

**Intrazelluläre Lokalisation und synaptische
Ausschüttung der Neurotrophine in
hippokampalen Neuronen und die Bedeutung
von BDNF bei hippocampaler synaptischer
Plastizität**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

**Dipl.-Biochem. Tanja Brigadski
geb. in Bochum**

Mainz 2007

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzung	V
1. Einleitung	1
1.1 Mechanismen zur Neurotrophin-vermittelten Signalweiterleitung	3
1.1.1 Pro-Neurotrophine und Neurotrophine	4
1.1.2 Die Signalweiterleitung über den Trk-Rezeptor	4
1.1.2.1 Die Signaltransduktionskaskaden des Trk-Rezeptors	5
1.1.2.2 Die Internalisierung des Trk-Rezeptors	7
1.1.3 Die Signalweiterleitung über den p75	8
1.2 Synthese und intrazelluläre Verteilung der Neurotrophine	8
1.2.1 Das Prozessieren der Neurotrophine	9
1.2.2 Die intrazelluläre Lokalisation der Neurotrophine	11
1.3 Die Sekretion der Neurotrophine	13
1.4 Die Rolle von BDNF bei synaptischer Plastizität	17
2. Materialien	20
2.1 Chemikalien	20
2.2 Enzyme, Substrate	21
2.3 Geräte	21
2.4 Kits	22
2.5 <i>Software</i>	22
2.6 Verbrauchsmaterialien	22
2.7 Versuchstiere	22
2.8 Zelllinien	23
2.9 Primer	23
2.10 Puffer, Lösungen und Medien	23

3. Methoden	27
3.1 Zellkultur	27
3.1.1 primäre Zellkultur	27
3.1.1.1 Präparation hippokampaler Neurone und kortikaler Astrozyten der Ratte	27
3.1.1.2 Passagieren kortikaler Astrozyten der Ratte	29
3.1.1.3 Transfektion primärer Neurone mit der Ca ²⁺ -Phosphat-Präzipitation	30
3.1.1.4 Präparation organotypischer Schnittkulturen des Hippokampus	31
3.1.2 sekundäre Zelllinien	31
3.1.2.1 Polyornithinbeschichtung von Deckgläsern	31
3.1.2.2 Auftauen sekundärer Zellen	32
3.1.2.3 Einfrieren sekundärer Zellen	32
3.1.2.4 Passagieren von COS 7 Zellen	32
3.1.2.5 Passagieren von PC12 Zellen	33
3.1.2.6 Transfektion von sekundären Zellen	33
3.1.2.7 PC12 Faserwachstumsstudie	33
3.2 Molekularbiologie	34
3.2.1 Herstellung kompetenter Bakterien	34
3.2.2 Transformation	35
3.2.3 Maxipräparation von Plasmid-DNA	35
3.2.4 Anlegen von Glycerindauerkulturen	35
3.2.5 Genotypisierung	35
3.2.5.1 DNA-Isolierung	35
3.2.5.2 PCR	36
3.2.5.3 Elektrophorese	37
3.3 Elektrophysiologie	37
3.3.1. Die Untersuchung der elektrophysiologischen Eigenschaften von CA1 Pyramidenzellen	37
3.3.1.1 Synaptische Transmission von CA1 Pyramidenzellen	39

3.3.1.2	Die Induktion der Langzeitpotenzierung	39
3.3.2	Bestimmung der Osmolarität	40
3.3.3	Elektroporation	41
3.4	Mikroskopie	41
3.4.1	Epifluoreszenz Mikroskopie	41
3.4.2	Konfokale Mikroskopie	42
3.4.3	Perfusionssystem zur Untersuchung der Neurotrophin Ausschüttung	42
3.4.4	Videomikroskopische Untersuchung der Neurotrophin Ausschüttung	43
3.4.5	Videomikroskopische Untersuchung der Ausschüttung von Styryl-Farbstoffe	43
3.4.6	Immunzytochemische Mehrfachfärbungen	44
4.	Ergebnisse	46
4.1	Die biologische Aktivität der GFP-markierten Neurotrophine	46
4.2	Lokalisation der Neurotrophine in hippocampalen Neuronen	49
4.2.1	Das Expressionsmuster der Neurotrophine in hippocampalen Neuronen	49
4.2.2	Die Charakterisierung der verschiedenen Expressionsmuster der Neurotrophine	57
4.2.2.1	Die spezifische Anreicherung der Neurotrophine im Endoplasmatischen Retikulum	58
4.2.2.2	Die Lokalisation der Neurotrophine im Golgi Netzwerk	58
4.2.2.3	Die Aggregation der Neurotrophine in sekretorischen Granula	61
4.2.2.4	Die synaptische Lokalisation der Neurotrophine	63
4.2.3	Die Expressionsmuster der Neurotrophine in undifferenzierten und differenzierten PC12 Zellen	67
4.3	Sekretion der Neurotrophine	69
4.3.1	Konstitutive Ausschüttung der Neurotrophine	70

4.3.2	Aktivitätsabhängige Ausschüttung der Neurotrophine an glutamatergen Synapsen	72
4.4	Die Funktion von BDNF bei Prozessen der aktivitätsabhängigen synaptischen Plastizität	81
4.4.1	Die Expression von BDNF-GFP in CA1 Pyramidenzellen	81
4.4.2	Elektrophysiologische Charakterisierung von CA1 Pyramidenzellen des Hippokampus BDNF-defizienter Mäuse	83
4.4.2.1	Basale synaptische Transmission von CA1 Pyramidenzellen BDNF-defizienter Mäuse	83
4.4.2.2	Untersuchungen der Langzeitpotenzierung von CA1 Pyramidenzellen BDNF-defizienter Mäuse	86
5.	Diskussion	90
5.1	Verteilungsmuster der Neurotrophine in hippocampalen Neuronen	91
5.2	Synaptische Sekretion der Neurotrophine	97
5.3	Die Rolle von BDNF für die Regulation synaptischer Plastizität	101
6.	Zusammenfassung	106
7.	Literatur	109
	Danksagung	121
	Lebenslauf	123

Abkürzung

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Massenprozent
A	Ampere
Akt	PKB = Proteinkinase B
AMPA	α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionat
APV	2-Amino-5-Phosphonovalerat
ARAC	Cytosinarabinosid
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintri-phosphat
BBS	BES gepufferte Lösung (2 fach)
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
BES	N,N-Bis-(2-Hydroxyethyl)-2-Aminoethansulfonsäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
CA	<i>Cornu ammonis</i>
Ca ²⁺	Calcium
CaMKII	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
CREB	cAMP responsives Element-Bindeprotein
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol
DIV	Tage <i>in vitro</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DNQX	6,7-Dinitroquinoxalin-2,3-dion
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dsRed	<i>Discosoma red fluorescent protein</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbant assay</i>
E-LTP	<i>early-LTP</i>
EPSCs	erregende postsynaptische Ströme
EPSPs	erregende postsynaptische Potentiale
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	extracellular signal-regulated kinase
et al.	Und andere
FCS	Fötales Kälberserum
Frs2	<i>fibroblast growth factor receptor substrate 2</i>
g	Gramm
GABA	γ -Aminobuttersäure
GFP	green fluorescent protein
GluR	Glutamatrezeptor
Gly	Glycin
Grb	growth factor receptor-bound protein
HBS	HEPES-gepufferte Salzlösung
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure
HFS	Hochfrequente Stimulation

Ig	Immunglobulin
IP3	Inositol-1,4,5-Triphosphat
IR	Immunreaktivität
K ⁺	Kalium
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LDCV	Große elektronendichte Vesikel
L-LTP	<i>late</i> -LTP
LTD	Langzeitdepression
LTP	Langzeitpotenzierung
M	Molar
mAk	monoklonaler Antikörper
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
mEPSC	Miniatur EPSC
mGluR	metabotroper GluR
mGluR	Metabotroper Glutamatrezeptor
min	Minute
mRNA	Boten-RNA
MW	Molekulargewicht
n. a.	numerische Apertur
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
NR1	NMDA-Rezeptor Untereinheit 1
NR2A/B	NMDA-Rezeptoruntereinheiten 2A und 2B
NT	Neurotrophin
OD600	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600nm
P	postnaler Tag
PACE	paired basic amino acid cleaving enzyme
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PC	prohormone convertase
PC12	Phäochromozytom-Zellen
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEST	Penicillin/Streptomycin
pH	potentia Hydrogenii
PI ₃ K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase B
PLC	Phospholipase C
PNS	Peripheres Nervensystem
PSD	Postsynaptische Dichte
Ras	<i>rat sarcoma</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
Ser	Serin
Shc	<i>Src homologous and collagen</i>
SK2	<i>small conductance</i> Kalium Kanal
SOS	<i>Son-of-sevenless guanine nucleotide exchange factor</i>
T	Thymin
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung
TBS	theta burst stimulation
TE	Tris-EDTA
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>

Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Trk	<i>Tropomyosin-related kinase</i>
TTX	Tetrodotoxin
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
Tyr	Tyrosin
V	Volt
VAMP	<i>Vesicle-associated membrane protein</i>
VGCC	Spannungsabhängige Kalzium Kanäle
VSP10	<i>vacuolar sorting protein 10</i>
wt	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

Kapitel 1

Einleitung

Neurotrophine sind bedeutende Faktoren für die neuronale Entwicklung des peripheren und des zentralen Nervensystems. Auf der Suche nach neurotrophen Faktoren, die von einem zu innervierenden Gewebe ausgeschüttet werden und über das Leben und Sterben von konkurrierenden Zellen entscheiden, wurde zunächst das Protein *nerve growth factor* (NGF; Levi-Montalcini *et al.*, 1952; 1987) entdeckt. In den folgenden Jahrzehnten wurden weitere dem NGF strukturverwandte Proteine identifiziert: BDNF (*brain derived neurotrophic factor*, Barde *et al.*, 1982; Leibrock *et al.*, 1989) NT-3 (*neurotrophin-3*, Hohn *et al.*, 1990; Maisonpierre *et al.*, 1990; Jones *et al.*, 1990) und NT-4/5 (*neurotrophin-4*, Hallbook *et al.*, 1991; Ip *et al.*, 1992). Sie zählen zu der Gruppe der Neurotrophine, die für die Entwicklung der Säugetiere eine wesentliche Rolle spielen. Abhängig vom Zelltyp und vom Expressionsmuster der Neurotrophine koordinieren sie eine Vielzahl von biologischen Prozessen, wie die neuronale Differenzierung von Stammzellen, das Wachstum und die Organisation der Neuriten, Apoptose, den Aufbau und die Organisation des Zytoskeletts und die Modulation der synaptischen Transmission (für eine Übersicht siehe Klein, 1994; Leßmann, 1998; Schuman, 1999; Huang & Reichardt, 2001). Ihre Signalwege verlaufen über drei verschiedene Rezeptoren, dem *tropomyosin related kinase* Rezeptor (Trk-Rezeptor), dem p75 Rezeptor und Sortilin (siehe Abb.1). Die Trk-Rezeptoren gehören zu der Gruppe der Tyrosinkinase-Rezeptoren. Bislang wurden drei verschiedene Trk-Rezeptoren identifiziert: der TrkA, TrkB und TrkC-Rezeptor. Die Wechselwirkungen

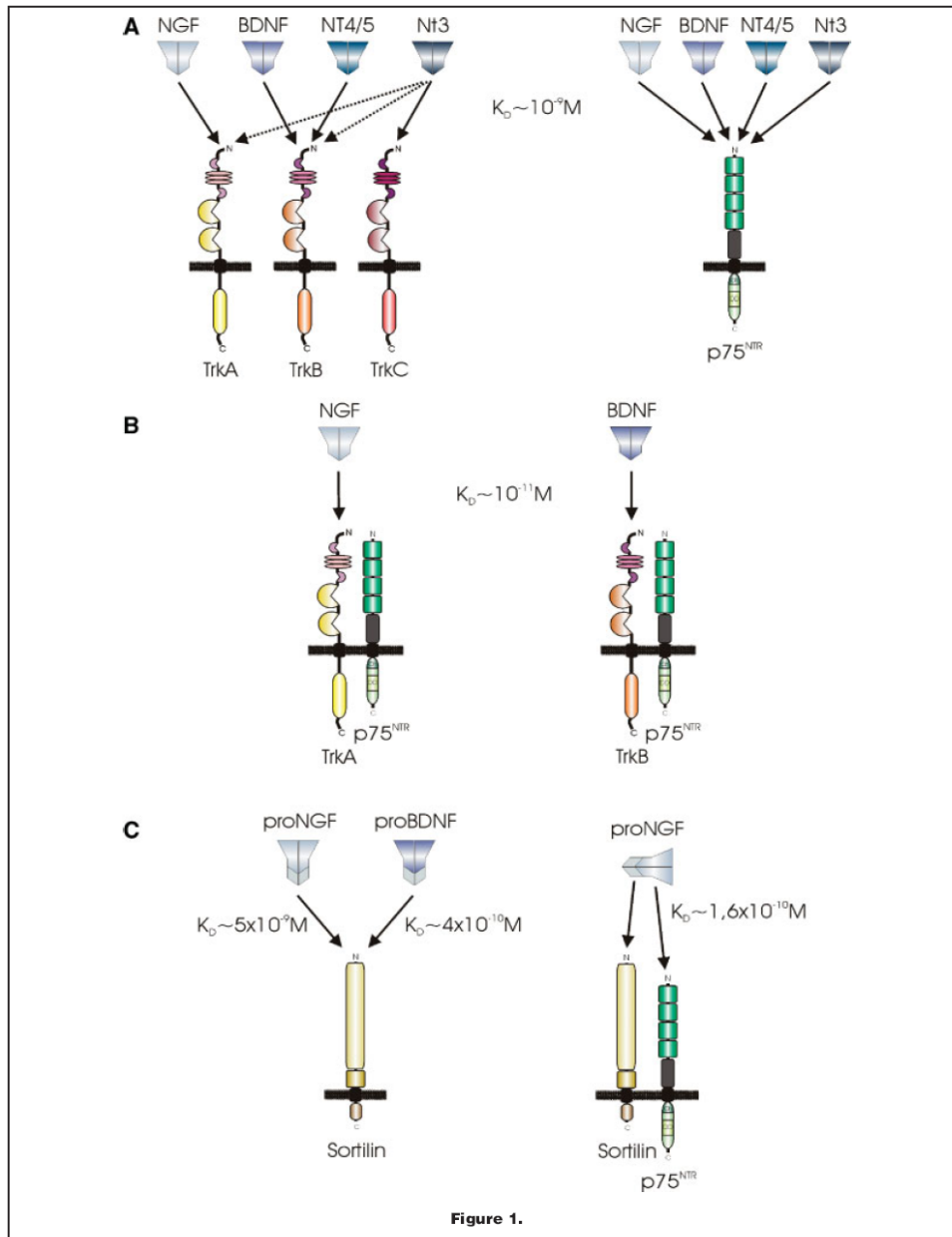


Abbildung 1: Die Neurotrophine und ihre Rezeptoren. A: Die Wechselwirkungen zwischen den Neurotrophinen und den Trk-Rezeptoren verlaufen im Gegensatz zu den Wechselwirkungen zwischen den Neurotrophinen und dem p75 Rezeptor spezifisch. NGF bindet an den TrkA-Rezeptor. BDNF und NT-4 binden hochaffin an den TrkB-Rezeptor. NT-3 bindet mit niedriger Affinität sowohl an den TrkA als auch an den TrkB-Rezeptor und mit hoher Affinität an den TrkC-Rezeptor. Die Wechselwirkungen zwischen den Neurotrophinen und dem p75 Rezeptor sind unspezifisch. B: Eine Heterodimerisierung zwischen den Trk-Rezeptoren und dem p75 Rezeptor ist ebenfalls bekannt. Die Heterodimerisierung erhöht die Bindungsaffinität der Neurotrophine. C: Sortilin gilt als Korezeptor zum p75 Rezeptor. Bislang wurden Interaktionen zwischen Sortilin und proNGF bzw. proBDNF identifiziert. (modifiziert nach Schweigreiter, 2006)

zwischen den Trk-Rezeptoren und den Neurotrophinen erfolgen spezifisch. Das Protein NGF bindet mit hoher Affinität an den TrkA-Rezeptor. BDNF und NT-4/5 binden ebenfalls hochaffin an den TrkB-Rezeptor, wohingegen NT-3 mit hoher Affinität an den TrkC-Rezeptor und mit niedrigerer Affinität an den TrkA und TrkB-Rezeptor binden kann (für eine Übersicht siehe Barbacid, 1995; Patapoutian & Reichardt, 2001; Huang & Reichardt, 2003). Der p75 Rezeptor gehört zur *tumor necrosis factor* (TNF) Superfamilie. Im Gegensatz zu den Trk-Rezeptoren verlaufen die Wechselwirkungen zwischen dem p75 Rezeptor und den Neurotrophinen unspezifisch. Alle Neurotrophine binden mit ähnlicher Affinität an den p75 Rezeptor. (für eine Übersicht siehe Patapoutian & Reichardt, 2001; Huang & Reichardt, 2003). Das Protein Sortilin ist ein Vertreter der VSP10 Familie. Interaktionen mit den Neurotrophinen NGF und BDNF konnten bislang gezeigt werden. Sortilin gilt derzeit als Korezeptor für den p75 Rezeptor (Nykjaer *et al.*, 2004; für eine Übersicht siehe Schweigreiter, 2006).

Die Neurotrophine gehören zur Gruppe der Neuropeptide. Sie teilen mehrere biochemische Charakteristika: sie besitzen ein Molekulargewicht von 13,2 – 15,9 kDa. Ihr isoelektrischer Punkt liegt bei 9-10. Sie weisen eine Strukturidentität von ca. 50 % auf. Neurotrophine werden als Präpropeptide synthetisiert. Während ihres Reifungsprozesses werden sie proteolytisch gespalten und gelangen entweder über den konstitutiven oder regulierten Sekretionsweg zu ihrem Wirkungsort (für eine Übersicht siehe Leßmann *et al.*, 2003).

1.1 Mechanismen zur Neurotrophin-vermittelten Signalweiterleitung

Die Signalweiterleitung der Neurotrophine ist ein Komplex aus verschiedenen dynamischen Prozessen. Sowohl zelluläre Prozesse wie die Endozytose von Ligand-Rezeptor-Komplexen als auch die Interaktionen der Rezeptoren mit einer Vielzahl von Proteinen tragen zu dem breiten Spektrum der Neurotrophin-vermittelten

Signaltransduktionsmechanismen bei. Im Folgenden soll auf einige Mechanismen zur Signalweiterleitung von Neurotrophinen eingegangen werden.

1.1.1 Pro-Neurotrophine und Neurotrophine

Neurotrophine werden als Vorläuferpeptide synthetisiert. Lange wurde angenommen, dass die Spaltung der Proregion der Neurotrophine lediglich im Golgi Netzwerk stattfindet und zum eigentlichen Reifungsprozess der Neurotrophine gehört. Ende der 20. Jhd. wurde jedoch die Anwesenheit von ungespaltenen Pro-Neurotrophinen im extrazellulären Raum entdeckt. 2001 beschrieben Lee *et al.* eine entgegengesetzte Wirkung von proNGF und maturem NGF auf das Überleben von Neuronen. Während matures NGF das Überleben von kultivierten Neuronen unterstützte, wirkte proNGF apoptotisch. Für proBDNF und matures BDNF konnte ebenfalls eine solche konträre Wirkungsweise auf das Überleben von Neuronen gezeigt werden (Teng *et al.*, 2005). Die extrazelluläre Spaltung von proBDNF spielt des Weiteren bei synaptischen Plastizitätsprozessen eine Rolle. Ungespaltenes proBDNF fördert die Langzeitdepression (LTD) im Hippokampus (Woo *et al.*, 2005), wohingegen die Spaltung von proBDNF im extrazellulären Medium durch Plasmin für die Expression einer Langzeit-Potenzierung (LTP) im Hippokampus essentiell ist (Pang *et al.*, 2004). Unterschiedliche Ligandenbindungsaffinitäten der Pro-Neurotrophine bzw. der maturen Neurotrophine zu den Trk-Rezeptoren, dem p75 Rezeptor und Sortilin werden für diese gegenläufigen Signaltransduktionsmechanismen verantwortlich gemacht (für eine Übersicht siehe Schweigreiter, 2006). Doch bislang sind die spezifischen Signalwege der Pro-Neurotrophine wenig untersucht.

1.1.2 Die Signalweiterleitung über den Trk-Rezeptor

Die Trk-Rezeptoren sind transmembrane Glykoproteine mit einer Größe von 140-150 kDa. Wie bereits beschrieben, wurden bislang drei verschiedene Trk-Rezeptoren identifiziert: der TrkA, TrkB und der TrkC-Rezeptor. Sowohl die extrazelluläre als auch die intrazelluläre Domäne der Transmembranrezeptoren zeigen strukturelle Gemeinsamkeiten. Im extrazellulären N-terminalen Bereich der Rezeptoren

werden drei Leucin reiche Motive durch zwei Cystein-reiche Strukturen flankiert. Die Ligandenbindung erfolgt mit den sich anschließenden Immunglobulindomänen, die unmittelbar vor der Transmembran-Region liegen. Intrazellulär erfolgt die Signalweiterleitung über die Tyrosinkinasedomäne (für eine Übersicht siehe Barbacid, 1995).

1.1.2.1 Die Signaltransduktionskaskaden des Trk-Rezeptors

Die Bindung von murenen Neurotrophin-Homodimeren an die Trk-Rezeptoren führt nach einer Liganden-induzierten Dimerisierung der Rezeptoren zur Phosphorylierung spezifischer Tyrosin-Reste in der zytoplasmatischen Domäne der Rezeptoren, die Bindungsstellen für *downstream*-Effektoren darstellen (für eine Übersicht siehe Kaplan & Miller, 2000; Patapoutain & Reichert, 2001; Huang und Reichardt, 2003). Drei Hauptsignalwege werden unterschieden: der Ras-MAP-Kinase Weg, der PI₃K/AKT-Weg und der PLC γ -Weg.

Die Aktivierung von Ras ist für Differenzierungsprozesse von Neuronen wesentlich. Des Weiteren fördert die Trk-abhängige Stimulation von Ras in einigen Zelltypen Überlebensprozesse. Die Aktivierung von Ras kann über verschiedene Trk-Rezeptor-vermittelte Wege erfolgen. Die Bindung des Adapterproteins Shc an einen phosphorylierten Tyrosin-Rest in der Juxtamembran-Domäne des Trk-Rezeptors stellt den prominentesten Signalweg zur Aktivierung von Ras dar: die Anlagerung des Adapterproteinkomplexes Shc/Grb2 und des Ras Austauschfaktors SOS führt zu einer Aktivierung des kleinen G-Proteins Ras und dessen *downstream*-Effektoren. Sowohl die Aktivierung des ERK-Signalweges, als auch die Aktivierung des p38 MAP Kinase-Weges wurden beschrieben (für eine Übersicht siehe Patapoutian & Reichardt, 2001). Beide Signalwege führen zu einer Phosphorylierung von CREB und anderen Transkriptionsfaktoren, die die Expression einer Vielzahl von Genen kontrollieren (für eine Übersicht siehe Finkbeiner, 2000a, b). Ein weiterer Signalweg zur Aktivierung von Ras erfolgt über die Anlagerung des myristylierten, membranständigen Adapterproteins Frs2 an den Trk-Rezeptor (Meakin *et al.*, 1999). Diese Bindung führt ebenfalls zu einer Aktivierung des Erk-Signalweges. Im Vergleich zur Aktivierung des Erk-Signalweges

durch Shc/Grb2/SOS stellt diese Aktivierung eine lang anhaltende und keine transiente Aktivierung dar (Marshall, 1995; York *et al.*, 1998). Die physiologische Bedeutung des Ras-Signalweges liegt in der Vermittlung neuronaler Differenzierungs- und Überlebensprozesse. Eine zusätzliche Bedeutung dieses Signalweges für synaptische Plastizitätsvorgänge konnte ebenfalls gezeigt werden.

Die Trk-abhängige Aktivierung der PLC γ ist ein weiterer wichtiger Signalweg für neuronale Zellen. Die Aktivierung der PLC γ führt zu einer Spaltung von Phosphatidyl-4,5-bisphosphat zu Inositol-3-Phosphat (IP $_3$) und Diacylglycerol (DAG). IP $_3$ wiederum induziert über den tetrameren IP $_3$ -Rezeptor eine Ca $^{2+}$ -Freisetzung aus den intrazellulären Ca $^{2+}$ -Speichern der Zelle, wodurch eine Aktivierung verschiedener Proteine und Transkriptionsfaktoren vermittelt wird. Diacylglycerol und Ca $^{2+}$ -Ionen stimulieren gleichzeitig die Aktivierung der Protein Kinase C. In PC12 Zellen nimmt dieser Signalweg einen bedeutenden Einfluss auf das durch NGF induzierte Faserwachstum (für eine Übersicht siehe Patapoutian & Reichardt, 2001; Huang & Reichardt, 2003). Genetisch veränderte Mäuse bei denen die PLC γ -Bindungsstelle des TrkB-Rezeptors durch eine Punktmutation ausgeschaltet wurde, zeigen ein gestörtes Lernvermögen (Gruart *et al.*, 2007). Elektrophysiologische Studien an diesen Mäuse zeigen einen Einfluss auf die frühen und späten Phasen hippokampaler Langzeitpotenzierung (LTP) (Minichiello *et al.*, 2002). Zusammenfassend hat der PLC γ -Signalweg einen großen Einfluss auf Plastizitätsprozesse im Hippokampus.

Die Trk-abhängige Aktivierung der PI $_3$ K ist u.a. für die Unterstützung des Überlebens von Neuronen wesentlich. Über die PI $_3$ K wird der PI $_3$ K/AKT-Signalweg eingeleitet. Das Protein AKT wiederum kontrolliert die biologische Funktion einer Vielzahl von Proteinen, die für das Überleben von Zellen verantwortlich sind. Darüber hinaus ist der Signalweg auch an synaptischen Plastizitätsprozessen beteiligt (für eine Übersicht siehe Kaplan & Miller 2000, Patapoutain & Reichert 2001; Huang & Reichardt, 2003).

1.1.2.2 Die Internalisierung des Trk-Rezeptors

Neben der lokalen Wirkung der Neurotrophine an Ort ihrer Ausschüttung gekoppelt mit der Aktivierung der Rezeptoren und den dazu gehörigen *downstream*-Effektoren wurde vor kurzem die Endozytose des Trk-Rezeptors als ein neuer Mechanismus der Neurotrophin-vermittelten Signalweiterleitung entdeckt. Dieser neue Mechanismus führt zu einer zusätzlichen Komplexität in der durch Neurotrophine vermittelten Signalweiterleitung (für eine Übersicht siehe Huang & Reichardt, 2003).

Die Trk-Rezeptoren sitzen angereichert in Caveolen-ähnlichen Strukturen der Plasmamembran. Nach Liganden-induzierter Internalisierung befinden sich die Neurotrophin-Trk-Rezeptor-Komplexe in endozytotischen Vesikeln. Experimente mit einem Komplex aus NGF und monoklonalem Antikörper, durch welchen lediglich die Effizienz der Internalisierung erhöht wird, nicht aber die Liganden-Bindungsaffinität beeinträchtigt wird, zeigen eine transiente Aktivierung von Erk über Shc, welches zum Überleben von PC12 Zellen führt. Jedoch ist in diesem Zusammenhang keine Phosphorylierung des myristylierten, membranständigen Adapterproteins FRS2, einem weiteren Trk-vermitteltem Signalweg zur Aktivierung von Ras, zu beobachten. Dagegen zeigen Experimente mit einem thermosensitiven Dynamin, welches zur Inhibition der Liganden-induzierten Rezeptor-Internalisierung eingesetzt wird, eine verstärkte Differenzierung der PC12 Zellen, mutmaßlich über die FRS2 Phosphorylierung (Zhang *et al.*, 2000). In früheren Studien konnte der FRS2-vermittelte Signalweg über eine lang anhaltende Erk-Aktivierung für die Differenzierung der PC12 Zellen verantwortlich gemacht werden (Saragovi *et al.*, 1998). Diese Experimente zeigen, dass die Fähigkeit der Rezeptor-Internalisierung aufgrund der Kinetik der Internalisierung einen kompetitiven Prozess zwischen verschiedenen Signalwegen an der Oberfläche der Zelle ermöglicht.

Eine unterschiedliche Signalweiterleitung der Neurotrophine in Abhängigkeit vom Ort der Stimulation wurde von Watson *et al.* beschrieben (Watson *et al.*, 2002). Eine Applikation von NGF am Soma oder an axonalen Terminalien des Neurons führt zu einer erhöhten Aktivität von Erk1/2 und Erk5 am jeweiligen Ort der Stimulation. Für die NGF Stimulation an den Axon-Terminalien kann darüber hinaus eine erhöhte

Aktivität von Erk5 im Soma des Neurons beobachtet werden, die durch die Inhibition der Liganden-induzierten Rezeptor-Internalisierung verhindert wird. Diese Art der Signaltransduktion zeigt besonders deutlich, wie wichtig zum einen der Transport der Neurotrophine als auch die subzelluläre Auflösung des Ausschüttungsortes der Neurotrophine ist.

1.1.3 Die Signalweiterleitung über den p75

Die Signalweiterleitung der Neurotrophine über den p75 Rezeptor ist ebenso umfangreich wie die Signalweiterleitung der Neurotrophine über die Trk-Rezeptoren. Der isolierte p75 Rezeptor bindet mature Neurotrophine mit ähnlicher Affinität wie die Trk-Rezeptoren, wobei die Liganden-Bindungsaffinität durch eine Heterodimerisierung des p75 mit den Trk-Rezeptoren erhöht wird. Des Weiteren erfolgt die Bindung der Pro-Neurotrophine an den p75 Rezeptor mit einer höheren Affinität als die Bindung der matura Neurotrophine. Die Internalisierung des Neurotrophin-p75-Komplexes wurde ebenfalls beschrieben, sowie Neurotrophin-vermittelte Signalwege über die Interaktion des p75 Rezeptors mit Sortilin. Die physiologische Funktion des Neurotrophin-vermittelten p75-Signalweges reicht von der Regulation apoptotischer Prozesse, über den Einfluss auf das Wachstum von Axonen bis hin zur Modulation synaptischer Plastizitätsvorgänge (für eine Übersicht siehe Dechant & Barde, 1997, 2002; Schweigreiter, 2006; Bronfman & Fainzilber, 2004).

1.2 Synthese und intrazelluläre Verteilung der Neurotrophine

Neurotrophine werden als Präpropeptide gebildet (240-260 AS). Diese Vorstufe enthält, wie bei Neuropeptiden üblich, ein Signalpeptid, welches die Vorläufersequenz zum Ort der aktiven Proteinbiosynthese, zum rauen Endoplasmatischen Retikulum leitet. Das am ER synthetisierte Propeptid wird posttranslational modifiziert, lagert sich zu Homodimeren zusammen und gelangt dann mit Hilfe von Transportvesikeln in den Golgi-Apparat, wo es schließlich von der *trans*-Seite des Golgi-Netzwerkes ausgehend

in Vesikeln verpackt zum jeweiligen Wirkungsort transportiert wird. Dieser Transport erfolgt entweder auf reguliertem oder konstitutivem Wege (für eine Übersicht siehe Leßmann *et al.*, 2003).

1.2.1 Das Prozessieren der Neurotrophine

Neurotrophine werden während ihres Reifungsprozesses in der Pro-Domäne N-glykosyliert. Es konnte gezeigt werden, dass diese Glykosylierung zum einen für den korrekten Transport der Neurotrophine in den Golgi-Apparat, und zum anderen für den Schutz der Neurotrophine vor Degradation notwendig ist (Suter *et al.*, 1991; Heymach *et al.*, 1996; Seidah *et al.*, 1996a, b). Die Pro-Domäne wird während des Reifungsprozesses proteolytisch entfernt. Das Prozessieren von Propeptiden im allgemeinen erfolgt über einen dreistufigen Mechanismus: 1) die endoproteolytische Spaltung der Prosequenz an der Carboxylseite spezifischer basischer Reste gefolgt von 2) der exoproteolytischen Entfernung der verbleibenden terminalen basischen Reste des Peptids und 3) einer α -Amidierung des Carboxylrestes (für eine Übersicht siehe Zheng *et al.*, 1994; Eipper *et al.*, 1993; Steiner *et al.*, 1998; Canaff *et al.*, 1999).

Die endoproteolytische Spaltung der Propeptide erfolgt durch Protein-Konvertasen, die eine Proteinfamilie Ca^{2+} - und pH-Wert abhängiger Serin-Endoproteasen darstellen. Verschiedene Endoproteasen der Säugetiere wurden bislang charakterisiert, die je nach ihrer bevorzugten Spaltung konstitutiv ausgeschütteter bzw. aktivitätsabhängig ausgeschütteter Proteine in zwei Gruppen unterteilt werden können (für eine Übersicht siehe Canaff *et al.*, 1999): die Spaltung von Proteinen des konstitutiven Sekretionsweges erfolgt bevorzugt durch die Konvertasen Furin, PACE4, PC5 und PC7. Sie werden ubiquitär exprimiert. Ihre biologische Aktivität besitzt ein Optimum bei neutralem pH-Wert und ihr Wirkungsort konzentriert sich auf das Golgi-Netzwerk. Die zweite Gruppe der Propeptid-Konvertasen, die für die Spaltung von Proteinen des regulierten Sekretionsweges verantwortlich gemacht werden, besteht aus den Protein-Konvertasen PC1 und PC2. Diese werden in neuronalen und endokrinen Zellen exprimiert (Zheng *et al.*, 1994) und entfalten ihre optimale biologische Aktivität bei azideren pH-Werten, die im *trans*-Golgi-Netzwerk bzw. in den sekretorischen Granula

vorkommen (für eine Übersicht siehe Canaff *et al.*, 1999). Die Endoproteasen Furin, PACE4, PC5/6-B und PC1 zeigen in sekundären Zelllinien eine effiziente endoproteolytische Spaltung von proNGF, proBDNF und proNT-3, wohingegen PC2 für die genannten Neurotrophine keine proteolytische Aktivität besitzt (Bresnahan *et al.*, 1990; Seidah *et al.*, 1996a, b; Farhadi *et al.*, 1997, 2000). Die Mechanismen der endoproteolytischen Spaltung von proNT-4 sind bislang nicht geklärt. In sekundären Zelllinien, die beide Sekretionswege besitzen, wird der transmembranständige Endoprotease Furin, die bevorzugt eine Spaltaktivität für Proteine des konstitutiven Sekretionsweg besitzt, eine mutmaßlich höhere Sensitivität für proNGF als für proBDNF zugesprochen (Mowla *et al.*, 1999). Für proBDNF konnte in hippokampalen Neuronen gezeigt werden, dass es im Gegensatz zu proNGF bevorzugt in sekretorischen Granula gespalten wird.

Weniger gut untersucht ist die exoproteolytischen Spaltung der Neurotrophine. Lou *et al* konnte im Jahre 2005 Interaktionen der Exopeptidase Carboxypeptidase E und proBDNF in hippokampalen Neuronen zeigen. Eine amphipatische Schleife in der Tertiärstruktur von BDNF wird für die nicht-kovalenten Wechselwirkungen zwischen proBDNF und der Carboxypeptidase E verantwortlich gemacht. Für das Protein NGF ist keine Interaktionen mit der Carboxypeptidase E nachgewiesen. Die Carboxypeptidase E ist ein Ca^{2+} und pH-Wert abhängiger transmembranständiger Rezeptor (Song *et al.*, 1995), der bereits in früheren Jahren für das intrazelluläre Sortieren von Proteinen verantwortlich gemacht wurde (Cool *et al.*, 1997; für eine Übersicht siehe Canaff *et al.*, 1997; Thomas & Davies, 2005). Der durch die Carboxypeptidase E vermittelte Transport von proBDNF in sekretorische Granula (Lou *et al* 2005) weist auf eine mutmaßliche endoproteolytische Spaltung durch zytosolische Konvertasen des aktivitätsabhängigen Sekretionsweges gefolgt von der Prozessierung des Carboxyterminus durch die Carboxypeptidase E in hippokampalen Neuronen hin. Bislang wurde jedoch lediglich der durch die Carboxypeptidase E vermittelte Transport von BDNF in sekretorische Granula, nicht aber die Prozessierung von BDNF durch diese Exoprotease gezeigt. Über eine exoproteolytische Prozessierung der anderen Neurotrophine ist bislang ebenfalls nichts bekannt. Des Weiteren existieren für die

Neurotrophine keine Studien über den dritten Schritt des Prozessierens von Propeptiden, der α -Amidierung des Carboxylrestes.

Studien zur Prozessierung der Neurotrophine zeigen neben der intrazellulären Proteolyse der Pro-Domäne eine Ausschüttung der ungespaltenen Pro-Neurotrophine in den extrazellulären Raum (Heymach *et al.*, 1996; Haubensack *et al.*, 1998; Mowla *et al.*, 1999; Farhadi *et al.*, 2000; Lou *et al.*, 2005). Diese ungespaltenen ausgeschütteten Pro-Neurotrophine aktivieren sowohl den Trk-Rezeptor als auch den p75 Rezeptor (siehe Abschnitt 1.1.1; für eine Übersicht siehe Huang & Reichardt 2003).

Zusammengefasst deuten die verschiedenen Studien zur Prozessierung der Pro-Neurotrophine auf eine bevorzugte posttranslationale Modifizierung von proNGF, proNT-3 und proNT4 durch Enzyme des konstitutiven Sekretionsweges hin, wohingegen proBDNF bevorzugt durch Enzyme des aktivitätsabhängigen Sekretionsweges prozessiert wird (für eine Übersicht siehe Leßmann *et al.*, 2003).

1.2.2 Die intrazelluläre Lokalisation der Neurotrophine

Alle Neurotrophine lassen sich hauptsächlich im Gehirn nachweisen und wirken auf die Zellen des peripheren und des zentralen Nervensystems. Sowohl retrograder als auch anterograder Transport der Neurotrophine ist bekannt. Die Fähigkeit zur Endozytose des Neurotrophin-gebundenen Rezeptor-Komplexes wirft jedoch Probleme bei der Identifizierung neu synthetisierter und internalisierter Neurotrophine auf. Die intrazelluläre Lokalisation der Neurotrophine wird insgesamt kontrovers diskutiert. Aufgrund des geringen endogenen Expressionsniveaus der Neurotrophine wurde bislang eine Vielzahl von Studien an Zellen vorgenommen, die nach einer Transfektion mit entsprechenden Expressionsplasmiden die jeweiligen Neurotrophine überexprimierten. Die subzelluläre Expression von BDNF ist am besten charakterisiert. Für BDNF-exprimierende hippocampale Neurone sind verschiedene Lokalisationsmuster beschrieben worden (Goodman *et al.*, 1996; Haubensack *et al.*, 1998; Mowla *et al.*, 1999; Kohara *et al.*, 2001; Hartmann *et al.*, 2001). Immunzytochemische Studien mit Markern für sekretorische Granula konnten eine Akkumulation von BDNF in Vesikeln des aktivitätsabhängigen Sekretionsweges

nachweisen. Eine vornehmlich somatodendritische Lokalisation von BDNF wurde in diesen Studien beschrieben (Goodman *et al.*, 1996; Haubensak *et al.*, 1998; Hartmann *et al.*, 2001). Eine Akkumulation von BDNF an synaptischen Strukturen hippocampaler Neurone konnte ebenfalls gezeigt werden (Hartmann *et al.*, 2001; Swanwick *et al.*, 2004). Studien mit sekundären Zelllinien zeigten zusätzlich eine Lokalisation von BDNF im *trans*-Golgi-Netzwerk (Haubensak *et al.*, 1998) und eine Kolo­kalisierung mit Markern sekretorischer Granula des aktivitätsabhängigen Sekretionsweges (Goodman *et al.*, 1996; Möller *et al.*, 1998; Mowla *et al.*, 1999). Endogenes BDNF zeigte eine ähnliche dendritische und axonale Verteilung in vesikulären Strukturen (Goodman *et al.*, 1996; Michael *et al.*, 1997; Haubensak *et al.*, 1998; Swanwick *et al.*, 2004), wie überexprimiertes BDNF.

Für NGF konnte eine Lokalisation im Endoplasmatischen Retikulum und eine vesikuläre Verteilung in hippocampalen Neuronen und weiteren Zelltypen beschrieben werden (Blöchl & Thoenen 1996). Eine Lokalisation von NGF in sekretorischen Granula des aktivitätsabhängigen Sekretionsweges wurde nachgewiesen (Möller *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2004). Diese Untersuchungen stehen jedoch im Kontrast zu der von Mowla *et al.* beschriebenen diffusen zytoplasmatischen Verteilung von NGF in endokrinen und hippocampalen Neuronen (Mowla *et al.*, 1999).

Für NT-3 ist sowohl eine axonale als auch eine dendritische Lokalisation in neuronalen Zellen beschrieben (Wang *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2004). Die Lokalisation von NT-3 in sekretorischen Granula ist gekoppelt mit einer aktivitätsabhängigen Sekretion. Dagegen zeigten Farhadi *et al.* eine diffuse zytoplasmatische Verteilung von NT-3 in neuroendokrinen Zellen, die mit einer konstitutiven Sekretion des Neurotrophins verbunden war. Eine stärkere Überexpression von NT-3 in diesen Zellen führte jedoch zu einer Anreicherung des Neurotrophins in vesikuläre Strukturen des aktivitätsabhängigen Sekretionsweges (Farhafi *et al.*, 2000).

NT-4 zeigt eine diffuse zytoplasmatische Verteilung in neuroendokrinen Zellen ohne eine offensichtliche Akkumulation in vesikulären Strukturen (Hibbert *et al.*, 2003).

Zusammengefasst kann für die verschiedenen Neurotrophine entweder eine diffuse zytoplasmatische oder eine vesikuläre Verteilung beobachtet werden. Während BDNF in Neuronen eine vesikuläre Anreicherung in sekretorischen Granula zeigt, sind die

Ergebnisse für NGF und NT-3 weniger eindeutig. Sowohl eine diffuse zytoplasmatische, als auch eine vesikuläre Verteilung werden von verschiedenen Gruppen diskutiert. NT-4 zeigt in den wenigen Untersuchungen eine diffuse zytoplasmatische Verteilung in Neuronen.

1.3 Die Sekretion der Neurotrophine

Bei der Untersuchung der Sekretion von Neurotrophinen führt das geringe Expressionsniveau der endogenen Faktoren ebenfalls zu Detektions-Problemen. Zur Untersuchung der Neurotrophin-Ausschüttung werden deshalb häufig experimentelle Ansätze gewählt, bei denen Genkonstrukte für Wildtyp- oder markierte-Neurotrophine überexprimiert werden.

Im Jahre 1989 konnte zum ersten Mal die Akkumulation von NGF im extrazellulären Medium kultivierter ZNS Neurone gezeigt werden. Die Art der Ausschüttung wurde in diesem Zusammenhang jedoch nicht aufgelöst (zur Übersicht siehe Leßmann *et al.*, 2003). In akuten hippocampalen Schnitten und kultivierten hippocampalen Neuronen, die NGF überexprimierten, kann eine aktivitätsabhängige Akkumulation von NGF im extrazellulären Medium mit Hilfe von ELISA-Messungen beobachtet werden (Bloechl & Thoenen, 1995). Die Ausschüttung von NGF wird jeweils durch K^+ -induzierte Depolarisation, Glutamat- oder Carbachol-Applikation ausgelöst. Neben dieser regulierten Sekretion am Soma und den Dendriten des Neurons ist eine temperaturabhängige konstitutive Ausschüttung von NGF am Soma und an den proximalen Dendriten der gleichen Kulturen zu beobachten (Bloechl und Thoenen, 1996). Eine vergleichbare aktivitätsabhängige Sekretion von BDNF, NT-3 und NGF in akuten hippocampalen Schnitten oder hippocampalen Kulturen, die mit BDNF, NT-3 oder NGF transfiziert waren, konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Goodman *et al.*, 1996; Heymach *et al.*, 1996; Griesbeck *et al.*, 1999; Hartmann *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2004). Diese Studien stehen jedoch im Widerspruch zu den Beobachtungen von Murphy und Kollegen, die zwar ebenfalls eine vesikuläre Lokalisation und aktivitätsabhängige Sekretion des neu synthetisierten BDNF in hippocampalen

Neuronen und neuronalen Zelllinien nachweisen konnten, jedoch eine diffuse zytoplasmatische Verteilung von NGF und NT-3, gekoppelt mit einer konstitutiven Ausschüttung, beobachteten (Mowla *et al.*, 1999, 2001; Farhadi *et al.*, 2000). Für NT-4 konnte bislang nur eine konstitutive Ausschüttung in hippocampalen Neuronen nachgewiesen werden (Hibbert *et al.*, 2003).

Die Auslöser für eine aktivitätsabhängige Ausschüttung sind für BDNF am besten untersucht. Eine aktivitätsabhängige Sekretion von BDNF aus hippocampalen Neuronen wird durch eine Depolarisation der Neurone nach Erhöhung der extrazellulären K^+ -Konzentration induziert (Goodmann *et al.*, 1996, Griesbeck *et al.*, 1999). Des Weiteren wird die Ausschüttung von BDNF durch eine hochfrequente elektrische Reizung der Neurone stimuliert (Balkowiec *et al.*, 2000, Lever *et al.*, 2001, Hartmann *et al.*, 2001, Gärtner *et al.*, 2002). Außerdem wurden in früheren Studien eine Neurotransmitter- und eine Neurotrophin-induzierte Neurotrophin-Sekretion gezeigt (Canossa *et al.*, 1997; Krüttgen *et al.*, 1998; Canossa *et al.*, 2001; Canossa *et al.*, 2002). Die Neurotransmitter-induzierte Ausschüttung von BDNF erfolgt dabei über die Aktivierung von ionotropen und metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluR) (Canossa *et al.*, 2001). Die Neurotrophin-vermittelte Sekretion von BDNF erfolgt über die Aktivierung der Trk-Rezeptoren und des p75 Rezeptors (Canossa *et al.*, 1997; Krüttgen *et al.*, 1998). Genau wie die durch metabotrope Glutamat-Rezeptor-Agonisten induzierte BDNF-Sekretion wird die Neurotrophin-induzierte Neurotrophin-Sekretion durch das Chelatieren der intrazellulären jedoch nicht der extrazellulären Ca^{2+} -Ionen verhindert. Die für den Freisetzungprozess notwendige Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wird bei der Neurotrophin- und Glutamat-induzierten Sekretion durch die Aktivierung des PLC γ Signalweges erreicht (Canossa *et al.*, 2001). Das durch PLC γ synthetisierte IP $_3$ sorgt für die Ca^{2+} -Freisetzung aus den intrazellulären Ca^{2+} -Speichern. Die Aktivierung des NO/cGMP/PKG-Signalweges führt zu einem reduzierten Ca^{2+} -Efflux aus den IP $_3$ sensitiven intrazellulären Speichern. Eine verminderte Sekretion von BDNF konnte nach Aktivierung des NO-Signalweges beobachtet werden. Umgekehrt führt die Inhibition des NO-Signalweges zu einer verstärkten Freisetzung von BDNF (Canossa *et al.*, 2002).

Die für die Induktion der BDNF-Sekretion angewendeten elektrischen Stimulationsmuster wie *theta burst* Stimulation (TBS) oder die sogenannte hochfrequente Stimulation (HFS) (Hartmann *et al.*, 2001, Gärtner *et al.*, 2002, Balkowiec *et al.*, 2000/02) sind identisch mit den LTP-induzierenden Stimulationsprotokollen (Bliss *et al.*, 1993, Malenka *et al.*, 1999). Ein initialer Ca^{2+} -Influx aus dem extrazellulären Medium ist neben dem Ca^{2+} -Efflux aus den intrazellulären Speichern für die Induktion dieses Sekretions-Mechanismus notwendig. (Balkowiec *et al.*, 2000, 2002; Hartmann *et al.*, 2001, Gärtner *et al.*, 2002). Der initiale Ca^{2+} -Fluss für die Induktion der BDNF-Sekretion kann sowohl über NMDA-Rezeptoren als auch über *voltage gated calcium channels* (VGCC) erfolgen. Die Anwesenheit von AMPA und NMDA-Rezeptor Antagonisten und von Ca^{2+} -Kanal-Blockern kann die Freisetzung von BDNF nach elektrischer Stimulation aus hippocampalen Neuronen verhindern (Hartmann *et al.*, 2001). An 3 DIV alten hippocampalen Neuronen konnten Balkowiec *et al.* dagegen eine intakte BDNF-Freisetzung in Anwesenheit von AMPA und NMDA-Rezeptor-Antagonisten zeigen. Für den notwendigen Ca^{2+} -Influx wurden in diesen Untersuchungen die N-Type VGCCs verantwortlich gemacht (Balkowiec *et al.*, 2002). Die Aktivierung der metabotropen Glutamat-Rezeptoren führt in hippocampalen Schnitten zu einer von TBS unabhängigen BDNF-Freisetzung (Canossa *et al.*, 2001; Balkowiec *et al.*, 2002).

Vor kurzem konnte die synaptische Sekretion von BDNF mit Hilfe von GFP-markiertem BDNF untersucht werden. BDNF-GFP akkumuliert an synaptischen Strukturen und wird durch K^+ -induzierte Depolarisation bzw. elektrische Stimulation an eben diesen Strukturen ausgeschüttet (Hartmann *et al.* 2001, Kojima *et al.* 2001). Aktivitätsabhängiger Transfer von BDNF-GFP von präsynaptischen Neuronen zu postsynaptischen Neuronen wurde ebenfalls beschrieben (Kohara *et al.*, 2001). Eine synaptische Sekretion der anderen Neurotrophine wurde in Säugetieren bislang nicht untersucht.

Die meisten Untersuchungen zur Sekretion von Neurotrophinen wurden bislang an neuronalen Massenkulturen vorgenommen. Mit Hilfe von proteinbiochemischen

Nachweismethoden wurde die Konzentration des Neurotrophins im extrazellulären Medium bestimmt. Diese Untersuchungen konnten eine langsame aktivitätsabhängige Ausschüttung mit einem Höhepunkt der Neurotrophin-Ausschüttung innerhalb der ersten fünf Minuten nach Beginn der Depolarisation der Kulturen zeigen. Die Untersuchung der BDNF-Sekretion mit Hilfe des GFP-markierten BDNF stellt dagegen eine Analysemethode dar, die sowohl eine räumlich als auch eine zeitlich hochaufgelöste Untersuchung des Ausschüttungsprozesses ermöglicht. Unter Verwendung des GFP-markierten BDNF kann eine Ausschüttung von BDNF mit einer Verzögerung von 30 sec nach Beginn der Stimulation beobachtet werden. Die Zeitkonstante der exponentiellen Ausschüttung beträgt 250 s (Hartmann *et al.*, 2001). Diese zeitlich hochaufgelöste Untersuchung legt nahe, dass die Geschwindigkeit der Neurotrophin-Sekretion im Vergleich zur Neurotransmitter-Ausschüttung langsam erfolgt. BDNF und andere Neuropeptide sind voluminöse biochemische Substanzen gepackt in sekretorischen Granula, bei denen die alleinige Ausbildung der Vesikel-Fusionspore für die Freisetzung des Peptids nicht ausreicht (Barg *et al.*, 2002). Des Weiteren spielt die Solubilisierung der Peptide in Abhängigkeit vom pH-Wert eine wesentliche Rolle für die Geschwindigkeit des Freisetzungsprozesses. Der pH-Wert solcher Vesikel liegt bei 5.5. In sekretorischen Granula neuroendokriner Zellen konnte gezeigt werden, dass es nach der Öffnung der Fusionspore zunächst zu einem Protonen-Austausch mit dem extrazellulären Milieu kommt, bevor die Fusionspore groß genug ist, um die Peptide in den extrazellulären Raum zu entlassen (Barg *et al.*, 2002). Demgegenüber stehen die Beobachtungen von Han *et al.* (1997). In diesen Untersuchungen konnte demonstriert werden, dass ein aktivitätsabhängiger Ca^{2+} -Influx für die Entstehung fusionskompetenter sekretorischer Vesikel verantwortlich ist. Eine mutmaßliche Ca^{2+} -abhängige Aktivierung von Protonenpumpen soll für den Alkalisierungsprozess der sekretorischen Granula vor der eigentlichen Exozytose der Vesikel verantwortlich sein (Han *et al.*, 1997). Der langsame Freisetzungsprozess, die zur Fusion benötigte langanhaltende intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationserhöhung und die Synthese von Sekretionspeptiden grenzen den Zyklus sekretorischer Vesikel von dem der synaptischen Vesikel ab.

1.4 Die Rolle von BDNF bei synaptischer Plastizität

Die modulatorische Wirkung von BDNF auf die synaptische Transmission in hippocampalen Neuronen wurde bereits gut untersucht. Die vorwiegend präsynaptisch charakterisierten Effekte von BDNF auf die synaptische Transmission und die Befunde für die Bedeutung des Neurotrophins bei der Ausbildung von LTP geben Hinweise auf eine mögliche Funktion von BDNF als retrogradem Botenstoff bei synaptischen Plastizitätsvorgängen (für eine Übersicht siehe Lu, 2003).

Die ersten Befunde für eine mutmaßlich präsynaptische Wirkung von BDNF in hippocampalen Neuronen ergaben sich aus den Beobachtungen einer Frequenzzunahme der exzitatorischen Miniaturströme nach einer Applikation von BDNF. Des Weiteren wurde in dieser Studie eine BDNF abhängige Potenzierung der evozierten postsynaptischen Ströme beobachtet. Die Stromamplitude der exzitatorischen Miniaturströme blieb dabei unverändert. Die Frequenzzunahme der Miniaturströme und die Zunahme der Amplitude der evozierten postsynaptischen Ströme gekoppelt mit der unveränderten Amplitude der Miniaturströme schließt auf einen präsynaptischen Effekt von BDNF (Leßmann *et al.*, 1994). In akuten hippocampalen Schnitten adulter Ratten kann der Einfluss von BDNF auf die glutamaterge synaptische Transmission bestätigt werden (Kang & Schuman, 1995). In hippocampalen Schnitten adulter, BDNF-defizienter Mäuse wird eine schnelle Reduktion der Anzahl gedockter synaptischer Vesikel bei hochfrequenter Stimulation beobachtet (Pozzo-Miller *et al.*, 1999). Darüber hinaus ist ein reduziertes Expressionsniveau der synaptischen Vesikelproteine Synaptophysin und Synaptobrevin im Hippokampus BDNF-defizienten Mäuse zu beobachten. (Pozzo-Miller *et al.*, 1999). Der MAPK- und der PI₃K-Weg werden für diese präsynaptische Ermüdung verantwortlich gemacht. Eine Inhibition des TrkB-vermittelten PLC γ -Signalweges zeigt hingegen keinen Einfluss auf die Anzahl der gedockten synaptischen Vesikel (Gottschalk *et al.*, 1998/1999 doch siehe Jovanovic *et al.*, 2000). Einen weiteren präsynaptischen Effekt von BDNF legten Schinder *et al.* dar (Schinder *et al.*, 2000). In dieser Studie wurde sowohl bei Glutamat/Glutamatergen Synapsen (glutamaterges Neuron projiziert auf glutamaterges Neuron) als auch bei Glutamat/GABAergen Synapsen (glutamaterges Neuron projiziert auf GABAerges

Neuron) die Frequenz der Miniaturströme nach BDNF-Applikation erhöht. Lediglich bei den Glutamat/Glutamatergen Verknüpfungen werden Veränderungen der evozierten Antworten beobachtet. Li *et al.* (1998 a, b) konnten in Kulturen von embryonalen Neuronen der Ratte zeigen, dass lediglich die Überexpression eines dominant-inhibierend wirkenden trunkierten TrkB T1-Rezeptors in der Präsynapse die BDNF-induzierte Potenzierung der synaptischen Miniaturströme und der evozierten synaptischen Ströme glutamaterger Zellen vermindert. Eine Überexpression des trunkierten Rezeptors in der Postsynapse zeigt hingegen keinen Effekt auf die durch die akute BDNF-Zugabe vermittelte Potenzierung.

Entgegen diesen Untersuchungen, die eine vornehmlich präsynaptische Wirkung von BDNF belegen (Leßmann *et al.*, 1994; Kang & Schuman, 1995; Li *et al.*, 1998a, b; Pozzo-Miller *et al.*, 1999) konnten durch Levine *et al.* (Levine *et al.*, 1995/1998) postsynaptische Effekte des durch BDNF aktivierten TrkB-Signalweges dargelegt werden. Eine verstärkte Phosphorylierung der NMDA-Rezeptor Untereinheit 2B, mit der eine erhöhte Leitfähigkeit des NMDA-Rezeptors einhergeht, ist nach Aktivierung des TrkB-Rezeptors nach BDNF-Zugabe zu beobachten. Die Phosphorylierung der NMDA-Rezeptor Untereinheit soll eine verstärkte Assoziation der Untereinheit 2B mit der Phosphatase PTP1D zur Folge haben (Lin *et al.*, 1998 und 1999). BDNF vermittelte Ca^{2+} -Ströme in Dendriten und *Spines* hippocampaler Neurone (Kovalchuk *et al.*, 2002) und BDNF vermittelte Phosphorylierung des postsynaptischen Ca^{2+} -aktivierenden K^{+} -Kanals SK2, der für hyperpolarisierende Effekte verantwortlich ist (Kramar *et al.*, 2004), sind weitere Befunde für eine postsynaptische Aktion von BDNF.

Der Einfluss von BDNF auf die Langzeitpotenzierung (LTP) wurde bereits in mehreren Studien gezeigt. BDNF-defiziente Mäuse zeigen neben einer geringeren Lernfähigkeit eine starke Beeinträchtigung von LTP in hippocampalen Neuronen (Korte *et al.*, 1995/1996; Patterson *et al.*, 1996), im somatosensorischen Kortex (Itami *et al.*, 2003) und im visuellen Kortex (Bartoletti *et al.*, 2002; Abidin *et al.*, 2006). Die Beeinträchtigung der hippocampalen LTP kann durch die exogene Applikation von BDNF (Patterson *et al.*, 1996) oder die virale Transfektion der CA1 Pyramidenzellen mit BDNF-Expressionsplasmiden beseitigt werden (Korte *et al.*, 1995, doch siehe

Zakharenko *et al.*, 2003). Das extrazelluläre Abfangen von endogen freigesetztem BDNF mit BDNF-Antikörpern führt in akuten hippocampalen Schnitten und im visuellen Kortex zu reduzierter LTP. (Figurov *et al.*, 1996; Akaneya *et al.*, 1996, 1997; Kang *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1999). Untersuchungen mit genetisch veränderten Mäusen, bei denen die PLC γ -Bindungsstelle bzw. die Shc-Bindungsstelle des TrkB-Rezeptors durch eine Punktmutation ausgeschaltet wurde, lassen der TrkB-PLC γ Bindungsseite Bedeutung - über einer Phosphorylierung der CaMKIV und der Hochregulation des Transkriptionsfaktors CREB - bezüglich der hippocampalen Langzeitpotenzierung zukommen (Minichiello *et al.*, 1998, 2002). Der Ras/MAPK Signalweg über die Shc-Bindungsstelle des TrkB-Rezeptors zeigt keinen Einfluss auf *early*- oder *late*-LTP (Korte *et al.*, 2000). Darüber hinaus zeigten Gärtner *et al.* dass die hippocampale LTP über eine prä- und postsynaptische TrkB-vermittelte PLC γ -Aktivierung verläuft (Gärtner *et al.*, 2006). Rein präsynaptische Effekte von BDNF auf die hippocampale LTP wurden im Kontrast dazu in früheren Studien beschrieben (Xu *et al.*, 2000; Zakharenko *et al.*, 2003 doch siehe Kovalchuk *et al.*, 2002; Kramar *et al.*, 2004, Barco *et al.*, 2005) Es bedarf weiterer Studien um diese Diskrepanzen zu klären.

Materialien

2.1 Chemikalien

Agar (select)	Sigma
Agarose	Gibco BRL
APV	Tocris/Sigma
ARAC	Sigma
B27	Gibco BRL
BES	Sigma
Calciumchlorid 97%	Riedel-de Haen
Calciumchlorid-Dihydrat	MERCK
Carbogenhydrat	Merck
D(+)-Glucose	Merck
DMEM	Gibco BRL
DMSO	Sigma
DNQX	Sigma
dNTPs	Boehringer Mannheim
Essigsäure	
Ethanol	Baker
FCS	Biochrom
FM4-64	Molecular Probes
Gluconsäure	Janssen Chimica
Glucose	Merck
Glutamax	Invitrogen
Glycerin	Riedel de Haen
Glycin	Roth
Hefeextrakt	Gibco BRL
HEPES	Roth
Hydrochlorid	Sigma
Insulin	Gibco BRL
Kalium-Gluconat	Janssen
KCl	Merck
KH ₂ PO ₄	Roth
KOH	
L-Glutamat	Sigma
Mg-ATP	Sigma
MgCl-Hexahydrat	Meck
Monensin	
Na ₂ HPO ₄	Merck
Na ₃ -GTP	Sigma
NaCl	Merck
NaH ₂ PO ₄	Merck
NaOH	Sigma
Natriumacetat	

Natrium-Pyruvat	Invitrogen
Neurobasalmedium	Life Technologies
PEI 800 kDa	Fluka
Penicillin-Streptomycin-Glutamine	Invitrogen
p-Formaldehyd	
Phenolrot	Sigma
Sucrose	
Triton X 100	Serva
Trypanblau	Sigma
Trypsin 2.5%	Invitrogen
Trypsin-EDTA	Invitrogen
SybyrGold	
Loading Dye	Fermentas
DNA Ladder	Fermentas

2.2 Enzyme, Substrate

DNase I	Roche Diagnostics
Rinderserumalbumin (BSA)	Serva
RNase A	Boehringer Mannheim
Taq-Hot-Start-Polymerase	MBI Fermentas
Taq-Polymerase	MBI Fermentas

2.3 Geräte

AD/DA-Umwandler -1322A 18 Bit Data Acquisition	DigiData
AOTF Controller	Visitech International
Badheizung	Luigs & Neumann Badcontroller
CCD IR Camara	Till Photonics
CCD-Kamera	PCO CCD Imaging
Chopper	McIlwain
CO ₂ -Inkubatoren - HeraCell 240	Heraeus
Elektrodenziehgerät - Model PP-830	Narishige
Elektroporationsverstärker - ELC-03M	NPI
Epi Fluoreszenzmikroskop	Olympus BX51WI
Fluoreszenzlampe - U-RFL-T Brenner	Olympus
Handwheel SM5	Luigs & Neumann
Laser	Laser Physics
Lichtmikroskop	Olympus CK40
Lichtmikroskop	Zeiss
Lichtquelle	Schott KL1500 electronic
Magnetrührer - MR 3001	Heidolph
Mikromanipulator	Luigs & Neumann
Neubauer-Zählkammer Brand	Brand
Osmometer	Knauer
<i>Patch Clamp</i> Verstärker EPC-8	HEKA
PCR-Cycler	Eppendorf <i>Mastercycler Personal</i>
pH-Meter	Inolab
Photometer	Shimadzu UV1402
Piezo	Piezosystem Jena
Pipetten	Eppendorf

Shutter	UniBlitz Electronics
Sterile Werkbank	Heraeus
Stimulationsgerät - Isolated Pulse Stimulator Modell 2100	A-M Systems
TDS 210 Two channel Digital Real Time Oszilloskop	Textronik
Thermomixer	Eppendorf
Thermomixer	Eppendorf 5436
Trockenschrank	Heraeus
Video Monitor WV-BM 1410	Panasonic
Wasserbad	Memmert
Zentrifuge	Heraeus Megafuge 1.0R Rotor 2252
	Eppendorf 5415C Tischzentrifuge
	Sorvall Rotor SS34

2.4 Kits

EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen
DNeasy Kit	Qiagen

2.5 Software

Bildaufnahme	Metaview (Universal Imaging Corporation)
Statistik	MS Excel (Microsoft Corporation), Sigmaplot (SPSS Science)
Abbildungslayout	Clampfit PClamp
Schriftsatz	CorelDRAW! (Corel Corporation)
Ableitung	MS Word (Microsoft Corporation)
	Clampex

2.6 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen	Laborservice Brenzinger
Kryo-Röhrchen	Nunc
miniPERM-Schalen	Heraeus
Plastikwaren Eppendorf	Eppendorf, Greiner, Nunc, Sarstedt
Sterilfilter	Filtropur S, 0,2 µm Fluka
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nunc
Millicell CM	Millipore

2.7 Versuchstiere

Wistar Ratten	
---------------	--

BDNF-defiziente Mäuse	Korte <i>et al.</i> , 1995
Nestbaumaterial	Tapvei – Holzwolle
Zuchtfutter	Altromin 1314 - Panacur versetzt mit Fenbendazol
Käfigtyp	Makrolon Typ III A
	Bodenmaße
Höhe	383 x 221 mm
Bodenfläche	150 mm
Wanddicke	810 cm ²
Einstreu Grobe Holzspähne j.	3 mm
Wasser	pH neutral, ohne Zusätze
Versteckhäuschen	Eigenbau

2.8 Zelllinien

COS7	Nierenmesenchymalzellen der grünen Meerkatze, SV 40 transformiert
PC12	Phäochromozytomzellen der Ratte, aus Nebennierentumor

2.9 Primer

3'NEO	5'-GATTCGCAGCGCATCGCCTT-3'
BD2A	5'-GTGTCTATCCTTATGAATCGC-3'
BK01	5'-ATAAGGACGCGGACTTGTACA-3'

2.10 Puffer, Lösungen und Medien

ACSF	90	mM	NaCl
	25	mM	NaHCO ₃
	10	mM	Glucose
	2.5	mM	KCl
	2.5	mM	CaCl ₂
	2	mM	MgCl ₂
	1.25	mM	Na ₂ HPO ₄
Agarose-Gel	1,5	%	Agarose in TBE
2× BBS	50	mM	BES pH 7.6
	280	mM	NaCl
	1.5	mM	Na ₂ HPO ₄ ·7 H ₂ O
DL-APV-Stocklösung	50	mM	DL-APV in 1 M NaOH

DMEM/10% FCS	10	%	FCS
	5	mM	Glucose
	1	mM	Glutamax
	10	mM	Hepes
	300	µl	Insulin
	250	µl	PEST in DMEM
DNase-Stocklösung	6	mg/ml	DNase in PBS (-/-)
DNQX-Stocklösung	50	mM	DNQX in DMSO
Expyr	2	mM	CaCl ₂
	10	mM	Glucose
	10	µM	Glycin
	15	mM	HEPES
	5	mM	KCl
	1	mM	MgCl ₂
	110	mM	NaCl pH 7.3
FM4-64® -Stocklösung	10	mM	FM4-64®-64 in DMSO
FM4-64® - Arbeitslösung	1	mM	FM4-64®-64 in HBS ^{-/-}
FM4-64® - Färbelösung	10	µM	FM4-64®-64 in HBSK ^{2/1}
HBS(-/-)	20	mM	HEPES
	4	mM	KCl
	100	mM	NaCl
	1	mM	Na ₂ PO ₄ pH 7.3
HBS(2/1)	2	mM	CaCl ₂
	10	mM	Glucose
	10	µM	Glycin
	1	mM	MgCl ₂
			in HBS(-/-)
HBS(2/1)	10	mM	Glucose
	10	µM	Glycin
	3	mM	MgCl ₂ in HBS(-/-)
HBSK50 ^{2/1}	2	mM	CaCl ₂
	10	mM	Glucose
	10	µM	Glycin
	20	mM	HEPES
	50	mM	KCl
	1	mM	MgCl ₂
	89	mM	NaCl

	1	mM	Na ₂ PO ₄ pH 7.3
Insulin-Stocklösung	12,5	g/l	Insulin in 0,01 M HCL
Intra	105	mM	Kalium-Gluconat
	10	mM	HEPES
	10	mM	Glucose
	5	mM	KCl
	1	mM	EGTA
	1	mM	MgCl ₂
	1	mM	NaCl
	4	μM	ATP
	1	μM	Na ₃ GTP pH 7.2
MEM	1	fach	MEM
	1	mM	Glutamin
MPBS(-/-)	1	mg/ml	BSA
	6	μg/ml	DNase I
	10	mM	Glucose
	1	mM	Glutamax
	4	mM	NaOH
	1	fach	PEST
	5	mg/ml	Phenolrot
	1	mM	Pyruvat in PBS
MPBS(+/+)	0.25	mM	CaCl ₂
	5.8	mM	MgCl ₂ in MPBS(-/-)
NB/B27	1	fach	B27
	1	mM	Glutamax
	1	fach	PEST in
Pulsing Puffer	1	mM	MgCl ₂
	0.7	mM	Na ₂ HPO ₄ (2H ₂ O)
	6	mM	Glucose
	5	mM	KCl
	1.8	mM	CaCl ₂
	1	mM	MgCl ₂
	0.7	mM	Na ₂ HPO ₄
PSB(-/-)	2	mM	KH ₂ PO ₄
	150	mM	NaCl
	8	mM	Na ₂ HPO ₄
PSB(+/+)	0.9	mM	CaCl ₂
	0.5	mM	MgCl ₂ in PBS(-/-)

SybyrGold	0.08	%	SybyrGold in TBE
TBE-Puffer	89	mM	Tris/Borat pH 8.0
	89	mM	Borsäure
	2	mM	EDTA
Trypanblau-Lösung	5	g/l	Trypanblau in PBS(-/-)

Kapitel 3

Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 primäre Zellkultur

3.1.1.1 Präparation hippokampaler Neurone und kortikaler Astrozyten der Ratte

(nach Brewer & Cotman, 1989; Brewer *et al.*, 1993)

Für die Präparation hippokampaler Neurone und kortikaler Astrozyten wurden Ratten 0-3 Tage nach der Geburt (Postnatale Tage P₀-P₃) verwendet. Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Die betäubte neugeborene Ratte wurde zunächst mit Hilfe einer Schere dekapitiert. Anschließend wurde die Kopfhaut mit einem Skalpell aufgeschnitten und zu den Seiten hin aufgeklappt. Die freigelegte Schädeldecke wurde an den knorpeligen Verbindungsstellen oberhalb des Auges und entlang der Mittellinie durchtrennt und die Schädeldeckenhälften unter Verwendung zweier Pinzetten zur Seite hin aufgeklappt. Mit Hilfe eines Spatels wurde das Gehirn herausgelöst und in einen gekühlten Tropfen MPBS(+/+) auf eine Präparierschale überführt.

Der Hippokampus und der Kortex wurden isoliert und in 0.5 ml 4°C kaltem MPBS(+/+) aufgefangen. Nach Beendigung der Präparation wurde der Puffer abpipettiert und die Gewebelöcke in einer 0.25 %igen Trypsinlösung für mehrere

Minuten im Thermoblock bei 37°C bei 800 Umdrehungen pro Minute (rpm) geschüttelt. Die Inkubationszeiten sind der Tabelle 3.1 zu entnehmen.

Gewebe	Stadium	Inkubationszeit
Hippokampus	P ₀ -P ₁	8 min
	P ₂	10 min
	P ₃	12 min
Cortex	P ₀ -P ₁	15 min
	P ₂	16 min
	P ₃	18 min

Tabelle 3.1: Inkubationszeiten für die Trypsinierung des neuronalen Gewebes. Mit steigendem Alter der Ratten erhöht sich ebenfalls die Dauer für eine erfolgreiche Trypsinierung. Hippokampales Gewebe zerfällt leichter als kortikales Gewebe.

Die Trennung der neuronalen und glialen Zellen erfolgte durch das Präplatieren. Unterschiedliche Adhäsionseigenschaften der beiden Zelltypen werden dabei ausgenutzt. Die glialen Zellen des kortikalen Gewebes wurden für die Kultur der Astrozyteninseln benötigt, auf denen später die hippocampalen Neuronen ausgesät wurden. Mit dieser Methode wurden so genannte Mikrokulturen hergestellt (Lessmann & Heumann, 1997), die eine Untersuchung an kleinen neuronalen Netzwerken ermöglichten.

Das Präplatieren erfolgte in 6 cm großen Petrischalen. Die gewünschte Zelldichte (2-3 Millionen Zellen) wurde in 3 ml DMEM/FCS 10% suspendiert, in die Petrischale pipettiert und im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Inkubationszeit richtete sich nach dem Alter der Ratten und nach der Art des Gewebes (Tabelle 3.2).

Gewebe	Stadium	Inkubationszeit
Hippokampus	P ₀	65 min
	P ₃	55 min
Cortex	P ₀	60 min
	P ₃	50 min

Tabelle 3.2: Inkubationszeiten für das Präplatieren des trituierten neuronalen Gewebes. Die Adhäsion der Astrozyten erfolgt bei kortikalem Gewebe schneller als bei hippocampalem Gewebe. Mit zunehmendem Alter der Ratten sinkt die Inkubationszeit für das Präplatieren.

Nach der Inkubation wurde die Petrischale mit den kortikalen Zellen nach Verwerfen des Überstandes mit 3 ml DMEM/10% FCS aufgefüllt und bis zur Passage der

Astrozyten (nach 2-4 Wochen) im Brutschrank aufbewahrt. Die hippokampale Neuronensuspension wurde in ein Röhrchen überführt und die Petrischale mit der adhärten Glia wurde verworfen. Die Neuronensuspension wurde 10 min lang bei 24°C und 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 3 ml DMEM/10% FCS (vorinkubiert, 37°C) resuspendiert. Die gewünschte Zelldichte wurde auf passagierten Gliainseln ausgesät (siehe Abschnitt 3.1.2). 4-24 Stunden nach der Aussaat erfolgte ein Mediumwechsel von DMEM/FCS 10 % auf NB/B27.

3.1.1.2 Passagieren kortikaler Astrozyten der Ratte

(nach Leßmann & Heumann 1997/1998)

Das Passagieren kortikaler Astrozyten wurde ca. zwei Wochen nach der Präparation des Rattengehirns durchgeführt (vgl. 3.1.1.1). Nach diesem Zeitraum bildeten die während des Präplatierens adhärten Astrozyten eine konfluente Astrozytenkultur auf dem Boden der Petrischale. Diese Kulturen wurden für die Astropassage verwendet.

Nach dem Waschen der Astrozyten mit 1,5 ml DMEM/FCS 10% wurden 1,5 ml einer 1 mM EDTA Lösung und 30 µl einer 2,5 % Trypsinlösung in die Petrischale pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 – 30 Minuten im Brutschrank (37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit) konnten die Zellen durch Abpipettieren und Abspritzen des Schalenbodens in Suspension gebracht werden. Die Zellsuspension wurde in 3 ml DMEM/FCS 10% aufgenommen und der Schalenboden mit einem weiteren ml DMEM/FCS 10% gewaschen. Die Suspension wurde bei 900 rpm für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment in 3 ml DMEM/FCS 10% resuspendiert. Nach dem Zählen der Zellen in der Neugebauer-Zählkammer wurden 80 000 Zellen auf Deckgläschen (12mm Ø) ausgesät. Die Deckgläschen wurden zuvor für mehrere Stunden in 100% Ethanol aufbewahrt, unter einem Bunsenbrenner abgeflämmt und in eine 3,5 cm große Petrischale überführt. 2-3 Tage nach der Aussaat der Astrozyten erfolgte die Zugabe von 3-4 µM ARAC. Ein bis zwei Wochen nach der Passage bildeten die adhärten Astrozyten einzelne Inselgruppen mit einer Größe von 10⁴µm². Auf diese Kulturen wurden die hippokampalen Neurone ausgesät.

3.1.1.3 Transfektion primärer Neurone mit der Ca^{2+} -Phosphat-Präzipitation

(nach Chen & Okayama, 1988; Kohrmann *et al.*, 1999)

Die Transfektion primärer Neurone erfolgte mit Hilfe der Ca^{2+} -Phosphat-Präzipitation. Die Ca^{2+} -Phosphat-Präzipitation wurde an hippocampalen Neuronen vorgenommen, die 8 Tage in Kultur waren. 2 - 4 Tage nach der Ca^{2+} -Phosphat-Präzipitation wurden die transfizierten Zellen untersucht.

3 μg Plasmid-DNA wurden in einem Eppendorfreaktionsgefäß vorgelegt und 32,5 μl steriles Zellkulturwasser zu den 3 μg DNA hinzu pipettiert. Nacheinander wurden zur Plasmid-DNA-Lösung 4,5 μl einer 2,0 M CaCl_2 -Lösung und 40 μl des 2 \times BBS-Puffer tropfenweise unter ständigem Schütteln hinzu gegeben. Alle Verbrauchsmaterialien waren gut gekühlt (4°C), um eine effiziente Ausbildung des Präzipitats zu gewährleisten. Die zu transfizierenden Neurone wurden aus dem Brutschrank geholt und 800 μl des konditionierten Mediums in ein Eppendorfreaktionsgefäß pipettiert. Die Neurone wurden zurück in den Brutschrank gestellt und die entnommenen 800 μl des konditionierten Mediums für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Transfektionslösung zu den 800 μl Medium tropfenweise unter Schütteln des Mediums hinzugegeben, die Neurone erneut aus dem Brutschrank geholt und die verbleibenden 1-1,2 ml des konditionierten Mediums aus der Zellkulturschale in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Das mit der Plasmid-DNA versetzte Medium wurde mit Hilfe einer Pipette gut durchmischt und in die Mitte der Zellkulturschale getropft, die Zellkulturschale leicht geschwenkt und beides, 1,0 – 1,2 ml konditioniertes Medium und primäre Zellen, für 2,5 h im Brutschrank inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 37°C warmen HBS(0/3)-Puffer zweimal gewaschen. Anschließend wurden 1 ml frisches, mindestens 3 h vor Gebrauch im Brutschrank equilibriertes NB/B27 Medium und 1,0 ml des konditionierten Mediums in die Zellkulturschale pipettiert und mit 4%igem FCS versetzt. Nach erneuten leichten Schwenken der Zellkulturschale wurden die transfizierten Neurone in den Brutschrank zurückgestellt.

3.1.1.4 Präparation organotypischer Schnittkulturen des Hippokampus

(nach Stoppini *et al.*, 1989)

Für die Präparation organotypischer hippokampaler Schnittkulturen wurden Mäuse 3-5 Tage nach der Geburt (Postnatale Tage P₃-P₅) verwendet. Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Das Gehirn wurde wie unter dem Punkt 3.1.1.1 isoliert und in gekühltes MEM+ überführt. Das Cerebellum wurde mit einem koronalen Schnitt entfernt. Mit einem Gewebe Chopper (McIlwain) wurden 350 µm dünne sagittale Gehirnschnitte angefertigt. Die hippokampale Formation, das Subikulum und der entorhinale Kortex wurden vom restlichen Schnitt isoliert und die Blutgefäße entfernt. Anschließend wurden die Schnitte auf Polytetrafluoroethylen Membranen (Millicell-CM) überführt, die in 1 ml Kulturmedium bestehend aus NB/B27 mit 1% FCS und 5mM MgCl₂ eingebettet waren. Überschüssiges Medium auf den Membranen wurde mit Hilfe einer Pipette entfernt. Die Schnitte wurden in einem Inkubator bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit aufbewahrt. Das Medium wurde alle 3-4 Tage gewechselt. Beim jedem Mediumwechsel mit einer ungeraden Zahl (erster Mediumwechsel, dritter Mediumwechsel, fünfter Mediumwechsel ...) wurde 10 µM AraC zum Medium hinzugefügt.

3.1.2 sekundäre Zelllinien

3.1.2.1 Polyornithinbeschichtung von Deckgläsern

PC12 Zellen wurden auf PO-beschichtete Deckgläser kultiviert. Dafür wurden die Deckgläser zunächst für 5h bei 130°C trocken sterilisiert. Die abgekühlten Deckgläser wurden in einer Polyornithin-Lösung, bestehend aus 1mg/ml Polyornithin Hydrobromid in 0,15M Boratpuffer (pH-Wert 8,35), überführt. Nach einer 4h Inkubation wurden die Deckgläser dreimal gewaschen, einzeln getrocknet und in eine sterile Zellkulturschale überführt.

3.1.2.2 Auftauen sekundärer Zellen

Die sekundären Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C schnell aufgetaut, in 10 ml DMEM/10% FCS (COS7 Zellen) bzw. DMEM/10% FCS/5% HOS (PC12 Zellen) aufgenommen und bei 900 rpm für 5min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Sediment in 15 ml DMEM/10% FCS resuspendiert und in eine 75 cm² Zellkulturflasche überführt. Die Zellen wurden in einem Inkubator bei 37 °C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit aufbewahrt.

3.1.2.3 Einfrieren sekundärer Zellen

Die sekundären Zellen wurden gemäß 3.1.2.4 bzw. 3.1.2.5 von einer 75 cm² Zellkulturflasche gelöst, die Suspension bei 1000 rpm für 5 min bei RT zentrifugiert und das Sediment in 1ml Kulturmedium mit 10% DMSO resuspendiert. Die suspendierten Zellen wurden in Kryoröhrchen überführt und nach dem Einfrieren im -80°C Gefrierschrank in Stickstoff überführt.

3.1.2.4 Passagieren von COS 7 Zellen

Die sekundären Zellen wurden zur Regulation der Zelldichte jeden 4. Tag passagiert. Dafür wurden die Zellen zunächst mit PBS^{-/-} gewaschen und anschließend in 10 ml Ablösepuffer, bestehend aus 0,1 % Trypsin-EDTA in PBS, für 5-10 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Suspension wurde in ein 50 ml Röhrchen überführt, mit 10 ml Zellkulturmedium versetzt und anschließend bei 900 rpm für 5 min bei RT zentrifugiert. Das Sediment wurde in 1 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Die Zellzahl wurde mit Hilfe der Neugebauer Zählkammer bestimmt. 0,5 Mio. Zellen wurden für die weitere Kultivierung in 15 ml Zellkulturmedium gelöst in eine sterile 75 cm² Zellkulturflasche überführt. Für die PC12-Faserwachstumsstudie (vgl. 3.1.2.8) wurden 200 000 Zellen auf 6 cm Zellkulturschalen ausgesät und nach 3 Tagen in Kultur mit dem jeweiligen Expressionsplasmid transfiziert.

3.1.2.5 Passagieren von PC12 Zellen

Die PC12 Zellen wurden analog zum beschriebenen Protokoll im Punkt 3.1.2.4 jeden 7. Tag passagiert. Wenige Modifikationen des Protokolls sind zu erwähnen. Der Ablösepuffer bestand lediglich aus PBS⁻ ohne jegliche weitere Zusätze. Nach der Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen durch starkes Klopfen der Zellkulturflasche auf die Tischplatte vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Zur Resuspension mussten die Zellen mindestens 100-mal hoch und runter pipettiert werden, um ausreichend vereinzelte Zellen zu erhalten. In der Neugebauer Zählkammer konnte man eine erfolgreiche Resuspension anhand der Anzahl an aggregierten PC12 Zellen erkennen. 2 Mio. Zellen wurden für die weitere Kultivierung in 15 ml Zellkulturmedium gelöst in eine sterile 75 cm² Zellkulturflasche überführt. Für die PC12-Faserwachstumsstudie bzw. für die Untersuchung des Verteilungsmusters der Neurotrophine wurden 200 000 Zellen auf PO-beschichteten Deckgläsern ausgesät und nach 6 Tagen in Kultur mit dem jeweiligen Fusionsplasmid transfiziert.

3.1.2.6 Transfektion von sekundären Zellen

(nach Boussif *et al.*, 1995)

Die Transfektion der COS7 und PC12 Zellen erfolgte mit Hilfe der Polyethylenimin (PEI)-Methode. 5 µg DNA bzw. 15 µl PEI werden jeweils zu 125 µl bzw. 110 µl 0,15M NaCl-Lösung gegeben. Die beiden Ansätze werden nach einer 10 min Inkubation bei RT unter starkem Vortexen vermengt. Nach erneuter 10 min Inkubation bei RT wurde die Lösung zu 1 ml DMEM/ohne FCS gegeben und auf die mit DMEM/ohne FCS gewaschenen Zellen pipettiert. Nach einer 3 h Inkubation im Brutschrank erfolgte ein Mediumwechsel.

3.1.2.7 PC12 Faserwachstumsstudie

Mit Hilfe der PC12 Faserwachstumsstudie wurde die biologische Aktivität der GFP-markierten Neurotrophine untersucht. Dafür wurden COS7 Zellen 3 Tage nach der Kultivierung mit dem jeweiligen Neurotrophin-Fusionsplasmid transfiziert. Nach

2 weiteren Tagen in Kultur wurde der Überstand der transfizierten COS7 Zellen entnommen und zu den vorbehandelten, kultivierten PC12 Zellen gegeben. Im Falle von NGF-GFP wurden die PC12 Zellen mit dem GFP-Plasmid transfiziert. Der Neurotrophin-beinhaltende Überstand der COS7 Zellkulturen wurde einen Tag nach der Transfektion der PC12 Zellen zu den PC12 Zellen gegeben und das Auswachsen der Fasern nach 3 weiteren Tagen untersucht. Im Falle von BDNF, NT-3, NT-4 und GFP wurden die PC12 Zellen mit GFP und TrkB kotransfiziert, und der Neurotrophin-beinhaltende COS7 Zellkultur-Überstand einen Tag nach der Transfektion der PC12 Zellen zu den PC12 Zellen gegeben. Das Faserwachstum wurde ebenfalls nach 3 weiteren Tagen in Kultur untersucht. Mit GFP transfizierte PC12 Zellen, deren Fasern länger waren als der Durchmesser der Zelle, wurden als differenzierte Zellen gewertet.

3.2 Molekularbiologie

3.2.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Kompetente Bakterien für die Transformation wurden nach der CaCl_2 Methode hergestellt. Dafür wurde aus einer E.coli K12 C600 Kolonie eine Vorkultur in LB Medium hergestellt. 1ml der Vorkultur wurde in 200 ml LB Medium transferiert. Nach ca. 2h Kultivierung bei 37°C erreichte die Bakterienkultur einen OD_{600} Wert von 0,4. Anschließend wurde die Kultur mit 4000 rpm bei 4°C für 10 min zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet in 60ml kalter, steriler 50mM CaCl_2 unter Vermeidung von Schaumbildung resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 3,2 ml kalter 50mM CaCl_2 resuspendiert und für 1h bei 4°C inkubiert. Die Lösung wurde mit 3,2 ml einer 50mM CaCl_2 -Lösung + 40% Glycerin vermischt. 300 μl der Bakterienkulturen wurden in Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.2 Transformation

Für die Transformation wurde ca. 1 µg DNA zu 100µl kompetenten Bakterien gegeben. Nach einer 15 min Inkubation auf Eis wurden die Bakterien für 100 sec bei 42 °C einem Hitzeschock ausgesetzt. Anschließend wurden 500 µl LB Medium hinzu pipettiert und die Zellen bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Die Bakterien wurden auf eine Agarplatte ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Von den einzelnen Kolonien wurden Glycerindauerstocks angefertigt.

3.2.3 Maxipräparation von Plasmid-DNA

Zur Transfektion von Neuronen wurde besonders reine, Toxin-freie Plasmid DNA-benötigt. Die Maxipräparation erfolgte mit dem EndoFree Maxi Plasmid Kit von Qiagen. Die aufgereinigte DNA wurde in Wasser aufgenommen und die Konzentration photometrisch bestimmt.

3.2.4 Anlegen von Glycerindauerkulturen

Aus einer einzelnen Bakterienkolonie wurde eine Vorkultur in LB Medium hergestellt. 1,5 ml der Vorkulturrkultur wurden sedimentiert, in 0,5 ml LB Medium gelöst und mit weiteren 0,5 ml Glycerin versetzt. Die Kultur wurde bei -80 °C gelagert.

3.2.5 Genotypisierung

Zur Bestimmung des Genotyps BDNF-defizienter Mäuse wurde aus Schwanzproben die DNA isoliert und mit Hilfe der PCR Methode die isolierte DNA amplifiziert.

3.2.5.1 DNA-Isolierung

Die Isolierung der DNA BDNF-defizienter Mäuse erfolgte mit Hilfe des DNeayse Kit von Qiagen. 3mm des Schwanzes der Mäuse wurden dafür verwendet.

3.2.5.2 PCR

Die Amplifizierung der isolierten DNA erfolgte unter Verwendung folgender Ansätze und Protokolle:

BDNF-KO-PCR

PCR Ansatz		
1	µl	DNA-Isolierung
0,2	µl	Taq-Hot-Start-Polymerase (5U/µl)
1,6	µl	dNTP (1.25mM)
4,2	µl	H ₂ O
1	µl	3'Neo Primer (10µM)
1	µl	BD2A Primer (10µM)
1	µl	Puffer

PCR-Programm			
n°	Temperatur	Zeit	
1	95°C	15 min	
2	94°C	1 min	Denaturierung
3	58°C	1 min	<i>Annealing</i>
4	72°C	45s	Elongation
5			35 Wiederholungen des Schrittes 2-4
6	72°C	4'	

Wildtyp-PCR

PCR Ansatz		
1	µl	DNA-Isolierung
0,1	µl	Taq-Hot-Start-Polymerase (5U/µl)
0,1	µl	MgCl ₂
1,6	µl	dNTP (1.25mM)
4,2	µl	H ₂ O
1	µl	BKO Primer (10µM)
1	µl	BD2A Primer (10µM)
1	µl	Puffer

PCR-Programm			
n°	Temperatur	Zeit	
1	95°C	15 min	
2	94°C	1 min	Denaturierung
3	64°C	1 min	Annealing
4	72°C	45s	Elongation
5			35 Wiederholungen des Schrittes 2-4
6	72°C	4'	

3.2.5.3 Elektrophorese

Zur Auftrennung der DNA wurden 1,5 % Agarosegele verwendet. Die PCR Ansätze wurden mit 2 µl 6 x *Loading Dye* versetzt. Als Marker wurde der 100bp DNA *Ladder* benutzt. Die Laufzeit der Elektrophorese betrug 60 min bei 50 V. Die anschließende Färbung des Gels erfolgte mit SybyrGold-Lösung.

3.3 Elektrophysiologie

Die von Erwin Neher und Bernd Sakmann entwickelte *Patch-Clamp*-Technik stellt eine Weiterentwicklung der *Voltage Clamp* Technik dar und ermöglicht das Messen von Ionenströmen durch einzelne Ionenkanäle. Ein sensibler Pipetten-Membran-Kontakt mit einem Abdichtwiderstand im Gigaohm-Bereich ist für das sehr hohe Signal-Rausch-Verhältnis bei solchen Messungen verantwortlich.

3.3.1. Die Untersuchung der elektrophysiologischen Eigenschaften von CA1 Pyramidenzellen

Die elektrophysiologischen Ableitungen wurden an 2-3 Wochen alten organotypischen Schnittkulturen des Hippokampus durchgeführt. Die organotypischen Schnitte wurden mit Hilfe eines Skalpell aus der Millipore Membran geschnitten und in einer Immersionskammer mit Hilfe eines Platindrahtes fixiert. Während der Messungen wurden die Schnitte mit Hilfe einer Perfusion kontinuierlich mit begaster ACSF überspült (3ml/min). Alle Messungen fanden bei einer Temperatur von 37°C statt. Die CA1 Pyramidenzellen wurden aufgrund ihrer Lage im Schnitt ausgewählt.

Das Platzieren der Stimulationselektrode in die Nähe der Schaffer-Kollateralen, das Annähern der Ableitelektrode an das Neuron und das Erreichen des *Gigaseals* erfolgte mit Hilfe von Mikromanipulatoren (Liugs& Neumann) unter visueller und elektrischer Kontrolle. Ein aufrechtes Epifluoreszenz-Mikroskop (Olympus BX51WI) und Wasserimmersionsobjektive (10x, n.a.: 0.3; 60x, n.a.: 0.9) wurden für die optische

Kontrolle verwendet. Für die elektrophysiologischen Ableitungen wurden ein EPC-8-Verstärker, ein Oszilloskop von HAMEG Instruments, ein AD/DA-Wandler von DigiData und die *Software* pClamp von Axon Instrument verwendet.

Borsilicat-Glaskapillaren (GB150F-8P9) von Science *Products* GmbH wurden mit Hilfe eines vertikalen Ziehgeräts von Narishige vor jeder Messung frisch ausgezogen. Zur Bestimmung der Pipettenöffnung wurde die im Pipettenhalter eingespannte und mit intrazellulärer Elektrolytlösung befüllte frisch ausgezogene Glaskapillare mit leichtem Überdruck in das ACSF eingetaucht und die resultierende Stromantwort auf einen repetitiven Spannungspuls von 1 mV am Oszilloskopen abgelesen. Lediglich Pipetten mit einem resultierenden Widerstand von 5-10 M Ω wurden für die Messungen verwendet. Anschließend wurde eine *Offset* Korrektur von +15 mV vorgenommen. Die Größe der Offset-Korrektur richtet sich nach den verwendeten Elektrolytlösungen, in die die Badelektrode und die Patchelektrode eintauchen. Diese unterschiedlichen Lösungen verursachen ein unterschiedliches elektrochemisches Potential bzw. unterschiedliche Diffusionsraten der Ionen an der Bad- und der Patchelektrode. Das unterschiedliche elektrochemische Potential der Elektroden verursacht eine anliegende Potentialdifferenz, die vor jeder Messung abgeglichen werden muss. Die Größe des Potentials wurde mit Hilfe der *Software* PClamp berechnet.

Nach einer groben Positionierung der Ableitelektrode näherte man sich der Zelle zunächst mit einem leichten Überdruck, der über einen geteilten Luftkanal am Pipettenhalter auf die Lösung ausgeübt werden konnte. Ein weißer Ring auf der Zelloberfläche bzw. elektrische Schwingungen auf dem Spannungspuls signalisierten den richtigen Abstand der Patchpipette von der Membran. Durch Relaxation des Überdruckes konnte die Reduktion des Pipettenwiderstandes beobachtet werden. Ein zusätzlicher leichter Unterdruck führte zum Erreichen des *Gigaseals*. In dieser Konfiguration konnten die Kapazitätsumladungen der Pipette am Verstärker kompensiert werden. Nach Öffnen des Membranabschnittes unterhalb der Pipette durch einen pulsartig angelegten Unterdruck wurde der Ganzzell-Ableitungs-Modus erhalten. Die Kompensation der Membrankapazität und des Serienwiderstandes konnte nun vorgenommen werden. Das angelegte Haltepotential betrug -90 mV. Im *Current Clamp*

Modus konnte das Membranpotential bestimmt werden. Des Weiteren wurden mit 200 ms langen Hyperpolarisationspulsen (3mV) die passiven Membraneigenschaften der Zelle überprüft.

3.3.1.1 Synaptische Transmission von CA1 Pyramidenzellen

Zur Charakterisierung des Einflusses von BDNF auf die basale synaptische Transmission von CA1 Pyramidenzellen wurden *Patch-Clamp*-Ganzzelleableitungen in organotypischen Schnittkulturen von BDNF-defizienten Mäusen durchgeführt. In der Strom- bzw. Spannungsklemme wurden die passiven Membraneigenschaften, die Aktionspotentiale von CA1 Pyramidenzellen und das Verhalten der Neurone auf gepaarte synaptische Reize untersucht.

Das Eigenpotential wurde im *Current Clamp* Modus bestimmt. Lediglich Zellen mit einem Eigenpotential negativer als -60 mV wurden für die weiteren Untersuchungen verwendet. Die Aktionspotentiale wurden in der Stromklemme durch depolarisierende Spannungspulse ausgelöst. Die Schwelle zum Auslösen des Aktionspotentials, die Dauer und die Amplitude des Aktionspotentials wurden mit Hilfe der *Software* Clampfit ausgewertet. Im *Voltage Clamp* Modus wurden die postsynaptischen Antworten der CA1 Pyramidenzellen nach doppelter Stimulation der Schaffer-Kollateralen gemessen.

3.3.1.2 Die Induktion der Langzeitpotenzierung

Zur Charakterisierung des aktivitätsabhängigen Einflusses von BDNF auf die synaptische Plastizität von CA1 Pyramidenzellen wurden *Patch-Clamp*-Ganzzelleableitungen in organotypischen Schnittkulturen durchgeführt. Die Schaffer-Kollateralen wurden mit Hilfe der Stimulationselektrode stimuliert und die evozierten postsynaptischen Antworten der CA1 Pyramidenzellen wurden mit Hilfe von Ganzzelleableitungen hinsichtlich einer aktivitätsabhängigen Potenzierung der synaptischen Antworten untersucht.

Die Stimulationsstärke wurde so gewählt, dass das gemessene EPSC 20-35% der maximal auslösbaren Antwort betrug. Die Schaffer-Kollateralen wurden alle 10 sec mit

einem 20 μ s langen Puls (1-10V) stimuliert und die evozierten Antworten gemessen. LTP wurde mit Hilfe eines Pairing Protokolls ausgelöst. Die postsynaptische Zelle wurde auf -10 mV depolarisiert und die Schaffer-Kollateralen tetanisch (sechsmal 1sec lang mit einer Frequenz von 100 Hz und einem *Intertrain* Intervall von 10 s) bzw. mit einem Theta Burst (10 *Bursts* mit 4 Pulsen mit einer Frequenz von 100Hz und einem *Interburst* Intervall von 200ms; davon 6 Wiederholungen in einem Intervall von 10 s) stimuliert. Mit Hilfe von Hyperpolarisationspulsen wurden alle 10 s der Serienwiderstand und Membranwiderstand bestimmt. Lediglich Zellen, die während der ganzen Messung einen konstanten Serien- und Membranwiderstand zeigten, wurden bei der Auswertung berücksichtigt.

3.3.2 Bestimmung der Osmolarität

Die Osmolarität definiert die Konzentration osmotisch wirksamer Teilchen pro Volumeneinheit und stellt gerade für die optimale Ausübung der *Patch Clamp* Technik eine wichtige Größe dar. Die Bestimmung der Osmolarität einer Lösung erfolgt mit Hilfe der Gefrierpunktserniedrigung. Durch die Anwesenheit gelöster Teilchen in einem Lösungsmittel wird die Entropie des Systems erhöht. Nur die Anzahl der gelösten Teilchen, nicht deren Wechselwirkung mit den Teilchen des Lösungsmittels spielen eine Rolle. Die größere Unordnung in dem System führt dazu, dass das Entgegenwirken der Teilchen, einen geordneten Zustand zu erlangen, entsprechend dem erhöhten Entropiebeitrag größer ist als beim reinen Lösungsmittel. Mehr Energie muss zum Erreichen der Kristallisation aufgebracht werden. Zwischen Gefrierpunktserniedrigung und Osmolarität besteht ein linearer Zusammenhang.

Die Messung der Osmolarität erfolgte mit dem Osmometer von KNAUER. Die Lösung wurde dabei zunächst unterkühlt und durch die automatische Betätigung des Vibrators wurde die Kristallisation eingeleitet. Als Eichlösungen dienten dest. Wasser und eine NaCl-Lösung mit der Osmolarität von 400 Milliosmol/kg.

3.3.3 Elektroporation

(nach Haas *et al.*, 2001; Rathenberg *et al.*, 2003)

Die kultivierten organotypischen Schnitte wurden mit Hilfe eines Skalpell aus der Millicell CM Membran geschnitten und mit einem Platindraht in der Messkammer fixiert. Alle Messungen fanden bei RT statt. Die CA1 Pyramidenzellen wurden nach morphologischen Kriterien ausgewählt. Die Elektroporation wurde mit Hilfe des ELC-03M *loose-patch* Verstärker unter visueller und elektrischer Kontrolle durchgeführt. Pipetten mit einem Durchmesser von 1,6-2,2 μm wurden mit der DNA-Lösung (*Pulsing Software* (in mM): NaCl 137, KCl 5, MgCl₂ 1, CaCl₂ 1,8, HEPES 15, Na₂HPO₄ 0.7 und Glucose 6, DNA 0.33 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). gefüllt. Nach Erreichen des *Cell-attached*-Zustandes wurden die Zellen hochfrequent stimuliert. Die tetanische Reizung bestand aus 250 Pulsen mit einer Frequenz von 250Hz. Die Pulsdauer betrug 2ms und die Stimulationsstärke 2V.

Die Schnitte wurden auf neue Millipore-Membranen überführt, in den Inkubator zurückgestellt und 2 Tage nach der Transfektion untersucht.

3.4 Mikroskopie

3.4.1 Epifluoreszenz Mikroskopie

Die Untersuchungen zur Ausschüttung der Neurotrophine wurden an einem inversen Epifluoreszenz Mikroskop (Olympus IX 70) durchgeführt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit Hilfe einer digitalen CCD Kamera (SenSys 1401E). Der elektronische *Shutter* (UniBlitz) wurde über die *Software* Metaview (Visitron System) gesteuert. Zur Aufnahme der Fluoreszenzbilder wurden zwei Filterblöcke, einer für die Anregung mit blauem Licht (FITC-Filterblock) und ein weiterer für die Anregung mit grünem Licht (TRITC-Filterblock) benötigt. Ein Ölimmersionsobjektiv (40 \times /1.0 *oil*) und ein normales Objektiv (20 \times /0.40 Ph1) (Olympus) wurden für die optische Auflösung der zu untersuchenden Proben verwendet.

3.4.2 Konfokale Mikroskopie

Die Untersuchungen zur Lokalisation der Neurotrophine wurden mit Hilfe eines Nipkow *Spinning Disk* konfokalen System von Visitech an einem aufrechten Mikroskop (Olympus BX51 WI) durchgeführt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit Hilfe einer digitalen CCD Kamera (CoolSnap HQ von Roper Scientific). Der elektronische Shutter (UniBlitz, Electronics) wurde über die *Software* Metamorph (Visitron System) gesteuert. Grüne und rote Fluoreszenz wurde mittels Krypton/Argon Laser mit einer Wellenlänge von 488nm und 568nm angeregt. Ölimmersionsobjektive (40×/1.0 *oil* und 100×/1,35) und Wasserimmersionsobjektive (10x, n.a.: 0.3; 60x, n.a.: 0.9; Olympus) wurden für die optische Auflösung der zu untersuchenden Proben verwendet.

3.4.3 Perfusionssystem zur Untersuchung der Neurotrophin Ausschüttung

Das Polykation BDNF besitzt die Eigenschaft an Zellmembranen zu haften. Aus diesem Grunde ist das Entfernen der ausgeschütteten Neurotrophine für die korrekte zeitaufgelöste Messung der aktivitätsabhängigen Neurotrophin-Sekretion von Notwendigkeit. Mit Hilfe der Perfusion werden durch einen permanent anliegenden Flüssigkeitsstrom die ausgeschütteten Neurotrophine direkt aus dem beobachteten System wegspült. Die Perfusion wird des Weiteren für die lokale Applikationen der K⁺-haltigen Lösung verwendet.

Die Perfusion bestand aus einer Zulaufpipette, die mit Mikromanipulatoren dicht an die Zelle gebracht wurde. Der Öffnungsdurchmesser der Pipette betrug ca. 50 µm. Über Schläuche, die in der Pipette mündeten, wurde der Zulauf mit Flüssigkeitsbehältern verbunden, die mit unterschiedlichen Lösungen befüllt werden konnten. Der Fluss der Lösung beruht lediglich auf dem anliegenden eines hydrostatischen Drucks. Dafür mussten die Schläuche und die Zulaufpipette blasenfrei mit Lösung befüllt werden. Über eine Ablaufpipette, die kontinuierlich Lösung aus dem System saugte, wurde der

Fluss einer Glucose-beihaltenden Lösung in einer Kontrollschale mit dest. Wasser sichtbar gemacht und die Fließgeschwindigkeit der Lösungen eingestellt. Birnenförmige Strömungslinien kennzeichneten die richtige Fließgeschwindigkeit.

3.4.4 Videomikroskopische Untersuchung der Neurotrophin Ausschüttung

(nach Hartmann *et al et al.*, 2001)

Die aktivitätsabhängige Ausschüttung der Neurotrophine wurde mittels videomikroskopischer Analyse des Fluoreszenzsignals nach K^+ -induzierter Depolarisation gemessen. Neurone wurden mit dem jeweiligen GFP-markierten Neurotrophin und synaptischen Marker-Proteinen kotransfiziert und die identifizierten synaptischen Neurotrophin-GFP beihaltenden Strukturen wurden mit dem unter dem Punkt 3.4.3 beschriebenen Perfusionssystem zunächst für 5 min mit HBS^{+/+}, anschließend für 5 min mit 50 mM K^+ -haltiger HBS-Lösung und schließlich wieder für 5 min mit HBS^{+/+} umspült. Die Messungen fanden bei RT statt. Im 5 bzw. 10 s Intervall wurden mit Hilfe der Kamera Bilder gemacht. Die synaptisch lokalisierten Neurotrophin-beihaltenden Vesikel wurden mit Hilfe der *Software* Metaview hinsichtlich einer Fluoreszenzabnahme untersucht. Für die Auswertung der Fluoreszenzabnahme wurde zunächst die Hintergrundfluoreszenz vom eigentlichen Signal subtrahiert und die durch das *Photobleaching* entstandene Fluoreszenzabnahme mittels monoexponentiellem Fit extrapoliert.

3.4.5 Videomikroskopische Untersuchung der Ausschüttung von Styryl-Farbstoffe

Die Verfolgung des synaptischen Vesikel-Zyklus, z.B. der schnellen aktivitätsabhängigen exozytotischen Vorgänge oder des intrazellulären Vesikel-Verkehrs, an lebenden Organismen wird durch die Verwendung von optischen

Methoden ermöglicht. Dabei finden fluoreszierende Membran-Marker mit lipophilen Eigenschaften, wie die Styryl-Farbstoffe, häufig Verwendung.

Die Styryl-Farbstoffe sind amphiphile Substanzen, die mit ihrem lipophilen Schwanz, einem Dialkylamminophenyl-Rest, in die äußerste Schicht der Membran eindringen (Schote *et al.*, 1998) und deren dikationische Kopfgruppe, ein Dibutylaminpyridin, ein Durchdringen der Membran verhindert. Ein ausgedehntes konjugiertes π -System zwischen dikationischer Kopfgruppe und lipophilen Ende des Moleküls sorgt für die fluoreszierenden Eigenschaften des jeweiligen Farbstoffes (Cochilla *et al.*, 1999).

Die Internalisierung des Farbstoffes in die synaptischen Terminalien erfolgte durch eine 2 minütige Inkubation der Neurone in 10 μ M FM4-64-Lösung. Dabei wurden die Neurone durch die erhöhte Kalium-Konzentration (50mM) depolarisiert, die synaptischen Vesikel ausgeschüttet und der fluoreszierende Farbstoff durch die folgenden endozytotischen Vorgänge intravesikulär in die Zelle aufgenommen. Anschließend wurde der überschüssige Farbstoff, der in der äußeren Membran des Neurons eingelagert war, mit HBS 0/3 ausgewaschen. Unter dem Fluoreszenzmikroskop konnte nun das aktivitätsabhängige Entfärben der Vesikel in den synaptischen Endigungen beobachtet werden. Die Analyse der Entfärbung erfolgte analog zur videomikroskopischen Untersuchung der Ausschüttung GFP-markierter Neurotrophine

3.4.6 Immunzytochemische Mehrfachfärbungen

Für die immunzytochemischen Färbungen wurden auf Deckgläser kultivierte und mit dem jeweiligen DNA-Plasmid transfizierte Neurone verwendet. Die Neurone wurden zunächst zweimal mit PBS^{+/+} gewaschen und anschließend für 20 min in 4% Formaldehydlösung fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS^{+/+} wurden die Zellen für 15 min in einer 0,3%igen Tritonlösung permeabilisiert, weitere zwei mal mit PBS gewaschen und anschließend 30 min in der Blockierlösung inkubiert. Die Zellen wurden nun mit der 1.Antikörperlösung (1.Antikörper-Verdünnung in 1% BSA/0,1% Triton X 100 in PBS^{+/+}) für 1,5 h bei RT behandelt (siehe Tabelle 3.3), weitere 4-mal gewaschen und im Folgenden in

der 2. Antikörperlösung (2. Antikörper-Verdünnung in 1% BSA/0,1% Triton X 100 in PBS^{+/+}) für 1,5 h bei RT inkubiert. Nach weiterem viermaligem Waschen wurden die Zellen in Histogel eingedeckelt.

1.Antikörper	Konzentration des 1. Antikörpers	Quelle	2.Antikörper	Konzentration des 2. Antikörpers
Calnexin	1:200	Stressgen	anti- <i>rabbit</i> Alexa <i>green</i>	1:500
GM130	1:100	BD Biosciences	anti- <i>mouse</i> Alexa <i>red</i>	1:1000
Sekretogranin II	1:100	W.Huttner	anti- <i>rabbit</i> Alexa <i>green</i>	1:500
Synapsin	1:400	L.DeGennaro	anti- <i>mouse</i> Alexa <i>red</i>	1:1000
BDNF	1:200	Chemicon	Anti- <i>sheep</i> Alexa <i>red</i>	1:1000
NGF	1:200	Chemicon	Anti- <i>sheep</i> Alexa <i>red</i>	1:1000
NT-3	1:200	Chemicon	Anti- <i>sheep</i> Alexa <i>red</i>	1:1000
NT-4	1:200	Chemicon	Anti- <i>sheep</i> Alexa <i>red</i>	1:1000

Tabelle 3.3: Auflistung der verwendeten Antikörper.

Für die immunzytochemischen Färbungen der Neurotrophine wurden einige Modifikationen vorgenommen. Die Zellen wurden vor dem Fixieren für 4 min in einer 4 μ M Monensin-Lösung inkubiert. Die Fixierlösung wurde mit 4% Sucrose versetzt. Das Permeabilisieren wurde ausgelassen. Die 1.Antikörperlösung bestand aus 0,3% Triton X 100/ 0,02% Natriumacetat in 2fach PBS^{+/+}. Die Inkubationszeit betrug 24 h bei RT. Nach der Behandlung mit dem 1.Antikörper wurde eine kalte Säurebehandlung zur Beseitigung membranständiger Antikörper durchgeführt. Dafür wurden die Zellen für 4 min in eiskalter Essigsäurelösung bestehend aus 0,5M NaCl in 0,2M Essigsäure (pH-Wert 2,5) inkubiert, anschließend 3-mal für 15 min mit PBS^{+/+} gewaschen und für 1,5 Stunden in der 2.Antikörperlösung (2.Antikörper-Verdünnung in 0,3% Triton X 100/ 0,02% Natriumacetat in 2fach PBS^{+/+}) inkubiert.

Kapitel 4

Ergebnisse

4.1 Die biologische Aktivität der GFP-markierten Neurotrophine

Zur Untersuchung des subzellulären Verteilungsmusters der Neurotrophine und deren konstitutiver und aktivitätsabhängiger Ausschüttung wurden GFP-markierte Neurotrophine verwendet, deren intakte biologische Aktivität zunächst analysiert wurde.

Die korrekte Prozessierung der Neurotrophin-GFP Fusionsproteine konnte durch proteinbiochemische Arbeiten von Matthias Hartmann gezeigt werden (Brigadski *et al.*, 2005). In COS7 Zellen, die mit dem jeweiligen GFP-markierten Neurotrophin transfiziert wurden, konnte eine dominante Anwesenheit der Pro-Version des jeweiligen Neurotrophins in den Lysaten der COS7 Zellkulturen mit Hilfe von GFP Western Blots nachgewiesen werden, wohingegen eine korrekte Prozessierung und eine korrekte Sekretion der reifen GFP-markierten Neurotrophine in den COS7 Zellkultur-Überständen nachgewiesen werden konnte (Brigadski *et al.*, 2005).

Ausgehend davon wurde die biologische Aktivität der von COS7 Zellen synthetisierten, prozessierten und ausgeschütteten GFP-markierten Neurotrophine mit Hilfe einer sogenannten PC12-Faserwachstums-Studie untersucht (Klau *et al.*, 2001). PC12 Zellen exprimieren endogen sowohl den TrkA als auch den p75 Rezeptor. Über die Bindung von NGF an den TrkA-Rezeptor wird die neuronale Differenzierung der PC12 Zellen induziert (Greene *et al.*, 1987). Die durch die GFP-markierten

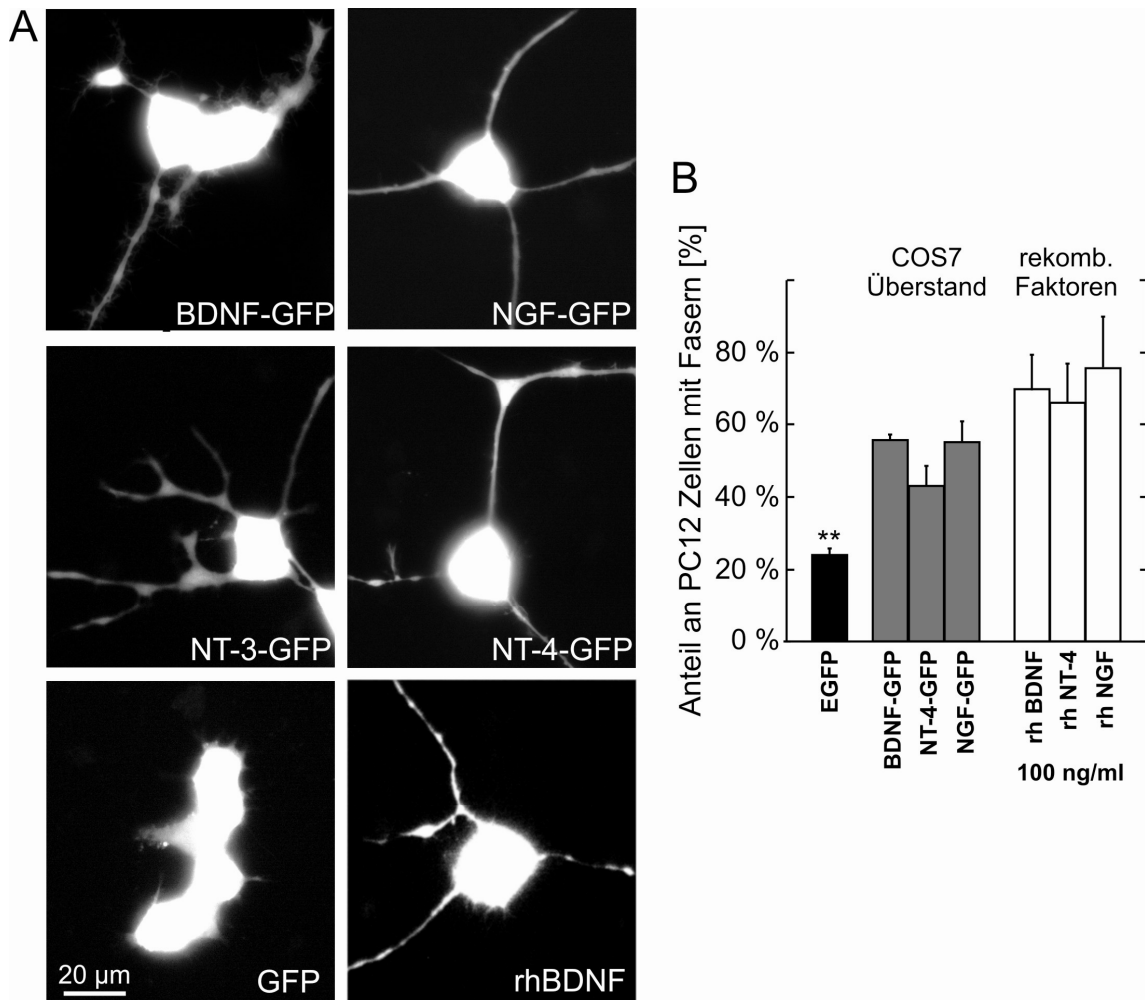


Abb. 4.1: Intakte biologische Aktivität der GFP-markierten Neurotrophine. **A:** Exemplarische Beispiele für das Neurotrophin-induzierte Faserwachstum bei PC12 Zellen über den überexprimierten TrkB-Rezeptor oder den endogen exprimierten TrkA-Rezeptor. COS7 Zellen (3DIV) wurden mit dem jeweiligen Neurotrophin-Fusionsplasmid bzw. GFP-Plasmid transfiziert und der konditionierte Überstand der COS7 Zellen 2 Tage nach der Transfektion zu den PC12 Zellen gegeben. Nach einer drei Tage langen Inkubation der PC12 Zellen mit dem Neurotrophin-GFP konditionierten Überstand war ein Auswachsen von Fasern zu beobachten. Das Auswachsen der Fasern wurde über die Aktivierung des endogen exprimierten TrkA-Rezeptors bzw. über den überexprimierten TrkB-Rezeptor vermittelt. Der Überstand von GFP exprimierenden COS7 Zellen zeigte kein Auswachsen von Fasern. Die Inkubation der PC12 Zellen mit rekombinanten Neurotrophinen führte ebenfalls zum Auswachsen von Fasern. **B:** Quantitative Auswertung des Neurotrophin-induzierten Faserwachstums. Die GFP-markierten Neurotrophine induzierten ein ähnliches Faserwachstum bei PC12 Zellen wie 100ng/ μ g rekombinantes Neurotrophin. Fehlerbalken repräsentieren Standardfehler. $p < 0,01$ (modifiziert nach Brigadski *et al.*, 2005).

Neurotrophine vermittelte Aktivierung der Trk-Rezeptoren wurde mit Hilfe der PC12-Faserwachstumsstudie untersucht. Dafür wurden COS7 Zellen (3 DIV) mit dem jeweiligen Expressionsplasmid für das GFP-markierte Neurotrophin transfiziert. COS7 Zellkulturen, welche mit GFP transfiziert wurden, dienten als Kontrolle. Zwei Tage nach der Transfektion der COS7 Zellen wurde der konditionierte Überstand der COS7 Zellkulturen zu PC12 Zellen, welche mit GFP transfiziert waren, gegeben und das Auswachsen von Fasern an GFP exprimierenden PC12 Zellen nach drei weiteren Tagen untersucht. Die Behandlung von PC12 Zellen mit dem Überstand von COS7 Zellkulturen, die mit dem NGF-GFP Plasmid transfiziert wurden, führte zu einem Ausdifferenzieren der PC12 Zellen (siehe Abb. 4.1A), welches über den endogenen TrkA-Rezeptor vermittelt wurde. Eine Behandlung mit BDNF-GFP bzw. NT-4-GFP konditioniertem Überstand von COS7 Zellkulturen führte bei PC12 Zellen, welche mit TrkB und GFP kotransfiziert wurden, ebenfalls zu einem Auswachsen von Fasern über den TrkB-Rezeptor (siehe Abb. 4.1A). Das über die Aktivierung der Trk-Rezeptoren induzierte Faserwachstum mittels der in COS7 Zellen synthetisierten, prozessierten und ausgeschütteten Neurotrophine hatte ähnliche Dimension wie die Stimulation des Faserwachstums durch die Applikation von 100 ng/ μ l rekombinantem Neurotrophin (siehe Abb. 4.1B). Die Stimulation der TrkB-Rezeptor und GFP-Protein überexprimierenden PC12 Zellen mit NT-3-GFP führte ebenfalls zu einem Faserwachstum mutmaßlich über die Aktivierung des TrkA und des TrkB-Rezeptors, an welche NT-3 niederaffin binden kann. Das durch NT-3-GFP induzierte Auswachsen von Fasern war jedoch statistisch nicht signifikant gegenüber den Kontrollen, die mit GFP-konditionierten Überstand behandelten wurden.

Mit Hilfe der PC12-Faserwachstumsstudie konnte gezeigt werden, dass die mit GFP fusionierten Neurotrophine sowohl von COS7 Zellen synthetisiert und ausgeschüttet werden, als auch dass sie funktionelle biologische Aktivität über die Aktivierung des Trk-Rezeptors besitzen und ein damit verbundenes Auswachsen von Fasern in PC12 Zellen induzieren.

4.2 Lokalisation der Neurotrophine in hippocampalen Neuronen

Hippokampale Neuronen sind in der Lage alle Neurotrophine endogen zu synthetisieren. Das subzelluläre Verteilungsmuster ist jedoch aufgrund des geringen Expressionslevels der verschiedenen Neurotrophine bislang nur unzureichend charakterisiert. Um das subzelluläre Verteilungsmuster der Neurotrophine unter identischen Bedingungen untersuchen zu können, wurden die Expressionsplasmide für die jeweiligen Neurotrophine in hippocampale Neurone transfiziert und die Verteilung der Neurotrophine mit Hilfe zellbiologischer Methoden und konfokaler Fluoreszenz-Mikroskopie analysiert.

4.2.1 Das Expressionsmuster der Neurotrophine in hippocampalen Neuronen

In den folgenden Untersuchungen wurden dissoziierte Kulturen hippocampaler Neurone nach 8 Tagen *in vitro* (8DIV) mit Hilfe der Ca^{2+} -Phosphat-Präzipitation mit der Plasmid-DNA des zu untersuchenden Proteins transfiziert. Die Untersuchung des subzellulären Expressionsmusters erfolgte 1-3 Tage nach der Transfektion an lebenden Neuronen mit Hilfe konfokaler Fluoreszenz-Mikroskopie.

Ein Drittel der Neurotrophin-exprimierenden Neurone war gekennzeichnet durch eine homogene Verteilung des GFP-Signals innerhalb aller Zellkompartimente einschließlich des Zellkerns, gekoppelt mit einer sehr hohen Expressionsrate des Fusionsproteins. Diese Neurone wurden aus den folgenden Auswertungen ausgeschlossen, da keine gerichtete Verteilung des Proteins zu erkennen war.

Neurone, die eine Verteilung des Fusionsproteins zeigten, waren gekennzeichnet durch eine Neurotrophin-Anreicherung in vesikulären Strukturen im Soma bzw. in den Neuriten des Neurons. Zwei verschiedene Typen der intrazellulären Verteilung der Neurotrophine konnten unterschieden werden: ein sogenannter distaler vesikulärer

Expressionstyp und ein proximaler Expressionstyp. Der distale vesikuläre Expressionstyp zeigte eine Anreicherung der Neurotrophine in vesikulären Strukturen im Soma und in distalen Bereichen der Neurite (Abb. 4.2A und 4.3A), wohingegen der proximale Expressionstyp durch eine vesikuläre Anreicherung der Neurotrophine im Soma und in proximalen Bereichen der Dendrite, gepaart mit einem schwachen diffusen GFP-Signal im Soma und in den Neuriten gekennzeichnet war. In den distalen Bereichen der Neurite ($> 30\mu\text{m}$ vom Soma entfernt) waren keine Neurotrophin-beinhaltenden Vesikel aufzufinden (Abb. 4.2B und 4.3B). Der Anteil an Neurotrophin-beinhaltenden Vesikeln in den Neuriten der Zellen wurde mit Hilfe von Kotransfektions-Studien bestimmt. Die Neurone (8 DIV) wurden mit dsRed-Plasmid-DNA und den Expressionsplasmiden für das jeweilige GFP-markierte Neurotrophin transfiziert

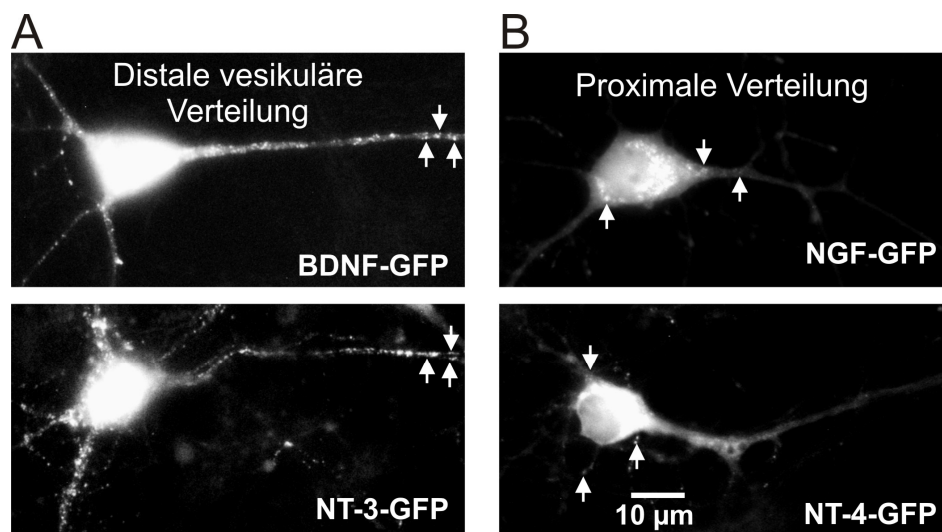


Abb. 4.2: Unterschiedliche Verteilung der Neurotrophine in hippocampalen Neuronen. Hippokampale Neurone (8DIV) wurden mit dem jeweiligen GFP-markierten Neurotrophin transfiziert und 2 Tage nach der Transfektion hinsichtlich ihrer Verteilung in der Zelle untersucht. Zwei unterschiedliche Verteilungsmuster konnten gegeneinander abgegrenzt werden: das distale vesikuläre (A) und das proximale Verteilungsmuster (B). **A:** Exemplarische Beispiele für BDNF-GFP und NT-3-GFP transfizierte Neurone, die eine distale vesikuläre Verteilung der Neurotrophine zeigen. Eindeutig sind die distalen vesikulären Strukturen bei den transfizierten Neuronen zu erkennen (siehe Pfeile). **B:** Exemplarische Beispiele für NGF-GFP und NT-4-GFP transfizierte Neurone, die eine proximale Verteilung der Neurotrophine zeigen. Eine Verteilung der Neurotrophine in distale vesikuläre Strukturen ist nicht zu beobachten (modifiziert nach Brigadski *et al.*, 2005).

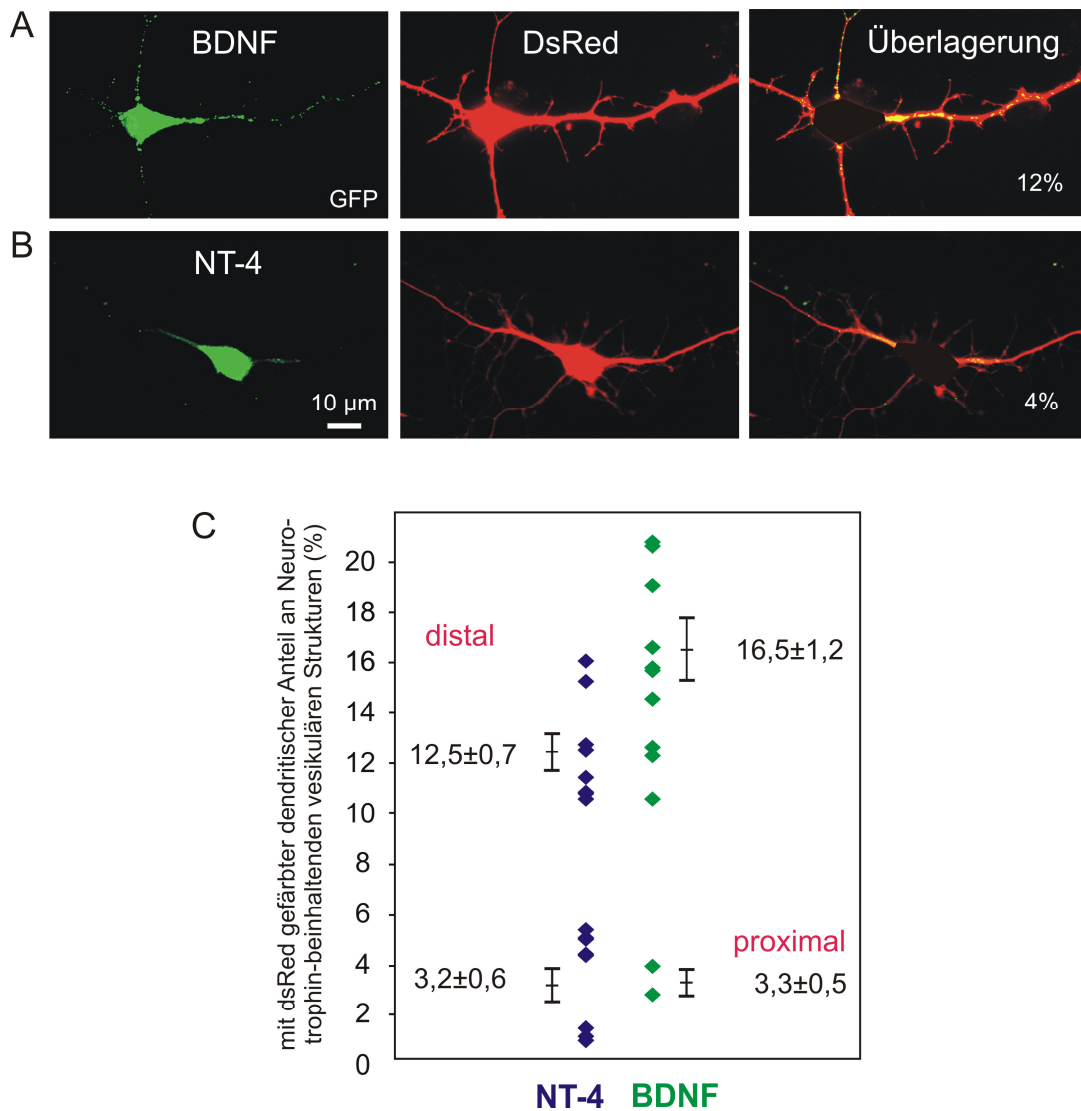


Abb. 4.3: Anteil an Neurotrophin-beinhaltenen Vesikeln in den Neuriten hippocampaler Neurone. **A:** Dissoziierte Kulturen hippocampaler Neurone (8DIV) wurden mit dsRed und dem jeweiligen GFP-markierten Neurotrophin kotransfiziert. 2 Tage nach der Transfektion wurde der mit dsRed gefärbte dendritische Anteil an Neurotrophin-beinhaltenen vesikulären Strukturen bestimmt. **A:** Exemplarisches Beispiel einer BDNF-GFP transfizierten Zelle, die eine distale vesikuläre Expression des Neurotrophins zeigte (links: GFP-Fluoreszenzsignal, Mitte: dsRed-Fluoreszenzsignal, rechts: Überlagerung der beiden Fluoreszenzbilder). **B:** Exemplarisches Beispiel einer NT4-GFP exprimierenden Zelle, die eine proximale Verteilung des Neurotrophins zeigt. **C:** Quantitative Auswertung des Anteils an Neurotrophin-beinhaltenen Vesikeln in dendritischen Strukturen. Eindeutig sind zwei Gruppen von Neuronen zu erkennen. Beim distalen vesikulären Expressionstyp konnte ein Anteil von dendritischen Neurotrophin-beinhaltenen Vesikeln von $16,5 \pm 1,2$ % (BDNF-GFP) bzw. $12,5 \pm 0,7$ % (NT-4-GFP) nachgewiesen werden, wohingegen der Anteil an dendritischen Neurotrophin-beinhaltenen Vesikeln bei dem proximalen Expressionstyp signifikant kleiner war. Fehlerbalken repräsentieren Standardfehler. $p < 10^{-6}$ (modifiziert nach Brigadski *et al.*, 2005).

und der Anteil an dendritischem dsRed-Signal, der mit vesikulärem Neurotrophin-GFP Fluoreszenz-Signal kolokalisierte, bestimmt. Für den proximalen Expressionstyp betrug der Anteil an Neurotrophin-beinhaltenden vesikulären Strukturen in den Dendriten im Falle von BDNF-GFP exprimierenden Neuronen $3,3 \pm 0,5$ % und im Falle von NT-4-GFP exprimierenden Neuronen $3,2 \pm 0,6$ %. Demgegenüber betrug der Anteil an Neurotrophin-beinhaltenden Vesikeln beim distalen vesikulären Expressionstyp im Falle von BDNF-GFP $16,5 \pm 1,2$ % und im Falle von NT-4-GFP $12,5 \pm 0,7$ % (Abb. 4.3C). Hieraus ergab sich, dass Zellen mit weniger als 6% Neurotrophin-beinhaltenden Vesikeln in den Dendriten dem proximalen Expressionstyp und Zellen mit mehr als 6% Neurotrophin-beinhaltenden Vesikeln in den Dendriten dem distalen vesikulären Expressionstyp zugeordnet werden konnten. BDNF-GFP und NT-3-GFP exprimierende Neurone zeigten in der Mehrheit der Fälle den distalen vesikulären Expressionstyp (BDNF-GFP, $98 \pm 2\%$ der Neurone; NT-3-GFP, $85 \pm 8\%$ der Neurone), wohingegen NT-4-GFP und NGF-GFP exprimierende Neurone das Fusionsprotein zu 74 ± 6 % bzw. 57 ± 10 % in proximale Vesikel sortierten (Abb. 4.4).

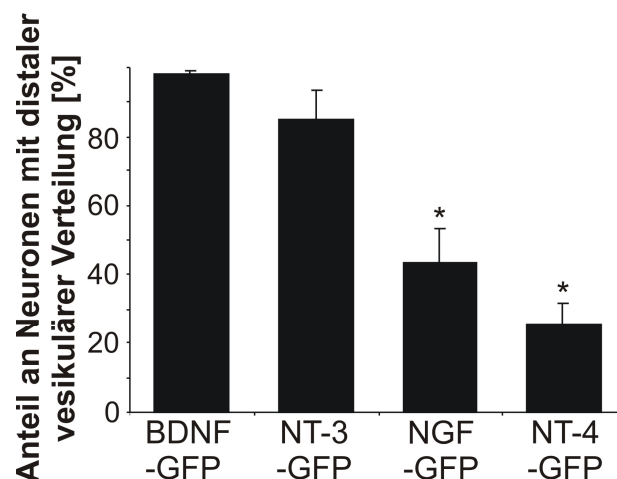


Abbildung 4.4: Quantitative Auswertung der Verteilung der Neurotrophine. Hippokampale Neurone (8DIV) wurden mit dem jeweiligen GFP-markierten Neurotrophin transfiziert und 2 Tage nach der Transfektion hinsichtlich ihrer Verteilung in der Zelle untersucht. BDNF- und NT-3-GFP zeigten in über 80 % der Fälle eine distale vesikuläre Verteilung. NGF- und NT-4-GFP zeigten eine geringere Wahrscheinlichkeit diese distalen vesikulären Strukturen zu erreichen. Fehlerbalken repräsentieren Standardfehler. $p < 0,001$ (modifiziert nach Brigadski *et al.*, 2005)

Insgesamt konnte die Existenz von zwei verschiedenen Verteilungsmustern nachgewiesen werden, wobei die Neurotrophine mit unterschiedlichen Wahrscheinlichkeiten in das jeweilige Verteilungsmuster sortiert wurden.

Zur Überprüfung, ob der fusionierte GFP-Anteil einen nachteiligen Einfluss auf die Verteilung des Neurotrophins besitzt, wurden hippocampale Neurone mit Neurotrophinen, die nicht mit GFP markiert waren, transfiziert und das Verteilungsmuster mit Hilfe immunzytochemischer Färbungen gegen das jeweilige Neurotrophin analysiert.

Die transfizierten hippocampalen Kulturen zeigten erneut die bereits mit dem GFP-Fusionsprotein nachgewiesenen Verteilungsmuster: die distale vesikuläre Verteilung und die proximale vesikuläre Verteilung. Der distale vesikuläre Expressionstyp zeigte erneut eine vesikuläre Anreicherung der Neurotrophine in Soma und distalen Bereichen der Neurite (Abb. 4.5A). Der proximale Expressionstyp zeigte eine vesikuläre Anreicherung der Neurotrophine im Soma des Neurons und in den proximalen Bereichen der Neurite (Abb. 4.5B). Diese Untersuchungen bestätigten, dass alle Neurotrophine unabhängig vom fusionierten GFP-Anteil auf zwei verschiedene Wege sortiert werden können. Die Wahrscheinlichkeit, welches Muster der intrazellulären Anreicherung die Neurotrophine in hippocampalen Neuronen zeigten, war für die verschiedenen Neurotrophine jedoch unterschiedlich. Die quantitative Auswertung der Verteilung von BDNF und NT-4 bestätigte die zuvor nachgewiesene Verteilungswahrscheinlichkeit der beiden GFP-markierten Neurotrophine. BDNF exprimierende Neurone zeigten in der Mehrheit der Fälle den distalen vesikulären Expressionstyp, wohingegen NT-4 exprimierende Neurone dieses Neurotrophin häufiger in proximale vesikuläre Strukturen sortierten (Abb. 4.5B). Eine diffuse Verteilung der Neurotrophine in den distalen Bereichen der Neurite konnte für den proximalen Expressionstyp aufgrund des schwachen Signal-Rausch Verhältnisses nicht beobachtet werden.

Insgesamt konnte durch die Expression von Neurotrophinen, die nicht mit GFP markiert waren, die Existenz der zwei verschiedenen Verteilungsmuster der

Neurotrophine bestätigt werden. Der GFP-Anteil hatte folglich keinen Einfluss auf die intrazelluläre Anreicherung der Neurotrophine.

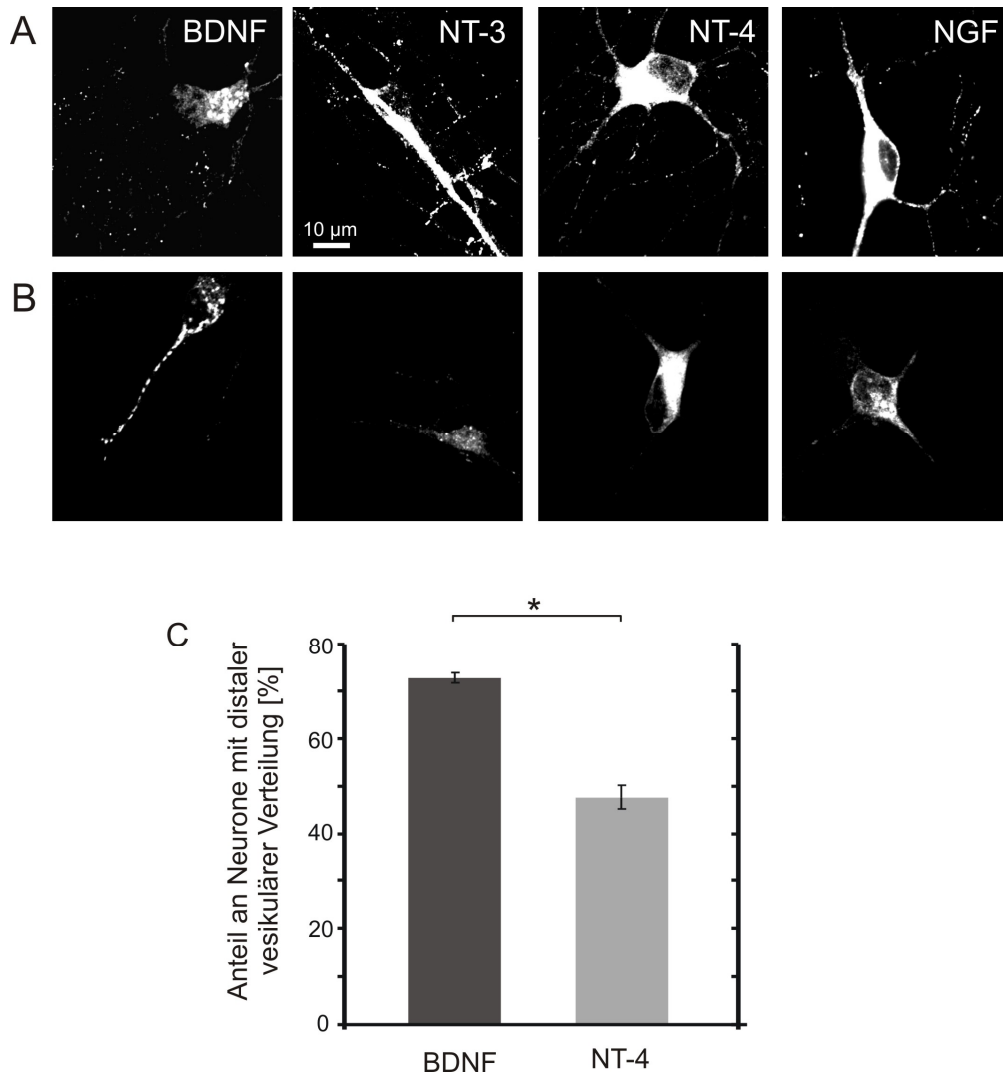


Abb. 4.5: Unterschiedliche Verteilung von unmarkierten Neurotrophinen in hippocampalen Neuronen. Dissoziierte Kulturen hippocampaler Neurone (8DIV) wurden mit dem jeweiligen Neurotrophin-Fusionskonstrukt, welches nicht mit GFP markiert war, transfiziert. 2 Tage nach der Transfektion wurde die Verteilung der Neurotrophine mit Hilfe immunzytochemischer Methoden untersucht. **A:** Exemplarische Beispiele für Neurone, die das jeweilige Neurotrophin in distale vesikuläre Strukturen sortieren. Die distalen vesikulären Strukturen sind eindeutig zu erkennen. **B:** Exemplarische Beispiele für Neurone, die das jeweilige Neurotrophin nach dem proximalen Verteilungsmuster sortieren. Eine distale vesikuläre Verteilung der transfizierten Zellen ist nicht zu beobachten. **C:** Quantitative Auswertung der Verteilung der Neurotrophine für BDNF und NT-4. BDNF zeigte in über 70 % der Fälle eine distale vesikuläre Verteilung. NT-4 zeigte eine geringere Wahrscheinlichkeit, in distale vesikuläre Strukturen sortiert zu werden. Fehlerbalken repräsentieren Standardfehler. $p < 0,01$ (modifiziert nach Brigadski *et al.*, 2005).

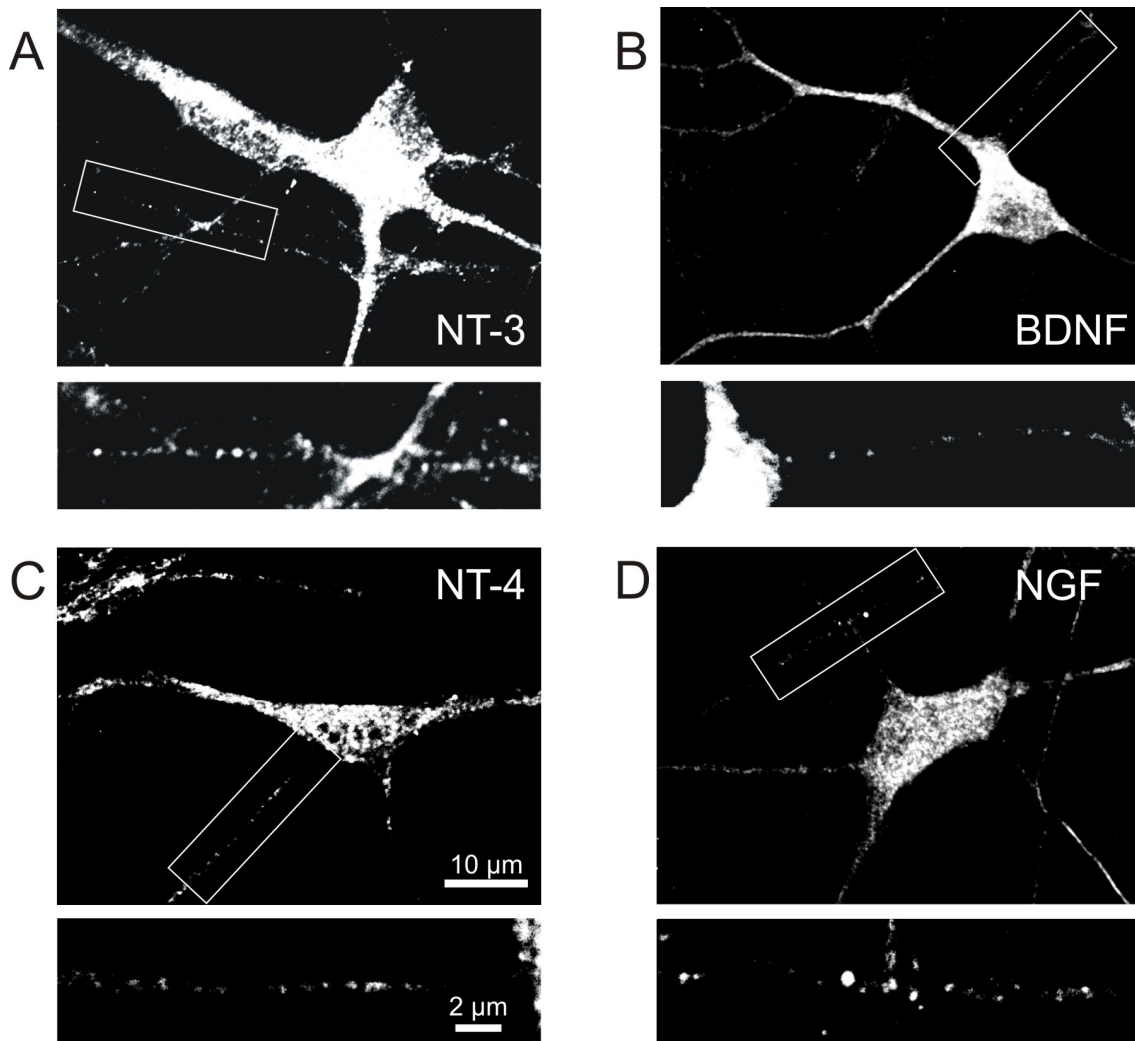


Abb. 4.6: Verteilung endogener Neurotrophine in hippocampalen Neuron. Hippokampale Neurone (10 DIV) wurden hinsichtlich der Verteilung der endogenen Neurotrophine mit Hilfe immunzytochemischer Methoden untersucht. **A-D:** (oben) Exemplarische Beispiele für die distale vesikuläre Verteilung von BDNF, NT-3, NGF und NT-4. (unten) Ausschnittsvergrößerung: Aufgrund des schlechten Signal-Rausch Verhältnisses konnte lediglich die Existenz des distalen vesikulären Expressionstyps nachgewiesen werden (modifiziert nach Brigadski *et al.*, 2005).

Zur Prüfung, ob die Überexpression einen nachteiligen Einfluss auf die Verteilung der verschiedenen Neurotrophine hat, wurde das Muster der intrazellulären Lokalisation der endogen exprimierten Neurotrophine mit Hilfe immunzytochemischer Färbungen mit Antikörpern gegen das jeweilige Neurotrophin an fixierten hippocampalen Neuronen (10 DIV) untersucht.

Für alle Neurotrophine konnte eine Anreicherung in vesikulären Strukturen nachgewiesen werden (Abb. 4.6). Eine diffuse Verteilung der Neurotrophine in den distalen Bereichen der Neurite konnte aufgrund des schwachen Signal-Rausch Verhältnisses nicht eindeutig genug nachgewiesen werden, so dass eine quantitative Analyse der intrazellulären Verteilung der Neurotrophine nicht möglich war.

Das differentielle Expressionsmuster der verschiedenen Neurotrophine legt die Vermutung nahe, dass bestimmte molekulare Domänen der Neurotrophine im Zusammenhang mit der spezifischen Verteilung der Neurotrophine stehen. Die Bedeutung der Präprodomäne von BDNF und NGF hinsichtlich der Sortierung der Neurotrophine wurde bereits in mehreren Studien untersucht (Suter *et al.*, 1991; Seidah *et al.*, 1996a, b). Verschiedene Motive, die für das Sortieren von BDNF in den

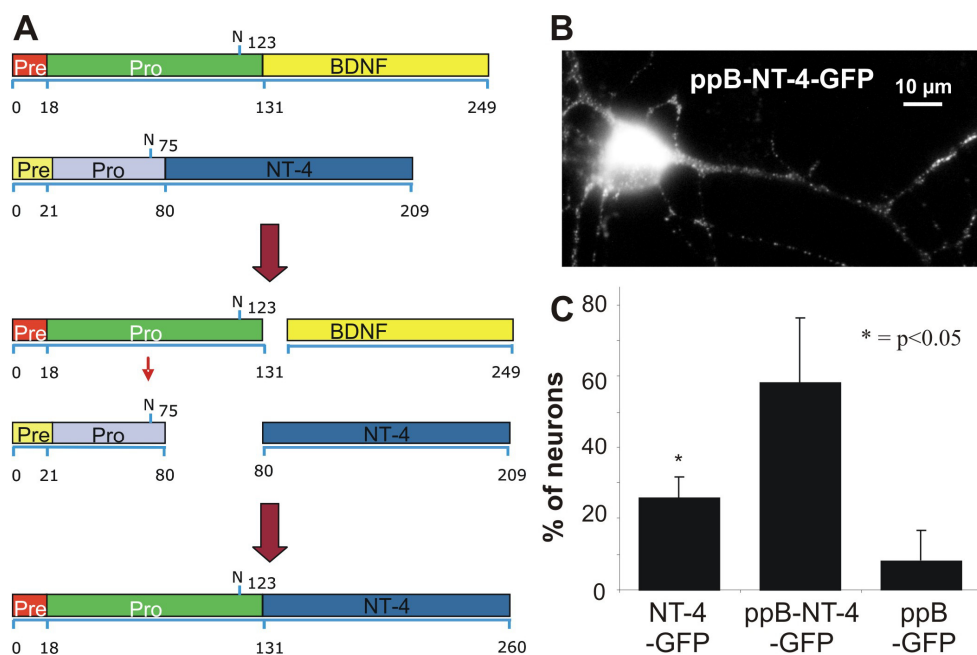


Abb. 4.7: Der Einfluss der Präprodomäne von BDNF auf das intrazelluläre Verteilungsmuster von NT-4 in hippocampalen Neuronen (10 DIV). **A:** Schematische Darstellung des Fusionsproteins ppB-NT-4. **B:** Ein typisches Bild für das Verteilungsmuster des ppB-NT-4-GFP Fusionsprotein. Deutlich sind die distalen Neurotrophin-beinhaltenen vesikulären Strukturen zu erkennen. **C:** Quantitative Auswertung der Verteilung von NT-4-GFP, ppB-NT-4-GFP und ppB-GFP. Die Präprodomäne von BDNF hatte einen signifikanten Einfluss auf die Verteilung des Neurotrophin NT-4 in distale vesikuläre Strukturen. Die Präprodomäne von BDNF an das Protein GFP fusioniert, hatte keinen Einfluss auf eine vesikuläre Verteilung des Proteins. Fehlerbalken repräsentieren Standardfehler. $p < 0,05$ (modifiziert nach Brigadski *et al.*, 2005).

aktivitätsabhängigen Sekretionsweg verantwortlich sind, befinden sich innerhalb dieser Domäne (Suter *et al.*, 1991; Seidah *et al.*, 1996a, b; Egan *et al.*, 2003). Um den Einfluss der Präpro-Sequenz auf das intrazelluläre Verteilungsmuster zu bestimmen, wurde ein Expressionsplasmid für NT-4 verwendet, in dem die Präprodomäne von NT-4 durch die Präprodomäne von BDNF ausgetauscht wurde (siehe Abb. 4.7A). Das Verteilungsmuster dieses GFP-markierten Fusionsproteins wurde in hippokampalen Neuronen untersucht. Die Präprodomäne von BDNF zeigte sich als hinreichend, um eine dominante Verteilung des Neurotrophins NT-4 in distale Vesikel zu bewirken (siehe Abb. 4.7B und 4.7C). Ein weiteres Expressionsplasmid, in dem die Präprodomäne von BDNF an GFP fusioniert war, erwies sich als ineffektiv, um distale vesikuläre Strukturen zu erreichen (siehe Abb. 4.7C).

Somit befinden sich entscheidende Sequenzmotive, die eine distale vesikuläre Verteilung von Neurotrophinen bewirken, in der Präprodomäne von BDNF. Motive in der Präprodomäne von NT-4 sind weniger effektiv für eine Sortierung dieses Neurotrophins in distale vesikuläre Strukturen. Des Weiteren ist die Präprodomäne von BDNF alleine nicht ausreichend für eine distale vesikuläre Verteilung. Zusätzliche Sequenzmotive in der maturen Region des Neurotrophins sind für die distale vesikuläre Verteilung von Notwendigkeit.

4.2.2 Die Charakterisierung der verschiedenen Expressionsmuster der Neurotrophine

Die Existenz zweier unterschiedlicher Verteilungsmustern deutet auf verschiedene Sortierungsmechanismen der Neurotrophine in spezifische intrazelluläre Kompartimente hin. Zur genaueren Untersuchung der Neurotrophin-beinhaltenden intrazellulären Kompartimente wurden immunzytochemische Färbungen mit Markern für das Endoplasmatische Retikulum, dem Golgi Apparat und sekretorischen Granula vorgenommen.

4.2.2.1 Die spezifische Anreicherung der Neurotrophine im Endoplasmatischen Retikulum

Ein Marker für das glatte und raue Endoplasmatische Retikulum ist das Chaperon Calnexin, ein integrales Protein des Endoplasmatischen Retikulums, welches für die Faltung N-glykosylierter, sekretorischer Proteine verantwortlich ist (Krijnse-Locker *et al.*, 1995). Immunzytochemische Färbungen von Neurotrophin-GFP exprimierenden hippokampalen Kulturen (10 DIV) mit einem Antikörper gegen das Protein Calnexin zeigten eine unterschiedliche Endoplasmatische Lokalisation der Neurotrophine in Neuronen des distalen vesikulären Expressionstyps im Vergleich zu Neuronen des proximalen Expressionstyps.

In Neuronen, die einen distalen vesikulären Phänotyp aufwiesen, zeigte sich lediglich eine Kolokalisation von Calnexin und Neurotrophin im Soma des Neurons (siehe Abb. 4.8A und 4.8C). Die distalen Neurotrophin-GFP beinhaltenden vesikulären Strukturen zeigten keine Kolokalisation des Neurotrophins mit Calnexin (siehe Abb. 4.8B und 4.8D). In Neuronen, die eine proximale vesikuläre Verteilung des Neurotrophins zeigten, konnte ebenfalls eine Kolokalisation des ER Markers Calnexin mit dem jeweiligen Neurotrophin im Soma nachgewiesen werden. Darüber hinaus kolokalisierte der ER Marker Calnexin mit dem diffusen, dendritischen Neurotrophin-GFP Signal (siehe Abb. 4.8E und 4.8F).

Die beiden unterschiedlichen Expressionstypen zeigten somit eine abweichende Verteilung der Neurotrophine im Endoplasmatischen Retikulum. Der proximale Expressionstyp war gekennzeichnet durch eine dominante Anreicherung des Neurotrophins im glatten und rauhen Endoplasmatischen Retikulum, wohingegen der distale vesikuläre Expressionstyp lediglich im Soma eine Anreicherung des Neurotrophins im Endoplasmatischen Retikulum zeigte.

4.2.2.2 Die Lokalisation der Neurotrophine im Golgi Netzwerk

Ein Marker für das Golgi Netzwerk ist das Golgi-Matrix Protein GM130, ein peripheres zytoplasmatisches Protein, das eng mit der Golgi Membran des cis-Golgi Netzwerkes

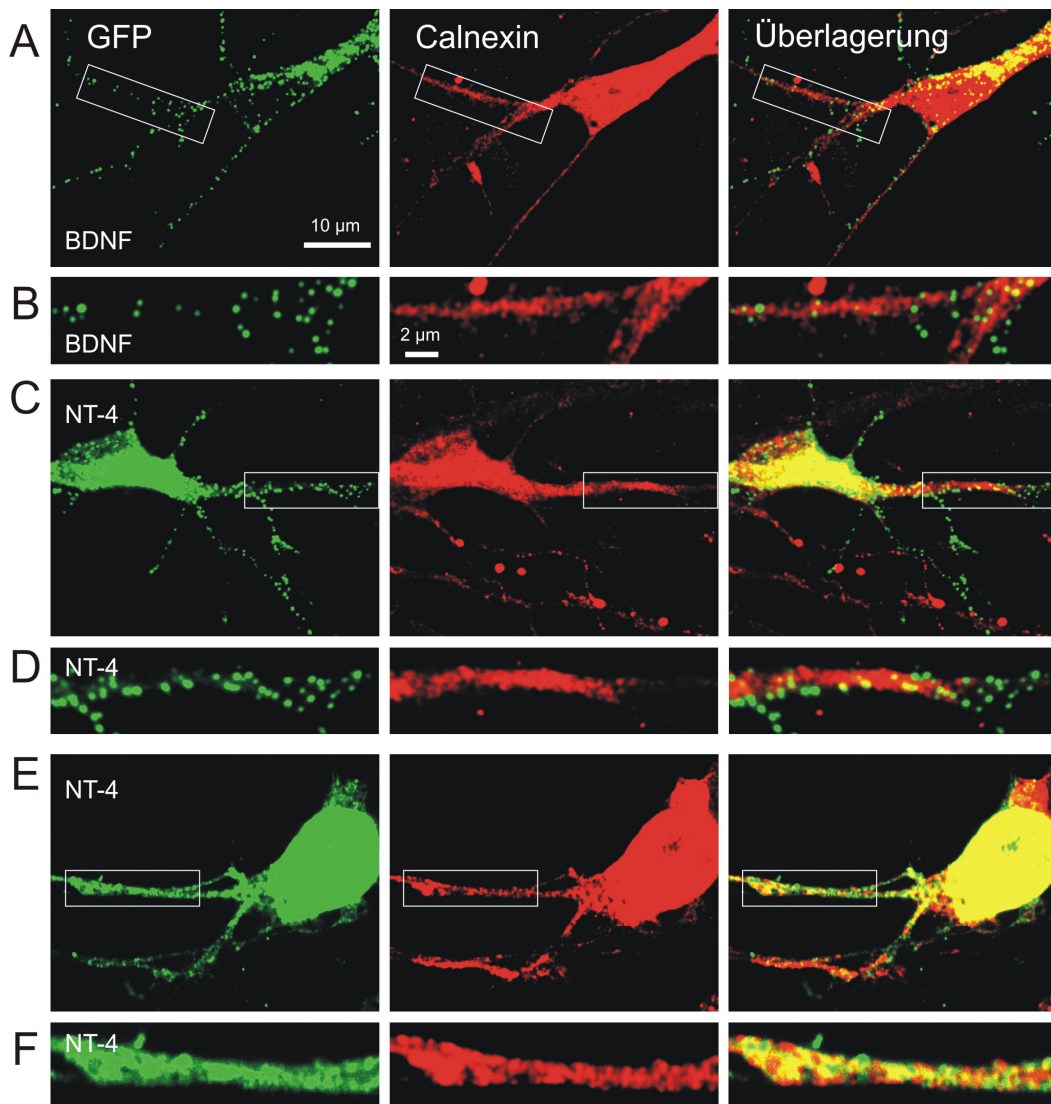


Abb. 4.8: Kolokalisationsstudie der Neurotrophine mit dem Marker für das raue und glatte Endoplasmatische Retikulum Calnexin. **A-F:** Hippokampale Neurone (8 DIV) wurden mit dem jeweiligen GFP-markierten Neurotrophin (links: GFP-Signal) transfiziert und 2 Tage nach der Transfektion mit einem Antikörper gegen das Protein Calnexin (Mitte: Immunreaktivität) gefärbt (rechts: Überlagerung der Fluoreszenzbilder). **A & C:** Konfokale Beispielbilder für den distalen vesikulären Expressionstyp. Eine somatische Kolokalisation des GFP Signals und des Calnexins ist zu beobachten. **B & D:** Ausschnittsvergrößerungen der Bilder A & C. Eine Kolokalisation der Neurotrophin-beinhaltenden vesikulären Strukturen und des Calnexins ist nicht zu erkennen. **E:** Konfokales Beispielbild für ein Neurotrophin mit proximalen Expressionsmuster. Eine somatische Kolokalisation beider Proteine ist zu erkennen. **F:** Ausschnittsvergrößerung von E. Eine gute Kolokalisation des Neurotrophin-Signals mit dem Marker für das Endoplasmatische Retikulum ist in den Dendriten zu erkennen (modifiziert nach Brigadski *et al.*, 2005).

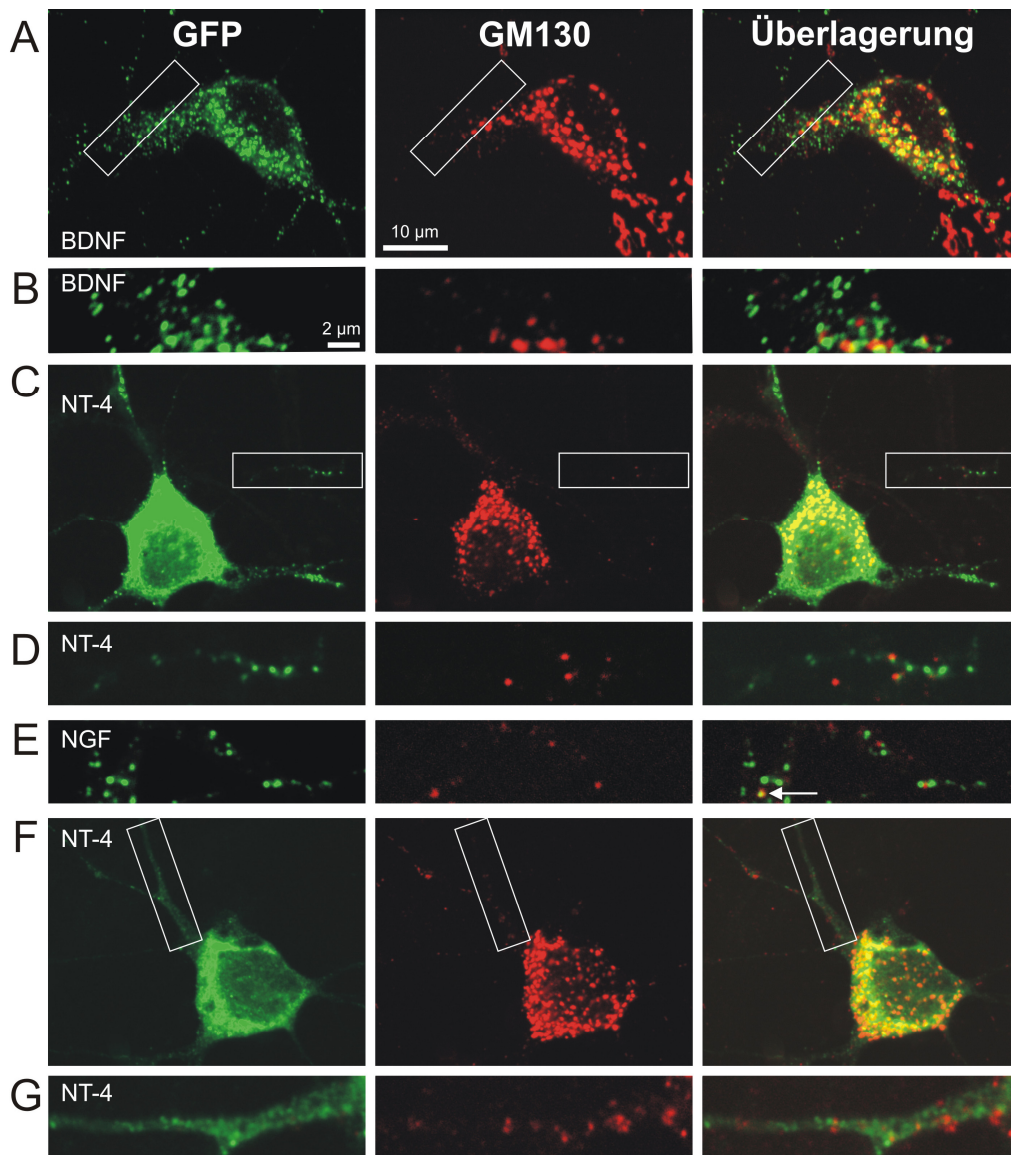


Abb. 4.9: Kolokalisation der Neurotrophine mit dem Marker für das cis-Golgi Netzwerk GM130. **A-G:** Hippokampale Neurone wurden nach 8 DIV mit dem jeweiligen GFP-markierten Neurotrophin (links: GFP-Signal) transfiziert und nach 2 weiteren Tagen mit einem Antikörper gegen das Protein GM130 (Mitte: Immunreaktivität) gefärbt (rechts: Überlagerung der beiden Fluoreszenzbilder). **A & C:** Konfokale Beispielbilder für den distalen vesikulären Expressionstyp. Eine partielle somatische Kolokalisation des GFP Signals und des GM130 ist zu beobachten. **B & D:** Ausschnittsvergrößerung von A & C. Keine Kolokalisation der Neurotrophin-beihaltenden vesikulären Strukturen mit GM130 ist zu beobachten. **E:** Vereinzelt konnte eine Kolokalisation der Neurotrophin-beihaltenden vesikulären Strukturen mit GM130 beobachtet werden (siehe Pfeil). **F:** Konfokales Beispielbild für einen proximalen Expressionstyp. Eine somatische Kolokalisation beider untersuchter Proteine ist zu erkennen. **G:** Ausschnittsvergrößerung von E. Eine Kolokalisation des Neurotrophin Signals mit dem Marker für das cis-Golgi Netzwerk ist in distalen Bereichen des Neurons nicht zu erkennen (modifiziert nach Brigadski *et al.*, 2005).

verbunden ist, und für die Aufrechterhaltung des cis-Golgi Netzwerkes und für den Transport vesikulärer Strukturen verantwortlich ist (Horton & Ehlers, 2003). Immunzytochemische Färbungen von Neurotrophin-GFP exprimierenden hippocampalen Kulturen (10 DIV) mit einem Antikörper gegen das Protein GM130 zeigten eine vergleichbare Verteilung der Neurotrophine im cis-Golgi Netzwerk unabhängig vom jeweiligen Verteilungsmuster der Neurotrophine.

In Neuronen, die die Neurotrophine nach dem distalen Expressionsmuster sortierten, zeigte sich eine partielle Kollokalisierung von Neurotrophinen und GM130 im Soma bzw. in proximalen Bereichen der Neurite des Neurons (siehe Abb. 4.9A-E). Die Neurotrophin-GFP beinhaltenden vesikulären Strukturen in den distalen Bereichen der Neurite zeigten selten eine Kollokalisierung des Neurotrophins und des GM130 (siehe Abb. 4.9E). In Neuronen, die die Neurotrophine nach dem proximalen Expressionsmuster sortierten, konnte ebenfalls eine partielle Kollokalisierung des Neurotrophins mit dem Golgi Marker sowohl im Soma als auch in den proximalen Bereichen der Neurite gefunden werden. Neurotrophin-beihaltende Strukturen, die durch eine diffuse Neurotrophin-Verteilung gekennzeichnet waren, wiesen keine Kollokalisierung mit dem Golgi Marker auf (siehe Abb. 4.9F-G).

Die beiden spezifischen Verteilungsmuster zeigten somit eine vergleichbare Verteilung der Neurotrophine im cis-Golgi Netzwerk. Neurotrophine, die im Soma oder in proximalen Bereichen der Neurite lokalisiert waren, zeigten eine Anreicherung im cis-Golgi oder in cis-Golgi angrenzenden Strukturen. Wohingegen Neurotrophine, die in distalen vesikulären Strukturen oder distalen diffusen Strukturen lokalisiert waren, selten eine Anreicherung im cis-Golgi Netzwerk zeigten.

4.2.2.3 Die Aggregation der Neurotrophine in sekretorischen Granula

Ein Marker für Vesikel des aktivitätsabhängigen Sekretionsweges ist das Protein Sekretogranin II, ein Mitglied der Chromogranin/Sekretogranin Familie, das für die Aggregation sekretorischer Proteine verantwortlich ist und in der Matrix von sekretorischen Granula lokalisiert ist (Halban & Irminger, 1994). Immunzytochemische

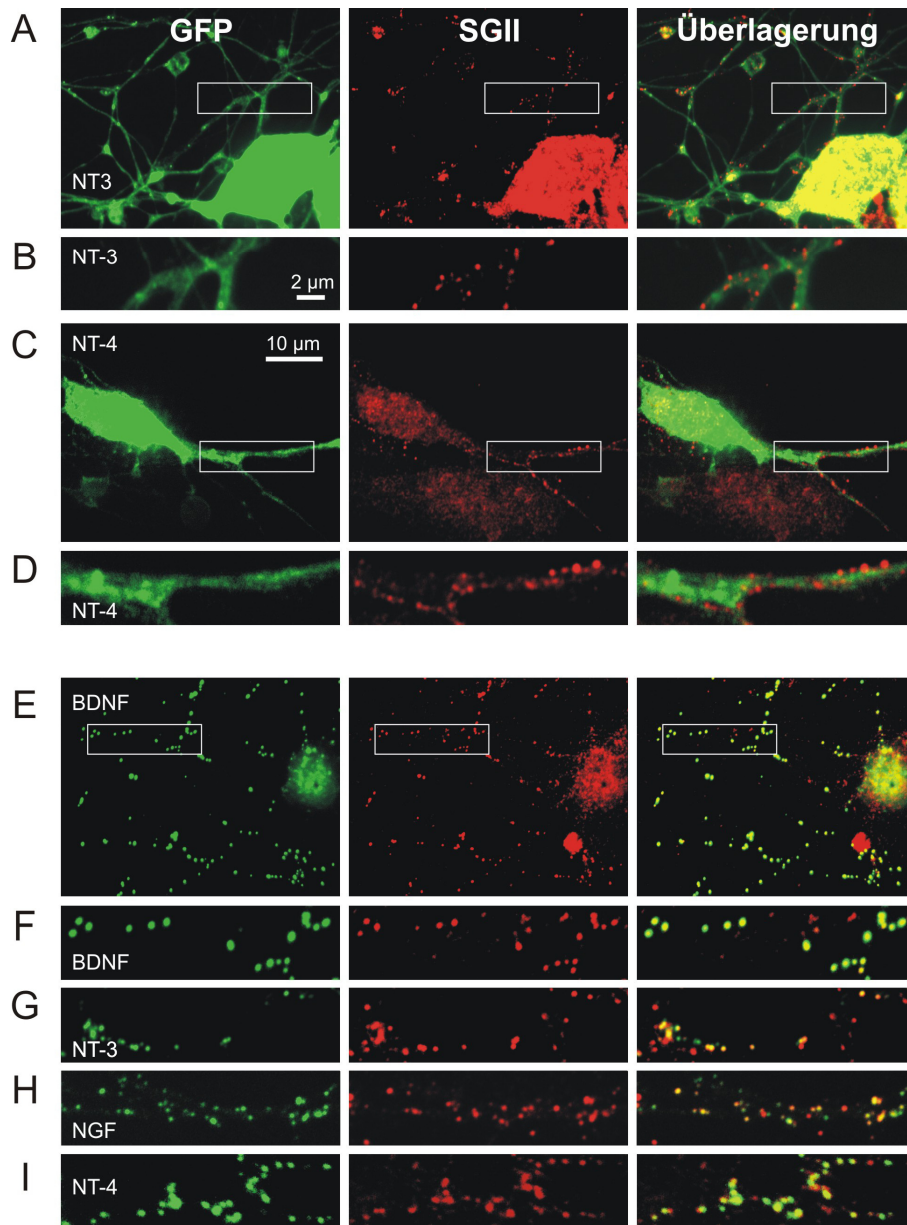


Abb. 4.10: Kolokalisation der Neurotrophine mit dem Marker für sekretorische Granula des aktivitätsabhängigen Sekretionsweges. **A-I:** Hippokampale Neurone (8 DIV) wurden mit dem jeweiligen GFP-markierten Neurotrophin (links: GFP-Signal) transfiziert und nach zwei weiteren Tagen mit einem Antikörper gegen das Protein Sekretogranin II (SGII) (Mitte: Immunreaktivität) gefärbt (rechts: Überlagerung der beiden Fluoreszenzbilder). **A & C:** Konfokale Beispielbilder für den proximalen Expressionstyp. **B & D:** Ausschnittsvergrößerung von A & C. Eine Kolokalisation des diffusen Neurotrophin-Signals mit dem Marker für sekretorische Granula ist in den distalen Bereichen des Neurons nicht zu erkennen. **E & F:** Konfokale Beispielbilder für den distalen vesikulären Expressionstyp. **G:** Ausschnittsvergrößerung von E & F. Eine Kolokalisation der Neurotrophin-beinhaltenden vesikulären Strukturen und des SGII ist jeweils deutlich zu erkennen (modifiziert nach Brigadski *et al.*, 2005).

Färbungen von Neurotrophin-GFP exprimierenden hippokampalen Kulturen mit einem Marker für Sekretogranin II zeigten eine vom Expressionsmuster der Neurotrophine abhängige Lokalisation der Neurotrophine in Vesikeln des aktivitätsabhängigen Sekretionsweges.

In Neuronen, die Neurotrophine nach dem distalen Expressionsmuster sortierten, zeigte sich eine Kolo­kalisierung von Neurotrophin-beinhalten­den vesikulären Strukturen mit dem Antikörper gegen Sekretogranin II (siehe Abb. 4.10E-I). In Neuronen, die Neurotrophine nach dem proximalen Expressionsmuster sortierten, konnte keine Kolo­kalisierung des diffusen, dendritischen Neurotrophin-GFP Signals mit dem Antikörper gegen Sekretogranin II beobachtet werden (siehe Abb. 4.10A-D).

Die beiden Expressionsmuster zeigten somit eine unterschiedliche Verteilung der Neurotrophine hinsichtlich des aktivitätsabhängigen Sekretionsweges. Neurotrophine mit distalem vesikulären Expressionsmuster gelangten über das Endoplasmatische Retikulum und dem Golgi Netzwerk in Vesikel des aktivitätsabhängigen Sekretionsweges, wohingegen Neurotrophine mit proximalem Expressionsmuster im Endoplasmatischen Retikulum angereichert wurden und nicht in distale Vesikel des aktivitätsabhängigen Sekretionsweges gelangten.

4.2.2.4 Die synaptische Lokalisation der Neurotrophine

Eine postsynaptische Lokalisation von BDNF konnte bereits in früheren Studien gezeigt werden (Hartmann *et al.*, 2001). Eine synaptische Lokalisation der anderen Neurotrophine ist bislang nicht untersucht worden. Zur Charakterisierung der prä- oder postsynaptischen Lokalisation von Neurotrophin-beinhalten­den sekretorischen Vesikeln wurden sowohl Kotransfektionsstudien als auch immunzytochemische Färbungen mit synaptischen Markerproteinen vorgenommen.

PSD-95 (post synaptic density-95) ist ein postsynaptisch lokalisiertes Protein und fungiert mit seinen PDZ Domänen als Strukturprotein der postsynaptischen Dichte glutamaterger Synapsen. Hippokampale Neurone (8 DIV) wurden mit dem postsynaptischen Markerprotein PSD95-dsRed und dem jeweiligen GFP-markierten

Neurotrophin kotransfiziert. Die räumliche Anordnung beider Proteine wurde zwei Tage nach der Transfektion mit Hilfe konfokaler Mikroskopie untersucht.

Neben der Lokalisation der GFP-markierten Neurotrophine im Soma des Neurons und entlang der Neurite zeigte die Kotransfektion mit PSD-95-dsRed eine Kolokalisation der Neurotrophine mit PSD-95-dsRed (siehe Abb. 4.11). Die eindeutige Zuordnung der Neurotrophin-beinhaltenen Vesikeln zu postsynaptischen Strukturen glutamaterger Synapsen konnte getroffen werden. Neben der postsynaptischen Lokalisation war ein zusätzliches Vorkommen von der Neurotrophin-beinhaltenen sekretorischen Vesikel an extrasynaptischen Strukturen zu beobachten.

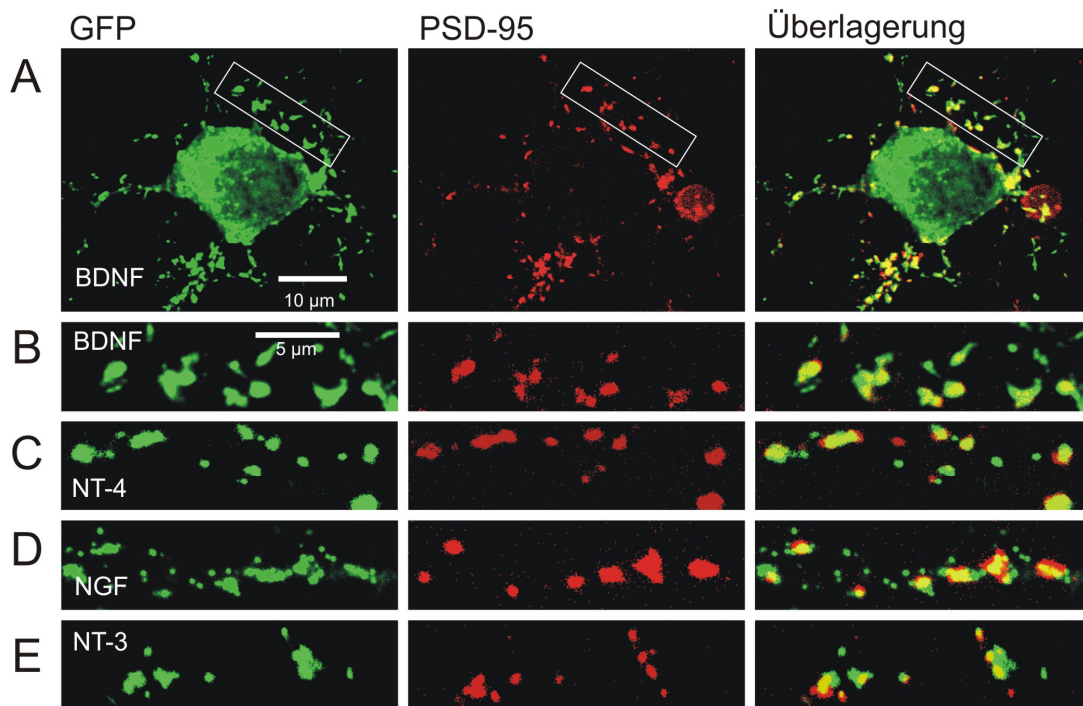


Abb. 4.11: Kotransfektionsstudie der Neurotrophine mit einem Marker für postsynaptische Strukturen glutamaterger Synapsen (PSD95-dsRed). Hippokampale Neurone (8 DIV) wurden mit dem jeweiligen GFP-markierten Neurotrophin (links: GFP-Signal) und PSD95-dsRed, einem postsynaptischen Protein (Mitte: dsRed-Signal) kotransfiziert (rechts: Überlagerung der beiden Fluoreszenzbilder). Zwei Tage nach der Transfektion wurde die räumliche Anordnung beider Proteine untersucht. **A:** Konfokales Beispielbild für den distalen vesikulären Expressionstyp. **B:** Ausschnittsvergrößerung von A. Eine Kolokalisation der BDNF-beinhaltenen vesikulären Strukturen mit dem postsynaptischen Marker Protein PSD95-dsRed ist deutlich zu erkennen. **C-E:** Konfokale Beispielbilder für die postsynaptische Lokalisation der verschiedenen Neurotrophine (modifiziert nach Brigadski *et al.*, 2005).

Des Weiteren wurde eine potentielle präsynaptische Lokalisation der Neurotrophine mit Hilfe immunzytochemischer Färbungen gegen das präsynaptische Markerprotein Synapsin untersucht. Das Protein Synapsin ist in der Präsynapse lokalisiert und verbindet Neurotransmitter-beinhaltende synaptische Vesikel mit Komponenten des Zytoskeletts. Dissoziierte Kulturen hippocampaler Neurone (8 DIV) wurden mit dem jeweiligen GFP-markierten Neurotrophin transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die immunzytochemischen Färbungen mit einem Antikörper gegen das präsynaptisch lokalisierte Protein Synapsin durchgeführt. Die räumliche

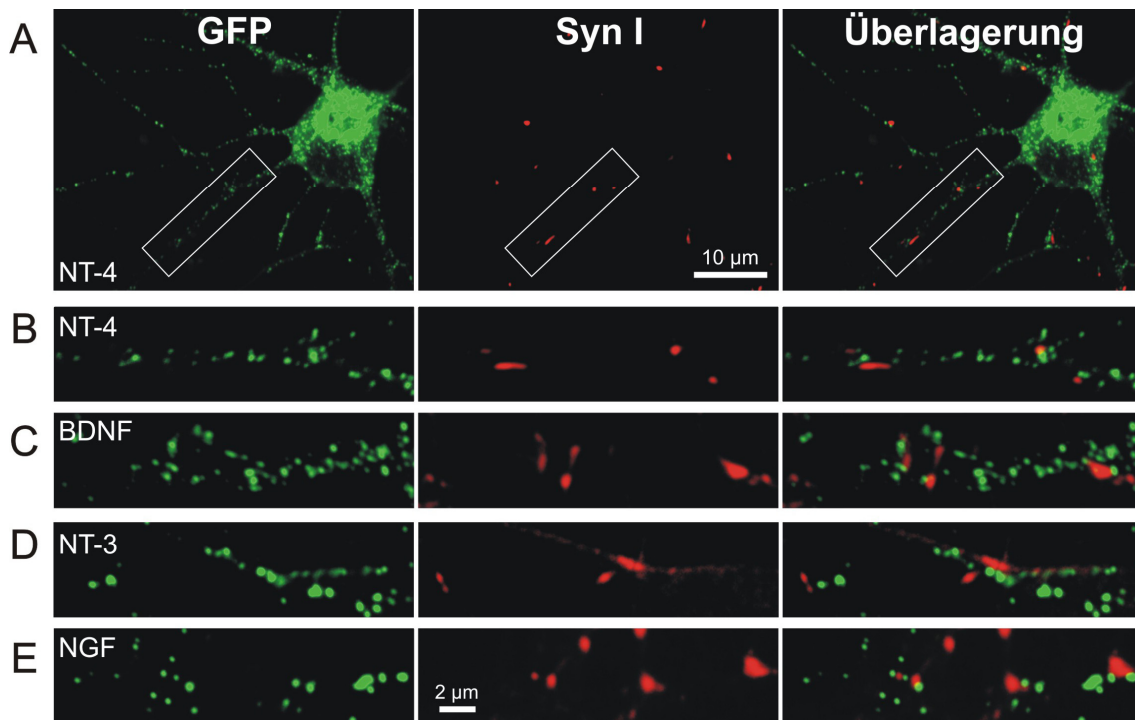


Abb. 4.12: Kolokalisation der Neurotrophine mit einem Marker für präsynaptische Strukturen (Synapsin). Hippokampale Neurone (8 DIV) wurden mit dem jeweiligen GFP-markierten Neurotrophin transfiziert (links: GFP-Signal) und zwei Tage nach der Transfektion mit Hilfe immunzytochemischer Färbung mit einem Antikörper gegen das präsynaptische Protein Synapsin (Mitte: Immunreaktivität) angefärbt (rechts: Überlagerung der beiden Fluoreszenzbilder). **A:** Konfokales Beispielbild für den distalen vesikulären Expressionstyp. **B:** Ausschnittsvergrößerung von A. Eine Kolokalisation der NT-4-GFP-beinhaltenden vesikulären Strukturen mit dem präsynaptischen Marker Protein Synapsin ist nicht zu erkennen. **C-E:** Konfokale Beispielbilder für die benachbarte Anordnung der verschiedenen Neurotrophine und das präsynaptische Protein Synapsin (modifiziert nach Brigadski *et al.*, 2005).

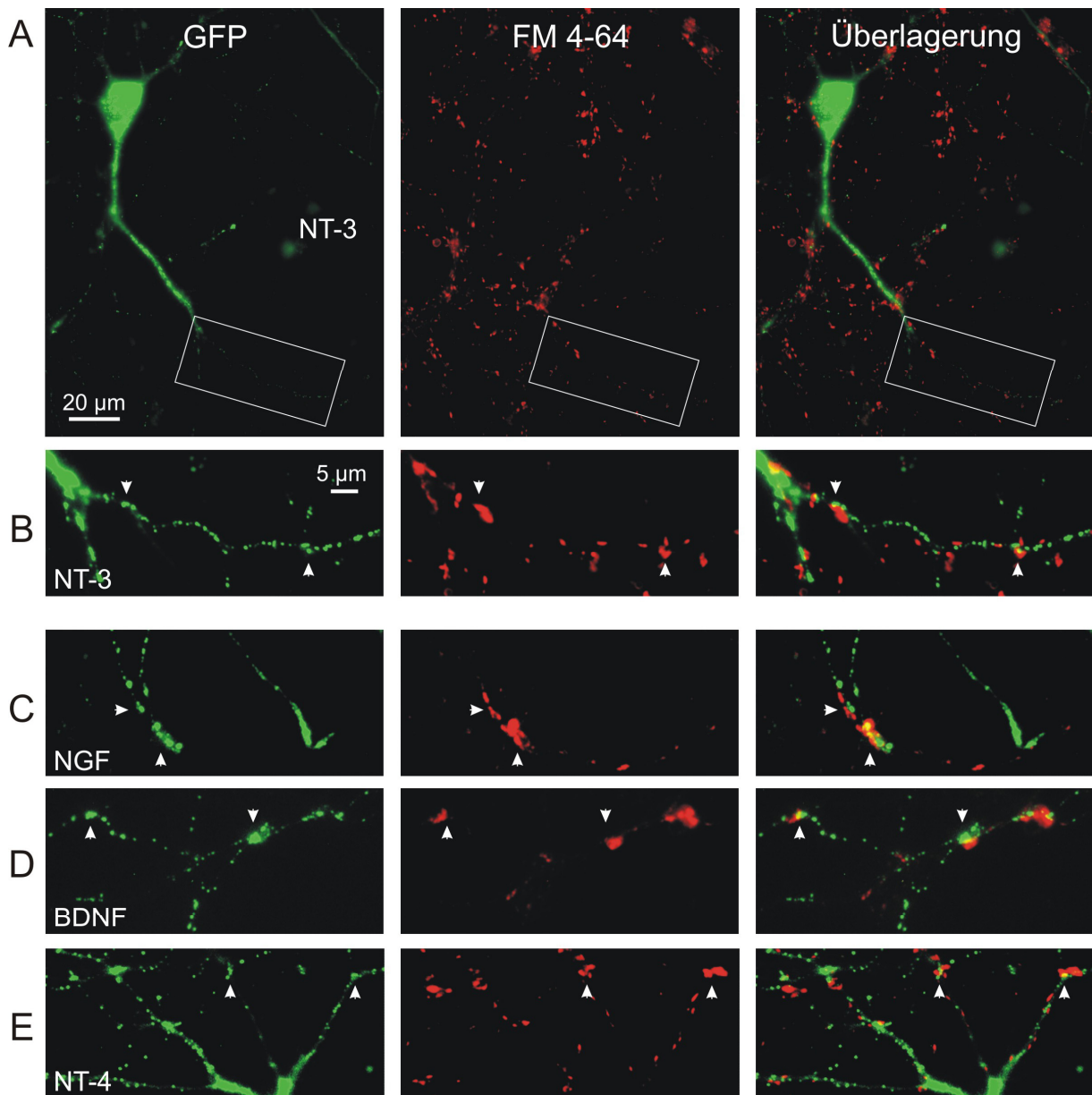


Abb. 4.13: Kolokalisationsstudie der Neurotrophine mit einem Marker für aktive Synapsen FM4-64. Hippokampale Neurone (8 DIV) wurden mit dem jeweiligen GFP-markierten Neurotrophin transfiziert (links: GFP-Signal) und mit Hilfe von FM4-64 wurden die synaptischen Vesikel zwei Tage nach der Transfektion (Mitte: FM4-64) angefärbt (rechts: Überlagerung der beiden Fluoreszenzbilder). **A:** Beispielbild für den distalen vesikulären Expressionstyp. **B:** Ausschnittsvergrößerung von A. Eine Kolokalisation der NT-3-GFP-beinhaltenden vesikulären Strukturen mit dem Marker synaptischer Vesikel ist nicht zu erkennen. **C-E:** Beispielbilder für die benachbarte Anordnung der verschiedenen Neurotrophine und des präsynaptischen Markers FM4-64 (modifiziert nach Brigadski *et al.*, 2005).

Anordnung beider Proteine wurde mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Die Doppelfärbung zeigte eine benachbarte Lokalisation der Neurotrophin-beinhaltenen sekretorischen Vesikel zu dem präsynaptisch lokalisierten Protein Synapsin (siehe Abb. 4.12).

Darüber hinaus wurde eine potentielle präsynaptische Lokalisation der Neurotrophine mit einem Marker für aktive Synapsen untersucht. Hippokampale Neurone (8 DIV) wurden mit dem Expressionsplasmid für das jeweilige GFP-markierte Neurotrophin transfiziert. Nach zwei weiteren Tagen wurden die synaptischen Vesikel mit dem amphiphilen Styrylfarbstoff FM4-64 angefärbt. Die räumliche Anordnung der mit FM4-64 angefärbten aktiven Synapsen und der Neurotrophin-beinhaltenen vesikulären Strukturen wurde untersucht. Die Doppelfärbungen zeigten eine benachbarte jedoch nicht überlappende Lokalisation der Neurotrophin-beinhaltenen sekretorischen Vesikeln zu den mit FM4-64 angefärbten synaptischen Vesikeln (siehe Abb. 4.13).

Die Untersuchungen zeigen insgesamt, dass eine postsynaptische Lokalisation aller Neurotrophine an glutamatergen Synapsen vorliegt, sofern es sich um Neurotrophine mit distalem Verteilungsmuster handelt. Die vorwiegend benachbarte Anordnung der Neurotrophin-beinhaltenen sekretorischen Granula zu dem präsynaptischen Marker-Protein Synapsin und zu FM4-64 kann ebenfalls durch die postsynaptische Lokalisation der Neurotrophine erklärt werden. Eine präsynaptische Lokalisation der Neurotrophine konnte nicht nachgewiesen werden.

4.2.3 Die Expressionsmuster der Neurotrophine in undifferenzierten und differenzierten PC12 Zellen

In Neuronen, in denen das Neurotrophin nach dem distalen vesikulären Expressionsmuster sortiert wurde, konnte eine Anreicherung des Neurotrophins in vesikulären Strukturen des aktivitätsabhängigen Sekretionsweges beobachtet werden. Neben einer aktivitätsabhängigen Sekretion der Neurotrophine ist jedoch auch eine

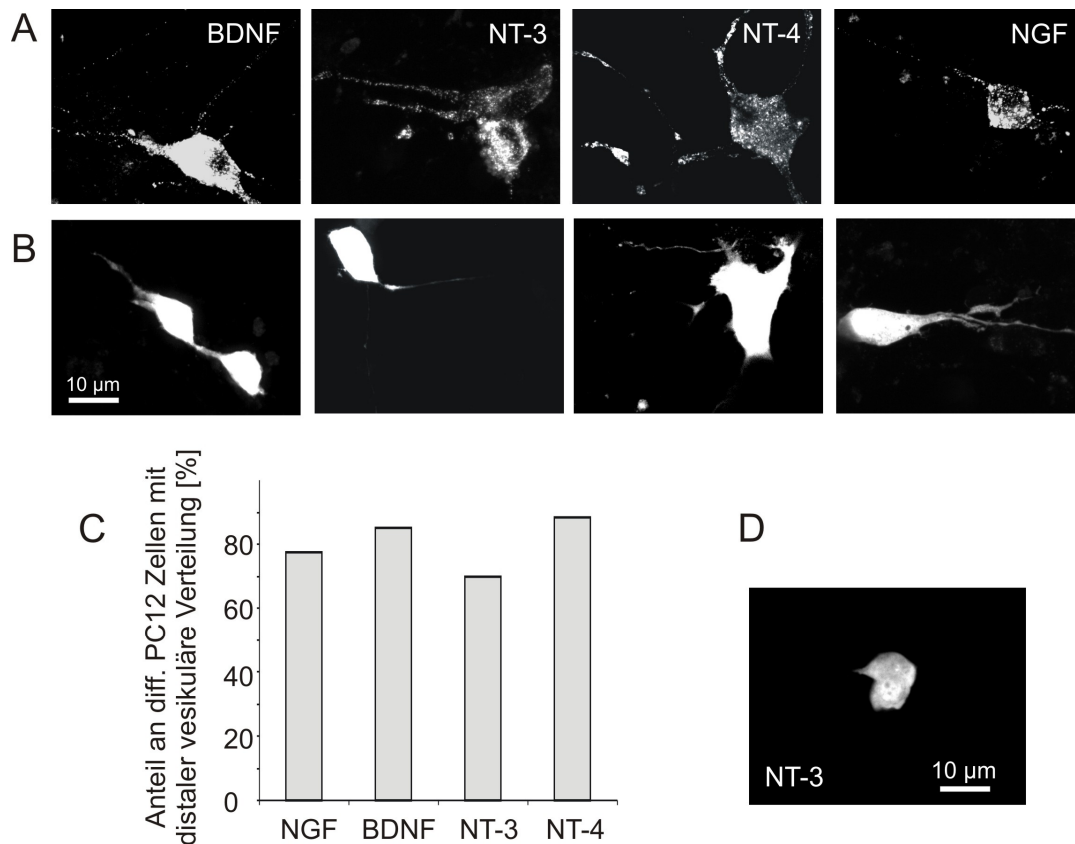


Abb. 4.14: Unterschiedliche Verteilung der Neurotrophine in PC12 Zellen. Undifferenzierte und differenzierte PC12 Zellen wurden mit den jeweiligen GFP-markierten Neurotrophinen transfiziert und das Verteilungsmuster 1 Tag nach der Transfektion beobachtet. **A:** PC12 Zellen wurden durch eine 7 Tage lange Inkubation in Kulturmedium mit 100ng/ml NGF ausdifferenziert. Anschließend wurden die Zellen mit dem Expressionsplasmid des jeweiligen GFP-markierten Neurotrophins transfiziert und das Expressionsmuster der Neurotrophine untersucht. Eine distale vesikuläre Verteilung der Neurotrophine ist deutlich zu erkennen. **B:** Differenzierte PC12 Zellen, die eine diffuse Verteilung der Neurotrophine zeigen. Vesikuläre Strukturen sind hier nicht zu beobachten. **C:** Quantitative Auswertung der Verteilung der Neurotrophine in differenzierten PC12 Zellen. Alle Neurotrophine zeigen in über 70 % der Fälle eine vesikuläre Verteilung. **D:** Beispielbild einer undifferenzierten PC12 Zelle. Alle Neurotrophine zeigten eine diffuse Verteilung des GFP-Signals in undifferenzierten PC12 Zellen (modifiziert nach Brigadski *et al.*, 2005).

konstitutive Sekretion der Neurotrophine bekannt (Mowla *et al.*, 1999, 2001; Farhadi *et al.*, 2000). Die Vermutung liegt nahe, dass die beiden existierenden Expressionsmuster die Kapazität eines Neurons darstellen, das jeweilige Neurotrophin in den konstitutiven bzw. regulierten Sekretionsweg zu sortieren. Zur Untersuchung, ob der proximale Expressionstyp einer Sortierung der Neurotrophine in den konstitutiven Sekretionsweg

entspricht, wurde das Verteilungsmuster der Neurotrophine an klonalen PC12 Zellen analysiert. PC12 Zellen zeigen im undifferenzierten Zustand bevorzugt eine konstitutive Sekretion von Proteinen. Mit zunehmender neuronaler Differenzierung nimmt die regulierte Sekretion von Proteinen in diesen Zellen zu (Nomoto *et al.*, 2000).

Undifferenzierte und differenzierte PC12 Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden der jeweiligen mit GFP-markierten Neurotrophine transfiziert. Das Verteilungsmuster wurde einen Tag nach der Transfektion untersucht. Undifferenzierte PC12 Zellen zeigten eine homogene, diffuse Verteilung des GFP-Signals (siehe Abb. 4.14D), wohingegen transfizierte PC12 Zellen, deren Ausdifferenzierung durch 100ng/ml NGF Applikation stimuliert wurde, zu über 70% das Neurotrophin in vesikulären Strukturen sortierten (siehe Abb. 4.14A-C).

An PC12 Zellen konnte somit die Existenz der beiden Verteilungsmuster bestätigt werden. Das Verteilungsmuster der Neurotrophine in undifferenzierten PC12 Zellen und in der Minderheit der differenzierten PC12 Zellen ähnelt dem proximalen Verteilungsmuster der Neurotrophine in hippocampalen Zellen, wohingegen das vesikuläre Verteilungsmuster in differenzierten PC12 Zellen der distalen vesikulären Verteilung der Neurotrophine in hippocampalen Neuronen gleich kommt.

4.3 Sekretion der Neurotrophine

Die Expressionsmuster der Neurotrophine in dissoziierten Kulturen hippocampaler Neurone und PC12 Zellen legten die Vermutung nahe, dass das proximale Verteilungsmuster ein Sortieren des jeweiligen Neurotrophins in den konstitutiven Sekretionsweg und das distale vesikuläre Verteilungsmuster ein Sortieren des jeweiligen Neurotrophins in den aktivitätsabhängigen Sekretionsweg darstellt. Zur genaueren Analyse wurden videomikroskopische Untersuchungen zur Ausschüttung GFP-markierter Neurotrophine in dissoziierten Kulturen hippocampaler Neurone durchgeführt.

4.3.1 Konstitutive Ausschüttung der Neurotrophine

Die konstitutive Sekretion GFP-markierter Neurotrophine wurde als intrazelluläre Fluoreszenzabnahme des GFP Signals unter aktivitätsdeprivierenden Bedingungen gemessen.

Neurone, die das Neurotrophin nach dem proximalen bzw. distalen vesikulären Verteilungsmuster sortierten, wurden kontinuierlich mit einer Ca^{2+} -freien und TTX-haltigen aktivitätsdeprivierenden Lösung umspült. Die Fluoreszenzintensität wurde über einen Zeitraum von 10 min verfolgt. Mit GFP transfizierte Neurone dienten als Kontrolle. In Abbildung 4.15A sind ausgewählte Neurone dargestellt, die eines der jeweiligen Verteilungsmuster zeigen. Der Verlauf der Fluoreszenzintensität der ausgewählten Regionen in Abbildung 4.15A während der Perfusion der Zellen mit aktivitätsdeprivierender Lösung in Abhängigkeit von der Zeit ist in der Abbildung 4.15B dargestellt. Über einen Zeitraum von 10 min ist eine kontinuierliche Abnahme der Fluoreszenzintensität bei dem Neuron mit dem proximalen Verteilungsmuster zu beobachten, die bei dem Neuron mit dem distalen Verteilungsmuster ausbleibt. Erst durch eine Perfusion der Zellen mit einer K^+ -haltigen (50 mM) Lösung, die eine Depolarisation der Neurone auf -20 mV auslöst, ist eine Abnahme der Fluoreszenzintensität beim distalen vesikulären Expresser zu beobachten, die beim proximalen Expressionstyp ausbleibt. Die quantitative Analyse der Fluoreszenzabnahme nach 10 min Behandlung der Zellen mit aktivitätsdeprivierender Lösung zeigte eine Abnahme der Fluoreszenzintensität beim proximalen Expressionstyp auf 8 % im Vergleich zu 2 % beim distalen Expressionstyp und 0 % bei den GFP-transfizierten Neuronen.

Diese Daten bestätigen, dass Neurotrophine, die nach dem proximalen Verteilungsmuster sortiert werden, in den konstitutiven Sekretionsweg gelangen und somit konstitutiv ausgeschüttet werden, wohingegen Neurotrophine, die nach dem distalen vesikulären Expressionsmuster sortiert werden, in den aktivitätsabhängigen Sekretionsweg gelangen.

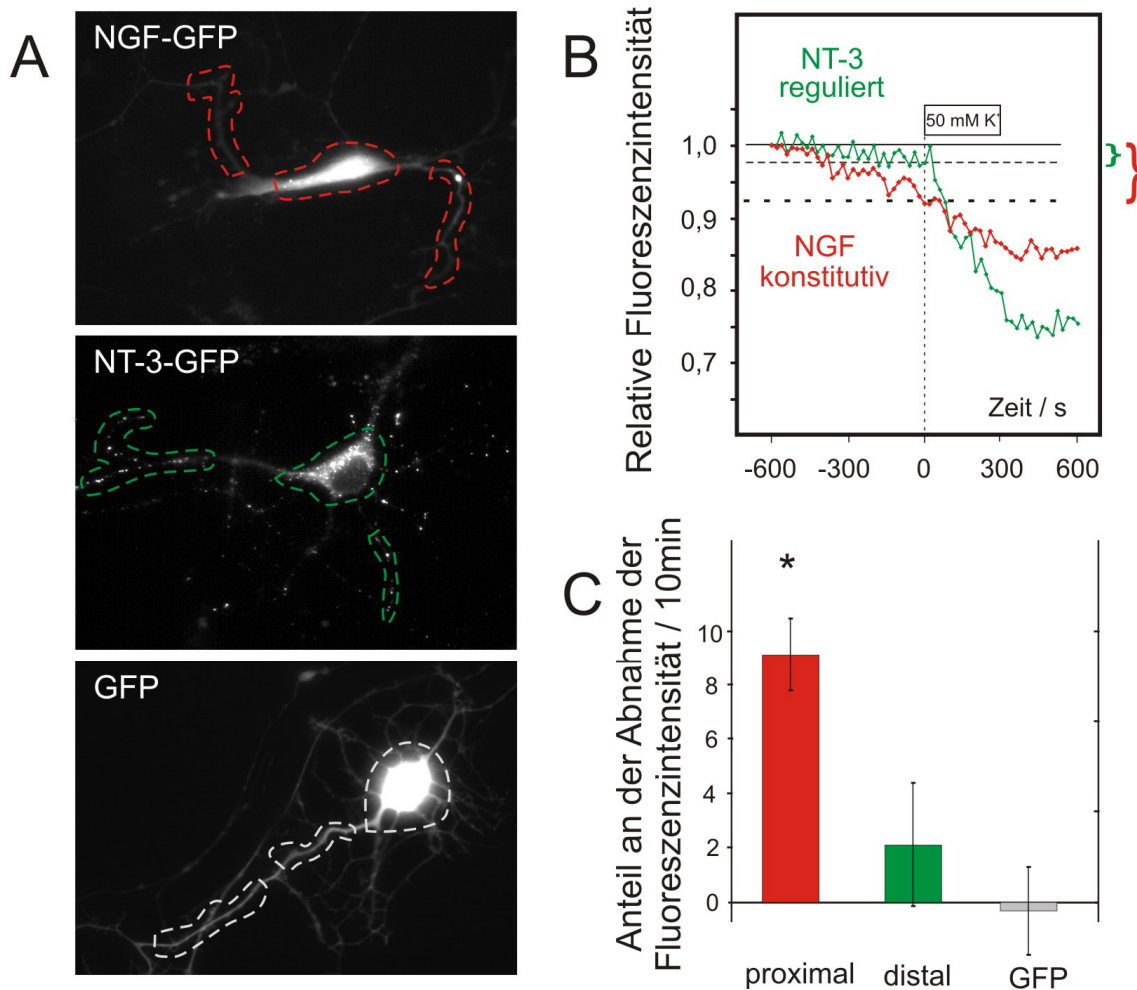


Abb. 4.15: Die konstitutive Sekretion von Neurotrophinen mit proximalem Expressionsmuster. Hippokampale Neurone (8 DIV) wurden mit dem jeweiligen Neurotrophin transfiziert und eine konstitutive bzw. aktivitätsabhängige Sekretion der Neurotrophine wurde zwei Tage nach der Transfektion mit Hilfe videomikroskopischer Methoden untersucht. **A:** Beispielbilder für Neurone, die das Neurotrophin proximal (oben), oder distal vesikulär sortieren (Mitte) und ein Beispielbild für ein Neuron, welches GFP exprimiert (unten). **B:** Quantitative Auswertung der videomikroskopischen Untersuchung. Während der Perfusion der Neurone mit aktivitätsdeprivierender Lösung (0 mM Ca²⁺, 1 μ M TTX) beobachtet man lediglich bei dem proximalen Expressionstyp eine kontinuierliche Abnahme des GFP-Signals. Eine Perfusion der Zellen mit 50 mM K⁺-haltiger Lösung induzierte lediglich bei dem distalen vesikulären Expressionstyp eine Depolarisations-induzierte Abnahme des GFP-Signals. **C:** Quantitative Auswertung der Ausschüttung von Neurotrophinen während 10 min Perfusion mit aktivitätsdeprivierender Lösung (proximal: n=15; distal: n=6). Neurotrophine, die nach dem proximalen Verteilungsmuster sortiert wurden, zeigten eine signifikante Abnahme des GFP-Signals während der Messung. Fehlerbalken repräsentieren Standardfehler. p<0,02 (modifiziert nach Brigadski *et al.*, 2005)

4.3.2 Aktivitätsabhängige Ausschüttung der Neurotrophine an glutamatergen Synapsen

Eine synaptische aktivitätsabhängige Ausschüttung von BDNF-GFP konnte bereits in früheren Studien gezeigt werden (Hartmann *et al.*, 2001), wohingegen eine synaptische Ausschüttung der andere Neurotrophine bislang nicht beschrieben wurde.

Dissoziierte Kulturen hippocampaler Neurone (8 DIV) wurden mit Expressionsplasmiden für das jeweilige GFP-markierte Neurotrophin und Plasmiden für synaptische Markerproteine kotransfiziert. Die identifizierten synaptischen Neurotrophin-GFP beinhaltenen Strukturen wurden hinsichtlich einer aktivitätsabhängigen Ausschüttung der Neurotrophine 1-3 Tage nach der Transfektion mit Hilfe videomikroskopischer Analyse der intrazellulären Fluoreszenzintensität untersucht. Die Ausschüttung der Neurotrophine wurde als Abnahme der intrazellulären Fluoreszenzintensität gemessen (Hartmann *et al.*, 2001). In der Abbildung 4.16 sind ausgewählte Neurone dargestellt, die eine Kollokalisierung des jeweiligen Neurotrophins mit dem postsynaptischen Markerprotein PSD95-dsRed bzw. eine benachbarte Anordnung des jeweiligen Neurotrophins mit dem präsynaptischen Markerprotein VAMP-dsRed zeigten. Die kotransfizierten Neurone wurden zunächst für einen Zeitraum von 5 min mit einer Kontrolllösung (5mM K^+ , 2 Ca^{2+} , 1 Mg^{2+}), anschließend für weitere 5 min mit einer 50 mM K^+ -haltigen Lösung (50mM K^+ , 2 Ca^{2+} , 1 Mg^{2+}), wodurch eine Depolarisation der Neurone auf -20mV induziert wird, umspült. Nach der Depolarisation der Neurone mit der 50 mM K^+ -haltigen Lösung (K^+ -induzierte Depolarisation) wurden die Neurone erneut für 5 weitere Minuten mit Kontrolllösung umspült. Der Verlauf der Fluoreszenzintensität des synaptisch lokalisierten Neurotrophin-GFP-Signals wurde mit Hilfe videomikroskopischer Aufnahmen über den gesamten Zeitraum verfolgt. Alle 10 s wurde ein digitales Bild erzeugt. In der Abbildung 4.16 sind synaptisch lokalisierte Neurotrophin-beinhaltenen vesikuläre Strukturen zu verschiedenen Zeitpunkten einer videomikroskopischen Untersuchung dargestellt. Man beobachtete eine Abnahme der intrazellulären Fluoreszenzintensität nach K^+ -induzierter Depolarisation der Neurone. Dieser Abnahme der intrazellulären

Fluoreszenzintensität ging in manchen Fällen eine transiente Fluoreszenzzunahme voraus. Die transiente Fluoreszenzzunahme wurde bei BDNF-GFP und NT-3-GFP exprimierenden Neuronen häufiger beobachtet als bei NGF-GFP und NT-4-GFP exprimierenden Neuronen. Das Protein GFP ist ein pH-sensitives Protein. Bei azideren pH-Werten, wie sie in sekretorischen Granula vorkommen, ist die Fluoreszenzintensität des GFP im Vergleich zu neutralen pH-Werten reduziert. Entsprechend dem in der Einleitung beschriebenen Sekretionsmodell von Peptiden beruht diese Fluoreszenzzunahme des GFP auf der Neutralisierung der sekretorischen Granula und der damit verbundenen pH-Wert abhängigen Erhöhung der relativen Fluoreszenzintensität des GFP-Proteins. Der Verlauf der Fluoreszenzintensität der ausgewählten synaptischen Regionen in Abhängigkeit von der Zeit ist in Abbildung 4.16 dargestellt. Deutlich ist die Abnahme der Fluoreszenzintensität um 15-20% nach K^+ -induzierter Depolarisation zu beobachten. Die Abnahme der Fluoreszenzintensität wird nach 10-30 s sichtbar. Die Kinetik der Neurotrophin-Ausschüttung ergibt sich aus den gemittelten Daten (siehe Abb. 4.17A-D). Eine Fluoreszenzabnahme von 12-21% war nach fünfminütiger Perfusion mit einer 50 mM K^+ -Lösung zu beobachten. Der Abfall der Fluoreszenzintensität konnte mit einer monoexponentiellen Funktion beschrieben werden. Daraus ergaben sich Zeitkonstanten (τ) für den Abfall von 121 ± 29 s für NT-4, 198 ± 16 s für NGF, 214 ± 30 s für NT-3 und 309 ± 78 s für BDNF. Die Zeitkonstante, mit der die Ausschüttung von NT-4 erfolgte, ist signifikant verschieden von den Zeitkonstanten, mit denen die Ausschüttung der Neurotrophine NT-3 und BDNF erfolgte. Daraus wird ersichtlich, dass die Neurotrophine mit unterschiedlicher Kinetik aktivitätsabhängig ausgeschüttet werden. Die gemittelten Daten zeigen ebenfalls sehr deutlich die transiente Fluoreszenzerhöhung nach K^+ -induzierter Depolarisation der Neurone bei den Neurotrophinen BDNF und NT-3, wohingegen sie bei NGF und NT-4 nur in wenigen Fällen beobachtet wurden.

Somit können alle Neurotrophine, die nach dem distalen vesikulären Expressionsmuster sortiert werden und in den aktivitätsabhängigen Sekretionsweg gelangen nach K^+ -induzierter Depolarisation der Neurone an postsynaptischen Strukturen glutamaterger Synapsen ausgeschüttet werden.

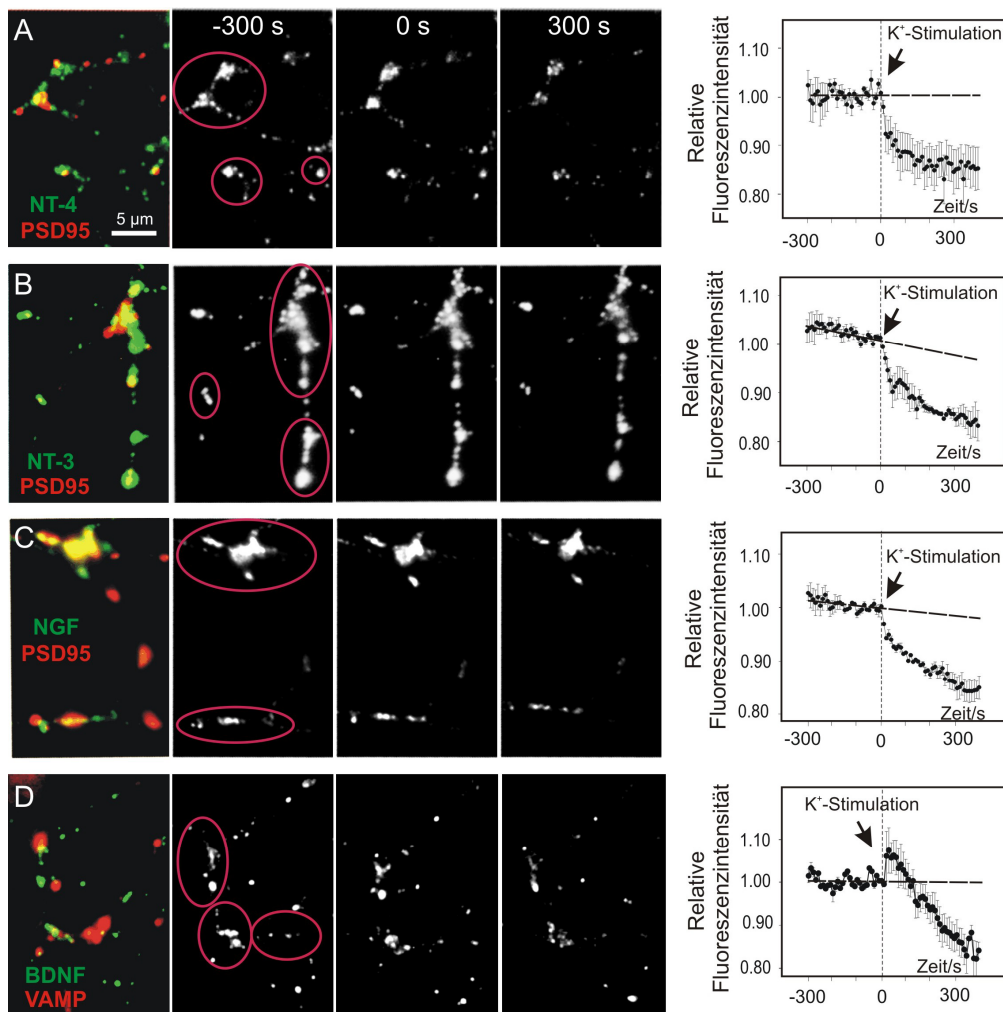


Abb. 4.16: Die aktivitätsabhängige Sekretion von Neurotrophinen mit distalem Expressionsmuster an glutamatergen Synapsen. Hippokampale Neurone (8 DIV) wurden mit Expressionsplasmiden des jeweiligen GFP-markierten Neurotrophins und einem synaptischen Markerprotein kotransfiziert und eine aktivitätsabhängige Sekretion der Neurotrophine wurde als Abnahme der intrazellulären Fluoreszenzintensität nach K^+ -induzierter Depolarisation gemessen. **A-D:** Beispielbilder für transfizierte Neurone, die eine Kolokalisation des jeweiligen Neurotrophins mit dem postsynaptischen Markerprotein PSD95-dsRed bzw. eine benachbarte Anordnung des jeweiligen Neurotrophins mit dem präsynaptischen Markerprotein VAMP-dsRed zeigen. Links: Überlagerung der GFP-Fluoreszenz des jeweiligen Neurotrophins und der DsRed-Fluoreszenz des jeweiligen post- bzw. präsynaptischen Markerproteins. Mitte: GFP-Signal 300 s vor, bei 0 s bzw. 300 s nach der K^+ -induzierten Depolarisation der Neurone. Rechts: Quantitative Analyse der ausgewählten synaptischen Strukturen während der videomikroskopischen Untersuchung. Die Quantitative Analyse zeigt deutlich die Abnahme der Fluoreszenzintensität an den glutamatergen Synapsen nach K^+ -induzierter Depolarisation der Neurone. Die gestrichelte Linie bzw. der Pfeil gibt den Start der fünfminütigen Perfusion der Neurone mit 50 mM K^+ -Lösung an. Fehlerbalken repräsentieren Standardfehler. (modifiziert nach Brigadski *et al.*, 2005).

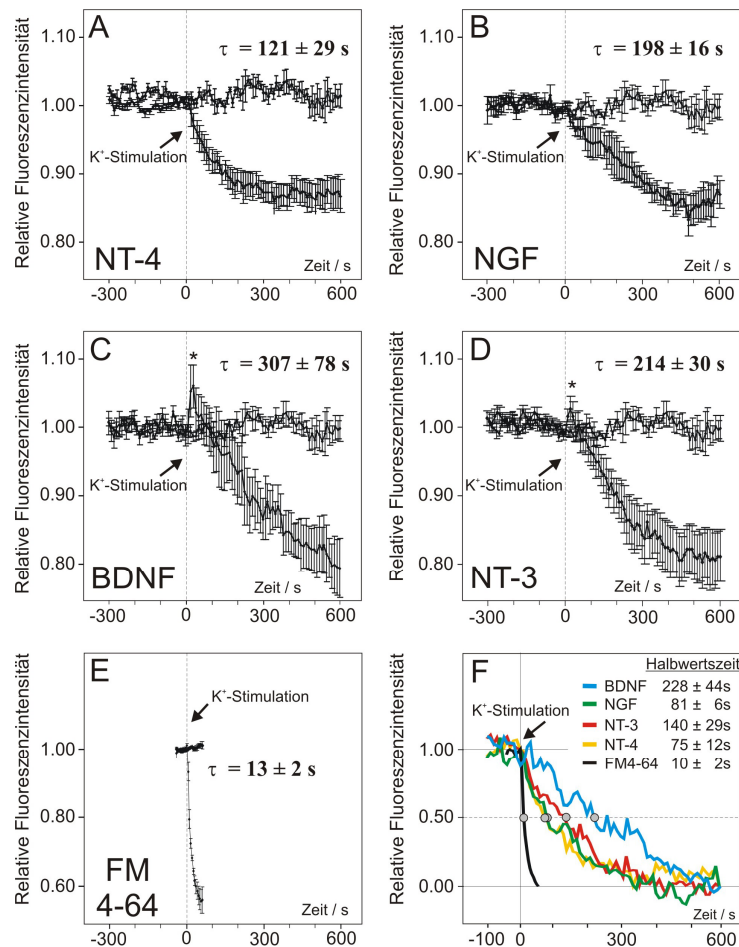


Abb. 4.17: Die Kinetik der aktivitätsabhängigen Sekretion von Neurotrophinen an glutamatergen Synapsen im Vergleich zur Kinetik der Neurotransmitter-Ausschüttung. **A-D:** Quantitative Auswertung der Neurotrophin-Sekretion während der videomikroskopischen Untersuchung. Die gestrichelte Linie bzw. der Pfeil gibt den Start der fünf minütigen Perfusion der Neurone mit 50 mM K⁺-haltigen Lösung an. Der Graph zeigt deutlich die Sekretion der Neurotrophine an den glutamatergen Synapsen nach K⁺-induzierter Depolarisation der Neurone. Die Zeitkonstanten für den monoexponentiellen Abfall der GFP-Fluoreszenzintensität betragen 121 ± 29 s für NT-4 (n=6), 198 ± 16 s für NGF (n=4), 214 ± 30 s für NT-3 (n=8) und 309 ± 78 s für BDNF (n=5). Die obere Kurve in jeder Abbildung zeigt den gemittelten Fluoreszenzverlauf von Kontrollmessungen, in denen die Zellen lediglich mit Kontrolllösung gespült wurden. Eine K⁺-induzierte Depolarisation blieb aus (n=3). In C und D ist eine transiente Fluoreszenzzunahme nach Beginn der K⁺-induzierten Depolarisation der Neurone zu beobachten. Die Zunahme der Fluoreszenz beruht auf der intragranulären Neutralisierung und einer damit verbundenen Erhöhung der Fluoreszenzintensität des GFP-Proteins (siehe Text). **E:** Quantitative Analyse der FM4-64-Ausschüttung nach K⁺-induzierter Depolarisation der Neurone. Die Zeitkonstante für die monoexponentielle Abnahme der Fluoreszenzintensität betrug 13 ± 2 s (n=3). **F:** Analyse der halbmaximalen Ausschüttung der Neurotrophine im Vergleich zu FM4-64. Die grauen Kreise geben die halbmaximale Ausschüttung des jeweiligen Vesikel-Inhaltes an. Fehlerbalken repräsentieren Standardfehler. (modifiziert nach Brigadski *et al.*, 2005).

Studien von Konnerth und Mitarbeitern forderten aufgrund ihrer beschriebenen desensibilisierenden Effekte von BDNF eine schnelle Sekretion des Neurotrophins, die vergleichbar mit der Ausschüttung von Neurotransmittern im ms Bereich stattfinden soll (Kafitz *et al.*, 1999; Blum *et al.*, 2002; für eine Übersicht siehe Kovalchuk *et al.*, 2004). Die Kinetik der Neurotrophin-Ausschüttung soll somit vergleichbar mit der Ausschüttung der Neurotransmitter aus synaptischen Vesikeln sein. Die vorliegende quantitative Auswertung der Neurotrophin-Sekretion zeigte jedoch eine deutlich langsamere Kinetik der Neurotrophin-Ausschüttung. Um die Neurotrophin-Ausschüttung mit der Ausschüttung von Neurotransmittern unter identischen Bedingungen vergleichen zu können, wurden Untersuchungen zur Neurotransmitter-Ausschüttung mit Hilfe des Styryl-Farbstoff FM4-64 vorgenommen. Die videomikroskopischen Untersuchungen der Ausschüttung von FM4-64 zeigten eine Abnahme der Fluoreszenzintensität infolge einer durch K^+ -induzierten Depolarisation der Neurone. Die Abnahme der Fluoreszenzintensität war nach weniger als 5 s nach Beginn der Depolarisation sichtbar. Eine Abnahme der Fluoreszenzintensität von 40% war nach 50 s K^+ -induzierter Depolarisation zu beobachten. Die Zeitkonstante des monoexponentiellen Abfalls der FM4-64-Ausschüttung betrug $13\text{sec} \pm 2\text{ s}$. Somit erfolgte die Ausschüttung der Neurotransmitter 10-mal schneller als die Ausschüttung des Neurotrophins NT-4, welches die schnellste Kinetik aufwies.

Um die Ausschüttung der Neurotrophine und des Farbstoffes FM4-64 unabhängig von der Menge des ausgeschütteten Proteins bzw. Moleküls vergleichen zu können, wurden die Daten normalisiert und der Zeitpunkt der halb-maximalen Ausschüttung als Maß für die Kinetik der Ausschüttung miteinander verglichen. Von dieser Auswertung wurden Zellen, die eine transiente Fluoreszenzzunahme zeigten, ausgeschlossen, um die Analyse durch die pH-Wert abhängige Zunahme der Fluoreszenzintensität nicht zu verfälschen. Die Neurotrophine erreichten eine Abnahme der Fluoreszenzintensität um 50 % nach 75 – 228 s (NT-4: $75 \pm 12\text{s}$, NGF: $81 \pm 6\text{s}$, NT-3: $140 \pm 29\text{s}$, BDNF $228 \pm 44\text{s}$) im Vergleich zum Farbstoff FM4-64, der eine halb-maximale Ausschüttung nach $10 \pm 2\text{s}$ erreichte. Auch diese Art der Auswertung zeigte eine deutlich schnellere Ausschüttung der niedermolekularen Neurotransmitter ($\text{Molekulargewicht}_{\text{Neurotransmitter}} \sim$

0,15 kDa) im Vergleich zu den voluminösen Neurotrophinen (Molekulargewicht_{Neurotrophin-Monomer} ~ 15 kDa).

Die Kinetik der Neurotrophin-Ausschüttung wirft die Frage nach den physiologischen Ursachen der unterschiedlichen Ausschüttungsgeschwindigkeiten der Neurotrophine auf. Die anfängliche transiente Fluoreszenzerhöhung deutet auf eine intragranuläre Neutralisierung vor bzw. während der Öffnung der Fusionspore hin. Diese intragranuläre Neutralisierung ist für die Solubilisierung der in den sekretorischen Granula aggregierten Proteine verantwortlich (Burke *et al.*, 1997, Han *et al.*, 1999). Um die Ausschüttung der Neurotrophine unabhängig von einer pH-Wert abhängigen Solubilisierung der aggregierten Neurotrophine zu untersuchen, wurden die Neurone mit Monensin, einem Protonen-Ionophor, vorinkubiert (Han *et al.*, 1999). Monensin ist ein Natrium/Protonen-Austauscher, der eine Entkoppelung des an der Vesikelmembran anliegenden Protonengradienten verursacht bzw. eine intragranuläre Neutralisierung induziert. Dieses ermöglicht den Vergleich der Kinetik der Neurotrophin-Sekretion sowohl unabhängig von einer pH-Wert abhängigen Solubilisierung der Neurotrophine als auch unabhängig von einer pH-Wert abhängigen Fluoreszenzzunahme des GFP-Signals. In der Abbildung 4.18 ist ein ausgewähltes BDNF-GFP exprimierendes Neuron gezeigt. Der Verlauf der Fluoreszenzintensität des Neurotrophin-GFP-Signals wurde mit Hilfe videomikroskopischer Aufnahmen über den gesamten Zeitraum verfolgt. Alle 10 s wurde ein digitales Bild erzeugt. In der Abbildung 4.18B sind BDNF-GFP-beinhaltende vesikuläre Strukturen zu verschiedenen Zeitpunkten einer videomikroskopischen Untersuchung dargestellt. Der Verlauf der Fluoreszenzintensität der ausgewählten Regionen in Abhängigkeit von der Zeit ist in Abbildung 4.18C dargestellt. Deutlich ist die Erhöhung der Fluoreszenzintensität nach Monensin-Applikation und die Abnahme des GFP-Signals nach K⁺-induzierter Depolarisation zu beobachten. Die Applikation von Monensin verursacht zunächst eine Entkoppelung des an der Vesikelmembran anliegenden Protonengradienten. Diese intragranuläre Neutralisierung führt zu einer Erhöhung der GFP-Fluoreszenzintensität. Nach 3 min Inkubation war keine weitere Intensitätserhöhung zu beobachten. Die Depolarisation des Neurons durch die Applikation der 50 mM K⁺-haltigen Lösung führte nun zu einer

schnellen Ausschüttung des Neurotrophins ohne jegliche transiente Fluoreszenzerhöhung. Deutlich ist die Abnahme der Fluoreszenzintensität um 27% nach K^+ -induzierter Depolarisation zu beobachten. Die Abnahme der Fluoreszenzintensität wird nach 10 s sichtbar.

Die Kinetik der Neurotrophin-Ausschüttung nach einer Entkoppelung des an der Vesikelmembran anliegenden Protonengradienten ergibt sich aus den gemittelten Daten (siehe Abb. 4.19A-D). Eine Fluoreszenzabnahme von 23-25 % war nach fünfminütiger Perfusion mit einer 50 mM K^+ -Lösung zu beobachten. Aus dem monoexponentiellen Abfall der Fluoreszenzintensität ergaben sich Zeitkonstanten für NGF, NT-4, NT-3 und BDNF von $76 \pm 29s$, $59 \pm 16s$, $81 \pm 22s$ bzw. $92 \pm 23s$ (siehe Abb. 4.19). Die Ausschüttungsgeschwindigkeit der Neurotrophine konnte durch die Monensin-Behandlung deutlich erhöht werden. Außerdem ist die Kinetik der Ausschüttung unter diesen Bedingungen für alle Neurotrophine ähnlich. Die Analyse der halb-maximalen Ausschüttungsgeschwindigkeit zeigte jedoch, dass die Ausschüttung der Neurotrophine trotz optimierter Sekretionsbedingung - Solubilisierung der aggregierten Neurotrophine in den sekretorischen Granula durch die intragranulären Neutralisierung des pH-Wertes langsamer von statten geht als die Ausschüttung der Neurotransmitter, die durch die Ausschüttung des Styryl-Farbstoffes FM4-64 gemessen wurde. Die Zeitpunkte der halb-maximalen Ausschüttung liegen bei Werten von $37 \pm 12s$ für NT-4, $39 \pm 13s$ für NGF, $39 \pm 13s$ für NT-3 und $52 \pm 14s$ für BDNF. Auch unter den optimierten Bedingungen zeigte das Neurotrophin NT-4 die schnellste Ausschüttungsgeschwindigkeit unter den 4 Neurotrophinen. Die Ausschüttung der Neurotrophine erfolgt allerdings immer noch fünf-mal langsamer als die Ausschüttung der Neurotransmitter.

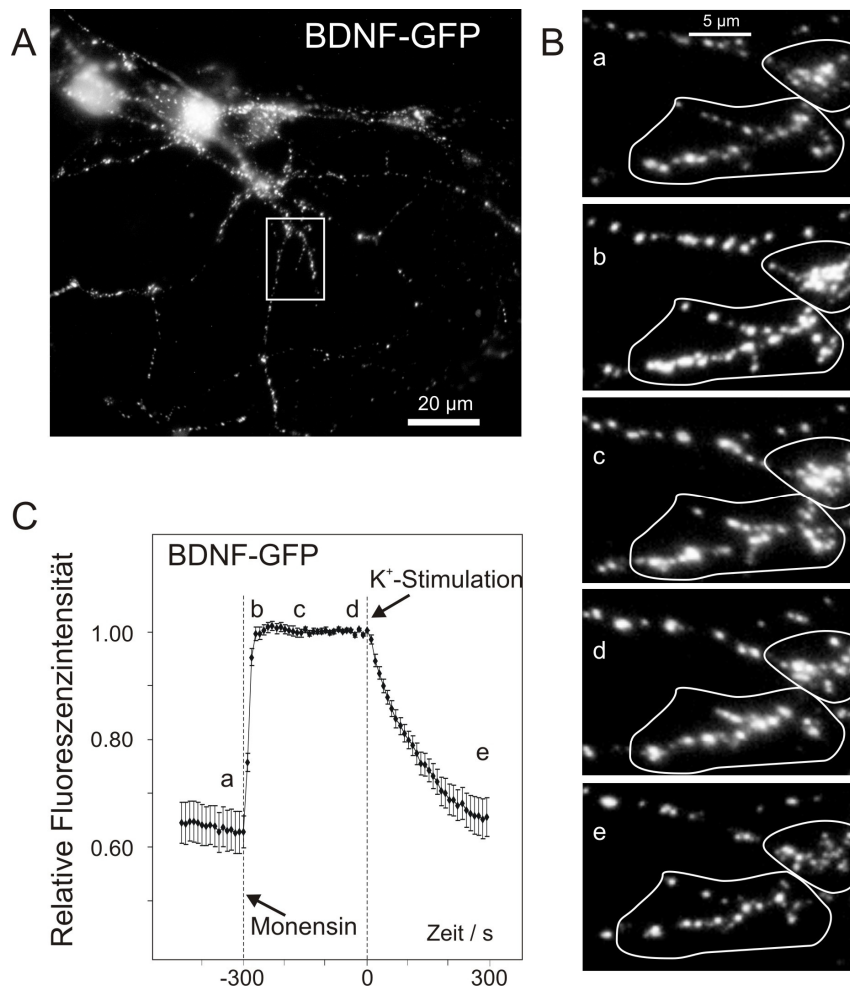


Abb. 4.18: Die aktivitätsabhängige Sekretion von Neurotrophinen nach Entkoppelung des an der Vesikelmembran anliegenden Protonengradienten. Dissoziierte Kulturen hippocampaler Neurone (8 DIV) wurden mit dem Expressionsplasmid des jeweiligen Neurotrophins transfiziert und 1-3 Tage nach der Transfektion hinsichtlich einer aktivitätsabhängigen Ausschüttung der Neurotrophine untersucht. Während der videomikroskopischen Analyse wurden die Zellen mit 4 μM Monensin, einem Natrium/Protonen-Austauscher, der ein Entkoppeln des an der Vesikelmembran anliegenden Protonengradienten induziert, umspült. **A:** Beispiel eines mit BDNF-GFP transfizierten Neurons. **B:** Ausschnittsvergrößerung von A zu verschiedenen Zeitpunkten der videomikroskopischen Untersuchung. Die Buchstaben geben die in C dargestellten Zeitpunkte an. **C:** Quantitative Analyse der in B ausgewählten Strukturen während der videomikroskopischen Untersuchung. Die erste gestrichelte Linie deutet die Perfusion der Neurone mit Monensin an. Deutlich ist eine Zunahme der intragranulären Fluoreszenzintensität zu erkennen. Monensin verursacht durch das Entkoppeln des Protonengradienten eine Neutralisation der sekretorischen Granula. Dadurch wird die Fluoreszenzintensität des pH-sensitiven GFP erhöht. Die zweite gestrichelte Linie gibt die Perfusion der Neurone mit der 50 mM K⁺-haltiger Lösung an. Die Abnahme der Fluoreszenzintensität nach der K⁺-induzierten Depolarisation der Neurone ist bereits 10 s nach Beginn der Depolarisation ersichtlich. Fehlerbalken repräsentieren Standardfehler. (modifiziert nach Brigadski *et al.*, 2005).

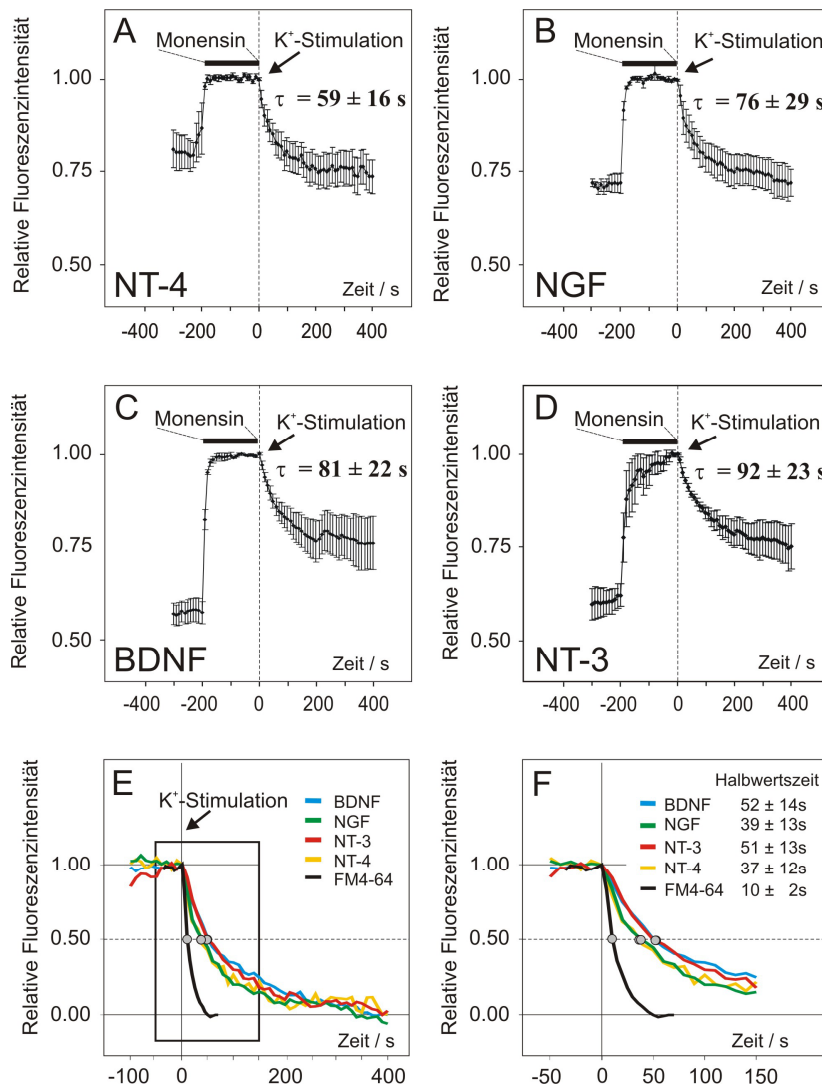


Abb. 4.19: Die Kinetik der aktivitätsabhängigen Sekretion von Neurotrophinen nach Entkoppelung des an der Vesikelmembran anliegenden Protonengradienten im Vergleich zur Kinetik der Neurotransmitter-Ausschüttung. **A-D:** Quantitative Analyse der Neurotrophin-Sekretion während der videomikroskopischen Untersuchung. Die gestrichelte Linie bzw. der Pfeil gibt den Start Perfusion der Neurone mit Monensin bzw. mit der 50 mM K⁺-haltigen Lösung an. Die Analyse zeigt deutlich die Monensin abhängige Zunahme der Fluoreszenz-Intensität und die Neurotrophin-Sekretion nach K⁺-induzierter Depolarisation der Neurone. Die Zeitkonstanten für den monoexponentiellen Abfall der GFP-Fluoreszenzintensität betragen 59 ± 16s für NT-4, 76 ± 29s für NGF, 81 ± 22s für NT -3 und 92 ± 23s für BDNF (n ≥ 4). **E:** Analyse der halb-maximalen Ausschüttung der Neurotrophine nach Monensin Behandlung im Vergleich zu FM4-64. **F:** Ausschnitt der quantitativen Analyse aus E. Die grauen Kreise geben die halb-maximale Ausschüttung des jeweiligen Vesikel-Inhaltes an. Trotz optimierter Sekretionsbedingung ist die Ausschüttung der Neurotrophine deutlich langsamer als die Ausschüttung der Neurotransmitter. Fehlerbalken repräsentieren Standardfehler. (modifiziert nach Brigadski *et al.*, 2005).

4.4 Die Funktion von BDNF bei Prozessen der aktivitätsabhängigen synaptischen Plastizität

Die Neurotrophine spielen eine wichtige Rolle bei synaptischen Plastizitätsprozessen. Eine aktivitätsabhängige synaptische Ausschüttung von BDNF-GFP nach hochfrequenter Reizung konnte bereits für dissoziierte hippocampale Neurone gezeigt werden. Die für die Induktion der BDNF-Sekretion angewendeten elektrischen Stimulationsmuster (Hartmann *et al.*, 2001, Gärtner *et al.*, 2002, Balkowiec *et al.*, 2000/02) sind identisch mit LTP-induzierenden Stimulationsprotokollen (Bliss *et al.*, 1993, Malenka *et al.*, 1999) und geben somit Hinweise auf eine mögliche Funktion von BDNF als retrogradem oder anterogradem Botenstoff bei synaptischen Plastizitätsvorgängen. In den folgenden Untersuchungen wird der Einfluss von BDNF auf die Potenzierung der Schaffer-Kollateralen in organotypischen Schnittkulturen des Hippokampus untersucht.

4.4.1 Die Expression von BDNF-GFP in CA1 Pyramidenzellen

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit konnte eine dominante vesikuläre Expression von BDNF in dissoziierten, hippocampalen Neuronen nachgewiesen werden. Dieses distale vesikuläre Expressionsmuster war verbunden mit einem Sortieren des Neurotrophins in den aktivitätsabhängigen Sekretionsweg und einer postsynaptischen Ausschüttung des Neurotrophins an glutamatergen Synapsen. Um zu prüfen, ob das Neurotrophin BDNF distale vesikuläre Strukturen in CA1 Pyramidenzellen erreicht, wurde das Expressionsmuster von BDNF-GFP in CA1 Pyramidenzellen organotypischer Schnittkulturen untersucht.

Organotypische Schnittkulturen des Hippokampus wurden entsprechend der Stoppini-Methode angelegt (Stoppini *et al.*, 1989). Nach 14 DIV wurde mit Hilfe der Einzelzell-Elektroporation das BDNF-GFP Plasmid in einzelne CA1 Pyramidenzellen transfiziert. Das Verteilungsmuster des Neurotrophins in den CA1 Pyramidenzellen wurde 2 Tage

nach der Transfektion analysiert. Abbildung 4.20A zeigt das Durchlichtbild eines organotypischen Schnittes des Hippokampus (16 DIV). Das Stimulationsprotokoll zur Transfektion der Neurone mit Hilfe der Einzelzell-Elektroporation ist in Abbildung 4.20B schematisch dargestellt. Deutlich waren BDNF-beinhaltende vesikuläre Strukturen in den proximalen und distalen Dendriten in CA1 Pyramidenzelle zu erkennen (siehe Abb. 4.20F).

CA1 Pyramidenzellen besitzen somit die Fähigkeit, das Neurotrophin BDNF effizient in distale vesikuläre Strukturen zu sortieren.

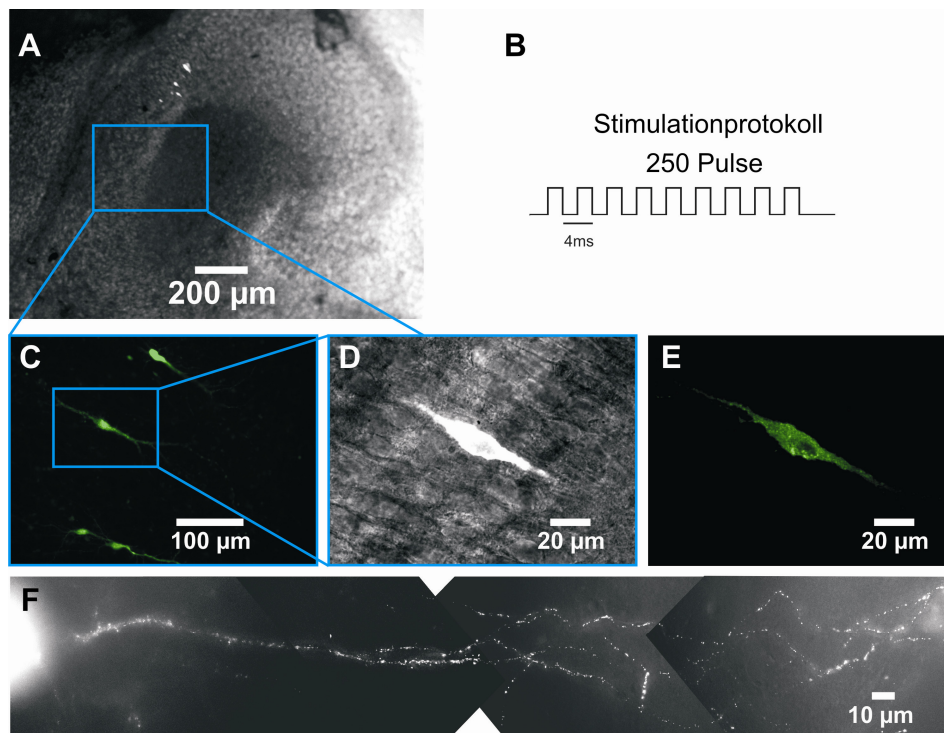


Abb. 4.20: Distale vesikuläre Expression von BDNF-GFP in CA1 Pyramidenzellen von organotypischen Schnittkulturen des Hippokampus. **A:** organotypischer Schnitt (14 DIV) wurde mit Hilfe der Einzelzell-Elektroporation mit dem BDNF-Plasmid transfiziert. Das Durchlichtbild eines organotypischen Schnittes und die GFP-Fluoreszenz (16DIV) wurden überlagert. **B:** Schematische Darstellung des Elektroporationsmusters. Das einzelne Neuron wurde mit 250 Pulsen mit einer Frequenz von 250 Hz stimuliert. **C:** Ausschnittsvergrößerung von A. Mit Hilfe einer Pipette wurden mehrere CA1 Pyramidenzellen transfiziert. **D:** Ausschnittsvergrößerung aus C. Durchlichtbild einer transfizierten CA1 Pyramidenzelle. **E:** GFP-Signal der transfizierten CA1 Pyramidenzelle aus D. **F:** Apikaler Dendrit der in E dargestellten CA1 Pyramidenzelle. Das distale vesikuläre Verteilungsmuster ist eindeutig zu erkennen.

4.4.2 Elektrophysiologische Charakterisierung von CA1 Pyramidenzellen des Hippokampus BDNF-defizienter Mäuse

Die Langzeitpotenzierung (LTP) ist eine Modellvorstellung für Lern- und Gedächtnisprozesse. Vor allem der Hippokampus steht aufgrund seiner zentralen Schaltfunktion bei der Speicherung von Umweltinformationen im Mittelpunkt vieler Untersuchungen. Bereits im Jahre 1973 konnte gezeigt werden, dass die Stimulation exzitatorischer Synapsen hippocampaler Neurone zu einer gesteigerten synaptischen Transmission führt (Bliss und Lomo, 1973). Weitere Studien in den 90er Jahren konnten den Einfluss von BDNF auf synaptische Plastizitätsprozesse in hippocampalen Strukturen darlegen (Bliss *et al.*, 1993, Malenka *et al.*, 1999).

Aufgrund der geringen Lebenserwartung BDNF-defizienter Mäuse wurden die folgenden Untersuchungen zur Funktion von BDNF bei synaptischen Plastizitätsprozessen an organotypischen Schnittkulturen des Hippokampus vorgenommen. Organotypische Schnittkulturen wurden von P2-P5 alten BDNF-defizienten Mäusen gemäß der Stoppini-Methode angelegt (Stoppini *et al.*, 1989) und die elektrophysiologischen Eigenschaften von CA1 Pyramidenzellen wurden nach 2 – 3 Wochen in Kultur untersucht.

4.4.2.1 Basale synaptische Transmission von CA1 Pyramidenzellen BDNF-defizienter Mäuse

Die Entwicklung von Neuronen ist gekennzeichnet durch eine Abfolge von Proteinexpressionsmustern, die zu einer spezifischen Zusammensetzung von Ionenkanälen auf der Zellmembran führt. Dieses entwicklungsabhängige spezifische Expressionsmuster von Proteinen bestimmt unter anderem die basale synaptische Transmission, das Entladungsmuster und die Erregbarkeit von Neuronen. Zur Charakterisierung des entwicklungsabhängigen Einflusses von BDNF auf die basale synaptische Transmission von CA1 Pyramidenzellen wurden *Patch-Clamp*-Ganzzelleableitungen in organotypischen Schnittkulturen durchgeführt. In der Strom-

bzw. Spannungsklemme wurden die passiven Membraneigenschaften, die Eigenschaften der Aktionspotentiale und die evozierten Antworten von CA1 Pyramidenzellen auf gepaarte präsynaptische Stimulationspulse BDNF-defizienter Mäuse untersucht.

Die Untersuchungen der elektrischen Eigenschaften von CA1 Pyramidenzellen BDNF-defizienter Mäuse (16-24 DIV) zeigten keinen signifikanten Unterschied zu den elektrischen Eigenschaften von CA1 Pyramidenzellen von Wildtyp Mäuse (16-24 DIV). Das gemittelte Eigenpotential der CA1 Pyramidenzellen betrug bei den BDNF^{-/-}-Mäusen $68,2 \pm 2,4$ mV ($n = 9$) und bei BDNF^{+/-}-Mäusen $64,8 \pm 2,4$ mV ($n = 8$). Diese Werte waren nicht signifikant verschieden von den Eigenpotentialen der CA1 Pyramidenzellen der BDNF^{+/+}-Kontrollgruppe. Diese zeigten ein gemitteltes Eigenpotential von $64,9 \pm 1,3$ mV (siehe Abb. 4.21B; $n = 24$). Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Eigenpotentiale der CA1 Pyramidenzellen sind vergleichbar mit den aus früheren Studien ermittelten Eigenpotentialen von CA1 Pyramidenzellen akuter und organotypischer Schnitte (Llano *et al.*, 1988; Kaczorowski *et al.*, 2006).

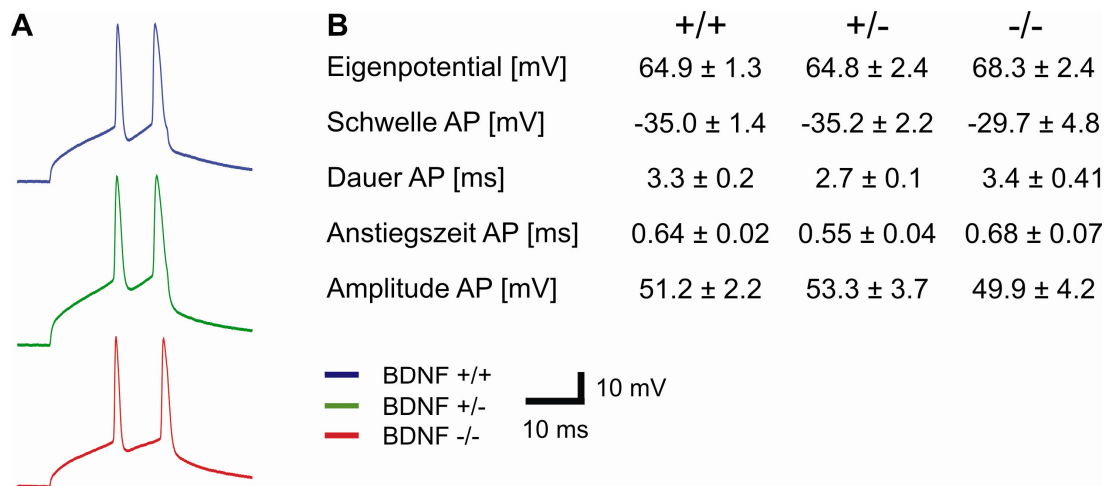


Abb. 4.21: Elektrische Eigenschaften von CA1 Pyramidenzellen BDNF-defizienter Mäuse (16 bis 24 DIV). **A:** Ausgewählte Spannungsspurten, die das charakteristische Bild der ausgelösten Aktionspotentiale widerspiegeln. **B:** Tabellarische Zusammenfassung der Membraneigenschaften und Charakteristika der Aktionspotentiale. Es wurden keine signifikanten Unterschiede für das Eigenpotential (BDNF^{-/-}: $n = 9$; BDNF^{+/-}: $n = 8$; BDNF^{+/+}: $n = 24$) und die Eigenschaften der Aktionspotentiale (BDNF^{-/-}: $n = 10$; BDNF^{+/-}: $n = 7$; BDNF^{+/+}: $n = 30$) nachgewiesen.

Aktionspotentiale konnten im *Current Clamp* Modus durch Depolarisationspulse ausgelöst werden. Die Schwelle zum Auslösen eines Aktionspotentials bei CA1 Pyramidenzelle war bei BDNF^{-/-} (n = 10), BDNF^{+/-} (n = 7) und BDNF^{+/+}-Mäusen (n = 30) ähnlich und zeigte keinen signifikanten Unterschied (siehe Abb.4.21A und B). Die Amplitude, die Anstiegszeit und die Dauer des Aktionspotentials der CA1 Pyramidenzellen BDNF-defizienter Mäuse waren ebenfalls vergleichbar mit den genannten Eigenschaften von Aktionspotentialen von CA1 Pyramidenzellen der Wildtyp Mäuse (siehe Abb.21).

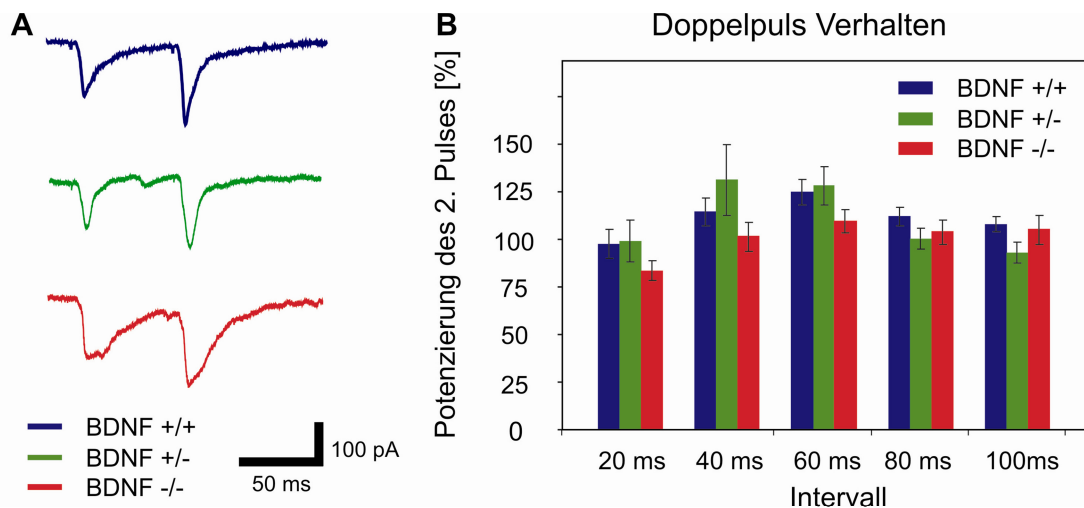


Abb. 4.22: Evozierte postsynaptische Antworten von CA1 Pyramidenzellen organotypischer Schnitte BDNF-defizienter Mäuse (16-24 DIV) auf gepaarte präsynaptische Stimulationspulse **A:** Ausgewählte Stromspuren, die die Potenzierung des zweiten Stimulationspulses nach einem Interpuls Intervall von 40ms wiedergeben. **B:** Quantitative Auswertung der Doppelpuls-Stimulation. Eine Erhöhung des evozierten postsynaptischen Potentials auf den zweiten präsynaptischen Stimulationspuls ist bei einem Interpuls Intervall von 40ms, 60ms, und 80 ms zu erkennen. Keine signifikanten Unterschiede sind zwischen den drei untersuchten Gruppen zu erkennen (BDNF^{-/-}: n = 9, BDNF^{+/-}: n = 8 und BDNF^{+/+}: n = 29). Fehlerbalken repräsentieren Standardfehler.

Die Untersuchung der Amplitude der evozierten postsynaptischen Antworten von CA1 Pyramidenzellen auf eine gepaarte präsynaptische Stimulationen der Schaffer-Kollateralen zeigte ebenfalls keinen Effekt der chronischen Abwesenheit von BDNF auf die Verarbeitung präsynaptischer Eingänge. Eine leichte Erhöhung der Amplitude der

evozierten postsynaptischen Antwort auf den zweiten präsynaptischen Stimulationspuls konnte bei einem Interpuls Intervall von 40ms, 60ms und 80ms bei BDNF^{-/-} (n = 9), BDNF^{+/-} (n = 8) und BDNF^{+/+}-Mäusen (n = 29) beobachtet werden (siehe Abb. 4.22). Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei untersuchten Gruppen.

Die Untersuchungen der elektrischen Eigenschaften von CA1 Pyramidenzellen in organotypischen Schnitten zeigten somit keinen signifikanten Einfluss von BDNF. Sowohl das Eigenpotential der CA1 Pyramidenzellen, die Form der Aktionspotentiale als auch die Antworten der CA1 Pyramidenzellen auf eine gepaarte präsynaptische Stimulation war bei BDNF^{-/-}, BDNF^{+/-} und BDNF^{+/+}-Mäusen ähnlich.

4.4.2.2 Untersuchungen der Langzeitpotenzierung von CA1 Pyramidenzellen BDNF-defizienter Mäuse

Die Untersuchung der elektrischen Eigenschaften von CA1 Pyramidenzellen zeigte keinen Einfluss von BDNF auf die Entwicklung der Neurone in organotypischen Schnittkulturen. Die Fähigkeit der Neurone, zeitlich korreliert auf Umweltinformationen zu reagieren, spiegelt ihre Plastizität wider. Ein Mechanismus, um schnell auf eingehende elektrische Signale zu reagieren, ist die Modulation der synaptischen Transmission in Form einer Potenzierung oder Depression. Zur Charakterisierung des Einflusses von BDNF auf die aktivitätsabhängige synaptische Plastizität von CA1 Pyramidenzellen wurden Ganzzelleableitungen in organotypischen Schnittkulturen durchgeführt. Die Schaffer-Kollaterale wurden stimuliert und die evozierten postsynaptischen Antworten der CA1 Pyramidenzellen wurden mit Hilfe von *Patch-Clamp*-Ganzzelleableitungen hinsichtlich einer aktivitätsabhängigen Potenzierung der synaptischen Antworten untersucht.

Während die Langzeitpotenzierung von CA1 Pyramidenzellen in akuten Schnittpräparaten der Maus eine bekannte und häufig verwendete Methode zur Untersuchung synaptischer Plastizitätsprozesse darstellt, gibt es wenige vergleichbare Untersuchungen an organotypischen Schnittpräparaten. Um eine BDNF-abhängige

Langzeitpotenzierung der CA1 Pyramidenzellen mit Hilfe von Ganzzelleableitungen untersuchen zu können, wurden zunächst gängige LTP induzierende Stimulationsprotokolle bezüglich ihrer Effektivität in organotypischen Schnitten getestet. Zwei Protokolle erwiesen sich als effektiv: Eine tetanische Stimulation gepaart mit einer postsynaptischen Depolarisation und eine sogenannte *Theta-Burst-Stimulation* ebenfalls gepaart mit einer postsynaptischen Depolarisation (siehe Abb. 4.20B). Beide Stimulationsprotokolle führten zu einer Potenzierung der evozierten synaptischen Antwort, wobei die Potenzierung während des untersuchten Zeitraumes von 30 min anhielt. Im Vergleich zur *Theta-Burst-Stimulation* (Potenzierung auf das

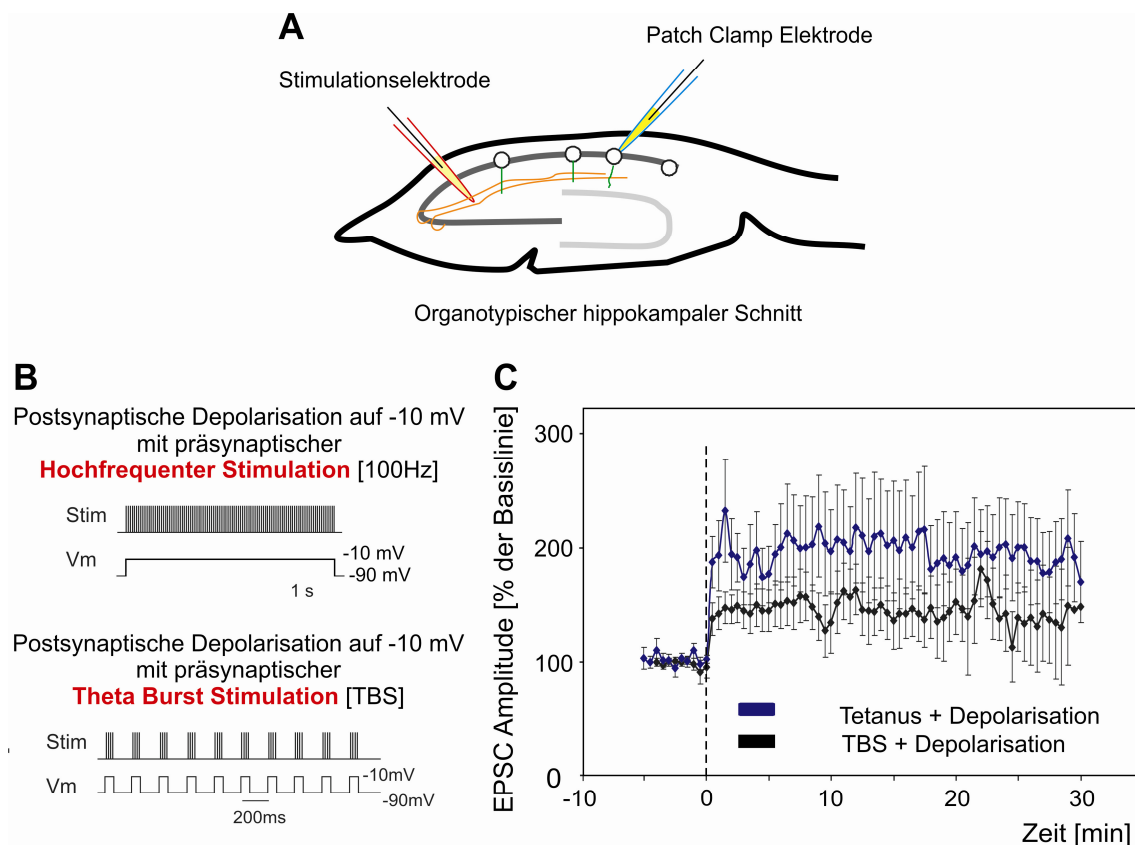


Abb. 4.23: Verschiedene Stimulationsprotokolle zur Induktion von LTP in organotypischen Schnittkulturen **A:** Schematische Abbildung eines Hippokampus. Die orangefarbenen Fasern stellen die Schaffer-Kollateralen dar - die Projektionen der CA3 Pyramidenzellen zu den CA1 Pyramidenzellen. **B:** Schematische Darstellung der verwendeten Stimulationsprotokolle. **C:** Quantitative Auswertung der evozierten postsynaptischen Ströme vor und nach der LTP Induktion. Die tetanische Stimulation gepaart mit der postsynaptischen Depolarisation zeigte eine deutlichere Induktion von LTP als die *Theta-Burst-Stimulation*. Fehlerbalken repräsentieren Standardfehler.

Ausgangsniveau nach 30min: 142 ± 46 %, n=15, n=8 Zellen zeigten LTP über > 110%) zeigte die tetanische Stimulation (190 ± 37 % des Ausgangsniveau, n=17. n=10 Zellen zeigten LTP über > 110%) jedoch eine tendenziell stärkere Potenzierung der postsynaptischen Antworten. Darüber hinaus konnte mit der tetanischen Stimulation zuverlässiger LTP induziert werden (siehe Abb. 4.23). Die Unterschiede beider Stimulationsprotokolle waren jedoch nicht signifikant.

Die tetanische Stimulation der Schaffer-Kollateralen gepaart mit der Depolarisation der abgeleiteten CA1 Pyramidenzelle konnte zuverlässig und lang anhaltend eine Potenzierung der evozierten postsynaptischen Ströme auslösen.

Des Weiteren wurde der Einfluss von BDNF auf die Potenzierung der Schaffer-Kollateralen in organotypischen Schnittkulturen des Hippokampus untersucht. *Patch-Clamp*-Ganzzelleableitungen von BDNF^{-/-}, BDNF^{+/-} und BDNF^{+/+}- CA1 Pyramidenzellen wurden durchgeführt. Die Schaffer-Kollateralen wurden tetanisch stimuliert. Die tetanische Stimulation der präsynaptischen Schaffer-Kollateralen wurde mit einer Depolarisation der abgeleiteten CA1 Pyramidenzelle gepaart und die evozierten postsynaptischen Antworten wurden hinsichtlich einer aktivitätsabhängigen Potenzierung der synaptischen Antworten untersucht. Zellen mit einem Eigenpotential von größer als -60 mV wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Des Weiteren wurden nur Zellen mit einem konstanten Serien- und Membranwiderstand (Änderung von ± 20 %) und Zellen mit einem Verhältnis von Membranwiderstand zu Serienwiderstand von größer 3 verwendet.

Während CA1 Pyramidenzellen von BDNF^{+/+}-Mäusen eine Langzeitpotenzierung der evozierten postsynaptischen Antwort zeigten, und diese Potenzierung über den untersuchten Zeitraum von 30 min anhielt, blieb eine vergleichbare lang anhaltende Potenzierung der Antworten von CA1 Pyramidenzellen BDNF-defizienter Mäusen aus (BDNF^{+/-}: 58 ± 14 % des Ausgangsniveaus, n=7, n=1 Zelle mit LTP >110%; BDNF^{-/-}: 64 ± 10 % des Ausgangsniveaus, n=6, n=0 Zelle mit LTP >110%; BDNF^{+/+}: 190 ± 37 % des Ausgangsniveaus, n=17, n=10 Zelle mit LTP >110%). Direkt nach der tetanischen Stimulation der Schaffer-Kollateralen war eine posttetanische Potenzierung der

evozierten postsynaptischen Ströme nachzuweisen. Die Potenzierung fiel jedoch innerhalb weniger Minuten auf das Niveau der Kontrollmessungen, bei denen nicht mit einem LTP induzierenden Protokoll stimuliert wurde, ab (siehe Abb.4.24).

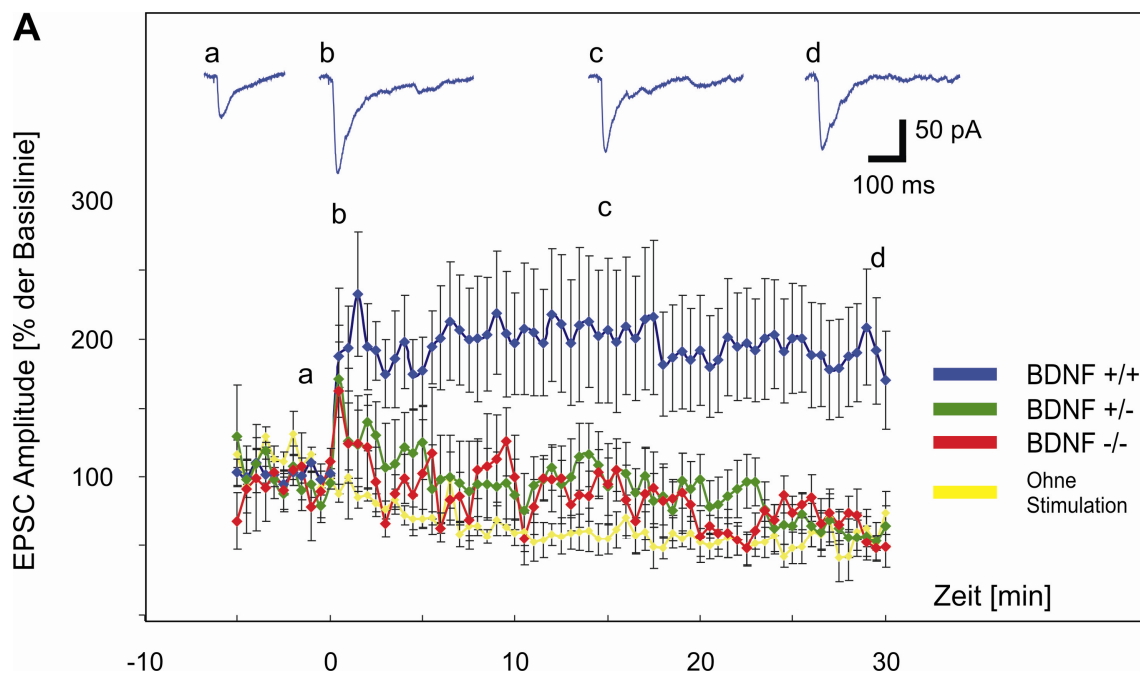


Abb. 4.24: Einfluss von BDNF auf die Langzeitpotenzierung organotypischer Schnittkulturen des Hippokampus (16-24 DIV). Quantitative Auswertung der evozierten postsynaptischen Ströme vor und nach der LTP Induktion. Die tetanische Stimulation gepaart mit der postsynaptischen Depolarisation zeigte eine deutliche Induktion von LTP bei den $BDNF^{+/+}$ -Mäusen, die während des untersuchten Zeitraums von 30 min anhielt. Das Stimulationsprotokoll induzierte bei den BDNF-defizienten Mäusen zunächst eine partielle Potenzierung, die jedoch bereits nach wenigen Minuten auf das Niveau der unstimulierten Kontrollen abfiel. (oben) Ausgewählte Stromspuren zu unterschiedlichen Zeitpunkten einer Ableitung (evozierte postsynaptischen Ströme einer Wildtyp-CA1 Pyramidenzelle). Fehlerbalken repräsentieren Standardfehler.

Die Untersuchungen der synaptischen Plastizität von CA1 Pyramidenzellen in organotypischen Schnitten zeigten somit einen Einfluss von BDNF auf die Induktion von LTP. Die tetanische Stimulation der CA1 Pyramidenzellen von $BDNF^{+/+}$ -Mäusen konnte lang anhaltend eine Potenzierung der evozierten postsynaptischen Ströme auslösen. Diese lang anhaltende Potenzierung der evozierten postsynaptischen Ströme blieb bei CA1 Pyramidenzellen von $BDNF^{+/-}$ - und $BDNF^{-/-}$ -Mäusen aus.

Kapitel 5

Diskussion

Für hippokampale Neurone konnten in der vorliegenden Arbeit zwei verschiedene Muster der intrazellulären Verteilung der Neurotrophine nachgewiesen werden: die distale vesikuläre Verteilung und die proximale Verteilung. Die distale vesikuläre Verteilung der Neurotrophine war charakterisiert durch eine dominante Anreicherung von Neurotrophinen in sekretorischen Granula des aktivitätsabhängigen Sekretionsweges, wohingegen die proximale Verteilung eine diffuse Verteilung im Endoplasmatischen Retikulum zeigte. Neurotrophine konnten nach beiden Verteilungsmustern sortiert werden. Die Wahrscheinlichkeit, nach welchem Muster das jeweilige Neurotrophin verteilt wurde, war von Neurotrophin zu Neurotrophin unterschiedlich. BDNF und NT-3 gelangten mit einer größeren Wahrscheinlichkeit über das Golgi Netzwerk in Vesikel des aktivitätsabhängigen Sekretionsweges, wohingegen NGF und NT4 eine dominante diffuse Verteilung im Endoplasmatischen Retikulum zeigten und konstitutiv ausgeschüttet wurden. Neurotrophine, die in sekretorischen Granula angereichert vorlagen, konnten an postsynaptischen Strukturen ausgeschüttet werden. Die Kinetik der Sekretion war im Vergleich zur Neurotransmitter-Sekretion langsam und hing von der Solubilisierung der Proteine in den sekretorischen Granula nach der Öffnung der Fusionspore ab.

Des Weiteren konnte dargelegt werden, dass das Neurotrophin BDNF in CA1 Pyramidenzellen organotypischer Schnittkulturen des Hippokampus effizient in distale vesikuläre Strukturen gelangte. Elektrophysiologische Charakterisierungen der CA1

Pyramidenzellen von BDNF-defizienten Mäusen zeigten, dass die entwicklungsabhängigen basalen elektrischen Eigenschaften der CA1 Pyramidenzellen BDNF-defizienter Mäuse keine signifikanten Unterschiede zu denen der Wildtyp-Mäuse zeigten. Die Untersuchungen der synaptischen Plastizität von CA1 Pyramidenzellen in organotypischen Schnitten zeigten dagegen die Bedeutung von BDNF bei synaptischen Plastizitätsprozessen. Eine verminderte Induktion von LTP war in den BDNF-defizienten Mäusen nach tetanischer Reizung zu beobachten.

5.1 Verteilungsmuster der Neurotrophine in hippokampalen Neuronen

Die subzelluläre Auflösung der Lokalisation und der Sekretion der Neurotrophine ist aufgrund der Komplexität der durch Neurotrophine vermittelten Mechanismen zur Signalweiterleitung von Notwendigkeit. Die Art der Sekretion und der Wirkungsort, an dem die Neurotrophine ausgeschüttet werden, definieren durch die nachgeschalteten, intrazellulären Signaltransduktionskaskaden die physiologische Aktivität des jeweiligen Neurotrophins (für eine Übersicht siehe Huang & Reichard, 2003). Die intrazelluläre Lokalisation der Neurotrophine wird kontrovers diskutiert. Aufgrund des niedrigen endogenen Expressionsniveaus wurde bislang eine Vielzahl von Studien an Zellen vorgenommen, die die Neurotrophine überexprimierten.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine dominante vesikuläre Anreicherung von BDNF-GFP in dendritischen und somatodendritischen Strukturen gezeigt werden (siehe Abb. 4.2A und Abb. 4.3A). Frühere Studien beobachteten ebenfalls diese somatodendritische und dendritische vesikuläre Lokalisation von BDNF in hippokampalen Neuronen (Goodman *et al.*, 1996; Haubensak *et al.*, 1998; Mowla *et al.*, 1999; Kohara *et al.*, 2001; Hartmann *et al.*, 2001). Darüber hinaus konnte eine Akkumulation von BDNF in Vesikeln des aktivitätsabhängigen Sekretionsweges mit Hilfe von immunzytochemischen Färbungen gegen Sekretogranin II, einem Marker für sekretorische Granula, nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.10E und F). Diese Daten

gehen ebenfalls konform mit früheren Studien, die eine Kollokalisierung von BDNF mit Markern sekretorischer Granula des aktivitätsabhängigen Sekretionsweges in primären Neuronen und sekundären Zelllinien zeigten (Goodman *et al.*, 1996; Haubensak *et al.*, 1998; Möller *et al.*, 1998; Mowla *et al.*, 1999; Hartmann *et al.*, 2001). Aus der vorliegenden Arbeit geht zusätzlich hervor, dass das Neurotrophin BDNF in wenigen Fällen in dendritischen Strukturen des Endoplasmatischen Retikulums verteilt vorlag. Wie in der Abbildung 4.15 gezeigt, war diese diffuse Verteilung mit einer konstitutiven Sekretion des Neurotrophins verbunden. Eine zellspezifische Verteilung des Neurotrophins BDNF in den konstitutiven Sekretionsweg konnte somit in wenigen Fällen beobachtet werden (siehe Abb. 4.4). Studien bezüglich des Prozessierens von BDNF konnten bereits darlegen, dass das Protein BDNF effizient von Endoproteasen des konstitutiven Sekretionsweges gespalten werden kann (Seidah *et al.*, 1996b; Mowla *et al.*, 1999; Farhadi *et al.*, 2000). Jedoch zeigten diese Studien bereits, dass proBDNF eine mutmaßlich geringere Sensitivität zu Endoproteasen des konstitutiven Sekretionsweges aufweist als proNGF (Mowla *et al.*, 1999). Endo- und Exoproteasen des aktivitätsabhängigen Sekretionsweges scheinen eine höhere Affinität für BDNF zu besitzen und für das Sortieren von BDNF in den aktivitätsabhängigen Sekretionsweg verantwortlich zu sein. Eine zell- bzw. entwicklungsabhängige Expression spezifischer Proteine könnte für das Sortieren der Neurotrophine in den bevorzugten Sekretionsweg maßgeblich sein.

In der vorliegenden Arbeit konnte die Existenz beider Sekretionswege für NGF dargelegt werden (siehe Abb. 4.4). Die dominante Anreicherung von NGF im Endoplasmatischen Retikulum führte zu einer konstitutiven Sekretion des Proteins. Eine vesikuläre Lokalisation und somit eine Verteilung des Proteins in den aktivitätsabhängigen Sekretionsweg konnte in 46% der untersuchten Neurone gezeigt werden. Diese Existenz beider Sekretionswege steht im Einklang mit den Arbeiten von Bloechl und Thoenen (Bloechl & Thoenen, 1996). Für NGF konnte in diesen Studien die Koexistenz der konstitutiven und aktivitätsabhängigen Sekretion in hippokampalen Neuronen gezeigt werden (Bloechl & Thoenen, 1996). Eine aktivitätsabhängige Sekretion von NGF konnte auch in anderen Studien gezeigt werden (Heymach *et al.*,

1996; Griesbeck *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2004). In diesen Untersuchungen wurde der NGF Gehalt des Überstandes von neuronalen Zellkulturen mit Hilfe von ELISA Messungen quantifiziert. Eine zellspezifische konstitutive Sekretion von NGF kann in diesen Untersuchungen nicht ausgeschlossen werden. Darüber hinaus zeigten weitere Studien eine vesikuläre Anreicherung von NGF in hippokampalen und embryonalen kortikalen Neuronen (Möller *et al.*, 1998; Griesbeck *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2004). Diese dominante vesikuläre Verteilung von NGF weicht von den beiden in der vorliegenden Arbeit beschriebenen nebeneinander existierenden Verteilungsmustern ab, und könnte auf eine zell- bzw. entwicklungsabhängige Verteilung des Neurotrophins zurückzuführen sein. Für NGF konnte ebenfalls eine Prozessierung durch Endoproteasen des regulierten Sekretionsweges gezeigt werden (Seidah *et al.*, 1996). Auf der anderen Seite konnten Studien von Murphy und Mitarbeitern ein dominantes Prozessieren von NGF durch Endoproteasen des konstitutiven Sekretionsweges und die konstitutive Sekretion von NGF in neuroendokrinen und hippokampalen Zellen zeigen (Mowla *et al.*, 1999, 2001; Farhadi *et al.*, 2000). Diese Studien sprechen für ein zell- bzw. entwicklungsabhängiges Prozessieren von NGF und bestätigen die in der vorliegenden Arbeit bevorzugte Verteilung von NGF in den konstitutiven Sekretionsweg. Der Ort des Prozessierens von Neurotrophinen, die konstitutiv ausgeschüttet werden, soll auf das Golgi Netzwerk beschränkt sein (für eine Übersicht siehe Canaff *et al.*, 1999). Eine dominante Anreicherung der Neurotrophine, die nach dem proximalen Verteilungsmuster sortiert und somit konstitutiv ausgeschüttet werden, in Endoplasmatischen Strukturen wurde jedoch beschrieben. Ob Neurotrophine bereits im ER an die transmembranständigen Endoproteasen binden oder ob es, wie im Falle von BDNF bereits beschrieben (Lou *et al.*, 2005), weitere Proteine gibt, die für die Verteilung der Neurotrophine verantwortlich sind, ist gegenwärtig noch nicht geklärt.

Für die Verteilung von NT-3 konnte genau wie für BDNF in der vorliegenden Arbeit eine dominante Anreicherung in Vesikeln des aktivitätsabhängigen Sekretionsweges in hippokampalen Neuronen nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.2A). In 86 % der Neurone ist eine distale vesikuläre Verteilung des Neurotrophins zu beobachten (siehe Abb. 4.4). Dieses steht im Einklang mit früheren Studien, in denen die

aktivitätsabhängige Sekretion von NT-3 aus neuroendokrinen Zellen und embryonalen neuronalen Zellen gezeigt wurde (Heymach *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 2004). Darüber hinaus wurden in weiteren Studien eine vesikuläre Verteilung von NT-3 und keine diffuse Verteilung beschrieben (Möller *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2004). Diese Studien stehen jedoch im Kontrast zu den Arbeiten von Murphy und Mitarbeitern, die für NT-3 ein dominantes Prozessieren durch Endoproteasen des konstitutiven Sekretionsweges zeigten und eine dominante konstitutive Sekretion in neuroendokrinen und hippokampalen Zellen nachweisen konnten (Farhadi *et al.*, 2000).

Die Studien für NT-4 sind dagegen eindeutiger. In der vorliegenden Arbeit konnte eine dominante Anreicherung im Endoplasmatischen Retikulum nachgewiesen werden, die einhergeht mit einer dominanten konstitutiven Ausschüttung dieses Neurotrophins. Eine konstitutive Sekretion von NT-4 ohne Akkumulation in vesikulären Strukturen konnte bereits von Hibbert *et al.* gezeigt werden (Hibbert *et al.*, 2003). Die Koexpression von NT-4 und BDNF erhöhte dort die Verteilung des Neurotrophins BDNF in Strukturen des konstitutiven Sekretionsweges. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit mit dem Fusionsprotein ppBDNF-NT-4-GFP weisen die Bedeutung der Präprodomäne bei der intrazellulären Verteilung von Neurotrophinen nach (siehe Abb. 4.7). Die Präprodomäne von BDNF zeigte sich in diesem Fusionsplasmid als hinreichend, um eine dominante Verteilung des Neurotrophins NT-4 in distale Vesikel zu erzielen. Somit befinden sich entscheidende Motive für eine dominante vesikuläre Expression in der Präprodomäne von BDNF. Vergleichbare Motive in der Präprodomäne von NT-4 sind entweder weniger effektiv für eine Verteilung des Neurotrophins in vesikuläre Strukturen oder fehlen ganz. Weitere regulatorische Motive für das Sortieren des Proteins befinden sich mutmaßlich in der Sequenz des muren Neurotrophins. Die Bedeutung der Präprodomäne von BDNF bezüglich des Sortieren des Neurotrophins wird auch durch die Studie von Egan *et al.* belegt (Egan *et al.*, 2003).

Wie aus den genannten Studien hervorgeht, werden die intrazelluläre Lokalisation und die Art der Sekretion der verschiedenen Neurotrophine jeweils kontrovers diskutiert. Auf der einen Seite zeigen Studien eine einheitliche aktivitätsabhängige Sekretion für

alle Neurotrophine (Heymach *et al.*, 1996; Griesbeck *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2004), auf der anderen Seite wird durch Murphy und Mitarbeiter eine dominante Prozessierung der Neurotrophine mit Ausnahme von BDNF durch Endoproteasen des konstitutiven Sekretionsweges gekoppelt mit einer konstitutiven Sekretion diskutiert (Mowla *et al.*, 1999, 2001; Farhadi *et al.*, 2000; Hibbert *et al.*, 2003). Diese Studien legen nahe, dass ein vom Zelltyp abhängiges spezifisches Proteinexpressionsmuster dem unterschiedlichen Sortieren von Neurotrophinen zugrunde liegt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass alle Neurotrophine in den aktivitätsabhängigen und in den konstitutiven Sekretionsweg hippocampaler Neurone gelangen können (siehe Abb. 4.4). Die Wahrscheinlichkeit, mit der Neurotrophine in den aktivitätsabhängigen Sekretionsweg gelangten, war jedoch unterschiedlich: BDNF und NT-3 gelangten mit einer größeren Effizienz über einen Transport durch das Golgi Netzwerk in sekretorische Vesikel des aktivitätsabhängigen Sekretionsweges (siehe Abb. 4.9 und 4.10), wohingegen NGF oder NT-4 eine dominante Anreicherung im Endoplasmatischen Retikulum zeigten (siehe Abb. 4.8) und über den konstitutiven Sekretionsweg ausgeschüttet wurden (siehe Abb. 4.15). Neben der zell- und entwicklungsabhängigen Expression spezifischer Proteinmuster sind Motive in der Präprodomäne und in der maturen Sequenz für die unterschiedliche Verteilung verantwortlich. Die zell- bzw. entwicklungsabhängige Expression der Neurotrophine wird durch die PC12 Daten bestätigt, in denen alle Neurotrophine mit gleichen Wahrscheinlichkeiten in einen der beiden Sekretionswege sortiert werden (siehe Abb. 4.14).

Neben den beiden Verteilungsmustern für den aktivitätsabhängigen bzw. konstitutiven Sekretionsweg konnte in der vorliegenden Arbeit eine synaptische Lokalisation aller Neurotrophine in hippocampalen Neuronen gezeigt werden (siehe Abb. 4.11-4.13). Alle Neurotrophine, die in die Vesikel des aktivitätsabhängigen sekretorischen Signalweges gelangten, zeigten eine Kolokalisation mit dem postsynaptischen Markerprotein glutamaterger Synapsen PSD95-dsRed (siehe Abb. 4.11). Eine räumlich benachbarte Anordnung von Neurotrophin-beihaltenden Vesikeln und Synapsin konnten mit Hilfe

immunzytochemischer Färbungen gezeigt werden (siehe Abb. 4.12). Färbungen mit dem Styrylfarbstoff FM4-64, mit dem synaptische Vesikel angefärbt werden, zeigten ebenfalls eine benachbarte Anordnung der Neurotrophin-beihaltenden Vesikel und aktiven präsynaptischen Terminalien (siehe Abb. 4.13). Eine solche postsynaptische Anordnung konnte bereits in früheren Studien für BDNF-GFP und endogenes BDNF gezeigt werden (Hartmann *et al.*, 2001; Swanwick *et al.*, 2004). Eine vergleichbare synaptische Lokalisation der anderen Neurotrophine ist bislang nicht untersucht worden. Alle Neurotrophine, die in den aktivitätsabhängigen Sekretionsweg gelangen, können somit an postsynaptischen Strukturen aktiver glutamaterger Synapsen lokalisiert sein.

5.2 Synaptische Sekretion der Neurotrophine

Eine synaptische Sekretion von BDNF konnte mit Hilfe von GFP-markiertem BDNF in früheren Studien bereits visualisiert werden (Hartmann *et al.*, 2001; Kojima *et al.*, 2001). BDNF-GFP, das an synaptischen Strukturen akkumuliert war, konnte durch eine K^+ -induzierte Depolarisation bzw. elektrische Stimulation ausgeschüttet werden (Hartmann *et al.*, 2001; Kojima *et al.*, 2001). Eine synaptische Sekretion der anderen Neurotrophine wurde bislang nicht untersucht. In der vorliegenden Arbeit konnte eine postsynaptische Ausschüttung für alle Neurotrophine nach K^+ -induzierter Depolarisation gezeigt werden.

Hippokampale Neurone wurden mit dem jeweiligen GFP-markierten Neurotrophin und einem synaptischen Markerprotein kotransfiziert. Mit Hilfe einer lokalen Perfusion wurden die Neurone mit einer Kontrolllösung bzw. mit einer 50 mM K^+ -haltigen Lösung umspült und die identifizierten synaptisch lokalisierten Neurotrophin-beinhaltenen vesikulären Strukturen hinsichtlich einer Depolarisations-induzierten Abnahme des GFP-Fluoreszenzsignals mit videomikroskopischen Analysemethoden untersucht. Eine Abnahme der Fluoreszenzintensität von 12-21% war nach 5 minütiger Stimulation mit einer 50 mM K^+ -haltigen Lösung zu beobachten (siehe Abb. 4.17). Der Abfall der Fluoreszenzintensität konnte mit einer monoexponentiellen Funktion beschrieben werden. Daraus ergaben sich Zeitkonstanten (τ) für den Abfall der Fluoreszenzintensität von 121 ± 29 s für NT-4, 198 ± 16 s für NGF, 214 ± 30 s für NT-3 und 309 ± 78 s für BDNF. Diese Werte sind somit vergleichbar mit der bereits beschriebenen Zeitkonstante der Sekretion von BDNF-GFP ($\tau = 250$ s) (Hartmann *et al.*, 2001). Frühere Studien zur Sekretion von Neurotrophinen konnten eine Ausschüttung von BDNF, NGF oder NT-3 innerhalb von wenigen Minuten zeigen (Goodman *et al.*, 1996; Heymach *et al.*, 1996; Griesbeck *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2004). In diesen Untersuchungen wurde der Neurotrophin-Gehalt des Überstandes der untersuchten Zellkulturen mit Hilfe von ELISA-Messungen analysiert. Eine zur vorliegenden Arbeit vergleichbare zeitliche und räumliche Auflösung konnten diese Studien nicht liefern.

Studien von Konnerth und Mitarbeitern forderten aufgrund der von ihnen beschriebenen desensitisierenden Effekte von BDNF auf die Öffnung von Na⁺-Kanälen eine schnelle Sekretion dieses Neurotrophins. Die Ausschüttung von BDNF sollte, vergleichbar mit der Ausschüttung von Neurotransmittern, im ms Bereich stattfinden (Kafitz *et al.*, 1999; Blum *et al.*, 2002; für eine Übersicht siehe Kovalchuk *et al.*, 2004). Diese Forderung steht im Kontrast zu den in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Daten, die eine detektierbare Ausschüttung der Neurotrophine erst 10-30 sec nach Beginn der Depolarisation der Neurone zeigten. Andererseits stehen die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten im Einklang mit der Ausschüttung anderer Neuropeptide, die ebenfalls langsame Ausschüttungsgeschwindigkeiten zeigten. Weitere Untersuchungen in dieser Arbeit mit dem Styrylfarbstoff FM4-64, mit dem die Kinetik der Ausschüttung der Neurotransmitter unter identischen Bedingungen gemessen werden konnte (Cochilla *et al.*, 1999), zeigten eine Abnahme der FM4-64-Fluoreszenzintensität bereits nach weniger als 5sec Depolarisation. Eine Abnahme der Fluoreszenzintensität um 40 % war bereits nach 50 sec Depolarisation zu beobachten. Die Zeitkonstante betrug 13 sec ± 2 s (siehe Abb. 4.17). Gemessen an der Größenordnung der ermittelten Zeitkonstanten erfolgte die Sekretion der Neurotrophine zehnmal langsamer als die Ausschüttung der Neurotransmitter. Die Kinetik der Ausschüttung der Neurotrophine steht somit im Einklang mit der Ausschüttung anderer Neuropeptide und erreichte keine Geschwindigkeit, wie man sie für einen schnellen Transmitter erwarten müsste.

Die Geschwindigkeit der Neurotrophin-Sekretion zeigte eine deutliche Heterogenität. Obwohl alle Neurotrophine langsam im Vergleich zur Neurotransmitter-Freisetzung ausgeschüttet wurden, zeigte NT-4 eine signifikant schnellere Ausschüttungsgeschwindigkeit als BDNF oder NT-3 (siehe Abb. 4.17). Der Sekretion von BDNF-GFP und NT-3-GFP ging in vielen Fällen eine transiente Zunahme der Fluoreszenzintensität voraus, die auf die pH-Sensitivität der GFP-Fluoreszenzintensität zurückzuführen ist. GFP zeigt bei physiologischem pH-Wert eine stärkere Fluoreszenz als unter azideren Bedingungen. Sekretorische Granula weisen einen pH-Wert von 5.5 auf. Ihre Ausschüttung ist mit einem Alkalisierungsprozess verbunden (Burke *et al.*, 1997, Han

et al., 1999). Demzufolge ist die anfängliche Fluoreszenzzunahme mit der Alkalisierung der sekretorischen Granula zu erklären (Burke *et al.*, 1997, Han *et al.*, 1999). Es konnte in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden, ob die Fluoreszenzzunahme, wie nach Burke *et al.*, von der Öffnung der Fusionspore und dem anschließenden Protonenaustausch herrührte, oder ob ein aktivitätsabhängiger Ca^{2+} -Influx in die Synapse für einen intrazellulären Alkalisierungsprozess der sekretorischen Granula verantwortlich war (Han *et al.*, 1999). Der durch mutmaßliche Ca^{2+} -abhängige Protonenpumpen induzierte intrazelluläre Alkalisierungsprozess soll nach Han *et al.* dem eigentlichen Fusionsprozess vorausgehen (Han *et al.*, 1999). Nach beiden Modellen ist die Neutralisierung der sekretorischen Granula Voraussetzung für die Vesikelentleerung, der eine Solubilisierung der Peptide in den Vesikeln vorangehen muss. Im Gegensatz zur Ausschüttung der synaptischen Vesikel bedingt dieser Prozess eine Verzögerung zwischen Stimulus und Entleerung der sekretorischen Granula. Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigten durch die transiente Fluoreszenzintensitätserhöhung ebenfalls eine Alkalisierung der Vesikel. Es konnte jedoch nicht zwischen einer intrazellulären Alkalisierung und einer Alkalisierung infolge eines Protonenaustausches nach Öffnung der Fusionspore unterschieden werden. Die unterschiedlichen Ausschüttungsgeschwindigkeiten der verschiedenen Neurotrophine könnten mit einer ungleichen Packungsdichte der einzelnen Neurotrophine in ihren jeweiligen Vesikeln bzw. mit einer unterschiedlich schnellen Solubilisierung der Neurotrophine aus diesen Peptid-Aggregaten zusammenhängen. Die Untersuchungen mit Monensin, einem Natrium/Protonen-Ionophor, der die Entkoppelung des an der Vesikelmembran anliegenden Protonengradienten verursacht (Han *et al.*, 1999), unterstützen diese These. Die Applikation von Monensin zeigte zunächst einen Anstieg der intragranulären GFP-Fluoreszenzintensität, wobei die Größe des Fluoreszenzanstiegs negativ mit der Ausschüttungsgeschwindigkeit der Neurotrophine korrelierte ($\Delta\text{Intensität}_{\text{Fluoreszenz}}$: NT-4 < NGF < NT-3 < BDNF, $\tau_{\text{Neurotrophine}}$: NT-4 > NGF > NT-3 > BDNF) (siehe Abb. 4.17 und 4.19). Eine größere Packungsdichte für BDNF-GFP und NT-3-GFP in sekretorischen Vesikeln könnte für den stärkeren Fluoreszenzanstieg verantwortlich sein. Die anschließende Depolarisation

der Neurone durch Kalium führte in diesen Monensin-Experimenten zu einer schnellen Ausschüttung des jeweiligen Neurotrophins ohne jegliche transiente Fluoreszenzerhöhung zu Beginn der K^+ -induzierten Depolarisation. Dieses Ausbleiben der transienten Fluoreszenzintensitätserhöhung deutet indirekt ebenfalls auf eine Neutralisation der sekretorischen Granula zu Beginn des Ausschüttungsprozesses oder des Reifungsprozesses der sekretorischen Granula hin und lässt auf die Anwesenheit unterschiedlicher Zustände der fusionskompetenten Vesikel schließen. Die Kinetik der Neurotrophin-Ausschüttung während der Monensin-Applikation erfolgte mit einer Zeitkonstante von $76 \pm 29s$ für NGF, von $59 \pm 16s$ für NT-4, von $81 \pm 22s$ für NT-3 bzw. von $92 \pm 23s$ für BDNF. Die Ausschüttungsgeschwindigkeit der Neurotrophine konnte durch die Monensin-Behandlung signifikant erhöht werden. Die Kinetik der Ausschüttung ist unter diesen Bedingungen für alle Neurotrophine ähnlich. Der Zeitpunkt der halb-maximalen-Ausschüttung zeigte jedoch, dass die Ausschüttung der Neurotrophine trotz optimierter Sekretionsbedingung durch die Solubilisierung der kristallinen Strukturen infolge der intragranulären Neutralisierung fünfmal langsamer von statten ging als die Ausschüttung der Neurotransmitter, die mit Hilfe der FM4-64 Ausschüttung gemessen werden konnte.

5.3 Die Rolle von BDNF für die Regulation synaptischer Plastizität

Die Neurotrophine spielen eine wichtige Rolle für die Regulation aktivitätsabhängiger synaptischer Plastizität im Gehirn von Säugetieren. Patterson *et al.* konnten bereits 1992 eine aktivitätsabhängige Zunahme des BDNF mRNA Gehaltes nach tetanischer Reizung von hippokampalen CA1 Pyramidenzellen zeigen. Untersuchungen zur aktivitätsabhängigen Ausschüttung von BDNF-GFP nach hochfrequenter Reizung gaben Hinweise auf eine mögliche Funktion von BDNF als retrogradem oder anterogradem Botenstoff während synaptischer Plastizitätsvorgänge. Die für die Induktion der BDNF-Sekretion angewendeten elektrischen Stimulationsmuster (Hartmann *et al.*, 2001; Gärtner *et al.*, 2002; Balkowiec *et al.*, 2000/02) waren dabei identisch mit den LTP-induzierenden Stimulationsprotokollen (Bliss *et al.*, 1993; Malenka *et al.*, 1999) und deuten auf eine prä- oder postsynaptische Ausschüttung von BDNF während synaptischer Plastizitätsprozesse hin. Die vorwiegend präsynaptische Wirkung von BDNF auf die synaptische Transmission (Lohof *et al.*, 1993; Leßmann *et al.*, 1994; Kang *et al.*, 1995), gekoppelt mit der dominanten postsynaptischen Lokalisation dieses Neurotrophins (Haubensak *et al.*, 1998; Hartmann *et al.*, 2001; Kojima *et al.*; 2001; Swanwick *et al.*, 2004) lassen eine Funktion von BDNF als retrogradem Botenstoff vermuten.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Auswirkung des chronischen Fehlens von BDNF in BDNF-defizienten Mäusen auf die physiologischen Eigenschaften von CA1 Pyramidenzellen an organotypischen Schnittkulturen untersucht. BDNF^{-/-}-Mäuse haben eine geringe Lebenserwartung und sterben abgesehen von wenigen Ausnahmen bereits kurz nach der Geburt. Untersuchungen zur Induktion von LTP können jedoch erst nach Beginn der Synaptogenese zwei Wochen nach der Geburt vorgenommen werden. Wenige BDNF^{-/-} Mäuse scheinen jedoch den Mangel an BDNF kompensieren zu können und zeigen eine längere Lebenserwartung. Um Untersuchungen an Mäusen, die einen Selektionsvorteil aufgrund kompensatorischer Effekte zeigen, zu vermeiden,

wurden die in der Arbeit durchgeführten Messungen an organotypischen Schnittkulturen vorgenommen. Organotypische Schnitte des Hippokampus von P2-P5 alten Mäusen wurden nach der Stoppini-Methode angelegt (Stoppini *et al.*, 1989), und die elektrophysiologischen Messungen nach 16-24 Tagen in Kultur durchgeführt.

Bereits in mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass die anatomischen und physiologischen Eigenschaften von Neuronen in organotypischen Schnittpräparaten vergleichbar mit den Eigenschaften von akuten Schnitten sind (Muller *et al.*, 1992; De Simoni *et al.*, 2003). Untersuchungen an CA1 Pyramidenzellen zeigten eine ähnliche Entwicklung bezüglich des Wachstums der apikalen Dendriten, der Dichte und Morphologie von *Spines* und der synaptischen Aktivität. Unterschiede zeigten sich jedoch in der Frequenz der Miniaturströme. Mit der Entwicklung des Hippokampus nimmt die Frequenz der Miniaturströme in organotypischen und in akuten Schnitten zwar vergleichbar zu, jedoch ist die absolute Frequenz der Miniaturströme bei organotypischen Schnittpräparaten größer (De Simoni *et al.*, 2003). Verantwortlich dafür könnten sowohl die Neubildung von funktionellen Verknüpfungen in den organotypischen Schnitten sein, als auch der starke Verlust von funktionellen Verknüpfungen nach akuter Präparation. Zusammenfassend konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass organotypische Schnittpräparate für die Untersuchung synaptischer Prozesse, ein gutes Modellsystem darstellen.

Die aktivitätsabhängige Ausschüttung von BDNF während synaptischer Plastizitätsprozesse bedarf einer Sortierung von BDNF in Vesikeln des aktivitätsabhängigen Sekretionsweges. Um gezielt das Verteilungsmuster von BDNF in CA1 Pyramidenzellen studieren zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der Einzelzell-Elektroporation CA1 Pyramidenzellen mit dem BDNF-GFP Plasmid transfiziert. Diese Experimente zeigen, dass CA1 Pyramidenzellen das Protein BDNF effizient in distale Vesikel sortieren (siehe Abb. 4.20). In der vorliegenden Arbeit konnte bereits für dissoziierte Kulturen des Hippokampus gezeigt werden, dass alle Neurotrophine, die in distale vesikuläre Strukturen verteilt werden, eine postsynaptische Lokalisation des Neurotrophins in Vesikeln des aktivitätsabhängigen Sekretionsweges zeigten (siehe Abb. 4.11). Diese Neurotrophin-beihaltenden Vesikel können

aktivitätsabhängig an postsynaptischen Strukturen glutamaterger Synapsen ausgeschüttet werden (siehe Abb. 4.17). Die distale vesikuläre Verteilung von BDNF in CA1 Pyramidenzellen organotypischer Schnitte des Hippokampus deutet auf eine ähnliche Verteilung wie in dissoziierten hippocampalen Neuronen hin. Weitere Untersuchungen bezüglich der Lokalisation und der Ausschüttungen von BDNF aus CA1 Pyramidenzellen sind jedoch von Notwendigkeit.

Die elektrophysiologische Charakterisierungen der CA1 Pyramidenzellen von BDNF-defizienten Mäusen belegen, dass die entwicklungsabhängigen basalen Eigenschaften der CA1 Pyramidenzellen BDNF-defizienter Mäuse keine signifikanten Unterschiede zu den Eigenschaften von CA1 Pyramidenzellen der Wildtyp-Mäuse zeigten. Intrazelluläre Ableitungen der postsynaptischen Ströme zeigten, dass die gepaarte präsynaptische Stimulation der Schaffer-Kollateralen zu einer geringen Potenzierung des zweiten evozierten Stroms führte. Diese Potenzierung war in allen drei untersuchten Gruppen BDNF^{+/+}-, BDNF^{+/-}- und BDNF^{-/-}-Mäusen vergleichbar. Ähnliche Resultate erzielte Korte *et al.* mit Feldpotential-Messungen im Bereich der apikalen Dendriten der CA1 Pyramidenzellen akuter hippocampaler Schnitte von BDNF-defizienten Mäusen (Korte *et al.*, 1995). Diese beiden Untersuchungen stehen jedoch im Kontrast zu den Untersuchungen von Patterson *et al.*, in denen gezeigt wurde, dass die gepaarte präsynaptische Stimulation der Schaffer-Kollateralen in akuten Schnitten BDNF-defizienter Mäuse verringert war und durch eine mehrstündige Applikation von exogenem BDNF nicht auf das Niveau der Wildtyp-Mäuse gebracht werden konnte. In diesen Untersuchungen wurde auf einen entwicklungsabhängigen Einfluss von BDNF auf die basale synaptische Transmission geschlossen, der nicht akut reversibel war. Der unterschiedliche genetische Hintergrund beider BDNF-defizienter Mauslinien könnte für die in dieser Hinsicht unterschiedlichen Resultate verantwortlich sein.

Die Analyse der Aktionspotentiale der CA1 Pyramidenzellen zeigte in der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Unterschiede in den drei untersuchten Gruppen. Sowohl die Schwelle zum Auslösen eines Aktionspotentials, als auch die Anstiegsgeschwindigkeit, die Dauer und die Amplitude des Aktionspotentials zeigten keine Unterschiede zwischen den drei experimentellen Gruppen. Die Eigenpotentiale

der CA1 Pyramidenzellen waren ebenfalls vergleichbar. Ein entwicklungsabhängiger Einfluss von BDNF auf die Erregbarkeit der Neurone und die Muster der Informationsweiterleitung sind daher auszuschließen. Vergleichende Studien anderer Arbeitsgruppen mit den beiden existierenden BDNF-defizienten Mauslinien existieren leider nicht. Eine Aussage, ob BDNF Einfluss auf die Erregbarkeit von Neurone abhängig vom genetischen Hintergrund hat, kann leider nicht getroffen werden. Ein ähnliches Membranpotential und ähnliche Eigenschaften der Aktionspotentiale sprechen für ähnliche Mechanismen bei der Informationsweiterleitung von CA1 Pyramidenzellen.

Die Untersuchungen zur synaptischen Plastizität von CA1 Pyramidenzellen in organotypischen Schnitten zeigten dagegen einen Einfluss von BDNF auf die Induktion von LTP. Eine verminderte Induktion von LTP war in den BDNF-defizienten Mäusen zu beobachten. Intrazelluläre Ableitungen der evozierten postsynaptischen Ströme nach Stimulation der Schaffer-Kollateralen zeigten eine lang anhaltende Potenzierung der postsynaptischen Antworten nach tetanischer Stimulation der Schaffer-Kollateralen und postsynaptischer Depolarisation der CA1 Pyramidenzellen in organotypischen Schnitten von BDNF^{+/+} Mäusen. Diese Potenzierung blieb bei den BDNF-defizienten Mäusen aus. Eine vergleichbare Einschränkung der Schaffer-Kollateralen LTP zeigte sich bei BDNF^{+/-}- und BDNF^{-/-}-Mäusen und deutet auf eine kritische Menge von BDNF bei der Induktion von LTP hin. Der BDNF-Gehalt in BDNF^{+/-}-Mäusen mit ungefähr 60 % des BDNF-Gehaltes von Wildtyp-Mäusen war nicht ausreichend für die Induktion von LTP (Abidin *et al.*, 2006). Diese Studien sind im Einklang mit den Resultaten aus früheren Studien (Korte *et al.*, 1995, 1996; Patterson *et al.*, 1996). Eine verminderte LTP nach tetanischer Reizung der CA1 Pyramidenzellen konnte gezeigt werden. Diese verminderte LTP konnte durch die exogene Applikation von BDNF (Patterson *et al.*, 1996) oder eine adenovirale Transfektion der CA1 Pyramidenzellen mit BDNF (Korte *et al.*, 1996) aufgehoben werden. Diese Daten deuten somit auf eine postsynaptische Quelle von BDNF nach Induktion von LTP hin (Korte *et al.*, 1996). Untersuchungen von Zakharenko *et al.* legten nahe, dass BDNF einen präsynaptischen Effekt auf die

LTP hat und dass die Quelle für diese präsynaptischen Effekte präsynaptisch ausgeschüttetes BDNF ist (doch siehe Gärtner *et al.*, 2006). Eine postsynaptische Ausschüttung von BDNF wird in diesen Studien ausgeschlossen und steht somit im Kontrast zu den Untersuchungen von Korte *et al.*. Weitere Studien sind von Notwendigkeit, um diesen Konflikt aufzuklären. Da sowohl eine prä- als auch eine postsynaptische Ausschüttung von BDNF und prä- und postsynaptische Wirkung von BDNF auf die synaptische Transmission gezeigt wurde, können beide Mechanismen für die synaptischen Plastizitätsprozesse verantwortlich sein. Es bedarf einer umfangreichen Studie um diese Diskrepanzen zu klären.

Kapitel 6

Zusammenfassung

Die Mitglieder der Neurotrophin-Familie (NGF, BDNF, NT-3 und NT-4) sind sekretierte Neuropeptide, die eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung von Nervenzellen und bei der Modulation der synaptischen Transmission spielen. Wenngleich eine aktivitätsabhängige Sekretion von BDNF bereits gezeigt werden konnte, wurden die subzelluläre Expression und die Ausschüttung der anderen Neurotrophine bislang nur unzureichend charakterisiert.

Um die Expression und die Ausschüttung aller Neurotrophine unter identischen Bedingungen untersuchen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit das Expressionsmuster und die synaptische Ausschüttung GFP-markierter Neurotrophine in dissoziierten hippocampalen Neuronen mit Hilfe der konfokalen Fluoreszenz-Videomikroskopie zeitaufgelöst untersucht.

Zwei Phänotypen konnten unterschieden werden: der distale vesikuläre Expressionstyp mit Neurotrophin-beihaltenden Vesikeln in distalen Neuriten, und der proximale Expressionstyp mit einer diffusen Neurotrophin-Verteilung in den Neuriten und Neurotrophin-beihaltenden Vesikeln im Soma des Neurons und in den proximalen Dendriten. Der distale vesikuläre Phänotyp entsprach einer Verteilung des entsprechenden Neurotrophins in die sekretorischen Granula des aktivitätsabhängigen Sekretionsweges, während der proximale Phänotyp den Transport eines Neurotrophins in den konstitutiven Sekretionsweg widerspiegelte.

Alle Neurotrophine erreichten in hippocampalen Neuronen prinzipiell beide Sekretionswege. Jedoch gelangten BDNF und NT-3 mit einer größeren Effizienz in den regulierten Sekretionsweg als NT-4 und NGF (BDNF: in 98% aller Zellen, NT-3: 85%, NT-4: 23% und NGF: 46%). Neurotrophine besitzen, wie es für sekretorische Peptide üblich ist, eine Vorläufersequenz, die während der Reifung des Proteins proteolytisch abgespalten wird. Die Fusion dieser Präpro-Sequenz von BDNF mit der Sequenz des murenen NT-4 bewirkte einen effizienteren Transport von NT-4 in die sekretorischen Granula des regulierten Sekretionsweges, und zeigte die große Bedeutung der Präpro-Sequenz für das zelluläre Verteilungsmuster von Neurotrophinen.

In Neuronen, in denen die Neurotrophine in den regulierten Sekretionsweg transportiert wurden, konnte eine aktivitätsabhängige Sekretion der Neurotrophine an postsynaptische Strukturen glutamaterger Synapsen beobachtet werden. Die aktivitätsabhängige postsynaptische Ausschüttung der Neurotrophine zeigte eine Heterogenität in der Kinetik der Sekretion (exponentieller Abfall des Neurotrophin-Signals mit Zeitkonstanten von $\tau = 121$ bis $307s$). Die Präinkubtion mit dem Protonen-Ionophor Monensin, welcher die Neutralisation des intragranulären pH-Wertes und somit die Solubilisierung der dicht gepackten Proteinstrukturen in den Vesikeln erzwingt, erhöhte die Geschwindigkeit der Neurotrophin-Ausschüttung auf den Wert des unter physiologischen Bedingungen schnellsten Neurotrophins NT-4. Dennoch blieb die Geschwindigkeit der Neurotrophin-Ausschüttung im Vergleich zur Neurotransmitter-Ausschüttung langsam ($\tau: 13 \pm 2 s$). Diese Daten belegen eindeutig, dass die Neutralisation der sekretorischen Granula die Geschwindigkeit der Neurotrophin-Ausschüttung kritisch determiniert und die Geschwindigkeit der Neurotrophin-Ausschüttung im Vergleich zur konventionellen Neurotransmitter-Ausschüttung langsam erfolgt.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das Neurotrophin BDNF effizient in distale vesikuläre Strukturen von CA1 Pyramidenzellen organotypischer Schnittkulturen des Hippokampus sortiert wird. Die basalen elektrischen Eigenschaften von CA1 Pyramidenzellen BDNF-defizienter Mäuse sind vergleichbar zu den Eigenschaften von Wildtyp Mäusen. Sowohl das Eigenpotential der CA1 Pyramidenzellen, die Form der

Aktionspotentiale als auch die evozierten Antworten der CA1 Pyramidenzellen auf eine gepaarte präsynaptische Stimulation der Schaffer-Kollateralen zeigten bei $BDNF^{-/-}$, $BDNF^{+/-}$ und $BDNF^{+/+}$ -Mäusen keine signifikanten Unterschiede. Die Fähigkeit der CA1 Pyramidenzellen auf eine hochfrequente Reizung mit einer Langzeitpotenzierung (LTP) der postsynaptischen Ströme zu reagieren ist jedoch bei den BDNF-defizienten Mäusen beeinträchtigt. Eine verminderte Induktion von LTP war in den BDNF-defizienten Mäusen nach tetanischer Stimulation der präsynaptischen Schaffer-Kollateralen und simultaner postsynaptischer Depolarisation der CA1 Pyramidenzelle zu beobachten.

Kapitel 7

Literatur

Abidin,I., Kohler,T., Weiler,E., Zoidl,G., Eysel,U.T., Lessmann,V., and Mittmann,T. (2006). Reduced presynaptic efficiency of excitatory synaptic transmission impairs LTP in the visual cortex of BDNF-heterozygous mice. *Eur. J. Neurosci.* *24*, 3519-3531.

Aicardi,G., Argilli,E., Cappello,S., Santi,S., Riccio,M., Thoenen,H., and Canossa,M. (2004). Induction of long-term potentiation and depression is reflected by corresponding changes in secretion of endogenous brain-derived neurotrophic factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 15788-15792.

Akaneya,Y., Tsumoto,T., and Hatanaka,H. (1996). Brain-derived neurotrophic factor blocks long-term depression in rat visual cortex. *Journal of Neurophysiology* *76*, 4198-4201.

Akaneya,Y., Tsumoto,T., Kinoshita,S., and Hatanaka,H. (1997). Brain-derived neurotrophic factor enhances long-term potentiation in rat visual cortex. *Journal of Neuroscience* *17*, 6707-6716.

Balkowiec,A., Kunze,D.L., and Katz,D.M. (2000). Brain-derived neurotrophic factor acutely inhibits AMPA-mediated currents in developing sensory relay neurons. *Journal of Neuroscience* *20*, 1904-1911.

Balkowiec,A. and Katz,D.M. (2002). Cellular mechanisms regulating activity-dependent release of native brain-derived neurotrophic factor from hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience* *22*, 10399-10407.

Barbacid,M. (1995). Neurotrophic Factors and Their Receptors. *Current Opinion in Cell Biology* *7*, 148-155.

Barco,A., Patterson,S., Alarcon,J.M., Gromova,P., Mata-Roig,M., Morozov,A., and Kandell,E.R. (2005). Gene expression profiling of facilitated L-LTP in VP16-CREB mice reveals that BDNF is critical for the maintenance of UP and its synaptic capture. *Neuron* *48*, 123-137.

Barde,Y.A., Edgar,D., and Thoenen,H. (1982). Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.* *1*, 549-553.

Barg,S., Olofsson,C.S., Schriever-Abeln,J., Wendt,A., Gebre-Medhin,S., Renstrom,E., and Rorsman,P. (2002). Delay between fusion pore opening and peptide release from large dense-core vesicles in neuroendocrine cells. *Neuron* 33, 287-299.

Bartoletti,A., Cancedda,L., Reid,S.W., Tessarollo,L., Porciatti,V., Pizzorusso,T., and Maffei,L. (2002). Heterozygous knock-out mice for brain-derived neurotrophic factor show a pathway-specific impairment of long-term potentiation but normal critical period for monocular deprivation. *Journal of Neuroscience* 22, 10072-10077.

Bliss,T.V. and Collingridge,G.L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, 31-39.

Bliss, TV. and Lomo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *Journal of Physiology* 232, 331-56.

Blochl,A. and Thoenen,H. (1995). Characterization of Nerve Growth-Factor (Ngf) Release from Hippokampal-Neurons - Evidence for A Constitutive and An Unconventional Sodium-Dependent Regulated Pathway. *European Journal of Neuroscience* 7, 1220-1228.

Blochl,A. and Thoenen,H. (1996). Localization of cellular storage compartments and sites of constitutive and activity-dependent release of nerve growth factor (NGF) in primary cultures of hippocampal neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience* 7, 173-190.

Blum,R., Kafitz,K.W., and Konnerth,A. (2002). Neurotrophin-evoked depolarization requires the sodium channel Na(V)1.9. *Nature* 419, 687-693.

Boussif,O., Lezoualc'h,F., Zanta,M.A., Mergny,M.D., Scherman,D., Demeneix,B., and Behr,J.P. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A* 92, 7297-7301.

Bresnahan,P.A., Leduc,R., Thomas,L., Thorner,J., Gibson,H.L., Brake,A.J., Barr,P.J., and Thomas,G. (1990). Human fur gene encodes a yeast KEX2-like endoprotease that cleaves pro-beta-NGF in vivo. *J. Cell Biol.* 111, 2851-2859.

Brewer,G.J. and Cotman,C.W. (1989). Survival and growth of hippocampal neurons in defined medium at low density: advantages of a sandwich culture technique or low oxygen. *Brain Res.* 494, 65-74.

Brewer,G.J., Torricelli,J.R., Evege,E.K., and Price,P.J. (1993). Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J. Neurosci. Res.* 35, 567-576.

Brigadski,T., Hartmann,M., and Lessmann,V. (2005). Differential vesicular targeting and time course of synaptic secretion of the mammalian neurotrophins. *Journal of Neuroscience* 25, 7601-7614.

Bronfman,F.C., Jovin,T.M., and Fainzilber,M. (2002). Ligand-induced internalization of the p75 neurotrophin receptor: a slow route to the recycling endosome. *Molecular Biology of the Cell* 13, 516A.

- Bronfman, F.C. and Fainzilber, M. (2004). Multi-tasking by the p75 neurotrophin receptor: sortilin things out? *Embo Reports* 5, 867-871.
- Burke, N.V., Han, W.P., Li, D.Q., Takimoto, K., Watkins, S.C., and Levitan, E.S. (1997). Neuronal peptide release is limited by secretory granule mobility. *Neuron* 19, 1095-1102.
- Canaff, L., Bennett, H.P.J., and Hendy, G.N. (1999). Peptide hormone precursor processing: getting sorted? *Molecular and Cellular Endocrinology* 156, 1-6.
- Canossa, M., Griesbeck, O., Berninger, B., Campana, G., Kolbeck, R., and Thoenen, H. (1997). Neurotrophin release by neurotrophins: Implications for activity-dependent neuronal plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 13279-13286.
- Canossa, M., Gartner, A., Campana, G., Inagaki, N., and Thoenen, H. (2001). Regulated secretion of neurotrophins by metabotropic glutamate group I (mGluRI) and Trk receptor activation is mediated via phospholipase C signalling pathways. *Embo Journal* 20, 1640-1650.
- Canossa, M., Giordano, E., Cappello, S., Guarnieri, C., and Ferri, S. (2002). Nitric oxide down-regulates brain-derived neurotrophic factor secretion in cultured hippocampal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 3282-3287.
- Chen, C.A. and Okayama, H. (1988). Calcium phosphate-mediated gene transfer: a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA. *Biotechniques* 6, 632-638.
- Chen, G., Kolbeck, R., Barde, Y.A., Bonhoeffer, T., and Kossel, A. (1999). Relative contribution of endogenous neurotrophins in hippocampal long-term potentiation. *J. Neurosci.* 19, 7983-7990.
- Cochilla, A.J., Angleson, J.K., and Betz, W.J. (1999). Monitoring secretory membrane with FM1-43 fluorescence. *Annual Review of Neuroscience* 22, 1-10.
- Cool, D.R., Normant, E., Shen, F.S., Chen, H.C., Pannell, L., Zhang, Y., and Loh, Y.P. (1997). Carboxypeptidase E is a regulated secretory pathway sorting receptor: Genetic obliteration leads to endocrine disorders in Cpe(fat) mice. *Cell* 88, 73-83.
- De Simoni, A., Griesinger, C.B., and Edwards, F.A. (2003). Development of rat CA1 neurones in acute versus organotypic slices: role of experience in synaptic morphology and activity. *Journal of Physiology-London* 550, 135-147.
- Dechant, G. and Barde, Y.A. (1997). Signalling through the neurotrophin receptor p75(NTR). *Current Opinion in Neurobiology* 7, 413-418.
- Dechant, G. and Barde, Y.A. (2002). The neurotrophin receptor p75(NTR): novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nature Neuroscience* 5, 1131-1136.
- Egan, M.F., Kojima, M., Callicott, J.H., Goldberg, T.E., Kolachana, B.S., Bertolino, A., Zaitsev, E., Gold, B., Goldman, D., Dean, M., Lu, B., and Weinberger, D.R. (2003). The BDNF val66met

polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell* 112, 257-269.

Eipper,B.A., Milgram,S.L., Husten,E.J., Yun,H.Y., and Mains,R.E. (1993). Peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase: a multifunctional protein with catalytic, processing, and routing domains. *Protein Sci.* 2, 489-497.

Farhadi,H., Pareek,S., Day,R., Dong,V.J., Chretien,M., Bergeron,J.J.M., Seidah,N.G., and Murphy,R.A. (1997). Prohormone convertases in mouse submandibular gland: Co-localization of furin and nerve growth factor. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 45, 795-804.

Farhadi,H.F., Mowla,S.J., Petrecca,K., Morris,S.J., Seidah,N.G., and Murphy,R.A. (2000). Neurotrophin-3 sorts to the constitutive secretory pathway of hippocampal neurons and is diverted to the regulated secretory pathway by coexpression with brain-derived neurotrophic factor. *Journal of Neuroscience* 20, 4059-4068.

Figurov,A., PozzoMiller,L.D., Olafsson,P., Wang,T., and Lu,B. (1996). Regulation of synaptic responses to high-frequency stimulation and LTP by neurotrophins in the hippocampus. *Nature* 381, 706-709.

Finkbeiner,S. (2000). Calcium regulation of the brain-derived neurotrophic factor gene. *Cell Mol. Life Sci.* 57, 394-401.

Gartner,A., Polnau,D.G., Staiger,V., Sciarretta,C., Minichiello,L., Thoenen,H., Bonhoeffer,T., and Korte,M. (2006). Hippocampal long-term potentiation is supported by presynaptic and postsynaptic tyrosine receptor kinase B-mediated phospholipase C gamma signaling. *Journal of Neuroscience* 26, 3496-3504.

Gartner,A.G. and Staiger,V. (2002). Neurotrophin secretion from hippocampal neurons evoked by long-term-potential-inducing electrical stimulation patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 6386-6391.

Goodman,L.J., Valverde,J., Lim,F., Geschwind,M.D., Federoff,H.J., Geller,A.I., and Hefti,F. (1996). Regulated release and polarized localization of brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience* 7, 222-238.

Gottschalk,W., Pozzo-Miller,L.D., Figurov,A., and Lu,B. (1998). Presynaptic modulation of synaptic transmission and plasticity by brain-derived neurotrophic factor in the developing hippocampus. *Journal of Neuroscience* 18, 6830-6839.

Gottschalk,W.A., Jiang,H., Tartaglia,N., Feng,L.Y., Figurov,A., and Lu,B. (1999). Signaling mechanisms mediating BDNF modulation of synaptic plasticity in the hippocampus. *Learning & Memory* 6, 243-256.

Greene LA., Aletta JM., Rukenstein A., Green SH. (1987). PC12 pheochromocytoma cells: culture, nerve growth factor treatment, and experimental exploitation. *Methods in enzymology* 147, 207-216.

Griesbeck,O., Canossa,M., Campana,G., Gartner,A., Hoener,M.C., Nawa,H., Kolbeck,R., and Thoenen,H. (1999). Are there differences between the secretion characteristics of NGF and

BDNF? Implications for the modulatory role of neurotrophins in activity-dependent neuronal plasticity. *Microscopy Research and Technique* 45, 262-275.

Haas,K., Sin,W.C., Javaherian,A., Li,Z., and Cline,H.T. (2001). Single-cell electroporation for gene transfer in vivo. *Neuron* 29, 583-591.

Halban,P.A. and Irminger,J.C. (1994). Sorting and Processing of Secretory Proteins. *Biochemical Journal* 299, 1-18.

Hallbook,F., Ibanez,C.F., and Persson,H. (1991). Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron* 6, 845-858.

Han,W.P., Li,D.Q., Stout,A.K., Takimoto,K., and Levitan,E.S. (1999). Ca^{2+} -induced deprotonation of peptide hormones inside secretory vesicles in preparation for release. *Journal of Neuroscience* 19, 900-905.

Hartmann,M., Heumann,R., and Lessmann,V. (2001). Synaptic secretion of BDNF after high-frequency stimulation of glutamatergic synapses. *Embo Journal* 20, 5887-5897.

Haubensak,W., Narz,F., Heumann,R., and Lessmann,V. (1998). BDNF-GFP containing secretory granules are localized in the vicinity of synaptic junctions of cultured cortical neurons. *Journal of Cell Science* 111, 1483-1493.

He,X.P., Yang,F., Xie,Z.P., and Lu,B. (2000). Intracellular Ca^{2+} and Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II mediate acute potentiation of neurotransmitter release by neurotrophin-3. *Journal of Cell Biology* 149, 783-791.

Heymach,J.V., Kruttgen,A., Suter,U., and Shooter,E.M. (1996). The regulated secretion and vectorial targeting of neurotrophins in neuroendocrine and epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry* 271, 25430-25437.

Hibbert,A.P., Morris,S.J., Seidah,N.G., and Murphy,R.A. (2003). Neurotrophin-4, alone or heterodimerized with brain-derived neurotrophic factor, is sorted to the constitutive secretory pathway. *Journal of Biological Chemistry* 278, 48129-48136.

Hohn,A., Leibrock,J., Bailey,K., and Barde,Y.A. (1990). Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature* 344, 339-341.

Horton,A.C. and Ehlers,M.D. (2003). Dual modes of endoplasmic reticulum-to-Golgi transport in dendrites revealed by live-cell imaging. *J. Neurosci.* 23, 6188-6199.

Huang,E.J. and Reichardt,L.F. (2001). Neurotrophins: Roles in neuronal development and function. *Annual Review of Neuroscience* 24, 677-736.

Huang,E.J. and Reichardt,L.F. (2003). Trk receptors: Roles in neuronal signal transduction. *Annual Review of Biochemistry* 72, 609-642.

Ip,N.Y., Ibanez,C.F., Nye,S.H., McClain,J., Jones,P.F., Gies,D.R., Belluscio,L., Le Beau,M.M., Espinosa,R., III, Squinto,S.P., and . (1992). Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A* 89, 3060-3064.

Itami,C., Kimura,F., Kohno,T., Matsuoka,M., Ichikawa,M., Tsumoto,T., and Nakamura,S. (2003). Brain-derived neurotrophic factor-dependent unmasking of "silent" synapses in the developing mouse barrel cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 13069-13074.

Jones,K.R. and Reichardt,L.F. (1990). Molecular cloning of a human gene that is a member of the nerve growth factor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A* 87, 8060-8064.

Jovanovic,J.N., Czernik,A.J., Fienberg,A.A., Greengard,P., and Sihra,T.S. (2000). Synapsins as mediators of BDNF-enhanced neurotransmitter release. *Nat. Neurosci.* 3, 323-329.

Kaczorowski,C.C., Disterhoft,J., and Spruston,N. (2007). Stability and plasticity of intrinsic membrane properties in hippocampal CA1 pyramidal neurons: effects of internal anions. *J. Physiol* 578, 799-818.

Kafitz,K.W., Rose,C.R., Thoenen,H., and Konnerth,A. (1999). Neurotrophin-evoked rapid excitation through TrkB receptors. *Nature* 401, 918-921.

Kang,H. and Schuman,E.M. (1995). Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus. *Science* 267, 1658-1662.

Kang,H., Welcher,A.A., Shelton,D., and Schuman,E.M. (1997). Neurotrophins and time: different roles for TrkB signaling in hippocampal long-term potentiation. *Neuron* 19, 653-664.

Kaplan,D.R. and Stephens,R.M. (1994). Neurotrophin Signal-Transduction by the Trk Receptor. *Journal of Neurobiology* 25, 1404-1417.

Klau, M., Hartmann M., Erdmann KS., Heumann R., Lessmann V. (2001). Reduced number of functional glutamatergic synapses in hippocampal neurons overexpressing full-length TrkB receptors. *Journal of Neuroscience Research* 66, 327-336.

Klein,R. (1994). Role of Neurotrophins in Mouse Neuronal Development. *Faseb Journal* 8, 738-744.

Kohara,K., Kitamura,A., Morishima,M., and Tsumoto,T. (2001). Activity-dependent transfer of brain-derived neurotrophic factor to postsynaptic neurons. *Science* 291, 2419-2423.

Kohrmann,M., Haubensak,W., Hemraj,I., Kaether,C., Lessmann,V.J., and Kiebler,M.A. (1999). Fast, convenient, and effective method to transiently transfect primary hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience Research* 58, 831-835.

Kojima,M. (2004). A SNP in BDNF gene is associated with human memory and BDNF secretion. *Seikagaku* 76, 662-666.

Korte,M., Carroll,P., Wolf,E., Brem,G., Thoenen,H., and Bonhoeffer,T. (1995). Hippokampal Long-Term Potentiation Is Impaired in Mice Lacking Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 8856-8860.

Korte,M., Staiger,V., Griesbeck,O., Thoenen,H., and Bonhoeffer,T. (1996). The involvement of brain-derived neurotrophic factor in hippocampal long-term potentiation revealed by gene targeting experiments. *Journal of Physiology-Paris* 90, 157-164.

Korte,M., Griesbeck,O., Gravel,C., Carroll,P., Staiger,V., Thoenen,H., and Bonhoeffer,T. (1996). Virus-mediated gene transfer into hippocampal CA1 region restores long-term potentiation in brain-derived neurotrophic factor mutant mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 12547-12552.

Korte,M., Minichiello,L., Klein,R., and Bonhoeffer,T. (2000). Shc-binding site in the TrkB receptor is not required for hippocampal long-term potentiation. *Neuropharmacology* 39, 717-724.

Kovalchuk,Y., Hanse,E., Kafitz,K.W., and Konnerth,A. (2002). Postsynaptic Induction of BDNF-Mediated Long-Term Potentiation. *Science* 295, 1729-1734.

Kramar,E.A., Lin,B., Lin,C.Y., Arai,A.C., Gall,C.M., and Lynch,G. (2004). A novel mechanism for the facilitation of theta-induced long-term potentiation by brain-derived neurotrophic factor. *J. Neurosci.* 24, 5151-5161.

Krijnselocker,J., Parton,R.G., Fuller,S.D., Griffiths,G., and Dotti,C.G. (1995). The Organization of the Endoplasmic-Reticulum and the Intermediate Compartment in Cultured Rat Hippokampal-Neurons. *Molecular Biology of the Cell* 6, 1315-1332.

Kruttgen,A., Moller,J.C., Heymach,J.V., and Shooter,E.M. (1998). Neurotrophins induce release of neurotrophins by the regulated secretory pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 9614-9619.

Kruttgen,A., Saxena-Seidel,S., Howe,C., Mobley,W.C., Shooter,E.M., and Weis,J. (2001). Subcellular trafficking of neurotrophins and their receptors. *Acta Neuropathologica* 102, 531.

Kruttgen,A., Saxena,S., and Weis,J. (2002). Trafficking of neurotrophins and their receptors. *Acta Neuropathologica* 104, 556.

Lee,R., Kermani,P., Teng,K.K., and Hempstead,B.L. (2001). Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 294, 1945-1948.

Leibrock,J., Lottspeich,F., Hohn,A., Hofer,M., Hengerer,B., Masiakowski,P., Thoenen,H., and Barde,Y.A. (1989). Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature* 341, 149-152.

Lessmann,V., Gottmann,K., and Heumann,R. (1994). BDNF and NT-4/5 enhance glutamatergic synaptic transmission in cultured hippocampal neurones. *Neuroreport* 6, 21-25.

Lessmann,V. and Heumann,R. (1997). Cyclic AMP endogenously enhances synaptic strength of developing glutamatergic synapses in serum-free microcultures of rat hippocampal neurons. *Brain Res.* 763, 111-122.

Lessmann,V. (1998). Neurotrophin-dependent modulation of glutamatergic synaptic transmission in the mammalian CNS. *General Pharmacology-the Vascular System* 31, 667-674.

Lessmann,V., Gottmann,K., and Malsangio,M. (2003). Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Progress in Neurobiology* 69, 341-374.

Lever,I.J., Bradbury,E.J., Cunningham,J.R., Adelson,D.W., Jones,M.G., McMahon,S.B., Marvizon,J.C.G., and Malsangio,M. (2001). Brain-derived neurotrophic factor is released in the dorsal horn by distinctive patterns of afferent fiber stimulation. *Journal of Neuroscience* 21, 4469-4477.

Levi-Montalcini,R. (1952). Effects of mouse tumor transplantation on the nervous system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 55, 330-344.

Levi-Montalcini,R. (1987). The nerve growth factor thirty-five years later. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 23, 227-238.

Levine,E.S., Dreyfus,C.F., Black,I.B., and Plummer,M.R. (1995). Brain-derived neurotrophic factor rapidly enhances synaptic transmission in hippocampal neurons via postsynaptic tyrosine kinase receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A* 92, 8074-8077.

Levine,E.S., Crozier,R.A., Black,I.B., and Plummer,M.R. (1998). Brain-derived neurotrophic factor modulates hippocampal synaptic transmission by increasing N-methyl-D-aspartic acid receptor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A* 95, 10235-10239.

Levine,E.S., Black,I.B., and Plummer,M.R. (1998). Neurotrophin modulation of hippocampal synaptic transmission. *Adv. Pharmacol.* 42, 921-924.

Li,Y.X., Xu,Y., Ju,D., Lester,H.A., Davidson,N., and Schuman,E.M. (1998). Expression of a dominant negative TrkB receptor, T1, reveals a requirement for presynaptic signaling in BDNF-induced synaptic potentiation in cultured hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A* 95, 10884-10889.

Li,Y.X., Zhang,Y., Lester,H.A., Schuman,E.M., and Davidson,N. (1998). Enhancement of neurotransmitter release induced by brain-derived neurotrophic factor in cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 18, 10231-10240.

Lin,S.Y., Wu,K., Levine,E.S., Mount,H.T., Suen,P.C., and Black,I.B. (1998). BDNF acutely increases tyrosine phosphorylation of the NMDA receptor subunit 2B in cortical and hippocampal postsynaptic densities. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 55, 20-27.

Llano,I., Marty,A., Johnson,J.W., Ascher,P., and Gahwiler,B.H. (1988). Patch-clamp recording of amino acid-activated responses in "organotypic" slice cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A* 85, 3221-3225.

- Lohof,A.M., Ip,N.Y., and Poo,M.M. (1993). Potentiation of developing neuromuscular synapses by the neurotrophins NT-3 and BDNF. *Nature* 363, 350-353.
- Lou,H., Kim,S.K., Zaitsev,E., Snell,C.R., Lu,B., and Loh,Y.P. (2005). Sorting and activity-dependent secretion of BDNF require interaction of a specific motif with the sorting receptor carboxypeptidase e. *Neuron* 45, 245-255.
- Lu,B. and Chow,A. (1999). Neurotrophins and hippocampal synaptic transmission and plasticity. *J. Neurosci. Res.* 58, 76-87.
- Lu,B. (2003). BDNF and activity-dependent synaptic modulation. *Learn. Mem.* 10, 86-98.
- Lu,B. (2003). Pro-region of neurotrophins: role in synaptic modulation. *Neuron* 39, 735-738.
- Maisonpierre,P.C., Belluscio,L., Squinto,S., Ip,N.Y., Furth,M.E., Lindsay,R.M., and Yancopoulos,G.D. (1990). Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science* 247, 1446-1451.
- Malenka,R.C. and Nicoll,R.A. (1999). Neuroscience - Long-term potentiation - A decade of progress? *Science* 285, 1870-1874.
- Marshall,C.J. (1995). Specificity of Receptor Tyrosine Kinase Signaling - Transient Versus Sustained Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation. *Cell* 80, 179-185.
- Meakin,S.O., MacDonald,J.I.S., Gryz,E.A., Kubu,C.J., and Verdi,J.M. (1999). The signaling adapter FRS-2 competes with Shc for binding to the nerve growth factor receptor TrkA - A model for discriminating proliferation and differentiation. *Journal of Biological Chemistry* 274, 9861-9870.
- Michael,G.J., Averill,S., Nitkunan,A., Rattray,M., Bennett,D.L.H., Yan,Q., and Priestley,J.V. (1997). Nerve growth factor treatment increases brain-derived neurotrophic factor selectively in TrkA-expressing dorsal root ganglion cells and in their central terminations within the spinal cord. *Journal of Neuroscience* 17, 8476-8490.
- Minichiello,L., Casagrande,F., Tatche,R.S., Stucky,C.L., Postigo,A., Lewin,G.R., Davies,A.M., and Klein,R. (1998). Point mutation in trkB causes loss of NT4-dependent neurons without major effects on diverse BDNF responses. *Neuron* 21, 335-345.
- Minichiello,L., Korte,M., Wolfner,D., Kuhn,R., Unsicker,K., Cestari,V., Rossi-Arnaud,C., Lipp,H.P., Bonhoeffer,T., and Klein,R. (1999). Essential role for TrkB receptors in hippocampus-mediated learning. *Neuron* 24, 401-414.
- Minichiello,L., Calella,A.M., Medina,D.L., Bonhoeffer,T., Klein,R., and Korte,M. (2002). Mechanism of TrkB-mediated hippocampal long-term potentiation. *Neuron* 36, 121-137.
- Moller,J.C., Kruttgen,A., Heymach,J.V., Ghori,N., and Shooter,E.M. (1998). Subcellular localization of epitope-tagged neurotrophins in neuroendocrine cells. *Journal of Neuroscience Research* 51, 463-472.

- Mowla,S.J., Pareek,S., Farhadi,H.F., Petrecca,K., Fawcett,J.P., Seidah,N.G., Morris,S.J., Sossin,W.S., and Murphy,R.A. (1999). Differential sorting of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience* 19, 2069-2080.
- Mowla,S.J., Farhadi,H.F., Pareek,S., Atwal,J.K., Morris,S.J., Seidah,N.G., and Murphy,R.A. (2001). Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *Journal of Biological Chemistry* 276, 12660-12666.
- Muller,D., Buchs,P.A., and Stoppini,L. (1993). Time course of synaptic development in hippocampal organotypic cultures. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 71, 93-100.
- Nomoto H., Tomotoshi K., Ito H., Furukawa S. (2000). Balance of two secretion pathways of nerve growth factor in PC12 cells changes during the progression of their differentiation, with a decrease in constitutive secretion in more differentiated cells. *Journal of Neuroscience Research* 59, 632-642.
- Pang,P.T., Teng,H.K., Zaitsev,E., Woo,N.T., Sakata,K., Zhen,S.H., Teng,K.K., Yung,W.H., Hempstead,B.L., and Lu,B. (2004). Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science* 306, 487-491.
- Pang,P.T. and Lu,B. (2004). Regulation of late-phase UP and long-term memory in normal and aging hippocampus: role of secreted proteins tPA and BDNF. *Ageing Research Reviews* 3, 407-430.
- Patapoutin,A. and Reichardt,L.F. (2001). Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Current Opinion in Neurobiology* 11, 272-280.
- Patterson,S.L., Abel,T., Deuel,T.A., Martin,K.C., Rose,J.C., and Kandel,E.R. (1996). Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice. *Neuron* 16, 1137-1145.
- Poo,M.M. (2001). Neurotrophins as synaptic modulators. *Nature Reviews Neuroscience* 2, 24-32.
- Pozzo-Miller,L.D., Gottschalk,W., Zhang,L., McDermott,K., Du,J., Gopalakrishnan,R., Oho,C., Sheng,Z.H., and Lu,B. (1999). Impairments in high-frequency transmission, synaptic vesicle docking, and synaptic protein distribution in the hippocampus of BDNF knockout mice. *J. Neurosci.* 19, 4972-4983.
- Rathenberg,J., Nevian,T., and Witzemann,V. (2003). High-efficiency transfection of individual neurons using modified electrophysiology techniques. *Journal of Neuroscience Methods* 126, 91-98.
- Santi,S., Cappello,S., Riccio,M., Bergami,M., Aicardi,G., Schenk,U., Matteoli,M., and Canossa,M. (2006). Hippocampal neurons recycle BDNF for activity-dependent secretion and LTP maintenance. *Embo Journal* 25, 4372-4380.
- Saragovi,H.U., Zheng,W.H., Maliartchouk,S., DiGugliermo,G.M., Mawal,Y.R., Kamen,A., Woo,S.B., Cuello,A.C., Debeir,T., and Neet,K.E. (1998). A TrkA-selective, fast internalizing

nerve growth factor-antibody complex induces trophic but not neuritogenic signals. *Journal of Biological Chemistry* 273, 34933-34940.

Schinder,A.F. and Poo,M.M. (2000). The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. *Trends in Neurosciences* 23, 639-645.

Schinder,A.F., Berninger,B., and Poo,M. (2000). Postsynaptic target specificity of neurotrophin-induced presynaptic potentiation. *Neuron* 25, 151-163.

Schote,U. and Seelig,J. (1998). Interaction of the neuronal marker dye FM1-43 with lipid membranes - Thermodynamics and lipid ordering. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* 1415, 135-146.

Schuman,E.M. (1999). Neurotrophin regulation of synaptic transmission. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9, 105-109.

Schweigreiter,R. (2006). The dual nature of neurotrophins. *Bioessays* 28, 583-594.

Seidah,N.G., Benjannet,S., Pareek,S., Savaria,D., Hamelin,J., Goulet,B., Laliberte,J., Lazure,C., Chretien,M., and Murphy,R.A. (1996). Cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian pro-protein convertases. *Biochemical Journal* 314, 951-960.

Seidah,N.G., Benjannet,S., Pareek,S., Chretien,M., and Murphy,R.A. (1996). Cellular processing of the neurotrophin precursors of NT3 and BDNF by the mammalian proprotein convertases. *Febs Letters* 379, 247-250.

Song,L.X. and Fricker,L.D. (1995). Calcium-Dependent and Ph-Dependent Aggregation of Carboxypeptidase-e. *Journal of Biological Chemistry* 270, 7963-7967.

Steiner,D.F. (1998). The proprotein convertases. *Current Opinion in Chemical Biology* 2, 31-39.

Stoppini,L., Buchs,P.A., and Muller,D. (1991). A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J. Neurosci. Methods* 37, 173-182.

Suter,U., Heymach,J.V., Jr., and Shooter,E.M. (1991). Two conserved domains in the NGF propeptide are necessary and sufficient for the biosynthesis of correctly processed and biologically active NGF. *EMBO J.* 10, 2395-2400.

Swanwick,C.C., Harrison,M.B., and Kapur,J. (2004). Synaptic and extrasynaptic localization of brain-derived neurotrophic factor and the tyrosine kinase B receptor in cultured hippocampal neurons. *Journal of Comparative Neurology* 478, 405-417.

Teng,H.K., Teng,K.K., Lee,R., Wright,S., Tevar,S., Almeida,R.D., Kermani,P., Torkin,R., Chen,Z.Y., Lee,F.S., Kraemer,R.T., Nykjaer,A., and Hempstead,B.L. (2005). ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75(NTR) and sortilin. *Journal of Neuroscience* 25, 5455-5463.

Thomas,K. and Davies,A. (2005). Neurotrophins: A ticket to ride for BDNF. *Current Biology* 15, R262-R264.

Wang,X., Butowt,R., Vasko,M.R., and von Bartheld,C.S. (2002). Mechanisms of the release of anterogradely transported neurotrophin-3 from axon terminals. *J. Neurosci.* 22, 931-945.

Watson,F.L., Heerssen,H.M., Bhattacharyya,A., Klesse,L., Lin,M.Z., and Segal,R.A. (2002). Neurotrophins use the Erk5 pathway to mediate a retrograde survival response (vol 4, pg 981, 2001). *Nature Neuroscience* 5, 1017.

Woo,N.H., Teng,H.K., Siao,C.J., Chiaruttini,C., Pang,P.T., Milner,T.A., Hempstead,B.L., and Lu,B. (2005). Activation of p75(NTR) by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. *Nature Neuroscience* 8, 1069-1077.

Wu,Y.J., Kruttgen,A., Moller,J.C., Shine,D., Chan,J.R., Shooter,E.M., and Cosgaya,J.M. (2004). Nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin-3 are sorted to dense-core vesicles and released via the regulated pathway in primary rat cortical neurons. *J. Neurosci. Res.* 75, 825-834.

Xu,B.J., Gottschalk,W., Chow,A., Wilson,R.I., Schnell,E., Zang,K.L., Wang,D.A., Nicoll,R.A., Lu,B., and Reichardt,L.F. (2000). The role of brain-derived neurotrophic factor receptors in the mature hippocampus: Modulation of long-term potentiation through a presynaptic mechanism involving TrkB. *Journal of Neuroscience* 20, 6888-6897.

York,R.D., Yao,H., Dillon,T., Ellig,C.L., Eckert,S.P., McCleskey,E.W., and Stork,P.J.S. (1998). Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor. *Nature* 392, 622-626.

Zakharenko,S.S., Patterson,S.L., Dragatsis,I., Zeitlin,S.O., Siegelbaum,S.A., Kandel,E.R., and Morozov,A. (2003). Presynaptic BDNF required for a presynaptic but not postsynaptic component of LTP at hippocampal CA1-CA3 synapses. *Neuron* 39, 975-990.

Zhang,S.H., Zettler,C., Cupler,E.J., Hurtado,P., Wong,K.J., and Rush,R.A. (2000). Neurotrophin 4/5 immunoassay: identification of sources of errors for the quantification of neurotrophins. *Journal of Neuroscience Methods* 99, 119-127.

Zhang,Y.Z., Moheban,D.B., Conway,B.R., Bhattacharyya,A., and Segal,R.A. (2000). Cell surface Trk receptors mediate NGF-induced survival while internalized receptors regulate NGF-induced differentiation. *Journal of Neuroscience* 20, 5671-5678.

Zheng,M., Streck,R.D., Scott,R.E.M., Seidah,N.G., and Pintar,J.E. (1994). The Developmental Expression in Rat of Proteases Furin, Pc1, Pc2, and Carboxypeptidase-e - Implications for Early Maturation of Proteolytic Processing Capacity. *Journal of Neuroscience* 14, 4656-4673.

Lebenslauf

Laufende Position: Ph.D. Studentin, Institut für Physiologie und Pathophysiologie, Johannes-Gutenberg Universität Mainz

Angaben zur Person:

Name: Tanja Brigadski
Adresse: Berliner Str. 29, 55131 Mainz, Deutschland
Telefon: dienstl.: 06131 / 39 26 381
Geburtstag/ort: 18.04.1979; Bochum (NRW), Deutschland

Schulausbildung:

1989-1998 Ernst-Barlach Gymnasium, Castrop-Rauxel (NRW)
1998-2003 Studium der Biochemie an der Ruhr-Universität Bochum
Abschluss: Diplom Biochemikerin

Veröffentlichungen:

1. M. Hartmann, T. Brigadski, K. Erdmann, B. Holtmann, M. Sendtner, F. Narz, and V. Leßmann. Truncated TrkB.T1 receptor induced outgrowth of dendritic filopodia in hippocampal neurons is mediated by the p75 neurotrophin receptor. *Journal of Cell Science* 117(24): 5803-5814 (2004).
2. C. Karl, S. Couillard-Despres, P. Prang, M. Munding, W. Kilb, T. Brigadski, S. Plötz, W. Mages, H. Luhmann, J. Winkler, U. Bogdahn, and L. Aigner. Neuronal Precursor Specific Activity of a Human Doublecortin Regulatory Sequence. *Journal of Neurochemistry*, 92(2): 264-282(2005).
3. T. Brigadski, M. Hartmann and V. Leßmann. Differential vesicular targeting and time course of synaptic secretion of the mammalian neurotrophins. *Journal of Neuroscience* 25(33): 7601-7614 (2005).
4. R. Kolarow, T. Brigadski, V. Lessmann. The signaling cascades involved in postsynaptic secretion of BDNF and NT-3 from hippocampal neurons. (J Neurosci; in Revision)

Kongreßbeiträge

1. Hartmann M., Brigadski T., Erdmann K., Holtmann B., Sendtner M., Narz F. and Leßmann V. Truncated TrkB receptors induce outgrowth of dendritic filopodia via p75 receptor signaling. 3rd annual meeting of the interdisciplinary science network 'molecular and cellular neurobiology', Mainz, 2003.
2. Brigadski T., Hartmann M., Kolarow R. and Leßmann V. Distinctive targeting and release of the mammalian neurotrophins in cultured hippocampal neurons. FENS Forum Abstracts, volume 2, Lisboa, 2004.
3. Brigadski T., Hartmann M., Kolarow R. and Leßmann V. Distinctive targeting and release of the mammalian neurotrophins in cultured hippocampal neurons. Society for Neuroscience 34th Annual Meeting, San Diego, 2004.
4. Hartmann M., Brigadski T., Erdmann K., Holtmann B., Sendtner M., Narz F. and Leßmann V. Truncated TrkB receptors induce outgrowth of dendritic filopodia via p75 receptor signaling. 4rd annual meeting of the interdisciplinary science network 'molecular and cellular neurobiology', Mainz, 2004.
5. Brigadski T., Hartmann M., Kolarow R. and Leßmann V. Differential synaptic targeting and secretion of the mammalian neurotrophins. 4rd annual meeting of the interdisciplinary science network 'molecular and cellular neurobiology', Mainz, 2004.
6. Brigadski T., Hartmann M., Kolarow R. & Leßmann V. Synaptic targeting and time course of secretion of neurotrophins from hippocampal neurons. 30th Göttingen Neurobiology Conference, 2005.
7. Brigadski T., Hartmann M., Kolarow R. & Leßmann V. Truncated TrkB receptor induced outgrowth of dendritic filopodia involves the p75 neurotrophin receptor. 30th Göttingen Neurobiology Conference, 2005.
8. Brigadski T., Hartmann M., Kolarow R. and Leßmann V. Time course of synaptic secretion of neurotrophins from hippocampal neurons. 84th Annual Meeting DPG, Göttingen, 2005.
9. Hartmann M., Brigadski T., Erdmann K., Holtmann B., Sendtner M., Narz F. and Leßmann V. Truncated TrkB receptors induce outgrowth of dendritic filopodia via p75 receptor signaling. 5rd annual meeting of the interdisciplinary science network 'molecular and cellular neurobiology', Mainz, 2005.
10. Brigadski T., Hartmann M. and Leßmann V. Cell specific targeting of neurotrophins to the regulated or the constitutive pathway of secretion in hippocampal neurons. 5rd annual meeting of the interdisciplinary science network 'molecular and cellular neurobiology', Mainz, 2005.
11. Kolarow R., Brigadski T., Hartmann M., Kuhlmann Ch., Luhmann H., Leßmann V.. Intracellular signalling cascades involved in activity-dependent synaptic secretion of neurotrophins. 5rd annual meeting of the interdisciplinary science network 'molecular and cellular neurobiology', Mainz, 2005.

12. Brigadski T., Lessmann V.; Re-introducing BDNF into single postsynaptic neurons of cultured hippocampal slices from BDNF deficient mice. Synaptic effects of re-introducing BDNF into single postsynaptic neurons of hippocampal slices from BDNF-deficient mice. Society for Neuroscience 36th Annual Meeting, Atlanta, 2006.
13. Lessmann V., Brigadski T., Kolarow R.; Intracellular targeting of neurotrophins and signalling cascades involved in synaptic secretion of BDNF and NT-3. Society for Neuroscience 36th Annual Meeting, Atlanta, 2006.
14. Brigadski T., Lessmann V.; Synaptic effects of reintroducing BDNF into single postsynaptic neurons of hippocampal slices from BDNF deficient mice. 6rd annual meeting of the interdisciplinary science network 'molecular and cellular neurobiology', Mainz, 2006.
15. Kolarow R., Brigadski T., Lessmann V. Intracellular targeting of neurotrophins and signalling cascades involved in synaptic secretion of BDNF and NT-3. 6rd annual meeting of the interdisciplinary science network 'molecular and cellular neurobiology', Mainz, 2006.
16. Niemann G., Brigadski T., Lessmann V. Small interfering RNA mediated efficient knockdown of BDNF in cultured hippocampal neurons. 6rd annual meeting of the interdisciplinary science network 'molecular and cellular neurobiology', Mainz, 2006.
17. Brigadski T., Lessmann V.; BDNF-dependent synaptic plasticity in organotypic hippocampal slice cultures. 6rd annual meeting of the interdisciplinary science network 'molecular and cellular neurobiology', 31th Göttingen Neurobiology Conference, 2007.
18. Kolarow R., Brigadski T., Lessmann V. L-type Ca^{2+} -channels, CAMKII, and cAMP cooperate in mediating postsynaptic secretion of BDNF and NT-3. 31th Göttingen Neurobiology Conference, 2007
19. Niemann G., Brigadski T., Lessmann V. Small interfering RNA mediated efficient knockdown of BDNF in cultured hippocampal neurons. 31th Göttingen Neurobiology Conference, 2007

Vorträge:

1. Differential vesicular targeting and time course of synaptic secretion of the mammalian neurotrophins. Seminar of the DFG Graduate Programme 736 "Development and Plasticity of the Nervous System: Molecular, Synaptic and Cellular Mechanisms", Bochum, 2005.
2. Differential vesicular targeting and synaptic secretion of the mammalian neurotrophins. 5rd annual meeting of the interdisciplinary science network 'molecular and cellular neurobiology', Mainz, 2005.

Preise:

- Poster Preis Brigadski T., Hartmann M., Kolarow R. & Leßmann V. Synaptic targeting and time course of secretion of neurotrophins from hippocampal neurons. 30th Göttingen Neurobiology Conference, Satellite Symposium IV, 2005.

