

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Versuchstiere**

Verwendet wurden 103 weibliche C57/BL6 Mäuse, die von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen worden waren. Das Alter der Mäuse betrug zu Beginn des Experiments 6 Wochen (mit Ausnahme der vier schon an Tag P7 getöteten Mäuse) und ihr Gewicht lag zwischen 19-24 g.

### **2.2 Versuchsaufbau und –bedingungen**

#### ***2.2.1 Allgemeine Tierhaltungsbedingungen***

Der Raum, in dem alle Tiere während des gesamten Experiments untergebracht waren, wurde abgedunkelt und täglich von 6-18 Uhr künstlich beleuchtet, um für die gesamte Dauer des Experiments stets die selben Beleuchtungsbedingungen zu erhalten. Die Mäuse bekamen Wasser und Nahrung ad libitum. Die wöchentliche Säuberung des Käfigs beinhaltete eine Reinigung mit Haushaltsreiniger und klarem Wasser und einen Austausch des Streu.

#### ***2.2.2 Experimentelles Design***

Zu Beginn des Experiments (Tag 1) wurden die Mäuse zufällig einer der verschiedenen Haltungsbedingungen zugeteilt. Um die altersabhängige CR-Expression zu bestimmen (Zeitreihenexperiment), wurden 30 Mäuse in sechs Gruppen aufgeteilt, die jeweils zu sechs verschiedenen Zeitpunkten (4 Stunden, 1 Tag, 3 Tage, 1 Woche, 2,5 Wochen und 4 Wochen) nach einer einzelnen BrdU Injektion (siehe unten) getötet und anschließend perfundiert wurden. Weitere vier Mäuse wurden bereits am siebten postnatalen Tag (P7) getötet und perfundiert.

52 Tiere wurden wie folgt den verschiedenen experimentellen Bedingungen zugeteilt: jeweils 12 Mäuse in der Läufergruppe (Runner) und der dazugehörigen Kontrollgruppe; je 8 Mäuse in der *enriched environment*-Gruppe (Enriched) und der entsprechenden Kontrollgruppe; je 6 Mäuse in der Kainatgruppe (Kainat) und der dazugehörigen Kontrollgruppe. (Aufgrund der begrenzten Kapazität des Tierhauses, wurden diese drei Paradigmen zeitlich nacheinander untersucht, so dass jede

experimentelle Bedingung eine eigene Kontrollgruppe erhielt). Alle 52 Tiere erhielten innerhalb der ersten Woche täglich eine BrdU-Injektion (siehe unten) und wurden vier Wochen nach der letzten Injektion getötet.

Die übrigen 17 Tiere wurden ebenso zufällig auf die drei hier zur Anwendung gebrachten experimentellen Bedingungen verteilt: Davon wurden 7 Mäuse der *Runner*-Gruppe, 4 der Kainatgruppe und 6 der Kontrollgruppe zugeordnet. Diese 17 Tiere wurden bereits einen Tag nach einwöchiger BrdU-Injektion getötet.

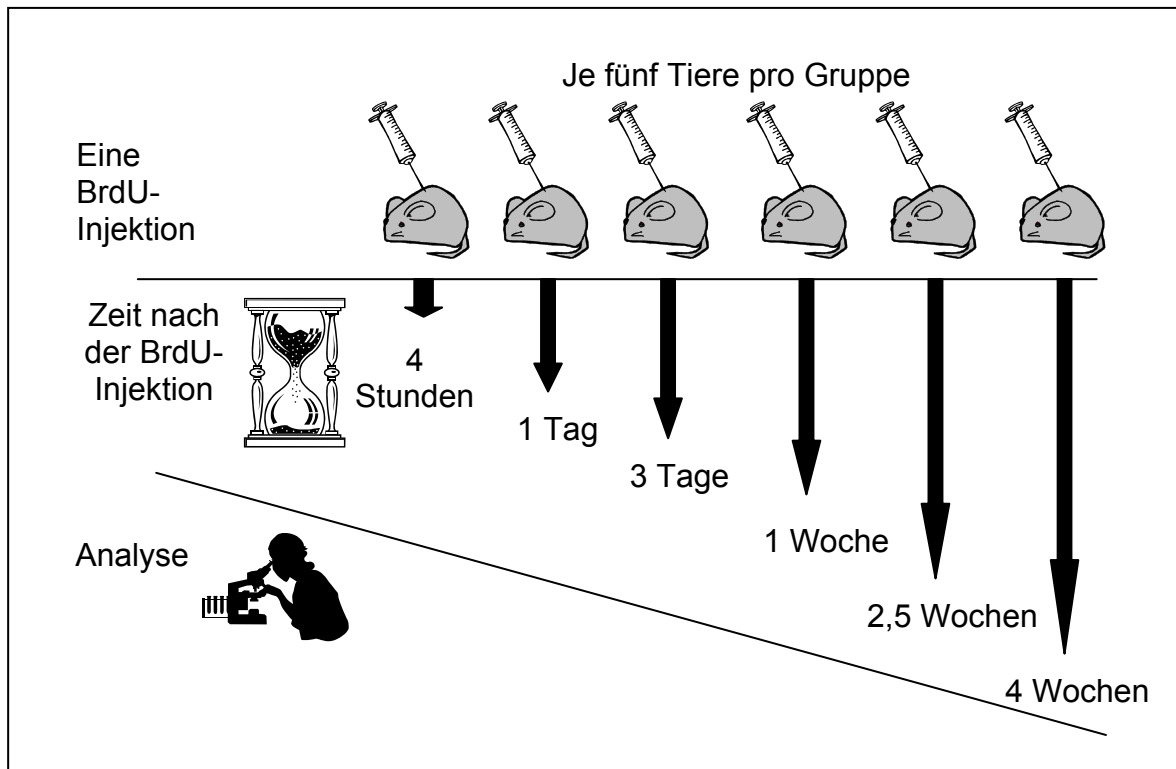


Abb. 3: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Untersuchung der phasenspezifischen Proteinexpression in neu entstandenen Zellen unterschiedlichen Alters.

### 2.2.3 Bedingungen einer reizreichen Lebensumgebung

Die Mäuse, die in einer reizreichen Lebensumgebung (*enriched environment*) lebten, wurden in eigens angefertigten Tierkäfigen mit einer Grundfläche von 80 cm x 80 cm gehalten (Werkstatt des MDC, Herr Kagelmaker, MDC Berlin-Buch). Um das Explorationsverhalten der Tiere zu steigern, wurden die Käfige mit verschiedenen Gegenständen ausgestattet: So befanden sich dort zu Labyrinthen zusammengesteckte Kunststoffröhren, deren räumliche Konfiguration 1-2 mal wöchentlich variiert wurde, handelsübliche Zellstofftücher, die von den Tieren zum Nestbau verwendet wurden, sowie Metallbestandteile gewöhnlicher Tierkäfige, die als Klettergerüst fungierten. Bei der wöchentlichen Säuberung des Käfigs wurden die Zellstofftücher ausgetauscht, die Kunststoffröhren und Metallteile gereinigt und in einer neuen Variante im Käfig arrangiert.

Da sich das *enriched environment* nicht nur durch eine abwechslungsreiche Umgebung von den Haltungsbedingungen im gewöhnlichen Laborkäfig unterscheidet, sondern dieses Paradigma auch eine gesteigerte soziale Interaktion zwischen den Tieren beinhaltet, lebten alle acht Mäuse gemeinsam in diesem Käfig. Die Pflege und Ernährung der ENR Mäuse unterschied sich nicht von der der anderen Gruppen.

Die Haltungsbedingungen in diesem Experiment entsprachen im Wesentlichen den früherer Studien (Kempermann et al., 1997).



Abb. 4: Das „enriched environment“. Den Mäusen wurde durch Kunststoffröhren und „Klettergerüste“, eine reizreiche Lebensumgebung dargeboten, die es jede Woche neu zu explorieren galt.

### **2.2.4 Standardlaborbedingungen**

Die Tiere, die als Kontrolltiere gehalten wurden, lebten jeweils zu zweit in Standardtierkäfigen. Diese Käfige enthielten nur Streu und den üblichen Träger für Wasser und Futter. Die Kontrollmäuse lebten für die gesamte Dauer des Experiments im selben Käfig und wurden unter den gleichen Voraussetzungen wie die anderen Gruppen gepflegt und ernährt.

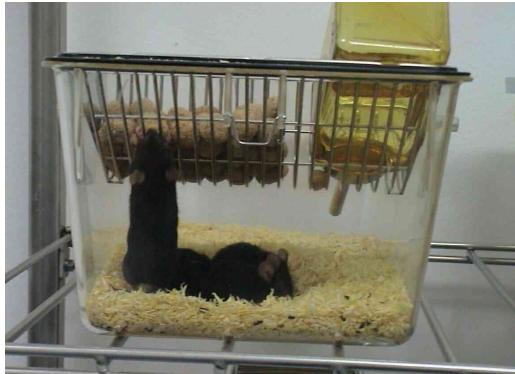


Abb. 5: Ein normaler Standardkäfig, wie er als Unterbringung der Kontrolltiere dieser Studie verwendet wurde.

### **2.2.5 Bedingungen körperlicher Aktivität (Runner)**

Die Mäuse, die während des Experiments die Möglichkeit haben sollten, körperlich aktiver zu sein als die Kontrolltiere, lebten in Standardlaborkäfigen, die zusätzlich mit einem Laufrad ausgestattet wurden. Beobachtungen konnten zeigen, dass die nachtaktiven Tiere besonders während der Dunkelphase die Option der körperlichen Aktivität nutzten. Auch die Mäuse dieser Gruppe waren jeweils zu zweit in einem Käfig untergebracht.

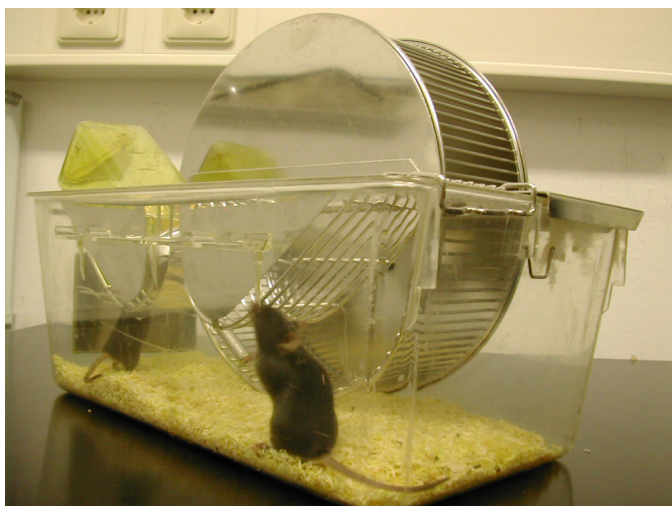


Abb. 6:

Ein im Standardlaborkäfig installiertes Laufrad gab den Mäusen dieser Gruppe (Runner) die Möglichkeit, vermehrt körperlich aktiv zu werden. Besonders während der Dunkelphasen wurde von dieser Option Gebrauch gemacht.

### **2.2.6 Auslösung von Krampfanfällen durch Kainsäureinjektion**

Die Tiere der Kainat-Gruppe (Kainat) erhielten an Tag 0, einen Tag vor der einwöchigen BrdU-Gabe, 30 mg/kg Körpergewicht des Glutamatrezeptoragonisten Kainat (KA, Sigma, Deisenhofen). Der zu verabreichende Stoff wurde in 0,1 M Phosphatpuffer (PBS) gelöst und einmalig intraperitoneal injiziert. Für das Experiment wurden nur die Mäuse verwendet, die nach der Injektion eine anhaltende konvulsive Krampfaktivität zeigten.

### **2.2.7 BrdU**

#### **2.2.7.1 Allgemeines**

Das Thymidin-Analogon 2-Bromo-5-desoxyuridin (BrdU, Sigma, Deisenhofen) wird während der S-Phase des Zellzyklus in die DNA sich teilender Zellen integriert. Auf Grund der kurzen Bioverfügbarkeit kann man davon ausgehen, dass BrdU nur in die DNA der Zellen eingebaut wird, die sich im Moment der Applikation in der S-Phase befinden. Da BrdU mittels spezifischer Antikörper immunhistochemisch im Zellkern nachgewiesen werden kann, ist es möglich, eine retrospektive Aussage über die Teilungsaktivität bestimmter Zellen zu machen (Nowakowski et al., 1989; Kuhn et al., 1996). BrdU-markierte Zellen geben bei jeder weiteren Mitose die Markierung an ihre Tochterzellen ab, so dass BrdU auch nach abgeschlossener Differenzierung der Zelle, selbst ein Jahr nach der initialen Zellteilung, nachweisbar ist (Kempermann et al., 2003).

#### **2.2.7.2 Applikation**

BrdU wurde bei -20°C gelagert und am Morgen der Injektion frisch in 0,9% NaCl-Lösung gelöst (20 mg BrdU pro 1 ml NaCl). Das korrekte Injektionsvolumen (50 mg/kg Körpergewicht) wurde täglich für jede Maus in Abhängigkeit des Körpergewichts bestimmt. Die BrdU-Lösung wurde konstant gegen 10 Uhr morgens intraperitoneal injiziert. Die korrekte Platzierung der Kanülenspitze wurde durch Aspiration vor dem Spritzen geprüft.

## **2.3 Gewebepräparation**

### **2.3.1 Narkose**

Die Mäuse wurden durch eine intraperitoneal applizierte Überdosis des Injektionsnarkotikums Ketamin getötet und im direkten Anschluss perfundiert.

### **2.3.2 Perfusion**

Um zufriedenstellende Ergebnisse bei der Immunhistochemie und der Fluoreszenzmikroskopie zu gewährleisten, muss das zu untersuchende Gewebe fixiert werden. Die effektivste Methode, um dies zu erreichen, ist eine Spülung des großen Kreislaufs mit frisch hergestelltem 4% Paraformaldehyd in kaltem 0,1M Phosphatpuffer.

Für die Perfusion wurden die Mäuse zunächst sternotomiert und anschließend der linke Ventrikel sowie der rechte Vorhof des Herzens mit einer Kanüle punktiert. Mit Hilfe einer Pumpe und einem im linken Ventrikel platzierten Infusionsbesteck wurde zunächst das Blut des großen Kreislaufs mit physiologischer NaCl-Lösung herausgespült. Anschließend wurde das Gewebe mit 100 ml der Paraformaldehydlösung perfundiert.

### **2.3.3 Entnahme des Gehirns**

Im direkten Anschluß an die Perfusion wurden die Mäuse dekapitiert. Um das komplette Gehirn aus der Schädelhöhle zu heben, wurde der Schädelknochen entlang der Schädelnähte durchschnitten.

### **2.3.4 Nachfixierung**

Nach der Extraktion der Gehirne wurden diese bei 4°C für 24 Std. in 4% Paraformaldehyd in 0,1M Phosphatpuffer fixiert. Das sich in den Zellen befindende Wasser führt beim Einfrieren des Gewebes zu einer irreversiblen Zerstörung der Zellen. Um dies zu verhindern wurde den Gehirnen durch Lagerung in 30% Sucrose-Lösung (72 Std. bei 4°C) osmotisch Wasser entzogen.

### ***2.3.5 Anfertigung und Lagerung von Schnittserien der Gehirne***

Nach Abtrennung des Kleinhirns und des vorderen Endes des Bulbus olfactorius, wurden die Gehirne einzeln, auf einem mit Trockeneis gekühlten Kupferblock platziert. Von den eingefrorenen Hirnen wurde anschließend an einem Schlittenmikrotom (SM 200R, Leica) eine koronare Schnittserie mit einer Schnittdicke von 40 µm erstellt.

Bis zur immunhistochemischen Weiterverarbeitung des Gewebes wurden die Hirnschnitte bei -20°C in einer Kälteschutzlösung mit 25% Glycerin und 25% Ethylenglykol in Phosphatpuffer (v/v) gelagert.

## **2.4 Immunhistochemie**

### ***2.4.1 Vorbehandlung***

Die immunhistochemische Verarbeitung des gewonnenen Gewebes beginnt mit zwei 5 Minuten dauernden Waschschritten in TRIS-gepufferter Kochsalzlösung (TBS). Hirnschnitte, in denen im späteren Verlauf BrdU detektiert werden sollte, wurden 30 min bei 37°C in 2N HCl inkubiert. Dadurch wird die DNA der Zelle denaturiert und eine Bindung zwischen anti-BrdU-Antikörpern und in die DNA integriertem BrdU ermöglicht. Nach der HCl-Behandlung wurde das Gewebe zunächst für 10 min in 0,1 M Boratpuffer (pH 8,5) bei Raumtemperatur inkubiert, dann 60 min in TBS, das alle 5 min ausgetauscht wurde, gewaschen.

### ***2.4.2 Immunhistochemie***

Vor der Antikörperinkubation müssen zum einen lipophile Membranen zerstört werden, um eine Bindung zwischen Antikörper und intrazellulär lokalisierten Antigenen zu ermöglichen, zum anderen erreicht man durch Absättigung unspezifischer Antikörperbindungen eine Reduktion des Hintergrundsignals bei der immunhistochemischen Färbung. Zur Auftrennung der lipophilen Membranen wurde Triton X-100 verwendet. Die Sättigung der unspezifischen Bindungen wurde durch Vorbehandlung des Gewebes mit Serum der Spezies, aus der der Sekundärantikörper gewonnen wurde (hier vom Esel), erreicht.

Das Gewebe wurde für 30 min in TBS-plus (bestehend aus 96 vol% TBS, 1 vol% Triton X-100 10% und 3 vol% Eseserum) inkubiert.

Die Antigendetektion wurde mittels spezifischer Antikörper (AK) gegen die weiter unten beschriebenen (2.4.3.) Antigene (Primärantikörper) erreicht. Die Antikörper wurden in TBS-plus verdünnt und das Gewebe in dieser Lösung bei 4°C für 48 Stunden unter ständigem Schütteln inkubiert.

Das Gewebe, in dem lediglich BrdU- bzw. CR-positive Zellen quantifiziert werden sollten, wurde für die lichtmikroskopische Auswertung wie folgt behandelt:

Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper, wurde das Gewebe zweimal für 15 min in TBS gewaschen und im Anschluss nochmals für 15 min in der Blockierlösung TBS-plus inkubiert. Die Hirnschnitte wurden dann bei Raumtemperatur mit dem jeweiligen sekundären Antikörper gegen das Fc-Fragment des primären Antikörpers (zur BrdU Detektion: Anti-Ratte-Biotin/Streptavidin aus dem Esel; zur CR Detektion: Anti-Maus-Biotin/Streptavidin aus dem Esel) inkubiert. Die Konjugierung der sekundären Antikörper mit Biotin-Streptavidin ermöglicht eine chemische Reaktion mit einem Komplex aus der Meerrettich-Peroxidase H und dem Glykoprotein Avidin, das eine sehr hohe Bindungsaffinität für Biotin besitzt. Nach drei Waschschritten erfolgte die Inkubation in diesem Komplex mit dem ABC Kit (Vectastain, Vector Laboratories). Nach der Inkubation mit dem Komplex für eine Stunde bei Raumtemperatur wurde das Gewebe erneut dreimal für 5 min in TBS gewaschen und anschließend mit dem Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin für 6 min inkubiert. Dadurch erreicht man in den markierten Zellen die Produktion eines dunkelbraunen, amorphen, in Wasser und Ethanol unlöslichen Präzipitats.

Nach dem Waschen der gefärbten Hirnschnitte in destilliertem Wasser wurden sie auf Objektträger aufgezogen und bei Raumtemperatur getrocknet. Zur Fixierung wurden die Schnitte auf den Objektträgern für 30 min in NeoClear (Merck) gehängt und anschließend mit NeoMount (Merck) eingedeckt.

Das Gewebe, das für die Auswertung am konfokalen Mikroskop zur Verfügung stehen sollte, wurde nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wie folgt behandelt:

Nachdem die nicht spezifisch gebundenen Primärantikörper durch zwei Schritte in TBS ausgewaschen und die unspezifischen Bindungsplätze mit TBS-plus abgesättigt wurden, konnte das Gewebe nun in eine Sekundärantikörper-TBS-plus-Lösung



überführt werden. Bei der Immunfluoreszenzfärbung sind die Sekundärantikörper, die das Fc-Fragment der Primärantikörper erkennen, an einem Fluoreszenzmolekül gekoppelt. Die Inkubation in der Sekundärantikörperlösung erfolgt für vier Stunden bei Raumtemperatur. Auch nach diesem Schritt wurden die nicht spezifisch gebundenen Sekundärantikörper mit TBS (6-mal 5 min) ausgewaschen. Die Hirnschnitte wurden anschließend in 0,1M Phosphatpuffer überführt, auf beschichtete Objektträger aufgezogen und luftgetrocknet. Das frühzeitige Ausbleichen der Fluoreszenzmoleküle kann durch die Übersichtung der Schnitte mit PVA-DABCO (10% Polyvinylalkohol und 25% Glycerin in TBS mit 2,5% Diazabicyclo-Oktan) verhindert werden.

### **2.4.3 Antikörper**

Alle Antikörper wurden in TBS-plus verdünnt verwendet.

#### **2.4.3.1 Primärantikörper**

Zur spezifischen Bindung von **BrdU** wurde ein monoklonaler Antikörper aus der Ratte in einer Verdünnung von 1:500 verwendet (Harlan Seralab, Leicestershire, England).

**NeuN** (Neuronal Nuclei) ist ein neuronales Protein in nukleärer Lokalisation und gilt als spezifischer Marker reifer Nervenzellen (Mullen et al., 1992). Es wurde ein monoklonaler Maus-Antikörper gegen NeuN (Chemicon, Hofheim, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:100 benutzt.

Zur Detektierung der **Calretinin**-positiven Zellen wurden monoklonale Antikörper von drei verschiedenen Spezies verwendet: Maus anti-CR (Swant, Bellinzona, Schweiz), Ziege anti-CR (Chemicon, Hofheim, Deutschland) und Kaninchen anti-CR (Swant, Bellinzona, Schweiz). Alle drei Calretinin-Antikörper wurden im Verhältnis 1:250 verdünnt.

**Calbindin** wird als calciumbindendes Protein von reifen Körnerzellen exprimiert (Sloviter, 1989). Es wurde ein monoklonaler Maus-Antikörper gegen Calbindin D28K der Firma Swant (Bellinzona, Schweiz) in einer Verdünnung von 1:250 verwendet.

**Doublecortin (DCX)** gilt als Marker unreifer Neurone (des Portes et al., 1998), die sich in einem Migrationsstadium befinden (Gleeson et al., 1999; Corbo et al., 2002).

In der hier vorliegenden Studie kamen polyklonale Antikörper der Ziege (Santa Cruz Biotech.) in einer Verdünnung von 1:200 zur Anwendung.

Zur Visualisierung exzitatorischer Neurone wurde ein polyklonaler Antikörper der Ziege gegen den **Excitatory aminoacid transporter (EAAT)** der Firma Chemicon (Hofheim, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:250 benutzt.

Zur Darstellung inhibitorischer Neurone wurde ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen den Neurotransmitter **GABA** der Firma Sigma (Deisenhofen, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:250 verwendet.

**Parvalbumin** ist das calciumbindende Protein einer Subpopulation hippocampaler Interneurone (Freund and Buzsaki, 1996). Verwendet wurde ein polyklonaler Antikörper der Ziege in einer Verdünnung von 1:1000, der von der Firma Swant (Bellinzona, Schweiz) bezogen wurde.

Die Untereinheit **GABA A1** des GABA-Rezeptors wird spezifisch von hippocampalen Interneuronen exprimiert (Bouilleret et al., 2000; Redecker et al., 2000). Der benutzte Meerschweinchen-Antikörper gegen den GABA A1-Rezeptor wurde uns freundlicherweise von Dr. Jean Marc Fritschy (Zürich) zur Verfügung gestellt. Dieser Antikörper wurde im Verhältnis 1:20000 verdünnt.

Die sich in der Mitose befindenden Zellen exprimieren das nukleäre Protein **mKi-67** (Scholzen und Gerdes, 2000). Verwendet wurde ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper (Ki-67) gegen mKi-67 (Novocastra) in einer Verdünnung von 1:500.

Das Protein **Prox-1** wird spezifisch von Körnerzellen des Gyrus dentatus exprimiert (Pleasure et al., 2000). Der verwendete polyklonale Kaninchen-Antikörper wurde uns großzügigerweise von Dr. Samuel Pleasure (San Francisco) zur Verfügung gestellt. Verdünnt wurde dieser Antikörper im Verhältnis 1:5000.

Cajal-Retzius Zellen zeichnen sich durch die Expression des Glykoprotein **Reelin** aus (D'Arcangelo et al., 1995; Meyer et al., 2000). Wir erhielten den monoklonalen (Klon E4) Maus-Antikörper gegen Reelin freundlicherweise von Dr. Andre Goffinet (Brüssel). Der Antikörper wurde im Verhältnis 1:1000 verdünnt.

### **2.4.3.2 Sekundärantikörper**

Alle verwendeten Sekundärantikörper stammten aus dem Esel und wurden von Jackson Laboratories (Dianova, Hamburg) bezogen.

Benutzt wurden für die DAB-Färbung entweder ein Anti-Ratte Biotin/SP Antikörper, oder ein Anti-Maus Biotin/SP Antikörper.

Für die Immunfluoreszenzfärbung kamen Antikörper, die gegen das Fc-Fragment von Antikörpern aus der Ratte, Maus, Ziege, Kaninchen oder Meerschweinchen gerichtet und entweder mit CY-5, FITC oder Rhodamin Red konjugiert waren, zur Anwendung.

## **2.5 Quantitative und qualitative Analyse der immunmarkierten Zellen**

### ***2.5.1 Quantifizierung BrdU- bzw. Calretinin-positiver Zellen***

Die Quantifizierung der BrdU- bzw. Calretinin-positiven Zellen erfolgte an koronaren Hirnschnittserien des Hippocampus. Aus der Schnittserie mit einer jeweiligen Schichtdicke von 40 µm, die die gesamte fronto-okzipitale Ausdehnung eines Hippocampus umfasste, wurde jeder sechste Schnitt gewählt und somit zunächst ein Sechstel der tatsächlichen Zellzahl quantifiziert. Durch Multiplikation mit dem Faktor Sechs konnte anschließend die tatsächliche Zellzahl errechnet werden.

Das zu analysierende Gewebe wurde zuvor immunhistochemisch mit Antikörpern gegen BrdU oder CR behandelt. Die Quantifizierung erfolgte an einem Leica DME Lichtmikroskop.

Um zu vermeiden, dass durch das „Mitzählen“ am Schnittrand lokalisierter halb angeschnittene Zellen, ein falsch zu hohes Ergebnis ermittelt wird, wurden die bei der Fokussierung als erstes sichtbaren Zellen von der Quantifizierung ausgeschlossen. Die Ausdehnung des zu analysierenden Areals wurde durch klare Strukturen begrenzt. So wurden nur Zellen gezählt, die sich in der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus, oder der angrenzenden SGZ befanden. Die SGZ umfasst per definitionem eine ein bis zwei Zelllagen dicke Schicht zwischen dem Stratum granulosum und dem Hilus.

### **2.5.2 Quantitative und qualitative Phänotypisierung BrdU-positiver Zellen**

Um quantitative und qualitative Aussagen über die teilungsaktiven (BrdU-positiven) Zellen machen zu können, wurden 40 µm dicke Schnitte der koronalen Schnittserie des Hippocampus im Abstand von 480 µm (jeder 12 Schnitt) ausgewählt. Diese Hirnschnitte wurden anschließend im Rahmen der Immunfluoreszenzfärbung (siehe 2.4.2.) mit Antikörpern gegen BrdU und zwei weiteren Antigenen, deren Expression durch bestimmte Zellen bekannt ist (Neurotransmitter, Rezeptoren, calciumbindende Proteine, u.a.), behandelt.

Um bei der Auswertung eine optimale Zuordnung der optischen Signale zu einer Zelle in allen Ebenen eines Schnittes zu gewährleisten, kam hierbei die konfokale Mikroskopie an einem spektralen Leica TCS-SP2 zur Anwendung.

Um die BrdU-markierten Zellen eines bestimmten Phänotyps zu quantifizieren, wurden aus den ausgewählten Schnitten einer Serie zufällig 50 über den gesamten Gyrus dentatus verteilte BrdU-positive Zellen hinsichtlich der Expression bestimmter Proteine untersucht. Somit erhielt man, zum einen den prozentualen Anteil der BrdU-markierten Zellen, die ein bestimmtes Protein exprimieren (z.B. wie viel Prozent der BrdU Zellen CR exprimieren: „%CR“), und zum anderen durch Multiplikation dieses Wertes mit der Gesamtzahl BrdU-positiver Zellen die absolute Zahl BrdU-markierter Zellen mit einem bestimmten Phänotyp (z.B. „CR neu“).

Bei den Tieren, die einem bestimmten Stimulus ausgesetzt waren (Runner, Enriched, Kainat) und deren Kontrollen, wurden die BrdU-positiven Zellen mit gleichzeitiger Kolokalisation der immunhistochemischen Marker NeuN und CR quantifiziert. Bei dem Zeitreihenexperiment kam zusätzlich der Körnerzell-Marker Prox-1 zum Einsatz.

Im Laufe des Experiments wurden auch rein qualitative Phänotypisierungen durchgeführt, bei denen entweder wegen einer dichotomen Fragestellung keine Quantifizierung notwendig war, oder aus anderen Gründen keine quantitativen Analysen durchgeführt wurden. Dabei wurde nur untersucht, ob es eine Kolokalisation zweier Marker in ein und der Selben Zelle gibt, oder ob man eine Kolokalisation zwei verschiedener Marker in einem Zelltyp generell ausschließen kann. Um eventuelle Fehlinterpretationen bei der zweidimensionalen Darstellungsweise des konfokalen Mikroskops zu verhindern (z.B. die falsch gewertete Kolokalisation, durch zwei in der z-Ebene übereinander liegenden Zellen mit den selben x und y Koordinaten.), wurde stets eine Spektralanalyse des

optischen Signals, sowie mit Hilfe einer Bildserie entlang der z-Achse eine dreidimensionale Rekonstruktion erstellt.

Bei der qualitativen Phänotypisierung wurden folgende Antikörperkombinationen verwendet:

| <b>AK 1</b> | <b>AK 2</b> | <b>AK 3</b>  | <b>Abb. Nr./ Seite</b>                |
|-------------|-------------|--------------|---------------------------------------|
| BrdU        | CR          | CB           | Abb. 7, Seite 37<br>Abb. 15, Seite 49 |
| BrdU        | CR          | NeuN         | Abb. 7, Seite 37                      |
| BrdU        | CR          | Parvalbumin  | Abb. 7, Seite 37                      |
| BrdU        | CR          | GABA         | Abb. 9, Seite 40                      |
| BrdU        | CR          | GABA-A1-Rez. | Abb. 9, Seite 40                      |
| BrdU        | CR          | Reelin       | Abb. 9, Seite 40                      |
| BrdU        | CR          | DCX          | Abb. 12, Seite 43                     |
| BrdU        | CR          | Prox-1       | Abb. 13, Seite 45                     |
| BrdU        | CR          | EAAT         | Abb. 13, Seite 45                     |
| BrdU        | CR          | Ki-67        | Abb. 14, Seite 47                     |
| BrdU        | DCX         | Ki-67        | Abb. 14, Seite 47                     |
| (BrdU)      | CR          | NeuN         | Abb. 16, Seite 51                     |
| (BrdU)      | CR          | Prox-1       | Abb. 16, Seite 51                     |

## **2.6 Statistische Analysen**

Die statistischen Auswertungen wurden mit Statview 5.0.1 für Macintosh durchgeführt. Für alle Vergleiche kam ANOVA und falls nach dem Ergebnis zulässig Fishers Posthoc-Tests zur Anwendung. Unterschiede wurden ab einem P-Wert < 0,05 als signifikant gewertet.