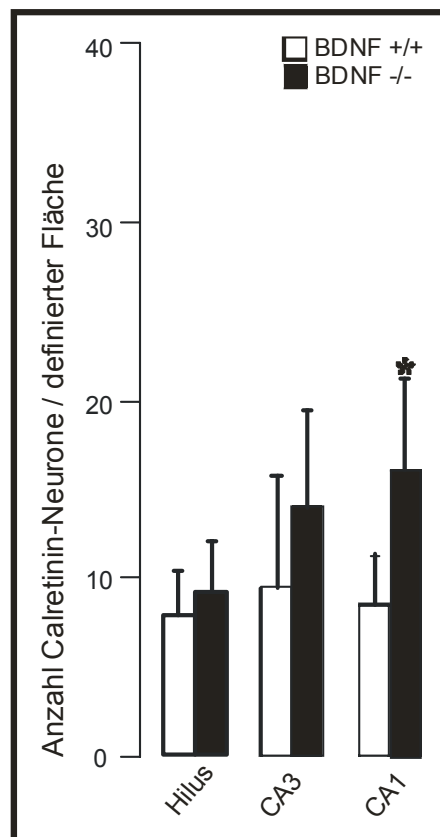
	BDNF +/+	BDNF -/-
Hilus	8,3 $\pm$ 2,5	9,7 $\pm$ 3,1
CA3	9,8 $\pm$ 3,0	14,1 $\pm$ 2,4
CA1	8,5 $\pm$ 2,6	15,9 $\pm$ 2,3



**Abbildung 11 - Immunzytochemische Darstellung von Calretinin:**

Coronale Serienschritte von **BDNF+/+** (A/B/C) und **BDNF-/-** (D/E/F) Mäusen aus der Hippocampusregion wurden mit einem polyklonalen Erstantikörper gegen Calretinin und biotiniertem Ziege-gegen-Kaninchen IgG Zweitantikörper immunzytochemisch mittels der ABC-DAB/Ni-Technik markiert und verglichen. Die mikroskopischen Aufnahmen stammen von P15 BDNF +/+ und BDNF -/- Geschwistertieren und zeigen den gesamten Hippocampus, den Hilus und Details der CA1 Region. Während bei BDNF -/- Mäusen keine Veränderungen in der Menge von Calretinin Nervenzellen in der Hilus Region beobachtet werden konnten, zeigte sich ein leichter Zuwachs im Bereich der CA3 Region. Die deutlich stärkste Zunahme konnte im Bereich der CA1 Region aufgezeichnet werden.

**Sub:** Subiculum, **CA1:** CA1 Region, **CA2:** CA2 Region, **CA3:** CA3 Region, **Hi:** Hilus



**Abbildung 12 - Anzahl Calretinin immunreaktiver Nervenzellen pro definierter Fläche**

Die Anzahl Calretinin positiver Nervenzellen wurde in der Hilusregion in einem Bereich von  $45\,000\ \mu\text{m}^2$ , der CA1-Region und der CA3-Region in einem Bereich von je  $90\,000\ \mu\text{m}^2$  bei BDNF +/+ und BDNF -/- Mäusen ermittelt.

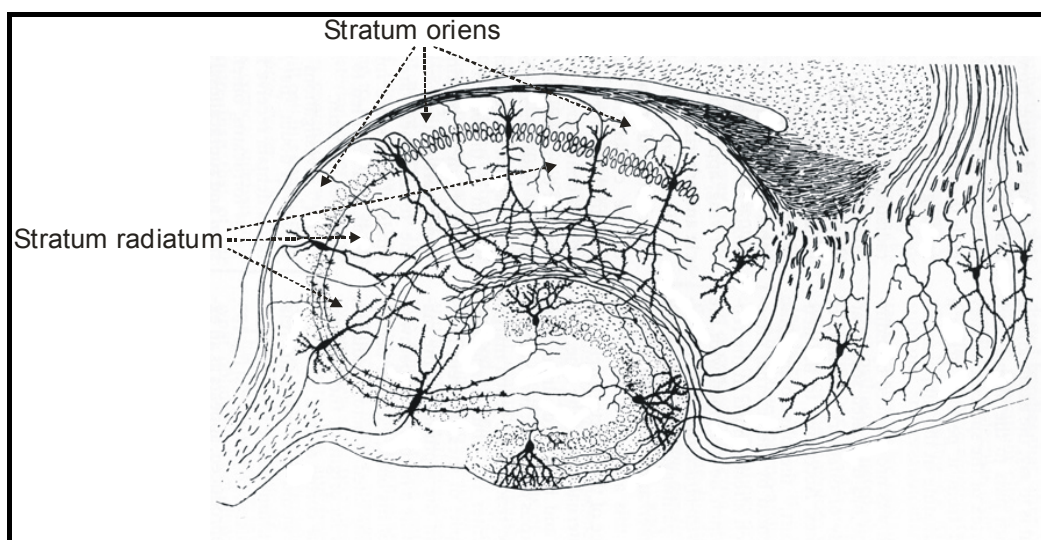
Die Werte ergeben sich aus jeweils 3 Geschwisterpaaren und werden als Mittelwert  $\pm$  der Standardabweichung gezeigt. Zur statistischen Analyse wurde Student's t-Test verwendet.

\*  $p$ -Wert  $< 0,05$  = signifikant

### 3.6 Immunhistochemische Quantifizierung von Calbindin – positiven Interneuronen

Das Calcium-bindende Protein Calbindin findet sich physiologischerweise sowohl in glutamatergen, als auch in GABAergen Nervenzellen.

Mittels eines Antikörpers gegen Calbindin markierte GABAerge Neurone befinden sich in verschiedenen Schichten des Hippocampus, dem Stratum oriens und die für unsere Untersuchung relevanten im Stratum radiatum, welche quantifiziert wurden.



**Abbildung 13 - Stratum oriens und Stratum radiatum im Hippocampus**  
in Anlehnung an „Schematische Zeichnung des Hippocampus“ von Ramón y Cajal(1911)

Coronale Serienschritte des Gehirns von P15-Geschwisterpaaren wurden mit einem monoklonalen Antikörper gegen Calbindin gefärbt. Die mikroskopischen Aufnahmen der Abbildung 14, der immunzytochemische Darstellung von Calbindin zeigen den Hippocampus von P15 BDNF +/+ und BDNF -/- Geschwistern.

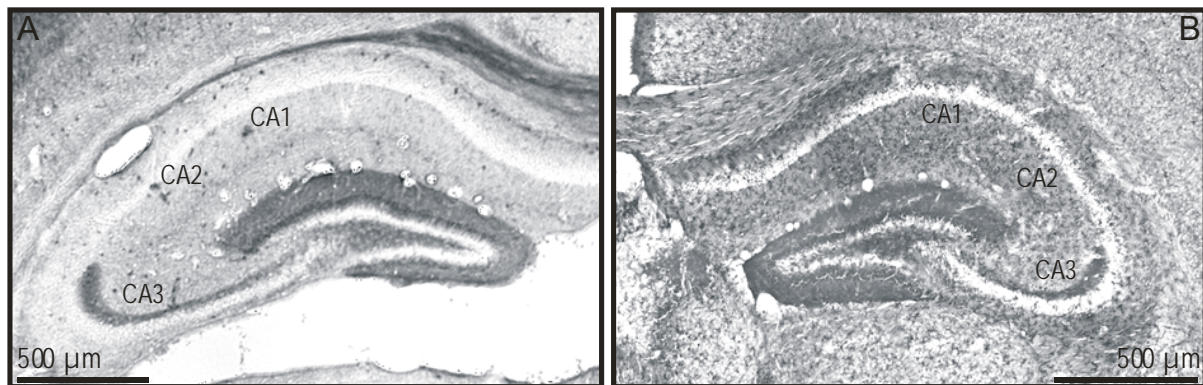
Die Werte ergeben sich aus jeweils 3 Geschwisterpaaren  $\pm$  der Standardabweichung. Von jedem Tier wurden 12 Schnitte pro Gehirn untersucht. In jedem Schnitt wurden die Calbindin-positiven Nervenzellen in der jeweiligen Region in einem Bereich von 90 000  $\mu\text{m}^2$  gezählt.

Im Stratum radiatum der untersuchten Hippocampus Regionen CA1/CA2/CA3 konnten keine Unterschiede in der Dichte an Calbindin immunreaktiven Neuronen zwischen BDNF Knock-out Mäusen und den entsprechenden Wildtyp Geschwistertieren gefunden werden.



**Tabelle 5: Mittelwerte der Anzahl Calbindin positiver Nervenzellen pro definierte Fläche  $\pm$  der Standardabweichung**

	BDNF +/+	BDNF -/-
Stratum radiatum CA1	8,8 $\pm$ 2,2	9,4 $\pm$ 1,6
Stratum radiatum CA2	9,5 $\pm$ 1,7	9,8 $\pm$ 1,5
Stratum radiatum CA3	10,4 $\pm$ 2,2	10,1 $\pm$ 1,6



**Abbildung 14 - Immunzytochemische Darstellung von Calbindin:**

Coronalschnitte von **BDNF+/+** (A) und **BDNF -/-** (B) Mäusen in Höhe des Hippocampus wurden mit einem monoklonalen Erstantikörper gegen Calbindin und biotiniertem Pferde-gegen-Maus IgG Zweitantikörper immunzytochemisch mittels der ABC-DAB/Ni-Technik markiert und verglichen.

Es konnten bei BDNF-Knock-out Mäusen keine Veränderungen in der Dichte an Calbindin Nervenzellen beobachtet werden.