

**Einzelzelltransfektion in organotypischen
Schnittkulturen und die Bedeutung von BDNF bei
Prozessen der synaptischen Transmission und
Plastizität**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Dipl.-Biol. Julia Daniel

geb. am 08. November 1983 in Berlin

Gutachter: Prof. Dr. Volkmar Leßmann
Prof. Dr. Irmgard D. Dietzel-Meyer

eingereicht am: 21. März 2014

verteidigt am: 04. November 2014

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Synthese, Prozessierung und Sekretion von BDNF	2
1.2 BDNF-abhängige Signalweiterleitung	3
1.2.1 Signalweiterleitung über den TrkB-Rezeptor	3
1.2.2 Signalweiterleitung über den p75 ^{NT} -Rezeptor	5
1.3 BDNF-abhängige Modulation von Synapsen	5
1.3.1 BDNF-abhängige Modulation der synaptischen Transmission	5
1.3.2 BDNF-abhängige Modulation der synaptischen Plastizität	8
1.4 Zellspezifische Manipulation von Neuronen	11
1.5 Zielsetzung dieser Arbeit	12
2 Materialien	13
2.1 Chemikalien	13
2.2 Kits	14
2.3 Verbrauchsmaterialien	15
2.4 Geräte	16
2.5 DNA	17
2.5.1 Plasmide	17
2.5.2 siRNA	17
2.6 Versuchstiere	17
2.7 Software	17
2.8 Medien und Puffer	18
3 Methoden	22
3.1 Zellkultur	22
3.1.1 Organotypische hippocampale Schnittkulturen	22
3.1.2 Dissoziierte hippocampale Neurone	23
3.1.3 siRNA Transfektion	25
3.2 Molekularbiologie	25
3.2.1 Herstellung kompetenter Zellen	25
3.2.2 Transformation kompetenter Zellen	26
3.2.3 Herstellung von Glycerinstocks	26
3.2.4 Plasmidaufreinigung	26
3.3 Proteinbiochemische Methoden	27
3.3.1 Herstellung von Ganzzelllysaten	27
3.3.2 Proteinbestimmung	27
3.3.3 BDNF-ELISA	28

3.4	Mikroskopie	28
3.4.1	Epifluoreszenzmikroskopie	28
3.4.2	Konfokale Mikroskopie	29
3.5	Elektrophysiologie	30
3.5.1	Juxtazelluläre Ableitung und Transfektion	30
3.5.2	Messung von Feldpotenzialen in der CA1 Region des Hippokampus	31
3.5.3	<i>Whole-cell patch clamp</i> Messungen in CA1 Pyramidenzellen	32
3.6	Statistik	37
4	Ergebnisse	38
4.1	Kombination von juxtazellulärer Ableitung und Transfektion	38
4.1.1	Juxtazelluläre Ableitung von Aktionsströmen	40
4.1.2	Juxtazelluläre Transfektion	45
4.2	Protein- <i>Knockdown</i> durch juxtazelluläre Transfektion von siRNA	47
4.2.1	<i>Knockdown</i> von eGFP	47
4.2.2	<i>Knockdown</i> von endogenem DPP6	49
4.3	Transiente genetische Manipulation des postsynaptischen BDNF-Gehalts	51
4.4	Akute Manipulation BDNF-abhängiger Signalwege	57
4.4.1	Extrazelluläre Applikation von K252a	57
4.4.2	Intrazelluläre Applikation von K252a	61
5	Diskussion	66
5.1	Genetische Manipulation von Neuronen auf Einzelzellniveau	67
5.1.1	Einzelzelltransfektion von identifizierten Neuronen	67
5.1.2	Regulierung der Proteinexpression durch Einzelzelltransfektion mit siRNA	70
5.2	Bedeutung von BDNF in Prozessen der synaptischen Transmission und Plastizität	71
5.2.1	Bedeutung von BDNF in Prozessen der synaptischen Transmission	71
5.2.2	Bedeutung von BDNF in Prozessen der synaptischen Plastizität	75
6	Zusammenfassung	78
7	Abstract	80
	Literatur	82
	Anhang	VI
A.	Firmensitze	VI
B.	Lebenslauf	VIII
C.	Publikationen	VIII
D.	Danksagung	IX

Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Massenprozent
A	Ampere
aCSF	artifizielle Zerebrospinalflüssigkeit
AD/DA	Analog-Digital / Digital-Analog (-Wandler)
Akt	Proteinkinase B
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionat
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
AraC	Cytosinarabinosid
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	<i>Brain derived neurotrophic factor</i>
BME	<i>Basal medium eagle</i>
B-Raf	<i>v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B</i>
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CA	<i>Cornu ammonis</i>
ca.	circa
CaMK	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CaRF	Ca ²⁺ <i>response factor</i>
CC	Stromklemme
CCD	<i>Charge-coupled Device</i>
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
DAG	Diacylglycerol
DIV	Tage <i>in vitro</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNQX	6,7-Dinitroquinoxalin-2,3-dion
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
eGFP	<i>enhanced Green Fluorescent Protein</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbant assay</i>
EPO-Puffer	Elektroporationspuffer
EPSC	Exzitatorischer postsynaptischer Strom
EPSP	Exzitatorisches postsynaptisches Potential
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>

et al.	und andere
FCS	Fötale Kälberserum
fEPSP	Exzitatorisches postsynaptisches Feldpotential
Frs	<i>Fibroblast growth factor receptor substrate</i>
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
Grb	<i>Growth factor receptor-bound protein</i>
HBS	HEPES-gepufferte Saline
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Hz	Hertz
IgG	Immunglobulin G
IP ₃	Inositoltrisphosphat
IPSC	Inhibitorischer postsynaptischer Strom
L	Liter
LRR	<i>Leucine-rich residue</i>
LTD	Langzeitdepression
LTP	Langzeitpotenzierung
m	Meter
M	Molar
MAP	<i>Mitogen-activated protein</i>
MEM	<i>Minimal essential medium</i>
mEPSC	Miniatur EPSC
min	Minute
mIPSC	Miniatur IPSC
MPBS	Modifiziertes PBS
mPF	medialer präfrontaler Kortex
mRNA	Boten-RNA
MRP	Membranruhepotential
n.A.	numerische Apertur
NB	Neurobasal
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMDAR	NMDA-Rezeptor
NT-3	<i>Neurotrophin-3</i>
NT-4/5	<i>Neurotrophin-4</i> und <i>Neurotrophin-5</i>
P	Postnataler Tag
p75 ^{NTR}	p75 Neurotrophinrezeptor
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PC	Phosphokreatin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDK1	<i>phosphoinositide-dependent kinase 1</i>

pEGFP-N1	für eGFP kodierendes Plasmid
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
PI ₃ K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PO	Polyornithin
PTFE	Polytetrafluorethylen
PTX	Picrotoxin
Rap	<i>Ras-related protein</i>
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehung pro Minute
Rs	Serienwiderstand
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
Shc	<i>Src homology 2 domain containing transforming protein</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
S.O.B.	<i>Super Optimal Broth</i>
S.O.C.	S.O.B.-Medium + 20 mM Glucose
SOS	<i>Son of sevenless</i>
TBS	<i>theta burst Stimulation</i>
TFB	<i>transformation buffer</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
tPA	<i>tissue plasminogen activator</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trk	Tropomyosinkinase
ÜN	über Nacht
V	Volt
VC	Spannungsklemme
VGCC	<i>Voltage-gated calcium channel</i>
WT	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Mit der 1949 veröffentlichten Arbeit von Viktor Hamburger und Rita Levi-Montalcini über die Regulierung der neuronalen Entwicklung durch periphere Faktoren [Hamburger & Levi-Montalcini, 1949] begann die Entdeckung einer neuen Proteingruppe: der Neurotrophine. Die Isolierung des ersten Neurotrophins, dem sogenannten *nerve growth factor* (NGF) erfolgte bereits 1954 [Cohen et al., 1954]. Neben NGF wurden Jahrzehnte später weitere Neurotrophine identifiziert: *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) [Barde et al., 1982, Leibrock et al., 1989], *neurotrophin-3* (NT-3) [Hohn et al., 1990, Maisonpierre et al., 1990] und *neurotrophin-4/-5* (NT-4/5) [Hallböök et al., 1991, Ip et al., 1992]. Klassischerweise regulieren neurotrophe Faktoren diverse Prozesse, die das Schicksal einer Zelle bestimmen. So spielen sie eine essentielle Rolle bei der Differenzierung neuronaler Stammzellen, der Apoptose und dem Wachstum neuronaler Ausläufer [für eine Übersicht siehe Huang & Reichardt, 2001, Lu et al., 2005, Park & Poo, 2013]. In den 90iger Jahren wurde den Neurotrophinen auch eine Schlüsselrolle in Prozessen der synaptischen Plastizität zugewiesen [für eine Übersicht siehe Schinder & Poo, 2000]. Die vielfältigen Signaltransduktionsmechanismen werden durch die Bindung der neurotrophinen Faktoren an Mitglieder der Tropomyosinrezeptor-Kinasen (Trk-Rezeptoren) einerseits und den p75 *neurotrophin* Rezeptor (p75^{NTR}) andererseits eingeleitet [für eine Übersicht siehe Chao, 2003]. Grundsätzlich bindet jedes Neurotrophin spezifisch an einen Trk-Rezeptor. TrkA stellt den spezifischen Rezeptor für NGF dar [Kaplan et al., 1991], TrkB für BDNF und NT-4 [Klein et al., 1992, Soppet et al., 1991] und TrkC für NT-3 [Lamballe et al., 1991]. NT-3 kann darüber hinaus mit niedriger Affinität auch an TrkA und TrkB binden. Hingegen kann der p75^{NTR} Rezeptor von jedem der beschriebenen Proteine gebunden werden [Bothwell, 1995].

1.1 Synthese, Prozessierung und Sekretion von BDNF

Die Expression des *bdnf*-Gens wird bei Nagern von insgesamt neun gewebespezifischen Promotern reguliert [Aid et al., 2007, Timmusk et al., 1993]. Speziell im zentralen Nervensystem konnte BDNF-mRNA im Hippokampus, Thalamus, Hypothalamus, Riechkolben, Kleinhirn, Rückenmark und der Großhirnrinde wie auch der Amygdala detektiert werden [für eine Übersicht siehe Edelmann et al., 2014]. Auf Proteinebene wurde eine erhöhte BDNF-Expression im Hippokampus und der Großhirnrinde festgestellt [Conner et al., 1997, Yan et al., 1997]. Speziell für die CA1 Region des Hippokampus sind jedoch unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich einer BDNF-Expression publiziert. Das endogene BDNF-Protein konnte in verschiedenen Studien sowohl im Zellsoma, wie auch in Dendriten von CA1 Pyramidenzellen nachgewiesen werden [Conner et al., 1997, Dugich-Djordjevic et al., 1995, Schmidt-Kastner et al., 1996]. Andere Gruppen konnten hingegen nur vereinzelt oder keine BDNF-Immunoreaktivität in der CA1 Region detektieren [Dieni et al., 2012, Yan et al., 1997]. Aufgrund dieser Diskrepanz scheint weiterhin Aufklärungsbedarf hinsichtlich einer CA1-spezifischen endogenen BDNF-Expression zu bestehen. Die Anwesenheit von BDNF-mRNA in CA1 Pyramidenzellen ist jedoch hinreichend belegt [zum Beispiel An et al., 2008, Timmusk et al., 1993, Tongiorgi et al., 2004], sodass auch eine BDNF-Expression in der CA1 Region wahrscheinlich ist.

Das Protein BDNF wird zunächst als Vorläuferprotein mit einer für sekretierte Proteine typischen Signalsequenz (Prä-Pro-BDNF) hergestellt [Timmusk et al., 1993]. Nach Entfernung dieser Signalsequenz wird das entstandene Pro-Neurotrophin vom endoplasmatischen Retikulum (ER) zum Golgi-Apparat transportiert und dort vom *trans*-Golgi-Netzwerk ausgehend in Transportvesikel verpackt [für eine Übersicht siehe Lessmann & Brigadski, 2009]. BDNF befindet sich zumeist in sekretorischen Granula, deren Ausschüttung anschließend aktivitätsabhängig erfolgt [Brigadski et al., 2005; für aktuelle Übersichtsartikel siehe Edelmann et al., 2014, Lessmann & Brigadski, 2009]. Eine BDNF-Sekretion wurde sowohl an postsynaptischen und extrasynaptischen dendritischen Strukturen [Brigadski et al., 2005, Hartmann et al., 2001], wie auch an präsynaptischen axonalen Terminalien gezeigt [Dean et al., 2009, Matsuda et al., 2009].

Neben der Ausschüttung von maturem BDNF wird auch die Ausschüttung von ungespaltenem Pro-BDNF diskutiert. In einer Studie von Yang et al. [2009] wurde in hippocampalen Neuronen die Ausschüttung von endogenem Pro-BDNF sowie von maturem BDNF gezeigt. Das freigesetzte Pro-BDNF kann anschließend beispielsweise durch die

tPA aktivierte Protease Plasmin [Pang et al., 2004] oder durch Matrix-Metalloproteasen [Lee et al., 2001] extrazellulär in matures BDNF gespalten werden. Demgegenüber steht jedoch eine Arbeit von Matsumoto et al. [2008]. In dieser Studie konnte ebenfalls in hippocampalen Neuronen gezeigt werden, dass die Spaltung von Pro-BDNF zu maturem BDNF lediglich intrazellulär erfolgt und dass somit ausschließlich die mature Form des Neurotrophins freigesetzt wird.

Nach der Exozytose von BDNF bindet das Protein vorrangig an den TrkB-Rezeptor, um das Überleben von Neuronen oder aber Prozesse der synaptischen Transmission und Plastizität zu vermitteln. Ungespalten bindet Pro-BDNF an den p75^{NT}-Rezeptor und kann zum Beispiel proapoptotische Prozesse induzieren oder aber für die Expression von Langzeitdepression (LTD) auf synaptischer Ebene verantwortlich sein [für eine Übersicht siehe Dechant & Barde, 2002].

1.2 BDNF-abhängige Signalweiterleitung

1.2.1 Signalweiterleitung über den TrkB-Rezeptor

Die extrazelluläre Domäne des TrkB-Rezeptors besteht aus drei *leucine-rich residue* (LRR)-Motiven, die von zwei Cystein-Clustern flankiert werden. Angrenzend befinden sich zwei Immunglobulindomänen, gefolgt von einer Transmembrandomäne [für eine Übersicht siehe Huang & Reichardt, 2003]. Für die Bindung von BDNF sind sowohl Teile der LRR-Motive als auch die membrannahe Immunglobulindomäne essentiell [Haniu et al., 1997]. Die Bindung des BDNF-Dimers an den TrkB-Rezeptor führt zur Rezeptordimerisierung und somit zur Aktivierung der Phosphokinase durch *trans*-Autophosphorylierung. Die Rekrutierung von Adapterproteinen initialisiert anschließend intrazelluläre Signalkaskaden [für eine Übersicht siehe Huang & Reichardt, 2003, Pataoutian & Reichardt, 2001].

1.2.1.1 Der Ras-MAP-Kinase-Signalweg

Die Aktivierung des Ras-MAP-Kinase-Signalwegs erfolgt über das kleine G-Protein Ras [für eine Übersicht siehe Huang & Reichardt, 2003]. Ras wird über das Shc-Adapterprotein und die Rekrutierung von Austauschfaktoren (Grb2/SOS) aktiviert und agiert über verschiedene *downstream*-Mechanismen. Unter anderem wird der Erk-Signalweg transient aktiviert. Eine langanhaltendere Aktivierung von Erk (Mitglied der MAP-Kinase-Familie) kann über die Phosphorylierung von Frs2 durch den Trk-Rezeptor und

der nachfolgenden Aktivierung von Rap1 und B-Raf erreicht werden [für eine Übersicht siehe Grewal et al., 1999]. Die über Ras oder Rap1 aktivierten MAP-Kinasen aktivieren wiederum Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel das *response element-binding* (CREB) Protein. Es konnte gezeigt werden, dass CREB die Transkription von Genen, wie zum Beispiel *bdnf*, reguliert, die für die neuronale Differenzierung, das Überleben von Neuronen sowie Plastizitätsprozesse essentiell sind [Lonze et al., 2002, Tao et al., 1998].

1.2.1.2 Der PI₃-Kinase/Akt-Signalweg

Der PI₃-Kinase-Signalweg ist unter anderem entscheidend für das Überleben von Neuronen. Nach der ebenfalls Ras-abhängigen Aktivierung von PI₃-Kinasen entstehen Phosphatidylinositide, die in Verbindung mit PDK1 (*phosphoinositide-dependent kinase 1*) die Proteinkinase B (PKB oder Akt) aktivieren. Die Aktivierung von Akt beeinflusst nicht nur das Überleben von Neuronen, sondern führt auch zu morphologischen Veränderungen, wie beispielsweise zum Wachstum von Neuriten während der neuronalen Entwicklung [Markus et al., 2002].

1.2.1.3 Der PLC γ -Signalweg

Die Aktivierung der Phospholipase C γ 1 (PLC γ 1) führt zur Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat und damit zur Entstehung von Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG). IP₃ aktiviert über die Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Kalziumspeichern zytosolische Proteine wie zum Beispiel die Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Proteinkinase (CaMK). Darüber hinaus stimulieren sowohl Kalzium als auch DAG Isoformen der Proteinkinase C (PKC). Die Relevanz des PLC γ -Wegs in Bezug auf die BDNF/TrkB-Signalweiterleitung wurde an transgenen Mäusen mit einer Mutation in der PLC γ -Bindestelle des TrkB-Rezeptors untersucht. Elektrophysiologische Untersuchungen zeigten einen Defizit in Prozessen der synaptischen Plastizität (LTP) [Minichiello et al., 2002]. Zudem wurde eine deutliche Beeinträchtigung bezüglich der Phosphorylierung von CREB beobachtet. Die Relevanz von CREB für die Expression der Langzeitpotenzierung wurde darüber hinaus von Pittenger et al. [2002] nachgewiesen. Durch genetische Manipulation der CA1 Region des Hippokampus wurde die DNA-Bindung von CREB inhibiert. Speziell cAMP- und Dopamin-abhängige Formen der LTP waren hierdurch gehemmt.

1.2.1.4 Endozytotischer Transport von Trk-Rezeptoren

Die Aktivierung von TrkB durch BDNF und somit auch die im Anschluss aktivierten Signaltransduktionskaskaden können durch die Rezeptorinternalisierung reguliert werden. Ein BDNF-abhängiger Transport von TrkB zur anschließenden Degradierung durch Proteasomen [Sommerfeld et al., 2000], sowie ein *Recycling* zurück zur Plasmamembran [Huang et al., 2009] und ein retrograder Transport von BDNF/TrkB in Endosomen [Ginty & Segal, 2002] sind beschrieben. Diese Signalendosome ermöglichen die Aktivierung TrkB-abhängiger Signalkaskaden im Zellkern.

1.2.2 Signalweiterleitung über den p75^{NT}-Rezeptor

Der p75^{NT}-Rezeptor ist ein Mitglied der Tumornekrosefaktor (TNF) Rezeptor-Familie [für eine Übersicht siehe Dechant & Barde, 2002]. p75^{NTR} kann mit vergleichbarer Affinität die mature Form verschiedener Neurotrophine binden [Bothwell, 1995]. Zudem führte die Koexpression von p75^{NTR} und TrkB nach Rezeptordimerisierung sogar zu einer verbesserten Spezifität der TrkB-Aktivierung durch matures BDNF, wodurch antiapoptotische Prozesse favorisiert wurden [Bibel et al., 1999]. Die Initialisierung apoptotischer Prozesse erfolgt hingegen bei Bindung von Pro-BDNF an den p75^{NT}-Rezeptor, speziell in Anwesenheit von dessen Korezeptor Sortilin [Teng et al., 2005]. Darüber hinaus wurde die Bedeutung von p75^{NTR} auf synaptischer Ebene untersucht. Die Deletion des p75^{NTR}-Gens hatte eine Minderung der Langzeitdepression zur Folge [Rösch et al., 2005]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die zur LTD-Induktion verwendeten niederfrequenten Stimulationsprotokolle vorrangig zu einer Ausschüttung von Pro-BDNF führen [Nagappan et al., 2009]. In diesem Zusammenhang erklären sich die von Woo et al. [2005] gemachten Beobachtungen hinsichtlich einer Faszilitierung der LTD in Pro-BDNF/p75^{NTR}-abhängiger Weise.

1.3 BDNF-abhängige Modulation von Synapsen

1.3.1 BDNF-abhängige Modulation der synaptischen Transmission

BDNF spielt eine besondere Rolle während der Modulation der synaptischen Transmission. Sowohl glutamaterge, wie auch GABAerge Synapsen werden auf prä- und postsynaptischer Ebene durch BDNF-abhängige Signalwege beeinflusst [für eine Übersicht siehe Gottmann et al., 2009].

1.3.1.1 BDNF-abhängige Modulation von glutamatergen Neuronen

Eine Vielzahl von Studien haben die BDNF-abhängige Modulation von glutamatergen Neuronen mithilfe von exogen appliziertem BDNF untersucht. Anhand dessen ließen erste Ergebnisse zur Funktion von BDNF auf eine Modulation der synaptischen Transmission auf präsynaptischer Ebene schließen. Die Applikation von BDNF führte in hippocampalen Neuronenkulturen zu einer Frequenzzunahme der exzitatorischen Miniaturströme (mEPSCs), während deren Amplitude unverändert blieb [Lessmann et al., 1994]. Verbunden mit einer Reduktion der Doppelpulsverstärkung (*paired pulse facilitation*) wie auch Veränderungen in der Varianz der Amplitude von exzitatorischen postsynaptischen Strömen (EPSCs) deutet dieses erste Ergebnis auf eine BDNF-abhängige Modulation der präsynaptischen Glutamatfreisetzung [Lessmann & Heumann, 1998]. Eine solche BDNF-bedingte Zunahme der Glutamatausschüttung ist spezifisch für Glutamat/Glutamaterge Synapsen (glutamaterge prä- und postsynaptische Zelle), jedoch nicht für Glutamat/GABAerge Synapsen (glutamaterge präsynaptische Zelle / GABAerge postsynaptische Zelle) [Schinder et al., 2000]. Zudem konnte in hippocampalen Schnittkulturen gezeigt werden, dass die verstärkte Glutamatfreisetzung unter anderem auf eine vermehrte Anzahl fusionsfähiger Vesikel zurückzuführen ist [Tyler & Pozzo-Miller, 2001]. Es wird angenommen, dass die hochfrequente Freisetzung der fusionsfähigen Vesikel die synaptische Ermüdung (*synaptic fatigue*) zur Folge hat [Zucker, 1989]. Eine Änderung der Vesikelanzahl nach BDNF-Zugabe oder -Mangel resultierte dementsprechend auch in einer Veränderung der synaptischen Antwort während der hochfrequenten Stimulation [Figurov et al., 1996, Pozzo-Miller et al., 1999]. Darüber hinaus wird die Ausschüttung der fusionsfähigen Vesikel ebenfalls durch präsynaptische NMDA-Rezeptoren moduliert [Madara & Levine, 2008]. Vermutlich wird die Effizienz der Transmitterfreisetzung durch den NMDAR-abhängigen Kalziumeinstrom beeinflusst.

Auf postsynaptischer Ebene ist ebenfalls eine BDNF-abhängige Modulation der synaptischen Transmission beschrieben. In hippocampalen Zellkulturen hatte eine akute BDNF-Applikation einen Anstieg der Amplitude evozierter EPSCs zur Folge, der durch die intrazelluläre postsynaptische Anwendung von K252a, einem spezifischen Trk-Inhibitor, blockiert wurde [Levine et al., 1995]. Verstärkte NMDAR-Phosphorylierung und ein damit einhergehender Anstieg der Rezeptorleitfähigkeit nach Aktivierung von BDNF/TrkB-abhängigen Signalwegen konnte dafür verantwortlich gemacht werden [Levine et al., 1998]. Speziell die Phosphorylierung der NR1 und NR2B Untereinheiten erfolgte in BDNF/TrkB-abhängiger Weise [Lin et al., 1998, Suen et al., 1997]. Der ver-

stärkte NMDAR-abhängige Kalziumeinstrom hatte zudem eine Phosphorylierung des AMPA-Rezeptors (AMPA) zur Folge [Wu et al., 2004a]. Die Phosphorylierung der GluR1-Untereinheit steht in Zusammenhang mit einer verstärkten synaptischen Effizienz, zum Beispiel bei Prozessen der synaptischen Plastizität [siehe z.B. Zamanillo et al., 1999].

Zusammengenommen moduliert BDNF demnach zum einen die Effizienz der präsynaptischen Transmitterfreisetzung und zum anderen die postsynaptische Transmittersensitivität und differenziert hierbei zwischen glutamatergen und GABAergen postsynaptischen Zellen.

1.3.1.2 BDNF-abhängige Modulation von GABAergen Neuronen

Die exzitatorische Signalweiterleitung wird zudem direkt von GABAergen Neuronen kontrolliert. Daher wurde in den vergangenen Jahren, neben Untersuchungen zur BDNF-abhängigen Modulation exzitatorischer Synapsen, auch der Einfluss von BDNF auf die GABAerge Transmission charakterisiert. Für das GABAerge System wurden ebenfalls prä- und postsynaptische BDNF-Effekte beschrieben. Jedoch scheinen die Ergebnisse abhängig vom Entwicklungsstadium des Präparats zu sein, an dem die Studien durchgeführt wurden [Mizoguchi et al., 2003]. Dieses steht in Verbindung mit der Verschiebung der neuronalen Modulation durch GABA (von exzitatorisch zu inhibitorisch) während der Entwicklung [Cherubini et al., 1991]. Im maturen hippocampalen Netzwerk hat BDNF generell eine Entkräftung des inhibitorischen Systems zur Folge.

Dementsprechend konnten verschiedene Arbeitsgruppen eine Reduktion der synaptischen Transmission an GABA/Glutamatergen Synapsen (GABAerge präsynaptische Zelle / glutamaterge postsynaptische Zelle) nach BDNF-Applikation beobachten [Frerking et al., 1998, Tanaka et al., 1997]. Frerking et al. [1998] führten dies unter anderem auf eine verminderte Wahrscheinlichkeit der präsynaptischen GABA-Freisetzung zurück. Die Ergebnisse von Tanaka et al. [1997] deuten hingegen auf einen postsynaptischen Wirkungsmechanismus, da die BDNF-bedingte Änderung der IPSC-Amplitude durch die intrazelluläre Applikation von K252a blockiert wurde. Zudem wurde eine Reduktion der membranständigen GABA_A-Rezeptoren nach akuter BDNF-Applikation beschrieben [Brünig et al., 2001]. Jedoch ist der Mechanismus, durch den die Aktivierung von TrkB zur GABA_A-Rezeptor-Internalisierung führt, unbekannt. Es wird angenommen, dass der BDNF-abhängige intrazelluläre Kalziumanstieg und darauf folgende Aktivierung von Phosphatasen zur Dephosphorylierung und anschließender In-

ternalisierung von postsynaptischen GABA_A-Rezeptoren führt. Darüber hinaus wurde auch an GABA/GABAergen Synapsen (prä- und postsynaptisch GABAerge Zelle) eine BDNF-abhängige Modulation festgestellt. Eine BDNF-Applikation hatte einen postsynaptischen Anstieg des Chlorid-Umkehrpotentials zur Folge und bedingte somit eine Reduktion des postsynaptischen inhibitorischen Stroms [Wardle & Poo, 2003].

Insgesamt wurden demnach unterschiedliche subzelluläre Wirkungsmechanismen von BDNF sowohl in Abhängigkeit des präsynaptischen wie auch des postsynaptischen Zelltyps beschrieben. Es ist jedoch zu beachten, dass die zuvor beschriebenen Untersuchungen zur synaptischen Transmission von GABAergen sowie glutamatergen Neuronen mithilfe von exogen appliziertem BDNF durchgeführt wurden. Infolgedessen erfolgte keine Differenzierung zwischen den zu behandelnden Zellen. Daher gestaltet es sich mitunter schwierig zwischen einer reduzierten inhibitorischen Transmission und einer Potenzierung der exzitatorischen Transmission zu unterscheiden (z.B. Glutamatfreisetzung). Um die lokale Bedeutung von BDNF auf subzellulärer Ebene zu untersuchen, bedarf es der Manipulation einzelner Zellen.

1.3.2 BDNF-abhängige Modulation der synaptischen Plastizität

BDNF agiert über die Modulation der synaptischen Transmission auch auf die synaptische Plastizität. Die Langzeitpotenzierung ist eine Form der synaptischen Plastizität. Ein Zusammenhang zwischen BDNF und LTP konnte bereits 1992 von Patterson et al. [1992] gezeigt werden. Eine LTP-induzierende Stimulation hatte in dieser Studie eine Erhöhung des BDNF-mRNA-Gehalts im Hippokampus zur Folge [Patterson et al., 1992]. Hingegen verursachte eine chronische BDNF-Defizienz eine Minderung der LTP-Expression in der CA1 Region des Hippokampus [Korte et al., 1995]. Die Beeinträchtigung der LTP wurde sowohl durch akute Applikation von BDNF [Patterson et al., 1996] wie auch durch viralen Gentransfer von BDNF-Plasmiden in die postsynaptische CA1 Region [Korte et al., 1996] aufgehoben. Zusammengenommen zeigen diese Studien eine eindeutige BDNF-Abhängigkeit der hippokampalen LTP.

Seither steht die Aufklärung der Wirkungsmechanismen von BDNF während synaptischer Plastizitätsprozesse sowie die vorangehende BDNF-Ausschüttung im Fokus. So konnten verschiedene Studien zeigen, dass elektrische Stimulationsmuster, wie sie zur Induktion der LTP verwendet werden, eine sofortige Freisetzung von BDNF zur Folge haben [Balkowiec & Katz, 2000, Gärtner & Staiger, 2002, Hartmann et al., 2001]. Der

Ort der aktivitätsabhängigen BDNF-Freisetzung sollte mithilfe von regionalen *Knockout*- und Überexpressionsstrategien bestimmt werden [Korte et al., 1996, Zakharenko et al., 2003]. So weisen beispielsweise Untersuchungen von Korte et al. [1996] nach genetischer Manipulation von *bdnf* auf die Relevanz von postsynaptisch freigesetztem BDNF für die Expression der hippocampalen LTP. In dieser Studie wurde die BDNF-Expression in der postsynaptischen CA1 Region von BDNF-defizienten Mäusen und infolgedessen auch die Expression der LTP wiederhergestellt [Korte et al., 1996]. Vergleichende Analysen, die in regionspezifischen BDNF-*Knockout*-Mäusen durchgeführt wurden, deuten hingegen auf eine präsynaptische Ausschüttung von BDNF während der LTP [Zakharenko et al., 2003]. Der *Knockout* von BDNF auf Niveau des gesamten Vorderhirns, einschließlich der CA3 und CA1 Region des Hippokampus, zeigte einen LTP-Defizit, wohingegen ein BDNF-Mangel speziell in der CA1 Region keine Auswirkungen auf die LTP hatte. Zusammengefasst weisen demnach die erhaltenen Ergebnisse, nach genetischer Manipulation des Hippokampus, Diskrepanzen auf. Aus diesem Grund bleibt die Quelle der BDNF-Freisetzung während der hippocampalen LTP ungewiss. Im kortiko-striatalen Projektionssystem hingegen konnte von Jia et al. [2010] im Jahr 2010 eine präsynaptische Ausschüttung gepaart mit einer postsynaptischen Wirkung von BDNF nachgewiesen werden. In diesem System ist die Quelle der BDNF-Ausschüttung definiert, da die präsynaptischen kortikalen Neurone BDNF exprimieren, während im Striatum kaum eine Expression von BDNF nachgewiesen werden konnte [Conner et al., 1997]. Das präsynaptisch freigesetzte BDNF ist ausreichend, um an der kortiko-striatalen Synapse LTP zu induzieren [Jia et al., 2010]. Jedoch war der Schwellenwert zur Induktion der LTP erhöht und spiegelte eventuell das Fehlen von positiven Modulatoren, wie beispielsweise BDNF, wider.

Neben der prä- beziehungsweise postsynaptischen Ausschüttung von BDNF während der LTP ist auch die prä- beziehungsweise postsynaptische Wirkung des Proteins während der LTP von besonderem Interesse. Eine postsynaptische Aktivierung BDNF/TrkB-abhängiger Signalwege konnte nicht nur, wie zuvor beschrieben, im kortiko-striatalen Projektionssystem [Jia et al., 2010], sondern auch in der Amygdala [Meis et al., 2012] und im medialen präfrontalen Kortex [Lu et al., 2010] während der LTP nachgewiesen werden. Im visuellen Kortex hingegen ist eine präsynaptische Aktivierung der TrkB-Rezeptoren für die LTP von Bedeutung [Inagaki et al., 2008]. Speziell im Hippokampus existieren jedoch widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich des Wirkungsorts von BDNF [Xu et al., 2000, Zakharenko et al., 2003, doch siehe Gärtner et al., 2006]. Untersuchungen von Xu

et al. [2000] weisen beispielsweise auf die alleinige Relevanz der präsynaptischen TrkB-Aktivierung für die Expression der LTP. Insofern hatte der CA1-spezifische *Knockout* des TrkB-Rezeptors keinen Einfluss auf die Langzeitpotenzierung [Xu et al., 2000]. Vergleichende Studien im Hippokampus von regionenspezifischen BDNF-*Knockout*-Mäusen deuten ebenfalls auf eine präsynaptische Funktion von BDNF [Zakharenko et al., 2003]. Zur Induktion der LTP wurde in dieser Studie unter anderem eine 200 Hz Stimulation verwendet. Nach der Stimulation konnte unter Kontrollbedingungen eine robuste Potenzierung, verbunden mit einer schnelleren Kinetik der Transmitterausschüttung beobachtet werden. Eine solche Zunahme der Ausschüttungsgeschwindigkeit blieb nach CA3-CA1-spezifischen *Knockout* von *bdnf* aus und bestätigt eine BDNF-abhängige Wirkung an der Präsynapse. Andererseits konnte auch die Notwendigkeit einer postsynaptischen Aktivierung von BDNF-abhängigen Signaltransduktionsmechanismen für die Expression der LTP gezeigt werden [Gärtner et al., 2006, Kovalchuk et al., 2002]. Sowohl eine BDNF-abhängige postsynaptische Aktivierung des PLC γ -Signalwegs [Gärtner et al., 2006], wie auch eine BDNF-abhängige Modulation postsynaptischer Kalziumkanäle und NMDA-Rezeptoren [Kovalchuk et al., 2002] konnte für die LTP-Expression verantwortlich gemacht werden. Demnach scheint im Hippokampus nicht nur die präsynaptische, sondern durchaus auch eine postsynaptische Aktivierung BDNF/TrkB-abhängiger Signalwege von Bedeutung zu sein.

Zusammenfassend existieren demnach sowohl Diskrepanzen hinsichtlich prä- und/oder postsynaptischen BDNF-Ausschüttung wie auch -Wirkung während der hippokampalen LTP. Diese sind mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Unzulänglichkeit der zur Analyse verwendeten Methoden zurückzuführen. Die regionenspezifische genetische Manipulation ist demnach für die Untersuchungen von zellulären und subzellulären Prozessen nur bedingt geeignet. Anhand der bisher veröffentlichten Studien ist daher keine zweifelsfreie Aufklärung von zell- und ortsspezifischen BDNF-abhängigen Modulationen möglich. Es erfordert die Entwicklung neuer Methoden zur zellspezifischen Manipulation, um diese und vergleichbare Problematiken zu adressieren.

1.4 Zellspezifische Manipulation von Neuronen

Experimentelle Unzulänglichkeiten begrenzen ebenfalls die Untersuchung von anderen Proteinen, die in Abhängigkeit des exprimierenden Zelltyps unterschiedliche Funktionen ausführen. Auch hier reicht die systemische Applikation des Proteins oder die Manipulation der Proteinexpression in Mischpopulationen nicht aus, um die zellspezifische Funktion zu charakterisieren. Zur hinreichenden Beantwortung dieser Fragestellung müssen einzelne Zellen in ihrer intakten Umgebung identifiziert und manipuliert werden. Hierfür müssen neue Methoden entwickelt, beziehungsweise kombiniert und weiterentwickelt werden. Eine Manipulation einzelner Zellen in ihrer natürlichen Umgebung kann durch die Einzelzellektroporation erreicht werden [Ogden, 1994, Wang et al., 2010]. Die Elektroporation einzelner Zellen erfolgt über hochfrequente Stimulation, die den dielektrischen Durchschlag der Zellmembran zur Folge hat [Ryttsén et al., 2000, Zudans et al., 2007]. Die Membran bildet daraufhin transiente Poren aus, deren Größe und Lebensdauer von dem verwendeten Stimulationsprotokoll bestimmt werden [Böckmann et al., 2008, Krassowska & Filev, 2007, Levine & Vernier, 2010, Smith et al., 2004, Sugar & Neumann, 1984]. Über diese Membranporen können extrazelluläre Moleküle in die Zelle hineingelangen. Die Einzelzellektroporation von kleinen fluoreszierenden Molekülen wurde bereits beschrieben [Nevian & Helmchen, 2007, Pinault, 1996]. Jedoch stellt die Einzelzelltransfektion mit Plasmid-DNA eine Herausforderung dar [Haas et al., 2001, Rathenber et al., 2003], weil der Porendurchmesser ausreichend groß sein muss, um den Durchgang der DNA zu gewährleisten. Jedoch sollten die Poren einen bestimmten Durchmesser nicht überschreiten, um die Membranintegrität nur temporär zu unterbrechen.

Die Einzelzelltransfektion mit Plasmid-DNA ermöglichte zwar die genetische Manipulation von Zellen, erlaubte es jedoch nicht auf optische Darstellungsmethoden zu verzichten. Dementsprechend erfolgte die Identifizierung der zu transfizierenden Zelle ausschließlich anhand morphologischer Kriterien. Eine elektrophysiologische Charakterisierung mit anschließender Einzelzelltransfektion war unter Einsatz der bisher beschriebenen Transfektionsprotokolle nicht möglich. Folglich waren die Voraussetzungen für eine genetische Manipulation charakterisierter Zellen nicht gegeben. Aus diesem Grund bedarf es der Etablierung neuer Techniken beziehungsweise der Modifizierung vorhandener Methoden, um elektrophysiologische Messungen mit der Transfektion von einzelnen Zellen zu kombinieren. Voraussetzung hierfür ist eine, im Vergleich zu bisher beschrie-

benen Studien, geringe Distanz zwischen der zu transfizierenden Zelle und der Transfektionspipette. Die Etablierung der Einzelzelltransfektion in der *loose seal*-Konfiguration würde vorangehende elektrophysiologische Messungen ermöglichen. Infolgedessen wäre es möglich, ohne visuelle Kontrolle, den Abstand zwischen Pipette und Zelle mithilfe des Abdichtwiderstands zu bestimmen. Des Weiteren kann über die Detektion der von einer Zelle generierten Aktionsströme, die zu transfizierende Zelle als Nervenzelle identifiziert werden. Die Kombination von Ableitung und Transfektion im *loose seal* Modus wird daher eine zellspezifische genetische Manipulation ermöglichen.

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Bisherige Arbeiten konnten unter anderem durch genetische Manipulation eindrucksvoll die Bedeutung von BDNF in Prozessen des Überlebens und der Differenzierung, sowie in Prozessen der synaptischen Transmission und Plastizität aufschlüsseln. Jedoch bedarf es zur Aufklärung des zellspezifischen oder sogar subzellulären (prä- bzw. postsynaptischen) Ausschüttungs- und Wirkungsortes von BDNF einer Manipulation auf Einzelzellniveau. Zu diesem Zweck sollte daher in der vorliegenden Arbeit der zellspezifische *Knockdown* von BDNF durch juxtazelluläre Transfektion etabliert werden, um anschließend den Einfluss dieses BDNF-*Knockdowns* auf die synaptische Transmission zu untersuchen. Des Weiteren sollte der Wirkungsort von BDNF während der hippokampalen LTP mithilfe des TrkB-Inhibitors K252a bestimmt werden.

2 Materialien

2.1 Chemikalien

Adenosintriphosphat (Mg-ATP)	Sigma
Aprotinin	Roche
Arabinosylcytosin (AraC)	Sigma
B27	Tocris Bioscience
Basal medium eagle (BME)	Gibco
Borsäure	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
DNase	Roche
Essigsäure (CH ₃ COOH)	Merck
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich
Ethylenglycoltetraacetat (EGTA)	Sigma-Aldrich
Fötale Kälberserum (FCS)	Gibco
Glucose	Sigma
Glutamax	Invitrogen
Glutamin	Invitrogen
(PlusOne) Glycerin	GE Healthcare
Glycin	Roth
Guanosintriphosphat (Na-GTP)	Sigma
HEPES	Serva
Immu-Mount	Fisher Scientific
Insulin	Sigma
K252a	Alomone Labs
Kaliumacetat (CH ₃ COOK)	Merck
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma
Kaliumgluconat	Sigma
Kaliumhydroxid (KOH)	Sigma
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Sigma

LB-Agar	Sigma
LB Broth (Lennox)	Sigma
Leupeptin	Roche
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Roth
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Sigma
Mangan(II)-chlorid (MnCl ₂)	Merck
Minimalmedium (MEM)	Invitrogen
MOPS	Sigma
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma
Natriumpyruvat	Invitrogen
Neurobasalmedium (NB)	Gibco
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Roth
Nonidet TM P40 Substitute (NP-40)	Fluka / Sigma
Paraformaldehyd	Electron Microscopy Sciences
Penicillin-Streptomycin-Glutamin	Gibco
Pferdeserum (HOS)	Gibco
Phenolrot	Sigma
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
Phosphokreatin (Na-PC)	Sigma
Picrotoxin (PTX)	Sigma
Polyornithin (PO)	Sigma
Rinderserumalbumin (BSA)	Serva
Rubidiumchlorid (RbCl)	Sigma-Aldrich
Salzsäure (HCl)	Sigma
Silberchlorid (AgCl)	Fluka
S.O.C. Medium	Invitrogen
Tetrodotoxin (TTX)	Tocris Bioscience
Tris	biomol
Triton X-100	PlusOne TM
Trypsin 2,5 %	Gibco

2.2 Kits

BCA-Proteinassay	Thermo Scientific
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen
HiPerFect Transfection Reagent	Qiagen
Quantikine Human BDNF Immunoassay	R&D Systems, Inc.
Sylgard 184 Silicone Elastomer Kit	Dow Corning

2.3 Verbrauchsmaterialien

Borosilikatglaskapillaren (GB150F-8P)	Science Products
Deckgläser Ø 50 mm	Menzel-Gläser
Einmal-Probenröhrchen	Advanced Instruments, Inc.
Exadrop [®] G (gravity)	Braun
Filterkerze Por. 3	Duran Group
Filtropur s 0.2	Sarstedt
Glasflaschen (Duran [®] 0,1 - 2L)	Duran Group
Membrex 4 CA, 0,2µm, steril	membraPure
Messkolben (Duran [®] 0,5 - 1 L)	Duran Group
Messzylinder (Duran [®] 0,1 - 1 L)	Duran Group
Microfil 28 G, 97 mm	World Precision Instruments, Inc.
24er Mikrotiterplatte	Nunc
96er Mikrotiterplatte	Nunc
Millicell [®] -Kultureinsatz	Nunc
pH-Elektrode (BlueLine 28 pH)	SI Analytics
3,5 cm Petrischalen	Nunc
6 cm Petrischalen	Nunc
Platindraht 0,5 mm	Neolab
Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe (HBO)	Osram
1,5 mL <i>SafeSeal</i> Reagiergefäß	Sarsted
2 mL <i>SafeSeal</i> Reagiergefäß	Sarsted
12 mL Röhrchen	greiner bio-one
15 mL Röhrchen	greiner bio-one
50 mL Röhrchen	greiner bio-one
Silberdraht 0,125 mm	Goodfellow Camebridge Ltd.
Silberdraht 0,25 mm	Science Products
Skalpell	Feather
Sterican 0,6 mm × 80 mm, 23 G x 3 $\frac{1}{8}$ "	Braun
25 cm ² Zellkulturflasche	TPP

2.4 Geräte

AD-DA Wandler (Digidata 1322A)	Axon Instruments/Molecular Devices
Badheizung (Temperature Controller V)	Luigs & Neumann
Gewebeschneider	McIlwain
Inkubator	Binder
Interface (CED 1401)	CED
Kaltlichtquelle (halolux 150)	STREPPPEL Glasfaseroptik
Kamera (Spot RT TM SE6 Monochrome)	Diagnostic Instruments Inc.
Immersionskammer (LN Insert Typ C)	Luigs & Neumann
Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 780 am Axio Examiner)	Zeiss
Mikromanipulatoren (LN mini / combi)	Luigs & Neumann
Mikromanipulatorkontrollbox (SM-1)	Luigs & Neumann
Mikrotiterplatten-Photometer (Infinite [®] F200)	Tecan Group Ltd.
10x Objektiv (UMPLFL)	Olympus
20x Objektiv (W Plan-ACHROMAT)	Zeiss
60x Objektiv (LUMPLFL/IR)	Olympus
63x Objektiv (W Plan-ACHROMAT)	Zeiss
Osmometer (Fiske [®] 210 Micro)	Advanced Instruments, Inc.
Pipettenziehgerät (PIP 5)	HEKA
Pipettenziehgerät (PP-830)	Narishige
Quecksilberdampfampe	Olympus
Shutter (VMM-D1)	Uniblitz
Stimulator (Model 2100)	A-M Systems, Inc.
Systemmikroskop (BX51-WI)	Olympus
Thermomixer comfort	eppendorf
Vakuumpumpe (AZ 02)	Roth
Videomonitor (WV-BM1410)	Panasonic
Verstärker (ELC-03XS)	npi
Verstärker (EPC8)	HEKA
Verstärker (EXT-02F)	npi
Zentrifuge (Centrifuge 5804 R)	eppendorf
Zentrifuge (Mikro 200R)	Hettich
Zentrifuge (Rotina 420R)	Hettich

2.5 DNA

2.5.1 Plasmide

pEGFP-N1 (Accession No. U55762) Clontech

2.5.2 siRNA

BDNF-283 siRNA (Qiagen)

Zielsequenz	5'-	CG	GGTGATGCTCAGCAGTCAA	-3'
Sense-Strang	5'-		GGUGAUGCUCAGCAGUCAA	tt -3'
Antisense-Strang	3'-	GC	CCACUACGAGUCGUCAGUU	-5'

Control (non-silencing) siRNA (1022076, Qiagen)

Zielsequenz	5'-	AA	TTCTCCGAACGTGTCACGT	-3'
Sense-Strang	5'-		UUCUCCGAACGUGUCACGU	tt -3'
Antisense-Strang	3'-	tt	AAGAGGCUUGCACAGUGCA	-5'

DPP6 siRNA (Qiagen)

Zielsequenz	5'-	AA	CTGGAAAGGAATCGCCATT	-3'
Sense-Strang	5'-		CUGGAAAGGAAUCGCCAUU	tt -3'
Antisense-Strang	3'-	tt	GACCUUCCUUAGCGGUAA	-5'

GFP-22 siRNA (1022064, Qiagen)

Zielsequenz	5'-	CG	GCAAGCTGACCCTGAAGTTC	AT -3'
Sense-Strang	5'-		GCAAGCUGACCCUGAAGUUC	AU -3'
Antisense-Strang	3'-	GC	CGUUCGACUGGGACUUCAAG	-5'

2.6 Versuchstiere

C57BL/6	Charles River
GAD67-GFP	Tamamaki et al. [2003]
Sprague Dawley Ratten	Charles River

2.7 Software

IMARIS	Bitplane Scientific Software
INTRACELL 1.5	Leibniz-Institut für Neurobiologie Magdeburg
Magellan TM V 6.5	Tecan Group Ltd.
Meta Imaging Series 7.5.3	Molecular Devices
Mini Analysis Program 6.0.7	Synaptosoft
Origin 8	OriginLab Corporation
pClamp 8	Axon Instruments
SPSS 21	IBM Corp.

2.8 Medien und Puffer

BME/10 % FCS

10	mM	HEPES
5	mM	Glucose
1	mM	Glutamax
10	%	FCS
36	mgL ⁻¹	Insulin in BME

siehe Abschnitt 3.1.2

Elektroporationspuffer (EPO-Puffer)

137	mM	NaCl
15	mM	HEPES
5	mM	KCl
0,7	mM	Na ₂ HPO ₄
frisch hinzufügen:		
6	mM	Glucose
1,8	mM	CaCl ₂
1	mM	MgCl ₂
0,01	mM	Glycin
		in H ₂ O
		pH 7,05
		293 mOsmol L ⁻¹

siehe Abschnitt 3.5.1

HEPES-gepufferte Saline (HBS)

100	mM	NaCl
20	mM	HEPES
4	mM	KCl
1	mM	Na ₂ HPO ₄
frisch hinzufügen:		
10	mM	Glucose
2	mM	CaCl ₂
1	mM	MgCl ₂
0,01	mM	Glycin
		in H ₂ O
		pH 7,38
		240 mOsmol L ⁻¹

siehe Abschnitt 3.4.2.1 und 3.5.1

<i>Lysispuffer</i>		siehe Abschnitt 3.3.1
150	mM	NaCl
50	mM	Tris
		pH 7,5
2	mM	EDTA
1	%	Triton-x100
1	%	NP-40
		in H ₂ O
frisch hinzufügen:		
1	mM	PMSF
10	µg mL ⁻¹	Aprotinin
1	µg mL ⁻¹	Leupeptin
<i>MPBS -/-</i>		siehe Abschnitt 3.1.2
10	mM	HEPES
10	mM	Glucose
1	mM	Glutamax
1	mM	Pyrovat
1	mM	Phenolrot
2,5	mL L ⁻¹	Penicillin-Streptomycin-Glutamin
6	µg mL ⁻¹	DNase
1	mg mL ⁻¹	BSA
		in PBS
		pH 7,4
<i>MPBS +/-</i>		siehe Abschnitt 3.1.2
4	mM	CaCl ₂
5,8	mM	MgCl ₂
		in MPBS -/-
<i>NB/B27</i>		siehe Abschnitt 3.1.1
20	mL L ⁻¹	B27
2,5	mL L ⁻¹	Penicillin-Streptomycin-Glutamin
2	mM	Glutamax
		in NB
<i>NB/B27 Stoppini (Kulturmedium)</i>		siehe Abschnitt 3.1.1
1	%	Pferdeserum
3,5	mM	MgCl ₂
		in NB/B27

Phosphatpuffer

38 mM
161,9 mM

siehe Abschnitt 3.4.2.1

NaH₂PO₄Na₂PO₄in H₂O

pH 7,2 - 7,4

TFB I

30 mM
10 mM
50 mM
100 mM
15 %

siehe Abschnitt 3.2.1

CH₃COOKCaCl₂MnCl₂

RbCl

Glycerin

pH 5,8 mit CH₃COOH

steril filtriert

TFB II

10 mM
75 mM
10 mM
15 %

siehe Abschnitt 3.2.1

MOPS

CaCl₂

RbCl

Glycerin

pH 6,5 mit KOH

steril filtriert

artifizielle Zerebrospinalflüssigkeit (aCSF) (in mM)

s. Abschnitt	aCSF1 3.5.2	aCSF2 3.5.3.1	aCSF3 3.5.3.1	aCSF4 3.5.3.2	aCSF5 3.5.3.3
NaCl	80	98	85	90	80
NaHCO ₃	25	25	25	24	25
KCl	2,5	2,1	2,5	2,5	2,5
NaH ₂ PO ₄	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25
frisch hinzufügen:					
Glucose	10	10	10	10	10
MgCl ₂	4	1	4	2	4
CaCl ₂	4	2	4	2,5	4
PTX	0	0	0	0	0,001
DMSO (in %)	0	0	0	0	0,1
K252a (in nM)	0	0	0	0	200
pH	7,4	7,4	7,4	7,4	7,4
Osmolarität (in mOsmol L ⁻¹)	230	249	240	240	243
Temperatur	RT	32 °C	RT	RT	RT

Pipettenlösungen (in mM)

s. Abschnitt	Intra1 3.5.3.1	Intra2 3.5.3.1	Intra3 3.5.3.2	Intra4 3.5.3.3
KCl	15	5	5	5
HEPES	10	10	10	10
NaCl	2,5	1	1	1
EGTA	0,5	1	1	0,5
MgCl ₂	0	1	1	0
frisch hinzufügen:				
Kaliumgluconat	106	100	105	115 / 100
DMSO (%)	0	0	0	0 / 0,1
Mg-ATP	4	4	2	4
Na ₃ -GTP	0,5	0,5	0,5	0,5
Na ₂ -PC	7,5	7,5	0	7,5
pH	7,3	7,2	7,2	7,2 - 7,3
Osmolarität (in mOsmol L ⁻¹)	239	225	230	230
<hr/>				
<i>Offset-Potential (in mV)</i>	-15	-15	-15	-16

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Organotypische hippocampale Schnittkulturen

Die Präparation organotypischer Schnittkulturen erfolgte nach der von Stoppini et al. [1991] entwickelten Methode. Dafür wurden neugeborene (P3-P5) Wildtyp (C57BL/6) oder GAD67-GFP [Tamamaki et al., 2003] Mäuse verwendet. Nach Dekapitation der Maus wurde der Kopf für 30 s in sterilem PBS auf 4 °C heruntergekühlt. Zur Entnahme des Gehirns wurde die Kopfhaut und der darunter liegende Schädel entlang der Sagittalnaht geöffnet, um anschließend das Gehirn mithilfe eines Löffels in eine mit Präparationsmedium (MEM incl. 2 mM Glutamin, 4 °C) gefüllte Präparationsschale zu überführen. Nach der Entfernung von Riechkolben und Kleinhirn wurden mit einem Gewebeschneider (McIlwain) 385 µm dicke Sagittalschnitte (mit einem Winkel von ca. 10°) des Gehirns hergestellt (siehe Abbildung 3.1 a). Nach der Separation der Hirnschnitte wurde die hippocampale Formation (Hippokampus, Subiculum und entorhinaler Kortex) isoliert und auf eine in Kulturmedium (1 mL) äquilibrierte PTFE Membran (Millicell®-Kultureinsatz) transferiert (siehe Abbildung 3.1 b). Nach der Entfernung von überschüssigem Präparationsmedium wurde der entorhinale Kortex leicht vom Hippokampus abgespreizt. Die Inkubation der Schnittkulturen erfolgte bei 37 °C und 5,3 % CO₂ bei 100 % Luftfeuchtigkeit. Alle zwei bis drei Tage erfolgt ein Austausch des Kulturmediums. Beginnend mit dem ersten Medienwechsel wurden bei jedem zweiten Medienwechsel 10 µM AraC hinzugefügt.

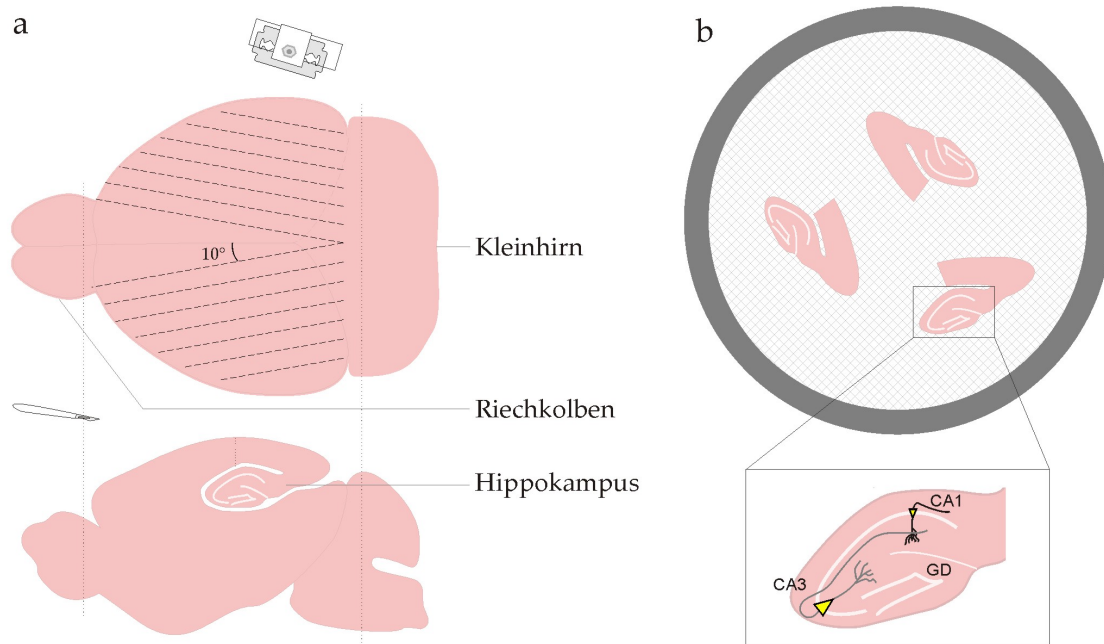


Abbildung 3.1: Präparation organotypischer hippocampaler Schnittkulturen. **a** Dorsale Ansicht eines Gehirns der Maus (oben). Riechkolben und Kleinhirn wurden entlang der gepunkteten Linie entfernt, die Schnittebenen sind durch gestrichelte Linien angedeutet. Schematische Darstellung eines Sagittalschnitts (unten). **b** Millicell[®]-Kultureinsatz mit hippocampalen Schnittkulturen (oben), schematische Darstellung der hippocampalen Formation (unten).

3.1.2 Dissoziierte hippocampale Neurone

3.1.2.1 Beschichtung von Kulturgefäßen zur Adhäsion hippocampaler Neurone

Zur Adhäsion hippocampaler Neurone an die Oberfläche von 24er Mikrotiterplatten wurden die einzelnen *Wells* mit Polyornithin (PO) beschichtet. Hierzu wurde 1 mg mL^{-1} PO in $0,15 \text{ M}$ Borsäure (pH 8,35) gelöst. Die PO-Lösung ($200 \text{ } \mu\text{L}/\text{Well}$) verblieb für mehr als fünf Stunden in Kontakt mit der Oberfläche der Mikrotiterplatte. Anschließend wurden Reste der PO-Lösung durch fünf Waschschrirte mit sterilem bidestilliertem Wasser entfernt. Die Mikrotiterplatten trockneten im Anschluss unter sterilen Bedingungen und wurden bei 4°C gelagert.

3.1.2.2 Präparation dissoziierter hippocampaler Neurone

Für die Präparation dissoziierter hippocampaler Neuronen wurden junge Ratten (P0-P3) verwendet. Nach der Dekapitierung wurde die Kopfhaut und der darunter liegende Schädel entlang der Sagittalnaht mithilfe eines Skalpell geöffnet. Das Gehirn wurde in eine mit MPBS +/+ (4 °C) gefüllte Präparationsschale überführt, der Hippokampus beider Hemisphären isoliert und anschließend mit Einschnitten an der Oberfläche versetzt. Die vorbereiteten Hippokampi wurden bis zum nachfolgenden Verdau in MPBS +/+ 4 °C aufbewahrt. Der durch die Oberflächenvergrößerung begünstigte Verdau der Hippokampi erfolgte in einer 0,25 %igen Trypsinlösung (verdünnt in MPBS -/-) bei 37 °C im Thermoschüttler (Thermomixer comfort) für aus Tabelle 3.1 zu entnehmende Inkubationszeiten. Nach mehrmaligem Triturieren der Gewebereste auf Eis wurde der Überstand in ein mit BME/10 % FCS gefülltes Röhrchen (15 mL) überführt. Die Zellsuspension wurde anschließend bei 1300 rpm für 10 min bei 4 °C zentrifugiert und das entstandene Pellet in 3 mL BME/10 % FCS aufgenommen. Diese sowohl Astrozyten als auch Neurone beinhaltende Zellsuspension wurde zur Trennung der beiden Zelltypen für circa eine Stunde bei 37 °C in einer 6 cm Petrischale inkubiert. Die unterschiedlichen Adhäsionseigenschaften beider Zelltypen wurden dabei ausgenutzt. Die Adhäsion von Astrozyten erfolgt schneller als die von Neuronen, weshalb sich diese nach der Inkubation weiterhin im Überstand befinden. Diese Neuronensuspension wurde in ein 15 mL Röhrchen überführt, bei 1300 rpm für 10 min bei 25 °C zentrifugiert und das entstandene Zellpellet in 3 mL BME/10 % FCS resuspendiert. 150 000 Neurone wurden pro *Well* einer 24er Mikrotiterplatte (PO-beschichtet, siehe Abschnitt 3.1.2.1) ausgesät. Nach 4-24 Stunden erfolgte ein Mediumaustausch von BME/10 % FCS durch NB/B27. Die Neuronenkulturen verweilten bis zur Transfektion mit siRNA (siehe Abschnitt 3.1.3) bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit.

Tabelle 3.1: Inkubationszeiten für den Verdau neuronalen Gewebes

Stadium	Inkubationszeit
P0-P1	8 min
P2	10 min
P3	12 min

3.1.3 siRNA Transfektion

Die Transfektion von dissoziierten hippokampalen Neuronen mit siRNA erfolgte mit Hilfe der HiPerFect Transfektionslösung entsprechend den Herstellerangaben. Zur Transfektion von fünf Tage alten hippokampalen Neuronen wurde pro Kulturwell 100 μL eines Transfektionsmixes hergestellt. Hierzu wurde sowohl HiPerFect als auch siRNA getrennt voneinander in NB/B27 verdünnt und anschließend vermengt. Für eine zusätzliche Pseudotransfektion wurde ein Transfektionsmix ohne siRNA hergestellt. Der Transfektionsmix wurde für 5-10 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurde das konditionierte Kulturmedium in den Kulturwells auf 400 μL reduziert, sodass das Endvolumen nach Zugabe des Transfektionsmixes 500 μL betrug. Die Konzentrationen von siRNA und HiPerfect können der Tabelle 3.2 entnommen werden. Der Transfektionsmix verblieb auf den Neuronenkulturen bis zu deren weiteren Verwendung.

Tabelle 3.2: Transfektionsmix

	Stockkonzentration	Menge	gelöst in
siRNA	20 μM	0,5 μL ¹	50 μL NB/B27
HiPerfect		2 μL	50 μL NB/B27

¹ entspricht 20 nM pro 500 μL Endvolumen

3.2 Molekularbiologie

3.2.1 Herstellung kompetenter Zellen

Kompetente *Escherichia coli* (*E. coli* C600) Zellen wurden entsprechend einer nach Hanahan [1983] modifizierten Methode hergestellt. Hierzu wurde LB-Medium (4 mL) mit *E. coli* C600 beimpft und über Nacht (ÜN) bei 37 °C (250 rpm) inkubiert. Die Vorkultur wurde in 100 mL LB-Medium (incl. 20 mM MgSO_4 , steril filtriert) transferiert und bis zum Erreichen einer $\text{OD}_{600} = 0,4 - 0,6$ bei 37 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (5 min bei 4500 x g, 4 °C) der Bakterienkultur wurde das Zellpellet in 40 mL kaltem TFB I Puffer resuspendiert und für 5 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Bakterienkultur durch einen weiteren Zentrifugationsschritt (wie zuvor) pelletiert und in 4 mL TFB II Puffer aufgenommen. Nach 15 - 60 min Inkubation bei 4 °C wurden die kompetenten *E. coli* C600 Zellen aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.2.2 Transformation kompetenter Zellen

Für die Transformation mit Plasmid-DNA wurden kompetente *E.coli* C600 Bakterien für 10 min auf Eis aufgetaut. 2,5 μL isolierter DNA-Lösung wurden zu 50 μL der kompetenten Bakterienlösung gegeben und für 10 min auf Eis inkubiert. Die Aufnahme der Plasmid-DNA erfolgte durch einen Hitzeschock (45 s bei 42°C). Anschließend wurden die transformierten Bakterien für 2 min auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 900 μL kaltem S.O.C. Medium wurde die Bakterienlösung für 60 min bei 37°C inkubiert und im Anschluss auf einer mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzten LB-Agarplatte ausplattiert.

3.2.3 Herstellung von Glycerinstocks

Einzelne Kolonien transformierter Zellen wurden für die Beimpfung von LB-Medium für die Herstellung einer Vorkultur verwendet (siehe Abschnitt 3.2.1). 200 μL der Bakterienkultur wurden mit 800 μL Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

3.2.4 Plasmidaufreinigung

Für die Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen wurde das EndoFree® Plasmid-Kit verwendet. Die Plasmidaufreinigung erfolgte entsprechend den Herstellerangaben und die aufgereinigte DNA wurde anschließend in Wasser gelöst. Sowohl die Konzentration als auch die Reinheit der DNA-Lösung wurden UV-spektroskopisch bestimmt. Anhand der gemessenen Extinktion bei 260 nm lässt sich die Konzentration doppelsträngiger DNA entsprechend des folgenden Verhältnisses berechnen:

$$E_{260} = 1 \text{ entspricht } 40 \mu\text{g mL}^{-1}$$

Die Abschätzung der Reinheit erfolgt über das Verhältnis der Extinktion bei 260 nm zu der Extinktion bei 280 nm. Hierbei sprechen Werte um 1,8 für eine reine DNA-Isolierung, Verhältnisse über 2 weisen auf eine erhöhte RNA-Konzentration hin und Werte unter 1,8 deuten auf eine Proteinkontamination. Mithilfe des verwendeten Aufreinigungssystems wurde sowohl der benötigte Reinheitsgrad (1,73 - 1,80) als auch die Abwesenheit von Endotoxinen gewährleistet, der für die Transfektion von Neuronen essentiell ist.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Herstellung von Ganzzelllysaten

Ganzzelllysate wurden aus dissoziierten hippokampalen Neuronen (siehe Abschnitt 3.1.2) nach sieben Tagen in Kultur beziehungsweise zwei Tage nach der siRNA-Transfektion (siehe Abschnitt 3.1.3) hergestellt. Dazu wurde das Kulturmedium abgenommen und verbleibende Mediumreste durch einen Waschschrift mit PBS (400 μL , 37°C) entfernt. Die Zelllysis erfolgte anschließend durch die Zugabe von 350 μL Lysispuffer (4°C), worin die Zellen für eine Minute auf einem gekühlten Aluminiumblock geschwenkt wurden. Nach mikroskopischer Kontrolle des Fortschritts der Zelllysis wurden die Zelllysate in Eppendorfgefäße überführt, für 5 min bei 4°C und 600 rpm im Thermomixer behandelt und anschließend für 10 min bei 13 000 x g (4°C) zentrifugiert (Centrifuge 5804 R). Der Überstand wurde aliquotiert und schrittweise zuerst auf -20°C, anschließend auf -80°C heruntergekühlt.

3.3.2 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der Ganzzelllysate wurde das BCA-Proteinassay Kit verwendet. Gemäß den Herstellerangaben wurde eine als Standard dienende BSA-Verdünnungsreihe (0 - 2 mg mL^{-1} verdünnt im in Abschnitt 3.3.1 beschriebenen Lysispuffer) angefertigt. 25 μL jedes BSA-Standards als auch der zu untersuchenden unverdünnten Proben wurden in einer 96er Mikrotiterplatte aufgetragen (Doppelbestimmung) und anschließend mit 200 μL der BCA-Arbeitslösung vermengt. Nach 30 min Inkubation bei 37°C wurde die Absorption bei 570 nm (Referenzwellenlänge: 405 nm) photometrisch bestimmt (Mikrotiterplatten-Photometer: Infinite® F200). Anhand der bekannten Konzentrationen der BSA-Verdünnungsreihe und den entsprechenden Absorptionswerten konnte eine Standardkurve angefertigt werden, die für die Bestimmung der Proteinkonzentration der zu untersuchenden Proben verwendet wurde. Die Gesamtproteinkonzentration einer Probe wurde zur Normierung der entsprechend Abschnitt 3.3.3 gemessenen BDNF-Konzentration der gleichen Probe verwendet.

3.3.3 BDNF-ELISA

Die Bestimmung des BDNF-Gehalts von Ganzzelllysaten dissoziierter hippocampaler Neurone erfolgte mittels des humanen BDNF-Immunoassays. Entsprechend den Herstellerangaben wurde die mit einem monoklonalen BDNF-Antikörper (*coat*-Antikörper) vorbehandelte Mikrotiterplatte mit der unverdünnten Probe beladen um vorhandenes BDNF zu binden. Nach zweistündiger Inkubation wurden ungebundene Moleküle durch drei Waschschriffe entfernt. Zu dem in der Mikrotiterplatte gebundenen BDNF-Protein wurde ein BDNF-spezifischer, Enzym-gekoppelter monoklonaler Antikörper hinzugefügt (Detektionsantikörper). Nach der Entfernung von überschüssigem Detektionsantikörper wurde die entsprechende Substratlösung hinzugefügt, deren Farbreaktion proportional zur gebundenen BDNF-Konzentration war. Diese Farbentwicklung wurde nach 30 min gestoppt und anschließend photometrisch bei 450 nm detektiert (Mikrotiterplatten-Photometer: Infinite[®] F200). Zur Wellenlängenkorrektur wurde die Absorption bei einer Referenzwellenlänge von 570 nm gemessen. Eine BDNF-Standard-Verdünnungsreihe diente der Erstellung einer Eichgeraden zur Bestimmung der BDNF-Konzentration in der Probe. Standardmäßig wurde eine Dreifachbestimmung der BDNF-Konzentration einer Probe durchgeführt.

3.4 Mikroskopie

3.4.1 Epifluoreszenzmikroskopie

Organotypische hippocampale Schnittkulturen wurden an einem aufrechten Systemmikroskop (BX51-WI) mit einem 10x (UMPLFL, n.A.: 0,3) und einem 60x (LUMPLFL/IR, n.A.: 0,9) Wasserimmersionsobjektiv untersucht. Zur Identifizierung und Analyse von transfizierten CA1 Pyramidenzellen wurde eine als Lichtquelle dienende 100 W Quecksilberdampfampe und ein geeigneter Filterwürfel (HQ-Filterset für eGFP) verwendet. Die Bildaufnahme erfolgte mit einer CCD Kamera (Spot RTTM SE6 Monochrome). Bei quantitativen Analysen der eGFP-Fluoreszenz war die Belichtungsdauer auf die Bildaufnahme beschränkt. Die Verschlussblende wurde elektronisch über die externe Shutterkontrolle (VMM-D1) mithilfe der MetaVue-Software gesteuert. Die Fluoreszenzbilder wurden später *offline* mithilfe der MetaMorph Software analysiert.

3.4.2 Konfokale Mikroskopie

3.4.2.1 Fixierung von organotypischen Hippokampusschnitten

Zwei bis drei Tage nach der juxtazellulären Transfektion (siehe Abschnitt 3.5.1) wurde die Fluoreszenz eGFP-exprimierender Neurone qualitativ mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop untersucht. Dieses geschah sowohl an unfixierten als auch fixierten Schnittkulturen. Die Fixierung erfolgte durch Inkubation in 4 % PFA (in 0,2 M Phosphat-Puffer) für eine Stunde bei Raumtemperatur (RT). Die Schnittkulturen wurden mit Immu-Mount auf Objektträger aufgebracht und über Nacht bei RT getrocknet. Die Präparate wurden bei -20°C und in Dunkelheit gelagert.

3.4.2.2 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Die qualitative Analyse eGFP-exprimierender Zellen erfolgte mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 780 am Axio Examiner). Als Punktlichtquelle diente ein Argonlaser (488 nm, 25 mW). Ein 20x (W Plan-ACHROMAT, n.A. 1,0) und ein 63x (W Plan-ACHROMAT, n.A. 1,0) Wasserimmersionsobjektiv wurden verwendet. Für die Bildakquisition wurde die Zen 2010 Software verwendet, wobei Übersichtsaufnahmen mit 20facher Vergrößerung und Detailaufnahmen mit 63facher Vergrößerung mit unterschiedlichen Einstellungen aufgenommen wurden (siehe unten). Die Bildbearbeitung erfolgte mit IMARIS.

	20x	63x
Laserintensität	0,1 %	2 %
Lochblende	33 μm	101 μm
Verweildauer / Pixel	0,39 μs	5,76 μs
Strahlenteiler	490 - 640 nm	

3.5 Elektrophysiologie

3.5.1 Juxtazelluläre Ableitung und Transfektion

Die Transfektion einzelner Neurone mittels elektrischer Stimulation wurde in acht bis elf Tage alten organotypischen Hippokampusschnitten mithilfe des ELC-03XS Verstärkers durchgeführt [Daniel et al., 2013]. Eine einzelne Schnittkultur wurde in eine mit sterilem und vorgewärmten (30 °C) HBS gefüllte Badkammer überführt. Die zu transfizierende DNA (0,065 µg µL⁻¹) / siRNA (0,65 µM)¹ wurde auf Eis aufgetaut und anschließend in einer der folgenden Pipettenlösungen (4 °C) verdünnt: HBS (angepasst an die Osmolarität des Kulturmediums) oder EPO-Puffer (Osmolarität entsprechend der *in vivo* Situation). Die DNA-Lösung wurde in eine Mikropipette mit einer besonderen Form gefüllt (hergestellt mit einem PIP5 Pipettenziehgerät, siehe Abbildung 3.2 a). Durch die vergleichsweise flache konische Pipettenspitze wird die Fällung der DNA in der Pipette minimiert, welches ansonsten zur Verstopfung der Pipettenöffnung führen könnte. Durch depolarisierende Spannungspulse (3 mV) wurde sowohl der Pipettenwiderstand, als auch der Abdichtwiderstand bei der Annäherung an eine nach morphologischen Kriterien ausgesuchte Zelle, gemessen. Nach Erreichen der *loose seal* Konfiguration (20 - 60 MΩ) wurde die neuronale Natur der gewählten Zelle durch das spontane Auftreten von Aktionsströmen oder deren Auslösen durch die überschwellige Stimulation der Schaffer-Kollateralen bestätigt. In Folge wurde die Einzelzelltransfektion durch ein hochfrequentes Stimulationsprotokoll (150 Pulse à 250 Hz) mit variierenden Stimulationsstärken im VC x 10 oder CC x 10² Modus durchgeführt. Juxtazelluläre Ableitungen wie auch die juxtazelluläre Transfektion erfolgten mit dem gleichen Verstärker (ELC-03XS). Die stimulierte Zelle wurde für 10s keinen weiteren elektrischen oder mechanischen Reizen ausgesetzt, um eine Regeneration zu begünstigen. Mit derselben Pipette wurden nacheinander bis zu zehn weitere Zellen behandelt. Anschließend wurde der Schnitt auf eine neue, äquilibrierte Millicell[®]-Membran überführt und verbleibende Pufferreste wurden sorgfältig entfernt. Die Schnitte wurden für zwei bis drei Tage bei 30 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Alle Komponenten des Versuchsaufbaus, die in Kontakt mit der Schnittkultur standen, wurden zu Beginn des Experiments mit 70 %igem Ethanol sterilisiert.

¹Endkonzentrationen

²*high range* VC bzw. CC-Modus, zur Stimulation und Elektroporation

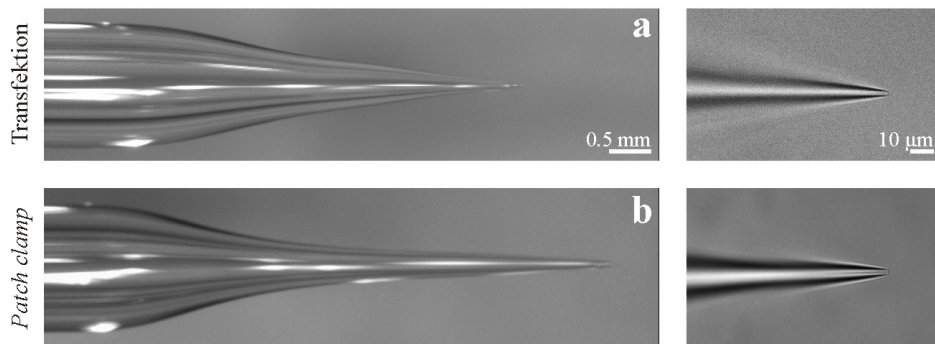


Abbildung 3.2: Eigenschaften von Glaspipetten für juxtazelluläre Ableitungen und Transfektion. **a** Aufnahme einer Mikropipette zur Nutzung für juxtazelluläre Transfektion (links). Eine konische Form ist für eine erfolgreiche Transfektion von Bedeutung. Phasenkontrastaufnahme der Pipettenspitze (\emptyset 2 μm) bei höherer Vergrößerung (rechts). **b** Aufnahme einer klassischen Mikropipette für *Patch clamp* Experimente (links) und deren Pipettenspitze bei höherer Vergrößerung (rechts).

3.5.2 Messung von Feldpotenzialen in der CA1 Region des Hippokampus

Feldpotentialmessungen wurden simultan mit juxtazellulären Messungen (siehe Abschnitt 3.5.1) an organotypischen Hippokampusschnitten durchgeführt (siehe Abbildung 3.3). Die Schnittkulturen wurden mit konstant begaster artifizierlicher Zerebrospinalflüssigkeit (aCSF1) überspült. Die Begasung mit 5% CO_2 / 95% O_2 erfolgte über eine Filterkerze (Porengröße 3). aCSF1 wurde ebenfalls als Pipettenlösung für Feldableitungen verwendet. Die Mikropipetten hatten einen Pipettenwiderstand von circa 1 $\text{M}\Omega$. Die Stimulationselektrode wurde im *stratum radiatum* positioniert, während die resultierenden Feldpotentiale im *stratum pyramidale* der CA1 Region abgeleitet wurden. Ein Einschnitt in der CA2 Region beugte spontanen und durch Stimulation induzierten Entladungen vor [De Simoni & Edwards, 2006, Schwartzkroin & Prince, 1978]. Für extrazelluläre Ableitungen wurde der EXT-02F Verstärker und das CED 1401 Interface verwendet. Die Korrektur des Offsets erfolgte individuell für jede Feldableitung. Das Signal wurde 200fach verstärkt und mit einem 3 kHz Tiefpassfilter gefiltert. Die Datendigitalisierung erfolgte mit 10 kHz und zur Datenaufnahme und -analyse wurde INTRACELL 1.5 Software verwendet.

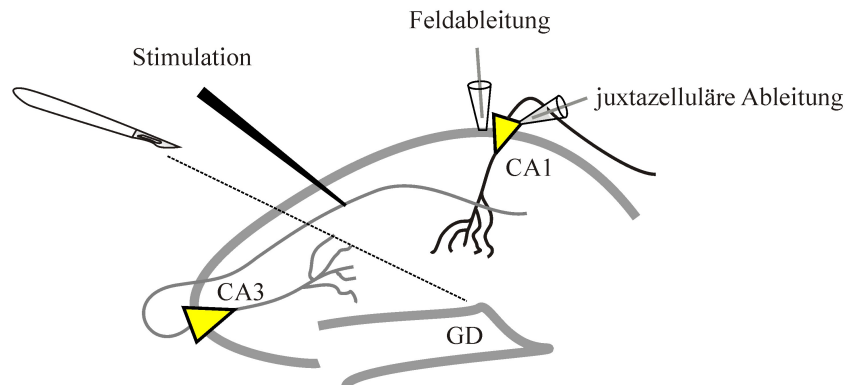


Abbildung 3.3: Simultane Ableitung von Feldpotentialen und juxtazellulären Strömen in der CA1 Region des Hippokampus nach präsynaptischer Stimulation. Die Stimulationselektrode wurde im *stratum radiatum* platziert, während juxtazelluläre und Feldableitungen in der CA1 Region gemessen wurden. CA: *Cornu ammonis*, GD: *Gyrus dentatus*

3.5.3 Whole-cell patch clamp Messungen in CA1 Pyramidenzellen

Ganzzelleableitungen wurden in ein bis zwei Wochen alten organotypischen Hippokampuschnitten durchgeführt. Mindestens eine Stunde vor Beginn des Experiments wurde ein Schnitt in der CA2 Region des Hippokampus gesetzt, um spontane wie auch durch Stimulation induzierte Entladungen zu verhindern. Während der Messung wurde der Schnitt mit einem Platinring in der Immersionskammer (LN Insert Typ C aus Keramik) fixiert und konstant mit begaster (5 % CO₂ / 95 % O₂) aCSF (Durchflussgeschwindigkeit: 2,5 mL min⁻¹) überspült.

Elektrophysiologische Messungen wurden mit der pClamp 8 Software gesteuert und ausgewertet. Als Hardwarekomponenten wurde der Digidata 1322 AD/DA-Wandler, ein Stimulator (Modell 2100) und ein EPC8 Verstärker verwendet. Der dazugehörige Operationsverstärker, das Systemmikroskop (BX51-WI) sowie die Stimulationselektrode wurden über Mikromanipulatoren (LN mini / combi) positioniert. Die für die Stimulation und Ganzzelleableitungen verwendeten Mikropipetten wurden aus Borosilikatglas (GB150F-8P) mithilfe eines Pipettenziehgeräts (PP-830) zu Beginn eines Experiments hergestellt. Deren Befüllung mit sterilfiltrierter (Membrex 4 CA; 0,2 μm) intrazellulärer Lösung (4 °C) erfolgte mit einem Glasfilament (Microfil 28 G). Der Pipettenwiderstand (6 - 9 MΩ) wurde mit depolarisierenden Spannungspulsen (3 mV) bestimmt und die Mikropipette anschließend mit Überdruck an die Schnittoberfläche herangeführt. Grenzflä-

chenpotentiale, die durch unterschiedliche Ionenkompositionen der intra- und extrazellulären Lösung entstehen, wurden vor Beginn der Sealbildung mit einer *Offset*-Korrektur herausgerechnet. Der Betrag des Grenzflächenpotentials wurde mit der pClamp Software für jede verwendete Lösungskombination berechnet und ist in Abschnitt 2.8 aufgeführt. Zur Ausbildung eines Seals wurde die Pipettenspitze mit leichtem Überdruck und unter Kontrolle des Pipettenwiderstands an die Zellmembran herangeführt bis eine leichte Eindellung der Membran zu erkennen war. Anstatt Überdruck wurde nun leichter Unterdruck an der Pipettenspitze angelegt bis der Gigaseal erreicht wurde. Die durch den Spannungspuls ausgelöste Stromantwort zum Test des Gigaseals weist zu dessen Beginn und Ende Umladeartefakte auf, die mithilfe des EPC-8 Verstärkers kompensiert wurden. Die Pipettenspitze wurde mit leichtem Überdruck wenige Mikrometer von der Zelle entfernt, um die Zellmembran zu entlasten. Anschließend wurde der Membranbereich unter der Pipette durch das Anlegen von Unterdruck durchbrochen und die *whole-cell patch clamp* Konfiguration erreicht. Im *whole-cell* Modus können nun sowohl Ionenströme in der Spannungsklemme (*voltage clamp* Modus) als auch das Membranpotential in der Stromklemme (*current clamp* Modus) abgeleitet werden. Im *voltage clamp* Modus abgeleitete Signale wurden, wenn nicht anders beschrieben, bei 3 kHz gefiltert (Besselfilter) und mit 10 kHz digitalisiert, während im *current clamp* Modus abgeleitete Signale bei 5 kHz gefiltert und mit 20 kHz digitalisiert wurden.

3.5.3.1 Messung von Aktionspotentialen

Aktionspotentiale von transfizierten Neuronen nach Kim et al. [2008]

Um die Möglichkeit der Regulation endogener Proteine durch das Einbringen von siRNA in Neurone über juxtazelluläre Transfektion (siehe Abschnitt 3.5.1) elektrophysiologisch zu untersuchen, wurden Ganzzelleableitungen durchgeführt. Die Messung von Aktionspotentialen in transfizierten CA1 Neuronen und untransfizierten Nachbarzellen erfolgte zwei Tage nach der Einzelzellelektroporation bei 32 °C. Transfizierte Neurone wurden durch ihre eGFP-Fluoreszenz identifiziert (siehe Abschnitt 3.4.1) und unter Verwendung der Lösungen aCSF2 und Intra1 für Ganzzelleableitungen verwendet. Unmittelbar nach dem Öffnen der Zelle wurde das Membranruhepotential im *current clamp* Modus bestimmt um anschließend ein Haltepotential von -70 mV anzulegen. Der Eingangswiderstand wurde bei diesen Messungen standardmäßig durch Strominjektion (-20 pA, 100 ms) mitbestimmt. Aktionspotentiale wurden durch Strominjektion (300 ms, 30 - 300 pA in 30 pA Inkrementen) ausgelöst. Für die Analyse der Aktionspotentiale wur-

de je Zelle das erste Aktionspotential von drei aufeinander folgenden *Bursts* (bei 300 pA Strominjektion) mit der Mini Analysis Software detektiert und gruppiert. Das daraus resultierende gemittelte Aktionspotential wurde entsprechend Abschnitt 3.5.3.1 ausgewertet.

Aktionspotentiale von mit DNA / BDNF-283 siRNA transfizierten Neuronen

Die Messung von elektrophysiologischen Eigenschaften wie zum Beispiel Aktionspotentiale von mit BDNF-283 siRNA kotransfizierten CA1 Pyramidenzellen erfolgte wie zuvor in diesem Abschnitt (3.5.3.1) beschrieben. Jedoch wurden die Messungen bei RT anstatt 32°C durchgeführt. Zudem wurden die Lösungen aCSF3 und Intra2 verwendet. Die ausgewerteten Aktionspotentiale wurden durch 120 pA Strominjektion für 300 ms ausgelöst.

Auswertung von Aktionspotentialen

Die Auswertung von Aktionspotentialen erfolgte mithilfe der Mini Analysis Software. Nach der Detektion des ersten Aktionspotentials aus einem Aktionspotentialburst wurde das *AP wave* Programm³ zur Analyse von Kinetik und Amplitude der Aktionspotentiale verwendet. Die Bestimmung von Schwellenwert, Anstieg 10–90%, Halbwertsbreite, Amplitude, AP-Breite und Nachhyperpolarisation erfolgte durch die *AP wave analysis* (siehe Abbildung 3.4). Die AP-Breite wurde hierbei entlang des Schwellenwerts berechnet.

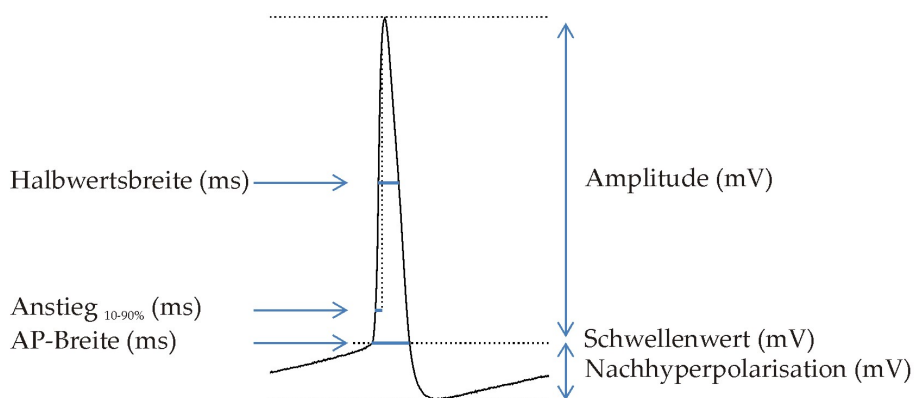


Abbildung 3.4: Parameter zur Charakterisierung von Aktionspotentialen. Die *AP wave analysis*-Funktion der Mini Analysis Software bestimmt u.a. folgende Eigenschaften eines Aktionspotentials: Schwellenwert, Anstieg 10–90%, Amplitude, Halbwertsbreite und Nachhyperpolarisation.

³in *group analysis and curve fitting*

3.5.3.2 Messung von Miniaturströmen

Die Messung von Miniaturströmen erfolgte in organotypischen hippocampalen Schnittkulturen zwei bis drei Tage nach der Einzelzelltransfektion und in untransfizierten Neuronen vergleichbaren Alters. Den zu untersuchenden CA1 Pyramidenzellen wurde während der elektrophysiologischen Charakterisierung ein Membranhaltpotential von -70 mV vorgegeben. Dieses entspricht näherungsweise dem Umkehrpotential von Chlorid (-65 mV) bei den durch die beschriebenen Lösungen (aCSF4 und Intra3) vorgegebenen Chloridkonzentrationen. Dementsprechend wurden nahezu keine inhibitorischen postsynaptischen Ströme detektiert sondern ausschließlich exzitatorische postsynaptische Ströme. Die Stromsignale wurden mit $0,7$ kHz (Tiefpassfilter) gefiltert. Spannungsabhängige Natriumströme wurden durch extrazelluläre Applikation von 1 μ M TTX blockiert.

Auswertung von Miniaturströmen

Die Auswertung der Miniaturströme erfolgte mit der MiniAnalysis Software. Ausgewertet wurden ausschließlich Messungen deren Serienwiderstand zu Beginn und Ende der Messung ($\Delta t = 3$ min) eine Änderung von maximal 25% aufwiesen. Zellen, die innerhalb der Messdauer weniger als 150 Miniaturstromereignisse zeigten, wurden aus der weiteren Analyse ebenfalls ausgeschlossen ($n = 3$). Generell wurden circa 250 oder mehr mEPSCs pro Zelle detektiert und ausgewertet. Die Detektionsparameter wurden bei Bedarf an den mEPSC-Verlauf angepasst, jedoch wurden nur Miniaturströme ausgewertet, die die folgenden generellen Kriterien erfüllten. Es wurden ausschließlich mPSCs mit negativer Ausrichtung detektiert, deren Anstieg $0-100\% \leq 10$ ms war. Ein Schwellenwert von ≥ 5 pA wurde für die Auswertung der mEPSC-Amplitude gesetzt, während es keine Ausschlusskriterien bezüglich der Amplitude für die Analyse der Ereignisfrequenz gab. Weiterhin wurde die Zeitkonstante bestimmt, bei der die mEPSC-Amplitude auf circa 37% ($1/e$) ihrer maximalen Amplitude gesunken war.

3.5.3.3 Langzeitpotenzierung (LTP)

Der Einfluss von BDNF auf die Veränderung der synaptischen Übertragung wurde an der CA3-CA1 Synapse von ein bis zwei Wochen alten organotypischen Hippokampus-schnittkulturen untersucht. Hierzu wurden Neurone der CA1 Region unter Verwendung der Lösungen aCSF5 und Intra4 für Ganzzelleableitungen herangezogen, während die präsynaptische Stimulation in der Schaffer-Kollaterale erfolgte (siehe Abbildung 3.5 a).

Die hier gewählte Stimulationsstärke wurde für jede Zelle individuell bestimmt und entsprach $30 \pm 10\%$ der maximal evozierbaren, jedoch nicht überschwelligen postsynaptischen Stromantwort. Der Stimulus ($50 - 500 \mu\text{A}$, Dauer: $20 \mu\text{s}$) erfolgte alle 15s. Membran- und Serienwiderstand wurden während einer Messung kontinuierlich durch hyperpolarisierende Spannungspulse (-3 mV , 60 ms) verfolgt. Bei Abweichungen von mehr als $\pm 20\%$ vom Wert vor LTP-Induktion wurden die entsprechenden Messungen nicht in die Auswertung integriert.

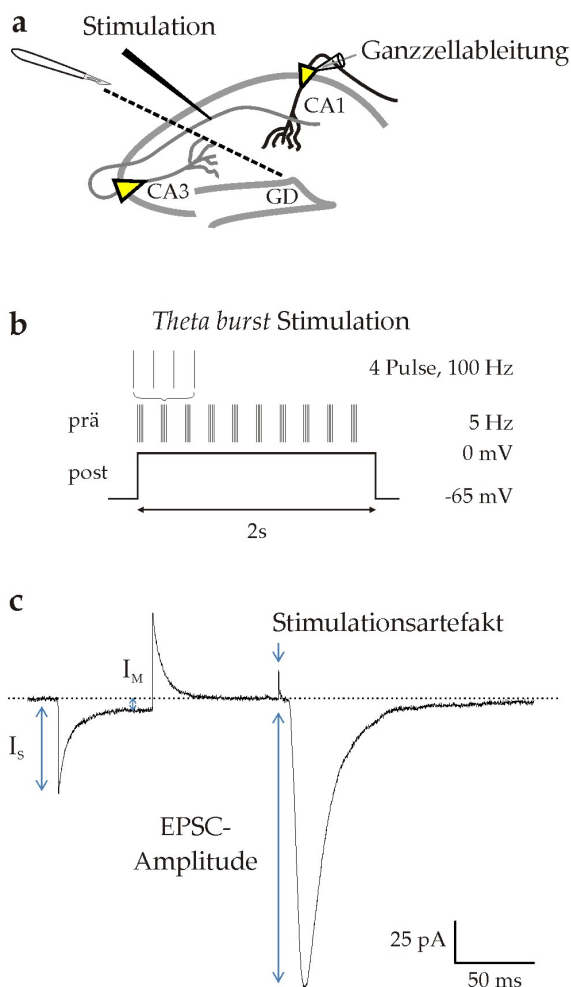


Abbildung 3.5: **a** Schematische Darstellung der hippocampalen Organisation. Ganzzellableitungen wurden an Neuronen der CA1 Region nach präsynaptischer Stimulation der Schaffer-Kollateralen gemessen. Die CA1 Region wurde durch einen Schnitt von der CA3 Region getrennt. **b** Schematische Darstellung der *Theta burst* Stimulation. **c** Beispielhafte Darstellung eines exzitatorischen postsynaptischen Stroms (EPSC) mit vorangehendem Test des Serien- und Membranwiderstands. Ein hyperpolarisierender Spannungspuls (-3 mV , 60 ms) führt zu einer schnellen (I_S) und zu einer kontinuierlichen Stromantwort (I_M). Anhand dieser Stromamplituden lassen sich nach dem Ohmschen Gesetz der Serien- und Membranwiderstand berechnen. Die präsynaptische Stimulation der Schaffer-Kollaterale erzeugt ein Stimulationsartefakt und ein exzitatorisches postsynaptisches Potential, dessen Amplitude ausgewertet wird.

LTP-Induktion

Die Induktion der Langzeitpotenzierung erfolgte durch ein gepaartes *Theta burst* Protokoll. Klassischerweise wird hierbei die Schaffer-Kollaterale vier Mal mit einer Frequenz von 100 Hz stimuliert. Diese hochfrequente Stimulation wurde zehn Mal alle 200 ms (5 Hz) entsprechend den hippokampalen Theta-Oszillationen wiederholt [Larson & Lynch, 1986, Lin et al., 2005]. Währenddessen wurde die postsynaptische CA1 Pyramidenzelle von -65 mV auf 0 mV depolarisiert (siehe Abbildung 3.5 b). Das beschriebene Induktionsprotokoll wurde zwei Mal in einem Abstand von 15 s appliziert.

LTP-Auswertung

Die Auswertung der EPSC-Amplitude erfolgte mit der pClamp Software (siehe Abbildung 3.5 c). Anhand der prozentualen Änderung der EPSC-Amplitude 25 - 30 min nach LTP-Induktion konnte der Wert der Langzeitpotenzierung bestimmt werden.

3.6 Statistik

Die in dieser Arbeit erhaltenen Messwerte wurden auf ihre Normalverteilung hin untersucht (*Shapiro-Wilk-Test*). Bei einer normal verteilten Messkollektive repräsentieren die aufgeführten Ergebnisse, wenn nicht explizit anders beschrieben Mittelwert \pm Standardfehler und der Zweistichproben-T-Test wurde für Tests der statistischen Signifikanz herangezogen. Für multiple Vergleich wurde eine ANOVA angewandt mit bei Signifikanz darauf folgendem *post-hoc* Test. Eine nicht normal verteilten Messkollektive wurde als Boxplot dargestellt und der nicht parametrische *Mann-Whitney-U-Test* wurde als Signifikanztest verwendet.

4 Ergebnisse

Das Protein BDNF übt eine Vielzahl von Funktionen aus. Es unterstützt die neuronale Differenzierung, fördert das Wachstum der Neurite und beeinflusst die synaptische Transmission sowie Plastizität. Um jedoch eine dieser Funktionen einem speziellen Zelltyp, beziehungsweise eventuell sogar ihrem subzellulären Wirkungsort zuzuordnen, bedarf es der Manipulation und Analyse einer einzelnen ausgewählten Zelle in einem multizellulären Netzwerk, ohne jedoch dieses Netzwerk dabei zu beeinflussen. Daher war es in bisherigen Studien, unter Verwendung von transgenen Tieren, dem Einsatz pharmakologischer Blockaden oder Überexpressionsstrategien nicht möglich, die Ausschüttung sowie die Wirkung von BDNF während der Ausübung seiner Funktionen zweifelsfrei zu lokalisieren. Aufgrund dessen ist die Etablierung neuer experimenteller Ansätze notwendig. Zu diesem Zweck soll in der vorliegenden Arbeit eine Methode entwickelt werden, welche die Identifizierung einzelner Neurone und deren genetische Manipulation kombiniert.

4.1 Kombination von juxtazellulärer Ableitung und Transfektion

Die Einzelzellektroporation ist eine etablierte Methode zum Transfer von Substanzen, wie beispielsweise niedermolekularen Farbstoffen, in einzelne Zellen. Nach entsprechender Weiterentwicklung war auch das Einbringen von Plasmid-DNA möglich, was eine transiente genetische Manipulation auf Einzelzellniveau erlaubte. Um vor der Transfektion jedoch Nervenzellen über die Generierung von Aktionsströmen identifizieren zu können, bedarf es eines verringerten Abstands zwischen Transfektionspipette und Zelle. Der Abdichtwiderstand ist ein Maß für diesen Abstand. Niederohmige Abdichtwiderstände (20 - 60 M Ω), wie sie in der *loose seal* Konfiguration üblich sind, ermöglichen die

Ableitung neuronaler Aktionsströme. Darüber hinaus wurde ein spezieller Verstärker verwendet, der sowohl elektrophysiologische Messungen im pA-Bereich, wie auch starke Stimulation zuließ. Um die Einzelzelltransfektion im *loose seal* Modus (juxtazelluläre Transfektion) zu etablieren, wurden organotypische hippocampale Schnittkulturen [Stoppini et al., 1991] verwendet. Nach 8 - 11 Tagen in Kultur wurden einzelne CA1 Pyramidenzellen nach morphologischen Kriterien ausgesucht. Daraufhin wurden juxtazelluläre Ableitungen vorgenommen, um die Zelle anschließend mit dem für eGFP-kodierenden Plasmid (pEGFP-N1) zu transfizieren. 1 - 3 Tage nach der Transfektion diente die grüne Fluoreszenz der Identifizierung der manipulierten Zelle (siehe Abbildung 4.1).

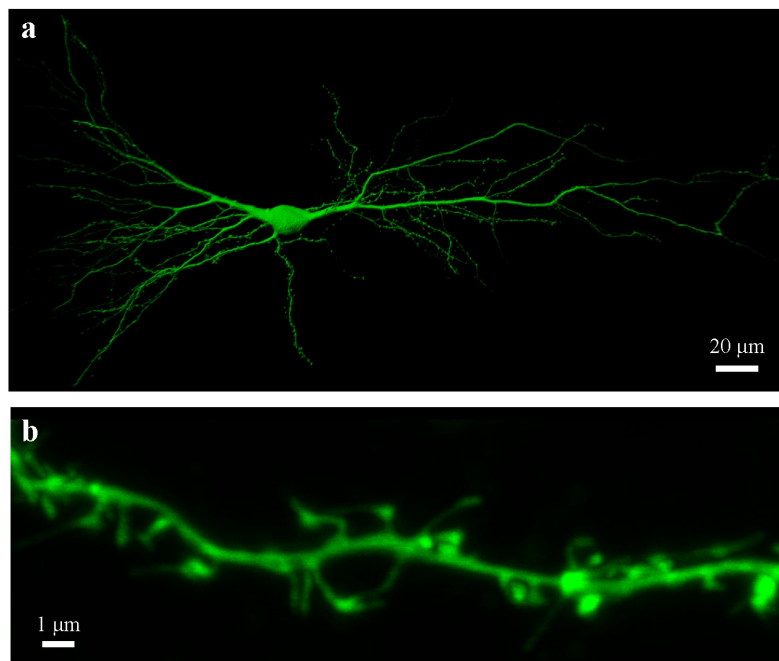


Abbildung 4.1: eGFP exprimierende CA1 Pyramidenzelle in einer organotypischen hippocampalen Schnittkultur. Hippokampale Schnittkulturen wurden entsprechend einer von Stoppini et al. [1991] beschriebenen Methode hergestellt. Einzelne Neurone wurden mit einem eGFP-kodierendem Plasmid transfiziert. 2 Tage nach der Transfektion wurden diese transient genetisch modifizierten Zellen mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie analysiert. **a** 3D-Rekonstruktion einer CA1 Pyramidenzelle. **b** Beispiel einer dendritischen Struktur mit höherer Auflösung. (Modifiziert nach Daniel et al. [2013])

4.1.1 Juxtazelluläre Ableitung von Aktionsströmen

Die juxtazelluläre Ableitung von Aktionsströmen, wie auch die Effizienz der juxtazellulären Transfektion ist von verschiedenen Parametern abhängig. Eine entscheidende Variable stellt zum Beispiel die Zusammensetzung der verwendeten Pipettenlösung dar. Um verschiedene Lösungen auf ihre Verwendbarkeit für die Kombination von juxtazellulärer Ableitung und Transfektion zu testen, wurden zwei verschiedene HEPES-gepufferte Lösungen benutzt. Die verwendeten Lösungen unterschieden sich vorrangig in ihrer Osmolarität und ihrem pH-Wert (siehe Tabelle 4.1). Die Osmolarität der HBS-Lösung war an die Osmolarität des verwendeten Kulturmediums für organotypische Schnittkulturen angepasst ($240 \text{ mOsmol L}^{-1}$). Hingegen entsprach die Osmolarität des Elektroporationspuffers (EPO-Puffer, $293 \text{ mOsmol L}^{-1}$) einem Wert, wie sie für Zerebrospinalflüssigkeit bekannt ist ($280 - 300 \text{ mOsmol L}^{-1}$). Die verwendeten Nukleinsäuren wurden zunächst in den Pipettenlösungen verdünnt. Anschließend wurde eine für die juxtazelluläre Transfektion geeignete Pipette (siehe Methoden: Abschnitt 3.5.1) mit der verdünnten DNA-Lösung befüllt. Die Pipette wurde mit Überdruck an die zu transfizierende Zelle herangeführt. Währenddessen wurde zur Kontrolle von Pipetten- und Abdichtwiderstand ein depolarisierender Spannungspuls (3 mV) appliziert. Nach Kontaktausbildung zwischen Zelle und Pipette wurde der Überdruck durch leichten Unterdruck ersetzt, um die *loose seal* Konfiguration zu erreichen. Nach Ausbildung des *loose seal* Modus wurde das Auftreten von Aktionsströmen gemessen. In Abhängigkeit der verwendeten Pipettenlösung waren sowohl Abdicht- wie auch Pipettenwiderstand signifikant unterschiedlich (Mann-Whitney-U-Test: $p < 0,001$; siehe Tabelle 4.1). Aktionsströme konnten in 77 % (HBS) beziehungsweise 78 % (EPO-Puffer) der Zellen detektiert werden. Die durchschnittliche Amplitude der Aktionsströme war unter Verwendung von HBS niedriger ($45 \pm 13 \text{ pA}$) als unter Verwendung des EPO-Puffers ($61 \pm 25 \text{ pA}$) (siehe Tabelle 4.1 und Abbildung 4.2), ohne jedoch ein statistisches Signifikanzniveau zu erreichen (T-Test: $p = 0,1$).

Tabelle 4.1: Pipetten- und Abdichtwiderstand von Mikropipetten wird von der Pipettenlösung bestimmt.

	HBS	EPO-Puffer
Osmolarität (mOsmol L ⁻¹)	240	293
pH	7,38	7,05
Pipettenwiderstand (MΩ)	8,5 ± 0,88 (n = 42)	7,3 ± 0,98* (n = 41)
Abdichtwiderstand (MΩ)	45,6 ± 17,0 (n = 34)	29,7 ± 12,8* (n = 44)
Aktionsstromamplitude (pA)	45 ± 13 (n = 10)	61 ± 25 (n = 7)

Bei der juxtazellulären Transfektion wurden die zu untersuchenden Nukleinsäuren in zwei verschiedenen Pufferlösungen verdünnt: HEPES-gepufferte Saline (HBS) und EPO-Puffer. Die Zusammensetzung beider Puffer basiert auf einer HEPES-gepufferten extrazellulären Lösung und unterscheidet sich vorrangig im pH-Wert und der Osmolarität. Mikropipetten wurden mit dem entsprechenden Nukleinsäure-beinhaltenen Puffer befüllt. Pipetten- und Abdichtwiderstand wurden durch depolarisierende Spannungspulse (3 mV) bestimmt. Unter Verwendung von HBS waren sowohl Pipetten- als auch Abdichtwiderstand im Vergleich zum EPO-Puffer signifikant erhöht. Die gemessenen Aktionsströme zeigten jedoch keinen signifikanten Unterschied in der Amplitude. Angegebene Werte repräsentieren Mittelwert ± Standardabweichung. (Modifiziert nach Daniel et al. [2013])

* Mann-Whitney-U-Test: $p < 0,001$

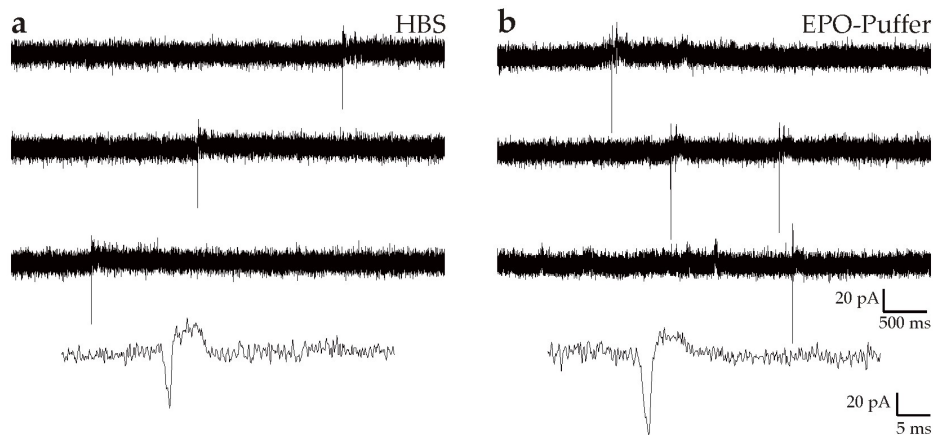


Abbildung 4.2: Identifizierung von Neuronen durch juxtazelluläre Ableitungen. **a** Spontane Aktionsströme von CA1 Pyramidenzellen wurden im *loose patch* Modus gemessen. Unter Verwendung von HBS zeigten 77 % der untersuchten Zellen spontane Aktionsströme mit einer durchschnittlichen Amplitude von 45 ± 13 pA. Ein repräsentativer Aktionsstrom ist mit größerer zeitlicher Auflösung gezeigt. **b** Mit EPO-Puffer als Pipettenlösung zeigte eine vergleichbare Anzahl an Zellen spontane Aktionsströme (78 %), jedoch war die durchschnittliche Amplitude leicht erhöht (61 ± 25 pA). (Modifiziert nach Daniel et al. [2013])

Darüber hinaus ließen sich Aktionsströme in 76 % der juxtazellulär abgeleiteten Zellen durch überschwellige Stimulation der Schaffer-Kollateralen ausfallsfrei evozieren ($n = 75$ Zellen). Simultane Ableitung von Aktionsströmen und somatischen Summenpotentialen nach Stimulation der Schaffer-Kollateralen ließen einen zeitgleichen Verlauf erkennen (siehe Abbildung 4.3 a). Zudem konnten sowohl Aktionsstrom als auch Summenpotential durch die Applikation von $1 \mu\text{M}$ TTX blockiert werden. Zusammengenommen konnte daher bestätigt werden, dass es sich bei den abgeleiteten kapazitiven Strömen tatsächlich um Aktionsströme handelt. Das Vorkommen von spontanen Aktionsströmen identifizierte die abgeleitete Zelle als Neuron.

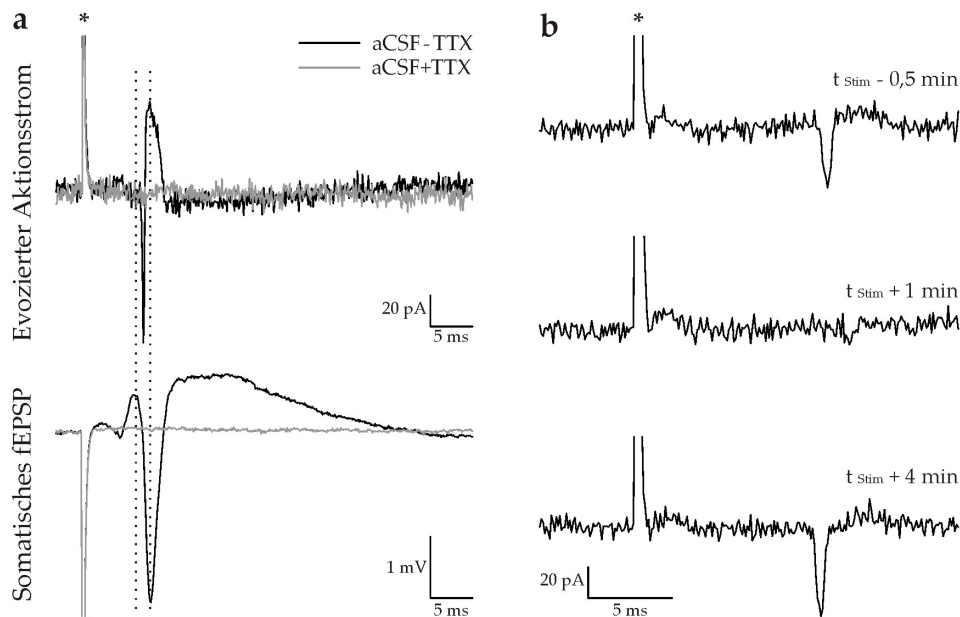


Abbildung 4.3: **a** Simultane Ableitung von Aktionsströmen (oben) und Feldpotentialen (unten) nach präsynaptischer Stimulation der Schaffer-Kollateralen. Der synaptisch evozierte Aktionsstrom tritt zeitgleich mit dem Summenpotential auf. Sowohl Aktionsstrom als auch fEPSP wurden durch die Applikation von $1 \mu\text{M}$ TTX blockiert. **b** Evozierte Aktionsströme vor und nach juxtazellulärer Transfektion. Eine überschwellige präsynaptische Stimulation löste vor der Transfektion einen Aktionsstrom aus, der nach Applikation des Transfektionspulses in 33 % der Fälle nach mehr als 4 min erneut auftrat. * repräsentiert Stimulationsartefakt. (Modifiziert nach Daniel et al. [2013])

Verschiedene Neuronentypen werden durch ihr unterschiedliches Entladungsverhalten charakterisiert. Um das Entladungsverhalten von glutamatergen und GABAergen Neuronen im *loose seal* Modus zu untersuchen, wurden juxtazelluläre Ableitungen in der CA1 Region von hippocampalen Schnittkulturen von GAD67-GFP Mäusen durchgeführt. Im *Stratum pyramidale* wurden die spontanen Aktionsströme von GAD67-GFP-negativen CA1 Pyramidenzellen und GAD67-GFP-positiven Interneuronen charakterisiert. Die Analyse des Inter-Aktionsstrom-Intervalls, der Aktionsstromfrequenz sowie der Amplitude der Aktionsströme zeigte keine signifikanten Unterschiede (Mann-Whitney-U-Test: $p > 0,35$) zwischen den Aktionsströmen GAD67-GFP-positiver und -negativer Zellen (siehe Abbildung 4.4). Im *loose seal* Modus war daher eine Unterscheidung von Interneuronen und glutamatergen Neuronen anhand spontaner Aktionsströme nicht möglich.

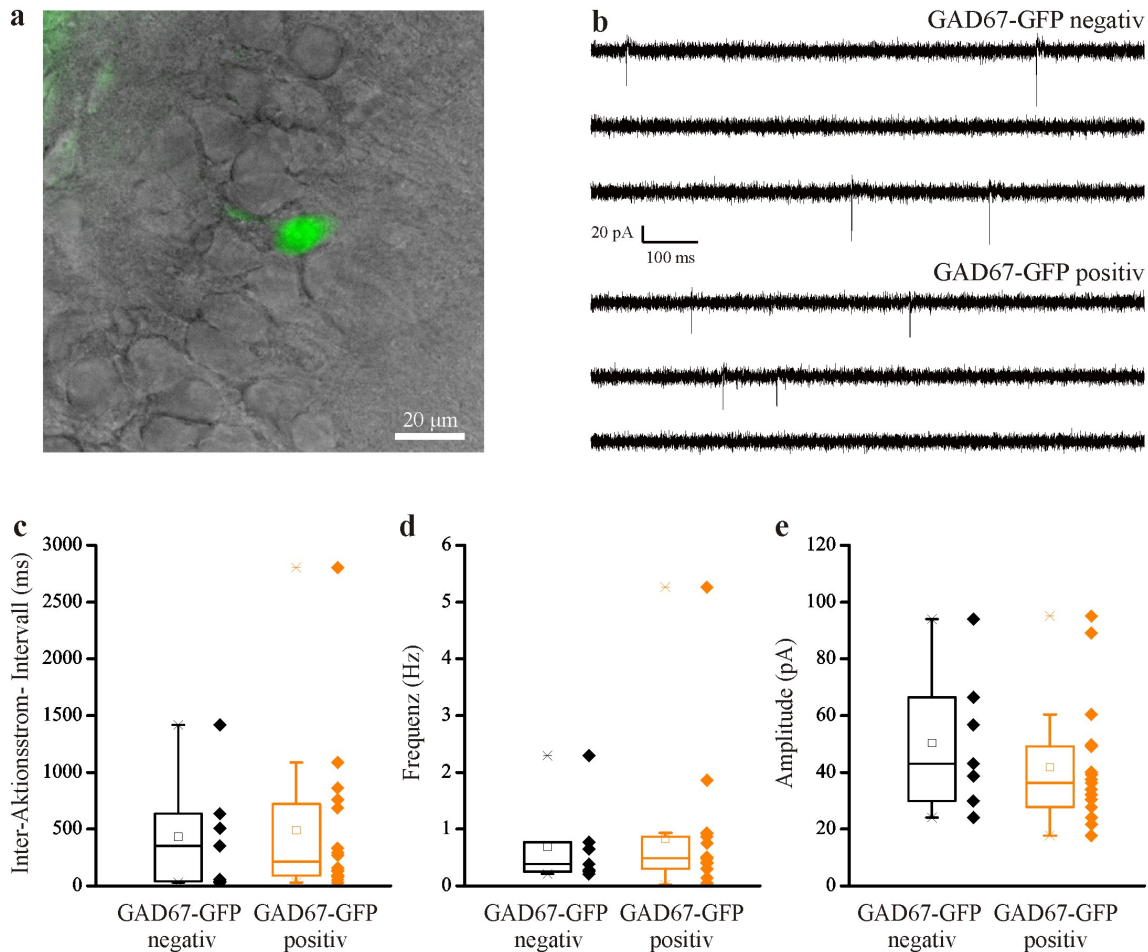


Abbildung 4.4: Juxtazelluläre Ableitung von Aktionsströmen an hippocampalen Neuronen aus GAD67-GFP Schnittkulturen. **a** Repräsentative Abbildung der CA1 Region. Das Durchlichtbild ist mit der entsprechenden GFP-Fluoreszenz überlagert. **b** Repräsentative Stromspuren einer GAD67-GFP-negativen Pyramidenzelle (oben) und eines GAD67-GFP-positiven Interneurons. Quantitative Analyse des Inter-Aktionsstrom-Intervalls (**c**), der Aktionsstromfrequenz (**d**) und der Aktionsstromamplitude (**e**). Es konnte in keinem der untersuchten Parameter ein signifikanter Unterschied zwischen glutamatergen und GABAergen Neuronen festgestellt werden (Mann-Whitney-U-Test: $p > 0,35$). (Modifiziert nach Daniel et al. [2013])

4.1.2 Juxtazelluläre Transfektion

In unmittelbarem Anschluss an die juxtazellulären Ableitungen erfolgte die transiente genetische Manipulation einzelner identifizierter Neurone im *Stratum pyramidale* mithilfe der juxtazellulären Transfektion. Das hierfür verwendete hochfrequente Transfektionsprotokoll bestand aus 150 Pulsen à 2 ms mit einer Frequenz von 250 Hz. Die Stimulationsstärke wurde variiert, um ihren Einfluss auf die Transfektionseffizienz zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurden 6 - 10 Zellen einer hippocampalen Schnittkultur nacheinander mit pEGFP-N1 juxtazellulär transfiziert. Die in Folge der hochfrequenten Stimulation resultierende Stromantwort zeigte einen charakteristischen Verlauf (siehe Abbildung 4.5 a). Kennzeichnend ist der Anstieg der gemessenen Stromantwort während der Transfektion. Dieser ließ entsprechend dem Ohmschen Gesetz ($U = R \cdot I$) auf eine Reduktion des Abdichtwiderstands während der hochfrequenten Stimulation schließen.

Im Anschluss an die juxtazelluläre Transfektion wurde der Einfluss der hochfrequenten Stimulation auf die Aktionsströme untersucht. Die präsynaptische Stimulation der Schaffer-Kollateralen löste kurz nach der Transfektion mit einer Stimulationsstärke von $-1,4\text{ V}$ keine Aktionsströme aus (siehe Abbildung 4.3 b). Jedoch konnten diese bereits vier Minuten nach der hochfrequenten Stimulation in 33 % der Zellen wieder detektiert werden.

Zwei Tage nach der juxtazellulären Transfektion wurde die Transfektionseffizienz bestimmt. Dafür wurde die Anzahl eGFP-positiver Zellen ins Verhältnis zur Anzahl juxtazellulär stimulierter Zellen gesetzt. Die Stimulationsstärke in Kombination mit der zur Verdünnung der DNA verwendeten Pipettenlösung beeinflussten die Transfektionseffizienz. Mithilfe der juxtazellulären Transfektion konnte unter Verwendung von HBS als Pipettenlösung und einer Stimulationsstärke von $-1,4\text{ V}$ eine maximale Transfektionseffizienz von $40 \pm 15\%$ erzielt werden (siehe Abbildung 4.5 b). Dahingegen lag die maximale Transfektionseffizienz unter Verwendung des EPO-Puffers als Pipettenlösung bei $23 \pm 5\%$. Diese Transfektionseffizienz wurde mit einer Stimulationsstärke von $-1,2\text{ V}$ erreicht. Für die jeweils optimale Stimulationsstärke, lag die gemessene mittlere Stromantwort bei ca. -130 nA . Daher wurde die juxtazelluläre Transfektion ebenfalls in der Stromklemme mit einer Stimulationsstärke von -130 nA getestet. pEGFP-N1 (verdünnt in HBS) wurde mittels dieses Transfektionsprotokolls erfolgreich in CA1 Pyramidenzellen transfiziert (siehe Abbildung 4.5 c). Die Applikation des Transfektionsprotokolls in der Stromklemme führte zu vergleichbaren Transfektionseffizienzen wie die juxtazelluläre Transfektion in der Spannungsklemme.

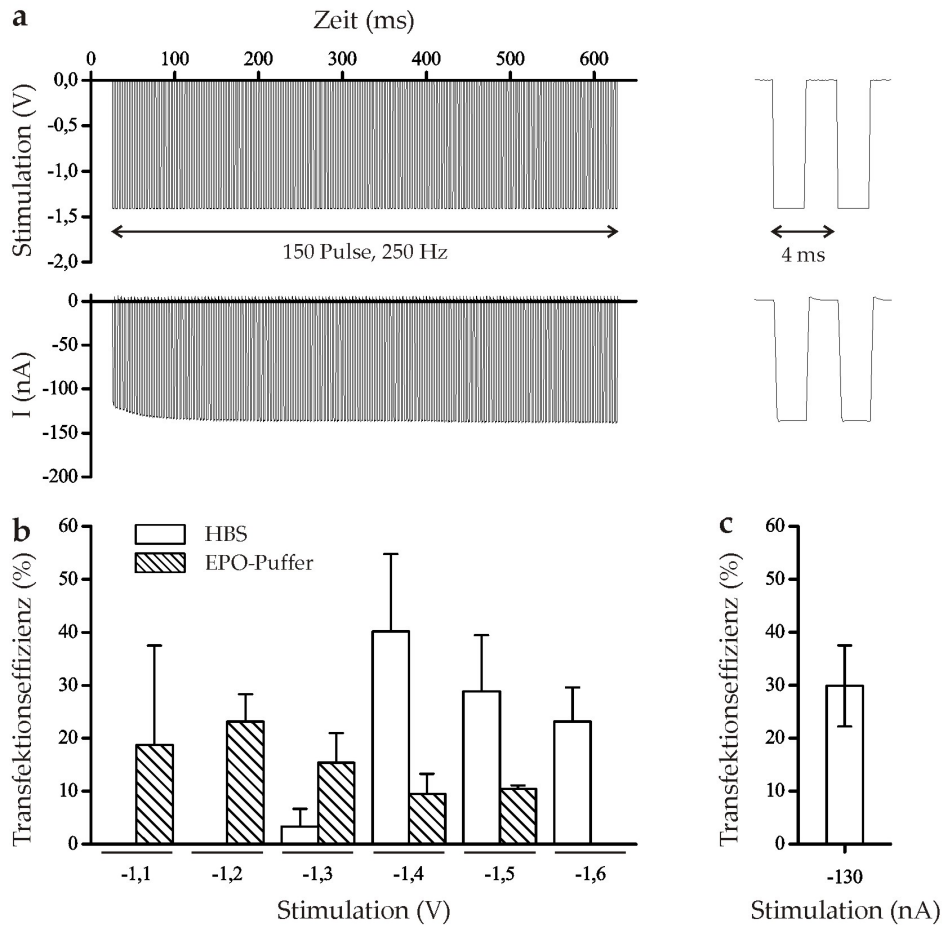


Abbildung 4.5: Die Transfektionseffizienz ist abhängig von der Pipettenlösung und der Stimulationsstärke. Hippokampale Schnittkulturen wurden nach 8 DIV transfiziert. CA1 Neurone wurden anhand ihrer morphologischen und elektrophysiologischen Eigenschaften ausgewählt. Mikropipetten wurden mit pEGFP-N1 in HBS bzw. EPO-Puffer (67 ng mL^{-1}) befüllt. **a** Hochfrequente Stimulation im *loose seal* Modus (oben: 150 Pulse à 2 ms, 250 Hz). Die entsprechende Stromantwort (unten) variierte in Abhängigkeit von der Zeit. Stimulation und Stromantwort mit höherer zeitlicher Auflösung (rechts). **b** Stimulationsstärken von $-1,1$ - $-1,6$ V wurden untersucht. 2 Tage nach der Transfektion wurde die Transfektionseffizienz quantifiziert. Unter Verwendung von HBS waren 40 % der mit einer Stimulationsstärke von $-1,4$ V stimulierten Neurone transfiziert. Mit einer Stimulationsstärke von $-1,2$ V war eine maximale Transfektionseffizienz von 23 % bei Verdünnung der DNA im EPO-Puffer erreichbar. **c** Eine vergleichbare Transfektionseffizienz wurde nach juxtazellulärer Transfektion in der Stromklemme mit einer Stimulationsstärke von -130 nA erzielt. Fehlerbalken repräsentieren Standardfehler. (Modifiziert nach Daniel et al. [2013])

Zusammenfassend konnte mit beiden Pipettenlösungen die juxtazelluläre Transfektion hippokampaler CA1 Pyramidenzellen mit pEGFP-N1 erfolgen. Die optimale Stimulationsstärke variierte in Abhängigkeit von der verwendeten Pipettenlösung und des daraus resultierenden Abdichtwiderstands. In beiden Fällen war jedoch eine Stimulation mit circa -130 nA optimal für die Transfektion der Zelle.

4.2 Protein-*Knockdown* durch juxtazelluläre Transfektion von siRNA

4.2.1 *Knockdown* von eGFP

Um die Möglichkeit eines Protein-*Knockdowns* durch juxtazelluläre Transfektion von siRNA in einzelnen Neuronen zu überprüfen, wurde zunächst der siRNA-vermittelte *Knockdown* der eGFP-Expression geprüft. Hierfür wurden CA1 Neurone mit dem für eGFP kodierenden Plasmid pEGFP-N1 und einer gegen eGFP-mRNA gerichteten siRNA (GFP-22 siRNA) beziehungsweise einer Kontroll siRNA kotransfiziert. Zwei Tage nach der Einzelzelltransfektion wurden eGFP-exprimierende Neurone fluoreszenzmikroskopisch untersucht (siehe Abbildung 4.6 a/b). Die somatische Fluoreszenzintensität war bei Neuronen, die mit GFP-22 siRNA kotransfiziert wurden, auf 3 % des Kontrollniveaus reduziert (siehe Abbildung 4.6 c). Die signifikante Reduktion der eGFP-Expression (Mann-Whitney-U-Test: $p < 0,001$) bestätigt daher zum einen die Wirksamkeit von siRNA auf exogene Plasmid-DNA nach juxtazellulärer Transfektion und zum anderen die Möglichkeit der juxtazellulären Kotransfektion von Plasmid-DNA und siRNA.

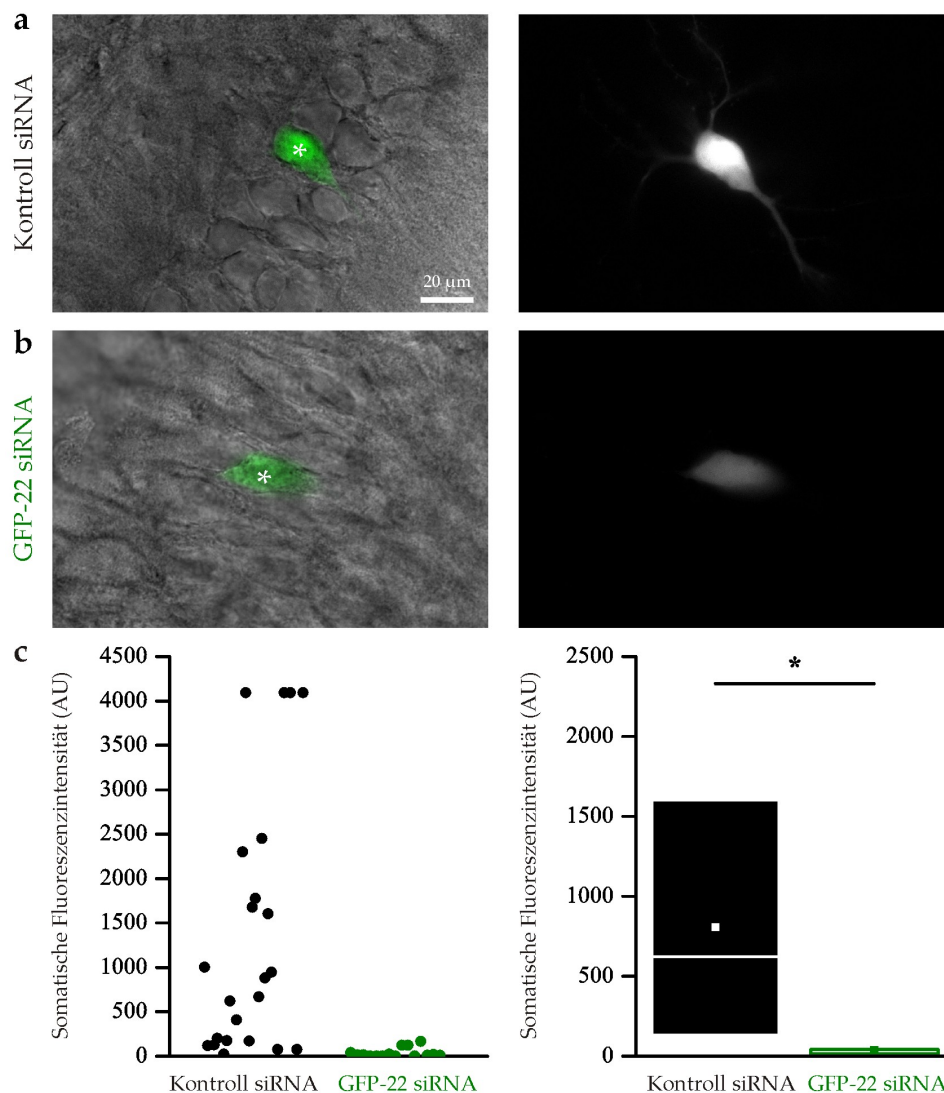


Abbildung 4.6: *Knockdown* von eGFP durch juxtazelluläre Transfektion. Einzelne CA1 Pyramidenzellen wurden mit pEGFP-N1 und gegen eGFP gerichtete siRNA (GFP-22) bzw. einer Kontroll siRNA kotransfiziert. 2 Tage nach der Einzelzelltransfektion wurde die eGFP-Fluoreszenzintensität analysiert. Repräsentative Abbildung von CA1 Neuronen nach Kotransfektion mit Kontroll siRNA (**a**) und GFP-22 siRNA (**b**). Überlagerung von eGFP-Fluoreszenz und Durchlichtbild (links), eGFP-Fluoreszenz mit identischer Signalskalierung (rechts). **c** Quantitative Analyse der somatischen eGFP-Fluoreszenz von Neuronen, die mit Kontroll ($n = 23$) bzw. GFP-22 ($n = 15$) siRNA kotransfiziert worden waren. Die Werte der Fluoreszenzintensität einzelner Zellen sind links dargestellt, der eGFP-*Knockdown* ist in einem Boxplot quantifiziert (rechts; Mann-Whitney-U-Test: $p < 0,001$). * repräsentiert transfizierte Zelle (Modifiziert nach Daniel et al. [2013])

4.2.2 *Knockdown* von endogenem DPP6

Im folgenden wurde der Protein-*Knockdown* von einem endogen exprimierten Protein durch juxtazelluläre Transfektion untersucht. Hierzu wurden CA1 Pyramidenzellen mit einer bereits beschriebenen, gegen *Dipeptidyl-peptidase like protein 6* (DPP6)-mRNA gerichteten siRNA [Kim et al., 2008] juxtazellulär transfiziert. DPP6 ist ein Protein, das die biophysikalischen Eigenschaften von *Kv4* Kanälen reguliert. Die siRNA-vermittelte Regulierung des Expressionsniveaus von DPP6 wurde zwei Tage nach juxtazellulärer Transfektion elektrophysiologisch untersucht. Zunächst wurden die Eigenschaften der durch Strominjektion (300 pA, 100 ms) ausgelösten Aktionspotentiale analysiert (siehe Abbildung 4.7 a). Die Aktionspotentiale von Neuronen, die mit DPP6 siRNA transfiziert worden waren, zeigten signifikante Unterschiede zu den Aktionspotentialen untransfizierter Neurone sowie Neurone, die mit Kontroll siRNA transfiziert worden waren. Schwellenwert, Anstieg $_{10-90\%}$ und Breite der Aktionspotentiale waren signifikant erhöht (ANOVA: $F_{2,22} > 5,3$; $p < 0,05$). Die Amplitude der Aktionspotentiale war hingegen signifikant reduziert (ANOVA: $F_{2,22} = 4,6$; $p < 0,05$). Das Membranruhepotential (ANOVA: $F_{2,17} = 2,9$; $p > 0,05$), wie auch das Entladungsverhalten (ANOVA *repeated measures design*: $F_{2,17} = 1,8$; $p > 0,05$) nach längerer Strominjektion (30 - 300 pA, 300 ms) war unverändert (siehe Abbildung 4.7 b). Sowohl diese unveränderten Eigenschaften, als auch die veränderte Aktionspotentialkinetik stehen im Einklang mit den durch virale Infektion erhaltenen Ergebnissen von Kim et al. [2008]. Ein effektiver *Knockdown* endogener Proteine konnte somit durch juxtazelluläre Transfektion von siRNA in einzelnen Neuronen nachgewiesen werden.

Darüber hinaus zeigten untransfizierte Zellen und Zellen, die mit Kontroll siRNA transfiziert worden waren, keine signifikanten Unterschiede im Membranruhepotential, in den Aktionspotentialeigenschaften und im Entladungsverhalten (ANOVA, Post-hoc Tukey-Test: $p > 0,3$; siehe Abbildung 4.7). Die juxtazelluläre Transfektion hatte somit keinen Einfluss auf die untersuchten elektrophysiologischen Basiseigenschaften. Dieses unterstreicht die Nutzbarkeit der juxtazellulären Transfektion für den *Knockdown* endogener Proteine, ohne ersichtliche Veränderungen im Phänotyp der transfizierten Zelle zu verursachen.

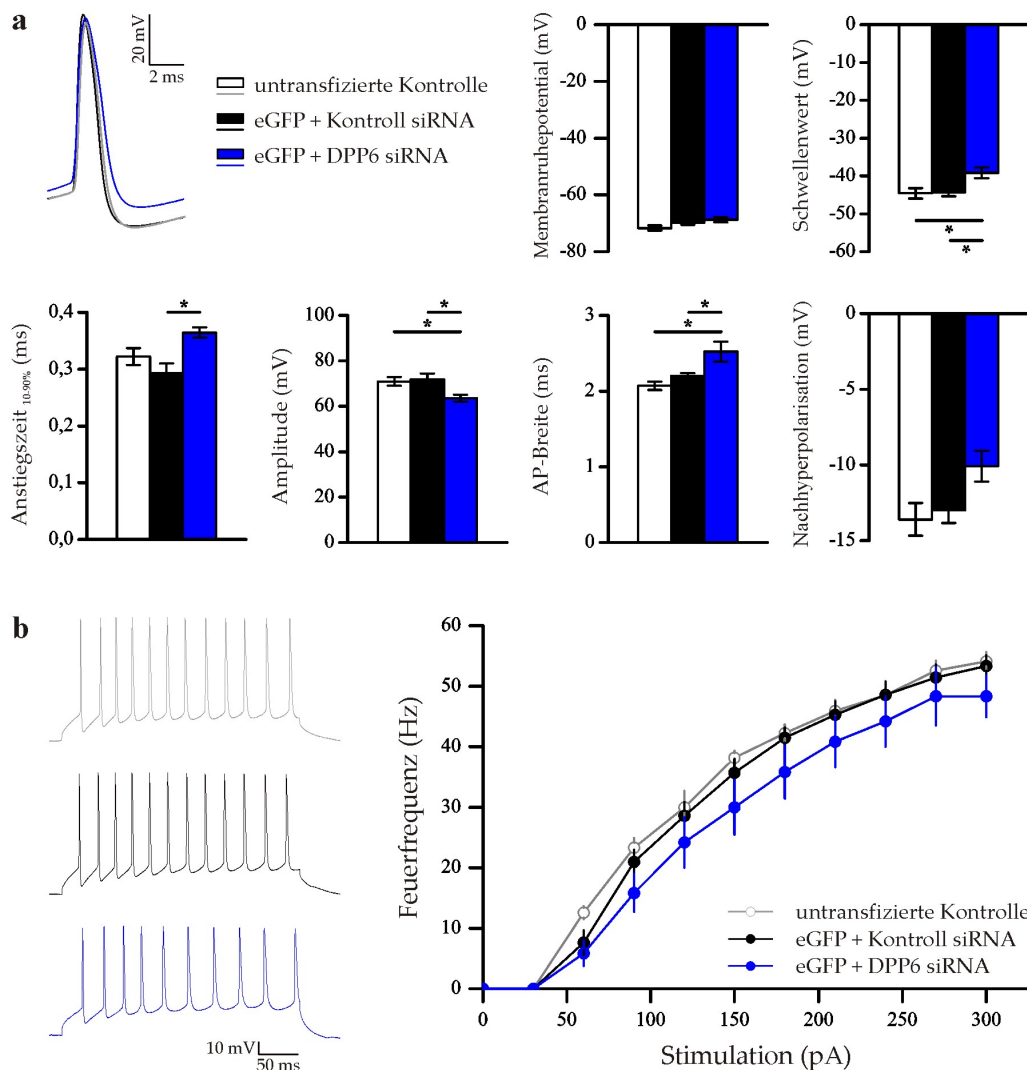


Abbildung 4.7: Charakterisierung von Aktionspotentialen untransfizierter und einzelzelltransfizierter Neurone. CA1 Pyramidenzellen wurden juxtazellulär mit pEGFP-N1 und siRNA kotransfiziert und 2 Tage nach der Transfektion anhand ihrer eGFP-Fluoreszenz identifiziert. **a** Repräsentative Aktionspotentiale von untransfizierten (grau, $n = 9$) und mit Kontroll siRNA (schwarz, $n = 7$) bzw. DPP6 siRNA (blau, $n = 7$) kotransfizierten Neuronen (links) sowie quantitative Analyse der angegebenen Parameter. Zwischen untransfizierten und mit Kontroll siRNA kotransfizierten Neuronen wurde kein Unterschied in den untersuchten Parametern festgestellt (ANOVA, Post-hoc Tukey-Test: $p > 0,05$). Schwellenwert, Anstieg 10–90%, Amplitude und AP-Breite von Neuronen, die mit DPP6 siRNA kotransfiziert worden waren, waren jedoch signifikant unterschiedlich zu Neuronen, die mit Kontroll siRNA kotransfiziert worden waren (ANOVA, Post-hoc Tukey-Test: $p < 0,05$). ►

4.3 Transiente genetische Manipulation des postsynaptischen BDNF-Gehalts

Bisherige Studien zur Untersuchung der Wirkungsmechanismen von BDNF wurden häufig durch experimentelle Unzulänglichkeiten beschränkt. Die gängigen Manipulationen des gesamten Zellnetzwerks erlauben weder die subzelluläre Lokalisierung der Ausschüttung noch die Analyse der Wirkung von BDNF in Prozessen der synaptischen Modulation. Zu diesem Zweck kann jedoch die zuvor beschriebene Methode der juxtazellulären Transfektion verwendet werden.

Für den gezielten *Knockdown* von endogenem BDNF durch die juxtazelluläre Transfektion wurde eine gegen BDNF-mRNA gerichtete siRNA (BDNF-283 siRNA) verwendet. Die Zielsequenz der BDNF-283 siRNA befindet sich in der kodierenden Region des BDNF-Gens von Maus und Ratte an Position 283-303. Zur Validierung der verwendeten siRNA wurden dissoziierte hippocampale Neurone nach fünf Tagen in Kultur mit der BDNF-283 siRNA transfiziert. Die Transfektion mit Kontroll siRNA wie auch eine Scheintransfektion ohne siRNA dienten als Referenz. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die neuronalen Kulturen lysiert und der BDNF-Gehalt mithilfe eines humanen BDNF-Immunoassays quantifiziert (siehe Abbildung 4.8). Hippocampale Kulturen zeigten nach der Transfektion mit Kontroll siRNA einen vergleichbaren BDNF-Gehalt zu Neuronen, die ohne siRNA scheintransfiziert wurden ($99 \pm 6\%$). Die Untersuchungen ergaben hingegen eine signifikante Reduktion des endogenen BDNF-Gehalts auf $64 \pm 3\%$ nach Transfektion mit der BDNF-283 siRNA (ANOVA: $F_{1,19} > 29,2$; $p < 0,001$). Die analysierten Zelllysate wurden jedoch aus einer Mischpopulation transfizierter und untransfizierter Neurone gewonnen, sodass der BDNF-*Knockdown* auf Einzelzellniveau deutlich höher anzusetzen ist.

zu Abbildung 4.7 vorangehende Seite

b Repräsentatives Entladungsverhalten von untransfizierten und kotransfizierten Neuronen nach Strominjektion (150 pA für 300 ms, links). Die Feuerfrequenz in Abhängigkeit von der Strominjektion (30 - 300 pA) ist in den drei Gruppen unverändert (ANOVA *repeated measures design*: $p > 0,05$). Fehlerbalken repräsentieren Standardfehler. (Modifiziert nach Daniel et al. [2013])

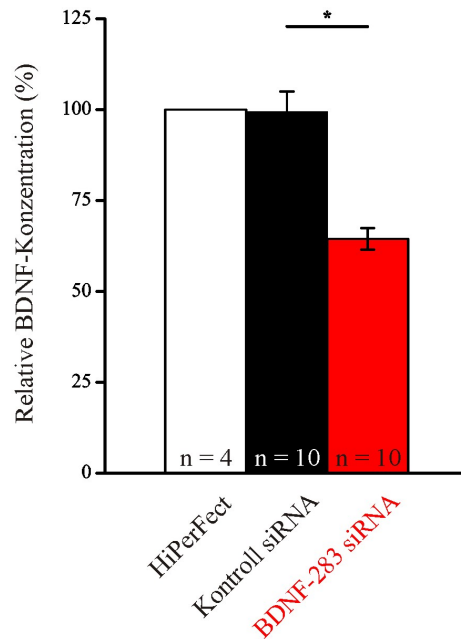


Abbildung 4.8: Validierung der gegen BDNF-mRNA gerichteten BDNF-283 siRNA. Dissoziierte hippocampale Neurone wurden nach 5 Tagen in Kultur mittels HiPerFect mit Kontroll siRNA bzw. BDNF-283 siRNA transfiziert (je 10 Transfektionen aus 4 Präparationen). Als weitere Kontrolle diente eine Scheintransfektion ohne siRNA (1 Scheintransfektion pro Präparation). Die Zellysis erfolgte 2 Tage nach der Transfektion, gefolgt von der Analyse durch einen quantitativen BDNF-ELISA und eine BCA-Proteinbestimmung. Die BDNF-Konzentration wurde auf die Gesamtproteinkonzentration normiert und anschließend ins Verhältnis zur Scheintransfektion (100 %) gesetzt. Die Transfektion mit BDNF-283 siRNA führte zu einer Reduktion des endogenen BDNF-Gehalts auf $64 \pm 3,0\%$ (ANOVA: $p < 0,001$). Man beachte, dass der BDNF-*Knockdown* auf Einzelzellniveau höher anzusetzen ist, da es sich hierbei um die BDNF-Quantifizierung aller lysierten Zellen handelt und nicht ausschließlich der transfizierten Neurone. Fehlerbalken repräsentieren Standardfehler.

Nach Validierung der verwendeten BDNF siRNA wurden die elektrophysiologischen Basiseigenschaften einzelner Neurone mit reduziertem BDNF-Gehalt analysiert. Dafür wurden CA1 Pyramidenzellen mit der BDNF-283 siRNA und pEGFP-N1 juxtazellulär kotransfiziert. 2 - 3 Tage nach der Einzelzelltransfektion wurden *whole-cell patch clamp* Messungen durchgeführt. Das Membranruhepotential von untransfizierten Zellen, wie auch von transfizierten Neuronen war vergleichbar (ANOVA: $F_{2,21} = 0,96$; $p = 0,4$). Nach der Vorgabe eines Membranhaltepotentials von -70 mV wurden Aktionspotentiale durch Strominjektion (120 pA) ausgelöst. Die Untersuchung der Aktionspotentialeigenschaften zeigte keine signifikanten Unterschiede in den analysierten Parametern (siehe Tabelle 4.2). Anstieg_{10–90%}, Amplitude, Halbwertsbreite und Nachhyperpolarisation der Aktionspotentiale waren in transfizierten und untransfizierten Zellen vergleichbar (ANOVA: $F_{2,21} < 1,9$; $p > 0,05$).

Tabelle 4.2: Vergleich der Aktionspotentialeigenschaften von Neuronen, die mit eGFP und Kontroll bzw. BDNF-283 siRNA kotransfizierten und untransfizierten CA1 Pyramidenzellen.

	Kontroll siRNA (n = 8)	BDNF-283 siRNA (n = 6)	untransfizierte Kontrolle (n = 8)
Membranruhepotential (mV)	$-67,02 \pm 1,90$	$-63,32 \pm 3,16$	$-67,21 \pm 1,47$
Schwellenpotential (mV)	$-43,54 \pm 1,29$	$-39,38 \pm 3,21$	$-43,51 \pm 1,10$
Anstieg _{10–90%} (ms)	$0,51 \pm 0,03$	$0,50 \pm 0,03$	$0,51 \pm 0,04$
Amplitude (mV)	$69,16 \pm 1,32$	$68,86 \pm 2,96$	$67,89 \pm 2,44$
Halbwertsbreite (ms)	$1,98 \pm 0,12$	$2,08 \pm 0,23$	$1,71 \pm 0,07$
Nachhyperpolarisation (ms)	$-10,82 \pm 1,22$	$-10,68 \pm 1,01$	$-8,44 \pm 1,58$

Die Membraneigenschaften und Aktionspotentialcharakteristika sind tabellarisch zusammengefasst. Es besteht kein signifikanter Unterschied in den untersuchten Eigenschaften (Membranruhepotential, Schwellenpotential, Anstieg_{10–90%}, Amplitude, Halbwertsbreite und Nachhyperpolarisation). Angegebene Werte repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler.

Im Anschluss wurde die Feuerfrequenz in Abhängigkeit von der Stimulationsstärke untersucht. Aktionspotentiale wurden durch Stimulationsstärken von 30 - 300 pA (300 ms) ausgelöst (siehe Abbildung 4.9). Es wurden keine Unterschiede in der Aktionspotentialfrequenz von Neuronen, die mit pEGFP-N1 und Kontroll siRNA bzw. BDNF-283 siRNA kotransfiziert wurden oder untransfizierten Nachbarzellen festgestellt (ANOVA *repeated measures design*: $F_{2,19} = 1,9$; $p > 0,05$).

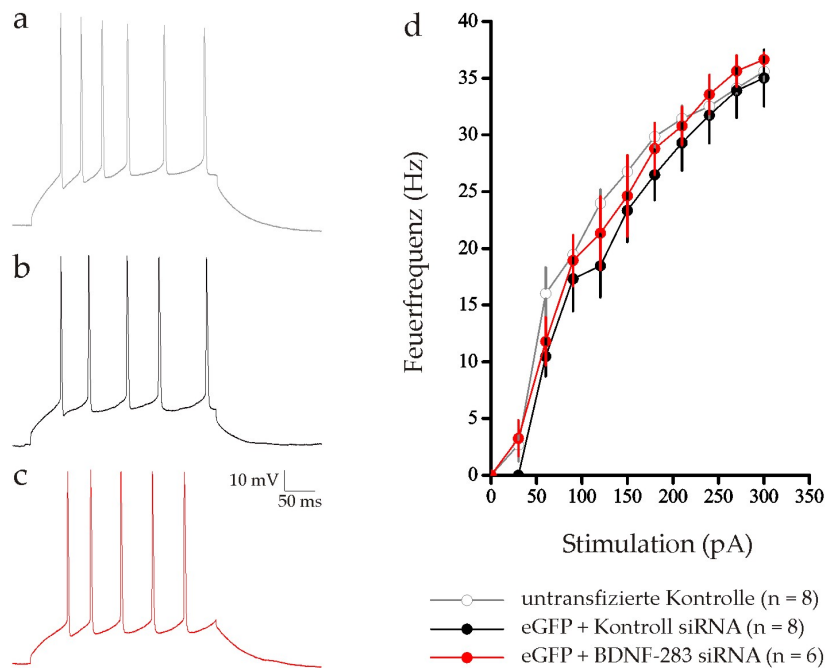


Abbildung 4.9: Vergleichbares Entladungsverhalten von Neuronen, die mit pEGFP-N1 und Kontroll siRNA bzw. BDNF-283 siRNA kotransfiziert worden waren und untransfizierten CA1 Pyramidenzellen. Die zu untersuchenden Zellen wurden in der Stromklemme bei einem Haltepotential von -70 mV gehalten. Das Auslösen von Aktionspotentialen erfolgte anschließend durch Strominjektion (30 - 300 pA für 300 ms). **a,b,c** Repräsentative Aktionspotentialspuren von untransfizierten Zellen (**a**), mit pEGFP-N1 und Kontroll siRNA (**b**) oder pEGFP-N1 und BDNF-283 siRNA (**c**) kotransfizierten Zellen bei 120 pA Strominjektion. **d** Die Feuerfrequenz wurde in Abhängigkeit von der Stimulationsstärke aufgetragen. Die Feuerrate war zwischen den untersuchten Gruppen vergleichbar (ANOVA *repeated measures design*: $p > 0,05$). Fehlerbalken repräsentieren Standardfehler.

Darüber hinaus wurden die Eigenschaften exzitatorischer postsynaptischer Miniaturströme (mEPSC) untersucht. Die Messung der mEPSCs erfolgte bei einem Haltepotential von -70 mV in Anwesenheit von $1 \mu\text{M}$ TTX zur Blockade spannungsabhängiger Natriumkanäle. Einzelne mit BDNF-283 siRNA transfizierte CA1 Pyramidenzellen zeigten keine Unterschiede in den Eigenschaften der Miniaturströme im Vergleich zur Kontrollsituation (siehe Abbildung 4.10). Sowohl Amplitude als auch Frequenz der mEPSCs von transfizierten und untransfizierten Neuronen war vergleichbar (ANOVA: $F_{2,15} < 1,4$; $p > 0,3$). Somit hatte weder die juxtazelluläre Transfektion von siRNA noch die hierdurch bedingte Reduktion des BDNF-Gehalts eine Auswirkung auf glutamaterge Miniaturströme. Demzufolge konnte nach einer Reduktion des BDNF-Gehalts auf Einzelzellniveau keine Veränderungen der basalen synaptischen Eigenschaften beobachtet werden.

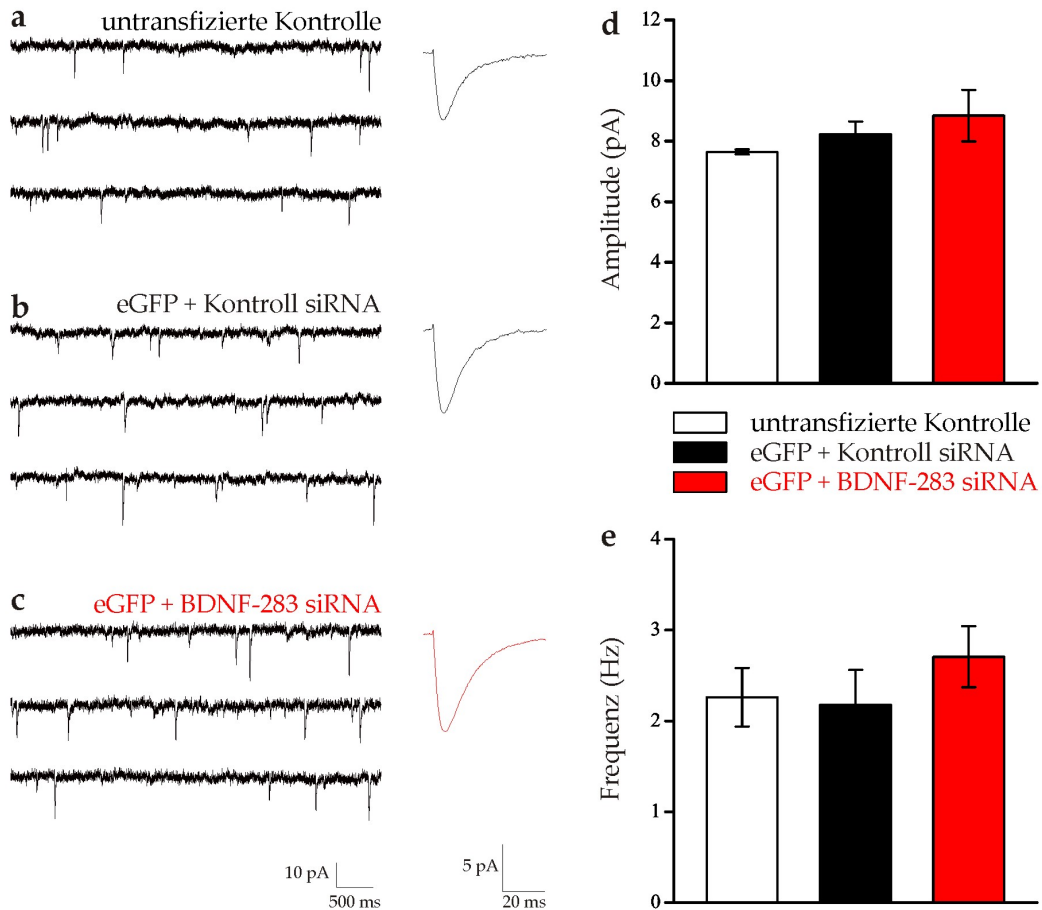


Abbildung 4.10: Vergleichbare Amplitude und Frequenz glutamaterger Miniaturströme von untransfizierten, mit pEGFP-N1 und Kontroll siRNA bzw. BDNF-283 siRNA kotransfizierten Neuronen. Miniaturströme wurden 2 Tage nach der juxtazellulären Transfektion von Pyramidenzellen der CA1 Region hippocampaler Schnittkulturen bei einem Haltepotential von -70 mV in Anwesenheit von $1 \mu\text{M}$ TTX gemessen. **a,b,c** Repräsentative Stromspuren (links) und das entsprechende gemittelte mEPSC (rechts) einer untransfizierten CA1 Pyramidenzelle (**a**), einer mit pEGFP-N1 und Kontroll siRNA (**b**) oder pEGFP-N1 und BDNF-283 siRNA (**c**) kotransfizierten Zelle. **d,e** Gemittelte Amplitude (**d**) und Frequenz (**e**) der Miniaturstromereignisse. (Untransfizierte Kontrolle: $n = 6$ Zellen aus 3 Präparationen, eGFP und Kontroll siRNA: $n = 5$ Zellen aus 4 Präparationen, eGFP und BDNF-283 siRNA: $n = 5$ Zellen aus 5 Präparationen) Fehlerbalken repräsentieren Standardfehler.

4.4 Akute Manipulation BDNF-abhängiger Signalwege

Die prä und/oder postsynaptische Aktivierung BDNF/TrkB-abhängiger Signalwege während der hippocampalen LTP ist in der BDNF-spezifischen Literatur kontrovers diskutiert. Um den Wirkungsort von BDNF, speziell in hippocampalen Schnittkulturen zu lokalisieren, wurde der TrkB-Inhibitor K252a verwendet. Dessen intrazelluläre Anwendung inhibiert die TrkB-Aktivierung zellspezifisch und soll Aufschluss über eine prä- beziehungsweise postsynaptische Wirkung von BDNF während der *Theta burst*-induzierten LTP geben.

4.4.1 Extrazelluläre Applikation von K252a

In akuten Hirnschnitten ist die *Theta burst* Stimulation als BDNF-abhängiges LTP-Induktionsprotokoll anerkannt. Dies konnte auch für hippocampale Schnittkulturen bestätigt werden [Muller et al., 2000, Tong et al., 2012]. Da in diesen Studien jedoch ausschließlich extrazelluläre Ableitungen vorgenommen wurden, handelte es sich bei der applizierten *Theta burst* Stimulation um eine rein präsynaptische Stimulation. Ein modifiziertes LTP-Induktionsprotokoll, welches eine präsynaptische *Theta burst* Stimulation mit einer postsynaptischen Depolarisation kombiniert, ist speziell für Ganzzellableitungen geeignet. Dessen generelle BDNF/TrkB-Abhängigkeit soll für organotypische hippocampale Schnittkulturen durch die extrazelluläre Applikation von K252a bestätigt werden.

Zu diesem Zweck wurden hippocampale Schnittkulturen (7-14 DIV) für mehr als 15 min vor Beginn und für die Dauer des Experiments mit K252a (200 nM)- bzw. DMSO (0,1 %)-haltiger aCSF-Lösung überspült. *Whole-cell patch clamp* Messungen wurden an CA1 Neuronen durchgeführt. Nach Aufnahme der EPSC-Referenzamplitude wurde das gepaarte *Theta burst* Stimulationsprotokoll zur Induktion der LTP appliziert. Unter Kontrollbedingungen (siehe Abbildung 4.11 a/c) konnte eine robuste Potenzierung ($198,8 \pm 14,4 \%$) 30 min nach Stimulation der Schaffer-Kollaterale gemessen werden ($n = 10$). Die extrazelluläre Applikation von K252a führte hingegen zu einer Inhibition der *Theta burst* induzierten LTP ($119,8 \pm 12,5 \%$, $n = 6$). Darüber hinaus wurden Ableitungen von Zellen ohne LTP-induzierende Stimulation sowohl in Anwesenheit von K252a ($n = 2$) als auch in Anwesenheit von DMSO ($n = 4$) durchgeführt. In beiden Situationen war die EPSC-Amplitude über die Messdauer konstant ($94,7 \pm 6,2 \%$) und wurden in Abbildung 4.11 c (offene Symbole, „ohne Stimulation“) kombiniert. Es bestand

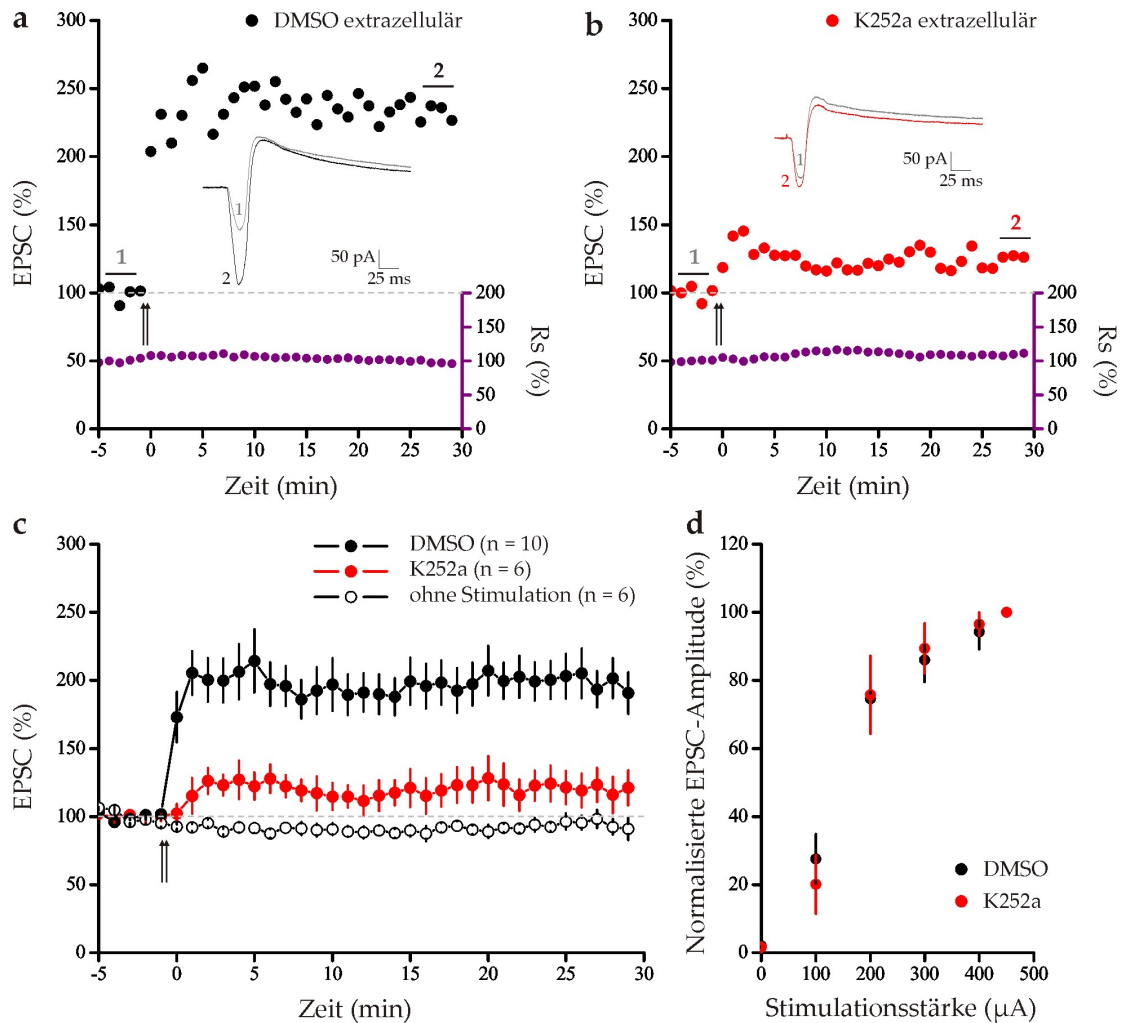


Abbildung 4.11: Inhibition der LTP durch extrazelluläre Applikation von K252a. *Whole-cell patch clamp* Messungen wurden in der CA1 Region von organotypischen Hippokampuschnitten (7-14 DIV) durchgeführt. Die Schnittkulturen wurden für mehr als 15 min vor Beginn und für die Dauer der Messung mit 0,1 % DMSO- bzw. 200 nM K252a-haltiger aCSF-Lösung überspült. Beispiel eines LTP-Experiments in Anwesenheit von 0,1 % DMSO (a) bzw. 200 nM K252a (b) mit ausgewählten Stromspuren. Ein gepaartes *Theta burst* Stimulationsprotokoll wurde zur Induktion von LTP appliziert (Zeitpunkt durch Pfeile gekennzeichnet). Der Serienwiderstand (Rs) wurde während des gesamten Experiments mitbestimmt. c Zusammenfassung der LTP-Experimente in Ab- und Anwesenheit von K252a. Die extrazelluläre Applikation von K252a hatte einen Verlust der LTP zur Folge. Experimente ohne LTP-Induktion wurden ebenfalls in Ab- und Anwesenheit von K252a durchgeführt und waren über die Dauer der Messung stabil. d Die für die Messungen gewählte Stimulationsintensität entsprach $30 \pm 10\%$ der maximal erreichbaren EPSC-Amplitude und ist in Ab- und Anwesenheit von K252a vergleichbar. Fehlerbalken repräsentieren Standardfehler.

kein signifikanter Unterschied zwischen der unstimulierten und der stimulierten Situation in Anwesenheit von K252a (ANOVA: $F_{2,21} = 18,4$; $p < 0,05$; Post-hoc Tukey-Test: $p = 0,46$; siehe Abbildung 4.11 b/c). Dementsprechend bestätigen die erhaltenen Ergebnisse eine BDNF-Abhängigkeit der durch gepaarte *Theta burst* Stimulation induzierten Langzeitpotenzierung in hippocampalen Schnittkulturen.

Die Effizienz der LTP-induzierenden Stimulation könnte durch Unterschiede in der basalen synaptischen Transmission beeinflusst werden. Jedoch zeigte die Auswertung der EPSC-Amplitude in Abhängigkeit von der Stimulationsstärke keine Unterschiede zwischen der DMSO- und K252a-Gruppe (siehe Abbildung 4.11 d). Darüber hinaus gehörte die Analyse der Aktionspotentiale zur Untersuchung der elektrophysiologischen Basis-eigenschaften. Von einem Haltepotential von -70 mV ausgehend wurden Aktionspotentiale durch 120 pA Strominjektion ausgelöst. Die Analyse von Schwellenpotential, Anstieg $_{10-90\%}$, Amplitude, Halbwertsbreite und Nachhyperpolarisation der Aktionspotentiale zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen extrazellulärer DMSO beziehungsweise K252a-Applikation (siehe Tabelle 4.3). Jedoch war das Membranruhepotential in Anwesenheit von K252a ($-65,79 \pm 0,48$ mV) im Vergleich zu DMSO ($-62,60 \pm 0,92$ mV) signifikant erniedrigt (T-Test: $p < 0,05$).

Tabelle 4.3: Die Aktionspotentialeigenschaften von CA1 Pyramidenzellen sind bei extrazellulärer Applikation von DMSO bzw. K252a vergleichbar.

	0,1 % DMSO (n = 13)	200 nM K252a (n = 5)
Membranruhepotential (mV)	$-62,60 \pm 0,92$	$-65,79 \pm 0,48^*$
Schwellenpotential (mV)	$-40,97 \pm 0,81$	$-39,84 \pm 0,85$
Anstieg $_{10-90\%}$ (ms)	$0,64 \pm 0,02$	$0,62 \pm 0,03$
Amplitude (mV)	$70,32 \pm 1,02$	$69,48 \pm 1,76$
Halbwertsbreite (ms)	$2,21 \pm 0,06$	$2,06 \pm 0,08$
Nachhyperpolarisation (ms)	$-9,59 \pm 0,61$	$-10,82 \pm 1,52$

Aktionspotentiale wurden durch Strominjektion (120 pA) ausgehend von einem Haltepotential von -70 mV ausgelöst. Schwellenpotential, Anstieg $_{10-90\%}$, Amplitude, Halbwertsbreite und Nachhyperpolarisation waren vergleichbar (T-Test: $p > 0,05$), jedoch war das Membranruhepotential signifikant negativer bei extrazellulärer Applikation von K252a. Angegebene Werte repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler.

* T-Test: $p < 0,05$

Weiterhin waren signifikante Unterschiede in der Aktionspotentialfrequenz bei anhaltender Depolarisation zu beobachten (siehe Abbildung 4.12). Die Feuerrate war in Anwesenheit von K252a im Vergleich zur DMSO-Kontrolle signifikant verringert (ANOVA *repeated measures design*: $F_{1,16} = 13,4$; $p < 0,05$). Dies deutet auf eine TrkB-vermittelte Reduktion der neuronalen Erregbarkeit.

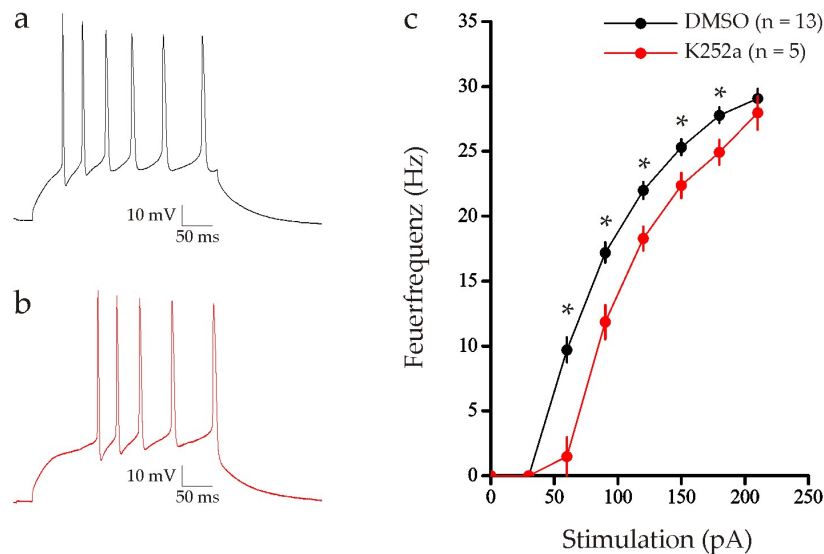


Abbildung 4.12: Veränderte Feuerrate bei extrazellulärer Applikation von K252a. Aktionspotentiale wurden in den zu untersuchenden Zellen durch Strominjektion (30 - 210 pA für 300 ms) ausgehend von einem Haltepotential von -70 mV ausgelöst. **a, b** Repräsentative Aktionspotentiale (Stimulation: 120 pA) in Anwesenheit von DMSO (**a**) bzw. K252a (**b**). **c** Die Feuerrate der Aktionspotentiale wurde in Abhängigkeit von der Stimulationsstärke aufgetragen. In Anwesenheit von K252a war die Aktionspotentialfrequenz im Vergleich zur DMSO-Kontrolle signifikant verringert (ANOVA *repeated measures design*: $p < 0,05$). Fehlerbalken repräsentieren Standardfehler.

4.4.2 Intrazelluläre Applikation von K252a

Um den Wirkungsort von BDNF während der LTP-Induktion zu identifizieren, wurde der zuvor beschriebene Trk-Inhibitor intrazellulär appliziert. Die intrazelluläre Anwendung von K252a inhibiert zellspezifisch BDNF/Trk-abhängige Signalwege. Zur Vergleichbarkeit mit vorangehenden Experimenten beinhaltete die extrazelluläre Lösung weiterhin permanent 0,1% DMSO. Hippokampale Schnittkulturen wurden vor Beginn eines Experiments für mehr als 15 min in dieser Lösung äquilibriert. *Whole-cell patch clamp* Messungen wurden anschließend in der CA1 Region des Hippokampus unter Verwendung von DMSO (0,1%) bzw. K252a (200 nM)-beinhaltender intrazellulärer Lösungen durchgeführt. Nach Aufnahme der EPSC-Referenzamplitude wurde das gepaarte *Theta burst* Stimulationsprotokoll zur Induktion der LTP appliziert. Unter DMSO-Kontrollbedingungen konnte eine Potenzierung von $161,7 \pm 13,7\%$ ($n = 6$) gemessen werden (siehe Abbildung 4.13 a/c). Die EPSC-Amplitude war in Kontrollmessungen ohne LTP-induzierende Stimulation (siehe Abbildung 4.13 c, offene Symbole, „ohne Stimulation“) nach 35 min sowohl in Anwesenheit von DMSO ($n = 3$) wie auch von K252a ($n = 1$) konstant ($96,6 \pm 9,8\%$). Die intrazelluläre Applikation von K252a hingegen führte zu einer Reduktion der Potenzierung auf $113,9 \pm 10,4\%$ ($n = 5$, siehe Abbildung 4.13 b/c). Es bestand darüber hinaus kein signifikanter Unterschied zu unstimulierten Kontrollmessungen (ANOVA: $F_{2,14} = 7,9$; $p < 0,05$; Post-hoc Tukey-Test: $p = 0,62$). Dies lässt auf eine vollständige Inhibition der LTP durch intrazelluläre Applikation von K252a schließen.

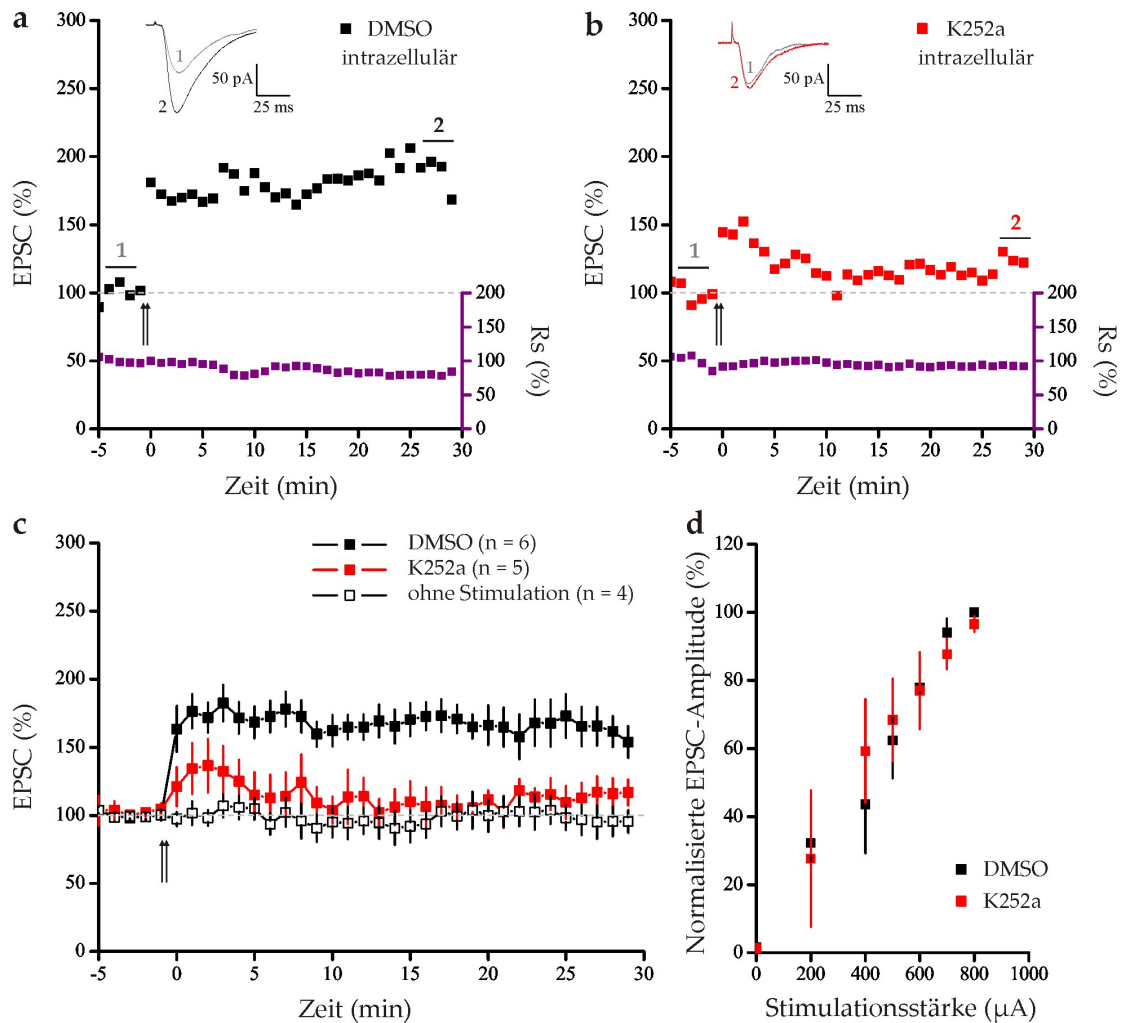


Abbildung 4.13: Inhibition der LTP durch intrazelluläre Applikation von K252a. *Whole-cell patch clamp* Messungen wurden in der CA1 Region organotypischer Hippokampus-schnitte (7-14 DIV) durchgeführt. Die Schnittkulturen wurden für mehr als 15 min vor Beginn und für die Dauer der Messung mit 0,1 % DMSO-haltiger aCSF-Lösung überspült. Beispiel eines LTP-Experiments unter Verwendung von 0,1 % DMSO (**a**) bzw. 200 nM K252a (**b**)-haltiger intrazellulärer Lösung und ausgesuchte Stromspuren. Ein gepaartes *Theta burst* Stimulationsprotokoll wurde zur Induktion der LTP appliziert (Zeitpunkt durch Pfeile gekennzeichnet). Der Serienwiderstand (Rs) wurde während des gesamten Experiments mitbestimmt. **c** Zusammenfassung der LTP-Experimente in Ab- und Anwesenheit von K252a. Die intrazelluläre Applikation von K252a führte zu einem LTP-Defizit nach *Theta burst* Stimulation. Experimente ohne LTP-Induktion waren über die Dauer der Messung stabil. **d** Die für die Messungen gewählte Stimulationsintensität entsprach 30 ± 10 % der maximal erreichbaren EPSC-Amplitude und war vergleichbar bei intrazellulärer Applikation von DMSO bzw. K252a. Fehlerbalken repräsentieren Standardfehler.

Zudem wurde die EPSC-Amplitude in Abhängigkeit von der Stimulationsstärke gemessen (siehe Abbildung 4.13 d). Hier wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen Experimenten, die in Anwesenheit von DMSO beziehungsweise K252a durchgeführt wurden, festgestellt. Darüber hinaus waren durch Strominjektion ausgelöste Aktionspotentiale bei intrazellulärer Applikation von DMSO bzw. K252a vergleichbar (siehe Tabelle 4.4). Anstieg $_{10-90\%}$, Schwellenpotential, Amplitude, Halbwertsbreite und Nachhyperpolarisation der Aktionspotentiale sowie das Membranruhepotential waren unverändert (T-Test: $p > 0,05$). Außerdem wurden keine Unterschiede in der Aktionspotentialfrequenz festgestellt (ANOVA *repeated measures design*: $F_{1,15} = 2,9$; $p > 0,05$). Dies bestätigt die bereits vorhandenen Ergebnisse zu Aktionspotentialen von einzelnen Neuronen mit BDNF-Defizit nach Transfektion mit BDNF-283 siRNA (siehe Abschnitt 4.3).

Tabelle 4.4: Die Aktionspotentialeigenschaften von CA1 Pyramidenzellen sind bei intrazellulärer Applikation von DMSO bzw. K252a vergleichbar.

	0,1 % DMSO (n = 9)	200 nM K252a 0,1 % DMSO (n = 8)
intrazellulär		
extrazellulär		
Membranruhepotential (mV)	$-62,96 \pm 1,16$	$-63,29 \pm 1,55$
Schwellenpotential (mV)	$-35,35 \pm 1,50$	$-36,04 \pm 1,11$
Anstieg $_{10-90\%}$ (ms)	$0,56 \pm 0,04$	$0,66 \pm 0,03$
Amplitude (mV)	$63,12 \pm 3,58$	$63,20 \pm 1,63$
Halbwertsbreite (ms)	$1,98 \pm 0,12$	$2,11 \pm 0,06$
Nachhyperpolarisation (ms)	$-6,98 \pm 1,18$	$-9,81 \pm 0,71$

Das Membranruhepotential und die untersuchten Eigenschaften der Aktionspotentiale (ausgelöst durch 120 pA Strominjektion) sind tabellarisch zusammengefasst. Es besteht kein signifikanter Unterschied in den untersuchten Eigenschaften (T-Test: $p > 0,05$). Angegebene Werte repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler.

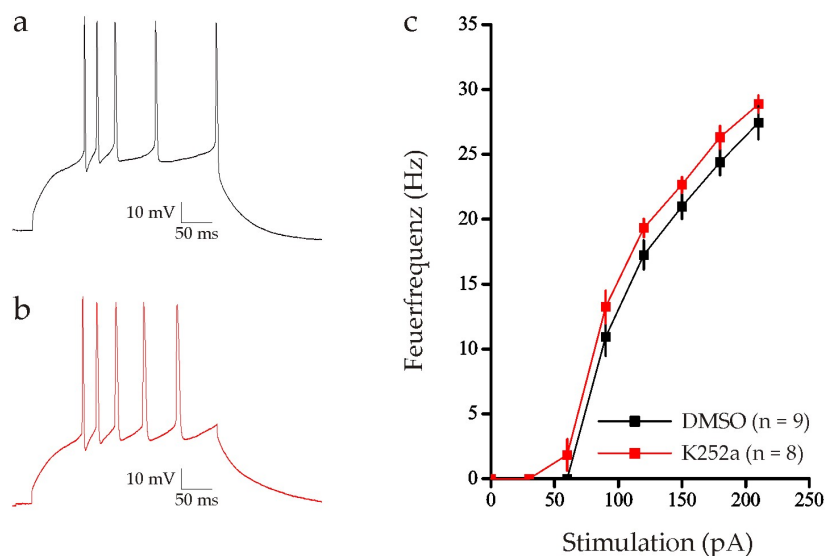


Abbildung 4.14: Vergleichbare Feuerrate bei intrazellulärer Applikation von K252a. Zu untersuchende Zellen wurden in der Stromklemme bei einem Haltepotential von -70 mV gehalten. Aktionspotentiale wurden anschließend durch Strominjektion ausgelöst (30 - 210 pA für 300 ms). **a,b** Repräsentative Aktionspotentiale (Stimulation: 120 pA) in Anwesenheit von DMSO (**a**) bzw. K252a (**b**). **c** Die Feuerfrequenz der Aktionspotentiale wurde in Abhängigkeit von der Stimulationsstärke aufgetragen. Die Aktionspotentialfrequenz war bei intrazellulärer Applikation von K252a vergleichbar zur DMSO-Kontrolle (ANOVA *repeated measures design*: $p > 0,05$). Fehlerbalken repräsentieren Standardfehler.

Zusammenfassend sind die erhaltenen Ergebnisse bezüglich der LTP nach extra- und intrazellulärer Applikation von DMSO beziehungsweise K252a vergleichbar und deuten auf eine vorwiegend postsynaptische BDNF-Abhängigkeit der durch *Theta burst* Stimulation ausgelösten LTP in organotypischen hippocampalen Schnittkulturen (siehe Abbildung 4.15).

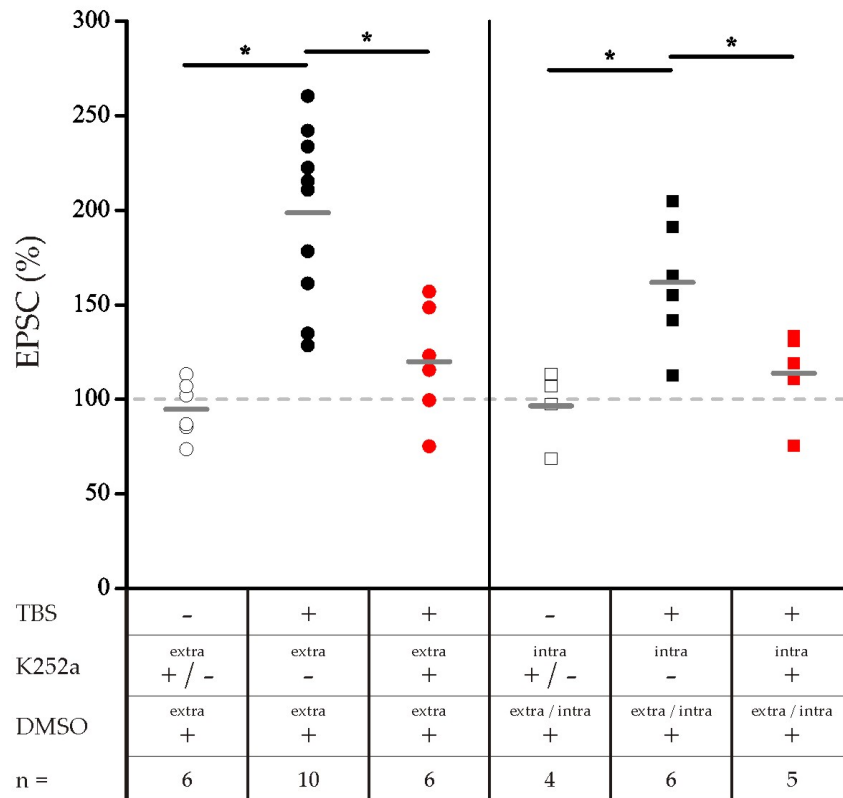


Abbildung 4.15: Postsynaptische Wirkung von BDNF während der hippocampalen LTP. Die relative EPSC-Amplitude (zum Zeitpunkt: $t = 25 - 30$ min nach TBS-Stimulation bzw. $t = 30 - 35$ min nach Beginn der Messung für unstimulierte Kontrollen) ist in Abhängigkeit der experimentellen Bedingungen aufgetragen. Unter Kontrollbedingungen (TBS -) war die EPSC-Amplitude in An- und Abwesenheit von K252a (+/-) über in die Dauer der Messung konstant. Die durchgeführten LTP-Experimente zeigten unter Kontrollbedingungen (DMSO: extra bzw. intra und extra) eine robuste Potenzierung. Sowohl die extra- wie auch die intrazelluläre Applikation von K252a (K252a +) hatte hingegen eine vollständige Inhibition der LTP zur Folge. extra: extrazelluläre Applikation; intra: intrazelluläre Applikation

5 Diskussion

Das Neurotrophin BDNF spielt eine essentielle Rolle bei der Entwicklung des Nervensystems. Darüber hinaus ist BDNF von zentraler Bedeutung bei der Regulation der synaptischen Transmission und der synaptischen Plastizität. Die Modulation dieser synaptischen Prozesse erfolgt in Abhängigkeit des jeweiligen Zelltyps auf prä- und/oder postsynaptischer Seite. Eine zweifelsfreie Aufklärung der subzellulären Wirkungsmechanismen von BDNF war jedoch bisher nicht möglich, da die zur Analyse verwendeten Methoden zumeist keine zellspezifische Manipulation erlaubten. In dieser Hinsicht ist die Entwicklung dahingehend neuer Techniken notwendig gewesen.

Daher wurde in der vorliegenden Arbeit ein experimenteller Ansatz etabliert, der es erlaubt ein einzelnes Neuron zu identifizieren und anschließend genetisch zu manipulieren, ohne in das umgebende Netzwerk einzugreifen. Eine solche Manipulation wurde durch die Kombination von juxtazellulärer Ableitung und juxtazellulärer Transfektion erreicht. Durch empfindliche juxtazelluläre Ableitungen konnte zum einen der Abstand zwischen der zur Transfektion verwendeten Pipette und der zu charakterisierenden Zelle elektrisch geprüft werden. Zum anderen konnte die neuronale Identität einer Zelle durch die Detektion von Aktionsströmen bestimmt werden. Durch hochfrequente Stimulation im *loose seal* Modus wurde die zuvor identifizierte Zelle erfolgreich juxtazellulär transfiziert. Elektrophysiologische Untersuchungen zeigten, dass die zur Transfektion genutzte Stimulation keinen Einfluss auf den Phänotyp der Zelle hatte. Hiermit wurde die Nutzbarkeit der Einzelzelltransfektion für die genetische Manipulation von Neuronen in einem unveränderten komplexen Netzwerk belegt. Für die Transfektion eignete sich sowohl Plasmid-DNA wie auch siRNA. So konnte zum einen ein siRNA-vermittelter *Knockdown* von eGFP nach Kotransfektion des kodierenden Plasmids und der entsprechenden siRNA

mikroskopisch nachgewiesen werden. Zum anderen konnte der *Knockdown* des endogen exprimierten DPP6 Proteins elektrophysiologisch bestätigt werden. Darüber hinaus wurde die zellspezifische Funktion von BDNF anhand der etablierten Methode untersucht. Durch die juxtazelluläre Transfektion mit einer verifizierten, gegen BDNF-mRNA gerichteten siRNA, wurde die BDNF-Expression auf Einzelzellniveau herunterreguliert. Ein *Knockdown* von BDNF hatte keine Defizite in der basalen synaptischen Transmission zur Folge. Jedoch spielte die BDNF-abhängige Signalweiterleitung eine essentielle Rolle bei der Expression der Langzeitpotenzierung.

5.1 Genetische Manipulation von Neuronen auf Einzelzellniveau

Bisherige Methoden zur genetischen Manipulation von einzelnen Zellen ließen keine über die morphologische Charakterisierung hinausgehende Identifizierung der zu transfizierenden Zelle zu. Die in der vorliegenden Arbeit etablierte juxtazelluläre Transfektion ermöglichte hingegen die zeitgleiche Durchführung juxtazellulärer Ableitungen und somit die elektrophysiologische Identifizierung einzelner Neurone unmittelbar vor deren genetischer Manipulation.

5.1.1 Einzelzelltransfektion von identifizierten Neuronen

Die Einzelzelltransfektion ist eine innovative Methode zur genetischen Manipulation einzelner Zellen in einem komplexen Netzwerk [Haas et al., 2001, Rae & Levis, 2002, Rathenberg et al., 2003]. Für eine erfolgreiche Transfektion ist die präzise Platzierung der Stimulationselektrode essentiell. Daher wurden bisherige Studien unter visueller Kontrolle der verwendeten Mikroelektroden durchgeführt [Haas et al., 2001, Rae & Levis, 2002, Rathenberg et al., 2003, Tanaka et al., 2009]. Jedoch beschränkte diese Tatsache die Einsatzmöglichkeiten der Einzelzelltransfektion hauptsächlich auf *in vitro* Präparationen. Eine Möglichkeit der genetischen Manipulation von Neuronen *in vivo* wurde von Kitamura et al. [2008] entwickelt. Mithilfe der sogenannten *shadowpatching*-Methode werden Zellkörper indirekt durch Perfusion mit einem fluoreszenten Farbstoff visualisiert und anschließend transfiziert. Da jedoch auch hier mikroskopische Methoden zum Einsatz kommen, ist die Anwendung auf oberflächennahe Regionen des Gehirns (≤ 1 mm) beschränkt [Theer et al., 2003]. Alternativ ließe sich der Abstand der Stimulationselektrode zu der zu transfizierenden Zelle auch elektrisch über den Abdichtwiderstand bestimmen [Joshi & Hawken, 2006]. Jedoch sind die für Elektroporationen verwendeten

Verstärker meist nicht dafür ausgelegt gewesen, Ableitungen im pA-Bereich messen zu können. Unter Verwendung eines speziellen Verstärkers sowie der Veränderungen der experimentellen Parameter ließen sich dennoch in der hier beschriebenen Studie juxtazelluläre Ableitungen mit der juxtazellulären Transfektion kombinieren [Daniel et al., 2013]. Dieses erlaubte, vergleichbar zur *blind patch clamp* Methode, den Verzicht auf die optische Darstellung der Stimulationselektrode während der Annäherung an die zu transfizierende Zelle. Nach Kontaktausbildung zwischen Pipette und Zellmembran erfolgte die neuronale Identifizierung der Zelle durch die Detektion spontaner Aktionsströme.

Die als Neuron identifizierte Zelle wurde anschließend juxtazellulär mit Plasmid-DNA transfiziert. Voraussetzung für die erfolgreiche Transfektion von Plasmid-DNA ist die Ausbildung von Membranporen mit ausreichendem Durchmesser. Der Porendurchmesser wird durch das verwendete Transfektionsprotokoll, speziell durch die Stimulationsstärke und -dauer bestimmt [Böckmann et al., 2008, Krassowska & Filev, 2007, Levine & Vernier, 2010, Neumann et al., 1998, Nolkrantz et al., 2001, Smith et al., 2004, Sugar & Neumann, 1984]. Somit erfolgte die Einstellung dieser Stimulationsparameter derart, dass die resultierenden Membranporen ausreichend groß waren, um den Durchgang der Plasmid-DNA zu gewährleisten, ohne jedoch die Zellintegrität aufzuheben. Für die Justierung der Stimulationsstärke war darüber hinaus der Abstand der Stimulationselektrode zu dem zu transfizierenden Neuron zu berücksichtigen, da die Stimulationsintensität an der Zelle mit ansteigender Distanz zur Elektrode abnimmt. Um juxtazelluläre Ableitungen mit der Einzelzelltransfektion kombinieren zu können, war eine vergleichsweise geringe Distanz zwischen Zellmembran und Stimulationselektrode notwendig (*loose seal* Modus). Damit war der Kontakt zwischen Stimulationselektrode und Zelle enger als in bisher beschriebenen Studien [Haas et al., 2001, Pi et al., 2010, Rae & Levis, 2002, Rathenber et al., 2003, Tanaka et al., 2009]. Das hatte zur Folge, dass eine Verringerung der Stimulationsstärke essentiell war, um die Ausbildung von permanenten Poren zu verhindern [Weaver, 1993].

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Transfektionsprotokolle für die Einzelzelltransfektion von pEGFP-N1 und siRNA etabliert (siehe Ergebnisse: Abschnitt 4.1.2). In der Spannungsklemme war die optimale Stimulationsstärke von der verwendeten Lösung abhängig, in der die zu transfizierenden Nukleinsäuren verdünnt wurden. Unter Verwendung von HBS war die optimale Stimulationsstärke, sowie die maximal erreichte Transfektionseffizienz etwas höher als unter Verwendung des EPO-Puffers. HBS und EPO-Puffer unterschieden sich hauptsächlich in ihrer Osmolarität. Eine Osmolari-

tätsdifferenz zwischen Pipettenlösung und Zelle, wie sie in dem verwendeten Zellsystem unter Verwendung des EPO-Puffers zustande kam, kann zu Zellschwellungen führen. Ein Schwellen der Zelle nach Elektroporation kann die Zelllysis zur Folge haben [Tsong, 1991]. In diesem Fall würde die transfizierte Zelle die Elektroporation nicht überleben und somit die Transfektionseffizienz verringern. Diese Situation begründet eventuell die verminderte Transfektionseffizienz unter Verwendung des EPO-Puffers.

Die Osmolaritätsdifferenz zwischen Pipettenlösung und Zelle beeinflusste darüber hinaus auch den Abdichtwiderstand. Dementsprechend wurden unter Verwendung von HBS ein höherer Abdichtwiderstand gemessen, als unter Verwendung des EPO-Puffers. Die dahingehend ermittelten Unterschiede führten bei gleicher Stimulationsstärke, entsprechend dem Ohmschen Gesetz, zu Abweichungen in der Amplitude der gemessenen Stromantwort. Die optimale Stromantwort, bei der die maximale Transfektionseffizienz erreicht wurde, betrug jedoch sowohl unter Verwendung von HBS, wie auch EPO-Puffer -130 nA.

Unter Verwendung der optimalen Transfektionsparameter konnte bereits wenige Minuten nach der zur Transfektion verwendeten hochfrequenten Stimulation erneut Aktionsströme gemessen werden, wodurch die Viabilität der Zellen bestätigt werden konnte. Generell waren die Eigenschaften der Aktionsströme von den zur Verdünnung der DNA verwendeten Lösungen abhängig. Da Aktionsströme hauptsächlich kapazitive Ströme sind, steigt deren Amplitude mit sinkendem Abdichtwiderstand [Barbour & Isope, 2000, Nunemaker et al., 2003]. Dementsprechend zeigte die Analyse spontaner Aktionsströme eine höhere Amplitude unter Verwendung des EPO-Puffers als unter Verwendung von HBS. Aktionsstrommessungen im *loose seal* Modus eignen sich hervorragend, um die Entladungsaktivität der abgeleiteten Zelle zu charakterisieren. Jedoch ist eine Untersuchung der intrinsischen Erregbarkeit durch somatische Depolarisation im *loose seal* Modus nicht möglich [Perkins, 2006]. Eine Unterscheidung von glutamatergen sowie GABAergen Neuronen, wie sie anhand des Entladungsverhaltens im *tight seal* oder *whole cell* Modus vorgenommen wurde, war daher ausgeschlossen [Perkins, 2006, Sotty et al., 2003, Wierenga et al., 2010].

5.1.2 Regulierung der Proteinexpression durch Einzelzelltransfektion mit siRNA

Der siRNA-vermittelte *Knockdown* von Proteinen ist eine effiziente Methode, um deren Expression zu regulieren. Eine zellspezifische Manipulation von Proteinen ließe sich somit über die Einzelzelltransfektion mit siRNA erreichen. Zu diesem Zweck wurde die Funktionalität des siRNA-vermittelten *Knockdowns* auf Einzelzellniveau sowohl visuell über die Expression von eGFP, als auch funktionell durch die Regulation des endogenen DPP6-Proteins bestimmt. Die Analyse der eGFP-Expression zeigte eine Reduktion der eGFP-Fluoreszenz um 97 % nach der Kotransfektion von pEGFP-N1 und der gegen eGFP-mRNA gerichteten siRNA. Unter Verwendung der gleichen siRNA erreichten Boudes et al. [2008] in dissoziierten Neuronenkulturen von transgenen Aktin-GFP-Mäusen [Okabe et al., 1997] nur eine Reduktion um 40 %. Bei dem *Knockdown* eines endogen exprimierten Proteins muss jedoch dessen Halbwertszeit berücksichtigt werden. Speziell eGFP hat eine vergleichsweise hohe Halbwertszeit [Li et al., 1998a]. Eine lange Lebensdauer erschwert funktionelle Studien, da ein siRNA-vermittelter *Knockdown* in diesem Fall weniger effizient ist [Wu et al., 2004b].

Ferner konnte der siRNA-vermittelte *Knockdown* des endogen exprimierten Proteins DPP6 zwei Tage nach der juxtazellulären Transfektion über elektrophysiologische Messungen nachgewiesen werden. Vergleichbare Ergebnisse erhielten Kim et al. [2008] nach viraler Infektion mit dem entsprechenden shRNA-beinholdendem Vektor. Die Verwendung von viralen Infektionssystemen zur Proteinexpression erlaubt die Untersuchung von genetisch manipulierten Zellen in einem Zeitraum von bis zu drei Tagen nach deren Infektion. In diesem Zeitraum zeigt die virale Infektion keine offensichtlichen Nebenerscheinungen in Bezug auf Morphologie und Physiologie [Kittler et al., 2006, Malinow et al., 2010]. Analog hierzu konnten auch nach der juxtazellulären Transfektion sowohl morphologische, als auch elektrophysiologische Studien an einzelzelltransfizierten Zellen circa 1 - 3 Tage nach der hochfrequenten Stimulation durchgeführt werden. Die elektrischen Eigenschaften von transfizierten Zellen waren zwei Tage nach der Transfektion vergleichbar zu untransfizierten Zellen. Da die elektrophysiologischen Charakteristika einer Zelle sehr anfällig für experimentelle Manipulationen sind, weisen die erhaltenen Ergebnisse darauf, dass weder die juxtazelluläre Ableitung noch die Transfektion merklich die zellulären Eigenschaften veränderte. Zudem beeinflussten weder die verwendete Kontroll siRNA noch eGFP die basalen elektrophysiologischen Eigenschaften von transfizierten Neuronen. Die Aktionspotentiale und das intrinsische Entladungsverhalten wie

auch die Amplitude und Frequenz von Miniaturströmen waren unter beiden Bedingungen vergleichbar.

Zusammengenommen ermöglicht die Kombination von juxtazellulärer Ableitung und Transfektion die Analyse von einzelnen genetisch veränderten Neuronen in einem komplexen neuronalen Netzwerk. Da die etablierte Methode nicht merklich in die Zelleigenschaften eingreift, können morphologische und elektrophysiologische Untersuchungen an den genetisch manipulierten Zellen vorgenommen werden.

5.2 Bedeutung von BDNF in Prozessen der synaptischen Transmission und Plastizität

Die undifferenzierte Manipulation neuronaler Netzwerke eignet sich nur bedingt für eine subzelluläre Auflösung BDNF-abhängiger Funktionen. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die zuvor etablierte juxtazelluläre Transfektion genutzt, um einen selektiven *Knockdown* von BDNF auf Einzelzellniveau zu erzeugen. Die anschließende elektrophysiologische Charakterisierung zeigte, dass ein postsynaptischer BDNF-Defizit keinen Einfluss auf die basalen Eigenschaften der synaptischen Transmission hatte. Während der Langzeitpotenzierung modulierte BDNF jedoch durchaus auch die Postsynapse. Die intra- wie auch die extrazelluläre Applikation von K252a führte zu einer Inhibition der LTP an der CA3-CA1-Synapse. Diese Ergebnisse deuten auf eine postsynaptische Abhängigkeit von BDNF/TrkB-Signalwegen während der hippocampalen Langzeitpotenzierung.

5.2.1 Bedeutung von BDNF in Prozessen der synaptischen Transmission

Zur Untersuchung des selektiven *Knockdowns* von BDNF wurde zunächst die verwendete, gegen BDNF-mRNA gerichtete, siRNA validiert. In dissoziierten hippocampalen Massenkulturen konnte eine signifikante Reduktion des endogenen BDNF-Proteins auf 64 % zwei Tage nach der Transfektion der siRNA detektiert werden. Die Transfektionseffizienz konnte jedoch nicht ermittelt werden, da eine unmarkierte, und somit fluoreszenzmikroskopisch nicht visualisierbare siRNA verwendet wurde. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass ein unbestimmter Anteil der Zellen untransfiziert blieb, sodass der BDNF-*Knockdown* auf Einzelzellniveau höher anzusetzen ist.

Die validierte siRNA wurde zur Manipulation des endogenen BDNF-Gehalts von einzelnen CA1 Pyramidenzellen hippokampaler Schnittkulturen verwendet. Verschiedene Studien belegen, dass organotypische hippokampale Schnittkulturen in Bezug auf Morphologie sowie synaptische Transmission, vergleichbar zu akuten Schnittpräparaten sind [De Simoni et al., 2003, Muller et al., 1993]. Vergleichende Analysen zeigten, dass sowohl die Entwicklung und Morphologie der Dendriten, wie auch die entwicklungsbedingte Frequenzzunahme der Miniaturströme analog verläuft. In hippokampalen Schnittkulturen war jedoch eine insgesamt erhöhte Frequenz der glutamatergen Miniaturströme zu beobachten [De Simoni et al., 2003]. Diese Ergebnisse wurde auf eine erhöhte Konnektivität durch die Ausbildung neuer synaptischer Kontakte zurückgeführt. Auch entwicklungsabhängige Prozesse der synaptischen Plastizität verlaufen parallel [Muller et al., 1993]. Circa 90 % der organotypischen Schnittpräparate zeigten nach 11 Tagen in Kultur eine robuste LTP-Expression (Präparation der Ratten: P5). Das entspricht in etwa den in akuten Schnittpräparaten des Hippokampus (Präparation der Ratten: P15) erhaltenen Ergebnissen [Harris & Teyler, 1984]. Hippokampale Schnittkulturen eignen sich demnach für die im Anschluss an die genetische Manipulation stattfindende elektrophysiologische Charakterisierung.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von BDNF auf verschiedene Eigenschaften der basalen synaptischen Transmission nach Manipulation einzelner CA1 Pyramidenzellen untersucht. Die Auswertungen ergaben, dass ein postsynaptisch reduzierter BDNF-Gehalt keine Auswirkungen auf Aktionspotentiale, das Entladungsverhalten sowie die Glutamatausschüttung präsynaptischer Zellen hatte.

Die Analyse der Aktionspotentiale von Neuronen mit einem siRNA-vermittelten BDNF-Defizit zeigte keine Unterschiede zu den entsprechenden Kontrollzellen. Sämtliche Eigenschaften der Aktionspotentiale (Schwellenwert, Anstieg 10–90%, Amplitude, Halbwertsbreite und Nachhyperpolarisation) waren unbeeinträchtigt von der Reduktion des BDNF-Gehalts der postsynaptischen Zelle. Die Aktionspotentiale wurden in der vorliegenden Arbeit zudem auch nach Manipulation von TrkB-abhängigen Signalwegen untersucht. Sowohl die zellspezifische intrazelluläre, wie auch die zellunspezifische extrazelluläre Applikation des TrkB-Inhibitors K252a hatte keine Veränderung der Aktionspotentiale zur Folge. Vergleichbare Ergebnisse wurden in dissoziierten hippokampalen Kulturen [Bolton et al., 2000, Li et al., 1998b], sowie im visuellen Kortex [Abidin et al., 2006] erhalten. Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse bestäti-

gen demnach, dass die Aktionspotentialeigenschaften weder durch BDNF, noch durch BDNF-abhängige Signalwege beeinflusst werden.

Darüber hinaus wurde die Bedeutung von BDNF für das Entladungsverhalten einer Zelle untersucht. Die Aktionspotentialfrequenz einer Zelle hängt zum einen von der intrinsischen Erregbarkeit des untersuchten postsynaptischen Neurons und zum anderen von den eingehenden Signalen präsynaptischer Zellen ab. Eine Modulation der synaptischen Transmission auf präsynaptischer Ebene spiegelt sich unter anderem in der spontanen Feuerrate einer Zelle wider. In hippocampalen Neuronenkulturen hatte eine BDNF-abhängige Potenzierung der synaptischen Transmission dementsprechend einen Anstieg der spontanen Feuerrate nach BDNF-Applikation zur Folge [Bolton et al., 2000, Levine et al., 1995]. Eine unveränderte Feuerrate wurde hingegen in kortikalen Pyramidenzellen nach chronischer Applikation von BDNF beobachtet [Rutherford et al., 1998]. Jedoch modulierte BDNF dort die Feuerrate nach andauernder Blockade der Netzwerkaktivität durch TTX [Desai et al., 1999, Rutherford et al., 1998]. Diese regulierende Funktion von BDNF ist essentiell für die neuronale Adaptation an dauerhafte Veränderungen der Netzwerkaktivität, wie sie beispielsweise während der Entwicklung auftreten. Im Gegensatz zu den beschriebenen Untersuchungen zur BDNF-abhängigen Modulation der Feuerrate, wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von BDNF auf die intrinsische Erregbarkeit der postsynaptischen Zelle untersucht. Die zellspezifische Manipulation durch eine siRNA-vermittelte Reduktion des BDNF-Gehalts, sowie durch intrazelluläre Applikation von K252a, hatte weder einen Einfluss auf die Aktionspotentialfrequenz, noch auf das gemessene Membranruhepotential. Demnach lassen die erhaltenen Ergebnisse darauf schließen, dass die intrinsische Erregbarkeit sowohl unabhängig vom endogenen BDNF-Gehalt, wie auch von der TrkB-abhängigen Signalweiterleitung der untersuchten Zelle ist. Vergleichbare Untersuchungen zur intrinsischen Erregbarkeit nach zellspezifischer Manipulation BDNF/TrkB-abhängiger Signalwege existieren leider nicht. Jedoch wurde das stimulationsbedingte Entladungsverhalten von dissoziierten hippocampalen Neuronen nach BDNF-Applikation beziehungsweise nach Entzug von BDNF durch TrkB-IgGs analysiert [Bolton et al., 2000, Li et al., 1998b]. Hier wurde kein Einfluss von BDNF auf die intrinsische Erregbarkeit (Membranruhepotential und Feuerfrequenz) festgestellt. Auch Studien in transgenen Mäusen mit reduziertem BDNF-Gehalt (BDNF^{+/-}) zeigten eine unveränderte Erregbarkeit von Neuronen des visuellen Kortex [Abidin et al., 2006], wie auch von Neuronen der Amygdala [Meis et al., 2012] im Vergleich zu entsprechenden Neuronen von Wildtyp-Mäusen.

Im Unterschied zu den zuvor beschriebenen Studien wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch eine Reduktion der intrinsischen Erregbarkeit nach zellunspezifischer extrazellulärer Applikation von K252a beobachtet. In Anwesenheit von K252a zeigten Neurone hippocampaler Schnittkulturen ein leicht hyperpolarisiertes Membranruhepotential, sowie eine verringerte Feuerrate. Die hier erhaltenen Ergebnisse bestätigen Untersuchungen von Wang et al. [2009] in dissoziierten hippocampalen Neuronen. Die akute K252a-Applikation hatte in dieser Studie eine Reduktion der basalen Feuerrate zur Folge. Die anhand von K252a erhaltenen Ergebnisse stehen jedoch in Widerspruch zu den Untersuchungen, die in einem System mit reduziertem BDNF-Gehalt durchgeführt wurden [Abidin et al., 2006, Bolton et al., 2000, Li et al., 1998b, Meis et al., 2012]. Es besteht daher die Möglichkeit, dass K252a eine gesonderte Aufgabe in Hinsicht auf die Aktionspotentialfrequenz erfüllt, die eventuell unabhängig von dessen Wirkung auf den TrkB-Rezeptor ist.

Abschließende Untersuchungen zur synaptischen Transmission von Neuronen mit siRNA-vermitteltem BDNF-Defizit, beinhalteten die Analyse exzitatorischer Miniaturströme (mEPSCs). Ein BDNF-Defizit auf Einzelzellniveau beeinflusste weder die Frequenz, noch die Amplitude der gemessenen mEPSCs. Verschiedene Studien konnten jedoch Veränderungen in der mEPSC-Frequenz beobachten. Eine erhöhte Frequenz der Miniaturströme nach BDNF-Applikation war unter anderem in dissoziierten Neuronenkulturen des Hippokampus [Lessmann et al., 1994], in hippocampalen Schnittkulturen [Tyler & Pozzo-Miller, 2001], sowie in akuten Hippokampuschnitten [Madara & Levine, 2008] zu beobachten. Ferner wurde in heterozygoten BDNF-*Knockout* Tieren eine Reduktion der mEPSC-Frequenz gezeigt [akutes Schnittpräparat des visuellen Kortex: Abidin et al., 2006]. Die Veränderungen in der Frequenz der Miniaturströme ließen sich auf eine Modulation der Präsynapse, speziell der präsynaptischen Glutamatfreisetzung, zurückführen. Diese wird unter anderem durch postsynaptisch freigesetztes BDNF, welches retrograd über den synaptischen Spalt diffundiert und an präsynaptische TrkB-Rezeptoren bindet, verstärkt [Magby et al., 2006]. In der vorliegenden Arbeit war die mEPSC-Frequenz und somit auch die präsynaptische Transmitterausschüttung jedoch durch den postsynaptischen BDNF-Defizit unbeeinträchtigt. Der BDNF-Gehalt scheint somit auch nach siRNA-vermitteltem *Knockdown* weiterhin über einem kritischen Schwellenwert zu liegen, sodass die zur Verfügung stehende BDNF-Menge ausreichend ist, um eine effiziente Glutamatausschüttung zu gewährleisten.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die untersuchten Parameter der basalen synaptischen Transmission unabhängig von einem postsynaptisch reduzierten BDNF-Gehalt, wie auch von der postsynaptischen BDNF/TrkB-abhängigen Signalweiterleitung sind.

5.2.2 Bedeutung von BDNF in Prozessen der synaptischen Plastizität

BDNF beeinflusst die synaptische Transmission über eine Vielzahl von Wirkungsmechanismen. In Abhängigkeit des Zelltyps, sowie des subzellulären Wirkungsorts, moduliert BDNF über verschiedene Signaltransduktionskaskaden die Signalweiterleitung. Welche zellspezifische Funktion BDNF speziell in Prozessen der synaptischen Plastizität ausübt und wo diese stattfinden, war und ist Gegenstand zahlreicher Studien.

Diverse experimentelle Ansätze wurden für die Aufklärung dieser Fragestellungen gewählt. Die Verwendung pharmakologischer Blocker ist eine Möglichkeit um Systeme zu manipulieren. Speziell K252a eignet sich für die Untersuchung des Wirkungsorts von BDNF [Inagaki et al., 2008, Meis et al., 2012]. Es besteht die Möglichkeit, K252a sowohl extrazellulär für eine generelle Blockade BDNF/TrkB-abhängiger Signalwege zu verwenden, wie auch intrazellulär für eine zellspezifische Blockade. Verschiedene Studien konnten über vergleichende Untersuchungen eine präsynaptische [Inagaki et al., 2008, Magby et al., 2006, Mohajerani et al., 2007] oder postsynaptische [Cheng & Yeh, 2003, Levine et al., 1995, Meis et al., 2012] Aktivierung TrkB-abhängiger Prozesse beobachten. Demzufolge wurde K252a in der vorliegenden Arbeit zum einen für den generellen Nachweis einer BDNF-abhängigen Langzeitpotenzierung und zum anderen für den Nachweis einer prä- oder postsynaptischen TrkB-Aktivierung verwendet.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass BDNF-abhängige Signalwege die durch *Theta burst* Stimulation induzierte LTP beeinflussen. Die Potenzierung der postsynaptischen Ströme war in Anwesenheit von K252a beeinträchtigt. Die Induktion der LTP an der CA3-CA1-Synapse hippokampaler Schnittkulturen erfolgte anhand einer gepaarten *Theta burst* Stimulation. Unter DMSO-Kontrollbedingungen war eine robuste Potenzierung der postsynaptischen Ströme nach TBS-Stimulation zu beobachten. Diese blieb in Anwesenheit von extrazellulärem K252a aus. In hippokampalen Schnittkulturen ist die *Theta burst* Stimulation dementsprechend ein BDNF-abhängiges LTP-Induktionsprotokoll. Vergleichbare Ergebnisse wurden sowohl in hippokampalen, wie auch in kortikalen Projektionssystemen erhalten [Bartoletti et al., 2002, Chen et

al., 1999]. Der Entzug von BDNF durch TrkB-IgGs [Chen et al., 1999] beziehungsweise durch genetische Manipulation (BDNF^{+/-}-Mäuse) [Bartoletti et al., 2002] hatte jeweils ebenfalls eine Reduktion der durch TBS induzierten LTP zur Folge.

In der vorliegenden Arbeit wurde darüber hinaus der Ort der TrkB-Aktivierung während der BDNF-abhängigen LTP untersucht. Zu diesem Zweck wurde die TrkB-Aktivierung in der postsynaptischen Zelle mit K252a blockiert. Die intrazelluläre Applikation von K252a hatte, wie zuvor auch dessen extrazelluläre Applikation, eine Inhibition der LTP zur Folge. Diese Ergebnisse legen eine postsynaptische Aktivierung BDNF/TrkB-abhängiger Signalwege während der Langzeitpotenzierung nahe. Vergleichbare Studien im thalamo-amygdalaren Projektionssystem bestätigen eine postsynaptische Aktivierung TrkB-abhängiger Prozesse [Meis et al., 2012]. Dort inhibierte die postsynaptische Blockade der TrkB-Rezeptoren mithilfe von K252a ebenfalls die Expression der LTP. Hingegen konnten Untersuchungen an GABA/Glutamatergen Synapsen des visuellen Kortex eine präsynaptische TrkB-Aktivierung während der LTP zeigen [Inagaki et al., 2008]. Die BDNF/TrkB-abhängige Expression der LTP war durch die intrazelluläre Applikation von K252a unbeeinträchtigt. Anhand der unter Verwendung von pharmakologischen Blockaden erhaltenen Ergebnisse scheint die subzelluläre TrkB-Aktivierung abhängig von der untersuchten Synapse zu sein. Jedoch ist die Bestimmung des Wirkungsorts von BDNF allein mithilfe von K252a nicht zweifelsfrei möglich, da es sich hierbei um einen membranpermeablen Wirkstoff handelt [Koizumi et al., 1988, Tapley et al., 1992]. Demnach ist dessen Diffusion über den synaptischen Spalt und dementsprechend auch dessen Wirkung an der Präsynapse nicht vollständig auszuschließen. Zudem wirkt K252a nicht ausschließlich auf die BDNF/TrkB-abhängige Signalweiterleitung, sondern agiert in der gewählten Konzentration auch auf andere Mitglieder der Trk-Rezeptor-Familie [Koizumi et al., 1988].

Daher nutzte eine Anzahl von Studien, anstatt pharmakologischer Blockaden, transgene Mausmodelle zur Manipulation von regionalen Netzwerken (und subregionalen Zellgruppen) [Gärtner et al., 2006, Xu et al., 2000]. Zur Aufklärung der prä- oder postsynaptischen TrkB-Aktivierung sollte beispielsweise ein konditionelles TrkB-*Knockout*-System beitragen [Xu et al., 2000]. Hier hatte ein CA1-spezifischer *Knockout* des TrkB-Rezeptors keinen Einfluss auf die Expression der LTP nach tetanischer Stimulation. Diese Untersuchung deutet demnach auf die Notwendigkeit einer präsynaptischen TrkB-Aktivierung während der LTP. Damit stünde die in der vorliegenden Arbeit ermittelte postsynaptische Aktivierung von TrkB-abhängigen Prozessen während der hippocampalen LTP

in Widerspruch zu den Ergebnissen von Xu et al. [2000]. Jedoch belegen weitere Untersuchungen im Hippokampus auch die Notwendigkeit der postsynaptischen Aktivierung TrkB-abhängiger Signalkaskaden [Gärtner et al., 2006]. Dementsprechend wies eine Studie von Gärtner et al. [2006] auf eine prä- und postsynaptisch TrkB-vermittelte PLC γ -Aktivierung nach tetanischer Stimulation. Zudem wurde eine BDNF-abhängige Aktivierung postsynaptischer NMDA-Rezeptoren und Kalzium-Kanäle gezeigt [Kovalchuk et al., 2002]. Die postsynaptische Aktivierung TrkB-abhängiger Signalwege spielt demnach durchaus eine Rolle in der hippokampalen LTP. Aufgrund der insgesamt teils widersprüchlichen Ergebnisse besteht jedoch weiterhin Aufklärungsbedarf hinsichtlich des subzellulären Wirkungsorts von BDNF.

Die für eine spezifische Region erhaltenen Ergebnisse weisen hinsichtlich der Wirkung von BDNF Diskrepanzen auf, welche unter anderem auf Unzulänglichkeiten der durchgeführten Manipulationen zurückzuführen sind. Aufgrund dessen war die Etablierung neuer Techniken notwendig. Die in der vorliegenden Arbeit etablierte Methode der Einzelzelltransfektion von identifizierten Neuronen eignet sich für eine zellspezifische Untersuchung der Funktionen von BDNF. Ein postsynaptischer *Knockdown* des TrkB-Rezeptors, sowie dessen Transfektion in einzelne Zellen eines TrkB-Rezeptor-defizienten Systems würden zur Aufklärung der zellspezifischen Wirkung von BDNF beitragen.

6 Zusammenfassung

Das Protein BDNF ist ein bedeutender Faktor für die Entwicklung des zentralen Nervensystems. Neben seiner Funktion als Überlebens- und Differenzierungsfaktor ist das Protein ein wichtiger Regulator von Prozessen der synaptischen Transmission und Plastizität. In Abhängigkeit des Zelltyps erfolgt die BDNF-abhängige Modulation auf prä- und/oder postsynaptischer Seite. Zur Aufklärung der zellspezifischen oder sogar subzellulären Wirkung von BDNF bedarf es jedoch der Manipulation auf Einzelzellniveau.

Zur Untersuchung der lokalen Bedeutung von BDNF während der synaptischen Transmission, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Methode entwickelt, die die genetische Manipulation einzelner identifizierter Neurone erlaubt. Die Identifizierung erfolgte anhand elektrophysiologischer Kriterien in der *loose-seal* Konfiguration durch die Ableitung von Aktionsströmen. Die anschließende juxtazelluläre Transfektion ermöglichte die genetische Manipulation eines Neurons. Die simultane Transfektion von Plasmid-DNA und siRNA wurde durch Optimierung der Einzelzelltransfektion erreicht. Ein effizienter *Knockdown* von eGFP, sowie des endogenen DPP6 Proteins konnte fluoreszenzmikroskopisch beziehungsweise elektrophysiologisch nachgewiesen werden.

Für den gezielten *Knockdown* von endogenem BDNF mittels RNA Interferenz wurde eine gegen BDNF mRNA gerichtete siRNA verwendet. Die Effizienz der verwendeten siRNA wurde mithilfe von ELISA Messungen bestätigt. Nach der Einzelzelltransfektion von CA1 Pyramidenzellen mit der validierten BDNF siRNA wurden die elektrophysiologischen Basiseigenschaften der Zelle analysiert. Ein BDNF-Defizit auf Einzelzellniveau hatte keine Auswirkungen auf die basale synaptische Transmission. Die Eigenschaften der Aktionspotentiale von Neuronen, die mit BDNF siRNA beziehungsweise Kontroll siRNA transfiziert waren, sowie untransfizierten Neuronen waren vergleichbar. Darüber

hinaus konnte kein Unterschied in der Frequenz und Amplitude von Miniaturströmen in den drei unterschiedlichen Gruppen beobachtet werden.

Des Weiteren wurde die lokale Bedeutung BDNF-TrkB-abhängiger Signalwege während der LTP in hippocampalen Schnittkulturen untersucht. Um den subzellulären Wirkungsort von BDNF zu bestimmen, wurde der TrkB-Inhibitor K252a verwendet. Die durch *Theta burst* Stimulation induzierte LTP war in Anwesenheit von extra- sowie intrazellulärem K252a beeinträchtigt. Dies lässt auf eine postsynaptische Wirkung von BDNF während der hippocampalen LTP schließen.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit eine Methode entwickelt werden, anhand welcher einzelne Neurone identifiziert und anschließend genetisch manipuliert werden konnten. Unter Zuhilfenahme dieser Methode wurde ein effizienter *Knockdown* endogener Proteine, wie beispielsweise DPP6 und BDNF, auf Einzelzellniveau erzielt. Ein *Knockdown* von BDNF hatte keine Defizite in der basalen synaptischen Transmission von CA1 Pyramidenzellen zur Folge. Jedoch spielte die BDNF-abhängige Signalweiterleitung eine essentielle Rolle während der LTP-Expression in CA1 Pyramidenzellen.

7 Abstract

The neurotrophin BDNF is a crucial factor in the development of the central nervous system. The protein plays an important role in cell survival and differentiation. Additionally, BDNF regulates synaptic transmission and plasticity. Depending on the cell type the BDNF-mediated modulation of synaptic processes occurs on the pre- and/or postsynaptic site. Consequently, understanding the underlying cellular and subcellular mechanisms requires manipulation on the single-cell level.

To investigate the cell-specific functions of BDNF during synaptic transmission, new techniques needed to be established. Therefore, a transfection method was developed in order to genetically modify a single identified neuron. Neuronal identification was performed in the loose seal configuration by the occurrence of action currents. The subsequent juxtacellular transfection allowed the genetic manipulation of the identified neuron. Optimization of the transfection protocol enabled the simultaneous transfection of plasmid DNA and siRNA. The efficiency of the siRNA mediated knockdown of eGFP as well as of the endogenous DPP6 protein was assessed and verified by microscopic and electrophysiological analyses, respectively.

The knockdown of the BDNF protein was performed with an siRNA directed against BDNF mRNA. The efficiency of BDNF-*Knockdown* was quantified by ELISA measurements. CA1 pyramidal neurons were juxtacellularly transfected with the validated BDNF siRNA and characterized two days later by electrophysiological analyses. Basal synaptic transmission was unaffected by a BDNF deficit on the single-cell level. The comparison of action potential properties revealed no significant differences between control and BDNF-deficient neurons. In addition, amplitude and frequency of the miniature currents were unchanged between the different groups.

Furthermore, the activation of BDNF-TrkB signaling during LTP was analyzed on the subcellular level. In hippocampal slice cultures LTP was induced by Theta burst stimulation. Extra- as well as intracellular application of the TrkB-inhibitor K252a impaired the expression of LTP. Therefore, during hippocampal LTP, a postsynaptic locus of TrkB-activation could be deduced from the results obtained in the present work.

In summary, a method that enables the genetic manipulation of identified neurons was developed in the present study. Using this technique, knockdown of endogenous proteins like DPP6 or BDNF was achieved on the single-cell level. Basal synaptic transmission was unaffected by a knockdown-mediated BDNF deficit. However, postsynaptic BDNF signaling was shown to be crucial for the expression of LTP in CA1 pyramidal neurons.

Literatur

- Abidin I, Köhler T, Weiler E, Zoidl G, Eysel UT, Lessmann V, 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.
- Aid T, Kazantseva A, Piirsoo M, Palm K, Timmusk T (2007) Mouse and rat bdnf gene structure and expression revisited. *J Neurosci Res* 85:525–535.
- An JJ, Gharami K, Liao GY, Woo NH, Lau AG, Vanevski F, Torre ER, Jones KR, Feng Y, Lu B, Xu B (2008) Distinct role of long 3' utr bdnf mrna in spine morphology and synaptic plasticity in hippocampal neurons. *Cell* 134:175–187.
- Balkowiec A, Katz DM (2000) Activity-dependent release of endogenous brain-derived neurotrophic factor from primary sensory neurons detected by elisa in situ. *J Neurosci* 20:7417–7423.
- Barbour B, Isope P (2000) Combining loose cell-attached stimulation and recording. *J Neurosci Methods* 103:199–208.
- Barde YA, Edgar D, Thoenen H (1982) Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J* 1:549–553.
- Bartoletti A, Cancedda L, Reid SW, Tessarollo L, Porciatti V, Pizzorusso T, 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. *J Neurosci* 22:10072–10077.
- Bibel M, Hoppe E, Barde YA (1999) Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75^{ntr}. *EMBO J* 18:616–622.
- Böckmann RA, de Groot BL, Kakorin S, Neumann E, Grubmüller H (2008) Kinetics, statistics, and energetics of lipid membrane electroporation studied by molecular dynamics simulations. *Biophys J* 95:1837–1850.
- Bolton MM, Pittman AJ, Lo DC (2000) Brain-derived neurotrophic factor differentially regulates excitatory and inhibitory synaptic transmission in hippocampal cultures. *J Neurosci* 20:3221–3232.
- Bothwell M (1995) Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors. *Annu Rev Neurosci* 18:223–253.
- Boudes M, Pieraut S, Valmier J, Carroll P, Scamps F (2008) Single-cell electroporation of adult sensory neurons for gene screening with rna interference mechanism. *J Neurosci Methods* 170:204–211.

- Brigadski T, Hartmann M, Lessmann V (2005) Differential vesicular targeting and time course of synaptic secretion of the mammalian neurotrophins. *J Neurosci* 25:7601–7614.
- Brünig I, Penschuck S, Berninger B, Benson J, Fritschy JM (2001) Bdnf reduces miniature inhibitory postsynaptic currents by rapid downregulation of gaba(a) receptor surface expression. *Eur J Neurosci* 13:1320–1328.
- Chao MV (2003) Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci* 4:299–309.
- Chen G, Kolbeck R, Barde YA, Bonhoeffer T, Kossel A (1999) Relative contribution of endogenous neurotrophins in hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci* 19:7983–7990.
- Cheng Q, Yeh HH (2003) Brain-derived neurotrophic factor attenuates mouse cerebellar granule cell gaba(a) receptor-mediated responses via postsynaptic mechanisms. *J Physiol* 548:711–721.
- Cherubini E, Gaiarsa JL, Ben-Ari Y (1991) Gaba: an excitatory transmitter in early postnatal life. *Trends Neurosci* 14:515–519.
- Cohen S, Levi-Montalcini R, Hamburger V (1954) A nerve growth-stimulating factor isolated from sarcom as 37 and 180. *Proc Natl Acad Sci U S A* 40:1014–1018.
- Conner JM, Lauterborn JC, Yan Q, Gall CM, Varon S (1997) Distribution of brain-derived neurotrophic factor (bdnf) protein and mrna in the normal adult rat cns: evidence for anterograde axonal transport. *J Neurosci* 17:2295–2313.
- Daniel J, Polder HR, Lessmann V, Brigadski T (2013) Single-cell juxtacellular transfection and recording technique. *Pflugers Arch* 465:1637–1649.
- De Simoni A, Edwards FA (2006) Pathway specificity of dendritic spine morphology in identified synapses onto rat hippocampal ca1 neurons in organotypic slices. *Hippocampus* 16:1111–1124.
- De Simoni A, Griesinger CB, Edwards FA (2003) Development of rat ca1 neurones in acute versus organotypic slices: role of experience in synaptic morphology and activity. *J Physiol* 550:135–147.
- Dean C, Liu H, Dunning FM, Chang PY, Jackson MB, Chapman ER (2009) Synaptotagmin-iv modulates synaptic function and long-term potentiation by regulating bdnf release. *Nat Neurosci* 12:767–776.
- Dechant G, Barde YA (2002) The neurotrophin receptor p75(ntr): novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nat Neurosci* 5:1131–1136.

- Desai NS, Rutherford LC, Turrigiano GG (1999) Bdnf regulates the intrinsic excitability of cortical neurons. *Learn Mem* 6:284–291.
- Dieni S, Matsumoto T, Dekkers M, Rauskolb S, Ionescu MS, Deogracias R, Gundelfinger ED, Kojima M, Nestel S, Frotscher M, Barde YA (2012) Bdnf and its pro-peptide are stored in presynaptic dense core vesicles in brain neurons. *J Cell Biol* 196:775–788.
- Dugich-Djordjevic MM, Peterson C, Isono F, Ohsawa F, Widmer HR, Denton TL, Bennett GL, Hefti F (1995) Immunohistochemical visualization of brain-derived neurotrophic factor in the rat brain. *Eur J Neurosci* 7:1831–1839.
- Edelmann E, Leßmann V, Brigadski T (2014) Pre- and postsynaptic twists in bdnf secretion and action in synaptic plasticity. *Neuropharmacology* 76 Pt C:610–627.
- Figurov A, Pozzo-Miller LD, Olafsson P, Wang T, Lu B (1996) Regulation of synaptic responses to high-frequency stimulation and ltp by neurotrophins in the hippocampus. *Nature* 381:706–709.
- Frerking M, Malenka RC, Nicoll RA (1998) Brain-derived neurotrophic factor (bdnf) modulates inhibitory, but not excitatory, transmission in the ca1 region of the hippocampus. *J Neurophysiol* 80:3383–3386.
- Gärtner A, Polnau DG, Staiger V, Sciarretta C, Minichiello L, Thoenen H, Bonhoeffer T, Korte M (2006) Hippocampal long-term potentiation is supported by presynaptic and postsynaptic tyrosine receptor kinase b-mediated phospholipase cgamma signaling. *J Neurosci* 26:3496–3504.
- Gärtner A, Staiger V (2002) Neurotrophin secretion from hippocampal neurons evoked by long-term-potential-inducing electrical stimulation patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:6386–6391.
- Ginty DD, Segal RA (2002) Retrograde neurotrophin signaling: Trk-ing along the axon. *Curr Opin Neurobiol* 12:268–274.
- Gottmann K, Mittmann T, Lessmann V (2009) Bdnf signaling in the formation, maturation and plasticity of glutamatergic and gabaergic synapses. *Exp Brain Res* 199:203–234.
- Grewal SS, York RD, Stork PJ (1999) Extracellular-signal-regulated kinase signalling in neurons. *Curr Opin Neurobiol* 9:544–553.
- Haas K, Sin WC, Javaherian A, Li Z, Cline HT (2001) Single-cell electroporation for gene transfer in vivo. *Neuron* 29:583–591.

- Hallböök F, Ibáñez CF, Persson H (1991) Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in xenopus ovary. *Neuron* 6:845–858.
- Hamburger V, Levi-Montalcini R (1949) Proliferation, differentiation and degeneration in the spinal ganglia of the chick embryo under normal and experimental conditions. *J Exp Zool* 111:457–501.
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of escherichia coli with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166:557–580.
- Haniu M, Montestrucque S, Bures EJ, Talvenheimo J, Toso R, Lewis-Sandy S, Welcher AA, Rohde MF (1997) Interactions between brain-derived neurotrophic factor and the trkb receptor. identification of two ligand binding domains in soluble trkb by affinity separation and chemical cross-linking. *J Biol Chem* 272:25296–25303.
- Harris KM, Teyler TJ (1984) Developmental onset of long-term potentiation in area ca1 of the rat hippocampus. *J Physiol* 346:27–48.
- Hartmann M, Heumann R, Lessmann V (2001) Synaptic secretion of bdnf after high-frequency stimulation of glutamatergic synapses. *EMBO J* 20:5887–5897.
- Hohn A, Leibrock J, Bailey K, Barde YA (1990) Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature* 344:339–341.
- Huang EJ, Reichardt LF (2001) Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24:677–736.
- Huang EJ, Reichardt LF (2003) Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 72:609–642.
- Huang SH, Zhao L, Sun ZP, Li XZ, Geng Z, Zhang KD, Chao MV, Chen ZY (2009) Essential role of hrs in endocytic recycling of full-length trkb receptor but not its isoform trkb.t1. *J Biol Chem* 284:15126–15136.
- Inagaki T, Begum T, Reza F, Horibe S, Inaba M, Yoshimura Y, Komatsu Y (2008) Brain-derived neurotrophic factor-mediated retrograde signaling required for the induction of long-term potentiation at inhibitory synapses of visual cortical pyramidal neurons. *Neurosci Res* 61:192–200.
- Ip NY, Ibáñez CF, Nye SH, McClain J, Jones PF, Gies DR, Belluscio L, Le Beau MM, Espinosa R, Squinto SP (1992) Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:3060–3064.

- Jia Y, Gall CM, Lynch G (2010) Presynaptic bdnf promotes postsynaptic long-term potentiation in the dorsal striatum. *J Neurosci* 30:14440–14445.
- Joshi S, Hawken MJ (2006) Loose-patch-juxtacellular recording in vivo—a method for functional characterization and labeling of neurons in macaque v1. *J Neurosci Methods* 156:37–49.
- Kaplan DR, Hempstead BL, Martin-Zanca D, Chao MV, Parada LF (1991) The trk proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science* 252:554–558.
- Kim J, Nadal MS, Clemens AM, Baron M, Jung SC, Misumi Y, Rudy B, Hoffman DA (2008) Kv4 accessory protein dppx (dpp6) is a critical regulator of membrane excitability in hippocampal ca1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 100:1835–1847.
- Kitamura K, Judkewitz B, Kano M, Denk W, Häusser M (2008) Targeted patch-clamp recordings and single-cell electroporation of unlabeled neurons in vivo. *Nat Methods* 5:61–67.
- Kittler J, Hanley J, Isaac J (2006) *Transfecting and Transducing Neurons with Synthetic Nucleic Acids and Biologically Active Macromolecules. In: The Dynamic Synapse: Molecular Methods in Ionotropic Receptor Biology. Chapter 11.* Boca Raton (FL): CRC Press.
- Klein R, Lamballe F, Bryant S, Barbacid M (1992) The trkb tyrosine protein kinase is a receptor for neurotrophin-4. *Neuron* 8:947–956.
- Koizumi S, Contreras ML, Matsuda Y, Hama T, Lazarovici P, Guroff G (1988) K-252a: a specific inhibitor of the action of nerve growth factor on pc 12 cells. *J Neurosci* 8:715–721.
- Korte M, Carroll P, Wolf E, Brem G, Thoenen H, Bonhoeffer T (1995) Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:8856–8860.
- Korte M, Griesbeck O, Gravel C, Carroll P, Staiger V, Thoenen H, Bonhoeffer T (1996) Virus-mediated gene transfer into hippocampal ca1 region restores long-term potentiation in brain-derived neurotrophic factor mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:12547–12552.
- Kovalchuk Y, Hanse E, Kafitz KW, Konnerth A (2002) Postsynaptic induction of bdnf-mediated long-term potentiation. *Science* 295:1729–1734.
- Krassowska W, Filev PD (2007) Modeling electroporation in a single cell. *Biophys J* 92:404–417.

- Lamballe F, Klein R, Barbacid M (1991) *trkc*, a new member of the *trk* family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell* 66:967–979.
- Larson J, Lynch G (1986) Induction of synaptic potentiation in hippocampus by patterned stimulation involves two events. *Science* 232:985–988.
- Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL (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, Barde YA (1989) Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature* 341:149–152.
- Lessmann V, Gottmann K, Heumann R (1994) Bdnf and nt-4/5 enhance glutamatergic synaptic transmission in cultured hippocampal neurones. *Neuroreport* 6:21–25.
- Lessmann V, Heumann R (1998) Modulation of unitary glutamatergic synapses by neurotrophin-4/5 or brain-derived neurotrophic factor in hippocampal microcultures: presynaptic enhancement depends on pre-established paired-pulse facilitation. *Neuroscience* 86:399–413.
- Lessmann V, Brigadski T (2009) Mechanisms, locations, and kinetics of synaptic bdnf secretion: an update. *Neurosci Res* 65:11–22.
- Levine ES, Crozier RA, Black IB, Plummer MR (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 ES, Dreyfus CF, Black IB, Plummer MR (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 ZA, Vernier PT (2010) Life cycle of an electropore: field-dependent and field-independent steps in pore creation and annihilation. *J Membr Biol* 236:27–36.
- Li X, Zhao X, Fang Y, Jiang X, Duong T, Fan C, Huang CC, Kain SR (1998a) Generation of destabilized green fluorescent protein as a transcription reporter. *J Biol Chem* 273:34970–34975.
- Li YX, Zhang Y, Lester HA, Schuman EM, Davidson N (1998b) Enhancement of neurotransmitter release induced by brain-derived neurotrophic factor in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 18:10231–10240.
- Lin B, Kramár EA, Bi X, Brucher FA, Gall CM, Lynch G (2005) Theta stimulation polymerizes actin in dendritic spines of hippocampus. *J Neurosci* 25:2062–2069.

- Lin SY, Wu K, Levine ES, Mount HT, Suen PC, Black IB (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.
- Lonze BE, Riccio A, Cohen S, Ginty DD (2002) Apoptosis, axonal growth defects, and degeneration of peripheral neurons in mice lacking creb. *Neuron* 34:371–385.
- Lu B, Pang PT, Woo NH (2005) The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci* 6:603–614.
- Lu H, Cheng PL, Lim BK, Khoshnevisrad N, Poo MM (2010) Elevated bdnf after cocaine withdrawal facilitates ltp in medial prefrontal cortex by suppressing gaba inhibition. *Neuron* 67:821–833.
- Madara JC, Levine ES (2008) Presynaptic and postsynaptic nmda receptors mediate distinct effects of brain-derived neurotrophic factor on synaptic transmission. *J Neurophysiol* 100:3175–3184.
- Magby JP, Bi C, Chen ZY, Lee FS, Plummer MR (2006) Single-cell characterization of retrograde signaling by brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 26:13531–13536.
- Maisonpierre PC, Belluscio L, Squinto S, Ip NY, Furth ME, Lindsay RM, Yancopoulos GD (1990) Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to ngf and bdnf. *Science* 247:1446–1451.
- Malinow R, Hayashi Y, Maletic-Savatic M, Zaman SH, Poncer JC, Shi SH, Esteban JA, Osten P, Seidenman K (2010) Introduction of green fluorescent protein (gfp) into hippocampal neurons through viral infection. *Cold Spring Harb Protoc* 2010:pdb.prot5406.
- Markus A, Zhong J, Snider WD (2002) Raf and akt mediate distinct aspects of sensory axon growth. *Neuron* 35:65–76.
- Matsuda N, Lu H, Fukata Y, Noritake J, Gao H, Mukherjee S, Nemoto T, Fukata M, Poo MM (2009) Differential activity-dependent secretion of brain-derived neurotrophic factor from axon and dendrite. *J Neurosci* 29:14185–14198.
- Matsumoto T, Rauskolb S, Polack M, Klose J, Kolbeck R, Korte M, Barde YA (2008) Biosynthesis and processing of endogenous bdnf: Cns neurons store and secrete bdnf, not pro-bdnf. *Nat Neurosci* 11:131–133.
- Meis S, Endres T, Lessmann V (2012) Postsynaptic bdnf signalling regulates long-term potentiation at thalamo-amygdala afferents. *J Physiol* 590:193–208.
- Minichiello L, Calella AM, Medina DL, Bonhoeffer T, Klein R, Korte M (2002) Mechanism of trkb-mediated hippocampal long-term potentiation. *Neuron* 36:121–137.

- Mizoguchi Y, Ishibashi H, Nabekura J (2003) The action of bdnf on gaba(a) currents changes from potentiating to suppressing during maturation of rat hippocampal ca1 pyramidal neurons. *J Physiol* 548:703–709.
- Mohajerani MH, Sivakumaran S, Zacchi P, Aguilera P, Cherubini E (2007) Correlated network activity enhances synaptic efficacy via bdnf and the erk pathway at immature ca3 ca1 connections in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:13176–13181.
- Muller D, Buchs PA, Stoppini L (1993) Time course of synaptic development in hippocampal organotypic cultures. *Brain Res Dev Brain Res* 71:93–100.
- Muller D, Djebbara-Hannas Z, Jourdain P, Vutskits L, Durbec P, Rougon G, Kiss JZ (2000) Brain-derived neurotrophic factor restores long-term potentiation in polysialic acid-neural cell adhesion molecule-deficient hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:4315–4320.
- Nagappan G, Zaitsev E, Senatorov J VV, Yang J, Hempstead BL, Lu B (2009) Control of extracellular cleavage of probdnf by high frequency neuronal activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:1267–1272.
- Neumann E, Toensing K, Kakorin S, Budde P, Frey J (1998) Mechanism of electroporative dye uptake by mouse b cells. *Biophys J* 74:98–108.
- Nevian T, Helmchen F (2007) Calcium indicator loading of neurons using single-cell electroporation. *Pflugers Arch* 454:675–688.
- Nolkrantz K, Farre C, Brederlau A, Karlsson RI, Brennan C, Eriksson PS, Weber SG, Sandberg M, Orwar O (2001) Electroporation of single cells and tissues with an electrolyte-filled capillary. *Anal Chem* 73:4469–4477.
- Nunemaker CS, DeFazio RA, Moenter SM (2003) A targeted extracellular approach for recording long-term firing patterns of excitable cells: a practical guide. *Biol Proced Online* 5:53–62.
- Ogden D (1994) *Microelectrode techniques: the Plymouth Workshop handbook* Company of Biologists.
- Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y (1997) 'green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* 407:313–319.
- Pang PT, Teng HK, Zaitsev E, Woo NT, Sakata K, Zhen S, Teng KK, Yung WH, Hempstead BL, Lu B (2004) Cleavage of probdnf by tpa/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science* 306:487–491.
- Park H, Poo Mm (2013) Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat Rev Neurosci* 14:7–23.

- Patapoutian A, Reichardt LF (2001) Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol* 11:272–280.
- Patterson SL, Abel T, Deuel TA, Martin KC, Rose JC, Kandel ER (1996) Recombinant bdnf rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal ltp in bdnf knockout mice. *Neuron* 16:1137–1145.
- Patterson SL, Grover LM, Schwartzkroin PA, Bothwell M (1992) Neurotrophin expression in rat hippocampal slices: a stimulus paradigm inducing ltp in ca1 evokes increases in bdnf and nt-3 mrnas. *Neuron* 9:1081–1088.
- Perkins KL (2006) Cell-attached voltage-clamp and current-clamp recording and stimulation techniques in brain slices. *J Neurosci Methods* 154:1–18.
- Pi HJ, Otmakhov N, Lemelin D, De Koninck P, Lisman J (2010) Autonomous camkii can promote either long-term potentiation or long-term depression, depending on the state of t305/t306 phosphorylation. *J Neurosci* 30:8704–8709.
- Pinault D (1996) A novel single-cell staining procedure performed in vivo under electrophysiological control: morpho-functional features of juxtacellularly labeled thalamic cells and other central neurons with biocytin or neurobiotin. *J Neurosci Methods* 65:113–136.
- Pittenger C, Huang YY, Paletzki RF, Bourtchouladze R, Scanlin H, Vronskaya S, Kandel ER (2002) Reversible inhibition of creb/atf transcription factors in region ca1 of the dorsal hippocampus disrupts hippocampus-dependent spatial memory. *Neuron* 34:447–462.
- Pozzo-Miller LD, Gottschalk W, Zhang L, McDermott K, Du J, Gopalakrishnan R, Oho C, Sheng ZH, 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.
- Rae JL, Levis RA (2002) Single-cell electroporation. *Pflugers Arch* 443:664–670.
- Rathenberg J, Nevian T, Witzemann V (2003) High-efficiency transfection of individual neurons using modified electrophysiology techniques. *J Neurosci Methods* 126:91–98.
- Rösch H, Schweigreiter R, Bonhoeffer T, Barde YA, Korte M (2005) The neurotrophin receptor p75^{ntr} modulates long-term depression and regulates the expression of ampa receptor subunits in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:7362–7367.
- Rutherford LC, Nelson SB, Turrigiano GG (1998) Bdnf has opposite effects on the quantal amplitude of pyramidal neuron and interneuron excitatory synapses. *Neuron* 21:521–530.

- Ryttsén F, Farre C, Brennan C, Weber SG, Nolkranz K, Jardemark K, Chiu DT, Orwar O (2000) Characterization of single-cell electroporation by using patch-clamp and fluorescence microscopy. *Biophys J* 79:1993–2001.
- Schinder AF, Berninger B, Poo M (2000) Postsynaptic target specificity of neurotrophin-induced presynaptic potentiation. *Neuron* 25:151–163.
- Schinder AF, Poo M (2000) The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 23:639–645.
- Schmidt-Kastner R, Wetmore C, Olson L (1996) Comparative study of brain-derived neurotrophic factor messenger rna and protein at the cellular level suggests multiple roles in hippocampus, striatum and cortex. *Neuroscience* 74:161–183.
- Schwartzkroin PA, Prince DA (1978) Cellular and field potential properties of epileptogenic hippocampal slices. *Brain Research* 147:117 – 130.
- Smith KC, Neu JC, Krassowska W (2004) Model of creation and evolution of stable electropores for dna delivery. *Biophys J* 86:2813–2826.
- Sommerfeld MT, Schweigreiter R, Barde YA, Hoppe E (2000) Down-regulation of the neurotrophin receptor trkb following ligand binding. evidence for an involvement of the proteasome and differential regulation of trka and trkb. *J Biol Chem* 275:8982–8990.
- Soppet D, Escandon E, Maragos J, Middlemas DS, Reid SW, Blair J, Burton LE, Stanton BR, Kaplan DR, Hunter T, Nikolics K, Parada LF (1991) The neurotrophic factors brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 are ligands for the trkb tyrosine kinase receptor. *Cell* 65:895–903.
- Sotty F, Danik M, Manseau F, Laplante F, Quirion R, Williams S (2003) Distinct electrophysiological properties of glutamatergic, cholinergic and gabaergic rat septohippocampal neurons: novel implications for hippocampal rhythmicity. *J Physiol* 551:927–943.
- Stoppini L, Buchs PA, Muller D (1991) A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 37:173–182.
- Suen PC, Wu K, Levine ES, Mount HT, Xu JL, Lin SY, Black IB (1997) Brain-derived neurotrophic factor rapidly enhances phosphorylation of the postsynaptic n-methyl-d-aspartate receptor subunit 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:8191–8195.
- Sugar IP, Neumann E (1984) Stochastic model for electric field-induced membrane pores. electroporation. *Biophys Chem* 19:211–225.

- Tamamaki N, Yanagawa Y, Tomioka R, Miyazaki JI, Obata K, Kaneko T (2003) Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the gad67-gfp knock-in mouse. *J Comp Neurol* 467:60–79.
- Tanaka M, Yanagawa Y, Hirashima N (2009) Transfer of small interfering rna by single-cell electroporation in cerebellar cell cultures. *J Neurosci Methods* 178:80–86.
- Tanaka T, Saito H, Matsuki N (1997) Inhibition of gabaa synaptic responses by brain-derived neurotrophic factor (bdnf) in rat hippocampus. *J Neurosci* 17:2959–2966.
- Tao X, Finkbeiner S, Arnold DB, Shaywitz AJ, Greenberg ME (1998) Ca²⁺ influx regulates bdnf transcription by a creb family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron* 20:709–726.
- Tapley P, Lamballe F, Barbacid M (1992) K252a is a selective inhibitor of the tyrosine protein kinase activity of the trk family of oncogenes and neurotrophin receptors. *Oncogene* 7:371–381.
- Teng HK, Teng KK, Lee R, Wright S, Tevar S, Almeida RD, Kermani P, Torkin R, Chen ZY, Lee FS, Kraemer RT, Nykjaer A, Hempstead BL (2005) Probdnf induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75^{ntr} and sortilin. *J Neurosci* 25:5455–5463.
- Theer P, Hasan MT, Denk W (2003) Two-photon imaging to a depth of 1000 microm in living brains by use of a ti:al₂O₃ regenerative amplifier. *Opt Lett* 28:1022–1024.
- Timmusk T, Palm K, Metsis M, Reintam T, Paalme V, Saarma M, Persson H (1993) Multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat bdnf gene. *Neuron* 10:475–489.
- Tong L, Prieto GA, Kram'ar EA, Smith ED, Cribbs DH, Lynch G, Cotman CW (2012) Brain-derived neurotrophic factor-dependent synaptic plasticity is suppressed by interleukin-1 β via p38 mitogen-activated protein kinase. *J Neurosci* 32:17714–17724.
- Tongiorgi E, Armellin M, Giulianini PG, Bregola G, Zucchini S, Paradiso B, Steward O, Cattaneo A, Simonato M (2004) Brain-derived neurotrophic factor mrna and protein are targeted to discrete dendritic laminas by events that trigger epileptogenesis. *J Neurosci* 24:6842–6852.
- Tsong TY (1991) Electroporation of cell membranes. *Biophys J* 60:297–306.
- Tyler WJ, Pozzo-Miller LD (2001) Bdnf enhances quantal neurotransmitter release and increases the number of docked vesicles at the active zones of hippocampal excitatory synapses. *J Neurosci* 21:4249–4258.

- Wang M, Orwar O, Olofsson J, Weber SG (2010) Single-cell electroporation. *Anal Bioanal Chem* 397:3235–3248.
- Wang Y, Qi JS, Kong S, Sun Y, Fan J, Jiang M, Chen G (2009) Bdnf-trkb signaling pathway mediates the induction of epileptiform activity induced by a convulsant drug cyclothiazide. *Neuropharmacology* 57:49–59.
- Wardle RA, Poo Mm (2003) Brain-derived neurotrophic factor modulation of gabaergic synapses by postsynaptic regulation of chloride transport. *J Neurosci* 23:8722–8732.
- Weaver JC (1993) Electroporation: a general phenomenon for manipulating cells and tissues. *J Cell Biochem* 51:426–435.
- Wierenga CJ, Müllner FE, Rinke I, Keck T, Stein V, Bonhoeffer T (2010) Molecular and electrophysiological characterization of gfp-expressing ca1 interneurons in gad65-gfp mice. *PLoS One* 5:e15915.
- Woo NH, Teng HK, Siao CJ, Chiaruttini C, Pang PT, Milner TA, Hempstead BL, Lu B (2005) Activation of p75^{ntr} by probdnf facilitates hippocampal long-term depression. *Nat Neurosci* 8:1069–1077.
- Wu K, Len GW, McAuliffe G, Ma C, Tai JP, Xu F, Black IB (2004a) Brain-derived neurotrophic factor acutely enhances tyrosine phosphorylation of the ampa receptor subunit glur1 via nmda receptor-dependent mechanisms. *Brain Res Mol Brain Res* 130:178–186.
- Wu W, Hodges E, Redelius J, Höög C (2004b) A novel approach for evaluating the efficiency of sirnas on protein levels in cultured cells. *Nucleic Acids Res* 32:e17.
- Xu B, Gottschalk W, Chow A, Wilson RI, Schnell E, Zang K, Wang D, Nicoll RA, Lu B, Reichardt LF (2000) The role of brain-derived neurotrophic factor receptors in the mature hippocampus: modulation of long-term potentiation through a presynaptic mechanism involving trkb. *J Neurosci* 20:6888–6897.
- Yan Q, Rosenfeld RD, Matheson CR, Hawkins N, Lopez OT, Bennett L, Welcher AA (1997) Expression of brain-derived neurotrophic factor protein in the adult rat central nervous system. *Neuroscience* 78:431–448.
- Yang J, Siao CJ, Nagappan G, Marinic T, Jing D, McGrath K, Chen ZY, Mark W, Tessarollo L, Lee FS, Lu B, Hempstead BL (2009) Neuronal release of probdnf. *Nat Neurosci* 12:113–115.
- Zakharenko SS, Patterson SL, Dragatsis I, Zeitlin SO, Siegelbaum SA, Kandel ER, Morozov A (2003) Presynaptic bdnf required for a presynaptic but not postsynaptic component of ltp at hippocampal ca1-ca3 synapses. *Neuron* 39:975–990.

-
- Zamanillo D, Sprengel R, Hvalby O, Jensen V, Burnashev N, Rozov A, Kaiser KM, Köster HJ, Borchardt T, Worley P, Lübke J, Frotscher M, Kelly PH, Sommer B, Andersen P, Seeburg PH, Sakmann B (1999) Importance of ampa receptors for hippocampal synaptic plasticity but not for spatial learning. *Science* 284:1805–1811.
- Zucker RS (1989) Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 12:13–31.
- Zudans I, Agarwal A, Orwar O, Weber SG (2007) Numerical calculations of single-cell electroporation with an electrolyte-filled capillary. *Biophys J* 92:3696–3705.

Anhang

A. Firmensitze

Advanced Instruments, Inc	Norwood, MA, USA
AHF analysentechnik	Tübingen, Deutschland
Alomone Labs	Jerusalem, Israel
A-M Systems	Carlsborg, WA, USA
Axon Instruments / Molecular Devices	Sunnyvale, CA, USA
Binder	Tuttlingen, Deutschland
biomol	Hamburg, Deutschland
BioTrend	Köln, Deutschland
Bitplane Scientific Software	Zurich, Schweiz
Braun	Melsungen, Deutschland
CED	Cambridge, England
Charles-River gehört	Sulzfeld, Deutschland
Clontech	Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
Diagnostic Instruments Inc.	Sterling Heights, MI, USA
Dow Corning	Wiesbaden, Deutschland
Duran Group	Wertheim / Main, Deutschland
Electron Microscopy Sciences	Hatfield, PA, USA
eppendorf	Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Feather	Osaka, Japan
Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
Fluka gehört zu Sigma-Aldrich	Little Chalfont, Großbritannien
GE Healthcare	Huntington, England
Gibco® gehört zu Life Technologies	Frickenhausen, Deutschland
Goodfellow Camebridge Ltd.	Lambrecht, Deutschland
greiner bio-one	Tuttlingen, Deutschland
HEKA	Armonk, NY, USA
Hettich	Darmstadt, Deutschland
IBM Corp.	Ratingen, Deutschland
Invitrogen™ gehört zu Life Technologies	Bodenheim, Deutschland
Life Technologies	Braunschweig, Deutschland
Luigs & Neumann	Darmstadt, Deutschland
McIlwain gehört zu	London, Großbritannien
membraPure	Heidelberg, Deutschland
Menzel-Gläser	
Merck	
Millipore gehört zu Merck	
Narishige	
Neolab	

npi	Tamm, Deutschland
Nunc™ gehört zu Fisher Scientific	
Olympus	Hamburg, Deutschland
OriginLab Corporation	Northampton, MA, USA
Osram	München, Deutschland
Panasonic	Hamburg, Deutschland
PlusOne™ gehört zu GE Healthcare	
Qiagen	Venlo, Niederlande
R & D Systems, Inc.	Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
Roche	Basel, Schweiz
Roth	Karlsruhe, Deutschland
Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Science Products	Hofheim, Deutschland
Serva	Heidelberg, Deutschland
SI Analytics	Mainz, Deutschland
Sigma gehört zu Sigma-Aldrich	
Sigma-Aldrich	Munich, Deutschland
Streppel Glasfaseroptik	Wermelskirchen, Deutschland
Synptosoft Inc.	Fort Lee, NJ, USA
Tecan Group Ltd.	Männedorf, Schweiz
Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Thermo Scientific gehört zu Thermo Fisher Scientific	
Tocris Bioscience	Bristol, Großbritannien
TPP	Trasadingen, Schweiz
Uniblitz gehört zu Vincent Associates	
Vincent Associates®	Rochester, NY, USA
Wacker Chemie	Stuttgart, Deutschland
World Precision Instruments, Inc.	Sarasota, FL, USA
Zeiss	Jena, Deutschland

B. Lebenslauf

Nachname: Daniel
Vorname: Julia
Geburtsdatum: 08.11.1983
Geburtsort: Berlin - Mitte
Staatsangehörigkeit: Deutsch

2002 - 2007 Studium der Biologie im Fachbereich Biologie/Chemie der
Universität Osnabrück
Abschluss: Diplom-Biologin (Dipl.-Biol.)
2008 - 2014 Promotion am Institut für Physiologie, Medizinische
Fakultät, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

C. Publikationen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden unter folgendem Titel veröffentlicht:

Daniel J, Polder HR, Lessmann V, Brigadski T (2013) Single-cell juxtacellular transfection and recording technique. *Pflügers Archiv (European Journal of Physiology)*.

D. Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie Herrn Prof. Dr. Volkmar Leßmann für die Bereitstellung des Themas, die exzellente fachliche Betreuung und die Möglichkeit in einem hervorragend ausgestatteten Institut promovieren zu dürfen.

Mein besonderer Dank gilt weiterhin Frau Jun.-Prof. Dr. Tanja Brigadski für die Betreuung dieser Doktorarbeit, die Diskussion der Versuche und Ergebnisse, sowie die Einarbeitung in die Kunst des wissenschaftlichen Schreibens. Darüber hinaus danke ich ihr für diverse Gespräche, die nicht unbedingt in Zusammenhang mit der Entstehung dieser Arbeit standen.

Außerdem möchte ich an dieser Stelle dem gesamten Institut für die tolle Zusammenarbeit danken. Spezieller Dank gilt hierbei meinen Büromitbewohnern Petra, Laura und Robert, aber auch Bianca, Dijana und Efrain für die Zeit im und außerhalb des Instituts. Außerdem danke ich Elke, Thomas, Thomas, und Susanne dafür, dass sie immer diskussions- und hilfsbereit waren. Natürlich steht mein Dank an Sabine und Regina (unsere Zellkulturengel) außer Frage. Nicht zu vergessen ein großes Dankeschön an Angela, Steffi, Sybille, Colette und Evelyn.

Meiner lieben Familie danke ich für all ihre Unterstützung. Speziell meiner Mutter Marion, aber auch meinem Vater Uli, sowie Helga und Josef danke ich dafür, dass ihr immer und in jeglichen Belangen für mich da wart. Mein ganz besonderer Dank für einfach alles gilt meinem Engel Timo. Danke, dass du da bist!

Julia Daniel
Springe 6
58095 Hagen

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die von mir eingereichte Dissertation zu dem Thema

*Einzelzelltransfektion in organotypischen Schnittkulturen und die Bedeutung von BDNF
bei Prozessen der synaptischen Transmission und Plastizität*

selbstständig verfasst, nicht schon als Dissertation verwendet habe und die benutzten Hilfsmittel und Quellen vollständig angegeben wurden.

Weiterhin erkläre ich, dass ich weder diese noch eine andere Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) an anderen Einrichtungen eingereicht habe.

Magdeburg, 21. März 2014

Julia Daniel