

# Modulation der Sekretion des Neurotrophins 'Brain-Derived Neurotrophic Factor' durch zyklisches Adenosinmonophosphat

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 Diplom-Biologin Petra Lichtenecker  
geb. am 18. November 1982 in Frankfurt am Main

Gutachter: Prof. Dr. Volkmar Leßmann  
Prof. Dr. Simon Rumpel

Eingereicht am: 10. März 2016  
Verteidigt am: 15. November 2016



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>		<b>IV</b>
<b>1. Einleitung</b>		<b>1</b>
1.1. Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) . . . . .		2
1.1.1. Synthese und Prozessierung von BDNF . . . . .		2
1.1.2. Lokalisation von BDNF . . . . .		3
1.1.3. Sekretion von BDNF . . . . .		5
1.1.3.1. Sekretion von endogenem BDNF . . . . .		5
1.1.3.2. BDNF-Sekretion mit Hilfe fluoreszenter Markerproteinen		6
1.1.3.3. BDNF-Sekretion infolge elektrischer Stimulation . . . . .		7
1.1.4. Die Rolle von BDNF während synaptischer Plastizitätsprozesse .		8
1.1.5. BDNF-abhängige Signaltransduktionskaskaden . . . . .		10
1.2. Der Einfluss von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) auf Verän-		
derungen der synaptischen Plastizität und auf Sekretionsmechanismen .		12
1.2.1. Die Rolle von cAMP während synaptischer Plastizitätsprozesse . .		12
1.2.2. Der Einfluss von zyklischem Adenosin-Monophosphat (cAMP) auf		
die Mechanismen der neuronalen und neuroendokrinen Sekretion .		13
1.2.2.1. Der Einfluss von cAMP auf die Mechanismen der Sekre-		
tion aus neuroendokrinen Zellen . . . . .		14
1.2.2.2. Die Bedeutung cAMP-abhängiger Signalkaskaden wäh-		
rend der Sekretion aus verschiedenen Zelltypen . . . . .		15
1.2.2.3. Der Einfluss von cAMP auf die Sekretion von Neuro-		
transmittern aus Neuronen . . . . .		16
1.3. Gemeinsame Wirkmechanismen von cAMP und BDNF . . . . .		16
1.3.1. Gemeinsame Wirkmechanismen von BDNF und cAMP während		
synaptischer Plastizitätsprozesse . . . . .		17
1.3.2. Modulation der Sekretion von BDNF durch cAMP . . . . .		19
1.4. Ziel dieser Arbeit . . . . .		20
<b>2. Materialien</b>		<b>21</b>
2.1. Chemikalien . . . . .		21
2.2. Kits . . . . .		22
2.3. Verbrauchsmaterialien . . . . .		22
2.4. Geräte . . . . .		23
2.5. DNA-Plasmide . . . . .		25
2.6. Versuchstiere . . . . .		26
2.7. Software . . . . .		27
2.8. Medien und Puffer . . . . .		27

<b>3. Methoden</b>	<b>31</b>
3.1. Primäre Zellkultur . . . . .	31
3.1.1. Hippokampale Mikrokulturen . . . . .	31
3.1.1.1. Reinigung von Deckgläsern . . . . .	31
3.1.1.2. Präparation dissoziierter hippokampaler Neurone . . . . .	31
3.1.1.3. Astrozytenpassage . . . . .	34
3.1.2. Organotypische hippokampale Schnittkulturen . . . . .	34
3.2. Transfektion . . . . .	35
3.2.1. Kalzium-Phosphat-Präzipitation . . . . .	36
3.2.2. Einzelzellektroporation . . . . .	36
3.3. Molekularbiologie . . . . .	37
3.3.1. Herstellung kompetenter Zellen . . . . .	37
3.3.2. Transformation kompetenter Zellen . . . . .	37
3.3.3. Herstellung von Glyceroldauerkulturen . . . . .	38
3.3.4. Plasmidaufreinigung . . . . .	38
3.4. Mikroskopie . . . . .	39
3.4.1. Epifluoreszenzmikroskopie . . . . .	39
3.4.1.1. Herstellung eines Perfusionssystems für dissoziierte hippokampale Neurone . . . . .	39
3.4.1.2. Videomikroskopie . . . . .	39
3.4.2. Immuncytochemische Färbungen . . . . .	40
3.4.3. Konfokale Laserscanning-Mikroskopie . . . . .	40
3.5. Elektrophysiologie . . . . .	41
3.5.1. Whole-Cell Patch Clamp Messungen an dissoziierten hippokampalen Kulturen . . . . .	41
3.6. Analyse . . . . .	42
3.6.1. Nachbearbeitung der fluoreszenzmikroskopischen Experimente . . . . .	42
3.6.2. Statistik . . . . .	43
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>44</b>
4.1. Lokalisation von BDNF in hippokampalen Neuronen . . . . .	44
4.2. Sekretion von BDNF aus hippokampalen Neuronen . . . . .	46
4.2.1. Sekretion von fluoreszenzmarkiertem BDNF durch verschiedene Stimulationsmuster . . . . .	46
4.2.1.1. Sekretion von fluoreszenzmarkiertem BDNF durch den Anstieg der extrazellulären Kaliumkonzentration . . . . .	46
4.2.1.2. Sekretion von fluoreszenzmarkiertem BDNF durch repetitive Depolarisation . . . . .	48
4.2.1.3. Sekretion von fluoreszenzmarkiertem BDNF durch die repetitive Auslösung von Aktionspotenzialen . . . . .	50
4.2.1.4. Vergleich der Sekretion von fluoreszenzmarkiertem BDNF durch verschiedene Stimulationsprotokolle . . . . .	52



4.3. Die Abhängigkeit der BDNF-Sekretion von der intrazellulären cAMP-Konzentration . . . . .	53
4.3.1. Modulation der BDNF-Sekretion durch exogene Zugabe von cAMP	53
4.3.2. Abhängigkeit der BDNF-Ausschüttung von der PKA und Epac . .	56
4.4. Sekretion aus organotypischen hippocampalen Schnittkulturen . . . . .	57
<b>5. Diskussion</b>	<b>61</b>
5.1. Sekretion von BDNF durch verschiedene Stimulationsprotokolle . . . . .	63
5.1.1. Lokalisation von BDNF in verschiedenen Neuronenkulturen . . . .	63
5.1.2. Sekretion von BDNF aufgrund von Depolarisationen . . . . .	63
5.1.3. Sekretion von BDNF durch die Auslösung von Aktionspotenzialen	65
5.1.4. Sekretion von BDNF infolge von Stimulationen, die bei der Initiation von synaptischer Plastizität angewendet werden . . . . .	67
5.1.5. Vergleich der verwendeten Stimulationsprotokolle zur Auslösung einer BDNF-Sekretion aus dissoziierten hippocampalen Neuronen	67
5.1.6. Sekretion von BDNF aus organotypischen, hippocampalen Schnittkulturen durch verschiedene Stimulationen . . . . .	68
5.2. cAMP-Abhängigkeit der BDNF-Sekretion . . . . .	71
5.2.1. Mechanismen, über die cAMP Einfluss auf die Sekretion von BDNF nehmen kann . . . . .	72
5.3. Abhängigkeit der BDNF-Sekretion von verschiedenen cAMP-Signalkaskaden	74
5.4. Bedeutung der Wirkmechanismen von cAMP für die BDNF-Sekretion . .	76
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>80</b>
<b>7. Abstract</b>	<b>81</b>
<b>8. Literatur</b>	<b>82</b>
<b>Anhang</b>	<b>VI</b>
A. Firmensitze . . . . .	VI
B. Lebenslauf . . . . .	VIII
C. Publikationen . . . . .	VIII
D. Danksagung . . . . .	IX

## Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CNG	<i>cyclic nucleotide ion channel</i> )
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
DAG	Diacylglycerol
DIV	<i>days in vitro</i> (Tage in Kultur)
DNA	Deoxyribonukleinsäure
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i> (verbessertes grünfluoreszierendes Protein)
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EPSCs	<i>excitatory postsynaptic currents</i> (exzitatorische postsynaptische Ströme)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GDPs	<i>Giant Depolarizing Potentials</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> (Grünfluoreszierendes Protein)
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
LDCV	<i>Large Dense Core Vesikel</i>
LTD	Langzeitdepression
LTP	Langzeitpotenzierung ( <i>Long Term Potentiation</i> )
MAP2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i> (Mitogen-aktivierte Proteinkinase)
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
n.A	numerische Apertur
NGF	Nerve Growth Factor
o.g.	oben genannt(e/en)
P <sub>x</sub>	postnataler Tag x
p75 <sup>NTR</sup>	p75 Neurotrophinrezeptor
PACAP	<i>pituitary adenylate cyclase activating polypeptide</i>
PFA	Paraformaldehyd
PI <sub>3</sub> -Kinase	Phosphoinositidylinositol-3-Kinase
PLC $\gamma$ 1	Phospholipase C $\gamma$ 1
PSD	<i>Postsynaptic Density</i> (Postsynaptische Dichte)
PTF	<i>post transfection</i> (nach der Transfektion)
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	<i>regions of interest</i> (Regionen von Interesse)

rpm .....	<i>rotations per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RRP .....	<i>ready releasable pool</i>
RT .....	Raumtemperatur
s. ....	siehe
S.E.M. ....	<i>standard error of the mean</i> (Standardfehler)
s.o. ....	siehe oben
Shc .....	<i>Src homolgy 2-containing protein</i>
STDP .....	<i>Spike-timing dependent plasticity</i>
TBS .....	<i>Theta-Burst</i> Stimulation
TGN .....	Trans-Golgi-Netzwerk
TIRF .....	<i>total internal reflection fluorescence</i> (Interne Totalreflexionsfluoreszenz)
tPA .....	<i>tissue plasminogen activator</i>
Trk .....	Tropomyosin-Kinase
TTX .....	Tetrodotoxin
ÜN .....	über Nacht
VGCCs .....	<i>voltage-gated calcium channels</i> (Spannungsgesteuerte Kalziumkanäle)
vgl. ....	vergleiche
z.B. ....	zum Beispiel
ZNS .....	Zentrales Nervensystem

## 1. Einleitung

In der Proteinfamilie der „Neurotrophine“ werden Faktoren zusammengefasst, die am Überleben, an der Funktion und an der ontogenetischen Entwicklung von Neuronen beteiligt sind. Der erste bekannte Vertreter, *Nerve-Growth Factor* (NGF), wurde bereits in den 1950er Jahren von Rita Levi-Montalcini, Stanley Cohen und Viktor Hamburger entdeckt und isoliert (Levi-Montalcini und Hamburger, 1951; Cohen et al., 1954). Der zweite Vertreter, das Protein *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF), konnte jedoch erst über 30 Jahre später aus den Gehirnen von Schweinen isoliert werden (Barde et al., 1982). In den 90er Jahren wurden schließlich weitere Neurotrophine, wie NT-3 (Neurotrophin-3) und NT-4/5, beschrieben (Maisonpierre et al., 1990; Hallböök et al., 1991; Ip et al., 1992). Darüber hinaus wurde die Wirkung der Faktoren näher charakterisiert: Es konnte festgestellt werden, dass diese sekretorischen Proteine nicht nur eine protektive und differenzierende Wirkung während und nach der Entwicklung von Neuronen besitzen, sondern auch an Prozessen der synaptischen Plastizität und der Reperatur von Neuronen beteiligt sein können (für eine Übersicht, s. Ebadi et al., 1997; Davies, 2000; Lu und Gottschalk, 2000; Huang und Reichardt, 2001; Poo, 2001). Die Neurotrophine erfüllen diese Funktionen durch ligandeninduzierte Aktivierungen des allgemeinen Neurotrophinrezeptors  $p75^{NTR}$  oder der spezifischen Tropomyosin-Kinasen (Trk-Rezeptoren; für eine Übersicht, s. Chao 2003). Die Bindung der Neurotrophine an den  $p75^{NTR}$  erfolgt dabei mit ähnlicher Ligandenbindungsaffinität (für eine aktuelle Übersicht, s. Meeker und Williams, 2015). Die Bindung an die Trk-Rezeptoren erfolgt jedoch ligandenspezifisch. BDNF und NT-4 aktivieren beispielsweise den Tropomyosin-Kinase B Rezeptor (Soppet et al., 1991; Klein et al., 1992), während NGF spezifisch an den TrkA Rezeptor bindet (Kaplan et al., 1991). NT-3 besitzt die stärkste Affinität zum

TrkC Rezeptor, kann jedoch auch an TrkA und TrkB binden (Lamballe et al. 1991; für eine Übersicht, s. Bothwell 1995). Die intensive Erforschung von Neurotrophinen, ihren Funktionen und der von ihnen aktivierten Signalkaskaden zeigte ihre zentrale Bedeutung während physiologischer und pathophysiologischer Prozesse (für eine Übersicht, s. Lessmann et al., 2003; Lu et al., 2005; Allen et al., 2013; Oliveira et al., 2013; Park und Poo, 2013).

## 1.1. Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF)

Bereits frühere Untersuchungen zeigten, dass BDNF-mRNA und Protein besonders stark im Säugergehirn verbreitet sind und sich diese Expression im Verlauf der Entwicklung und während Alterungsprozessen verändert (Leibrock et al., 1989; Maisonpierre et al., 1990; Kato-Semba et al., 1997). Inzwischen ist zudem bekannt, dass BDNF eine wichtige Rolle während der Entstehung und Modulation von synaptischer Plastizität im Gehirn besitzt und an Gedächtnisprozessen beteiligt ist (s. auch Abschnitt 1.1.4). Dabei sind der Transport und die aktivitätsabhängige Sekretion von BDNF von zentraler Bedeutung (für eine Übersicht, s. Lessmann et al., 2003; Lessmann und Brigadski, 2009; Bekinschtein et al., 2014; Park und Poo, 2013; Edelmann et al., 2014). Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass die Sekretion von BDNF durch eine Punktmutation im BDNF-Gen, die den Austausch der Aminosäure Valin durch Methionin in der Pro-Region des Proteins verursacht, beeinflusst werden kann. Diese genetische Veränderung nimmt gleichzeitig Einfluss auf die Gedächtnisbildung und die neuronale synaptische Plastizität (Egan et al., 2003).

### 1.1.1. Synthese und Prozessierung von BDNF

Das BDNF-Protein wird wie andere Neurotrophine als Prä-Pro-Peptid aus seiner mRNA synthetisiert (Timmusk et al., 1993). Diese BDNF-mRNA konnte in vielen Gehirnregionen von Mäusen und Ratten nachgewiesen werden (z.B. im Hippokampus, der Amygdala sowie in Thalamus und Hypothalamus; für eine Übersicht s. Edelmann et al. 2014). Während der Synthese gelangt ProBDNF unter Abspaltung der Prä-Domäne in das endoplasmatische Retikulum (ER), wo es beispielsweise durch Glykosylierung und Glykosulfatierung weiter modifiziert werden kann (Mowla et al., 2001). Als sekretorisches Protein wird BDNF in den Golgi-Apparat und in das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) transportiert, wo es letztendlich in sogenannte *Large Dense Core* Vesikel (LDCV) ver-

packt wird (für eine Übersicht, s. Lessmann und Brigadski, 2009). Eine weitere mögliche Form der Prozessierung des Proteins ist die Abspaltung der Pro-Domäne, um matures BDNF (mBDNF, ca. 14 kD) zu generieren. Innerhalb dieser Pro-Domäne befinden sich Signalsequenzen, die dazu führen, dass das Protein in einen von zwei Freisetzungswegen einsortiert wird: Den konstitutiven Sekretionsweg oder den aktivitätsabhängigen Sekretionsweg (Ma et al. 2008, zusammengefasst in Lessmann et al. 2003). Für die Pro-Domäne des Faktors BDNF konnte dabei gezeigt werden, dass sie eine Einsortierung in den aktivitätsabhängigen Freisetzungsweg bewirkt (Chen et al., 2005). Dies konnte von Brigadski et al. (2005) durch den Austausch der verschiedenen Pro-Domänen zwischen den Neurotrophinen, die bevorzugt in unterschiedliche Sekretionswege einsortiert werden, bestätigt werden. Die o.g. proteolytische Spaltung findet intrazellulär durch Furin und Prokonvertasen vor der Sekretion statt (Seidah et al., 1996). Neben dieser intrazellulären Prozessierung wurde jedoch auch die extrazelluläre Abspaltung der Pro-Domäne durch das tPA/Plasmin-System (tPA: *tissue plasminogen activator*) sowie durch extrazelluläre Metalloproteasen beschrieben (Lee et al., 2001; Pang et al., 2004). Da Neurotrophine generell in geringer Konzentration exprimiert werden, wurde die BDNF-Menge in diesen Studien durch das Einbringen von BDNF-Plasmidkonstrukten in die Zellen erhöht. Sowohl endogenes ProBDNF als auch endogenes mBDNF konnten in hippokampalen Lysaten und in hippokampalen Neuronenkulturen detektiert werden (Matsumoto et al. 2008; Yang et al. 2009; für eine Übersicht, s. Lu et al. 2005; Barker 2009).

### 1.1.2. Lokalisation von BDNF

Die geringen Expressionslevel von Neurotrophinen erschweren die Untersuchungen zur Lokalisation des Proteins im Zentralen Nervensystem (ZNS). Allgemein konnte nachgewiesen werden, dass das Protein im gesamten ZNS verbreitet ist. Teilweise gelangt es dabei durch Internalisierung und Transzytose in die verschiedenen Gehirnregionen (Conner et al., 1997). Zudem konnten einige Arbeitsgruppen zeigen, dass die Expression des BDNF-Proteins in der hippokampalen Formation und im zerebralen Kortex besonders hoch ist (für eine Übersicht s. Lessmann et al., 2003; Edelman et al., 2014). Bezüglich der subregionalen und subzellulären Verteilung des Proteins gibt es bisher unterschiedliche Studienergebnisse. Die mRNA des Proteins ist im ZNS weit verbreitet und kann beispielsweise in den hippokampalen CA1-, CA2- und CA3-Pyramidenzellen, in den Körnerzellen des Hippokampus und des Cerebellums sowie in kortikalen Neu-

ronen und in Neuronen des Hypothalamus detektiert werden (Wetmore et al. 1994; für eine Übersicht s. Tongiorgi 2008; Edelman et al. 2014). Für das aus der mRNA translatierte Protein gibt es jedoch bezüglich seiner Lokalisation widersprüchliche Studien. Es wird zwar ebenfalls in den Neuronen des Kortex und des Hypothalamus sowie in Körnerzellen des Hippokampus und in CA2- und CA3-Pyramidenzellen exprimiert, doch während einige Arbeitsgruppen das Protein in den Somata und Dendriten der CA1 Neurone durch Antikörperfärbungen nachweisen konnten (Wetmore et al., 1991; Conner et al., 1997; Dugich-Djordjevic et al., 1995; Schmidt-Kastner et al., 1996), gab es auch Untersuchungen, bei denen BDNF nur in einigen wenigen CA1-Pyramidenzellen detektiert werden konnte (Yan et al., 1997; Dieni et al., 2012). Diese beiden Arbeitsgruppen konnten BDNF jedoch insbesondere in axonalen Fasern detektieren, die präsynaptisch auf die CA1-Pyramidenneurone projizieren.

Auf subzellulärer Ebene wurde insbesondere in Kortex und Hippokampus überprüft, in welchen Regionen sich BDNF mRNA und Protein nachweisen lassen. Die BDNF-mRNA wurde dabei in somatodendritischen Bereichen hippocampaler und kortikaler Kulturen nachgewiesen (Cellerino et al., 1996; Tongiorgi et al., 1997; Capsoni et al., 1999; An et al., 2008; Matsuda et al., 2009; Waterhouse et al., 2012), in denen sie auch translatiert wird (Lau et al., 2010; Liao et al., 2012). Eine dendritische Lokalisation zeigten Tongiorgi et al. (2004) auch *in vivo*. Ferner fanden Righi et al. (2000) heraus, dass eine Depolarisation von Neuronen zu einer Zunahme der dendritisch lokalisierten mRNA im Hippokampus führt, was jedoch für kortikale und striatale Neurone nicht bestätigt werden konnte (Ma et al., 2012). Einige Studien untersuchten im Zusammenhang mit der Lokalisation der mRNA auch die Verteilung des BDNF-Proteins durch immunozytochemische Versuche. Dabei konnte in kultivierten, hippocampalen Neuronen eine starke Kollokalisierung von endogenem BDNF und dem dendritischen Marker MAP2 (Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2) sowohl für embryonal als auch postnatal gewonnene Neurone gezeigt werden (Goodman et al., 1996; An et al., 2008; Matsuda et al., 2009; Waterhouse et al., 2012). Interessanterweise fanden Cheng et al. (2011) unter ihren Kulturbedingungen heraus, dass BDNF während der frühen Entwicklung embryonaler hippocampaler Neurone vor allem axonal lokalisiert ist, wo es durch einen autokrinen Mechanismus an der Entstehung des Axons beteiligt ist. Swanwick et al. (2004) und Matsuda et al. (2009) zeigten nach einer längeren Kultivierungszeit sowohl axonale als auch dendritische Expression des endogenen BDNF-Proteins. Sie zeigten auch, dass BDNF zwar größtenteils extra-

synaptisch lokalisiert war, jedoch auch in den synaptischen Kompartimenten der Zellen vorkam (vgl. auch Scalettar et al., 2012). Eine deutliche Kolo­kalisierung von BDNF-EGFP mit dem postsynaptischen Marker *Postsynaptic Density*-Fraktion 95 (PSD95) wurde von Brigadski et al. (2005) in kultivierten, hippokampalen Neuronen gezeigt. Eine solche Kolo­kalisierung von endogenem BDNF mit der postsynaptischen Dichte konnte auch in kortikalen Neuronen durch hochauflösende Elektronenmikroskopie nachgewiesen werden (Aoki et al., 2000).

Die vielen Studien zur Lokalisation von BDNF zeigen demnach, dass der insgesamt sehr weit verbreitete Faktor in Hippokampus und Kortex am stärksten exprimiert wird. Studien auf zellulärer und subzellulärer Ebene zeigen, dass BDNF beispielsweise in verschiedenen Bereichen des Hippokampus, in Axonen und Dendriten sowie synaptisch und extrasynaptisch nachgewiesen werden kann.

### 1.1.3. Sekretion von BDNF

Bereits Mitte der 90er Jahre gab es die ersten indirekten Beweise für eine mögliche Sekretion von BDNF. Wetmore et al. (1994) konnten immunohistochemisch zeigen, dass eine Stimulation der CA3-Moosfasern im Hippokampus zu einer Zunahme von BDNF ausserhalb der Neurone führte. 1996 zeigten Figurov et al., dass das Abfangen von BDNF durch die extrazelluläre Zugabe von TrkB-Antikörpern die von BDNF ausgelösten Funktionen unterband. Zahlreiche weitere Studien nutzten dieses System, um die Sekretion von BDNF aus Neuronen des Hippokampus und anderer Gehirnstrukturen zu bestätigen (für eine Übersicht s. Lessmann und Brigadski, 2009; Edelman et al., 2014).

#### 1.1.3.1. Sekretion von endogenem BDNF

Die Sekretion von endogenem BDNF konnte durch die Verwendung des *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) für Superfusate von Gehirnschnitten von Ratten und Mäusen mehrfach bestätigt werden. Bei diesen Versuchen wurden die Gewebeschnitte elektrisch (Kortex, Aicardi et al. 2004; Bergami et al. 2008) oder durch eine Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration (Hippokampus, Griesbeck et al. 1999) bzw. durch die extrazelluläre Zugabe von Neurotrophinen (Hippokampus, Canossa et al. 1997) stimuliert und der BDNF-Gehalt des Puffers zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Der BDNF-Gehalt in der extrazellulären Lösung stieg nach der Stimulation jeweils an. Versuche an Neuronenkulturen zeigten ebenfalls eine Zunahme der BDNF-Sekretion nach



Stimulation (Canossa et al., 1997; Griesbeck et al., 1999). In diesen Versuchen wurden die basalen BDNF-Level jedoch experimentell erhöht, um die Detektionsschwelle für die ELISA-Messungen zu erreichen. Erst später entwickelten Balkowiec und Katz (2000) eine modifizierte ELISA-Technik, die es ihnen ermöglichte, die Konzentration sekretierten BDNFs in Kulturschalen auch ohne Überexpression des Proteins zu bestimmen. Durch sie und weitere Arbeitsgruppen konnte eine BDNF-Freisetzung aus hippokampalen Kulturen nach elektrischer Stimulation, nicht jedoch nach der Zunahme der extrazellulären Kaliumkonzentration, bestätigt werden (Balkowiec und Katz, 2002; Babu et al., 2009; Dean et al., 2009). Obwohl die o.g. Studien eine Freisetzung von endogenem BDNF eindeutig nachwiesen, beträgt die zeitliche Auflösung der BDNF-ELISA-Messungen zwischen einer Minute und mehreren Stunden, was wesentlich langsamer ist als die Sekretionsgeschwindigkeit von Neurotrophinen (vgl. Brigadski et al., 2005, sowie Abschnitt 1.1.3.2). Die Zelltypen, die BDNF ausschütten, sowie der subzelluläre Ursprung des sekretierten BDNFs können durch diese Methode demnach nicht genauer eingegrenzt werden (für eine Übersicht s. Lessmann und Brigadski, 2009).

### **1.1.3.2. BDNF-Sekretion mit Hilfe fluoreszenter Markerproteinen**

Um die aktivitätsabhängige Sekretion von BDNF räumlich und zeitlich besser auflösen zu können, verwendeten viele Studien DNA-Konstrukte für fluoreszenzmarkiertes BDNF, die in Neurone eingebracht wurden. Einige dieser Studien zeigten, dass die zelluläre Verteilung und die Sekretionseigenschaften dieser Proteine mit denen von endogenem BDNF vergleichbar sind (Haubensak et al. 1998; Kojima et al. 2001; Brigadski et al. 2005; Matsuda et al. 2009; Dean et al. 2009; Scalettar et al. 2012; für eine Übersicht s. beispielsweise Lessmann und Brigadski 2009). BDNF-GFP (GFP: Grünfluoreszierendes Protein) kann insbesondere dazu verwendet werden, die Sekretion und Wiederaufnahme von BDNF als Reaktion auf verschiedene Stimuli durch Videoaufnahmen in Echtzeit zu untersuchen. Viele Studien verwenden dabei eine Methode, bei der die extrazelluläre Kaliumkonzentration zur Depolarisation der Neurone erhöht wird. Die Sekretion wird dabei als Abnahme der intravesikulären GFP-Fluoreszenz nach der Stimulation gemessen. Mit dieser Methode konnte die Sekretion von BDNF aus den Dendriten hippokampaler und kortikaler Neurone (Hartmann et al., 2001; Kojima et al., 2001; Brigadski et al., 2005; Kolarow et al., 2007; de Wit et al., 2009; Dean et al., 2009) und aus Axonen (Shinoda et al., 2011; Dean et al., 2009; Sadakata et al., 2012) beobachtet werden. Brigadski et al. (2005) fanden mit dieser Methode heraus, dass die Dynamik der BDNF-Sekretion

aus den Dendriten hippocampaler Neurone kritisch vom pH-Wert der LDCVs beeinflusst wird, in denen sich das Protein befindet. Eine vorzeitige Alkalisierung der Vesikel konnte die Sekretion beschleunigen, die unter physiologischen Bedingungen zehnfach langsamer verläuft als die Sekretion aus synaptischen Vesikeln. Die gleiche Arbeitsgruppe konnte außerdem zeigen, dass diese Ausschüttung über die Entstehung von Fusionsporen erfolgt, die entweder über mehrere Sekunden konstant geöffnet bleiben oder sich wiederholt öffnen und schließen (*kiss and run* oder transiente Fusion). Diese durch Zunahme der extrazellulären Kaliumkonzentration induzierte Freisetzung von BDNF war kritisch vom Einstrom postsynaptischen Kalziums über spannungsgesteuerte Kalziumkanäle (L-Typ VGCCs) und von der Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Speichern abhängig (Hartmann et al., 2001; Kolarow et al., 2007).

### 1.1.3.3. BDNF-Sekretion infolge elektrischer Stimulation

Neben der Stimulation von Neuronen durch exzitatorische Transmitter oder durch Veränderungen in der extrazellulären Kaliumkonzentration haben sich einige Studien bisher auch mit der Beobachtung der Sekretion von BDNF aufgrund elektrischer Stimuli beschäftigt. Hartmann et al. konnten 2001 zeigen, dass eine presynaptische, tetanische Stimulation in einigen Zellen eine Sekretion auslösen konnte, die mit der Sekretion durch die gleichzeitige Zugabe von erhöhtem extrazellulärem Kalium und dem exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat vergleichbar war. Weitere Studien konnten außerdem eine spontane neuronale Aktivität mit der Sekretion von BDNF aus hippocampalen Neuronen in Verbindung bringen (Canossa et al., 2002; Magby et al., 2006; Kuczewski et al., 2008).

Studien, die sich mit der Induktion der BDNF-Sekretion durch elektrische Stimulation beschäftigten, nutzten in ihren Ansätzen die Methode der Feldstimulation. Sie verwendeten dabei Protokolle, die bei Versuchen zur Induktion von synaptischer Plastizität eine Rolle spielen (vgl. Abschnitt 1.1.4). So konnte an kortikalen Schnitten eine BDNF-Sekretion durch Theta-Burst Stimulationen (TBS<sup>1</sup>) ausgelöst werden, die durch ELISA-Messungen oder Immunfärbungen nachgewiesen werden konnte (Aicardi et al., 2004; Bergami et al., 2008). Solche TBS wurden auch bei Feldstimulationen an hippocampalen Neuronen und Gehirnschnitten verwendet, um eine Ausschüttung von BDNF auszulösen (Balkowiec und Katz, 2002; Gärtner und Staiger, 2002; Santi et al., 2006; Matsuda et al.,

---

<sup>1</sup>TBS: mehrfache Wiederholungen von kurzen Impulsen (4-5 Stimuli bei 100 Hz) im Abstand von 5 Hz

2009). Matsuda et al. stellten dabei fest, dass sich der Modus der BDNF-Sekretion nach TBS in Axonen und Dendriten unterscheidet: Dendritische BDNF-enhaltende Vesikel gaben ihren gesamten Inhalt durch Verschmelzung mit der Zellmembran an das extrazelluläre Medium ab (*full collapse* Fusion), während axonale Vesikel ihr BDNF durch transiente Fusion freisetzten. Neben diesen Protokollen wurden außerdem verschiedene hochfrequente Stimulationen mit Mustern von 50 - 100 Hz zur erfolgreichen Induktion einer BDNF-Sekretion verwendet (Balkowiec und Katz, 2002; Gärtner und Staiger, 2002; Nagappan et al., 2009) sowie einige niederfrequente Stimulationsprotokolle, die entweder keine Sekretion verursachten (Gärtner und Staiger, 2002) oder die Sekretion von ProBDNF zur Folge hatten (Nagappan et al., 2009).

Auch Kuczewski et al. (2008) beschäftigten sich in ihrer Arbeit intensiv mit der Möglichkeit, eine BDNF-Sekretion durch elektrische Stimulationen auszulösen, jedoch ohne dabei auf Feldpotenziale zurückgreifen zu müssen. Sie nutzten *patch clamp* Ganzzellableitungen, um eine BDNF-Ausschüttung nach spontaner Zellaktivität, erhöhter elektrischer Aktivität, anhaltender oder zunehmender Depolarisierung sowie durch die Auslösung von Aktionspotenzialen zu induzieren. Durch dendritische Ableitungen konnten sie feststellen, dass das Zurückpropagieren der Aktionspotenziale in die Dendriten eine Sekretion von endogenem BDNF verursacht. Sie konnten diese Ausschüttung auch durch Echtzeitaufnahmen von fluoreszenzmarkiertem BDNF während der Sekretion beobachten. Interessanterweise fanden sie bei dieser Methode keine Abhängigkeit der Sekretion von Kalzium aus internen Speichern, obwohl der Einstrom von extrazellulärem Kalzium auch bei ihren Experimenten von essentieller Bedeutung war (vgl. kaliuminduzierte Sekretion in Kolarow et al., 2007). Eine weitere interessante Entdeckung dieser und einer weiteren Studie ist, dass eine anhaltende Depolarisation der hippocampalen Neurone auf  $-40$  mV auch dann eine BDNF-Sekretion auslösen konnte, wenn die Entstehung von Aktionspotenzialen durch Tetrodotoxin (TTX), einem Blocker für spannungsgesteuerte Natriumkanäle, unterbunden wurde (Magby et al., 2006; Kuczewski et al., 2008).

#### **1.1.4. Die Rolle von BDNF während synaptischer Plastizitätsprozesse**

Wie in Abschnitt 1.1.3.3 erwähnt, entstammen viele Stimulationsmuster, die eine Sekretion von BDNF induzieren, aus Versuchen zur synaptischen Plastizität in Neuronen. Die Beteiligung von BDNF an Plastizitätsprozessen ist allgemein bekannt und wurde kürzlich in zahlreichen Übersichtsartikeln zusammengefasst (s. zum Beispiel Edelmann et al.,

2014; Leal et al., 2014a,b; Panja und Bramham, 2014). Erste Hinweise zur Bedeutung von BDNF bei synaptischen Plastizitätsprozessen wurden bereits 1992 von Patterson et al. entdeckt, die nach der Induktion einer Langzeitpotenzierung (*long term potentiation*, LTP) durch tetanische Stimulation an hippocampalen Neuronen eine Zunahme der BDNF-mRNA nachweisen konnten. Eine akute Zugabe von BDNF zu hippocampalen oder kortikalen Neuronen bzw. hippocampalen Schnitten führte außerdem zu einer Verbesserung der synaptischen Transmission (Lessmann et al., 1994; Figuero et al., 1996; Takei et al., 1997). Einige Studien zeigten zudem, dass eine Reduktion des extrazellulären BDNFs die Stärke einer LTP verringern oder sie unterbinden kann (Figuero et al., 1996; Kang et al., 1997; Chen et al., 1999). Ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung von BDNF bei synaptischen Plastizitätsprozessen konnte in BDNF-defizienten Mäusen gefunden werden. Heterozygote BDNF *knockout* Mäuse, deren BDNF-Gehalt um 40 - 55 % reduziert ist (Kolbeck et al., 1999; Psotta et al., 2013), zeigten Defizite bei der Entwicklung der synaptischen Plastizität (Korte et al., 1995; Patterson et al., 1996). Diese Veränderungen in der synaptischen Plastizität konnten durch eine Erhöhung des BDNF-Gehalts mit Hilfe viraler Genexpression oder durch exogener Zugabe des Proteins aufgehoben werden (Patterson et al., 1996; Korte et al., 1996). Interessanterweise zeigten heterozygote BDNF *knockout* Mäuse außerdem deutliche Lern- und Gedächtnisdefizite (Gorski et al. 2003; Endres und Lessmann 2012; Psotta et al. 2013, für eine Übersicht s. Gottmann et al. 2009; Yoshii und Constantine-Paton 2010).

Inzwischen ist bekannt, dass BDNF sowohl bei der Entstehung der hippocampalen *early* LTP (E-LTP)<sup>2</sup>, der *late* LTP (L-LTP)<sup>3</sup> und teilweise auch der LTD eine Funktion besitzt, wobei die Details der Mechanismen, die diese Funktionen vermitteln, noch genauer untersucht werden müssen (für eine aktuelle Übersicht, s. Edelman et al., 2014; Leal et al., 2014a; Panja und Bramham, 2014). Beispielsweise kann BDNF in hippocampalen Gehirnschnitten von neonatalen Ratten eine nur sehr wenige Minuten anhaltende Potenzierung in eine langanhaltende Potenzierung umwandeln (Figuero et al., 1996). Andere Studien zeigen, dass eine reine BDNF-Applikation bereits eine LTP induzieren kann (für eine Übersicht, s. Leal et al., 2014a; Lu et al., 2014) oder für die langfristige Aufrechterhaltung der LTP notwendig ist (Korte et al., 1998; Kang et al., 1997; Minichiello et al., 1999).

---

<sup>2</sup>Die E-LTP wird von der Modulation und dem postsynaptischen Einbau von AMPA-Rezeptoren getragen und ist nicht von einer Gentranskription abhängig.

<sup>3</sup>Die L-LTP hält mehrere Stunden bis Tage an und benötigt die Transkription von Genen.

Insgesamt zeigen die Untersuchungen der letzten 25 Jahren diverse Mechanismen und Auswirkungen, die bei der BDNF-abhängigen LTP eine Rolle spielen, sich aber je nach Gewebe, Stimulationsmethode und experimentellen Bedingungen unterscheiden (für eine aktuelle Übersicht, s. Edelman et al., 2014; Leal et al., 2014a; Lu et al., 2014). Die experimentellen Ergebnisse in diesen Studien weisen zusammengenommen jedoch deutlich darauf hin, dass BDNF an der Regulation, Modulation bzw. der Vermittlung von verschiedenen synaptischen Plastizitätsprozessen, wie L-LTP, E-LTP und auch STDP (*spike-timing dependent plasticity*)<sup>4</sup>, beteiligt ist.

### 1.1.5. BDNF-abhängige Signaltransduktionskaskaden

BDNF vermittelt seine diversen Wirkungen, wie beispielsweise die Vermittlung synaptischer Plastizitätsprozesse, durch Rezeptor-aktivierte Signalkaskaden. Wie eingangs bereits erwähnt, kann BDNF nach seiner Ausschüttung sowohl an Tropomyosinkinase-Rezeptoren (TrkB) als auch an den allgemeinen Neurotrophinrezeptor p75<sup>NTR</sup> binden (für eine Übersicht, s. Chao, 2003; Reichardt, 2006). Es wird vermutet, dass die beiden Rezeptoren gegensätzliche Funktionen vermitteln, indem sie entweder vorwiegend matures BDNF (TrkB) oder die sekretierte Proform der Neurotrophine (p75<sup>NTR</sup>) binden. Die Bindung von BDNF an den TrkB-Rezeptor kann beispielsweise neuroprotektiv wirken, die synaptische Transmission fördern oder das Wachstum der Neurone stimulieren, während der p75<sup>NTR</sup> die synaptische Transmission und das Wachstum von Neuriten reduziert und apoptotisch wirkt (für eine Übersicht, s. Lu et al., 2005, 2014).

Die Bindung von BDNF an den TrkB-Rezeptor führt zu dessen Dimerisierung. Dies wiederum initiiert die *trans*-Autophosphorylierung der Rezeptoren. Über Adapterproteine werden verschiedene Signalwege aktiviert, die unter anderem die Transkription von Genen und die Translation von Proteinen zur Folge haben können (für eine Übersicht, s. Huang und Reichardt, 2003; Patapoutian und Reichardt, 2001). Derzeit werden drei Signalwege unterschieden, die durch TrkB-Rezeptoren aktiviert werden: Der Signalweg über die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK), der Phospholipase C $\gamma$ 1 (PLC $\gamma$ 1)-Signalweg und der Signalweg über die Phosphoinositidylinositol-3-Kinasen (PI<sub>3</sub>-Kinasen). TrkB kann beispielsweise über das G-Protein Ras und das Adapterprotein *Src homology 2-containing protein* (Shc) die Phosphorylierung der MAPK initiieren. Eine langanhalt-

---

<sup>4</sup>Assoziative, Hebb'sche Form einer Langzeitpotenzierung, bei der eine bestimmte, zeitlicher Zusammenhang der prä- zur postsynaptischen Stimulation eine Potenzierung auslöst.

tende Aktivierung dieser Kinase führt über mehrere Zwischenschritte auch zu einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie CREB (*cAMP response element binding protein*), welches auch die Transkription von *bdnf* reguliert (für eine Übersicht, s. Huang und Reichardt, 2003; Yoshii und Constantine-Paton, 2010). Über diesen Signalweg werden Funktionen wie das Überleben von Neuronen, neuroprotektive Effekte und teilweise auch die BDNF-induzierte Verstärkung der synaptischen Plastizität vermittelt (für eine Übersicht, s. Kaplan und Miller, 2000; Reichardt, 2006; Carvalho et al., 2008).

Das G-Protein Ras kann jedoch auch zur Aktivierung der  $PI_3$ -Kinase führen, was die Entstehung von Phosphatidylinositiden katalysiert und die Phosphorylierung von Akt (Proteinkinase B) zur Folge hat. Dieser Signalweg wird insbesondere mit dem Überleben von Neuronen und dem Wachstum von Neuriten in Verbindung gebracht (Markus et al., 2002).

Der dritte Signalweg ist durch die Aktivität der  $PLC\gamma_1$  charakterisiert. Dies hat die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat zur Folge. Dabei entsteht Diacylglycerol (DAG), welches zur Aktivierung der Proteinkinase C führt, sowie  $IP_3$  (Inositol-1,4,5-trisphosphat), das über den  $IP_3$ -Rezeptor Kalzium aus internen Speichern freigibt (für eine Übersicht, s. Huang und Reichardt, 2003; Carvalho et al., 2008). Rückwirkend trägt dies wiederum zur Aktivierung von MAPK und über die CaMKII (Calmodulin-dependent Protein Kinase II) zur Phosphorylierung von CREB bei (für eine Übersicht, s. Carvalho et al., 2008; Bekinschtein et al., 2008). Der  $PLC\gamma_1$ -Signalweg ist insbesondere mit den Auswirkungen von BDNF auf Lernprozesse und synaptische Plastizität assoziiert (für eine Übersicht, s. Schweigreiter, 2006).

Die Signalweiterleitung über den  $p75^{NTR}$  kann beispielsweise apoptotische Prozesse einleiten, wobei die Beteiligung des Korezeptors Sortilin von Bedeutung ist (Teng et al., 2005). Zusätzlich wird der Bindung von Proneurotrophinen an den  $p75^{NTR}$  eine Bedeutung bei der Entstehung der LTD zugeschrieben (für eine Übersicht, s. Lu et al., 2014).

## 1.2. Der Einfluss von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) auf Veränderungen der synaptischen Plastizität und auf Sekretionsmechanismen

Der sekundäre Botenstoff cAMP ist ein ubiquitärer Signalstoff, der durch die Adenylatzyklase aus Adenosintriphosphat (ATP) hergestellt wird und von nahezu allen Organismen, sowohl eukaryotisch als auch prokaryotisch, synthetisiert und verwendet wird (für eine Übersicht, s. Antoni, 2000). Ein Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration führt zur Aktivierung der Proteinkinase A (PKA), dem *Exchange protein directly activated by cAMP* (Epac) oder der *cyclic nucleotide ion channels* (CNGs, für eine Übersicht, s. beispielsweise Seino und Shibasaki 2005). Die nachfolgenden Abschnitte konzentrieren sich insbesondere auf die nachgeschalteten Signalwege von cAMP über PKA und Epac bei der Entstehung der synaptischen Plastizität sowie bei der Sekretion von Proteinen aus neuronalen und neuroendokrinen Zellen.

### 1.2.1. Die Rolle von cAMP während synaptischer Plastizitätsprozesse

Für cAMP ist eine Beteiligung an Plastizitätsprozessen bekannt und konnte zum Beispiel im Zerebellum (Salin et al., 1996; Linden und Ahn, 1999) und im Hippokampus (Huang et al., 1994; Huang und Kandel, 1994; Slack und Pockett, 1991; Weisskopf et al., 1994) gezeigt werden (für eine Übersicht, s. Seino und Shibasaki, 2005; Sanderson und Sher, 2013). So stellten Lessmann und Heumann (1997) zum Beispiel an dissoziierten hippocampalen Neuronen fest, dass eine intrazelluläre Applikation von cAMP in das präsynaptische Neuron hippocampaler Kulturen die synaptische Stärke glutamaterger Synapsen verbessert. Trudeau et al. (1996) vermuteten, dass dieser Mechanismus durch eine Veränderung in der vesikulären Ausschüttung von Glutamat über die PKA vermittelt werden könnte. Die Bedeutung von cAMP während der LTP wurde aber insbesondere in der CA1-Region hippocampaler Schnitten untersucht. So konnten Chavez-Noriega und Stevens (1992) zeigen, dass eine Potenzierung der postsynaptischen Antwort von CA1-Neuronen durch den Adenylatzyklase-Aktivator Forskolin erreicht werden kann. Blitzer et al. (1995) bestätigten, dass die Entstehung einer solchen E-LTP (*early-LTP*) kritisch von der postsynaptischen Zunahme der cAMP-Konzentration abhängig ist. Frey et al. (1993) und Wong et al. (1999) stellten außerdem fest, dass starke tetanische Reize in hippocampalen Schnitten durch Calmodulin-aktivierte Adenylatzyklasen zu einem Anstieg

von cAMP führten. Dieser Anstieg war notwendig, um eine langanhaltenden Potenzierung auszulösen (L-LTP, *late* LTP), die durch die PKA vermittelt wurde (Frey et al., 1993; Huang und Kandel, 1994). Genetisch veränderte Mäuse, deren PKA-Aktivität reduziert ist, zeigen zudem eine Beeinträchtigung bei der Expression der L-LTP (Woo et al., 2002). Interessanterweise gibt es auch Studien, die zeigen konnten, dass auch die Aktivierung des Faktors Epac sowohl für die Entstehung der hippocampalen L-LTP nach hochfrequenter Stimulation als auch für das Langzeitgedächtnis essenziell ist (Gelines et al., 2008; Ma et al., 2009).

Zyklisches AMP ist auch bei der Entstehung der Langzeitdepression (LTD) von Bedeutung. Eine Arbeitsgruppe zeigte beispielsweise, dass das Einwaschen von cAMP-Analoga nach einer hochfrequenten Stimulation der Schaffer-Kollaterale zunächst zu einer LTD führte und erst nach dem Auswaschen eine LTP nach sich zog (Slack und Pockett, 1991; Pockett et al., 1993). In einer anderen Studie wurde die PKA-Untereinheit RI $\beta$  durch genetische Manipulation verändert, was zu einer Beeinträchtigung bei der Entwicklung hippocampalen LTD nach niederfrequenter Stimulation führte (Brandon et al., 1995). Im Vergleich zu diesen Erkenntnissen sind die Ergebnisse von Ster et al. (2009) zur hippocampalen LTD ebenfalls sehr interessant: Sie stellten fest, dass die alleinige Aktivierung des Faktors Epac eine LTD auslöste, der eine Aktivierung der Adenylatzyklase durch PACAP (*pituitary adenylate cyclase activating polypeptide*) voraus ging.

Diese Untersuchungen zeigen, dass cAMP-abhängige Signalkaskaden sowohl über die PKA als auch über Epac bei der Entstehung und Erhaltung der synaptischen Plastizität eine Rolle spielen. Sie sind dabei sowohl bei der Entstehung der LTP als auch bei der Entstehung der LTD von Bedeutung. Die Unterschiede zwischen den beiden Kaskaden müssen jedoch noch genauer untersucht werden, um ein besseres Verständnis ihrer individuellen Bedeutung während synaptischer Plastizitätsprozesse zu erlangen.

### **1.2.2. Der Einfluss von zyklischem Adenosin-Monophosphat (cAMP) auf die Mechanismen der neuronalen und neuroendokrinen Sekretion**

Es ist allgemein bekannt, dass cAMP eine bedeutende Rolle bei der Exozytose von synaptischen Vesikeln und LDCVs besitzt. Durch eine verstärkende Wirkung auf die Sekretion aus synaptischen Vesikeln nimmt der Botenstoff Einfluss auf synaptische Plastizitätspro-



zesse, wie die Entstehung der LTP (für eine Übersicht, s. Seino und Shibasaki, 2005, sowie Abschnitt 1.2.1).

### **1.2.2.1. Der Einfluss von cAMP auf die Mechanismen der Sekretion aus neuroendokrinen Zellen**

Insbesondere an hormonsekretierenden Zellen konnte gezeigt werden, dass cAMP einen regulatorischen Einfluss auf die Sekretion von Proteinen aus diesen Zellen hat (für eine Übersicht, s. Seino und Shibasaki, 2005). Im Fokus solcher Untersuchungen stand bisher die Ausschüttung von Hormonen aus endokrinen und neuroendokrinen Zellen (für eine Übersicht, s. Seino und Shibasaki, 2005; Stojilkovic et al., 2010). Beispielsweise konnte eine Verstärkung der Sekretion durch die Zunahme der intrazellulären cAMP-Level an insulinsekretierenden pankreatischen Inselzellen (Charles et al., 1973), an melantropen (Sikdar et al., 1998; Sedej et al., 2005) und laktotrophen (Sikdar et al., 1990; Cochilla et al., 2000; Gonzalez-Iglesias et al., 2006; Calejo et al., 2013) Zellen der Hypophyse sowie an Chromaffinzellen (Parramon et al., 1995) und pankreatischen  $\beta$ -Zellen (Renstrom et al., 1997; Kang et al., 2001; Eliasson et al., 2003; Hanna et al., 2009) gezeigt werden. Nur wenige Beobachtungen der Sekretion nach Zunahme der intrazellulären cAMP-Konzentration wurden dabei in Echtzeit durch hochaufgelöste TIRF-Mikroskopie (Interne Totalreflexionsfluoreszenz) gemacht (Cochilla et al., 2000; Hanna et al., 2009). Bezüglich der molekularen Mechanismen, die bei diesen Veränderungen von Bedeutung sind, gibt es jedoch unterschiedliche Ergebnisse. Einige Studien fanden heraus, dass cAMP die Sekretion durch die Erhöhung der Kalziumsensitivität der vesikulären Exozytosemechanismen fördert (Dolensek et al., 2011; Skelin und Rupnik, 2011). Ein direkter Einfluss auf die exozytotische Maschinerie konnte ebenfalls gezeigt werden (Sikdar et al., 1990). Zwei weitere Studien stellten bei Untersuchungen an pankreatischen  $\beta$ -Zellen fest, dass cAMP vollständige Fusionsereignisse verringern und dafür die transiente Fusion verstärken konnte, was nach ihren Vermutungen zu einer geringeren Ausschüttung großer Proteine und einer vermehrten Ausschüttung kleinerer Transmitter führte (MacDonald et al., 2006; Hanna et al., 2009). Allerdings fanden Calejo et al. (2013) an laktotrophen Zellen der Ratte durch Kapazitätsmessungen heraus, dass Fusionsporen durch cAMP stabilisiert und vergrößert werden konnten, wodurch mehr Protein sekretiert wird. Sikdar et al. (1998) zeigten dagegen in melantropen Hypophysenzellen, dass cAMP besonders eine Fusion größerer Vesikel fördert, ohne jedoch die Gesamtfrequenz aller Fusionsereignisse zu verändern. In insulinsekretierenden Zellen wurde zudem festgestellt, dass cAMP

die Menge der sekretionsfähigen Vesikel (RRP, *ready releasable pool*) vergrößert (Hisatomi et al., 1996; Rorsman und Renstrom, 2003). Auch eine Modulation der Sensitivität verschiedener Kationenkanäle, die bei der Sekretion eine Rolle spielen, wurde diskutiert (für eine Übersicht s. Seino und Shibasaki, 2005; Stojilkovic et al., 2010).

Insgesamt lässt sich feststellen, dass cAMP generell fördernd auf die Sekretion aus neuroendokrinen Zellen wirkt, die zugrunde liegenden Mechanismen jedoch vielseitig sind und sich zwischen verschiedenen Zelltypen unterscheiden können.

#### **1.2.2.2. Die Bedeutung cAMP-abhängiger Signalkaskaden während der Sekretion aus verschiedenen Zelltypen**

Bezüglich der cAMP-vermittelten Signalkaskaden, die an diesen Vorgängen beteiligt sind, besteht ebenfalls noch Unklarheit. Obwohl gezeigt werden konnte, dass insbesondere der Signalweg über die Proteinkinase A (PKA) für die Effekte von cAMP auf die Sekretion verantwortlich ist, gibt es auch Mechanismen, die von einer Beeinflussung der PKA ganz oder teilweise unabhängig sind (für eine Übersicht, s. Seino und Shibasaki, 2005). Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass cAMP die Exozytose aus dem RRP PKA-abhängig verstärkte (Renstrom et al., 1997). Neuere Untersuchungen zeigten jedoch auch, dass cAMP über Epac eine PKA-unabhängige Exozytose vermitteln könnte (Ozaki et al., 2000; Kang et al., 2001; Kashima et al., 2001; Fujimoto et al., 2002; Eliasson et al., 2003). Dies wurde beispielsweise an PC12-Zellen untersucht, die Wachstumshormone unter Beteiligung von Epac2 über einen teilweise PKA-unabhängigen Signalweg sekretierten (Ozaki et al., 2000). In pankreatischen  $\beta$ -Zellen reduzierte eine Herunterregulation von Epac2 durch synthetische *antisense*-Oligodeoxynukleotide die Insulinsekretion (Kashima et al., 2001; Eliasson et al., 2003). Ferner fanden Hatakeyama et al. (2007) heraus, dass Epac für die cAMP-regulierte Exozytose synaptischer Vesikel verantwortlich ist, während die PKA nur bei der langsameren Exozytose der LDCVs von Bedeutung ist. Anhand dieser Studien wird deutlich, dass cAMP die Sekretion beeinflussen kann, die genauen Mechanismen und involvierten Signalkaskaden jedoch sehr unterschiedlich sein können, was möglicherweise vom Zell- und Vesikeltyp oder den experimentellen Bedingungen abhängt.

### 1.2.2.3. Der Einfluss von cAMP auf die Sekretion von Neurotransmittern aus Neuronen

Neben diesen vielseitigen Studien an endokrinen Zellen wurden auch einige Untersuchungen zum Einfluss von cAMP auf die Ausschüttung von Neurotransmittern aus synaptischen Vesikeln durchgeführt. So zeigten Versuche mit Invertebraten-Neuronen, dass es bei einer cAMP-vermittelten Neurotransmitterausschüttung zur Öffnung von VGCCs kommt (Brunelli et al., 1976; Castellucci et al., 1980; Kandel und Schwartz, 1982; Klein, 1993) und dass eine tetanische Stimulation die Anzahl der Vesikel im RRP über die Zunahme der cAMP-Konzentration vergrößert (Kuromi und Kidokoro, 2000). Auch hier konnten Mechanismen gefunden werden, die kritisch von einer Aktivierung der PKA abhängen (Yoshihara et al., 2000; Kuromi und Kidokoro, 2003). Des Weiteren zeigten einige Studien, dass die cAMP/PKA-Signalkaskade in Neuronen des Zerebellums und des Hippokampus die Wahrscheinlichkeit einer Exozytose kalziumunabhängig vergrößert (Trudeau et al., 1996; Chen und Regehr, 1997; Chavis et al., 1998) bzw. dass eine cAMP/PKA-Aktivierung während des Kalziumeinstroms in hippocampalen Neuronen die Sekretionswahrscheinlichkeit für einzelne Vesikel erhöht (Trudeau et al., 1996). Interessanterweise zeigten Untersuchung an der Held'schen Calyx<sup>5</sup> jedoch, dass eine durch cAMP verstärkte Sekretion unabhängig von der PKA, jedoch abhängig von Epac ist (Sakaba und Neher, 2001; Fujimoto et al., 2002; Kaneko und Takahashi, 2004).

Insgesamt lässt sich feststellen, dass cAMP einen bedeutenden Einfluss auf die Exozytose besitzt, wobei eine Vielzahl von Untersuchungen an endokrinen Zellen durchgeführt wurden und es an ähnlichen Studien über Neurone mangelt. Zwar konnten einige Studien am Nervensystem von Invertebraten und Nagern eine Bedeutung von cAMP bei der Exozytose synaptischer Vesikel darlegen; Untersuchungen, die sich auf die Auswirkungen von cAMP auf die Sekretion aus neuronalen LDCVs und deren Inhalt konzentrieren, fehlen jedoch gänzlich.

## 1.3. Gemeinsame Wirkmechanismen von cAMP und BDNF

BDNF und cAMP können bei diversen Mechanismen zusammen wirken. Beispielsweise kann cAMP die BDNF-Transkription erhöhen (für eine Übersicht, s. Fukuchi et al., 2005), den Überlebensseffekt verbessern, den BDNF auf retinale Ganglionzellen hat (Meyer-

---

<sup>5</sup>Besonders große Synapse der Säuger, die bei der Verarbeitung von auditorischen Signalen von Bedeutung ist

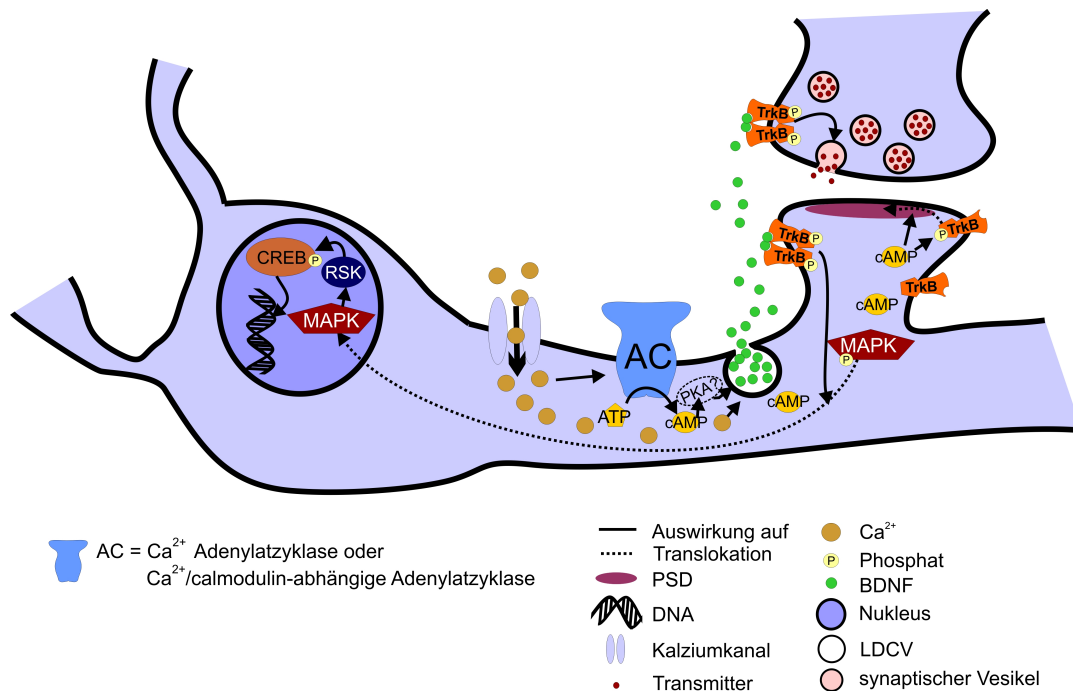
Franke et al., 1995) und ein Modulator für die Entstehung neuer Spines an kultivierten, hippocampalen Neuronen sein (Ji et al., 2005). Außerdem bestimmen intrazelluläre cAMP-Level in den Spinalneuronen von *Xenopus*, ob die Wachstumskegel ihrer Axone in Richtung eines BDNF-Gradienten wachsen oder sich davon entfernen (Song et al., 1997). Umgekehrt führt eine BDNF-Applikation zu einer Zunahme der cAMP-Level in den Synaptosomen von Ratten und in PC12-Zellen (Knipper et al., 1993a,b). In vielen Studien konnte außerdem gezeigt werden, dass sowohl cAMP als auch BDNF an Vorgängen der synaptischen Plastizität beteiligt sind (s. Abschnitt 1.3.1). Allerdings wird BDNF keine direkte Auswirkung auf cAMP bei der Initiation der Transkription von Genen zugeschrieben (Gaiddon et al., 1996; Tartaglia et al., 2001). Stattdessen wird angenommen, dass cAMP eine regulierende Rolle auf BDNF-vermittelte Funktionen besitzt (Boulanger und Poo, 1999; Tartaglia et al., 2001; Ji et al., 2005).

### **1.3.1. Gemeinsame Wirkmechanismen von BDNF und cAMP während synaptischer Plastizitätsprozesse**

Bezüglich der gemeinsamen Wirkmechanismen von BDNF und cAMP während der synaptischen Plastizität gibt es bisher nur sehr wenige Studien. Einige Untersuchungen wurden von Boulanger und Poo (1999) an der neuromuskulären Endplatte von *Xenopus* durchgeführt. Sie fanden heraus, dass der verstärkende Effekt, den BDNF auf die Amplitude und die Frequenz evozierter bzw. spontaner exzitatorische postsynaptische Ströme (EPSCs, *excitatory post-synaptic currents*) hat, durch cAMP potenziert werden kann. Die Blockade der cAMP/PKA-Kaskade verhinderte diesen Effekt. Außerdem hatte eine präsynaptische Depolarisation, die vermutlich den Anstieg der cAMP-Level zur Folge hatte (vgl. Agnihotri et al., 1997; Reddy et al., 1995), den gleichen fördernden Effekt auf die BDNF-Wirkung. Auch diese Veränderung konnte durch eine Blockade der PKA-Aktivität verhindert werden (Boulanger et al., 1999; Boulanger und Poo, 1999). In einer weiteren Studie zur Interaktion von BDNF und cAMP interessierten sich Patterson et al. (2001) besonders für Stimulationsmuster, die sowohl cAMP als auch BDNF für die Entstehung einer LTP benötigten. Sie stellten fest, dass sowohl die Aktivierung der Adenylatzyklase durch Forskolin als auch eine *theta-burst* Stimulation eine LTP auslösen konnten, für die BDNF absolut notwendig war. Diese Stimulationsmuster zur Induktion einer L-LTP führten jeweils zu einer Phosphorylierung des TrkB-Rezeptors und der MAP-Kinase. Sie vermuteten, dass die cAMP-Zunahme eine BDNF-Sekretion zur Folge

hatte, die wiederum zur Phosphorylierung des TrkB-Rezeptors führte und die Translokation der MAP-Kinase verursachte. Dementsprechend fanden Ji et al. (2005) in ihren bereits erwähnten Versuchen zum Einfluss von BDNF und cAMP auf das Wachstum von Spines, dass cAMP die TrkB-Phosphorylierung nicht nur verstärkt, sondern in maturaen Neuronen auch eine Translokation des Rezeptors zur PSD verursachen kann. Eine direkter Nachweis einer cAMP-induzierten Sekretion von BDNF fehlt derzeit jedoch noch.

Anhand dieser Studien lässt sich ein vorläufiges Modell der molekularen Zusammenhänge von BDNF und cAMP bei synaptischen Plastizitätsprozessen erstellen, wie es in Abbildung 1 zu sehen ist. Demnach fördert die Stimulation von neuronalen Zellen und der Einstrom von Kalziumionen die Entstehung von zyklischem AMP durch Kalzium/Calmodulin-abhängige Adenylatzyklen. Über einen noch nicht vollständig entschlüsselten Mechanismus, der beispielsweise über cAMP-abhängige Proteine wie PKA oder Epac gesteuert werden könnte, führt die cAMP-Zunahme auch zu einer Verstärkung der Sekretion von BDNF (vgl. Abschnitt 1.3.2) und zur Translokation einiger TrkB-Rezeptoren zur PSD. BDNF aktiviert die TrkB-Rezeptoren, wodurch die präsynaptische Transmitterausschüttung faszilitiert wird. Postsynaptisch führt der BDNF/TrkB-Signalweg zu einer Translokation der durch cAMP (teilweise bereits) phosphorylierten MAP-Kinase zum Nukleus. Die nachfolgende Signalkaskade führt zur Aktivierung des Proteins CREB (*cAMP Response Element Binding Protein*) und zur Transkription von Genen, die für die Entstehung der L-LTP von Bedeutung sind.



**Abbildung 1 – Schemazeichnung zum möglichen Zusammenwirken von BDNF und cAMP bei der Entstehung synaptischer Plastizität.** Die Depolarisation der Neurone und der Einstrom von Kalziumionen stimuliert die Aktivität der kalziumabhängigen bzw. Kalzium-Calmodulin-abhängigen Adenylatzyklase, die die Umwandlung von ATP zu cAMP katalysiert (Blitzer et al., 1995). Die cAMP-Zunahme und die Stimulation führen zur Sekretion von BDNF, möglicherweise unter Beteiligung der PKA (Patterson et al., 2001; Kolarow et al., 2007). BDNF phosphoryliert die TrkB-Rezeptoren, die zusätzlich durch cAMP moduliert werden können (Ji et al., 2005). In der nachfolgenden Kaskade wird die MAP-Kinase phosphoryliert und unter Einfluss von cAMP in den Nucleus translokalisiert (Patterson et al., 2001), wo sie über ihren Ras/CREB-Signalweg zur Transkription von Genen führt. Zusätzlich können über cAMP TrkB-Rezeptoren zur postsynaptischen Verdichtung translokalisiert werden (Patterson et al., 2001). Präsynaptische Effekte der BDNF-Sekretion und cAMP-Aktivierung führen außerdem zur Zunahme der präsynaptischen Transmittersekretion (Boulanger und Poo, 1999).

### 1.3.2. Modulation der Sekretion von BDNF durch cAMP

Bezüglich des direkten Einflusses von cAMP auf die Sekretion von BDNF gibt es sehr wenige Studien. Zwar konnte in AtT-20 Zellen gezeigt werden, dass cAMP die Sekretion von Neurotrophinen, auch BDNF, auslösen kann (Goodman et al., 1996; Heymach et al., 1996), dies konnte jedoch in hippokampalen Neuronen für BDNF nicht bestätigt werden (Kolarow et al., 2007). Wurde eine BDNF-Sekretion an diesen Neuronen jedoch durch eine Zunahme der extrazellulären Kaliumkonzentration ausgelöst, führte eine Blockade der PKA zu einer verspäteten und weniger effizienten Sekretion von BDNF (Kolarow

et al., 2007). Weitere Studien zur Modulation der Sekretion von BDNF durch cAMP existieren bisher noch nicht.

#### **1.4. Ziel dieser Arbeit**

Das Neurotrophin BDNF ist an einer Vielzahl von Funktionen im zentralen Nervensystem beteiligt. Das Protein unterstützt das Zellwachstum, die Verzweigung und das Wachstum neuronaler Ausläufer und ist an synaptischen Plastizitätsprozessen, wie beispielsweise der morphologischen Veränderung von Synapsen, sowie an der Modifikation der synaptischen Transmission beteiligt. Eine Vielzahl dieser Funktionen werden infolge einer aktivitätsabhängigen Sekretion des Proteins, beispielsweise durch die elektrische Aktivität von Neuronen, initiiert. In der vorliegenden Arbeit sollten daher zunächst verschiedene Stimulationsmuster entwickelt werden, die eine Sekretion von BDNF zur Folge haben. Anschließend sollte untersucht werden, ob der sekundäre Botenstoff cAMP, der bereits in neurosekretorischen Zellen als möglicher Modulator einer Exozytose identifiziert werden konnte, einen Einfluss auf die Sekretion von BDNF aus sekretorischen Granula hat.

## 2. Materialien

### 2.1. Chemikalien

Adenosintriphosphat (Mg-ATP)	Sigma
B27	Tocris Bioscience
Basal medium eagle (BME)	Gibco
Cystein- $\beta$ -D-Arabinofuranosid (AraC)	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Di-Natriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Merck
Dnase I	Roche
D,L-APV	Sigma
DNQX	Tocris Bioscience
Ethanol	Roth
Fötale Kälberserum (FCS)	Gibco
Glukose	Sigma
Glutamax	Invitrogen
Glutamin	Invitrogen
Glyzin	Roth
Guanosintriphosphat (Na-GTP)	Sigma
HEPES	Serva
ImmuMount	Fisher Scientific
Insulin	Sigma
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma
Kaliumglukonat	Sigma



Kalziumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Sigma
Kaliumhydroxid (KOH)	Sigma
LB-Agar	Sigma
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Roth
Mangan(II)-Chlorid (MnCl)	Merck
Minimalmedium (MEM)	Invitrogen
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma
Neurobasalmedium (NB)	Gibco
Penicillin-Streptomycin-Glutamin	Gibco
Pferdeserum (HOS)	Gibco
Phenolrot	Sigma
Phosphat-gepufferte Saline (PBS)	Gibco
Pcirotoxin (PTX)	Sigma
Rinderserumalbumin (BSA)	Serva
Rp-cAMPs	Biolog
Rubidiumchlorid (RbCl)	Sigma
Salzsäure (HCl)	Sigma
SP-8-OH-cAMPs	Biolog
Silberchlorid (AgCl)	Fluka
S.O.C. Medium	Invitrogen
Tetrodotoxin (TTX)	Tocris Bioscience
Trypsin 2,5 %	Gibco
Trypsinlösung (Trypsin Solution 1x)	SAFC

## 2.2. Kits

EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Sylgard® 184 Silicone Elastomer Kit	Dow Corning
Paladur® Kaltpolymerisat	Kulzer

## 2.3. Verbrauchsmaterialien

Borosilikatglaskapillaren (GB150F-8P)	Science Products
---------------------------------------	------------------

Befüllspitzen (Microloader)	Eppendorf
Deckgläser ø 12 mm	Paul Marienfeld GmbH
Einmal-Probenröhrchen	Advanced Instruments, Inc.
Exadrop <sup>®</sup> G (gravity)	Braun
Filterkerze Por. 3	Duran Group
Glasflaschen (Duran <sup>®</sup> 0,1 - 2 L)	Duran Group
Kanüle (Sterican 0,6 mm × 80 mm)	Braun
Kanüle (Sterican 100 0,9 mm × 70 mm)	Braun
Kanüle (BD Spinal Needle 0,5 x 90 mm)	Braun
Membrex 4 CA, 0,2 µm, steril	membraPure
Microfil 28 G, 97 mm	World Precision Instruments, Inc.
Millicell <sup>®</sup> -Kultureinsatz	Merck
Objektträger (Superfrost)	Menzel-Gläser
pH-Elektrode (BlueLine 28 pH)	SI Analytics
3,5 cm Petrischalen	Nunc
6 cm Petrischalen	Nunc
Perfusor <sup>®</sup> -Leitung	Braun
Platindraht 0,5 mm	Neolab
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
Silikonkleber (Silicon Elastomer E43)	Wacker
Skalpell	Feather
25 cm <sup>2</sup> Zellkulturflasche	TPP

#### 2.4. Geräte

AD-DA Wandler (LIH8+8)	HEKA
Analysewaage (BP 211D)	Sartorius
Bandpassfilter (ET470/40x; ET525/50M)	Chroma Technology Corporation

---

Binokular (Stemi 200)	Zeiss
Bunsenbrenner (gasprofi 1 SCS)	WLD-Tec GmbH
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Binder
CO <sub>2</sub> -Inkubator (Heraeus)	Thermo Fisher Scientific
Gewebeschneider	McIlwain
Gefrierschrank (−80 °C)	Panasonic
Inversionsmikroskop (Axiovert 35)	Zeiss
Kamera (Cool Snap ES <sup>2</sup> )	Photometrics
Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 780 am Axio Examiner)	Zeiss
Lichtquelle LQ-HXP R 120	Zeiss
Mikromanipulatoren (LN mini / combi)	Luigs & Neumann
Mikromanipulatorkontrollbox (SM-5)	Luigs & Neumann
10x Objektiv (W Plan-APOCHROMAT)	Zeiss
63x Objektiv (W Plan-APOCHROMAT)	Zeiss
Osmometer (Fiske <sup>®</sup> 210 Micro)	Advanced Instruments, Inc.
pH-Meter	Schott AG
Pipetten (Transferpette <sup>®</sup> S)	Brandt GmbH & Co. KG
Pipettenziehgerät (PIP 5)	HEKA
Pipettenziehgerät (PIP 6)	HEKA
Schüttelinkubator (Orbital Incubator S150)	Stuart
Sterilbank (B10 130 <i>Silver</i> )	Biowizard
Sterilbank (KH-135 SC)	Biowizard
Systemmikroskop (Axio Examiner A.1)	Zeiss
Thermomixer comfort	Eppendorf
Trockenschrank (Heraeus)	Thermo Fisher Scientific
Ultraschallbad (Sonorex Super RK 100SH)	Bandelin electronic GmbH & Co. KG
UV-Spektrometer (SmartSpec <sup>TM</sup> Plus)	Bio-Rad Laboratories
Vakuumpumpe (AZ 02)	Roth
Verstärker (EPC8)	HEKA
Verstärker (ELC-03XS)	npi
Vortexer (Whirlmix)	Cenco
Wasseraufreinigungsanlage (Milli-Q)	Merck
Wasserbad (TW 8)	JULABO GmbH

Zentrifuge (Mikro 200R)  
Zentrifuge (Rotina 420R)

Hettich  
Hettich

## 2.5. DNA-Plasmide

### pBDNF(M1A)EGFP-N1 (s. Abbildung 2)

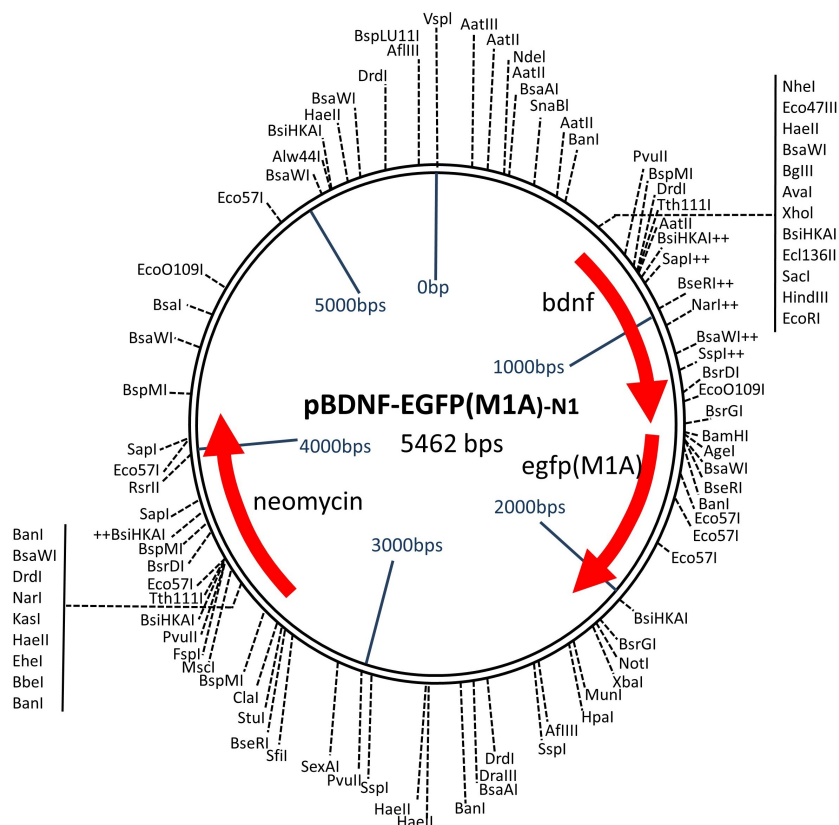
basierend auf pEGFP-N1 von Clontech Laboratories Inc.

### pNT3(M1A)EGFP-N1

basierend auf pEGFP-N1 von Clontech Laboratories Inc.

### pEGFP-N1

Clontech Laboratories Inc.



**Abbildung 2 – pBDNF(M1A)EGFP-N1 Plasmid mit Restriktionsschnittstellen** Darstellung durch die Programme Clone Manager und Powerpoint. Die EGFP-Sequenz ist im Bereich des späteren C-Terminales Endes des Proteins angehängt. Die Startkodierung der EGFP-Sequenz wurde gegen eine Kodierung für Arginin ausgetauscht, um die Entstehung reiner EGFP-Proteine zu unterbinden.

Basenpaare 631 bis 1370 des Plasmids pBDNF(M1A)EGFP-N1 mit dazugehöriger Proteinsequenz:

```

attcgagtguatgaccatccttttccttactatggttatttcatacttcggttgcataag
  I R V M T I L F L T M V I S Y F G C M K
gctgcgcccatgaaagaagcaaacgtccacggacaaggcaacttggcctaccagctgtg
  A A P M K E A N V H G Q G N L A Y P A V
cggacccatgggactctggagagcgtgaatgggccaggcaggttcgagaggtctgacg
  R T H G T L E S V N G P R A G S R G L T
acgacgtccctggctgacacttttgagcagctgatcgaagagctgctggatgaggaccag
  T T S L A D T F E H V I E E L L D E D Q
aaggttcggcccaacgaagaaaaccataaggacgcggacttgtacacttcccggtgatg
  K V R P N E E N H K D A D L Y T S R V M
ctcagcagtcgaatgcctttggagcctcctctgctctttctgctggaggaatacaaaaat
  L S S Q V P L E P P L L F L L E E Y K N
tacctggatgcccgaacatgtctatgagggttcggcgccactccgaccccgccgacct
  Y L D A A N M S M R V R R H S D P A R R
ggggagctgagcgtgtgtgacagtattagcagtggttcacagcggcagataaaaagact
  G E L S V C D S I S E W V T A A D K K T
gcagtggacatgtccggtgggacggtcacagtcctggagaaagtcccgggtatcaaaaggc
  A V D M S G G T V T V L E K V P V S K G
caactgaagcaatatttctacgagaccaagtgaatcccatgggttacacgaaggaaggc
  Q L K Q Y F Y E T K C N P M G Y T K E G
tgcaggggcatagacaaaaggcactggaactcgcaatgccgaactaccaatcgtatggt
  C R G I D K R H W N S Q C R T T Q S Y V
cgggcccttactatggatagcaaaaagagaattggctggcgggttcataaggatagacact
  R A L T M D S K K R I G W R F I R I D T
tcctgtgtatgtacactgac
  S C V C T L

```

A= Alanin; C= Cystein; D= Asparaginsäure; E= Glutaminsäure; F= Phenylalanin; G= Glyzin;  
H= Histidin; I= Isoleucin; K= Lysin; L= Leucin; M= Methionin; N= Asparagin; P= Prolin; Q= Glu-  
tamin; R= Arginin; S= Serin; T= Threonin; V= Valin; W= Tryptophan; Y= Tyrosin

## 2.6. Versuchstiere

C57BL/6 Mäuse

Sprague Dawley Ratten

Charles River

Charles River

## 2.7. Software

Clone Manager	Sci-Ed Software
CorelDraw X3	Corel Corporation
Excel 2010	Microsoft Corporation
IMARIS	Bitplane Scientific Software
L <sup>A</sup> T <sub>E</sub> X	LaTeX Project ( <i>Public License</i> )
Meta Imaging Series 7.5.0	Molecular Devices
Origin 8	OriginLab Corporation
pClamp 8	Axon Instruments
PatchMaster 8	HEKA
SPSS 21	IBM Corp.
VisiView	VisitronSystems
Zen 2010	Zeiss

## 2.8. Medien und Puffer

<i>aCSF</i> ( <i>artifizielle Spinalflüssigkeit</i> )	s. Abschnitt 3.4.1.2		
<i>aCSF</i>	<i>aCSFK</i>		
85	80	mM	NaCl
15	15	mM	NaHCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
1,25	1,25	mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
2,5	7,5	mM	KCl
4	4	mM	MgCl <sub>2</sub>
4	4	mM	CaCl <sub>2</sub>
10	10	mM	Glukose
			244 - 256 mOsmol
<i>2x BBS</i>			s. Abschnitt 3.1.1
50		mM	BES
			(N,N-Bis-(2-Hydroxyethyl)-2
			Aminoethansulfonsäure; pH 7,06)
1,5		mM	Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
260		mM	NaCl
			in Millipore-Wasser
			pH 7,06 (NaOH)
<i>BME/10% FCS</i>			s. Abschnitt 3.1.1
10		mM	HEPES
5		mM	Glukose
1		mM	Glutamax
10		%	FCS
36		mg L <sup>-1</sup>	Insulin
			in BME

<i>D,L-APV-Stocklösung</i>				s. Abschnitt 3.2.1
200			mM	D,L-APV in 0,1 M NaOH
<i>DNQX-Stocklösung</i>				s. Abschnitt 3.2.1
50			mM	DNQX in DMSO
<i>Elektroporationspuffer (EPO-Puffer)</i>				s. Abschnitt 3.2.2
137			mM	NaCl
15			mM	HEPES
5			mM	KCl
0,7			mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
frisch hinzufügen:				
6			mM	Glukose
1,8			mM	CaCl <sub>2</sub>
1			mM	MgCl <sub>2</sub>
0,01			mM	Glyzin in H <sub>2</sub> O pH 7,05 293 mOsmol L <sup>-1</sup>
<i>HEPES gepufferte Saline (HBS)</i>				s. Abschnitt 3.4 und 3.2.2
<i>2/1</i>	<i>K 2/1</i>	<i>0/3</i>		
100	54	100	mM	NaCl
20	20	20	mM	HEPES
4	50	4	mM	KCl
1	1	1	mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
frisch hinzufügen:				
1	1	3	mM	MgCl <sub>2</sub>
2	2	0	mM	CaCl <sub>2</sub>
10	10	10	mM	Glukose
0,01	0,01	0,01	mM	Glyzin pH 7,38 240 mOsmol L <sup>-1</sup>

<i>MPBS</i>			s. Abschnitt 3.1.1
- / -	+ / +		
10	10	mM	HEPES
10	10	mM	Glukose
1	1	mM	Glutamax
1	1	mM	Pyruvat
1	1	mM	Phenolrot
2,5	2,5	mL L <sup>-1</sup>	Penicillin-Streptomycin-Glutamin
6	6	µg mL <sup>-1</sup>	DNase
1	1	mg mL <sup>-1</sup>	BSA
	4	mM	CaCl <sub>2</sub>
	5,8	mM	MgCl <sub>2</sub>
			in PBS
			pH 7,4
<i>NB/B27</i>			s. Abschnitt 3.1.2
20		mL L <sup>-1</sup>	B27
2,5		mL L <sup>-1</sup>	Penicillin-Streptomycin-Glutamin
2		mM	Glutamax
			in NB
<i>NB/B27 Stoppini (Kulturmedium)</i>			s. Abschnitt 3.1.2
1		%	Pferdeserum
3,5		mM	MgCl <sub>2</sub>
			in NB/B27
<i>TFB I</i>			s. Abschnitt 3.3.1
30		mM	CH <sub>3</sub> COOK
10		mM	CaCl <sub>2</sub>
50		mM	MnCl <sub>2</sub>
100		mM	RbCl
15		%	Glycerol
			pH 5,8 mit CH <sub>3</sub> COOH
			steril filtriert
<i>TFB II</i>			s. Abschnitt 3.3.1
10		mM	MOPS
75		mM	CaCl <sub>2</sub>
10		mM	RbCl
15		%	Glycerol
			pH 6,5 mit KOH
			steril filtriert



---

0,2 M <i>PB</i>		s. Abschnitt 3.4.2
38	mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
161,9	mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
		pH 7,2 - 7,4
<i>Pipettenlösung</i>		s. Abschnitt 3.5
17,5	mM	KCl
10	mM	HEPES
90	mM	K-Glukonat
9	mM	NaCl
0,2	mM	EGTA
frisch hinzufügen:		
2	mM	Mg-ATP
0,2	mM	Na <sub>3</sub> -GTP
		pH 7,2 (KOH)
		220 - 230 mOsmol L <sup>-1</sup>

## 3. Methoden

### 3.1. Primäre Zellkultur

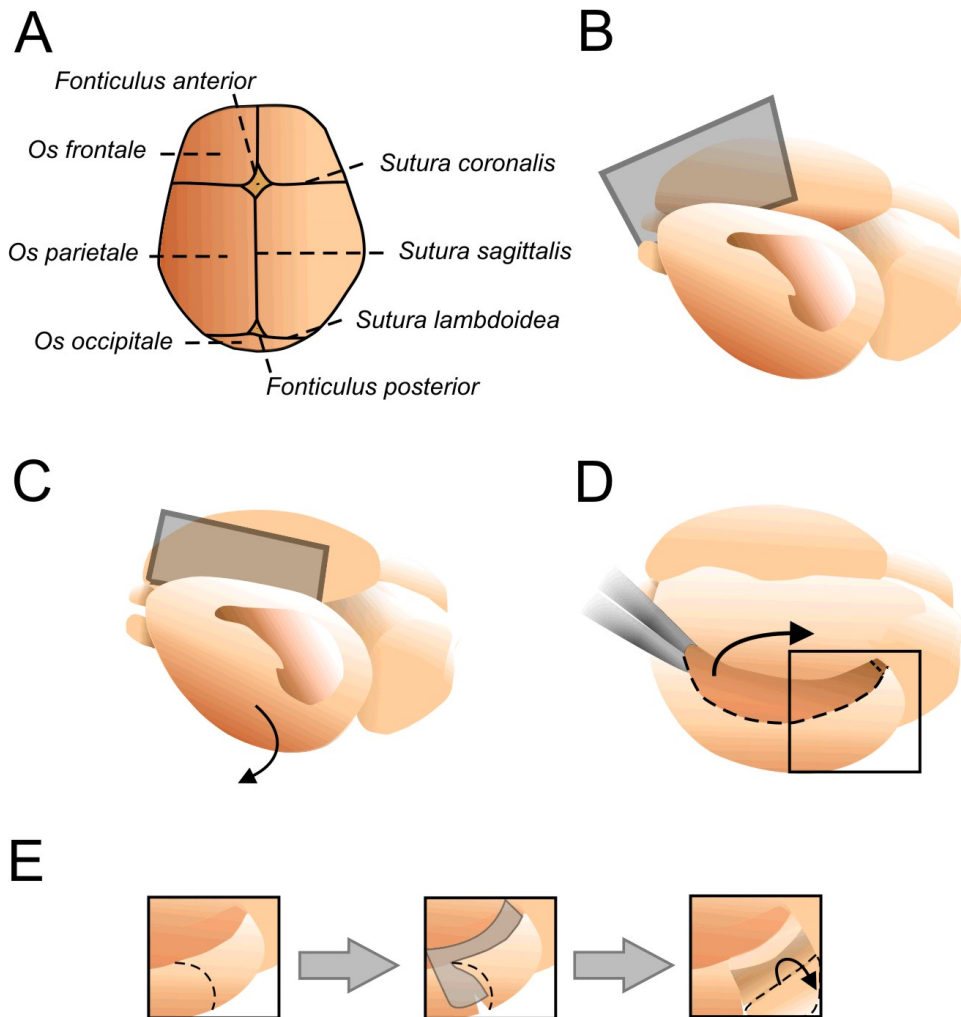
#### 3.1.1. Hippokampale Mikrokulturen

##### 3.1.1.1. Reinigung von Deckgläsern

Für die Herstellung von Astrozytenkulturen wurden 12 mm Deckgläser vorbereitet. Um Schmutzpartikel zu lösen, wurden die Deckgläser zunächst bei 80 °C für 15 min im Ultraschallbad gereinigt. Anschließend wurden sie für mehrere Stunden in 100 % Ethanol inkubiert und in steriler Umgebung getrocknet. Zum Abschluss wurden die Deckgläser über dem Bunsenbrenner kurzzeitig erhitzt und in sterilen 3,5 cm Kulturschalen gelagert.

##### 3.1.1.2. Präparation dissoziierter hippokampaler Neurone

Dissoziierte hippokampale Neurone wurden auf Astrozyteninseln (s. Abschnitt 3.1.1.3) kultiviert. Für diese sogenannten Mikrokulturen wurden Neurone aus dem Hippokampus und dem Kortex postnataler Ratten gewonnen (vgl. Lessmann und Heumann, 1997). Sprague Dawley Ratten wurden postnatal (P<sub>0</sub>-P<sub>3</sub>) dekapitiert. Der Kopf wurde für die weitere Präparation unter sterilen Bedingungen in eine gekühlte Schale überführt. Kopfhaut und Schädeldecke wurden mit Hilfe eines Skalpell entlang der *Sutura sagittalis* und der *Sutura coronalis* geöffnet, sodass die Schädeldecke mit einer Pinzette zu beiden Seiten hin aufgeklappt werden konnte. Das Gehirn wurde mit einem Spatel entnommen und in einen gekühlten Tropfen MPBS+/+ in eine Präparationsschale überführt. Die Hippokampi und Kortices wurden isoliert und von Blutgefäßen gereinigt (Details s. Abbildung 3). Anschließend wurden die Gewebestücke mehrfach eingeschnitten, um eine effektive Trypsinierung zu gewährleisten. Die isolierten, eingeschnittenen Hippokampi und Kortices wurden nach Gewebeart getrennt in gekühltem MPBS+/+ aufgefangen. Das Medium wurde abgezogen und durch eine 0,25 %ige Trypsinlösung in MPBS-/-



**Abbildung 3 – Schemazeichnung zur Präparation des Hippokampus und Teilen des Kortex aus dem Gehirn postnataler Ratten.** **A** Dorsale Ansicht der Schädeldecke einer neugeborenen Sprague Dawley Ratte. Kopfhaut und Schädel wurden entlang der *Sutura coronalis* und der *Sutura sagittalis* geöffnet. **B** und **C** Rattengehirn nach der Entnahme. Die Position des Hippokampus ist eingezeichnet. Das Gehirn wurde wie in den Schemazeichnungen dargestellt eingeschnitten. Die Gehirnhälften wurden auseinander geklappt. **D** Der freigelegte Hippokampus wurde entlang der gestrichelten Linien ausgeschnitten und mit einer Pinzette aus der Gehirnhälfte entnommen. **E** Vergrößerter Ausschnitt aus **D** während der Präparation des Kortex. Der Kortex wurde entlang der gestrichelten Linien eingeschnitten und aufgeklappt. Ein Teil des Kortexgewebes (gestrichelte Linie) wurde von der Hirnhaut entfernt und zur weiteren Verwendung in Präparationslösung gesammelt (s. Text).

ersetzt. Das Gewebe wurde anschließend im Thermoschüttler bei 800 rpm und 37 °C gemäß Tabelle 1 inkubiert.

**Tabelle 1** – Inkubationszeiten im Thermoschüttler während der Trypsinierung

Alter	Hippokampus	Kortex
P <sub>0</sub> -P <sub>1</sub>	8 min	15 min
P <sub>2</sub>	10 min	16 min
P <sub>3</sub>	12 min	18 min

Nach der Trypsinierung wurde der Überstand in gekühltes BME/10% FCS überführt. Das verbleibende hippokampale und kortikale Gewebe wurde mit eisgekühltem MPBS-/- durch auf- und abpipettieren mehrfach luftblasenfrei trituiert und mit der zuvor gewonnenen Zellsuspension des jeweiligen Gewebes vereinigt. Die Trituierung wurde wiederholt, die Suspensionen bei 4 °C und 1300 rpm zentrifugiert und das entstandene Pellet in je 6 mL BME/10% FCS resuspendiert. Unter Verwendung einer Neubauer Zählkammer wurde die Konzentration der Zellen bestimmt, sodass anschließend je 2-3 Millionen Zellen in 3 mL BME/10% FCS in Kulturschalen (ø 6 cm) überführt und im Brutschrank (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) gemäß Tabelle 2 inkubiert werden konnten. Die unterschiedlichen Adhäsionseigenschaften von Neuronen und Gliazellen erlauben die Isolierung beider Zelltypen voneinander.

**Tabelle 2** – Inkubationszeiten im Brutschrank für die Zelladhäsion

Alter	Hippokampus	Kortex
P <sub>0</sub> -P <sub>1</sub>	65 min	60 min
P <sub>2</sub> -P <sub>3</sub>	55 min	50 min

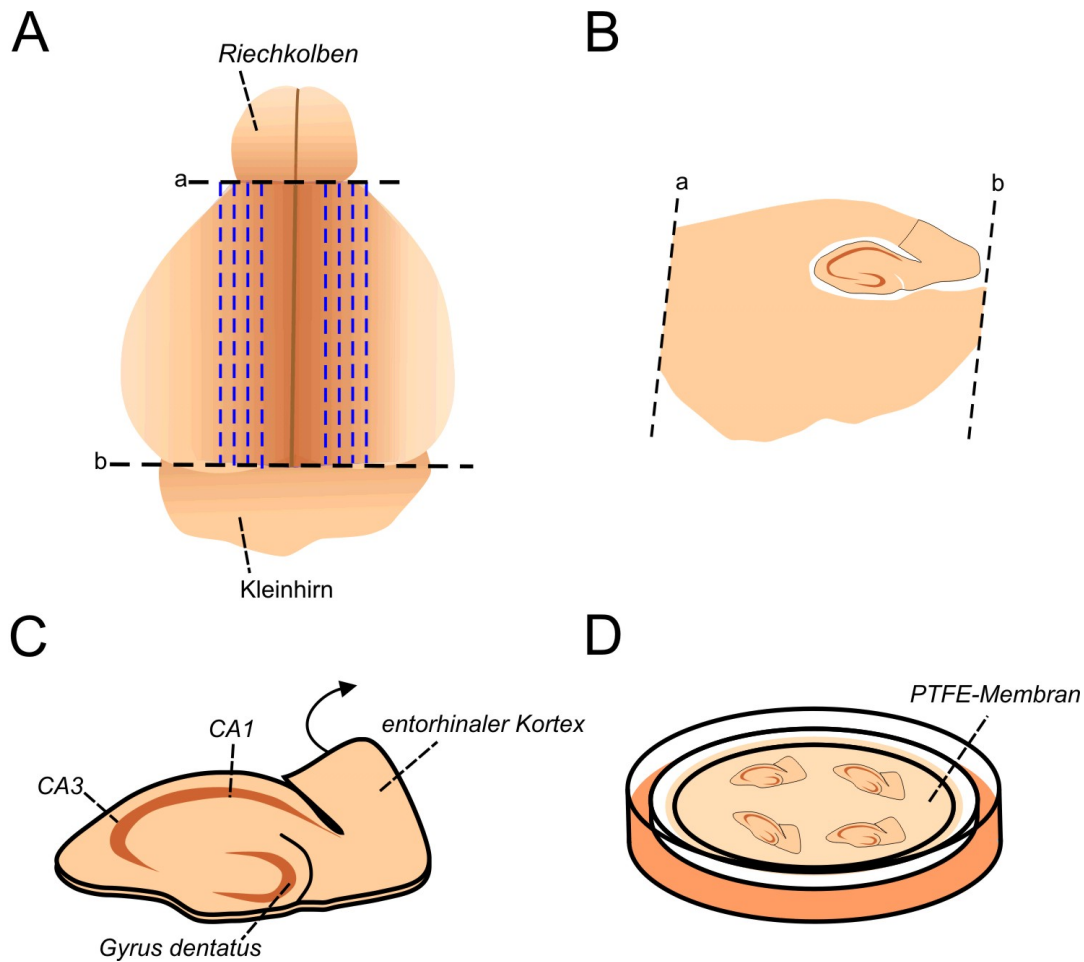
Nach der Inkubation wurde das Medium der kortikalen Kulturen durch frisches BME/10% FCS (37 °C) ersetzt und bis zur Astrozytenpassage (s. Abschnitt 3.1.1.3) im Brutschrank kultiviert. Im wöchentlichen Abstand wurde das Medium erneuert. Der Überstand der hippokampalen Kulturen wurde gesammelt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur und 1300 rpm zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 3 mL BME/10% FCS resuspendiert. Je 120 000 bis 150 000 Neurone wurden auf Astrozyteninseln (s. Abschnitt 3.1.1.3) ausplattiert. Nach 4 bis 24 Stunden wurde das Medium durch 2 mL NB/B27 ersetzt.

### 3.1.1.3. Astrozytenpassage

Die in Abschnitt 3.1.1.2 hergestellten Neurone wurden auf Mikroinseln kultiviert. Zur Herstellung dieser Inseln wurden konfluente Astrozytenkulturen verwendet, wie sie nach zwei- bis vierwöchiger Inkubation aus der Präparation der Kortices neugeborener Sprague Dawley Ratten gewonnen werden konnten (s. Abschnitt 3.1.1). Der Überstand der Kulturen wurde verworfen und die Astrozyten zweimalig mit PBS (37 °C) unter mehrfachem Abspritzen des Schalenbodens gewaschen. Anschließend wurden die Kulturen für 10 Minuten im Inkubator (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) in einer Trypsinlösung inkubiert, bis sich die Astrozyten vom Schalenboden gelöst hatten. Die gelösten Zellen wurden mit dem trypsinhaltigen Überstand in 3 mL BME/10% FCS überführt und der Schalenboden mit 1 mL BME/10% FCS gewaschen. Die Waschsuspension wurde gemeinsam mit dem trypsinhaltigen Überstand bei Raumtemperatur und 1300 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde die Zellkonzentration bestimmt und etwa 50 000 Zellen auf gereinigte, 12 mm starke Deckgläser (s. Abschnitt 3.1.1.1) ausgesät. Nach zwei bis drei Tagen wurde die Teilung der Astrozyten durch die Zugabe von 3 - 4 µM AraC (Cystein-β-D-Arabinofuranosid) inhibiert. Die Kulturen konnten nach zwei- bis vierwöchiger Inkubationszeit im Brutschrank für das Ausplattieren von Neuronen (s. Abschnitt 3.1.1) verwendet werden.

### 3.1.2. Organotypische hippocampale Schnittkulturen

Organotypische hippocampale Schnittkulturen wurden nach Stoppini et al. (1991) hergestellt. Postnatale C57BL/6 Mäuse wurden im Alter von P<sub>4</sub>-P<sub>5</sub> dekapitiert. Der Kopf wurde für 30 s in steriles PBS (4 °C) überführt und die Schädeldecke anschließend mit Hilfe eines Skalpellens entlang der *Sutture sagittalis* und der *Sutura coronalis* geöffnet. Das Gehirn wurde unter Verwendung eines Spatels entnommen und in das Präparationsmedium (MEM; 2 mM Glutamin) einer gekühlten (4 °C auf Eis), sterilen Präparationsschale überführt. Riechkolben und Kleinhirn wurden entfernt und das Gehirn auf der Arbeitsplatte eines Gewebeschnidders (McIlwain) so ausgerichtet, dass Sagittalschnitte hergestellt werden konnten (375 µm). Die entstandenen Schnitte wurden in der Präparationsschale voneinander getrennt und begutachtet. Hippokampus, Subiculum und entorhinaler Kortex wurden gemeinsam aus unversehrten Schnitten isoliert. Vier bis fünf Schnitte wurden auf eine in 1 mL Kulturmedium (NB/B27, versetzt mit 10% Pferdeserum und 5 mM Mg<sup>2+</sup>) equilibrierte PTFE-Membran (Millicell® Kultureinsatz) überführt. Überschüssiges Medium wurde von der Oberseite der Membran entfernt. Anschließend wurde der entorhinale Kortex leicht vom Hippokampus abgespreizt, um einem Überwachsen des Hippokampus mit entorhinalen Kortexzellen während der Inkubation entgegenzuwirken. Die Schnitte wurden bis zur Elektroporation (s. Abschnitt 3.2.2) bei 37 °C und 5,0% CO<sub>2</sub> inkubiert. Das Kulturmedium wurde dreimal wöchentlich ausgetauscht, wobei beim ersten, dritten



**Abbildung 4 – Schemazeichnung zur Präparation organotypischer hippocampaler Schnittkulturen aus den Gehirnen postnataler C57BL/6 Mäuse.** **A** Dorsalansicht des entnommenen Mäusegehirns. Zunächst wurden Schnitte a und b gesetzt. Danach wurde das Gehirn auf einem Gewebeschnaider positioniert, um Sagittalschnitte (blaue Linien) von 375  $\mu\text{m}$  Breite anzufertigen. **B** Lateralansicht eines Sagittalschnitts mit eingezeichnetem Hippokampus. **C** Der Hippokampus wurde aus dem Sagittalschnitt herauspräpariert und wie in **D** dargestellt auf einer in PTFE-Membran, die auf Kulturmedium inkubiert wurde, angeordnet. Der entorhinale Kortex wurde dabei vorsichtig vom hippocampalen Gewebe abgespreizt.

und fünften Mediumwechsel jeweils 10  $\mu\text{M}$  AraC hinzugegeben wurde, um das Zellwachstum zu kontrollieren.

### 3.2. Transfektion

Large Dense Core Vesicles (LDCVs) oder sekretorische Granula können durch fluoreszenzmarkierte Proteine, wie dem grünfluoreszierenden Protein (GFP, *Green Fluorescent Protein*) der Qualle *Aequoria victoria*, selektiv markiert werden. Dazu wird GFP-DNA an die DNA eines

vesikelspezifischen Proteins gekoppelt und in Zellen oder Organismen eingebracht, damit diese exprimiert werden können (Nonet, 1999; Prasher et al., 1992). In der vorliegenden Arbeit wurde ein Vektorkonstrukt aus dem Neurotrophin BDNF und aus EGFP (*enhanced Green Fluorescent Protein*) verwendet und entweder durch eine Kalzium-Phosphat-Präzipitation in hippocampale Neurone eingebracht oder durch juxtazelluläre Transfektion in einzelne CA1 Pyramidenzellen organotypischer Hippokampusschnitte elektroporiert (vgl. Daniel et al., 2013). Nach Haubensak et al. (1998) und Brigadski et al. (2005) behalten Fusionsproteine aus BDNF und GFP, auf deren Plasmidvektor das hier verwendete Konstrukt pBDNF-EGFP(M1A)-N1 basiert, die biologische Aktivität des BDNF.

### 3.2.1. Kalzium-Phosphat-Präzipitation

Für die Transfektion wurden dissoziierte hippocampale Neurone acht bis neun Tage nach der Präparation verwendet (8 - 9 DIV; s. Abschnitt 3.1.1). Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Zunächst wurden 3 µg Plasmid-DNA (ca. 1 µg mL<sup>-1</sup> in Millipore Wasser) auf 32,1 µL verdünnt. Unter Vortexen wurden nacheinander tropfenweise 4,9 µL einer 2 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung und 37 µL 2x BBS zur DNA gegeben (Transfektionsmix). Zusätzlich wurden pro Schale 800 µL des präinkubierten Mediums (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) mit 1 µL einer 1 M NaOH fünf Minuten bei RT inkubiert. Unter Vortexen wurde der Transfektionsmix (74 µL) tropfenweise zum entnommenen Medium gegeben und anschließend mit 5 µM DNQX (AMPA/Kainat-Rezeptor-Antagonist) und 200 µM D,L-APV (NMDA-Rezeptor-Antagonist (N-Methyl-D-Aspartat)) versetzt. Das restliche Medium wurde entnommen und durch das Transfektionsmix-enthaltende Medium ersetzt. Die Neurone sowie das entnommene Medium wurden anschließend im Brutschrank (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) inkubiert. Nach einer Stunde wurde das Präzipitat unter dem Inversionsmikroskop hinsichtlich einer optimalen Größe (1 - 3 µm) begutachtet. Die Zellen wurden je nach Größe des Präzipitats für zweieinhalb bis drei Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Transfektionsmix-enthaltende Medium entfernt, die Neuronenkulturen zweimal mit je 1 mL HBS 0/3 (37 °C) gewaschen und das zuvor entnommene Medium zurück auf die Neurone gegeben. Die nun transfizierten Zellen wurden bei 30 °C und 5% CO<sub>2</sub> bis zur Versuchsdurchführung kultiviert.

### 3.2.2. Einzelzellektroporation

Um ein Plasmidkonstrukt selektiv in einzelne CA1 Pyramidenzellen eines Gehirnschnitts einzubringen, wurden Neurone gezielt mittels juxtazellulärer Transfektion elektroporiert (vgl. Daniel et al., 2013). Für diese Transfektion wurde ein organotypischer hippocampaler Schnitt im Alter von 8 - 9 DIV auf einem Ausschnitt PTFE-Membran (s. Abschnitt 3.1.2) in eine sterile Bad-

kammer mit HBS 2/1 überführt und mit einem Platindraht am Kammerboden fixiert. Die zu transfizierende Plasmid-DNA wurde in geringer Konzentration ( $0,08 \mu\text{g} \mu\text{L}^{-1}$ ) in Elektroporationspuffer gelöst und auf Eis gelagert. Diese DNA-Lösung wurde in eine konische Elektroporationspipette gefüllt ( $\varnothing$  ca.  $1,4 - 2 \mu\text{m}$ ; PIP5 Pippettenziehgerät). Die Pipette wurde über Mikromanipulatoren und unter visueller Kontrolle an das zu transfizierende CA1 Neuron herangeführt. Durch einen geringen Überdruck beim Annähern an die Zelle wurde verhindert, dass die Pipette beim Eindringen in das Gewebe verstopfte, ohne dass die im Puffer enthaltene DNA durch Scherkräfte an der Pipettenwand ausfiel. Durch Ablassen des Überdrucks wurde die *Loose-Seal*-Konfiguration erreicht. Über den Verstärker ELC-03XS wurden 150 Spannungspulse (600 ms, 250 Hz,  $-1,4 \text{ V}$ ) appliziert. Der Vorgang wurde an fünf bis zehn Zellen im gleichen organotypischen Hippokampusschnitt wiederholt. Das Gewebe wurde anschließend auf einer vorinkubierten PTFE-Membran auf frischem Medium für weitere zwei bis drei Tage bis zur Verwendung im Brutschrank ( $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{ CO}_2$ ) inkubiert.

### 3.3. Molekularbiologie

#### 3.3.1. Herstellung kompetenter Zellen

Um kompetente Zellen für die Aufnahme und Expression von Plasmiden herzustellen, wurden *Escherichia coli* Bakterien (*E. coli* C600) angezüchtet und aliquotiert (Hanahan, 1983). Hierzu wurden 4 mL LB-Medium mit *E. coli* C600 beimpft und über Nacht (ÜN) auf dem Schüttler inkubiert ( $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 250 rpm). Am nachfolgenden Tag wurden die angezüchteten Zellen in 100 mL LB-Medium aufgenommen und im Brutschrank kultiviert ( $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Sobald die Kultur einen  $\text{OD}_{600}$ -Wert von 0,4 bis 0,6 erreicht hatte, wurde die Zellsuspension 5 min bei  $4500 \times g$  und einer Temperatur von  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 40 mL kaltem TFB I Puffer resuspendiert und 5 min bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  im Kühlschrank gelagert. Nach erneuter Zentrifugation (5 min,  $4500 \times g$ ,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ) wurde das Pellet in 4 mL TFB II Puffer aufgenommen, resuspendiert und für 15 - 60 min bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  bis zur Aliquotierung inkubiert. Die kompetenten Zellen wurden bis zu ihrer Verwendung bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

#### 3.3.2. Transformation kompetenter Zellen

Um große Mengen gereinigter Plasmid-DNA herstellen zu können (s. Abschnitt 3.3.4), wurden *E. coli* C600 mit den entsprechenden Plasmiden transformiert und vermehrt. Dazu wurden die aus 3.3.1 gewonnenen Bakterien für 10 min auf Eis aufgetaut und mit  $2,5 \mu\text{L}$  DNA-Lösung versetzt (insgesamt  $52,5 \mu\text{L}$ ). Nach weiteren 10 min wurden das gekühlte Gemisch aus Bakterien und Plasmid-DNA für 45 s auf  $42 \text{ }^\circ\text{C}$  erhitzt, um die Aufnahme der Plasmid-DNA zu indu-



zieren (Hitzeschock) und anschließend für 2 min auf Eis gekühlt. Die Bakterienlösung wurde mit 900  $\mu\text{L}$  S.O.C. Medium (4 °C) versetzt und für 60 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten ausgestrichen. Um ein selektives Wachstum zu ermöglichen, waren die Platten mit einem Antibiotikum versetzt, dessen Resistenz durch das transformierte Plasmid codiert wurde.

### 3.3.3. Herstellung von Glyceroldauerkulturen

Einzelne Kolonien der aus 3.3.2 gewonnenen Bakterienkulturen wurden für die spätere Verwendung zur Plasmidaufreinigung (s. Abschnitt 3.3.4) langfristig in Glycerol gelagert. Hierzu wurde eine Kolonie einer bereits transformierten Bakterienkultur nach 3.3.1 angezüchtet. Anschließend wurden 200  $\mu\text{L}$  der Bakterienkultur mit 800  $\mu\text{L}$  Glycerol versetzt, in flüssigem Stickstoffschockgefroren und bei  $-80$  °C gelagert.

### 3.3.4. Plasmidaufreinigung

Die in 3.2 verwendeten Plasmide wurden aus Bakterien gewonnen, unter Verwendung des EndoFree<sup>®</sup> Plasmid-Kits nach Herstelleranweisung endotoxinfrei aufgereinigt und zu 0,8 - 1  $\mu\text{g}$  in Wasser gelöst. Die Extinktion der aufgereinigten DNA wurde UV-spektroskopisch bei 260 nm und 280 nm gemessen, um Rückschlüsse auf die Plasmidmenge bzw. auf Proteinverunreinigungen ziehen zu können. Dabei wurde die Konzentration der doppelsträngigen Plasmid-DNA nach folgender Formel ermittelt:

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

Die Reinheit der DNA wurde nach folgender Formel ermittelt:

$$\text{Reinheitsgrad} = \frac{E_{260}}{E_{280}}$$

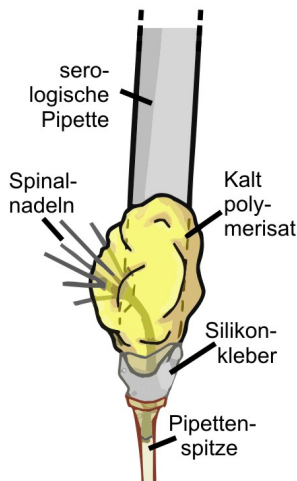
Dabei entspricht ein Wert von ca. 1,8 einer reinen DNA-Isolierung, während niedrigere Werte eine Proteinverunreinigung anzeigen. Werte über 2,0 weisen auf eine erhöhte RNA-Konzentration hin.

## 3.4. Mikroskopie

### 3.4.1. Epifluoreszenzmikroskopie

#### 3.4.1.1. Herstellung eines Perfusionssystems für dissoziierte hippocampale Neurone

Um Neurone während der Lebendzellmessungen gezielt und zügig mit verschiedenen Lösungen umspülen zu können, wurde ein lokales Perfusionssystem um die zu untersuchende Zelle positioniert. Zur Herstellung des Perfusionenzulaufs wurden 4 - 6 Spinalnadeln zu 4 - 5 cm langen Kanülen geschnitten und mit grobem und feinem Schmirgelpapier beidseitig glatt geschliffen. Die gereinigten Kanülen (Spülung mit Millipore-Wasser, 70% und 100% Ethanol) wurden durch ein zuvor hergestelltes Zugangsloch in eine serologische Plastikpipette (10 mL) eingeführt und durch Paladur Kaltpolymerisat (2,5 g Pulver, 1,5 mL Flüssigkeit) fixiert.



**Abbildung 5 – Zulauf der Einzelzellperfusion**

Als Zulauf (s. Abbildung 5) wurde eine 10  $\mu$ L Pipettenspitze unter Hitzeeinwirkung ausgezogen und mit einem Skalpell auf etwa eine Länge von einem cm verkürzt. Die Spitze wurde mit Silikonkleber über den Kanülen befestigt und ÜN zum Trocknen aufgestellt. Bei der Herstellung einer Ablaufpipette wurde statt mehrerer kleiner Kanülen nur eine größere Kanüle (Sterican 100) verwendet, deren Länge auf 4 - 5 cm verkürzt wurde. Die Kanülenöffnung wurde mit grobem und feinem Schmirgelpapier geglättet. Die Halterung des Ablaufs wurde gleich dem Zulauf aus einer serologischen Pipette hergestellt (s.o.). Für die Messungen wurde das Perfusionssystem über die Kanülen mit Schläuchen verbunden, die über eine manuelle Ventilregelung die Messlösung in das System bzw. aus dem System herausleiten konnten. Die Gleichmäßigkeit des Flüssigkeitsstroms über die zu messende Zelle wurde über den hydrostatischen Druck kontrolliert.

#### 3.4.1.2. Videomikroskopie

In der vorliegenden Arbeit wurde die Sekretion von fluoreszenzmarkiertem BDNF aus transfizierten, dissoziierten Neurone oder organotypischen, hippocampalen Schnittkulturen durch *Time Lapse* Videomikroskopie in Echtzeit aufgenommen (Aufnahmeintervall: 10 s) und anschließend analysiert. Während der Aufnahmen wurde das Gewebe konstant mit Flüssigkeit überspült, wobei entweder eine lokale Perfusion (HBS; dissoziierte, hippocampale Neurone, s. Abschnitt 3.4.1.1) oder eine Badperfusion (aCSF; organotypische Schnittkulturen) einge-

setzt wurde. Für die Messungen wurde ein aufrechtes Systemmikroskop verwendet, an das eine Metall-Halid Lampe (HXP, Zeiss) über einen Lichtleiter eingekoppelt war. Das einfallende Licht wurde über einen dichroischen Spiegel geleitet und sowohl für die Exzitation als auch für die Emission durch Bandpassfilter selektiert (s. Tabelle 3).

**Tabelle 3** – Verwendete Bandpassfilter während der *Time-Lapse* Videomikroskopie

Funktion	Zentrale Wellenlänge	Bandbreite
Exzitationsfilter	470 nm	$\pm 40$ nm
Emissionsfilter	525 nm	$\pm 25$ nm

Alle Messungen wurden 2 - 3 Tage nach der Transfektion des Gewebes vorgenommen (s. Abschnitt 3.2). Während der Durchführung wurden, sofern nicht anders beschrieben, Lebendzellaufnahmen bei 63-facher Vergrößerung im Abstand von 10 s aufgenommen. Die Aufnahmen wurden von einer gekühlten CCD-Kamera (CoolSnap ES<sup>2</sup>) erfasst und digitalisiert. Die elektronische Steuerung dieser Kamera sowie der Filterräder und der Lichtquelle erfolgte über das Programm VisiView (VisitronSystems).

### 3.4.2. Immuncytochemische Färbungen

Um transfizierte Neuronenkulturen mit speziellen Markern anzufärben, wurden diese zwei Tage (2 PTF) nach der Transfektion (s. Abschnitt 3.2.1) in PBS gewaschen und 20 min in 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Anschließend wurden die Deckgläser dreimal für 10 min in PBS gewaschen. Um den Zugang der Antikörper zum Zellinneren zu ermöglichen, wurden die Neuronenkulturen für 15 min in 0,3% TritonX (in PBS) inkubiert und anschließend zweimal für 10 min in PBS gewaschen. Nach einer Blockierung mit 10% BSA und 0,1% TritonX in PBS wurden die fixierten Kulturen mit dem primären Antikörper im Verhältnis 1:100 (in PBS, 1% BSA und 0,1% TritonX) ÜN bei 4 °C inkubiert. Am nachfolgenden Tag wurden die Kulturen viermal für je 10 min in PBS gewaschen und für weitere zwei Stunden bei RT mit dem sekundären Antikörper (Verdünnung: entweder 1:100 oder 1:1000 in PBS, 1% BSA und 0,1% TritonX) inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen erneut gewaschen (viermal für je 10 min in PBS) und mit ImmuMount auf einem Objektträger fixiert.

### 3.4.3. Konfokale Laserscanning-Mikroskopie

Die qualitative Analyse der Antikörperfärbungen aus 3.4.2 wurde mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop vorgenommen (Axio Examiner, LSM 780). Die Fluoreszenzanregung für

das grünfluoreszierende Protein wurde über einen Argonlaser bei einer Wellenlänge von 488 nm und 25 mW Leistung vorgenommen. Die Laser-Intensität betrug 3,5 %. Der Farbstoff Alexa555 wurde durch einen Helium-Neon Laser (543 nm, 1,2 mW, 2,5 %) angeregt. Die Größe der Lochblende betrug 58  $\mu\text{m}$ . Die Pixelgröße wurde jeweils auf 0,07  $\mu\text{m}$  justiert. Die Anregungswellenlängen wurden durch einen Strahlenteiler (488/543 nm) aus der Emission herausgefiltert. Die Bildakquisition erfolgte über ein 20x Wasserimmersionsobjektiv (W Plan-ACHROMAT, n.A. 1,0) und wurde über die Software Zen 2010 gesteuert. Die Bildbearbeitung erfolgte über die Software IMARIS.

## 3.5. Elektrophysiologie

### 3.5.1. Whole-Cell Patch Clamp Messungen an dissoziierten hippokampalen Kulturen

Bei einem Teil der Experimente, bei denen eine Lebendzellmikroskopie an dissoziierten hippokampalen Neuronen durchgeführt wurde, wurden die Neurone gleichzeitig durch die *Whole Cell Patch Clamp*-Methode abgeleitet. Als Hardware-Komponenten des elektrophysiologischen Aufbaus wurden der Verstärker EPC8 (HEKA) und der Analog-Digitalwandler LIH8 verwendet. Diese Komponenten wurden durch die Software PatchMaster (HEKA) gesteuert. Für die Feinsteuerung des Mikroskops und des Vorverstärkers wurden elektrische Mikromanipulatoren (Luigs und Neumann) eingesetzt. Die für die Versuche verwendeten Mikropipetten wurden aus Borosilikatglas (GB150F-8P) über ein Pipettenziehgerät (PIP8, HEKA) hergestellt (Pipettenwiderstand 6 - 8  $\text{M}\Omega$ ) und über ein Mikrofilament (Microfil 28 G) oder eine feine Pipettenspitze (Microloader) mit Pipettenlösung befüllt. Für die verwendete extrazelluläre Lösung (HBS 2/1) wurde gegenüber der Pipettenlösung durch das Programm pClamp ein Potenzialunterschied von  $-13,7$  mV berechnet, für das über den Verstärker eine entsprechende Kompensation eingestellt wurde. Während des Patch-Vorgangs wurde die Mikropipette zunächst unter leichtem Überdruck an das Zellsoma herangeführt. In direkter Nähe zum Soma wurde der Überdruck entfernt und, falls notwendig, ein leichter Unterdruck appliziert, um eine dichte Verbindung zwischen Pipette und Zellmembran zu erreichen (Gigaseal,  $>1$   $\text{M}\Omega$ ). Die durch den Gigaseal sichtbaren Umladeströme wurden über den EPC8-Verstärker bestmöglich kompensiert, bevor die Zelle durch starken Unterdruck geöffnet wurde (*Whole Cell* Konfiguration). In dieser Konfiguration wurde zunächst das Membranpotenzial der Zelle abgelesen (keine Injektion von Strom). Anschließend wurden die Neurone entweder in der Spannungsklemme (*Voltage Clamp* Modus), in der an der Zellmembran entstehende Ströme sofort kompensiert werden, oder in der Stromklemme (*Current Clamp* Modus) abgeleitet. Im *Voltage Clamp* Modus wurden die Neurone auf ein Potenzial von  $-60$  mV geklemmt, während sie im *Current Clamp* Modus auf

ein Ruhemembranpotenzial von  $-60\text{mV}$  eingestellt wurden. Die abgeleiteten Signale wurden bei  $3\text{ kHz}$  gefiltert (Besselfilter) und mit  $10\text{ kHz}$  digitalisiert. Die aufgezeichneten Stromspuren vor, während und nach der Stimulation wurden mit dem Analyseprogramm FitMaster (HEKA) ausgewertet.

## 3.6. Analyse

### 3.6.1. Nachbearbeitung der fluoreszenzmikroskopischen Experimente

Für die Ermittlung von Kollokalisierungen bei den Antikörperfärbungen wurde ein Hintergrundwert ermittelt, um die Untergrenze einer Detektionsschwelle zu generieren. Aus den verbleibenden Intensitätswerten wurde aus dem Gesamtvolumen der BDNF-EGFP-positiven Bereiche der prozentuale Anteil errechnet, der mit dem dendritischen Marker MAP2 kollokalisierte.

Die Analyse der aktivitätsabhängigen Sekretion von fluoreszenzmarkiertem BDNF erfolgte über das Programm MetaMorph. Es wurden 5 - 22 Regionen (ROI, *regions of interest*) pro Zelle untersucht. Für jede Region und jeden Messzeitpunkt wurde ein durchschnittlicher Fluoreszenzintensitätswert ermittelt und in das Programm Excel übertragen. Für jeden Messzeitpunkt wurde zusätzlich der Hintergrundwert von den Messwerten abgezogen, bevor die Fluoreszenzwerte der einzelnen Regionen wie folgt weiter bearbeitet wurden: Die Messungen der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität von  $200\text{ s}$  bis  $10\text{ s}$  vor der Stimulation des Neurons wurden verwendet, um für jede Region eine individuelle Bleichkurve zu erstellen. Diese Kurve wurde als monoexponentieller Fit extrapoliert. Für jeden Messzeitpunkt wurde die Differenz der extrapolierten Bleichkurve zum Intensitätswert der Fluoreszenz zum Zeitpunkt  $0\text{ s}$  ermittelt. Der gemessene Intensitätswert der Region zu diesem Zeitpunkt wurde um diese Differenz korrigiert. Schnelle Veränderungen (z.B. aufgrund von Fokusschwankungen) wurden dabei nicht in den Fit mit einbezogen. Regionen mit instabilen oder stark ansteigenden Bleichkurven wurden nicht berücksichtigt. Anschließend wurden je fünf Regionen einer Zelle ausgewählt, die den größten Fluoreszenzverlust zeigten, gemittelt und für die weitere Analyse verwendet. Die Fluoreszenzintensitätswerte aller Neurone einer Messbedingung wurden über die Zeit gemittelt und verglichen. Die Darstellung erfolgte über die Software Origin. Einzelbilder wurden in Adobe Photoshop oder CorelDraw bezüglich ihres Kontrasts, Helligkeit und ihrer Graduationskurve für die Darstellung nachbearbeitet. Die monochromatischen Aufnahmen wurden zur Darstellung farbig erfärbt, um fluoreszente Marker und fluoreszierende Antikörper farbig abzuheben. Bilder, die dem Vergleich untereinander dienen, wurden dabei auf die gleiche Weise und um die gleichen Werte verändert.

### 3.6.2. Statistik

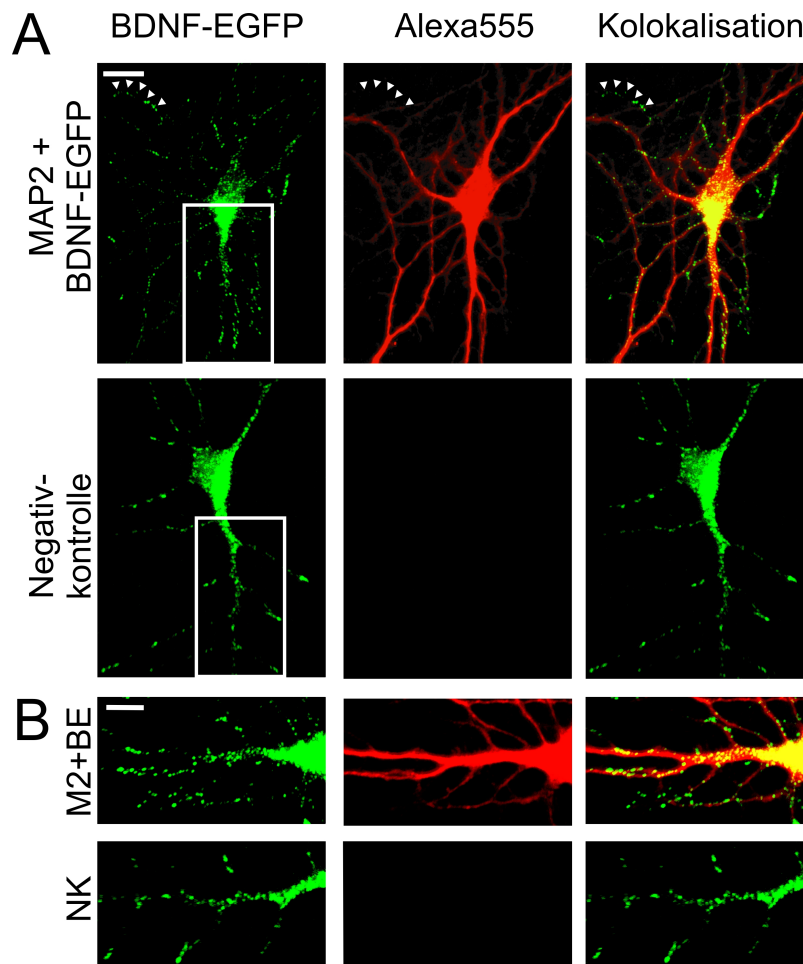
Die in dieser Arbeit enthaltenen Messwerte wurden auf Ausreißer untersucht (*Nalimov-Test*). Die aufgeführten Ergebnisse zeigen, wenn nicht explizit anders beschrieben, den Mittelwert mit dazugehörigem Standardfehler. Für multiple Vergleiche wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) mit *post-hoc* Test (*Tukey Test*) zur Ermittlung der Signifikanzen ( $p \leq 0,05$ ) verwendet.

## 4. Ergebnisse

Der sekretierte neurotrophe Faktor BDNF ist für eine Vielzahl von Funktionen, wie zum Beispiel die Differenzierung von Neuronen und die Modulation synaptischer Plastizität, ein bedeutendes Protein. Obwohl der aktivitätsabhängigen Ausschüttung von BDNF eine Schlüsselrolle während der Induktion und der Manifestation der Langzeitpotenzierung zugesprochen wird, ist der Mechanismus dieser Sekretion kaum verstanden. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Ausschüttung von BDNF in Abhängigkeit von verschiedenen Stimulationsmustern und des sekundären Messengers cAMP bestimmt.

### 4.1. Lokalisation von BDNF in hippocampalen Neuronen

BDNF wird in allen glutamatergen Neuronen endogen hergestellt. Aufgrund des geringen Expressionsniveaus wird jedoch das subzelluläre Verteilungsmuster kontrovers diskutiert (s. Abschnitt 1.1.2). Daher sollte zunächst ermittelt werden, in welchen Neuriten sich BDNF unter den hier verwendeten Kultivierungsbedingungen nachweisen lässt. Hierzu wurden dissoziierte hippocampale Neurone nach acht Tagen *in vitro* mit Hilfe der Kalzium-Phosphat Präzipitation mit einem Plasmidkonstrukt transfiziert, das für BDNF-EGFP kodiert. Die Kulturen wurden anschließend mit PFA fixiert und mit einem Antikörper gegen den dendritischen Marker MAP2 angefärbt. Anschließend folgte die Analyse der Kolo-kalisation von MAP2 und BDNF an Neuronen, in deren Umgebung sich keine weiteren Neurone befanden, die BDNF-EGFP vesikulär exprimierten. In diesen hippocampalen Neuronen konnte BDNF-EGFP insbesondere in größeren Clustern in Soma und Neuriten detektiert werden. Die Kolo-kalisationsanalyse mit MAP2 ergab, dass sich diese Punkte vor allem im somatodendritischen Bereich der Neurone befanden. Insgesamt war das vorhandene, vesikuläre BDNF zu in  $91,5 \pm 1,6$  % ( $n=13$ ) mit MAP2 kolo-kalisiert. Negativkontrollen, die lediglich mit dem Zweitantikörper gefärbt wurden, zeigten dagegen keine rote MAP2-Fluoreszenz und daher auch keine Kolo-kalisation ( $0,10 \pm 0,03$  % in-



**Abbildung 6 – MAP2 Antikörper-Färbung an dissoziierten, hippocampalen Neuronen mit BDNF-EGFP-Expression** Dissoziierte hippocampale Neurone wurden mit einer BDNF-EGFP-Plasmid-DNA transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion erfolgte eine Antikörperfärbung gegen den dendritischen Marker MAP2. **A** Hippokampales Neuron nach MAP2-Antikörper-Färbung im Vergleich zur Negativkontrolle (Färbung mit dem Zweitantikörper, Messbalken: 10 µm). Weiße Pfeilspitzen markieren das Axon. **B** Vergrößerte Ausschnitte der dendritischen Bereiche der hippocampalen Neurone aus A (M2=Map2; BE=BDNF-EGFP; NK=Negativkontrolle; Messbalken: 6 µm). Die Bilder wurden mit Hilfe eines Laser-Scanning Mikroskops bei einer Pixelgröße von 0,07 µm aufgenommen.

klusive Soma, n=11; s. Abbildung 6). Zusammenfassend konnte durch die Antikörperfärbung eine Verteilung BDNF-beinhaltenender, vesikulärer Strukturen vor allem in dendritischen Bereichen der Neurone beobachtet werden.



## 4.2. Sekretion von BDNF aus hippokampalen Neuronen

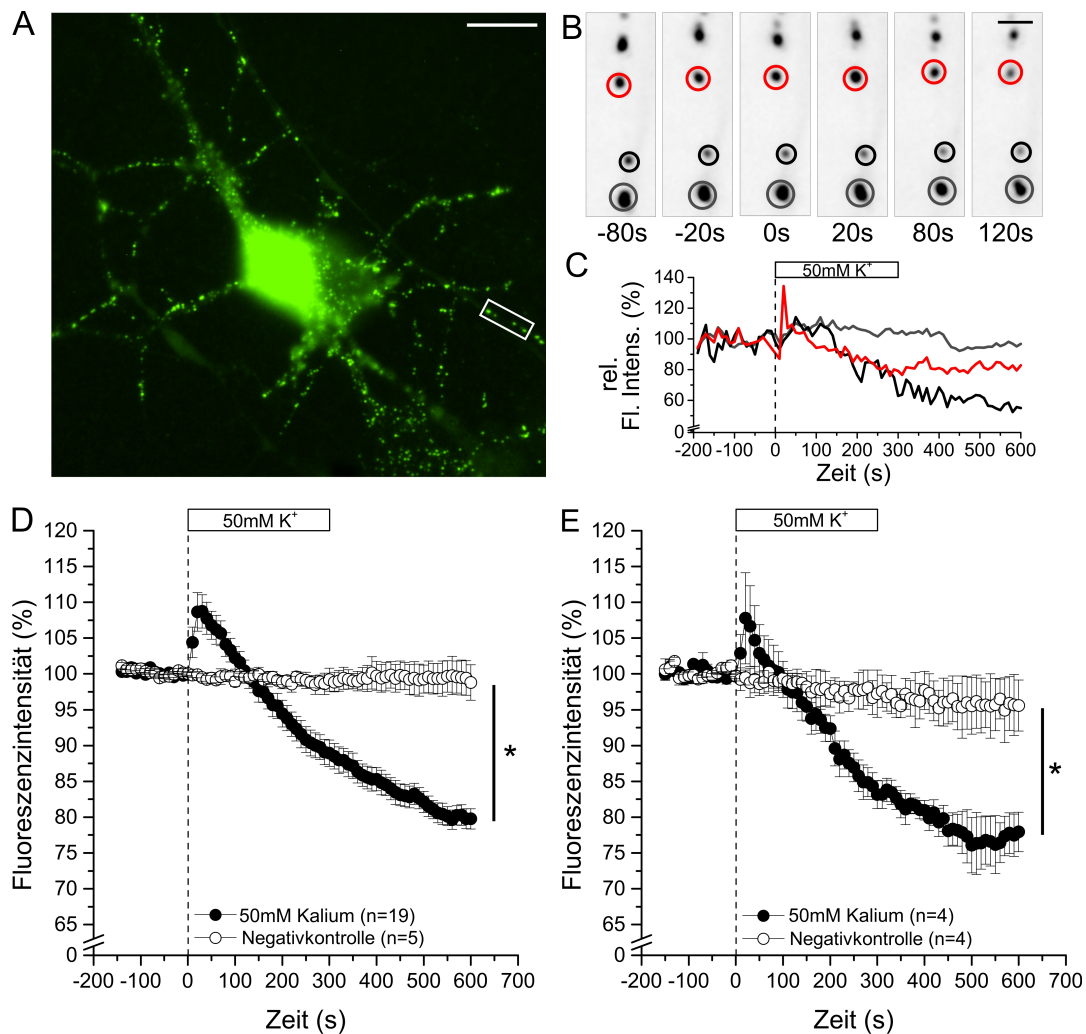
Wie bereits von einigen Studien gezeigt, eignen sich dissoziierte, hippokampale Neurone besonders für die zeitlich aufgelöste Analyse der BDNF-Ausschüttung an lebenden Zellen (s. Abschnitt 1.1.3). Da sich Neurone in Zellkulturen fast vollständig auf einer Ebene ausbreiten, lassen sich viele Bereiche, die durch BDNF-EGFP markiert wurden, unter dem Epifluoreszenzmikroskop gleichzeitig erfassen und deren Fluoreszenzveränderungen durch *Time Lapse* Videomikroskopie messen. Die Sekretion lässt sich dabei als Abnahme der intravesikulären Fluoreszenzintensität bestimmen.

### 4.2.1. Sekretion von fluoreszenzmarkiertem BDNF durch verschiedene Stimulationsmuster

Hippokampale Neurone zeigen im Verlauf ihrer postnatalen Entwicklung diverse Muster elektrischer Aktivität. Sowohl spontane, repetitive Depolarisationen von bis zu 50 mV (sogenannte GDPs, „Giant Depolarizing Potentials“), welchen eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung des Hippokampus zugewiesen wird, als auch repetitive Aktionspotenziale, die im muren Hippokampus insbesondere bei der Entwicklung der synaptischen Plastizität von Bedeutung sind, konnten mit einer regulierten Sekretion von BDNF verbunden werden (Mohajerani und Cherubini 2006; Kuczewski et al. 2008; für eine Übersicht s. Ben-Ari 2001). Die Mechanismen der aktivitätsabhängigen Ausschüttung von BDNF wurden in der Vergangenheit jedoch häufig nach einer kaliuminduzierten Depolarisation untersucht. Inwiefern sich die Mechanismen der durch Kalium induzierten Ausschüttung von BDNF von den Mechanismen einer elektrisch induzierten Ausschüttung unterscheiden, ist bislang jedoch ungeklärt. In der vorliegenden Arbeit wurden daher Stimulationsprotokolle entwickelt, die durch Nachahmung physiologischer Aktivitätsmuster eine Ausschüttung von BDNF induzieren.

#### 4.2.1.1. Sekretion von fluoreszenzmarkiertem BDNF durch den Anstieg der extrazellulären Kaliumkonzentration

Dissoziierte hippokampale Neurone wurden im Alter von 7-8 DIV mit Hilfe der Kalzium-Phosphat-Präzipitation mit BDNF-EGFP transfiziert. Nach 2-3 Tagen *post transfection* (2-3 PTF) wurden die Kulturen unter dem Fluoreszenzmikroskop hinsichtlich einer BDNF-Sekretion videomikroskopisch untersucht. Während der Versuche wurden die Neurone über eine lokale Perfusion zunächst mit dem extrazellulären Puffer HBS 2/1 überspült. Nach 5 min wurde der extrazelluläre Puffer für weitere 5 min durch eine Lösung ersetzt, die zusätzlich 50 mM Kalium (im Austausch für eine äquimolare Menge Natrium) enthielt (HBSK50 2/1), um die Neurone zu depolarisieren. Die Depolarisation führte in vielen Strukturen zum kurzzeitigen Anstieg



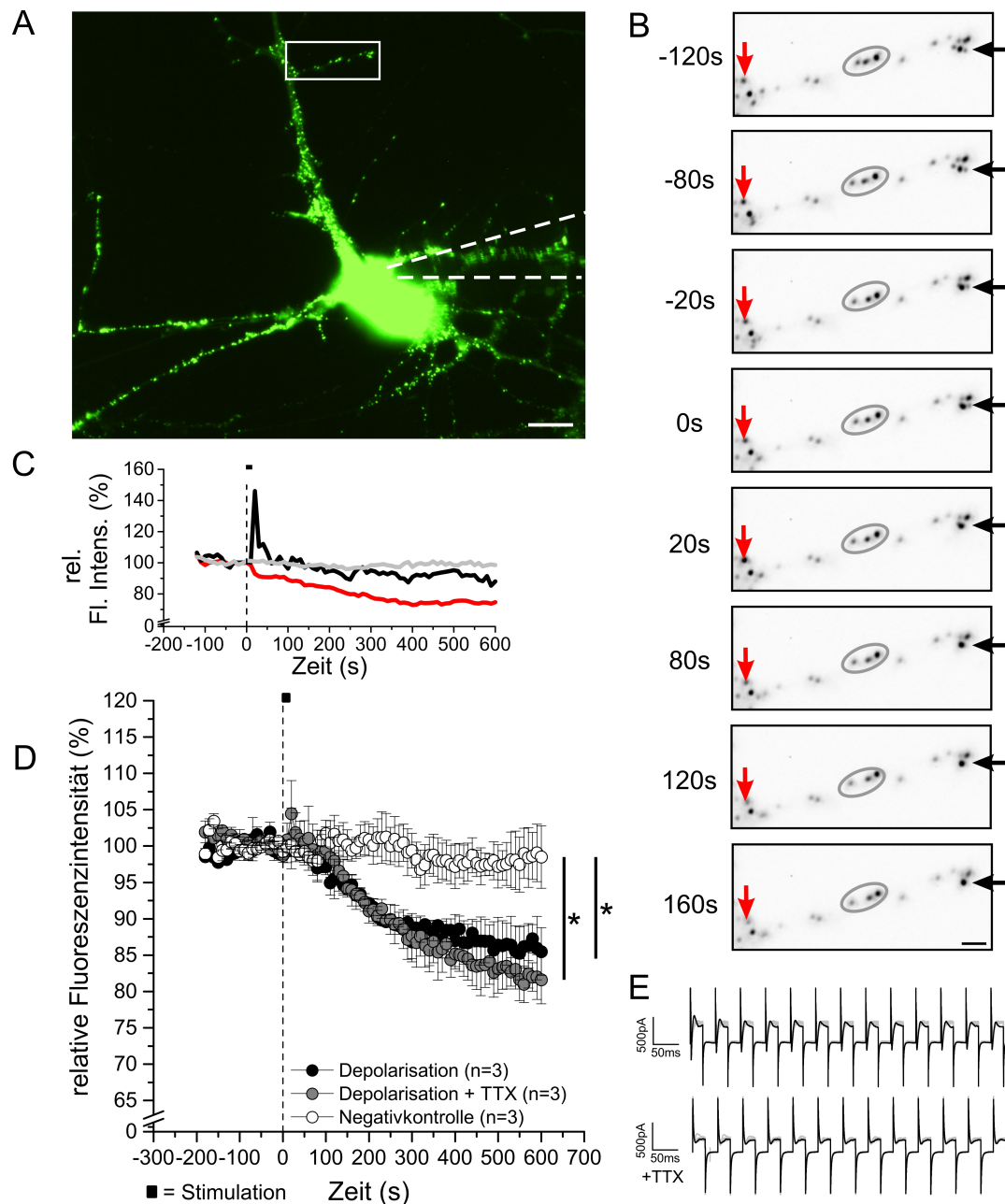
**Abbildung 7 – Ausschüttung von BDNF-EGFP nach kaliuminduzierter Depolarisation aus dissoziierten hippocampalen Neuronen** Dissoziierte hippocampale Neurone wurden mit BDNF-EGFP transfiziert. Zwei bis drei Tage nach der Transfektion erfolgte die videomikroskopische Analyse der BDNF-Ausschüttung während der kaliuminduzierten Depolarisation zum Zeitpunkt 0 s. **A** Exemplarisch ausgewähltes, mit BDNF-EGFP transfiziertes Neuron (Ratte). Das mit EGFP markierte Neurotrophin BDNF ist vesikulär über das Neuron verteilt (Messbalken: 10  $\mu\text{m}$ ). **B** Ausschnittsvergrößerung von A zu verschiedenen Zeitpunkten während der videomikroskopischen Untersuchungen (Messbalken: 1  $\mu\text{m}$ ). **C** Verlauf der EGFP-Fluoreszenzintensität der drei verschiedenen Regionen aus B während der Versuchsdurchführung. **D** Gemittelter Verlauf der Fluoreszenzintensität. Die Depolarisation führte zunächst zu einem Fluoreszenzanstieg. Anschließend wurde die Sekretion als Abnahme der Fluoreszenz über die Zeit gemessen (Details, s. Text). **E** Quantitative Analyse der Fluoreszenzveränderungen wie in A, jedoch mit Neuronen, deren elektrische Aktivität während der Versuchsdurchführung über das *Patch-Clamp* Verfahren beobachtet wurde. (Fehlerbalken = S.E.M, \* =  $p < 0.05$ )

der Fluoreszenzintensität. Diese Veränderung in der Fluoreszenzintensität wird durch die pH-Abhängigkeit des Fluoreszenzproteins verursacht. Die Fluoreszenzintensität von GFP nimmt bei einer Alkalisierung des umgebenden Milieus deutlich zu. Eine solche pH-Veränderung findet bei der Fusion der Vesikel- mit der Plasmamembran statt. Das Vesikelinnere, das typischerweise einen sauren pH-Wert von 5,5 - 6,5 aufweist, wird beim Kontakt mit dem neutralen, extrazellulären Medium neutralisiert, was die Fluoreszenzintensität des Fluoreszenzproteins verstärkt. Die anschließende Sekretion konnte in den hier durchgeführten Untersuchungen als Abnahme der Fluoreszenzintensität der vesikulären Strukturen gemessen werden. Es wurde festgestellt, dass der Fluoreszenzverlust durch die kaliuminduzierte Depolarisation nach 10 min  $20,2 \pm 1,4$  % (n=19) betrug. Im Vergleich dazu zeigten Kontrollzellen, die nicht depolarisiert wurden, einen vernachlässigbaren Fluoreszenzverlust von  $1,2 \pm 2,5$  % (n=5; s. Abbildung 7 A).

Um die kaliuminduzierte Depolarisation mit Stimulationsprotokollen vergleichen zu können, die auf intrazelluläre Strominjektion in der Spannungsklemme basieren, wurden die zu untersuchenden Neurone gleichzeitig über das *Patch-Clamp* Verfahren intrazellulär abgeleitet. Hierbei wurden die Zellen während des Experiments im *Whole-Cell* Modus auf ein Membranpotenzial von  $-60$  mV geklemmt. 10 min nach der Depolarisation durch erhöhtes extrazelluläres Kalium konnte ein Fluoreszenzverlust von  $22,1 \pm 2,8$  % (n=4) festgestellt werden. Bei nicht depolarisierten Kontrollzellen wurde lediglich ein Fluoreszenzverlust von  $4,4 \pm 3,6$  % detektiert (n=4; s. Abbildung 7 B). Der Patch-Vorgang und der Kontakt mit der intrazellulären Lösung in der Pipette veränderten demnach nicht die Sekretion des Neurotrophins. Dies zeigt, dass eine intakte Sekretion und deren Beobachtung durch Lebendzellaufnahmen in Echtzeit bei gleichzeitiger intrazellulärer Ableitung möglich ist.

#### 4.2.1.2. Sekretion von fluoreszenzmarkiertem BDNF durch repetitive Depolarisation

Im nächsten Schritt wurden Stimulationsprotokolle entwickelt, die durch die Nachahmung physiologischer Aktivitätsmuster eine Ausschüttung von BDNF-EGFP induzierten. Zunächst wurde ein Protokoll verwendet, das auf starken Depolarisationen (GDPs) basiert, wie sie über den Neurotransmitter GABA im postnatalen Hippokampus während der Entwicklung des jungen Nagergehirns entstehen können (für eine Übersicht, s. Mohajerani und Cherubini, 2006). Um solch starke Depolarisationen zu simulieren, wurden transfizierte, dissoziierte hippocampale Neurone (10-11 DIV, 1-3 PTF) mit Hilfe der *Patch Clamp* Technik im *Whole-Cell* Modus bei  $-60$  mV gehalten. Nach der Aufnahme des Bleichverhaltens (5 min) wurden die Neurone mit 20 Hz 300 mal auf  $-10$  mV depolarisiert. Jede dieser Depolarisationen löste einen starken Einwärtsstrom in die Zelle aus. Die Dynamik des Fluoreszenzverlusts wurde in verschiedenen

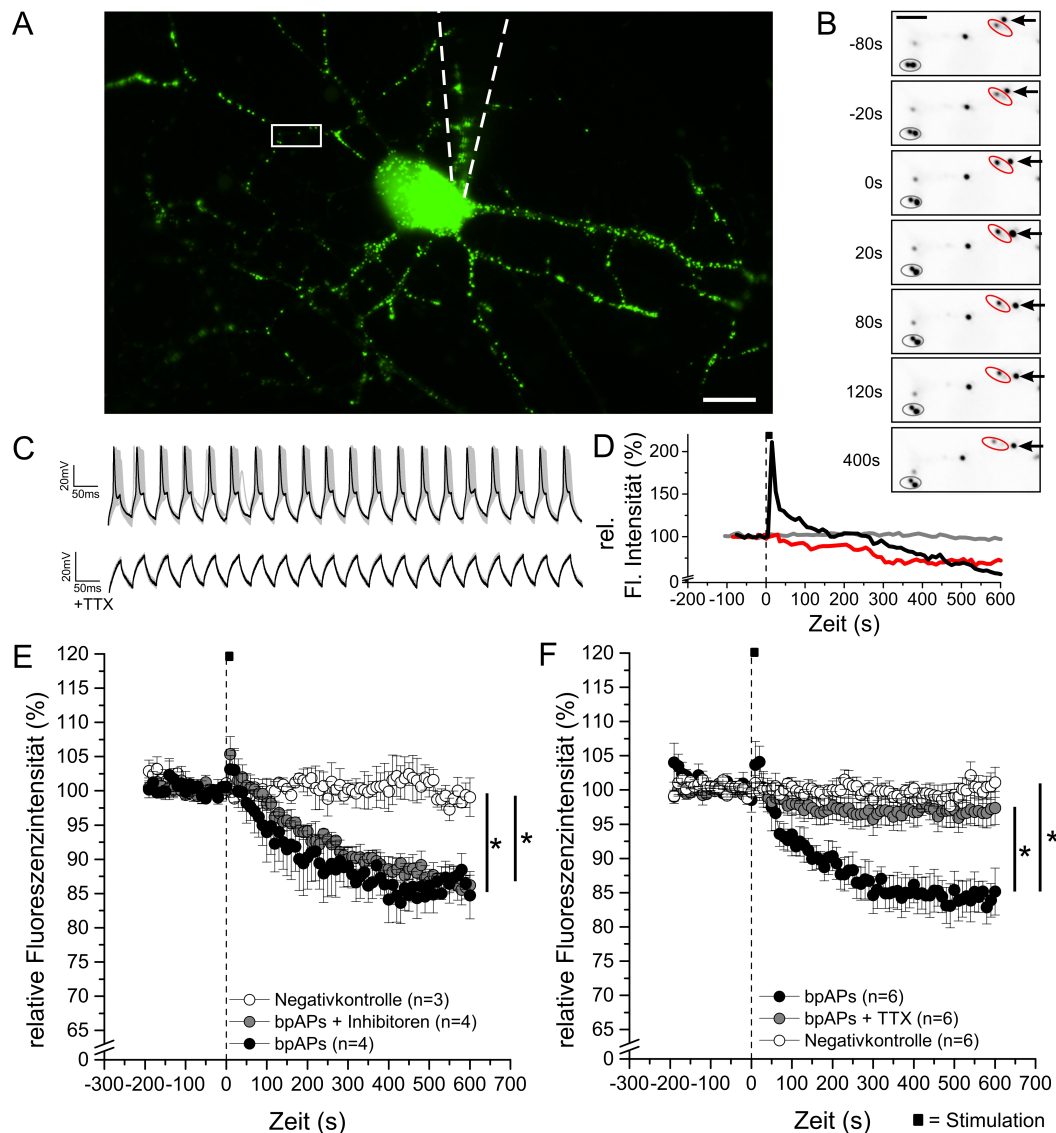


**Abbildung 8 – Ausschüttung von BDNF-EGFP nach wiederholter Depolarisation aus dissoziierten hippocampalen Neuronen** Dissoziierte hippocampale Neurone wurden mit BDNF-EGFP transfiziert. Die videomikroskopische Analyse der BDNF-Ausschüttung nach hochfrequenter Depolarisation erfolgte nach 2-3 PTF nach der Transfektion (300 Pulse, 20 Hz, auf  $-10$  mV). **A** Exemplarisch ausgewähltes, mit BDNF-EGFP transfiziertes Neuron (Ratte, 2PTF). Die Position der Patch-Pipette ist eingezeichnet (Messbalken:  $10\ \mu\text{m}$ ). **B** Ausschnittsvergrößerung von A zu verschiedenen Zeitpunkten während der videomikroskopischen Untersuchungen (Messbalken:  $1\ \mu\text{m}$ ). **C** Verlauf der EGFP-Fluoreszenzintensität der verschiedenen Regionen aus B während der Versuchsdurchführung. Die Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt 0 s wurde auf 100 % gesetzt. **D** Quantitative Analyse der Fluoreszenzintensitätsveränderungen (vgl. B). Die Depolarisation führte infolge der intravesikulären Alkalisierung zu einem Fluoreszenzanstieg. Anschließend wurde die Sekretion als Abnahme der Fluoreszenz über die Zeit gemessen (Details, s. Text). Die extrazelluläre Zugabe von  $1\ \mu\text{M}$  TTX hatte keinen Einfluss auf die Sekretion. **E** Repräsentative Stromspuren während der repetitiven Depolarisation, ohne (oben) und mit (unten) TTX. (Fehlerbalken = S.E.M., \*  $p < 0,05$ )

Regionen beobachtet. Über einen Zeitbereich von 10 Minuten nach der Stimulation wurde die Ausschüttung des BDNF-EGFP als prozentualer Abfall der vesikulären Fluoreszenzintensität bestimmt. Insgesamt konnte nach 10 min eine Fluoreszenzabnahme von  $14,5 \pm 3,2$  % ( $n=3$ ) gemessen werden. Im Vergleich dazu zeigten unstimulierte Kontrollen nur einen Fluoreszenzverlust von  $1,5 \pm 4,3$  % ( $n=3$ ) (s. Abbildung 8). Die extrazelluläre Zugabe des Natriumkanalblockers Tetrodotoxin (TTX, 1  $\mu$ M) hatte keine Auswirkung auf die durch Depolarisation induzierte Ausschüttung von BDNF-EGFP aus hippokampalen Neuronen (Fluoreszenzverlust:  $18,4 \pm 4,3$  %;  $n=3$ ).

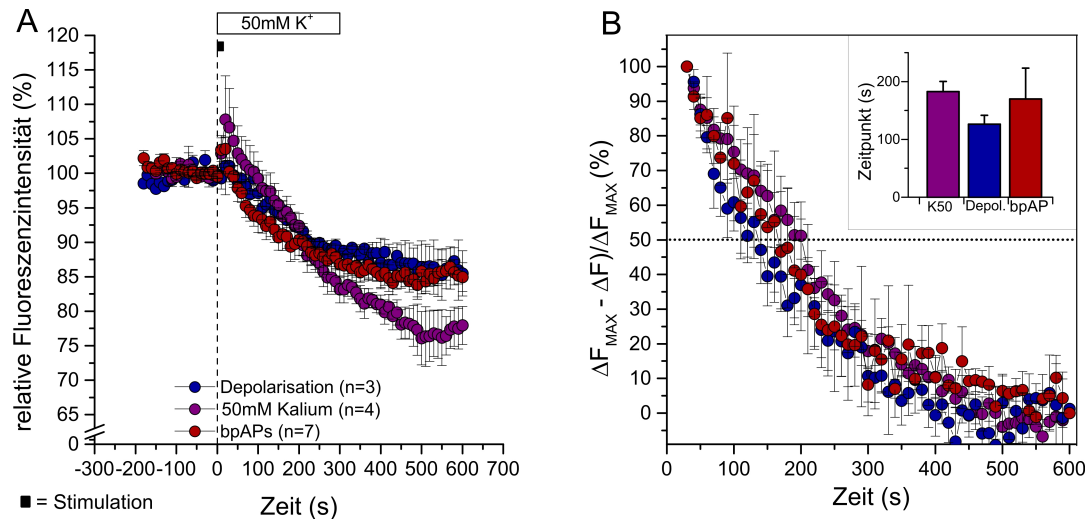
#### 4.2.1.3. Sekretion von fluoreszenzmarkiertem BDNF durch die repetitive Auslösung von Aktionspotenzialen

Aufgrund der Bedeutung von BDNF für die Induktion und Aufrechterhaltung der LTP wurde ein Stimulationsprotokoll entwickelt, das auf den Parametern plastizitätsvermittelnder Stimuli beruht. In der vorliegenden Arbeit wurde eine hochfrequente Stimulation gewählt, bei der wiederholt Aktionspotenziale ausgelöst werden. Dazu wurden mit BDNF-EGFP transfizierte Neurone 300 mal mit 20 Hz überschwellig durch Strominjektionen stimuliert. Die Stärke der Strominjektion, die notwendig war, um Aktionspotenziale auszulösen, wurde dabei für jedes Neuron vor Beginn der videomikroskopischen Untersuchung neu bestimmt. Die Veränderungen in der Fluoreszenzintensität einzelner Regionen nach der Stimulation wurde gemessen. Es konnte festgestellt werden, dass die verwendete Stimulation zu einem Fluoreszenzverlust von  $14,8 \pm 3,4$  % ( $n=4$ ) führte, während unstimulierte Kontrollen keine Fluoreszenzveränderung zeigten ( $-1,1 \pm 0,9$  %;  $n=3$ ). Die extrazelluläre Zugabe des Natriumkanalblockers TTX verhinderte die Ausbildung von Aktionspotenzialen und führte zu einer Inhibition der Sekretion (Fluoreszenzverlust:  $2,6 \pm 2,4$  %;  $n=4$ ). Ferner konnte festgestellt werden, dass die Zugabe von synaptischen Inhibitoren (50 nM PTX, 50  $\mu$ M D,L-APV, 5  $\mu$ M DNQX) keinen Einfluss auf die Sekretion hatte (Fluoreszenzverlust: ohne Inhibitoren  $13,8 \pm 1,5$  %,  $n=6$ ; mit Inhibitoren  $15,3 \pm 3,5$  %,  $n=6$ ; Negativkontrolle  $0,9 \pm 2,8$  %,  $n=6$ ). Die hochfrequente Auslösung von Aktionspotenzialen, die auch bei der Induktion synaptischer, BDNF-abhängiger Plastizität Verwendung findet (s. beispielweise Deisseroth et al., 1996; Gärtner und Staiger, 2002), ist demnach geeignet, um die Sekretion von BDNF videomikroskopisch in Echtzeit zu beobachten. Eine zusätzliche Wirkung der basalen synaptischen Aktivität auf die Sekretion von BDNF konnte durch Zugabe der synaptischen Inhibitoren ausgeschlossen werden.



**Abbildung 9 – Ausschüttung von BDNF-EGFP nach repetitiver Auslösung von Aktionspotenzialen aus dissoziierten hippocampalen Neuronen** Dissoziierte hippocampale Neurone wurden mit BDNF-EGFP transfiziert. Die videomikroskopische Analyse der BDNF-Ausschüttung nach repetitiver Auslösung von Aktionspotenzialen erfolgte 2-3 PTF nach der Transfektion (20 Hz). **A** Exemplarisch ausgewähltes, mit BDNF-EGFP transfiziertes Neuron (Ratte). Die Position der Patch-Pipette ist eingezeichnet (Messbalken: 10  $\mu$ m). **B** Ausschnittsvergrößerung von A zu verschiedenen Zeitpunkten während der videomikroskopischen Untersuchungen (Messbalken: 2  $\mu$ m). **C** Repräsentative Stromspuren während der Stimulation durch Aktionspotenziale, ohne (oben) und mit TTX (unten). **D** Verlauf der EGFP-Fluoreszenzintensität der verschiedenen Regionen aus B während der Versuchsdurchführung. Die Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt 0 s wurde auf 100 % gesetzt. **E** Quantitative Analyse der Fluoreszenzintensitätsveränderungen (vgl. B). Die Stimulation führte infolge der intravesikulären Alkalisierung zu einem Fluoreszenzanstieg. Anschließend wurde die Sekretion als Abnahme der Fluoreszenz über die Zeit gemessen (Details, s. Text). **E** Die extrazelluläre Zugabe von synaptischen Inhibitoren (PTX, D,L-APV, DNQX) hatte keine Auswirkung auf die Sekretion. **F** Bei einer extrazelluläre Zugabe von 1  $\mu$ M TTX wurden die Auslösung der Aktionspotenziale (vgl. C, unten) und der Fluoreszenzverlust inhibiert. (Fehlerbalken = S.E.M., \* =  $p < 0,05$ )

#### 4.2.1.4. Vergleich der Sekretion von fluoreszenzmarkiertem BDNF durch verschiedene Stimulationsprotokolle



**Abbildung 10 – Vergleich der BDNF-Sekretion aus dissoziierten hippocampalen Neuronen durch verschiedene Stimulationsprotokolle** Die in Abschnitt 4.2 verwendeten Stimulationsprotokolle wurden bezüglich der Effizienz und der Dynamik der BDNF-Sekretion verglichen. **A** Quantitative Analyse der Fluoreszenzintensitätsveränderungen. Bezüglich Sekretionsamplitude konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. **B** Vergleich der Dynamik des Fluoreszenzverlaufs. Der Maximalwert der Fluoreszenz wurde dabei auf 100 % gesetzt, während der Wert zum Ende der Messung auf 0 % festgelegt wurde. Der Verlauf der Fluoreszenzintensität von der Maximalfluoreszenz zur finalen Fluoreszenz verlief bei allen verwendeten Protokollen gleich, ohne dass signifikante Unterschiede festgestellt werden konnten. Auch beim Erreichen der halbmaximalen Fluoreszenz wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt (Kasten oben rechts).

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Stimulationsprotokolle verwendet, um eine BDNF-Sekretion aus dissoziierten, hippocampalen Neuronen auszulösen. Die hier verwendeten Protokolle wurden dabei hinsichtlich der durch sie ausgelösten Dynamik und Menge der BDNF-Sekretion verglichen. Zunächst konnte festgestellt werden, dass sich die Sekretionsmenge 10 Minuten nach der Stimulation zwischen den verschiedenen Protokollen nicht signifikant unterschied (s. Abbildung 10 A). Da sich die Fluoreszenzintensität des fluoreszierenden Markers nach Öffnen der Vesikel verändert, wurde die Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt der intensivsten Fluoreszenz (30 s) auf 100 % gesetzt, um den gesamten Fluoreszenzverlust ohne die o.g. Intensitätsveränderung zu vergleichen. Die untersuchten Zellen zeigten zu diesem Zeitpunkt durchschnittlich die höchste Fluoreszenzintensität nach der Stimulation. Der Endzeitpunkt der Messung (600 s) wurde als finaler Sekretionswert auf 0 % festgelegt. Anschließend wurde die

Dynamik der Fluoreszenzabnahme zwischen den verschiedenen Protokollen verglichen (s. Abbildung 10 B). Es konnten keine deutlichen Unterschiede im Verlauf der Fluoreszenzabnahme festgestellt werden. Der Zeitpunkt bis zum Erreichen des Halbmaximalwerts der Fluoreszenzintensität unterschied sich nicht signifikant zwischen den einzelnen Protokollen. Demnach sind alle drei Protokolle ähnlich effizient in der Auslösung der BDNF-Sekretion. Darüber hinaus wird die Kinetik der Ausschüttung durch die Wahl des Protokolls nicht beeinflusst.

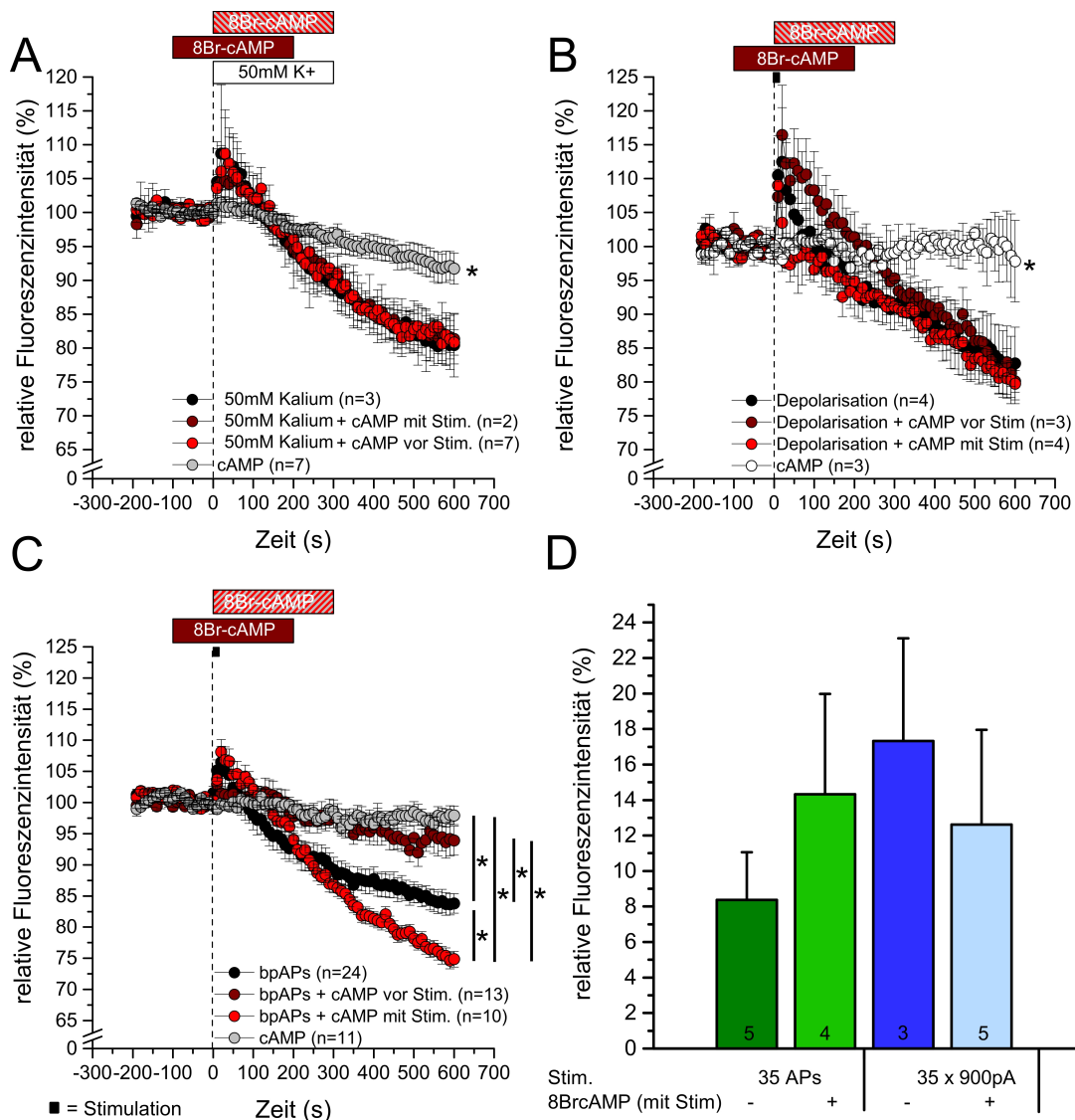
### 4.3. Die Abhängigkeit der BDNF-Sekretion von der intrazellulären cAMP-Konzentration

Zyklisches AMP ist ein ubiquitärer Botenstoff, der bei der Vermittlung verschiedener zellulärer Prozesse, wie der Entwicklung von synaptischen Netzwerken und der Entstehung von synaptischer Plastizität, von großer Relevanz ist (für eine Übersicht, s. Waltereit und Weller, 2003; Antoni, 2012). Bisher konnte nur an neuroendokrinen Zellen direkt gezeigt werden, dass die Applikation von cAMP eine Ausschüttung von BDNF induziert (Heymach et al., 1996). Bisher wurden zwei verschiedene cAMP-vermittelte Signaltransduktionskaskaden, die die Exozytose aus LDCV beeinflussen, identifiziert: Zum einen der Signalweg über die Proteinkinase A (PKA), zum anderen über das *Exchange protein directly activated by cAMP* (Epac) (für eine Übersicht s. Seino und Shibasaki, 2005). In den nachfolgenden Versuchen wurde deshalb überprüft, welchen Einfluss cAMP bzw. cAMP-vermittelte Signalwege auf eine aktivitätsabhängige Ausschüttung von BDNF aus hippocampalen Neuronen besitzt.

#### 4.3.1. Modulation der BDNF-Sekretion durch exogene Zugabe von cAMP

Um den Einfluss von cAMP auf die aktivitätsabhängige Ausschüttung von BDNF-EGFP zu untersuchen, wurden dissoziierte, hippocampale Neurone mit den oben beschriebenen Reizmustern stimuliert. Zur gleichen Zeit wurde das membranpermeable cAMP-Analogon 8Br-cAMP (100  $\mu\text{M}$ ) über das lokale Perfusionssystem extrazellulär appliziert. Die Überspülung mit 8Br-cAMP wurde dabei entweder 100 s vor bzw. gleichzeitig mit der Stimulation eingeleitet. Obwohl die mit 8Br-cAMP überspülten Neurone eine leichte Fluoreszenzabnahme von BDNF-EGFP zeigten ( $8,3 \pm 2,3$  %;  $n=7$ ), war diese signifikant geringer als bei kaliuminduzierter Depolarisation ( $19,6 \pm 4,7$  %;  $n=3$ ) oder Stimulation durch intrazelluläre Strominjektion (s. Abschnitt 4.2.1.2, s. Abbildung 11 A). Experimente zur gleichzeitigen Applikation von 8Br-cAMP und 50 mM Kalium zeigten allerdings keine verstärkte Fluoreszenzintensitätsabnahme gegenüber den Experimenten mit einer alleinigen kaliuminduzierten Depolarisation der Neurone ( $18,7 \pm 3,7$  %,  $n=2$ ; bzw.  $19,6 \pm 4,7$  %,  $n=3$ ). Eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-





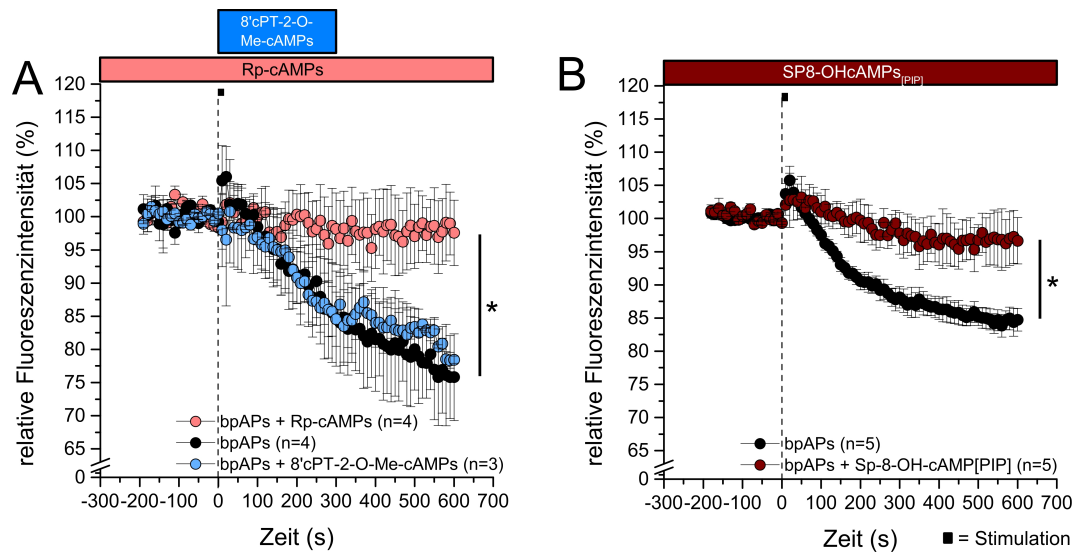
**Abbildung 11 – Modulation der Sekretion von BDNF-EGFP aus dissoziierten hippocampalen Neuronen durch die exogene Zugabe eines membranpermeablen cAMP-Analogons**  
 Dissoziierte hippocampale Neurone wurden mit BDNF-EGFP transfiziert. Zwei bis drei Tage nach der Transfektion erfolgte die videomikroskopische Analyse der BDNF-Ausschüttung unter verschiedenen Bedingungen. **A** Der Anstieg der extrazellulären Kaliumkonzentration auf 50 mM führte zu einer Sekretion von BDNF, die jedoch durch die Zugabe des cAMP-Analogons 8Br-cAMP nicht beeinflusst wurde. **B** Die Effizienz der Sekretion von BDNF, die durch repetitive Depolarisationen auf  $-10$  mV (300 mal bei 20 Hz) ausgelöst wurde, wurde durch den Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration ebenfalls nicht beeinflusst. **C** Die Sekretion von BDNF nach der Auslösung repetitiver Aktionspotenziale (300 überschwellige Stimulationen bei 20 Hz) wurde hingegen durch cAMP beeinflusst. Wurde die cAMP-Konzentration 100 s vor der Stimulation erhöht, führte dies zu einer Blockade der Sekretion. Bei gleichzeitiger Applikation von 8Br-cAMP wurde die Sekretion verstärkt. **D** Weitere Protokolle, mit denen die Sekretion von BDNF ausgelöst wurde, zeigten entweder eine wesentlich geringere Sekretionsamplitude oder führten nur in einigen Versuchen zu einer Sekretion. Die Anzahl der Messungen ist innerhalb der Balken angegeben. Eine Modulation durch die Zugabe von 8Br-cAMP konnte bei diesen Protokollen nicht gezeigt werden.

Konzentration vor der kaliuminduzierten Depolarisation veränderte die Sekretionsdynamik und -menge ebenfalls nicht ( $19,2 \pm 1,9$  %,  $n=7$ ; s. Abbildung 11 A).

Darüber hinaus wurde der Einfluss von 8Br-cAMP auf die Ausschüttung von BDNF nach der repetitiven Depolarisation von Neuronen durch intrazelluläre Strominjektion untersucht. Das Überspülen hippokampaler Neurone mit 8Br-cAMP-haltigem Puffer führte bei Ausbleiben der Depolarisation zu keiner Sekretion von BDNF-EGFP ( $2,2 \pm 6,0$  %,  $n=4$ ). Die Überspülung der Neurone mit 8Br-cAMP 100 s vor der repetitiven Depolarisation durch Strominjektion führte zu einem Fluoreszenzverlust von  $19,9 \pm 1,6$  % ( $n=3$ ). Diese Veränderung in der Fluoreszenzintensität unterschied sich nicht von den Fluoreszenzveränderungen in den Kontrollzellen, die ohne 8Br-cAMP-Zugabe repetitiv depolarisiert wurden ( $17,3 \pm 5,4$  %,  $n=3$ ). Bei Neuronen, bei denen Depolarisation und 8Br-cAMP-Applikation gleichzeitig erfolgten, konnte ebenfalls keine Veränderung in der Sekretionsamplitude festgestellt werden ( $20,3 \pm 2,9$  %,  $n=4$ ; s. Abbildung 11 B). Die durch repetitive Depolarisationen auf  $-10$  mV (300 Depolarisationen, 20 Hz; vgl. Abschnitt 4.2.1.2) induzierte Ausschüttung von BDNF aus dissoziierten hippokampalen Neuronen wurde somit nicht durch einen intrazellulären Anstieg von 8Br-cAMP beeinflusst.

Neurone, bei denen die Stimulation durch das Auslösen repetitiver Aktionspotenziale (vgl. Abschnitt 4.2.1.3) zeitgleich mit der 8Br-cAMP-Überspülung erfolgte, zeigten jedoch einen deutlich erhöhten Fluoreszenzverlust von  $25,1 \pm 1,3$  % ( $n=10$ ) im Vergleich zu Kontrollzellen, denen kein 8Br-cAMP zugeführt wurde ( $16,2 \pm 1,6$  %,  $n=24$ ). Eine reine Überspülung mit 8Br-cAMP ohne Stimulation konnte in den dissoziierten, hippokampalen Neuronen keine deutliche Sekretion auslösen ( $2,1 \pm 1,5$  %,  $n=11$ ). Interessanterweise reduzierte die Überspülung mit 8Br-cAMP 100 s vor der Stimulation die Sekretion von BDNF ( $6,1 \pm 2,3$  %,  $n=13$ ; s. Abbildung 11 D). Somit konnte je nach zeitlicher Beziehung zwischen der intrazellulären cAMP-Erhöhung und dem einsetzenden Feuern von Aktionspotenzialen ein verstärkender bzw. blockierender modulatorischer Einfluss von 8Br-cAMP auf die Sekretion von BDNF-EGFP beobachtet werden, sofern repetitive Aktionspotenziale als auslösender Stimulus verwendet wurden.

In einem letzten Schritt wurden Stimulationsprotokolle zur Induktion der BDNF-Sekretion untersucht, die dem postsynaptischen Anteil einer STDP-Stimulation (*Spike-timing dependent plasticity*) entsprechen (vgl. Edelman und Lessmann, 2013). Bei den beiden verwendeten Protokollen wurde jeweils ein Burst von vier Aktionspotenzialen ausgelöst, der insgesamt 35 mal im Abstand von 2 s wiederholt wurde. Bei einem der beiden Protokolle wurde die Stimulationsstärke für jedes Neuron neu bestimmt, sodass je vier Aktionspotenziale mit einer Frequenz von 20 Hz ausgelöst wurden (s. Abbildung 11 D, grün). In einem weiteren Protokoll wurden die vier Aktionspotenziale mit einer Stimulationsstärke von 900 pA und einer Frequenz von 200 Hz ausgelöst (s. Abbildung 11 D, blau; vgl. Edelman und Lessmann 2013). Beide Stimulations-



**Abbildung 12 – Modulation der Sekretion von BDNF-EGFP aus dissoziierten hippocampalen Neuronen durch PKA und Epac** **A** Eine Präinkubation mit dem cAMP-Analogen Rp-cAMPs, das die PKA-abhängige Signalkaskaden blockiert, führte zu einer Blockade der Sekretion während der Auslösung von bis zu 300 Aktionspotenzialen (20 Hz). Die Applikation des spezifischen Epac-Aktivators 8'cPT-2-O-Me-cAMPs gleichzeitig mit der Stimulation führte zu keiner Veränderung in der BDNF-Sekretionsamplitude und -dynamik. **B** Die Applikation des membranimpermeablen cAMP Analogens SP-8-OH-cAMPs, welches ein Aktivator der PKA ist, blockierte ebenfalls die Sekretion.

protokolle lösten eine Sekretion von BDNF-EGFP aus (35xAPs:  $8,4 \pm 2,7\%$ ,  $n=5$ ; 35x900 pA:  $17,3 \pm 5,8\%$ ,  $n=3$ ), die jedoch durch die Zugabe von 8Br-cAMP zum Zeitpunkt der Stimulation nicht signifikant beeinflusst wurde (35xAP:  $14,3 \pm 5,6\%$ ,  $n=4$ ; 35x900 pA:  $12,6 \pm 5,4\%$ ,  $n=5$ ). Insgesamt zeigte sich, dass die BDNF-Sekretion infolge der Stimulation der Neurone durch die Zunahme der extrazellulären Kaliumkonzentration sowie durch wiederholte Depolarisationen auf  $-10$  mV von einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration nicht beeinflusst werden konnte. Die Stimulationen, die auf wiederholten Stominjektionen im Abstand von 2 s basierten (35x 4 Stimuli), konnten ebenfalls durch 8Br-cAMP nicht beeinflusst werden. Eine Applikation von 8Br-cAMP konnte die Sekretion bei gleichzeitiger Applikation mit dem Stimulus jedoch dann verstärken, wenn mehrere Aktionspotenziale mit 20 Hz über einen Zeitraum von mehreren Sekunden ausgelöst wurden. Bei einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration vor der Stimulation wurde die Sekretion in diesem Fall dagegen blockiert.

#### 4.3.2. Abhängigkeit der BDNF-Ausschüttung von der PKA und Epac

Sowohl Epac als auch die Proteinkinase A (PKA) wurden als mögliche Signalwege beschrieben, die eine Modulation der Proteinsekretion in neuroendokrinen Zellen verursachen kön-

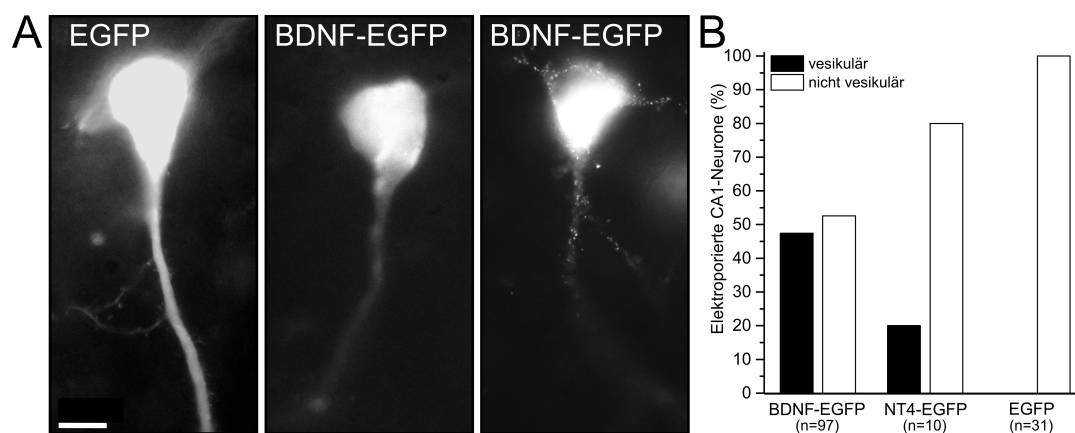
nen (für eine Übersicht, s. Seino und Shibasaki, 2005). Um zunächst einen möglichen Einfluss von Epac auf die Sekretion zu untersuchen, wurden die Neurone mit dem cAMP-Analogen 8'cPT-2-O-Me-cAMPs (100  $\mu$ M) überspült, einem membranpermeablen Aktivator für Epac. Die Aktivierung des Faktors durch das Analogon zeigte keine Veränderungen der Sekretion von BDNF-EGFP, die durch 300 Stimulationen über der Aktionspotenzialschwelle (20 Hz) induziert wurde (bpAPs:  $24,1 \pm 6,5$  %,  $n=4$ ; Epac-Aktivator:  $21,5 \pm 0,5$  %,  $n=3$ ; s. Abbildung 12 A). Um den Einfluss der PKA auf die Sekretion von BDNF-EGFP zu untersuchen, wurden die dissoziierten hippokampalen Neurone für 30 min in 100  $\mu$ M Rp-cAMPs, einem Inhibitor der PKA, im Kulturmedium inkubiert. Anschließend wurden die Neurone in eine Badkammer überführt, wo sie über die lokale Perfusion konstant mit Rp-cAMPs (in Puffer) überspült wurden. Das Auslösen von Aktionspotenzialen führte unter diesen Bedingungen zu einer Inhibition der Sekretion von BDNF-EGFP ( $2,4 \pm 0,8$  %,  $n=4$ ; s. Abbildung 12 A). Interessanterweise führte die Zugabe des membranimpermeablen PKA-Aktivators SP8-OH-cAMPs (4 mM, Präinkubation: 20 min) über die Patch-Pipette ebenfalls zu einer Blockade der Sekretion ( $3,3 \pm 3,5$  %,  $n=5$ ) gegenüber gleich behandelten Kontrollzellen ( $15,3 \pm 1,7$  %,  $n=5$ ; s. Abbildung 12 B).

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass die Aktivierung der PKA durch endogenes cAMP essenziell für die aktivitätsabhängige Sekretion von BDNF ist, während eine vor der elektrischen Stimulation erfolgte Erhöhung der basalen intrazellulären cAMP-Konzentration durch exogene Zugabe eines cAMP-Analogons die Sekretion vollständig inhibiert. Des Weiteren zeigen die hier vorliegenden Ergebnisse, dass eine Aktivierung von Epac die Sekretion von BDNF-EGFP nicht verändert.

#### 4.4. Sekretion aus organotypischen hippokampalen Schnittkulturen

Die Sekretion von BDNF aus lebenden Zellen in Echtzeit wurde bisher ausschließlich an dissoziierten Zellen unter Verwendung der Lebendzell-Mikroskopie untersucht. Um sowohl die Sichtbarkeit des Proteins, als auch dessen biologische Funktion zu gewährleisten, werden in solchen Experimenten beispielsweise Plasmide, die für fluoreszenzmarkierte Varianten des Proteins kodieren, über diverse Transfektionsmethoden in Zellen eingebracht. Die Expression dieser Plasmide beansprucht jedoch eine längere Inkubationszeit, sodass die Verwendung von akuten Schnitten nicht möglich ist. Um dennoch vergleichbare Untersuchungen an Gehirnschnitten zu ermöglichen, wurden in dieser Arbeit organotypische Schnittkulturen der Maus verwendet. Einzelne CA1-Pyramidenzellen organotypischer hippokampaler Schnittkulturen wurden durch juxtazelluläre Elektroporation mit einem BDNF-EGFP Plasmid transfiziert. Zunächst wurde das Expressionmuster des Proteins in den elektroporierten Zellen untersucht. Zum Vergleich wurde

das fluoreszenzmarkierte Neurotrophin NT4 (NT4-EGFP) sowie das reine EGFP-Konstrukt ebenfalls in einzelne CA1-Zellen organotypischer, hippocampaler Schnittkulturen elektroporiert. Es konnte gezeigt werden, dass BDNF-EGFP bei 47,4 % der Zellen (n=94) in einem vesikulären Verteilungsmuster vorliegt, das sich auch deutlich über die Neuriten, einschließlich der Apikal- und Basaldendriten, erstreckte (s. Abbildung 13 A und B). Im Vergleich dazu zeigte NT4-EGFP mit 20 % (n=10) nur selten eine vesikuläre Verteilung, was sich mit Ergebnissen an Zellkulturen deckt (vgl. Brigadski et al., 2005). Das Kontrollkonstrukt EGFP lag im Vergleich dazu ausschließlich in homogener Verteilung über die gesamte Zelle vor (n=31; s. Abbildung 13).



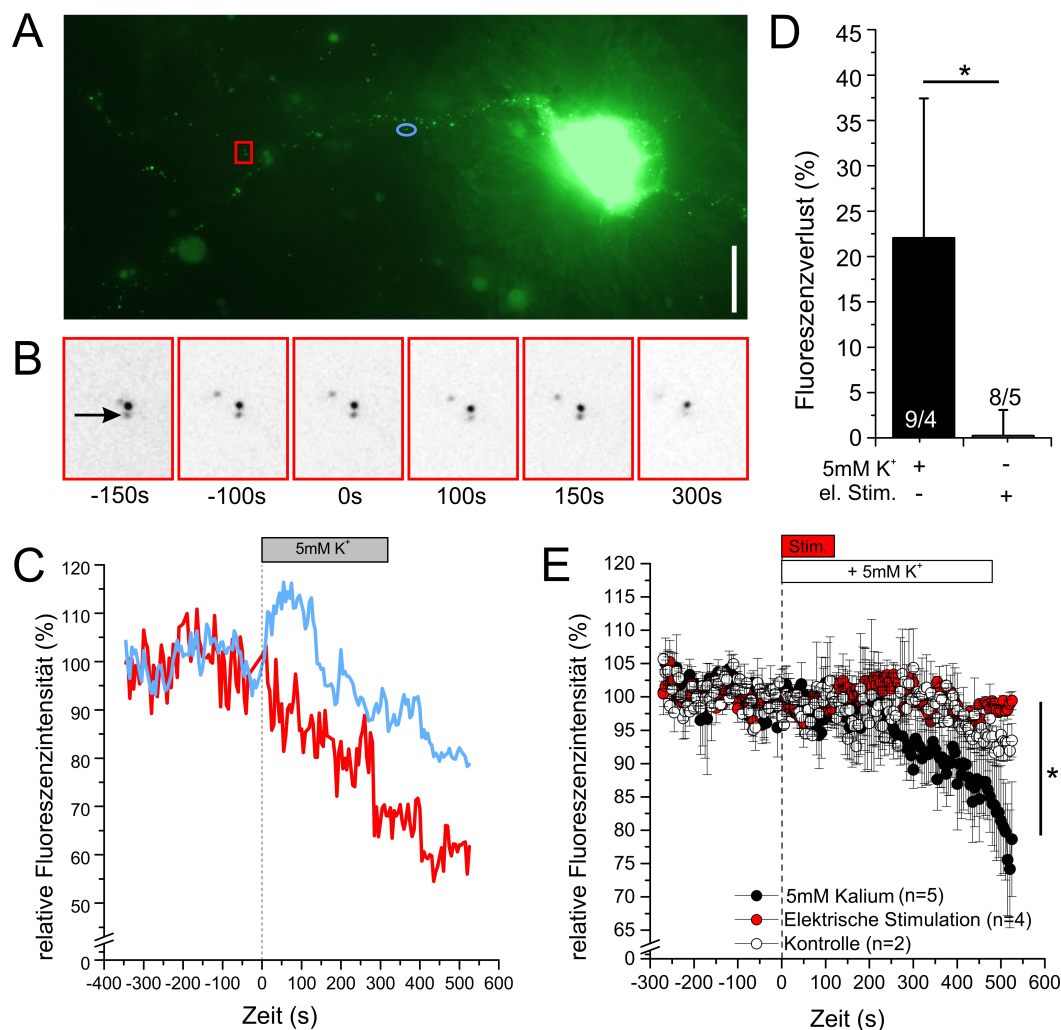
**Abbildung 13 – Expressionstypen einzelner CA1-Pyramidenzellen nach Elektroporation mit fluoreszenzmarkierten Neurotrophinen** **A** Repräsentative CA1 Neurone aus organotypischen hippocampalen Schnitten, die nach juxtazellulärer Einzelzelektroporation die Expressionsmuster zeigen, die in **B** vergleichend analysiert wurden. Links: CA1-Pyramidenzelle, die mit EGFP transfiziert wurde und eine homogene Verteilung des fluoreszenten Proteins zeigt. Mitte: CA1-Pyramidenzelle, die mit BDNF-EGFP transfiziert wurde und keine deutliche vesikuläre Verteilung des Proteins zeigte. Rechts: CA1-Pyramidenzelle, die mit BDNF-EGFP transfiziert wurde und ein deutliches, vesikuläres Verteilungsmuster des Proteins über die Neuriten der Zelle zeigt. **B** Vergleichende Analyse der Verteilung der verschiedenen Expressionsmuster von CA1-Pyramidenzellen nach juxtazellulärer Elektroporation mit verschiedenen DNA-Konstrukten.

An solchen CA1-Pyramidenzellen, die eine vesikuläre Verteilung von BDNF-EGFP zeigten, wurde die aktivitätsabhängige Ausschüttung des Proteins zwei Tage nach der Transfektion analysiert. Dafür wurden zwei verschiedene Protokolle verwendet: Um eine Sekretion durch das Heraufsetzen der basalen elektrischen Aktivität zu induzieren, wurde die extrazelluläre Kaliumkonzentration in der Badkammer durch eine Badperfusion um 5 mM (Endkonzentration 7,5 mM) erhöht. Die Sekretion wurde an einzelnen fluoreszenzmarkierten Regionen innerhalb einer Fokusebene untersucht und als Abnahme der Fluoreszenzintensität nach Beginn der Kali-

umzugabe zur Badlösung gemessen. Die Ebene wurde dabei so ausgewählt, dass möglichst viele Vesikel des Apikaldendriten der jeweiligen CA1-Pyramidenzelle zu erkennen waren. Nach der kaliuminduzierten Depolarisation konnte eine deutliche Abnahme der Fluoreszenz festgestellt werden ( $21,3 \pm 8,6$  %,  $n=5$ ; unstimulierte Kontrollen:  $6,6 \pm 2,5$  %,  $n=2$ ; s. Abbildung 14).

Die intakte strukturelle Organisation der Neurone in intakten Gehirnschnitten bietet zudem die Möglichkeit, axonale Faserbahnen, die auf bestimmte Zellen projizieren, direkt zu stimulieren. Deshalb wurde in einem weiteren Versuchsansatz eine ektopische, elektrische Stimulation der Schaffer-Kollaterale ( $10 \times -5$  V, 100 Hz für je 1 s) als Stimulationsmuster gewählt. Diese Art der Stimulation konnte jedoch keine Sekretion auslösen ( $0,6 \pm 2,4$  %,  $n=4$ ).

Zusammenfassend konnte eine Ausschüttung von BDNF aus dendritischen Strukturen von CA1-Pyramidenzellen in organotypischen Schnittkulturen gezeigt werden. Die Anzahl der messbaren Vesikel innerhalb einer Fokusebene war jedoch gering, sodass ein Großteil der möglichen Sekretionsereignisse während der Messung nicht erfasst werden konnte. Im Mittel zeigte die Fluoreszenzabnahme einen langsameren und weniger exponentiellen Verlauf als in den vorangegangenen Experimenten an dissoziierten Neuronenkulturen (s. Abbildung 14 E und C).



**Abbildung 14 – Sekretion von BDNF-EGFP aus CA1-Pyramidenzellen organotypischer hippocampaler Schnittkulturen** **A** Maximumprojektion eines einzelnen pyramidalen Neurons der CA1-Region eines organotypischen Schnitts (12 DIV). Das Neuron wurde mit Hilfe der Einzelzellektroporation mit BDNF-EGFP transfiziert. Die charakteristische punktuelle Verteilung des Proteins einer CA1-Pyramidenzelle entlang der gesamten dendritischen Verzweigung ist zu beobachten (Messbalken: 10  $\mu$ m). **B** Vergrößerte Region aus A zu verschiedenen Zeitpunkten während der Zunahme des Kaliumgehalts in die Badkammer. **C** Verlauf der Fluoreszenzintensität der Regionen aus A. **D** Fluoreszenzabnahme 525 s nach Beginn der Stimulation (Zunahme der Kaliumkonzentration im Vergleich zu einer ektopischen Stimulation in der CA3 Region [10x  $-5$  V, 100 Hz für je 1 s, Interpuls-Intervall: 10 s]). Die Anzahl an Regionen und die Anzahl der Schnitte, die für die Messungen verwendet wurden, sind für die beiden unterschiedlichen Messbedingungen angegeben. **E** Quantitative Analyse der Sekretion aus den CA1-Pyramidenzellen organotypischer hippocampaler Schnittkulturen unter Verwendung verschiedener Protokolle. Ein leichter Anstieg der extrazellulären Kaliumkonzentration führte zu einer erhöhten Sekretion von BDNF, während eine ektopische, elektrische Stimulation keine Sekretion verursachte. (Fehlerbalken = S.E.M., \* =  $p < 0,05$ ; modifiziert nach Edelman et al. 2015)

## 5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden Ganzzelleableitungen in Kombination mit zeitaufgelöster Videomikroskopie verwendet, um eine Sekretion von BDNF infolge elektrischer Stimulationen zu untersuchen. Dies erlaubte einerseits den Vergleich verschiedener Stimulationen hinsichtlich der durch sie ausgelösten BDNF-Sekretion; andererseits ließen sich die Eigenschaften der Sekretion über die extrazelluläre Applikation von Pharmaka genauer charakterisieren.

In den Untersuchungen dieser Arbeit konnte zunächst gezeigt werden, dass eine BDNF-Sekretion durch die Zunahme der extrazellulären Kaliumkonzentration sowohl in dissoziierten Neuronen als auch in organotypischen hippocampalen Schnitten ausgelöst werden konnte. In dissoziierten Neuronen konnte außerdem festgestellt werden, dass eine BDNF-Sekretion auch durch die Applikation repetitiver Depolarisationen oder durch repetitive, zurückpropagierende Aktionspotenziale ausgelöst werden kann. Dabei wurde festgestellt, dass sich die Sekretionsamplitude und die Sekretionskinetik zwischen den verschiedenen Stimulationen nicht unterschied. Auch die Zugabe synaptischer Inhibitoren hatte keinen Einfluss auf die hier gezeigte Ausschüttung von BDNF. Interessanterweise konnte jedoch gezeigt werden, dass sich die Abhängigkeit der BDNF-Sekretion von spannungsabhängigen Natriumkanälen und dem sekundären Botenstoff cAMP zwischen den verschiedenen Protokollen unterschied. So konnte die BDNF-Sekretion durch die Zunahme der extrazellulären Kaliumkonzentration oder durch die Applikation von repetitiven Depolarisationspulsen nicht durch die Blockade spannungsabhängiger Natriumkanäle oder durch die Zunahme der cAMP-Konzentration verändert werden. Wurde die Sekretion jedoch durch die Auslösung zurückpropagierender Aktionspotenziale induziert, zeigte sie eine kritische Abhängigkeit von der Funktion spannungsabhängiger Natriumkanäle und der cAMP-abhängigen Proteinkinase A. Zudem ließ sich die Sekretion durch die Zunahme der intrazellulären cAMP-Konzentration auf unterschiedliche Weise modulieren: Eine Applikation von membranpermeablem 8Br-cAMP über die lokale Perfusion führte nur dann zu einer erhöhten Sekretion, wenn diese Applikation gleichzeitig mit der Stimulation stattfand. Wurden



die cAMP-Level über dieses System jedoch deutlich vor der Stimulation erhöht, konnte eine Sekretion sogar unterbunden werden. Dabei ist es möglich, dass der genaue Zeitpunkt der cAMP-Veränderung für die beiden gegensätzlichen Effekte auf die Sekretion verantwortlich ist. Zudem könnte der längerer Applikationszeitraum von membranpermeablem 8Br-cAMP bei einer frühzeitigen Überspülung zu einer höheren intrazellulären Konzentration des Analogons führen, sodass die cAMP-Konzentration zum Stimulationszeitpunkt für dessen Wirkung auf die BDNF-Sekretion von Bedeutung ist.

Bisher wurde der Einfluss von cAMP auf BDNF-vermittelte Funktionen jedoch nur wenig untersucht. So sind einige dieser Funktionen kritisch von der cAMP-Konzentration oder den von cAMP-aktivierten Signalwegen abhängig bzw. werden durch cAMP moduliert (s. Abschnitt 1.3). Insbesondere in Bezug auf die Entwicklung der synaptischen Plastizität in Neuronen kann cAMP die Wirkung von BDNF potenzieren (s. Abschnitt 1.3.1). Dabei könnte es möglicherweise auch auf die Sekretion von BDNF einwirken. Dass cAMP modulatorisch auf die Sekretion von Proteinen Einfluss nimmt, wurde bereits an neuroendokrinen Zellen untersucht. Einige dieser Studien stellten fest, dass cAMP Einfluss auf die Sekretionsmaschinerie, die Fusionsporenöffnung und die Sekretionsmenge aus diesen Zellen nehmen kann. Wenige Studien zeigten auch, dass cAMP bei der Sekretion von Transmittern aus Neuronen von Bedeutung sein kann (s. Abschnitt 1.2.2).

Obwohl cAMP mitunter verstärkend auf die diversen BDNF-Effekte wirkt (Meyer-Franke et al., 1995; Boulanger und Poo, 1999; Ji et al., 2005), wurden bisher nur wenige Untersuchungen zum Einfluss von cAMP auf die Sekretion von BDNF vorgenommen. Lediglich in AtT-20 Zellen konnte gezeigt werden, dass cAMP eine Neurotrophin-Sekretion auslösen kann (Goodman et al., 1996; Heymach et al., 1996). An Neuronen konnten Kolarow et al. (2007) unter Verwendung erhöhter extrazellulärer Kaliumkonzentrationen als Stimulus jedoch keinen Einfluss von exogen applizierten cAMP-Analoga auf die BDNF-Sekretion feststellen. Dieses Ergebnis wurde hier zunächst bestätigt. Es konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch ein Einfluss von cAMP bei der neuronalen BDNF-Sekretion gezeigt werden, wenn die Applikation repetitiver Aktionspotenziale als Auslöser für eine BDNF-Sekretion verwendet wurde. Dabei war der Zeitpunkt der cAMP-Applikation, wie oben beschrieben, entscheidend für dessen Wirkung. Diese modulatorische Rolle von cAMP bei der BDNF-Sekretion ist bisher noch nicht gezeigt worden.

## 5.1. Lokalisation von BDNF in verschiedenen Neuronenkulturen

Viele Studien haben gezeigt, dass BDNF in unterschiedlichen Subregionen neuronaler Zellen lokalisiert sein kann (s. Abschnitt 1.1.2). Möglicherweise sind Unterschiede in der Art und Sen-

sitivität der Detektion, der experimentellen Bedingungen und des verwendeten Gewebes Faktoren, die die Detektion der genauen Verteilung des Proteins beeinflussen. Aus diesem Grund ist es wichtig, für eine spezifische Präparation einer Gewebekultur festzustellen, in welchen Regionen BDNF lokalisiert ist und potenziell ausgeschüttet werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurden dissoziierte, hippocampale Neurone auf Astrozyteninseln nach einer Methode hergestellt, die beispielsweise von Hartmann et al. (2001) verwendet wurde. Die Autoren zeigten, dass BDNF vorwiegend dendritisch lokalisiert ist. Für ähnliche Kulturen wurde endogenes und fluoreszenzmarkiertes BDNF ebenfalls in den somatodendritischen Bereichen der Neurone gefunden (s. beispielsweise Goodman et al., 1996; Haubensak et al., 1998; An et al., 2008; Matsuda et al., 2009). Einige Studien zeigten in dissoziierten Neuronen jedoch auch eine axonale Lokalisation (Haubensak et al., 1998; Kohara et al., 2001; Matsuda et al., 2009; Andreska et al., 2014). Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten dissoziierten hippocampalen Neurone zeigten in immunozytochemischen Versuchen, dass BDNF-EGFP zu über 90 % in somatodendritischen Bereichen lokalisiert ist. Somit konnte in der vorliegenden Arbeit eine vorwiegend somatodendritische Lokalisation von BDNF bestätigt werden.

Der Ursprung des sekretierten BDNFs in den hier verwendeten Kulturen wurde anhand von Antikörperfärbungen ermittelt. Dabei wurde die Expression des fluoreszenzmarkierten Proteins mit der Verteilung des dendritischen Markers MAP2 verglichen (s. Abbildung 6). Die Analyse dieser Färbungen zeigte, dass das BDNF-Protein in den hier verwendeten Kulturen vor allem dendritisch lokalisiert ist. Eine juxtazelluläre Elektroporation einzelner Zellen mit fluoreszenzmarkiertem BDNF innerhalb eines organotypisch strukturierten Gehirnschnitts zeigte, dass BDNF aus den Apikaldendriten der CA1-Neurone sekretiert wird. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass BDNF in dendritischen Bereichen lokalisiert sein kann und auch von dort ausgeschüttet wird.

## **5.2. Sekretion von BDNF durch verschiedene Stimulationsprotokolle**

### **5.2.1. Sekretion von BDNF aufgrund von Depolarisationen**

Eine Sekretion von BDNF aus dissoziierten, hippocampalen Neuronen wurde durch verschiedene Stimulationsprotokolle induziert. Zunächst wurden die Neurone mit einer erhöhten Kaliumkonzentration von 54 mM überspült. Diese Form der Stimulation wurde bereits zuvor in einigen Studien erfolgreich verwendet, um die Sekretion von Neurotrophinen zu induzieren (für eine Übersicht, s. Lessmann et al., 2003; Edelmann et al., 2014). Erhöhte Kaliumlevel finden auch

bei der Induktion epileptoformer Aktivität Anwendung (s. beispielsweise Jensen und Yaari, 1997; McBain, 1995), bei der eine erhöhte BDNF-Sekretion ebenfalls gezeigt werden konnte (für eine Übersicht, s. Reibel et al., 2001). In den hier vorliegenden Experimenten konnte zunächst gezeigt werden, dass sich sowohl die Dynamik als auch die Menge des ausgeschütteten BDNF nach kaliuminduzierter Depolarisation von einer Patch-Clamp Ableitung des Neurons nicht beeinflussen lassen (s. Abbildung 7). Dies bestätigt unter anderem, dass die elektrophysiologische Ableitung im Ganzzellmodus in den hier vorgestellten Experimenten keinen Einfluss auf die BDNF-Sekretion nimmt.

Verschiedene Stimuli können eine BDNF-Sekretion einleiten. Starke Depolarisationen von Neuronen können spannungsabhängige Ionenkanäle aktivieren (Leinekugel et al., 1995; Mohajerani und Cherubini, 2006). Beispielsweise sind spannungsabhängige Kalziumkanäle an der Sekretion von BDNF beteiligt (Balkowiec und Katz, 2002; Kolarow et al., 2007). Diese Form der Stimulation von Neuronen ist eine häufig verwendete Methode (für eine Übersicht, s. beispielweise Kuczewski et al., 2010). Lediglich Balkowiec und Katz (2002) konnten eine solche Sekretion in ihren *in situ* ELISA Studien bei einer KCl-Applikation von unter 10 s für endogenes BDNF nicht bestätigen.

In den postnatalen Zellen der Säuger spielen langanhaltende, starke Depolarisationen von bis zu 0 mV vor allem während der Entwicklung des Hippokampus eine bedeutende Rolle (für eine Übersicht, s. Mohajerani und Cherubini, 2006). Sie führen zu Netzwerk-Ereignissen, die auch als „Giant Depolarizing Potentials“ (GDPs) bezeichnet werden. Die Frequenz dieser vom Neurotransmitter GABA abhängigen Potenziale kann nicht nur durch die extrazelluläre Applikation von GABA verstärkt werden, sondern auch durch die Zunahme der extrazellulären Kaliumkonzentration (Sipila et al., 2005). Sowohl BDNF als auch GDPs sind bedeutende Faktoren für die postnatale Zellentwicklung (für eine Übersicht, s. Lessmann et al., 2003; Mohajerani und Cherubini, 2006). Tatsächlich können die durch GDPs ausgelösten Depolarisationen zu einer Sekretion von BDNF führen (Fiorentino et al., 2009). Allerdings ist die Entstehung spontaner GDPs kritisch von spannungsgesteuerten Kalzium- und Natriumkanälen abhängig (Cherubini et al., 2011). Es wurde jedoch schon in früheren Studien gezeigt, dass die Sekretion von BDNF durch die Zunahme der extrazellulären Kaliumkonzentration von spannungsgesteuerten Natriumkanälen unabhängig ist, da eine Blockade mit TTX keine Auswirkung auf die BDNF-Sekretion zeigte (Kolarow et al., 2007). Spannungsabhängige Kalziumkanäle (VGCCs) und intrazelluläre Kalziumspeicher sind bei diesem Vorgang dagegen von essentieller Bedeutung (Balkowiec und Katz, 2002; Kolarow et al., 2007). Da spannungsgesteuerte Kalziumkanäle allein durch erhöhte extrazelluläre Kaliumkonzentrationen geöffnet werden können (vgl. Di Virgilio et al., 1987), ist es möglich, dass die notwendige Aktivierung spannungsgesteuerter Natriumkanäle, die für die

Entstehung der VGCC-assoziierten GDPs notwendig ist, bei einer Depolarisation durch eine erhöhte extrazelluläre Kaliumkonzentration nicht notwendig ist und eine erwartete Abhängigkeit der BDNF-Sekretion von TTX daher nicht beobachtet werden konnte. Obwohl sowohl GDPs als auch die Zunahme der extrazellulären Kaliumkonzentration zu einer Depolarisation führen, gibt es zwischen den beiden Protokollen bereits dokumentierte Unterschiede (Sipila et al., 2005). Die Autoren vergleichen die rhythmische Aktivität, die durch eine Zunahme des extrazellulären Kaliums ausgelöst wird mit der Generierung rhythmischer Pulse durch CA3-Zellen im Hippokampus, wie sie beispielsweise bei epileptiformer Aktivität vorkommen. Dies führt auch zu einer Zunahme des extrazellulären Kaliums (Fertziger und Ranck, 1970; Fisher et al., 1976) und fördert die BDNF-Expression (für eine Übersicht, s. Binder und Scharfman, 2004).

Die Sekretion von BDNF durch 300 evozierte, repetitive Depolarisationen mit einer Frequenz von 20 Hz, wie sie in der vorliegenden Arbeit über die Patch-Pipette erreicht wurde, war ebenfalls unabhängig von TTX (s. Abbildung 8). Aufgrund der starken Depolarisationen, die in der Spannungsklemme ausgelöst wurden, können VGCCs unabhängig von der vorherigen Aktivierung spannungsaktivierter Na-Kanäle geöffnet werden und somit eine BDNF-Sekretion auch während einer TTX-Applikation verursachen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die BDNF-Sekretion generell vom Natriumeinstrom über TTX-sensible Kanäle unabhängig ist, jedoch kritisch von VGCCs abhängt (vgl. Balkowiec und Katz, 2002; Kolarow et al., 2007). In weiteren Untersuchungen könnte dieser Mechanismus über die Blockade der VGCCs, beispielsweise durch  $\omega$ -Conotoxin oder Nifedipin, genauer charakterisiert werden (vgl. Kolarow et al., 2007).

### 5.2.2. Sekretion von BDNF durch die Auslösung von Aktionspotenzialen

Neben den repetitiven Depolarisationen wurden auch 300 Aktionspotenziale mit einer Frequenz von 20 Hz als Stimulus verwendet. Eine Blockade dieser Aktionspotenziale durch die Zugabe von TTX führte zu einer Inhibition der BDNF-Sekretion (siehe Abbildung 9). Es ist zu vermuten, dass in diesem Fall die VGCCs nicht oder nicht ausreichend aktiviert wurden, da der Kationen-Influx über die Natriumkanäle essentiell für eine ausreichende Depolarisation zur Aktivierung der VGCCs ist. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Untersuchungen zur BDNF-Sekretion durch ELISA-Messungen von Balkowiec und Katz (2002), nach denen die Entstehung von Aktionspotenzialen für die BDNF-Sekretion von entscheidender Bedeutung ist. Dabei wurden von Balkowiec und Katz (2002) zudem unterschiedliche Stimulationsprotokolle von 25 - 100 Hz verwendet, um eine erfolgreiche Sekretion von BDNF auszulösen. Auch Gärtner und

Staiger 2002 konnten eine BDNF-Sekretion mit Stimulationsfrequenzen von 100 Hz auslösen. Eine solche Ausschüttung blieb in ihren Untersuchungen bei einer Stimulation mit nur 10 Hz jedoch aus. Beide Gruppen verwendeten dichte Massenkulturen für ihre Experimente, während in der hier präsentierten Arbeit kleinere Netzwerke auf Astrozyteninseln verwendet wurden, die sich in Zellmorphologie und elektrophysiologischen Eigenschaften von dichteren Massenkulturen unterscheiden. So bilden weniger dichte Kulturen mehr dendritische Verzweigungen und synaptische Verbindungen aus (Cullen et al., 2010). Die morphologischen Unterschiede wirken sich insbesondere auf die spontane Netzwerkaktivität aus. So konnten einige Studien zeigen, dass Neurone in dissoziierten hippocampalen Kulturen bei geringerer Zelldichte weniger spontane Aktivität zeigen (Cohen et al., 2008; Ivenshitz und Segal, 2010; Biffi et al., 2012). Eine neuere Studie von Shimba et al. (2015) zeigte außerdem, dass die spontane Feuerfrequenz in ihren hippocampalen Kulturen mit zunehmendem Alter abnahm (25 - 10 Hz während 20 DIV). Die Frequenz betrug zu einem Zeitpunkt, in dem das Alter der Neurone mit dem der in der vorliegenden Studie verwendeten Neurone vergleichbar war, durchschnittlich 15 Hz. In Experimenten an dissoziierten kortikalen Neuronenkulturen zeigten Wang et al. (2014) außerdem, dass ein gleichmäßiges Feuern von Aktionspotenzialen nur bei Stimulationen bis 20 Hz möglich war. Bei höheren Frequenzen führte die Stimulation zu einer deutlichen Verringerung der Amplitude nachfolgender Aktionspotenziale. In der vorliegenden Studie wurde die Stimulationsfrequenz daher empirisch so gewählt, dass dissoziierte hippocampale Neurone repetitive Aktionspotenziale ausbilden konnten.

Aufgrund der Erkenntnisse aus der MAP2-Färbung, nach der das hier verwendete BDNF-EGFP Protein über die Dendriten verteilt ist, und der Beobachtung, dass auch die Sekretion nicht auf wenige Neurite beschränkt ist (die beispielsweise alle zum Axon gehören könnten), lässt sich vermuten, dass die hier beschriebene BDNF-Sekretion dendritisch lokalisiert war. Die Beobachtung, dass Inhibitoren für synaptische Transmission, die sowohl GABAerge Signale (PTX) als auch glutamaterge Signale (AP-3, DNQX) blockieren, keinen Einfluss auf die Sekretion haben (vgl. auch Kolarow et al., 2007), lässt vermuten, dass die Aktionspotenziale in die Dendriten zurückpropagierten und dadurch eine Sekretion auslösten. Zumindest zeigt die intakte BDNF-Sekretion in Gegenwart der synaptischen Inhibitoren, dass synaptische Aktivität unter diesen Bedingungen nicht an der Ausschüttung von BDNF beteiligt war. Dies ist mit den Beobachtungen von Kuczewski et al. (2008), die durch dendritische Ableitung und Sekretionsversuche eine Ausschüttung von BDNF durch zurückpropagierende Aktionspotenziale zeigen konnten, vergleichbar.

### 5.2.3. Sekretion von BDNF infolge von Stimulationen, die bei der Initiation von synaptischer Plastizität angewendet werden

Da BDNF und cAMP an Vorgängen der synaptischen Plastizität beteiligt sein können, wurde versucht, eine BDNF-Sekretion auch unter Verwendung von Protokollen auszulösen, die bei der Initiation synaptischer Plastizität angewendet werden. Eines der BDNF-abhängigen Protokolle ist dabei ein STDP-Protokoll, das von Edelman und Lessmann (2013) erfolgreich verwendet wurde. Dieses Protokoll wurde zunächst unverändert eingesetzt, indem 35 mal je vier Aktionspotenziale durch Strominjektionen von 900 pA mit einer Frequenz von 200 Hz im Abstand von 2 s ausgelöst wurden. Dies führte zwar zu wiederholten, starken Depolarisationen der Neurone, nicht jedoch zur Ausbildung von Aktionspotentialen. Aufgrund der oben beschriebenen Veränderungen in den Feuerfrequenzen dissoziierter hippocampaler Neurone wurde dieses ursprüngliche Stimulationsprotokoll anschließend adaptiert, sodass die Aktionspotenziale mit einer gering überschwelligen Stimulationsstärke, die für jedes Neuron angepasst wurde, und einer Frequenz von 20 Hz ausgelöst wurden. Die Neurone konnten lediglich dem zweiten verwendeten Protokoll durch die zuverlässige Auslösung von Aktionspotentialen folgen. Diese Stimulation (35 wiederholte Auslösungen von 4 Aktionspotenziale mit 20 Hz im Abstand von zwei Sekunden) führte insgesamt zu einer geringeren Sekretion von BDNF im Vergleich zu dem aus Edelman und Lessmann (2013) übernommenen Protokoll (35 wiederholte Stimulationen mit 900 pA im Abstand von zwei Sekunden). Die beiden Protokolle unterscheiden sich insbesondere in Hinsicht auf ihre Stimulationsstärke. Die stärkere Stimulation führt in diesem Fall zu einer Öffnung von spannungsabhängigen VGCC-Kanälen, ohne dass eine zusätzliche Depolarisation über Na-Kanäle, wie sie bei der Generierung von Aktionspotentialen erfolgt, notwendig ist. Die BDNF-Sekretion infolge der weniger starken Stimulation führt dagegen zur Ausbildung von Aktionspotentialen, die eine schwächere und kürzere Depolarisation zur Folge haben. Durch die schwächere und kürzere Depolarisation verringert sich auch die Aktivierung der VGCCs. Die von VGCCs abhängige BDNF-Sekretion ist entsprechend geringer.

### 5.2.4. Vergleich der verwendeten Stimulationsprotokolle zur Auslösung einer BDNF-Sekretion aus dissoziierten hippocampalen Neuronen

Insgesamt zeigen die Versuche zur Sekretion von BDNF-EGFP, dass es mehrere Stimulationsprotokolle gibt, die eine BDNF-Sekretion auslösen können. Allerdings gibt es Unterschiede zwischen den hier vorgestellten Stimulationen. So ist die BDNF-Sekretion bei einigen der hier verwendeten Protokolle nicht von spannungsabhängigen Natriumkanälen abhängig, was auf die direkte Aktivierung spannungsabhängiger Kalziumkanäle zurückzuführen ist. Die durch Ak-

tionspotenziale ausgelöste Sekretion des dendritisch lokalisierten BDNFs kann dagegen durch die Blockade der spannungsabhängigen Natriumkanäle unterbunden werden, ist jedoch nicht von Glutamatrezeptoren oder GABA-Rezeptoren abhängig, was auf eine Sekretion aus dendritischen Strukturen infolge zurückpropagierender Aktionspotenziale hinweist (vgl. Kuczewski et al., 2008).

### **5.2.5. Sekretion von BDNF aus organotypischen, hippocampalen Schnittkulturen durch verschiedene Stimulationen**

In der vorliegenden Arbeit wurde auch eine Sekretion von BDNF aus organotypischen, hippocampalen Schnittkulturen untersucht. In den hier verwendeten organotypischen hippocampalen Schnitten wurde zunächst die Lokalisation von BDNF-EGFP überprüft. Durch gezielte Einzelzellektroporation in den organotypischen, hippocampalen Schnitten wurde das fluoreszenzmarkierte BDNF in einzelnen CA1-Neuronen translatiert. In den anschließenden Sekretionsversuchen war das vesikulär verteilte BDNF-EGFP deutlich im Apikaldendrit lokalisiert und wurde auch von dort ausgeschüttet. Demnach besitzen CA1-Pyramidenzellen Mechanismen, die von ihnen produziertes BDNF in die Dendriten verteilen, wo es aktivitätsabhängig ausgeschüttet werden kann (vgl. jedoch Dieni et al., 2012).

Interessanterweise fanden sich unter den elektroporierten Neuronen auch solche Neurone, die keine vesikuläre Expression, sondern eine eher homogene Expression von BDNF-EGFP über die gesamte Zelle zeigten. Solche Zellen mit homogener BDNF-Expression wurden auch in den dissoziierten hippocampalen Neuronen, die hier verwendet wurden, beobachtet (Daten nicht gezeigt; vgl. auch Brigadski et al. 2005). In der vorliegenden Studie wurde ein Plasmid verwendet, bei welchem das EGFP-Startkodon gegen ein Kodon für Arginin ausgetauscht wurde, sodass isoliertes EGFP durch Initiation der Translation am Startkodon von EGFP nicht entstehen konnte. Bei der beobachteten homogenen Expression handelt es sich daher vermutlich um eine zytosolisch exprimierte Form von BDNF-EGFP. Diese duale Expression von fluoreszenzmarkiertem BDNF wurde von Brigadski et al. (2005) an dissoziierten, hippocampalen Kulturen näher charakterisiert. Diese Studie zeigte, dass andere fluoreszenzmarkierte Neurotrophine wie NT4 weniger häufig in einem vesikulären, heterogenen Verteilungsmuster vorlagen als beispielsweise BDNF. Es wird vermutet, dass eine vesikuläre Verteilung mit der Neurotrophine mit ihrer Einordnung in den aktivitätsabhängigen Sekretionsweg zusammenhängt (für eine Übersicht, s. Lessmann et al., 2003). In der vorliegenden Studie wurden die Expressionsmuster von BDNF-EGFP mit den Expressionsmustern von NT4-EGFP in den hippocampalen CA1-Neuronen organotypischer Schnitte verglichen. Dabei wurde festgestellt, dass BDNF-EGFP-transfizierte Neu-

rone häufiger ein heterogenes Verteilungsmuster des Proteins zeigten als NT4-EGFP-tranfizierte Zellen (s. Abbildung 13). Dies bestätigt die Ergebnisse zur Expression von NT4 und BDNF in dissoziierten hippocampalen Neuronen von Brigadski et al. (2005). Interessanterweise zeigte BDNF-EGFP in den hier verwendeten organotypischen Schnittkulturen jedoch insgesamt einen höheren Anteil an homogen BDNF-EGFP-exprimierenden Zellen als bei der o.g. Studie. Dies könnte im Zusammenhang mit der Selektion eines bestimmten Zelltyps (CA1-Neurone) durch gezielte Elektroporation zusammenhängen. Möglicherweise gibt es Unterschiede zwischen den verschiedenen hippocampalen Neuronentypen bezüglich ihrer BDNF-Expression, die in einer dissoziierten Kultur, die aus verschiedenen Zelltypen besteht, nicht deutlich werden. Zudem könnten die Signale benachbarter oder synaptisch verschalteter Zellen in einem Gewebeschnitt Einfluss auf die BDNF-Expression nehmen.

In den organotypischen, hippocampalen Strukturen war es nicht möglich, eine extrazelluläre Lösung zu applizieren, die eine Kaliumkonzentration von 50 mM aufweist (Daten nicht gezeigt). Gliazellen verändern durch hohe, extrazelluläre Kaliummengen ihre Form durch Schwellung (für eine neuere Übersicht, s. MacAulay und Zeuthen, 2012). Durch das gemeinsame Anschwellen der Gliazellen im gesamten Schnitt veränderte sich die Fokusebene, sodass eine Messung in einer einzelnen Ebene des organotypischen hippocampalen Schnitts nicht möglich war. Extrazelluläre Kaliumkonzentrationen von 54 mM können in organotypischen hippocampalen Schnittkulturen außerdem eine reversible Fragmentierung des endoplasmatischen Retikulums verursachen, die möglicherweise die Verteilung des BDNF-Proteins beeinträchtigt (Kucharz et al., 2011). In der vorliegenden Studie wurde daher eine BDNF-Sekretion durch eine leichte Kaliumzunahme der extrazellulären Lösung auf 7,5 mM etabliert. Solche geringen Veränderungen der extrazellulären Kaliumkonzentrationen (6 - 9 mM) wurden in mehreren Studien bereits als Auslöser einer erhöhten Netzwerkaktivität beschrieben (Benninger et al., 1980; Krnjevic et al., 1982; LeBeau et al., 2002) und werden auch zur Aktivierung des Netzwerks und zur Initiation von Burst-Aktivität verwendet (s. beispielsweise Korn et al., 1987; Jensen et al., 1994; Jensen und Yaari, 1997). Die hier verwendeten Kaliumkonzentrationen konnten eine Sekretion von BDNF-EGFP aus organotypischen, hippocampalen Gewebeschnitten erfolgreich auslösen. Die Sekretion aus den Stoppini-Kulturen verlief jedoch mit einer anderen Dynamik im Vergleich zur Sekretion aus den dissoziierten Kulturen (vgl. Abbildung 4 und Abbildung 10), obwohl einzelne Bereiche während der BDNF-Sekretion durchaus einen typischen Sekretionsverlauf zeigten (vgl. Abbildung 4 C). Die langsamere Entwicklung des Fluoreszenzverlusts könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Netzwerkaktivität im Vergleich zu einer direkten Stimulation durch intrazelluläre Strominjektion zu einer zeitverzögerten Öffnung der VGCCs führt, da die Depolarisation eines Neurons durch die graduell ansteigende Netzwerkaktivität ebenfalls langsamer verläuft. Die Depolarisation über die Aktionspotenzialschwelle hinaus erreicht unter diesen Bedingungen auch



nicht die gleiche Stärke wie bei einer direkten Depolarisation oder bei einer zügigen, starken Zunahme der extrazellulären Kaliumkonzentration um 50 mM durch eine Einzelzellperfusion, wie sie bei dissoziierten Neuronen verwendet wurde. Entsprechend ist zu erwarten, dass auch die einzelnen Vesikel zeitverzögert mit der Zellmembran fusionieren. Dies konnte jedoch nur bei wenigen Vesikeln beobachtet werden. Ein weiterer Mechanismus, der die BDNF-Sekretion verlangsamen kann, ist die Ausbildung einer kleineren Fusionspore, die das BDNF-Protein langsamer entlässt als während einer vollständigen Fusion des Vesikels mit der Zellmembran. An dissoziierten Kulturen wurden diese unterschiedlichen Modi der Sekretion innerhalb eines einzelnen Neurons beschrieben (Matsuda et al., 2009). In dieser Studie konnte eine transiente Fusion in axonalen Vesikeln gezeigt werden, die jedoch in dendritischen Vesikeln ausblieb. In der vorliegenden Arbeit wurden jedoch ausschließlich dendritische Regionen analysiert (vgl. auch Kolarow et al., 2007). Zusätzlich ist zu bedenken, dass die funktionelle Morphologie einer Zelle innerhalb eines organotypischen, hippocampalen Schnitts durch die vorhandene Struktur und Organisation des Schnittes besonders beeinflusst wird. Beispielsweise besitzen bestimmte dendritische Bereiche einer CA1-Pyramidenzelle vorwiegend Verbindungen von bestimmten Regionen des Schnittes oder bestimmten Zelltypen. In der vorliegenden Studie wurde vor allem der proximale Apikaldendrit analysiert. Dieser Bereich erhält typischerweise Input aus lokalen Quellen, wie beispielsweise den CA3-Neuronen, während distalere Bereiche von außerhalb des Hippokampus innerviert werden (für eine Übersicht, s. Spruston, 2008). Möglicherweise existieren je nach Innervierung und nach umgebenden Gewebe lokale Unterschiede in den Sekretionseigenschaften von Vesikeln, die in diesen Versuchen deutlich werden. Zusätzlich befinden sich die gemessenen Zellen nicht in der obersten Zellschicht des organotypischen Schnitts (vgl. Daniel et al., 2013). Es ist daher möglich, dass zwischen der Sekretion des polaren Proteins und dessen Auswaschen aus dem intrazellulären Raum durch die langsame Badperfusion mehr Zeit vergeht, als bei der lokalen Perfusion, die bei dissoziierten hippocampalen Kulturen Verwendung findet.

Interessant ist jedoch, dass eine extrazelluläre, elektrische Stimulation der Schaffer-Kollaterale keine BDNF-Sekretion im Apikaldendriten der CA1-Neurone auslösen konnte, obwohl dieser, wie bereits erwähnt, über diese Fasern von CA3-Pyramidenzellen innerviert wird. In LTP-Experimenten wird diese Art der extrazellulären Stimulation häufig verwendet. Allerdings wird das gemessene CA1-Neuron zur Ausbildung einer LTP in einigen Experimenten gleichzeitig depolarisiert (Lin et al., 2005; Daniel, 2014). Obwohl für die LTP-Induktionen durch Feldstimulationen grundsätzlich keine zusätzliche Depolarisation postsynaptischer Zellen benötigt wird (s. beispielsweise Leutgeb et al., 2003), könnte eine BDNF-abhängige LTP von einer postsynaptischen Depolarisation und einer damit verbundenen BDNF-Ausschüttung abhängig sein. In einem weiteren Schritt könnte zunächst überprüft werden, wie sich die verwendete Stimu-

lation auf das transfizierte Neuron auswirkt, um die Effizienz der Stimulationsmethode unter den hier verwendeten Bedingungen zu überprüfen. Eine gleichzeitige Ganzzelleableitung ermöglicht nicht nur das Überprüfen der Reizantwort des mit BDNF-EGFP transfizierten Neurons, sondern ebenfalls die Applikation des o.g. depolarisierenden Reizes. In parallelen Versuchen zur LTP-Induktion an den hier verwendeten Schnittkulturen war eine solche postsynaptische Depolarisation tatsächlich notwendig, um eine LTP zu generieren (Daniel, 2014).

Zusammenfassend zeigt die hier dargestellte Sekretion aus organotypischen hippocampalen Schnittkulturen, dass eine dendritische Sekretion von BDNF auch in intaktem Gewebe beobachtet werden kann. Bisher konnte eine solche BDNF-Ausschüttung in Echtzeit an intakten Gewebeschnitten noch nicht gezeigt werden. Interessant ist besonders, dass eine extrazelluläre, elektrische Stimulation keine BDNF-Sekretion verursachen konnte. Dies könnte im Zusammenhang mit den spezifischen Anforderungen für die Ausbildung einer BDNF-abhängigen LTP in organotypischen hippocampalen Schnittkulturen stehen. Eine Sekretion von BDNF durch die Zunahme der extrazellulären Kaliumkonzentration konnte hier jedoch gezeigt werden. Die Dynamik dieser Sekretion unterscheidet sich im Vergleich zu dissoziierten Kulturen, was möglicherweise auf diverse Eigenschaften des Gewebes zurückzuführen ist.

### 5.3. cAMP-Abhängigkeit der BDNF-Sekretion

Insgesamt zeigen die Beobachtung zur Sekretion von BDNF durch verschiedene Stimulationsprotokolle, dass sowohl Veränderungen der extrazellulären Kaliumkonzentration, als auch Stimulationen durch Strominjektionen zu einer Sekretion von fluoreszenzmarkiertem BDNF führen können, die in Echtzeit beobachtet werden kann. Bezüglich ihrer Abhängigkeit von synaptischen Inhibitoren sowie dem spannungabhängigen Natriumkanalblocker TTX bestehen jedoch deutliche Unterschiede. Dies weist auf unterschiedliche Sekretionsmechanismen hin, die bei den verschiedenen Protokollen von Bedeutung sind. Diese Mechanismen wurden daher auch bezüglich ihrer Abhängigkeit vom sekundären Messenger cAMP miteinander verglichen.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass cAMP die Sekretion von BDNF modulieren kann. Der Einfluss von cAMP auf diese Sekretion hing jedoch vom Protokoll ab, das für die Induktion der BDNF-Ausschüttung verwendet wurde. Die Sekretion von BDNF nach den o.g. Protokollen, die auf eine Zunahme der extrazellulären Kaliumkonzentration oder gezielte Depolarisationen auf  $-10$  mV basieren, konnten durch eine Veränderung der intrazellulären cAMP-Konzentrationen über ein membranpermeables cAMP-Analogon nicht moduliert werden (vgl. auch Kolarow et al., 2007). Bei einer ebenfalls auf einer starken und langanhaltenden Depolarisation beruhenden Stimulation durch wiederholte Strominjektionen von 900 pA (35 mal vier

Injektionen von 200 Hz im Abstand von 2 s) blieb eine Wirkung von cAMP auf die BDNF-Sekretion ebenfalls aus. Das gleiche Protokoll wurde jedoch auch dann nicht signifikant von cAMP beeinflusst, wenn eine schwächere Stimulation (wenige pA über der Stimulationsschwelle) mit nur 20 Hz verwendet wurde. Da die Menge des sekretierten BDNFs gegenüber anderen verwendeten Protokollen bei dieser Stimulation geringer ausfiel, handelt es sich bei diesem Protokoll um ein unzureichendes Stimulationsprotokoll zur Untersuchung der Ausschüttung von BDNF aus dissoziierten, hippocampalen Neuronen. Wurde die BDNF-Sekretion dagegen durch die repetitive Auslösung von Aktionspotenzialen initiiert, wirkte cAMP je nach Zeitpunkt der Applikation des membranpermeablen Analogons entweder verstärkend (Applikation gleichzeitig mit der Stimulation) oder blockierend (Applikation 100 s vor der Stimulation, s. Abbildung 11).

### 5.3.1. Mechanismen, über die cAMP Einfluss auf die Sekretion von BDNF nehmen kann

Die verwendeten Protokolle wirken, wie oben beschrieben, unterschiedlich auf diverse spannungsabhängige Kanäle. Daher könnte eine cAMP-vermittelte Modulation dieser Kanäle Einfluss auf die BDNF-Sekretion nehmen. An Chromaffinzellen und olfaktorischen Rezeptorneuronen wurde bereits gezeigt, dass cAMP spannungsabhängige Kalziumkanäle durch Phosphorylierung modulieren kann (Carabelli et al., 2001; Marcantoni et al., 2009; Mahapatra et al., 2012; Vandael et al., 2013). Diese Studien zeigten eine verstärkende Wirkung von cAMP auf VGCCs. Zudem wurde bereits gezeigt, dass die BDNF-Sekretion von VGCCs abhängig ist (Balkowiec und Katz, 2002; Kolarow et al., 2007). Kolarow et al. (2007) zeigten außerdem eine Abhängigkeit der BDNF-Sekretion vom Kalziumeinstrom über NMDA-Kanäle, welche nach den Untersuchungen von Llansola et al. (2004) ebenfalls durch cAMP-regulierte Phosphorylierung verändert werden können. Allerdings wurden die Versuche zur Bedeutung von VGCCs und NMDA-Kanälen auf die BDNF-Sekretion von Kolarow et al. (2007) unter Verwendung einer erhöhten extrazellulären Kaliumkonzentration durchgeführt. Gerade bei dieser Form der Initiation der BDNF-Sekretion nimmt cAMP in der vorliegenden Studie jedoch keinen Einfluss. Angesichts dieser Diskrepanz ist es daher unwahrscheinlich, dass cAMP die BDNF-Sekretion über diese Kanäle steuert. Es ist vielmehr wahrscheinlicher, dass cAMP über andere Mechanismen auf die Sekretion von BDNF-EGFP einwirkt. Beispielsweise könnte cAMP die Exozytose faszilitieren oder inhibieren. Für hippocampale Neurone wurde eine Zunahme der exozytosefähigen, präsynaptischen Vesikel durch die cAMP/PKA Signalkaskade gezeigt, die unabhängig von Veränderungen des Kalziumeinstroms in die Neurone war und über die Modulation der Sekretionsmaschinerie wirkte (Trudeau et al., 1996). Ein ähnlicher Einfluss von cAMP könnte

auch in der vorgelegten Arbeit postsynaptisch eine Rolle spielen. Hieraus ließe sich ableiten, dass die Anzahl der exozytierten Vesikel durch cAMP je nach Zeitpunkt der Applikation zu- bzw. abnimmt. Ein solcher Mechanismus ließe sich mit einem ähnlichen Ansatz, wie er in dieser Arbeit verwendet wurde, quantifizieren, indem man mit dem extrazellulären Medium einen Fluoreszenzquencher wie Bromphenolblau appliziert, der die Fluoreszenz der von EGFP unmittelbar nach Öffnen der Vesikel quencht (vgl. Kolarow et al., 2007; Cheng et al., 2011). Die Anzahl der Vesikel, deren Fluoreszenz durch diesen Prozess nach einer Stimulation ausgelöscht wird, ließe sich somit für die unterschiedlichen Versuchsbedingungen ermitteln.

Die unterschiedliche Wirkung, die cAMP bei verschiedenen Protokollen in Bezug auf die BDNF-Sekretion besitzt, gibt jedoch selbst bereits einigen Aufschluss über mögliche Wirkmechanismen. Während der hochfrequenten Auslösung von zurückpropagierenden Aktionspotenzialen war der Applikationszeitpunkt des membranpermeablen cAMP-Analogons von entscheidender Bedeutung für dessen modulatorische Wirkung bei der BDNF-Ausschüttung. Diese Beobachtung weist auf eine zeitabhängige Komponente bezüglich der cAMP-Wirkung im Vergleich zur Stimulation hin, oder auf eine Sensibilität der Neurone bezüglich der genauen cAMP-Konzentration zum Zeitpunkt der Stimulation. Diese Konzentration könnte durch einige der verwendeten Stimulationsprotokolle bereits ohne eine zusätzliche Applikation von cAMP beeinflusst werden. Beispielsweise wurde für diencephale Neurone gezeigt, dass hohe extrazelluläre Kaliumkonzentrationen die intrazelluläre cAMP-Konzentration um mehr als das fünffache erhöhen können (Tolon et al., 2000), während eine LTP-Induktion über eine hochfrequente Auslösung von Aktionspotenzialen in den Experimenten von Chetkovich et al. (1991) nur die 1,5-fache Zunahme der basalen cAMP-Konzentration in CA1-Zellen des Hippokampus verursachte. Falls durch eine Depolarisation über die extrazelluläre Kaliumkonzentration oder über die Patchpipette eine Sättigung des noch unbekanntes, durch cAMP regulierten Mechanismus eintritt, würde eine zusätzliche Applikation von cAMP keinen weiteren Effekt mehr zeigen. Zusätzlich könnten Mechanismen, die auf geringe Veränderungen in der cAMP-Konzentration basieren, in diesem Fall ebenfalls nicht untersucht werden, da die Stimulation bereits stärkere Veränderungen der cAMP-Konzentration verursachen könnte. Die Quantifizierung der cAMP-Level durch den Einsatz von fluoreszierenden Indikatoren für cAMP oder von fluoreszenzmarkierten cAMP-Varianten wie Flamingo2 könnte Aufschluss über die Bedeutung der cAMP-Konzentration bei der Modulation der BDNF-Sekretion geben (Nikolaev et al., 2004; Odaka et al., 2014). Desweiteren könnten cAMP-Indikatoren auch klären, ob erhöhte Kaliumkonzentrationen, repetitive Depolarisationen oder Strominjektionen von 900 pA einen Einfluss auf die cAMP-Konzentration besitzen und daher eine weitere Modulation durch zusätzlich appliziertes cAMP verhindern. Jedoch auch mit der lokalen Perfusionseinrichtung bieten sich Versuche an, um weitere Details bezüglich der Zeit- oder Konzentrationsabhängigkeit der cAMP-Applikation zu klären. Die Va-

riation des Zeitpunkts der cAMP-Applikation könnte Aufschluss darüber geben, in welchen Zeitspannen der verstärkende bzw. verringernde Effekt von cAMP auf die BDNF-Sekretion vermittelt wird. cAMP-Analoga, die eine stärkere Membranpermeabilität aufweisen (beispielsweise 8Br-cAMP-AM)<sup>6</sup> könnten durch den genauen Zeitpunkt ihrer Wirkung im Vergleich zum hier verwendeten Analogon 8Br-cAMP ebenfalls Aufschluss über die Bedeutung der cAMP-Konzentration geben. Wirken die unterschiedlichen Analoga in solchen Versuchen gleich, muss innerhalb der Neurone, ähnlich wie bei der STDP, eine zeitliche Integration stattfinden. Wird jedoch die Blockade der Sekretion mit den membranpermeableren Analoga durch kürzere Applikationszeiten ausgelöst als durch 8Br-cAMP, weist dies auf eine Konzentrationsabhängigkeit der Modulation der BDNF-Sekretion durch cAMP hin. Im Falle einer zeitlichen Abhängigkeit könnten membranpermeable cAMP-Varianten, die durch Lichtpulse aktiviert werden (cAMP *uncaging*), die Bedeutung des genauen Zeitpunkts der cAMP-Zunahme sogar noch genauer eingrenzen als dies über eine lokale Perfusion möglich ist (Hagen et al., 1998; Furuta et al., 2004).

#### 5.4. Abhängigkeit der BDNF-Sekretion von den cAMP-Signalkaskaden

Da sowohl die Wirkungen von cAMP als auch die Regulation der BDNF-Sekretion vielseitig ist, gibt die Signalkaskade, über die cAMP auf die Sekretion wirkt, möglicherweise näheren Aufschluss über die potenziellen Wirkmechanismen. Laut Seino und Shibasaki (2005) gibt es sowohl PKA-abhängige als auch PKA-unabhängige Mechanismen, über die cAMP Einfluss auf Sekretionsprozesse nehmen kann. Daher wurde die Bedeutung der cAMP-Signalkaskaden in der vorliegenden Studie ebenfalls genauer charakterisiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde die BDNF-Sekretion, die durch die repetitive Auslösung von Aktionspotenzialen induziert werden konnte, durch die Applikation eines Inhibitors für die cAMP-Abhängige PKA unterbunden. Dies bedeutet, dass die endogene Aktivierung dieser Kinase für die BDNF-Sekretion durch dieses Protokoll essentiell ist. Diese Untersuchungen sind besonders im Vergleich zur Bedeutung der PKA-Aktivierung bei einer BDNF-Sekretion, die durch die Zunahme des extrazellulären Kaliumgehaltes ausgelöst wurde, interessant. In diesem Fall führte die Blockade der PKA nämlich zu einer Verspätung der Sekretion (Kolarow et al., 2007) um ungefähr 200 - 300 s. Nach einer Studie von Chetkovich et al. (1991) verursacht eine hohe extrazelluläre Kaliumkonzentrationen über die Aktivierung der Adenylatzyklase

<sup>6</sup>Bei dieser Variante des Botenstoffs ist das polare zyklische Phosphat durch eine Acetoxymethylgruppe maskiert.

einen Anstieg von cAMP in CA1-Pyramidenzellen (Chetkovich et al., 1991). Bei einer Zugabe von membranpermeablen 8Br-cAMP in Verbindung mit einer Stimulation, die auf eine Zunahme der extrazellulären Kaliumkonzentration basiert, ist also zu beachten, dass die endogenen cAMP-Level bereits durch die Zugabe von Kalium erhöht werden. Epac besitzt eine geringere Affinität für cAMP als die PKA (Christensen et al., 2003), sodass cAMP zunächst eher an die Kinase bindet. Die durch Kalium verursachte Zunahme der cAMP-Konzentration könnte jedoch eine vermehrte Bindung von cAMP an Epac erleichtern. Falls sowohl PKA als auch Epac in Neuronen eine Sekretion über cAMP faszilitieren (vgl. Seino und Shibasaki 2005, neuroendokrine Zellen), könnte eine verzögerte Aktivierung von Epac, nachdem eine ausreichende cAMP-Konzentration erreicht wurde, letztendlich zu der von Kolarow et al. (2007) beobachteten, verzögerten Sekretion von BDNF während der Blockade der PKA führen. 8Br-cAMP aktiviert beide *downstream*-Faktoren dagegen gleichermaßen, weshalb eine Unterscheidung der Wirkmechanismen von Epac und cAMP über die Applikation von spezifischen Inhibitoren und Aktivatoren für die beiden Signalkaskaden erfolgen muss. In der vorliegenden Studie hatte die Aktivierung von Epac über den spezifischen Aktivator 8-pCPT-2-O-Me-cAMP gleichzeitig mit der Stimulation keinen Einfluss auf die Sekretion von BDNF nach der wiederholten Auslösung von Aktionspotenzialen. Obwohl dies auf eine fehlende Bedeutung von Epac bei dieser Form der BDNF-Sekretion hinweist, wäre es in Bezug auf die o.g. Ergebnisse von Kolarow et al. (2007) interessant zu überprüfen, ob eine direkte Aktivierung von Epac die Inhibition der Sekretion durch die Blockade der PKA aufheben kann. Eine Applikation des Epac-Aktivators vor der Stimulation der Neurone durch repetitive Aktionspotenziale ist ebenfalls von Interesse. Sollte die Epac-Aktivierung unter diesen Versuchsbedingungen zu einer Blockade der Sekretion führen, würde dies auf eine Bedeutung von Epac bei diesem Mechanismus hinweisen. Andererseits würde eine Verstärkung der Sekretion zeigen, dass eine längere oder stärkere Aktivierung von Epac notwendig ist, um die Sekretion zu verstärken.

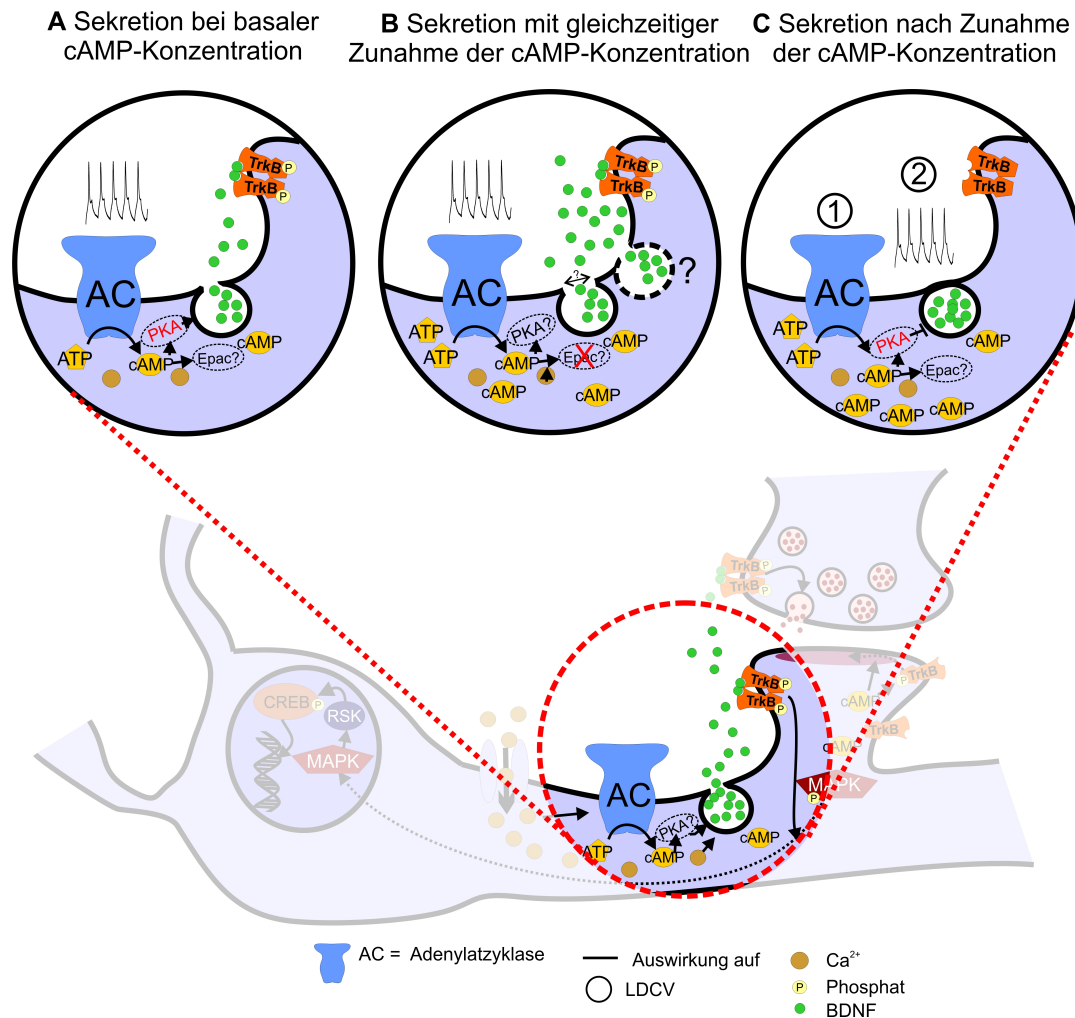
In der vorliegenden Arbeit sollte aber zunächst der Einfluss der PKA auf die Ausschüttung von BDNF getestet werden. Deshalb wurde versucht, die PKA direkt zu aktivieren. Hatakeyama et al. (2007) vermuteten, dass in neuroendokrinen Zellen vor allem die PKA für die Verstärkung der Sekretion von LCDVs verantwortlich ist, während Epac insbesondere synaptische Vesikel beeinflusst. Da BDNF in Neuronen ebenfalls in LDCVs vorliegt (Salio et al., 2007), war es besonders überraschend, dass eine Applikation von Sp8-OH-cAMPs über die Patchpipette eine fast vollständige Blockade der Sekretion von BDNF verursachte. Aufgrund der Applikationsmethode dieses membranimpermeablen Aktivators über die Patchpipette handelt es sich hierbei um eine Applikation vor der Stimulation, da die Zelle direkt nach dem Öffnen und somit schon vor Beginn der Messung mit dem Agonisten gefüllt wird. Eine längere Wartezeit, wie sie auch in diesen Experimenten verwendet wurde, ist jedoch notwendig, um eine Diffusion des Agonisten

in distale Neuriten zu gewährleisten. Dass eine solche Aktivierung der PKA einen ähnlichen Effekt zeigt wie deren Blockade, wurde zuvor nur von Otmakhov und Lisman (2002) gezeigt, bei denen sowohl der Inhibitor Rp-cAMPs als auch SP8-OH-cAMPs eine synaptische Potenzierung an hippocampalen CA1-Neuronen verhindern konnten. Bisher wurde jedoch noch nicht untersucht, ob zwischen der dualen Wirkung der PKA während der LTP bei Otmakhov und Lisman (2002) und dem Neurotrophin BDNF eine Verbindung besteht. Die hier gezeigten Ergebnisse könnten jedoch einen Hinweis auf einen derartigen Zusammenhang liefern.

Zusammenfassend wird deutlich, dass die PKA sowohl die Modulation der synaptischen Plastizität als auch die Sekretion des Neurotrophins BDNF, das für seine Bedeutung bei synaptischen Plastizitätsprozessen bekannt ist, beeinflusst. Sowohl durch die Aktivierung der PKA als auch deren Blockade kann eine Sekretion von BDNF verhindert werden. Welche Signalkaskaden für die Zunahme einer BDNF-Sekretion durch cAMP verantwortlich sind, wenn dessen Konzentration gleichzeitig mit der Stimulation erhöht wird, ist jedoch noch nicht bekannt. Da Epac-Antagonisten bisher noch nicht etabliert wurden, konnte eine mögliche permissive Rolle von Epac bei der Sekretion hier nicht untersucht werden. Für die Sekretion aus nicht-synaptischen Vesikeln wurde bereits von Hatakeyama et al. (2007) vermutet, dass die PKA von besonderer Bedeutung ist, während Epac eher auf synaptische Vesikel wirkt (für eine Übersicht, s. Seino und Shibasaki, 2005). Vor diesem Hintergrund ist es besonders interessant, dass die Aktivierung von Epac durch einen Agonisten bei gleichzeitiger Applikation mit der Stimulation auch in der vorliegenden Studie keinen verstärkenden Effekt besitzt.

## 5.5. Bedeutung der Wirkmechanismen von cAMP für die BDNF-Sekretion

Es ist allgemein bekannt, dass BDNF einen bedeutenden Einfluss auf synaptische Plastizitätsprozesse besitzt. Dieser Einfluss wurde insbesondere in hippocampalem Gewebe untersucht und mehrfach bestätigt, indem beispielsweise die Ausbildung oder Aufrechterhaltung der synaptischen Plastizität durch eine Blockade der BDNF-Signalkaskade verhindert wurde (s. Abschnitt 1.1.4). Mechanismen, welche die Sekretion von BDNF modulieren können, sind daher in Bezug auf synaptische Plastizität besonders interessant. Da auch für cAMP gezeigt wurde, dass es an der Entstehung von synaptischer Plastizität beteiligt ist (s. Abschnitt 1.2.1), ist eine Beteiligung der cAMP-abhängigen BDNF-Sekretion auf die Modulation der LTP möglich. Wie in Abschnitt 1.3.1 beschrieben, kann cAMP beispielsweise auf die TrkB-Rezeptoren der BDNF-Signalkaskade oder die Translokation der MAPK Einfluss nehmen. Mit dem erst kürzlich entdeckten cAMP-



**Abbildung 15 – Schemazeichnung zur möglichen Zusammenwirkung von BDNF und cAMP unter Einbezug der hier gewonnenen Daten** Bezüglich der Wirkung von cAMP auf die BDNF-Sekretion müssen drei verschiedene Situationen unterschieden werden. **A** Die Sekretion von BDNF bei basalen cAMP-Leveln ist kritisch von der PKA abhängig. Der Einfluss von Epac ist noch nicht bekannt. **B** Wird cAMP gleichzeitig mit der Stimulation erhöht oder erreicht eine kritische Konzentration, führt dies zur stärkeren Sekretion von BDNF, entweder durch die Öffnung zusätzlicher Vesikel, oder durch die Erweiterung der Fusionspore bei transienten Fusionsereignissen. Epac scheint in diesem Fall nicht beteiligt zu sein. **C** Wird die cAMP-Konzentration vor der Stimulation erhöht, blockiert cAMP über eine besonders starke oder langanhaltende Aktivierung der PKA die Sekretion von BDNF. Der Einfluss von Epac ist in diesem Fall noch nicht bekannt.

abhängigen Faktor Epac bieten sich zudem neue Möglichkeiten zwischen verschiedenen Funktionen, die durch cAMP vermittelt werden, genauer zu differenzieren. Vorherige Arbeiten zur gemeinsamen Wirkung von BDNF und cAMP gingen davon aus, dass cAMP eine regulierende Rolle auf die BDNF-Wirkung besitzt (s. beispielsweise Boulanger und Poo, 1999; Tartaglia



et al., 2001; Woo et al., 2002; Ji et al., 2005). Die hier vorliegende Arbeit zeigt nun, dass eine solche Regulation über den Einfluss von cAMP auf die Sekretion von BDNF vermittelt werden könnte und entweder eine zeitliche Komponente oder die genaue cAMP-Konzentration in Bezug auf die neuronale Aktivität ein wichtiger Faktor bei dieser Funktion sein könnte (s. Abbildung 15).

Der hier ermittelte duale Mechanismus zum Einfluss von cAMP auf die Sekretion von BDNF aus sekretorischen Granula ist zuvor noch nicht gezeigt worden und bietet viele Möglichkeiten für weitere Untersuchungen, sowohl bezüglich der Sekretionsmechanismen selbst als auch hinsichtlich der beteiligten Signalkaskaden. Beispielsweise bieten sich Untersuchungen zum Einfluss von cAMP auf die Größe von Fusionsporen an, wie von Calejo et al. (2013) bereits an neuroendokrinen Zellen gezeigt werden konnte. Wegen der starken Verzweigung von Neuronen sind die Kapazitätsmessungen aus diesen Untersuchungen jedoch kein adäquates Mittel für die Ermittlung von Fusionsereignissen in Neuronen oder zur Unterscheidung von transienter und vollständiger Fusion. Experimente mit fluoreszenzmarkiertem BDNF in Verbindung mit einem extrazellulär applizierten Fluoreszenzquencher, wie beispielsweise von Kolarow et al. (2007) verwendet, erlauben jedoch die Beobachtung von Fusionsporenöffnungen in Echtzeit.

In weiterführenden Untersuchungen wäre natürlich die physiologische Bedeutung der dualen Modulation der Sekretion durch cAMP besonders interessant. So könnte durch elektrophysiologische Ansätze untersucht werden, ob die cAMP-Applikation, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurde, Veränderungen bei der synaptischen Transmission verursacht, indem beispielsweise postsynaptische Rezeptoren eingebaut werden, was eine Veränderung von spontanen Miniaturströmen zur Folge hätte (vgl. auch Trudeau et al., 1996; Lessmann und Heumann, 1997). Auch Veränderungen in Bezug auf den *Ready Releasable Pool* (RRP) könnten über cAMP-vermittelte Veränderungen der Miniaturströme beobachtet werden (vgl. Hisatomi et al., 1996; Rorsman und Renstrom, 2003).

Von besonderer Bedeutung wären zudem Experimente, welche die Induktion von synaptischer Plastizität in Verbindung mit der cAMP-Applikation bzw. der Sekretion von BDNF-EGFP gleichzeitig untersuchen. Diese Untersuchungen könnten sowohl in dissoziierten Kulturen als auch organotypischen, hippocampalen Schnitten mit Methoden untersucht werden, die in dieser Arbeit teils erstmalig vorgestellt wurden. Da es bisher noch an Möglichkeiten fehlt, endogenes BDNF direkt zu beobachten, sind ähnliche Experimente an akuten Schnitten und Neuronen mit endogener BDNF-Expression derzeit nicht möglich. Virusinfektionen und genetische Manipulation könnten allerdings eine Beobachtung von BDNF-EGFP in akuten Hippokampuschnitten ermöglichen.

Insgesamt bieten die hier vorgestellten Ergebnisse neue Erkenntnisse in das bisher noch unzurei-

chend untersuchte Thema der cAMP-Wirkung auf die Sekretion aus den sekretorischen Granula neuronaler Zellen. Besonders interessant ist, dass unterschiedliche Methoden, die zu einer Sekretion von BDNF führen, unterschiedlichen Mechanismen unterliegen können und experimentelle Details bei Studien zu diesem Thema von besonderer Bedeutung sind. Die Unterschiede weisen auch darauf hin, dass verschiedene physiologische Mechanismen bezüglich der BDNF-Sekretion existieren und die Details bei der Interpretation der Ergebnisse je nach Verhalten der Neurone oder Entwicklung des Gewebes unterschieden werden müssen. In der vorliegenden Studie wurde insbesondere die PKA als bedeutender Faktor bei der cAMP-vermittelten Modulation der BDNF-Sekretion ermittelt. Überraschenderweise scheint sie nicht nur eine permissive Rolle bei der BDNF-Sekretion zu besitzen, sondern kann durch frühzeitige Aktivierung auch blockierend auf die BDNF-Sekretion wirken. Generell ist die Tatsache, dass cAMP sowohl verstärkenden als auch verringernden Einfluss auf die Sekretion von BDNF nehmen kann, eine neue Erkenntnis, die neue Interpretationsansätze bezüglich der Wirkung von cAMP bei synaptischen Plastizitätsprozessen, an denen BDNF beteiligt ist, eröffnet.

## 6. Zusammenfassung

Das Neurotrophin BDNF ist ein wichtiger Modulator im zentralen Nervensystem. Dieses Protein wird aktivitätsabhängig sekretiert und ist an der neuronalen Entwicklung und an synaptischen Plastizitätsprozessen beteiligt. Der sekundäre Botenstoff cAMP ist ein weiterer wichtiger Modulator des zentralen Nervensystems. Während der Einfluss von cAMP auf die Sekretion von Peptiden aus neuroendokrinen Zellen und Neuronen bereits untersucht wurde, ist über dessen Einfluss bei der aktivitätsabhängigen Ausschüttung von BDNF noch wenig bekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Wirkung von cAMP auf die Ausschüttung von fluoreszenzmarkierten BDNF aus dissoziierten hippocampalen Neuronen in Echtzeit untersucht. Mit Hilfe der Kombination aus Lebendzell-Fluoreszenzmikroskopie und elektrophysiologischen Patch-Clamp-Versuchen wurden verschiedene Muster elektrischer Aktivität identifiziert, die eine BDNF-Ausschüttung auslösen konnten. Erhöhte extrazelluläre Kaliumkonzentrationen, repetitive depolarisierende Reize sowie die Generierung repetitiver Aktionspotenziale führten zu einer robusten Sekretion von BDNF aus neuronalen Ausläufern. Die Auslösung der Sekretion durch diese zurückpropagierenden, repetitiven Aktionspotenziale zeigte außerdem eine Abhängigkeit von spannungsabhängigen Natriumkanälen, wie sie für andere Protokolle nicht beobachtet wurde. Zudem konnte die Sekretion von BDNF durch eine Blockade des cAMP-Signalwegs über die Proteinkinase A inhibiert werden. Des Weiteren führte eine externe Applikation von membranpermeablen cAMP zu einer erhöhten Sekretion von BDNF, sofern diese gleichzeitig mit der Initiation der BDNF-Sekretion stattfand. Wurden cAMP oder ein PKA-aktivierendes cAMP-Analogon jedoch vor der Stimulation appliziert, konnte die BDNF-Ausschüttung blockiert werden. Eine Antikörperfärbung mit dem dendritischen Marker MAP2 zeigte, dass BDNF-EGFP vor allem in somatischen und dendritischen Strukturen lokalisiert war. Eine zusätzliche Analyse der Sekretion an den apikalen Dendriten organotypischer hippocampaler Schnittkulturen, bei denen einzelne CA1-Neurone mittels juxtazellulärer Einzelzellelektroporation mit BDNF-EGFP transfiziert worden waren, bestätigte eine mögliche Lokalisation des Proteins in dendritischen Strukturen.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit, dass cAMP, ähnlich wie bei neuroendokrinen Zellen, modulierend auf die Sekretion von Proteinen wie BDNF aus sekretorischen Granula spielt. Abhängig vom Applikationszeitpunkt kann der sekundäre Botenstoff die BDNF-Sekretion entweder verstärken oder unterbinden. Da die BDNF-Sekretion bei der Entwicklung von synaptischer Plastizität beteiligt ist, könnte der modulatorische Effekt von cAMP auf diesen Mechanismus einen Einfluss auf BDNF-vermittelte synaptische Plastizität nehmen.

## 7. Abstract

The neurotrophin BDNF is an important modulator in the central nervous system. This protein is secreted in an activity-dependent fashion and plays an important role during neuronal development and synaptic plasticity. The secondary messenger cAMP is another important modulator of the central nervous system. While the influence of cAMP on the secretion of peptides from neuroendocrine cells and from neurons has been studied, not much is known concerning its influence on the activity-dependent secretion of BDNF.

In this study, the effect of cAMP on the secretion of fluorescence-tagged BDNF from dissociated hippocampal neurons was analyzed in real time. By combining fluorescence-imaging and electrophysiological patch-clamp recordings several patterns of electric activity which could trigger the release of BDNF were identified. High extracellular potassium concentrations, repetitive depolarizing stimulations or the generation of repetitive backpropagating action potentials lead to a robust secretion of BDNF from neuronal processes. The initiation of the secretion from these backpropagating, repetitive action potentials was also dependent on voltage-gated sodium channels, which has not been observed for the other protocols. In addition, blocking the cAMP-signaling cascade via protein kinase A inhibited the secretion of BDNF. Further, the external application of membrane permeable cAMP lead to an increased secretion of BDNF, if it was initiated at the same time as the stimulation. The addition of cAMP or a PKA-activating cAMP-analagon before the stimulation blocked the secretion of BDNF. An antibody-staining with the dendritic marker MAP2 showed that BDNF-EGFP was primarily localized in somatic and dendritic structures. An additional analysis of the secretion of BDNF-EGFP from organotypic hippocampal slice cultures, in which single CA1-neurons had been transfected with BDNF-EGFP by juxtacellular single cell electroporation, confirmed a possible localization of the protein in dendritic structures.

Altogether, this study shows that cAMP, similar to its effects in neuroendocrine cells, plays an important, modulatory role during the secretion of proteins like BDNF from LDCVs. Depending on the time point of application, the secondary messenger can either strengthen or abolish the secretion of BDNF. Because the secretion of BDNF takes part in the development of synaptic plasticity, a modulatory role of cAMP on this process could influence BDNF-mediated synaptic plasticity.

---

## 8. Literatur

- Agnihotri, N., Kisaalita, W. S., und Keith, C. H. Free cyclic AMP increases in PC12 cells on depolarization. *J. Neurosci. Res.*, 47(5):555–560, Mar 1997.
- Aicardi, G., Argilli, E., Cappello, S., Santi, S., Riccio, M., Thoenen, H., und Canossa, M. Induction of long-term potentiation and depression is reflected by corresponding changes in secretion of endogenous brain-derived neurotrophic factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101(44):15788–15792, Nov 2004.
- Allen, S. J., Watson, J. J., Shoemark, D. K., Barua, N. U., und Patel, N. K. GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. *Pharmacol. Ther.*, 138(2):155–175, May 2013.
- An, J. J., Gharami, K., Liao, G. Y., Woo, N. H., Lau, A. G., Vanevski, F., Torre, E. R., Jones, K. R., Feng, Y., Lu, B., und Xu, B. Distinct role of long 3' UTR BDNF mRNA in spine morphology and synaptic plasticity in hippocampal neurons. *Cell*, 134(1):175–187, Jul 2008.
- Andreska, T., Aufmkolk, S., Sauer, M., und Blum, R. High abundance of BDNF within glutamatergic presynapses of cultured hippocampal neurons. *Front Cell Neurosci*, 8:107, 2014.
- Antoni, F. A. Molecular diversity of cyclic AMP signalling. *Front Neuroendocrinol*, 21(2): 103–132, Apr 2000.
- Antoni, F. A. New paradigms in cAMP signalling. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 353(1-2):3–9, Apr 2012.
- Aoki, C., Wu, K., Elste, A., Len, G. w., Lin, S. y., McAuliffe, G., und Black, I. B. Localization of brain-derived neurotrophic factor and TrkB receptors to postsynaptic densities of adult rat cerebral cortex. *J. Neurosci. Res.*, 59(3):454–463, Feb 2000.
- Babu, H., Ramirez-Rodriguez, G., Fabel, K., Bischofberger, J., und Kempermann, G. Synaptic Network Activity Induces Neuronal Differentiation of Adult Hippocampal Precursor Cells through BDNF Signaling. *Front Neurosci*, 3:49, 2009.
- Balkowiec, A. und Katz, D. M. Activity-dependent release of endogenous brain-derived neurotrophic factor from primary sensory neurons detected by ELISA in situ. *J. Neurosci.*, 20(19):7417–7423, Oct 2000.
- Balkowiec, A. und Katz, D. M. Cellular mechanisms regulating activity-dependent release of native brain-derived neurotrophic factor from hippocampal neurons. *J. Neurosci.*, 22(23): 10399–10407, Dec 2002.
- Barde, Y. A., Edgar, D., und Thoenen, H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.*, 1(5):549–553, 1982.
- Barker, P. A. Whither proBDNF? *Nat. Neurosci.*, 12(2):105–106, Feb 2009.

- 
- Bekinschtein, P., Cammarota, M., Izquierdo, I., und Medina, J. H. BDNF and memory formation and storage. *Neuroscientist*, 14(2):147–156, Apr 2008.
- Bekinschtein, P., Cammarota, M., und Medina, J. H. BDNF and memory processing. *Neuropharmacology*, 76 Pt C:677–683, Jan 2014.
- Ben-Ari, Y. Developing networks play a similar melody. *Trends Neurosci.*, 24(6):353–360, Jun 2001.
- Benninger, C., Kadis, J., und Prince, D. A. Extracellular calcium and potassium changes in hippocampal slices. *Brain Res.*, 187(1):165–182, Apr 1980.
- Bergami, M., Santi, S., Formaggio, E., Cagnoli, C., Verderio, C., Blum, R., Berninger, B., Matteoli, M., und Canossa, M. Uptake and recycling of pro-BDNF for transmitter-induced secretion by cortical astrocytes. *J. Cell Biol.*, 183(2):213–221, Oct 2008.
- Biffi, E., Menegon, A., Piraino, F., Pedrocchi, A., Fiore, G. B., und Rasponi, M. Validation of long-term primary neuronal cultures and network activity through the integration of reversibly bonded microbio reactors and MEA substrates. *Biotechnol. Bioeng.*, 109(1):166–175, Jan 2012.
- Binder, D. K. und Scharfman, H. E. Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors*, 22(3):123–131, Sep 2004.
- Blitzer, R. D., Wong, T., Nouranifar, R., Iyengar, R., und Landau, E. M. Postsynaptic cAMP pathway gates early LTP in hippocampal CA1 region. *Neuron*, 15(6):1403–1414, Dec 1995.
- Bothwell, M. Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors. *Annu. Rev. Neurosci.*, 18:223–253, 1995.
- Boulanger, L. und Poo, M. M. Gating of BDNF-induced synaptic potentiation by cAMP. *Science*, 284(5422):1982–1984, Jun 1999.
- Boulanger, L. M., Boulanger, L., und Poo, M. M. Presynaptic depolarization facilitates neurotrophin-induced synaptic potentiation. *Nat. Neurosci.*, 2(4):346–351, Apr 1999.
- Boyett, J. und Associates. Surviving the destructive narcissistic leader. *Administrative Science Quarterly (zitiert durch \*)*, 48(5):9–17, 2006.
- Brandon, E. P., Zhuo, M., Huang, Y. Y., Qi, M., Gerhold, K. A., Burton, K. A., Kandel, E. R., McKnight, G. S., und Idzerda, R. L. Hippocampal long-term depression and depotentiation are defective in mice carrying a targeted disruption of the gene encoding the RI beta subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92(19):8851–8855, Sep 1995.
- Brigadski, T., Hartmann, M., und Lessmann, V. Differential vesicular targeting and time course of synaptic secretion of the mammalian neurotrophins. *J. Neurosci.*, 25(33):7601–7614, Aug 2005.

- 
- Brunelli, M., Castellucci, V., und Kandel, E. R. Synaptic facilitation and behavioral sensitization in Aplysia: possible role of serotonin and cyclic AMP. *Science*, 194(4270):1178–1181, Dec 1976.
- Calejo, A. I., Jorgacevski, J., Kucka, M., Kreft, M., Goncalves, P. P., Stojilkovic, S. S., und Zorec, R. cAMP-mediated stabilization of fusion pores in cultured rat pituitary lactotrophs. *J. Neurosci.*, 33(18):8068–8078, May 2013.
- Canossa, M., Griesbeck, O., Berninger, B., Campana, G., Kolbeck, R., und Thoenen, H. Neurotrophin release by neurotrophins: implications for activity-dependent neuronal plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94(24):13279–13286, Nov 1997.
- Canossa, M., Giordano, E., Cappello, S., Guarnieri, C., und Ferri, S. Nitric oxide down-regulates brain-derived neurotrophic factor secretion in cultured hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99(5):3282–3287, Mar 2002.
- Capsoni, S., Tongiorgi, E., Cattaneo, A., und Domenici, L. Differential regulation of brain-derived neurotrophic factor messenger RNA cellular expression in the adult rat visual cortex. *Neuroscience*, 93(3):1033–1040, 1999.
- Carabelli, V., Hernandez-Guijo, J. M., Baldelli, P., und Carbone, E. Direct autocrine inhibition and cAMP-dependent potentiation of single L-type Ca<sup>2+</sup> channels in bovine chromaffin cells. *J. Physiol. (Lond.)*, 532(Pt 1):73–90, Apr 2001.
- Carvalho, A. L., Caldeira, M. V., Santos, S. D., und Duarte, C. B. Role of the brain-derived neurotrophic factor at glutamatergic synapses. *Br. J. Pharmacol.*, 153 Suppl 1:S310–324, Mar 2008.
- Castellucci, V. F., Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Wilson, F. D., Nairn, A. C., und Greengard, P. Intracellular injection of the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase simulates facilitation of transmitter release underlying behavioral sensitization in Aplysia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77(12):7492–7496, Dec 1980.
- Cellerino, A., Maffei, L., und Domenici, L. The distribution of brain-derived neurotrophic factor and its receptor trkB in parvalbumin-containing neurons of the rat visual cortex. *Eur. J. Neurosci.*, 8(6):1190–1197, Jun 1996.
- Chao, M. V. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat. Rev. Neurosci.*, 4(4):299–309, Apr 2003.
- Charles, M. A., Fanska, R., Schmid, F. G., Forsham, P. H., und Grodsky, G. M. Adenosine 3',5'-monophosphate in pancreatic islets: glucose-induced insulin release. *Science*, 179(4073):569–571, Feb 1973.
- Chavez-Noriega, L. E. und Stevens, C. F. Modulation of synaptic efficacy in field CA1 of the rat hippocampus by forskolin. *Brain Res.*, 574(1-2):85–92, Mar 1992.

- 
- Chavis, P., Mollard, P., Bockaert, J., und Manzoni, O. Visualization of cyclic AMP-regulated presynaptic activity at cerebellar granule cells. *Neuron*, 20(4):773–781, Apr 1998.
- Chen, C. und Regehr, W. G. The mechanism of cAMP-mediated enhancement at a cerebellar synapse. *J. Neurosci.*, 17(22):8687–8694, Nov 1997.
- Chen, G., Kolbeck, R., Barde, Y. A., Bonhoeffer, T., und Kossel, A. Relative contribution of endogenous neurotrophins in hippocampal long-term potentiation. *J. Neurosci.*, 19(18):7983–7990, Sep 1999.
- Chen, Z. Y., Ieraci, A., Teng, H., Dall, H., Meng, C. X., Herrera, D. G., Nykjaer, A., Hempstead, B. L., und Lee, F. S. Sortilin controls intracellular sorting of brain-derived neurotrophic factor to the regulated secretory pathway. *J. Neurosci.*, 25(26):6156–6166, Jun 2005.
- Cheng, P. L., Song, A. H., Wong, Y. H., Wang, S., Zhang, X., und Poo, M. M. Self-amplifying autocrine actions of BDNF in axon development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 108(45):18430–18435, Nov 2011.
- Cherubini, E., Griguoli, M., Safiulina, V., und Lagostena, L. The depolarizing action of GABA controls early network activity in the developing hippocampus. *Mol. Neurobiol.*, 43(2):97–106, Apr 2011.
- Chetkovich, D. M., Gray, R., Johnston, D., und Sweatt, J. D. N-methyl-D-aspartate receptor activation increases cAMP levels and voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel activity in area CA1 of hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88(15):6467–6471, Aug 1991.
- Christensen, A. E., Selheim, F., de Rooij, J., Dremier, S., Schwede, F., Dao, K. K., Martinez, A., Maenhaut, C., Bos, J. L., Genieser, H. G., und D'skeland, S. O. cAMP analog mapping of Epac1 and cAMP kinase. Discriminating analogs demonstrate that Epac and cAMP kinase act synergistically to promote PC-12 cell neurite extension. *J. Biol. Chem.*, 278(37):35394–35402, Sep 2003.
- Cochilla, A. J., Angleson, J. K., und Betz, W. J. Differential regulation of granule-to-granule and granule-to-plasma membrane fusion during secretion from rat pituitary lactotrophs. *J. Cell Biol.*, 150(4):839–848, Aug 2000.
- Cohen, D., Segal, M., und Reiner, O. Doublecortin supports the development of dendritic arbors in primary hippocampal neurons. *Dev. Neurosci.*, 30(1-3):187–199, 2008.
- Cohen, S., Levi-Montalcini, R., und Hamburger, V. A NERVE GROWTH-STIMULATING FACTOR ISOLATED FROM SARCOM AS 37 AND 180. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 40(10):1014–1018, Oct 1954.
- Conner, J. M., Lauterborn, J. C., Yan, Q., Gall, C. M., und Varon, S. Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport. *J. Neurosci.*, 17(7):2295–2313, Apr 1997.



- Cullen, D. K., Gilroy, M. E., Irons, H. R., und Laplaca, M. C. Synapse-to-neuron ratio is inversely related to neuronal density in mature neuronal cultures. *Brain Res.*, 1359:44–55, Nov 2010.
- Daniel. *Einzellzelltransfektion in organotypischen Schnittkulturen und die Bedeutung von BDNF bei Prozessen der synaptischen Transmission und Plastizität.* dissertation, Otto-von-Guericke Universität, Magdeburg, 2014.
- Daniel, J., Polder, H. R., Lessmann, V., und Brigadski, T. Single-cell juxtacellular transfection and recording technique. *Pflugers Arch.*, 465(11):1637–1649, Nov 2013.
- Davies, A. M. Neurotrophins: neurotrophic modulation of neurite growth. *Curr. Biol.*, 10(5): 198–200, Mar 2000.
- de Wit, J., Toonen, R. F., und Verhage, M. Matrix-dependent local retention of secretory vesicle cargo in cortical neurons. *J. Neurosci.*, 29(1):23–37, Jan 2009.
- Dean, C., Liu, H., Dunning, F. M., Chang, P. Y., Jackson, M. B., und Chapman, E. R. Synaptotagmin-IV modulates synaptic function and long-term potentiation by regulating BDNF release. *Nat. Neurosci.*, 12(6):767–776, Jun 2009.
- Deisseroth, K., Bitto, H., und Tsien, R. W. Signaling from synapse to nucleus: postsynaptic CREB phosphorylation during multiple forms of hippocampal synaptic plasticity. *Neuron*, 16(1):89–101, Jan 1996.
- Di Virgilio, F., Milani, D., Leon, A., Meldolesi, J., und Pozzan, T. Voltage-dependent activation and inactivation of calcium channels in PC12 cells. Correlation with neurotransmitter release. *J. Biol. Chem.*, 262(19):9189–9195, Jul 1987.
- Dieni, S., Matsumoto, T., Dekkers, M., Rauskolb, S., Ionescu, M. S., Deogracias, R., Gundelfinger, E. D., Kojima, M., Nestel, S., Frotscher, M., und Barde, Y. A. BDNF and its pro-peptide are stored in presynaptic dense core vesicles in brain neurons. *J. Cell Biol.*, 196(6):775–788, Mar 2012.
- Dolensek, J., Skelin, M., und Rupnik, M. S. Calcium dependencies of regulated exocytosis in different endocrine cells. *Physiol Res*, 60 Suppl 1:29–38, 2011.
- Dugich-Djordjevic, M. M., Peterson, C., Isono, F., Ohsawa, F., Widmer, H. R., Denton, T. L., Bennett, G. L., und Hefti, F. Immunohistochemical visualization of brain-derived neurotrophic factor in the rat brain. *Eur. J. Neurosci.*, 7(9):1831–1839, Sep 1995.
- Ebadi, M., Bashir, R. M., Heidrick, M. L., Hamada, F. M., Refaey, H. E., Hamed, A., Helal, G., Baxi, M. D., Cerutis, D. R., und Lassi, N. K. Neurotrophins and their receptors in nerve injury and repair. *Neurochem. Int.*, 30(4-5):347–374, 1997.
- Edelmann, E. und Lessmann, V. Dopamine regulates intrinsic excitability thereby gating successful induction of spike timing-dependent plasticity in CA1 of the hippocampus. *Front Neurosci*, 7:25, 2013.

- 
- Edelmann, E., Lessmann, V., und Brigadski, T. Pre- and postsynaptic twists in BDNF secretion and action in synaptic plasticity. *Neuropharmacology*, 76 Pt C:610–627, Jan 2014.
- Edelmann, E., Cepeda-Prado, E., Franck, M., Lichtenecker, P., Brigadski, T., und Lessmann, V. Theta Burst Firing Recruits BDNF Release and Signaling in Postsynaptic CA1 Neurons in Spike-Timing-Dependent LTP. *Neuron*, 86(4):1041–1054, May 2015.
- Egan, M. F., Kojima, M., Callicott, J. H., Goldberg, T. E., Kolachana, B. S., Bertolino, A., Zaitsev, E., Gold, B., Goldman, D., Dean, M., Lu, B., und Weinberger, D. R. The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell*, 112(2):257–269, Jan 2003.
- Eliasson, L., Ma, X., Renstrom, E., Barg, S., Berggren, P. O., Galvanovskis, J., Gromada, J., Jing, X., Lundquist, I., Salehi, A., Sewing, S., und Rorsman, P. SUR1 regulates PKA-independent cAMP-induced granule priming in mouse pancreatic B-cells. *J. Gen. Physiol.*, 121(3):181–197, Mar 2003.
- Endres, T. und Lessmann, V. Age-dependent deficits in fear learning in heterozygous BDNF knock-out mice. *Learn. Mem.*, 19(12):561–570, 2012.
- Fertziger, A. P. und Ranck, J. B. Potassium accumulation in interstitial space during epileptiform seizures. *Exp. Neurol.*, 26(3):571–585, Mar 1970.
- Figurov, A., Pozzo-Miller, L. D., Olafsson, P., Wang, T., und Lu, B. Regulation of synaptic responses to high-frequency stimulation and LTP by neurotrophins in the hippocampus. *Nature*, 381(6584):706–709, Jun 1996.
- Fiorentino, H., Kuczewski, N., Diabira, D., Ferrand, N., Pangalos, M. N., Porcher, C., und Gaiarsa, J. L. GABA(B) receptor activation triggers BDNF release and promotes the maturation of GABAergic synapses. *J. Neurosci.*, 29(37):11650–11661, Sep 2009.
- Fisher, R. S., Pedley, T. A., Moody, W. J., und Prince, D. A. The role of extracellular potassium in hippocampal epilepsy. *Arch. Neurol.*, 33(2):76–83, Feb 1976.
- Frey, U., Huang, Y. Y., und Kandel, E. R. Effects of cAMP simulate a late stage of LTP in hippocampal CA1 neurons. *Science*, 260(5114):1661–1664, Jun 1993.
- Fujimoto, K., Shibasaki, T., Yokoi, N., Kashima, Y., Matsumoto, M., Sasaki, T., Tajima, N., Iwanaga, T., und Seino, S. Piccolo, a Ca<sup>2+</sup> sensor in pancreatic beta-cells. Involvement of cAMP-GEFII.Rim2. Piccolo complex in cAMP-dependent exocytosis. *J. Biol. Chem.*, 277(52):50497–50502, Dec 2002.
- Fukuchi, M., Tabuchi, A., und Tsuda, M. Transcriptional regulation of neuronal genes and its effect on neural functions: cumulative mRNA expression of PACAP and BDNF genes controlled by calcium and cAMP signals in neurons. *J. Pharmacol. Sci.*, 98(3):212–218, Jul 2005.

- Furuta, T., Takeuchi, H., Isozaki, M., Takahashi, Y., Kanehara, M., Sugimoto, M., Watanabe, T., Noguchi, K., Dore, T. M., Kurahashi, T., Iwamura, M., und Tsien, R. Y. Bhc-cNMPs as either water-soluble or membrane-permeant photoreleasable cyclic nucleotides for both one- and two-photon excitation. *Chembiochem*, 5(8):1119–1128, Aug 2004.
- Gaiddon, C., Loeffler, J. P., und Larmer, Y. Brain-derived neurotrophic factor stimulates AP-1 and cyclic AMP-responsive element dependent transcriptional activity in central nervous system neurons. *J. Neurochem.*, 66(6):2279–2286, Jun 1996.
- Gelinas, J. N., Banko, J. L., Peters, M. M., Klann, E., Weeber, E. J., und Nguyen, P. V. Activation of exchange protein activated by cyclic-AMP enhances long-lasting synaptic potentiation in the hippocampus. *Learn. Mem.*, 15(6):403–411, Jun 2008.
- Gonzalez-Iglesias, A. E., Jiang, Y., Tomic, M., Kretschmannova, K., Andric, S. A., Zemkova, H., und Stojilkovic, S. S. Dependence of electrical activity and calcium influx-controlled prolactin release on adenylyl cyclase signaling pathway in pituitary lactotrophs. *Mol. Endocrinol.*, 20(9):2231–2246, Sep 2006.
- Goodman, L. J., Valverde, J., Lim, F., Geschwind, M. D., Federoff, H. J., Geller, A. I., und Hefti, F. Regulated release and polarized localization of brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons. *Mol. Cell. Neurosci.*, 7(3):222–238, Mar 1996.
- Gorski, J. A., Balogh, S. A., Wehner, J. M., und Jones, K. R. Learning deficits in forebrain-restricted brain-derived neurotrophic factor mutant mice. *Neuroscience*, 121(2):341–354, 2003.
- Gottmann, K., Mittmann, T., und Lessmann, V. BDNF signaling in the formation, maturation and plasticity of glutamatergic and GABAergic synapses. *Exp Brain Res*, 199(3-4):203–234, Dec 2009.
- Griesbeck, O., Canossa, M., Campana, G., Gartner, A., Hoener, M. C., Nawa, H., Kolbeck, R., und Thoenen, H. Are there differences between the secretion characteristics of NGF and BDNF? Implications for the modulatory role of neurotrophins in activity-dependent neuronal plasticity. *Microsc. Res. Tech.*, 45(4-5):262–275, 1999.
- Gärtner, A. und Staiger, V. Neurotrophin secretion from hippocampal neurons evoked by long-term-potential-inducing electrical stimulation patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99(9):6386–6391, Apr 2002.
- Hagen, V., Dzeja, C., Bendig, J., Baeger, I., und Kaupp, U. B. Novel caged compounds of hydrolysis-resistant 8-Br-cAMP and 8-Br-cGMP: photolabile NPE esters. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.*, 42(1):71–78, Jan 1998.
- Hallböök, F., Ibanez, C. F., und Persson, H. Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron*, 6(5):845–858, May 1991.

- 
- Hanahan, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, 166 (4):557–580, Jun 1983.
- Hanna, S. T., Pigeau, G. M., Galvanovskis, J., Clark, A., Rorsman, P., und MacDonald, P. E. Kiss-and-run exocytosis and fusion pores of secretory vesicles in human beta-cells. *Pflugers Arch.*, 457(6):1343–1350, Apr 2009.
- Hartmann, M., Heumann, R., und Lessmann, V. Synaptic secretion of BDNF after high-frequency stimulation of glutamatergic synapses. *EMBO J.*, 20(21):5887–5897, Nov 2001.
- Hatakeyama, H., Takahashi, N., Kishimoto, T., Nemoto, T., und Kasai, H. Two cAMP-dependent pathways differentially regulate exocytosis of large dense-core and small vesicles in mouse beta-cells. *J. Physiol. (Lond.)*, 582(Pt 3):1087–1098, Aug 2007.
- Haubensak, W., Narz, F., Heumann, R., und Lessmann, V. BDNF-GFP containing secretory granules are localized in the vicinity of synaptic junctions of cultured cortical neurons. *J. Cell. Sci.*, 111 ( Pt 11):1483–1493, Jun 1998.
- Heymach, J. V., Kruttgen, A., Suter, U., und Shooter, E. M. The regulated secretion and vectorial targeting of neurotrophins in neuroendocrine and epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, 271(41):25430–25437, Oct 1996.
- Hisatomi, M., Hidaka, H., und Niki, I.  $Ca^{2+}$ /calmodulin and cyclic 3,5' adenosine monophosphate control movement of secretory granules through protein phosphorylation/dephosphorylation in the pancreatic beta-cell. *Endocrinology*, 137(11):4644–4649, Nov 1996.
- Huang, E. J. und Reichardt, L. F. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu. Rev. Neurosci.*, 24:677–736, 2001.
- Huang, E. J. und Reichardt, L. F. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.*, 72:609–642, 2003.
- Huang, Y. Y. und Kandel, E. R. Recruitment of long-lasting and protein kinase A-dependent long-term potentiation in the CA1 region of hippocampus requires repeated tetanization. *Learn. Mem.*, 1(1):74–82, 1994.
- Huang, Y. Y., Li, X. C., und Kandel, E. R. cAMP contributes to mossy fiber LTP by initiating both a covalently mediated early phase and macromolecular synthesis-dependent late phase. *Cell*, 79(1):69–79, Oct 1994.
- Ip, N. Y., Ibanez, C. F., Nye, S. H., McClain, J., Jones, P. F., Gies, D. R., Belluscio, L., Le Beau, M. M., Espinosa, R., und Squinto, S. P. Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89 (7):3060–3064, Apr 1992.
- Ivenshitz, M. und Segal, M. Neuronal density determines network connectivity and spontaneous activity in cultured hippocampus. *J. Neurophysiol.*, 104(2):1052–1060, Aug 2010.

- 
- Jensen, M. S. und Yaari, Y. Role of intrinsic burst firing, potassium accumulation, and electrical coupling in the elevated potassium model of hippocampal epilepsy. *J. Neurophysiol.*, 77(3): 1224–1233, Mar 1997.
- Jensen, M. S., Azouz, R., und Yaari, Y. Variant firing patterns in rat hippocampal pyramidal cells modulated by extracellular potassium. *J. Neurophysiol.*, 71(3):831–839, Mar 1994.
- Ji, Y., Pang, P. T., Feng, L., und Lu, B. Cyclic AMP controls BDNF-induced TrkB phosphorylation and dendritic spine formation in mature hippocampal neurons. *Nat. Neurosci.*, 8(2):164–172, Feb 2005.
- Kandel, E. R. und Schwartz, J. H. Molecular biology of learning: modulation of transmitter release. *Science*, 218(4571):433–443, Oct 1982.
- Kaneko, M. und Takahashi, T. Presynaptic mechanism underlying cAMP-dependent synaptic potentiation. *J. Neurosci.*, 24(22):5202–5208, Jun 2004.
- Kang, G., Chepurny, O. G., und Holz, G. G. cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factor II (Epac2) mediates Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release in INS-1 pancreatic beta-cells. *J. Physiol. (Lond.)*, 536(Pt 2):375–385, Oct 2001.
- Kang, H., Welcher, A. A., Shelton, D., und Schuman, E. M. Neurotrophins and time: different roles for TrkB signaling in hippocampal long-term potentiation. *Neuron*, 19(3):653–664, Sep 1997.
- Kaplan, D. R. und Miller, F. D. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 10(3):381–391, Jun 2000.
- Kaplan, D. R., Martin-Zanca, D., und Parada, L. F. Tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of the trk proto-oncogene product induced by NGF. *Nature*, 350(6314):158–160, Mar 1991.
- Kashima, Y., Miki, T., Shibasaki, T., Ozaki, N., Miyazaki, M., Yano, H., und Seino, S. Critical role of cAMP-GEFII–Rim2 complex in incretin-potentiated insulin secretion. *J. Biol. Chem.*, 276(49):46046–46053, Dec 2001.
- Katoh-Semba, R., Takeuchi, I. K., Semba, R., und Kato, K. Distribution of brain-derived neurotrophic factor in rats and its changes with development in the brain. *J. Neurochem.*, 69(1):34–42, Jul 1997.
- Klein, M. Differential cyclic AMP dependence of facilitation at Aplysia sensorimotor synapses as a function of prior stimulation: augmentation versus restoration of transmitter release. *J. Neurosci.*, 13(9):3793–3801, Sep 1993.
- Klein, R., Lamballe, F., Bryant, S., und Barbacid, M. The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for neurotrophin-4. *Neuron*, 8(5):947–956, May 1992.

- 
- Knipper, M., Beck, A., Rylett, J., und Breer, H. Neurotrophin induced second messenger responses in rat brain synaptosomes. *Neuroreport*, 4(5):483–486, May 1993a.
- Knipper, M., Beck, A., Rylett, J., und Breer, H. Neurotrophin induced second messenger responses in rat brain synaptosomes. *Neuroreport*, 4(5):483–486, May 1993b.
- Kohara, K., Kitamura, A., Morishima, M., und Tsumoto, T. Activity-dependent transfer of brain-derived neurotrophic factor to postsynaptic neurons. *Science*, 291(5512):2419–2423, Mar 2001.
- Kojima, M., Takei, N., Numakawa, T., Ishikawa, Y., Suzuki, S., Matsumoto, T., Katoh-Semba, R., Nawa, H., und Hatanaka, H. Biological characterization and optical imaging of brain-derived neurotrophic factor-green fluorescent protein suggest an activity-dependent local release of brain-derived neurotrophic factor in neurites of cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci. Res.*, 64(1):1–10, Apr 2001.
- Kolarow, R., Brigadski, T., und Lessmann, V. Postsynaptic secretion of BDNF and NT-3 from hippocampal neurons depends on calcium calmodulin kinase II signaling and proceeds via delayed fusion pore opening. *J. Neurosci.*, 27(39):10350–10364, Sep 2007.
- Kolbeck, R., Bartke, I., Eberle, W., und Barde, Y. A. Brain-derived neurotrophic factor levels in the nervous system of wild-type and neurotrophin gene mutant mice. *J. Neurochem.*, 72(5):1930–1938, May 1999.
- Korn, S. J., Giacchino, J. L., Chamberlin, N. L., und Dingledine, R. Epileptiform burst activity induced by potassium in the hippocampus and its regulation by GABA-mediated inhibition. *J. Neurophysiol.*, 57(1):325–340, Jan 1987.
- Korte, M., Carroll, P., Wolf, E., Brem, G., Thoenen, H., und Bonhoeffer, T. Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92(19):8856–8860, Sep 1995.
- Korte, M., Griesbeck, O., Gravel, C., Carroll, P., Staiger, V., Thoenen, H., und Bonhoeffer, T. 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(22):12547–12552, Oct 1996.
- Korte, M., Kang, H., Bonhoeffer, T., und Schuman, E. A role for BDNF in the late-phase of hippocampal long-term potentiation. *Neuropharmacology*, 37(4-5):553–559, 1998.
- Krnjevic, K., Morris, M. E., und Reiffenstein, R. J. Stimulation-evoked changes in extracellular  $K^+$  and  $Ca^{2+}$  in pyramidal layers of the rat's hippocampus. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 60(12):1643–1657, Dec 1982.
- Kucharz, K., Wieloch, T., und Toresson, H. Potassium-induced structural changes of the endoplasmic reticulum in pyramidal neurons in murine organotypic hippocampal slices. *J. Neurosci. Res.*, 89(8):1150–1159, Aug 2011.

- 
- Kuczewski, N., Porcher, C., Ferrand, N., Fiorentino, H., Pellegrino, C., Kolarow, R., Lessmann, V., Medina, I., und Gaiarsa, J. L. Backpropagating action potentials trigger dendritic release of BDNF during spontaneous network activity. *J. Neurosci.*, 28(27):7013–7023, Jul 2008.
- Kuczewski, N., Porcher, C., und Gaiarsa, J. L. Activity-dependent dendritic secretion of brain-derived neurotrophic factor modulates synaptic plasticity. *Eur. J. Neurosci.*, 32(8):1239–1244, Oct 2010.
- Kuromi, H. und Kidokoro, Y. Tetanic stimulation recruits vesicles from reserve pool via a cAMP-mediated process in *Drosophila* synapses. *Neuron*, 27(1):133–143, Jul 2000.
- Kuromi, H. und Kidokoro, Y. Two synaptic vesicle pools, vesicle recruitment and replenishment of pools at the *Drosophila* neuromuscular junction. *J. Neurocytol.*, 32(5-8):551–565, 2003.
- Lamballe, F., Klein, R., und Barbacid, M. trkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell*, 66(5):967–979, Sep 1991.
- Lau, A. G., Irier, H. A., Gu, J., Tian, D., Ku, L., Liu, G., Xia, M., Fritsch, B., Zheng, J. Q., Dingledine, R., Xu, B., Lu, B., und Feng, Y. Distinct 3'UTRs differentially regulate activity-dependent translation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 107(36):15945–15950, Sep 2010.
- Leal, G., Afonso, P. M., Salazar, I. L., und Duarte, C. B. Regulation of hippocampal synaptic plasticity by BDNF. *Brain Res.*, Oct 2014a.
- Leal, G., Comprido, D., und Duarte, C. B. BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity. *Neuropharmacology*, 76 Pt C:639–656, Jan 2014b.
- LeBeau, F. E., Towers, S. K., Traub, R. D., Whittington, M. A., und Buhl, E. H. Fast network oscillations induced by potassium transients in the rat hippocampus in vitro. *J. Physiol. (Lond.)*, 542(Pt 1):167–179, Jul 2002.
- Lee, R., Kermani, P., Teng, K. K., und Hempstead, B. L. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science*, 294(5548):1945–1948, Nov 2001.
- Leibrock, J., Lottspeich, F., Hohn, A., Hofer, M., Hengerer, B., Masiakowski, P., Thoenen, H., und Barde, Y. A. Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature*, 341(6238):149–152, Sep 1989.
- Leinekugel, X., Tseeb, V., Ben-Ari, Y., und Bregestovski, P. Synaptic GABAA activation induces Ca<sup>2+</sup> rise in pyramidal cells and interneurons from rat neonatal hippocampal slices. *J. Physiol. (Lond.)*, 487 ( Pt 2):319–329, Sep 1995.
- Lessmann, V. und Brigadski, T. Mechanisms, locations, and kinetics of synaptic BDNF secretion: an update. *Neurosci. Res.*, 65(1):11–22, Sep 2009.
- Lessmann, V. und Heumann, R. Cyclic AMP endogenously enhances synaptic strength of developing glutamatergic synapses in serum-free microcultures of rat hippocampal neurons. *Brain Res.*, 763(1):111–122, Jul 1997.

- 
- Lessmann, V., Gottmann, K., und Heumann, R. BDNF and NT-4/5 enhance glutamatergic synaptic transmission in cultured hippocampal neurones. *Neuroreport*, 6(1):21–25, Dec 1994.
- Lessmann, V., Gottmann, K., und Malsangio, M. Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Prog. Neurobiol.*, 69(5):341–374, Apr 2003.
- Leutgeb, J. K., Frey, J. U., und Behnisch, T. LTP in cultured hippocampal-entorhinal cortex slices from young adult (P25-30) rats. *J. Neurosci. Methods*, 130(1):19–32, Nov 2003.
- Levi-Montalcini, R. und Hamburger, V. Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J. Exp. Zool.*, 116(2): 321–361, Mar 1951.
- Liao, G. Y., An, J. J., Gharami, K., Waterhouse, E. G., Vanevski, F., Jones, K. R., und Xu, B. Dendritically targeted Bdnf mRNA is essential for energy balance and response to leptin. *Nat. Med.*, 18(4):564–571, Apr 2012.
- Lin, B., Kramar, E. A., Bi, X., Brucher, F. A., Gall, C. M., und Lynch, G. Theta stimulation polymerizes actin in dendritic spines of hippocampus. *J. Neurosci.*, 25(8):2062–2069, Feb 2005.
- Linden, D. J. und Ahn, S. Activation of presynaptic cAMP-dependent protein kinase is required for induction of cerebellar long-term potentiation. *J. Neurosci.*, 19(23):10221–10227, Dec 1999.
- Llansola, M., Sanchez-Perez, A. M., Montoliu, C., und Felipo, V. Modulation of NMDA receptor function by cyclic AMP in cerebellar neurones in culture. *J. Neurochem.*, 91(3):591–599, Nov 2004.
- Lu, B. und Gottschalk, W. Modulation of hippocampal synaptic transmission and plasticity by neurotrophins. *Prog. Brain Res.*, 128:231–241, 2000.
- Lu, B., Pang, P. T., und Woo, N. H. The yin and yang of neurotrophin action. *Nat. Rev. Neurosci.*, 6(8):603–614, Aug 2005.
- Lu, B., Nagappan, G., und Lu, Y. BDNF and synaptic plasticity, cognitive function, and dysfunction. *Handb Exp Pharmacol*, 220:223–250, 2014.
- Ma, B., Savas, J. N., Chao, M. V., und Tanese, N. Quantitative analysis of BDNF/TrkB protein and mRNA in cortical and striatal neurons using alpha-tubulin as a normalization factor. *Cytometry A*, 81(8):704–717, Aug 2012.
- Ma, G. Q., Wang, B., Wang, H. B., Wang, Q., und Bao, L. Short elements with charged amino acids form clusters to sort protachykinin into large dense-core vesicles. *Traffic*, 9(12): 2165–2179, Dec 2008.
- Ma, N., Abel, T., und Hernandez, P. J. Exchange protein activated by cAMP enhances long-term memory formation independent of protein kinase A. *Learn. Mem.*, 16(6):367–370, Jun 2009.



- 
- MacAulay, N. und Zeuthen, T. Glial  $K^+$  clearance and cell swelling: key roles for cotransporters and pumps. *Neurochem. Res.*, 37(11):2299–2309, Nov 2012.
- MacDonald, P. E., Braun, M., Galvanovskis, J., und Rorsman, P. Release of small transmitters through kiss-and-run fusion pores in rat pancreatic beta cells. *Cell Metab.*, 4(4):283–290, Oct 2006.
- Magby, J. P., Bi, C., Chen, Z. Y., Lee, F. S., und Plummer, M. R. Single-cell characterization of retrograde signaling by brain-derived neurotrophic factor. *J. Neurosci.*, 26(52):13531–13536, Dec 2006.
- Mahapatra, S., Marcantoni, A., Zuccotti, A., Carabelli, V., und Carbone, E. Equal sensitivity of Cav1.2 and Cav1.3 channels to the opposing modulations of PKA and PKG in mouse chromaffin cells. *J. Physiol. (Lond.)*, 590(Pt 20):5053–5073, Oct 2012.
- Maisonpierre, P. C., Belluscio, L., Squinto, S., Ip, N. Y., Furth, M. E., Lindsay, R. M., und Yancopoulos, G. D. Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science*, 247(4949 Pt 1):1446–1451, Mar 1990.
- Marcantoni, A., Carabelli, V., Vandael, D. H., Comunanza, V., und Carbone, E. PDE type-4 inhibition increases L-type  $Ca^{2+}$  currents, action potential firing, and quantal size of exocytosis in mouse chromaffin cells. *Pflugers Arch.*, 457(5):1093–1110, Mar 2009.
- Markus, A., Zhong, J., und Snider, W. D. Raf and akt mediate distinct aspects of sensory axon growth. *Neuron*, 35(1):65–76, Jul 2002.
- Matsuda, N., Lu, H., Fukata, Y., Noritake, J., Gao, H., Mukherjee, S., Nemoto, T., Fukata, M., und Poo, M. M. Differential activity-dependent secretion of brain-derived neurotrophic factor from axon and dendrite. *J. Neurosci.*, 29(45):14185–14198, Nov 2009.
- Matsumoto, T., Rauskolb, S., Polack, M., Klose, J., Kolbeck, R., Korte, M., und Barde, Y. A. Biosynthesis and processing of endogenous BDNF: CNS neurons store and secrete BDNF, not pro-BDNF. *Nat. Neurosci.*, 11(2):131–133, Feb 2008.
- McBain, C. J. Hippocampal inhibitory neuron activity in the elevated potassium model of epilepsy. *J. Neurophysiol.*, 73(2):2853–2863, Feb 1995.
- Meeker, R. B. und Williams, K. S. The p75 neurotrophin receptor: at the crossroad of neural repair and death. *Neural Regen Res*, 10(5):721–725, May 2015.
- Meyer-Franke, A., Tropak, M. B., Roder, J. C., Fischer, P., Beyreuther, K., Probstmeier, R., und Schachner, M. Functional topography of myelin-associated glycoprotein. II. Mapping of domains on molecular fragments. *J. Neurosci. Res.*, 41(3):311–323, Jun 1995.
- Minichiello, L., Korte, M., Wolfert, D., Kuhn, R., Unsicker, K., Cestari, V., Rossi-Arnaud, C., Lipp, H. P., Bonhoeffer, T., und Klein, R. Essential role for TrkB receptors in hippocampus-mediated learning. *Neuron*, 24(2):401–414, Oct 1999.

- 
- Mohajerani, M. H. und Cherubini, E. Role of giant depolarizing potentials in shaping synaptic currents in the developing hippocampus. *Crit Rev Neurobiol*, 18(1-2):13–23, 2006.
- Mowla, S. J., Farhadi, H. F., Pareek, S., Atwal, J. K., Morris, S. J., Seidah, N. G., und Murphy, R. A. Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *J. Biol. Chem.*, 276(16):12660–12666, Apr 2001.
- Nagappan, G., Zaitsev, E., Senatorov, V. V., Yang, J., Hempstead, B. L., und Lu, B. Control of extracellular cleavage of ProBDNF by high frequency neuronal activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 106(4):1267–1272, Jan 2009.
- Nikolaev, V. O., Bunemann, M., Hein, L., Hannawacker, A., und Lohse, M. J. Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. *J. Biol. Chem.*, 279(36):37215–37218, Sep 2004.
- Nonet, M. L. Visualization of synaptic specializations in live *C. elegans* with synaptic vesicle protein-GFP fusions. *J. Neurosci. Methods*, 89(1):33–40, Jul 1999.
- Odaka, H., Arai, S., Inoue, T., und Kitaguchi, T. Genetically-encoded yellow fluorescent cAMP indicator with an expanded dynamic range for dual-color imaging. *PLoS ONE*, 9(6):e100252, 2014.
- Oliveira, S. L., Pillat, M. M., Cheffer, A., Lameu, C., Schwindt, T. T., und Ulrich, H. Functions of neurotrophins and growth factors in neurogenesis and brain repair. *Cytometry A*, 83(1):76–89, Jan 2013.
- Otmakhov, N. und Lisman, J. E. Postsynaptic application of a cAMP analogue reverses long-term potentiation in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J. Neurophysiol.*, 87(6):3018–3032, Jun 2002.
- Ozaki, N., Shibasaki, T., Kashima, Y., Miki, T., Takahashi, K., Ueno, H., Sunaga, Y., Yano, H., Matsuura, Y., Iwanaga, T., Takai, Y., und Seino, S. cAMP-GEFII is a direct target of cAMP in regulated exocytosis. *Nat. Cell Biol.*, 2(11):805–811, Nov 2000.
- Pang, P. T., Teng, H. K., Zaitsev, E., Woo, N. T., Sakata, K., Zhen, S., Teng, K. K., Yung, W. H., Hempstead, B. L., und Lu, B. Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science*, 306(5695):487–491, Oct 2004.
- Panja, D. und Bramham, C. R. BDNF mechanisms in late LTP formation: A synthesis and breakdown. *Neuropharmacology*, 76 Pt C:664–676, Jan 2014.
- Park, H. und Poo, M. M. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat. Rev. Neurosci.*, 14(1):7–23, Jan 2013.
- Parramon, M., Gonzalez, M. P., und Oset-Gasque, M. J. A reassessment of the modulatory role of cyclic AMP in catecholamine secretion by chromaffin cells. *Br. J. Pharmacol.*, 114(2):517–523, Jan 1995.

- 
- Patapoutian, A. und Reichardt, L. F. Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 11(3):272–280, Jun 2001.
- Patterson, S. L., Grover, L. M., Schwartzkroin, P. A., und Bothwell, M. Neurotrophin expression in rat hippocampal slices: a stimulus paradigm inducing LTP in CA1 evokes increases in BDNF and NT-3 mRNAs. *Neuron*, 9(6):1081–1088, Dec 1992.
- Patterson, S. L., Abel, T., Deuel, T. A., Martin, K. C., Rose, J. C., und Kandel, E. R. Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice. *Neuron*, 16(6):1137–1145, Jun 1996.
- Patterson, S. L., Pittenger, C., Morozov, A., Martin, K. C., Scanlin, H., Drake, C., und Kandel, E. R. Some forms of cAMP-mediated long-lasting potentiation are associated with release of BDNF and nuclear translocation of phospho-MAP kinase. *Neuron*, 32(1):123–140, Oct 2001.
- Pockett, S., Slack, J. R., und Peacock, S. Cyclic AMP and long-term potentiation in the CA1 region of rat hippocampus. *Neuroscience*, 52(2):229–236, Jan 1993.
- Poo, M. M. Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2(1):24–32, Jan 2001.
- Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G., und Cormier, M. J. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, 111(2):229–233, Feb 1992.
- Psotta, L., Lessmann, V., und Endres, T. Impaired fear extinction learning in adult heterozygous BDNF knock-out mice. *Neurobiol Learn Mem*, 103:34–38, Jul 2013.
- Reddy, R., Smith, D., Wayman, G., Wu, Z., Villacres, E. C., und Storm, D. R. Voltage-sensitive adenylyl cyclase activity in cultured neurons. A calcium-independent phenomenon. *J. Biol. Chem.*, 270(24):14340–14346, Jun 1995.
- Reibel, S., Depaulis, A., und Larmet, Y. BDNF and epilepsy—the bad could turn out to be good. *Trends Neurosci.*, 24(6):318–319, Jun 2001.
- Reichardt, L. F. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.*, 361(1473):1545–1564, Sep 2006.
- Renstrom, E., Eliasson, L., und Rorsman, P. Protein kinase A-dependent and -independent stimulation of exocytosis by cAMP in mouse pancreatic B-cells. *J. Physiol. (Lond.)*, 502 (Pt 1):105–118, Jul 1997.
- Righi, M., Tongiorgi, E., und Cattaneo, A. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) induces dendritic targeting of BDNF and tyrosine kinase B mRNAs in hippocampal neurons through a phosphatidylinositol-3 kinase-dependent pathway. *J. Neurosci.*, 20(9):3165–3174, May 2000.
- Rorsman, P. und Renstrom, E. Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia*, 46(8):1029–1045, Aug 2003.

- 
- Sadakata, T., Shinoda, Y., Oka, M., Sekine, Y., Sato, Y., Saruta, C., Miwa, H., Tanaka, M., Itohara, S., und Furuichi, T. Reduced axonal localization of a Caps2 splice variant impairs axonal release of BDNF and causes autistic-like behavior in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 109(51):21104–21109, Dec 2012.
- Sakaba, T. und Neher, E. Preferential potentiation of fast-releasing synaptic vesicles by cAMP at the calyx of Held. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98(1):331–336, Jan 2001.
- Salin, P. A., Malenka, R. C., und Nicoll, R. A. Cyclic AMP mediates a presynaptic form of LTP at cerebellar parallel fiber synapses. *Neuron*, 16(4):797–803, Apr 1996.
- Salio, C., Averill, S., Priestley, J. V., und Merighi, A. Costorage of BDNF and neuropeptides within individual dense-core vesicles in central and peripheral neurons. *Dev Neurobiol*, 67(3):326–338, Feb 2007.
- Sanderson, T. M. und Sher, E. The role of phosphodiesterases in hippocampal synaptic plasticity. *Neuropharmacology*, 74:86–95, Nov 2013.
- Santi, S., Cappello, S., Riccio, M., Bergami, M., Aicardi, G., Schenk, U., Matteoli, M., und Canossa, M. Hippocampal neurons recycle BDNF for activity-dependent secretion and LTP maintenance. *EMBO J.*, 25(18):4372–4380, Sep 2006.
- Scalettar, B. A., Jacobs, C., Fulwiler, A., Prael, L., Simon, A., Hilken, L., und Lochner, J. E. Hindered submicron mobility and long-term storage of presynaptic dense-core granules revealed by single-particle tracking. *Dev Neurobiol*, 72(9):1181–1195, Sep 2012.
- Schmidt-Kastner, R., Wetmore, C., und Olson, L. 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(1):161–183, Sep 1996.
- Schweigreiter, R. The dual nature of neurotrophins. *Bioessays*, 28(6):583–594, Jun 2006.
- Sedj, S., Rose, T., und Rupnik, M. cAMP increases Ca<sup>2+</sup>-dependent exocytosis through both PKA and Epac2 in mouse melanotrophs from pituitary tissue slices. *J. Physiol. (Lond.)*, 567(Pt 3):799–813, Sep 2005.
- Seidah, N. G., Benjannet, S., Pareek, S., Chretien, M., und Murphy, R. A. Cellular processing of the neurotrophin precursors of NT3 and BDNF by the mammalian proprotein convertases. *FEBS Lett.*, 379(3):247–250, Feb 1996.
- Seino, S. und Shibasaki, T. PKA-dependent and PKA-independent pathways for cAMP-regulated exocytosis. *Physiol. Rev.*, 85(4):1303–1342, Oct 2005.
- Shimba, K., Sakai, K., Isomura, T., Kotani, K., und Jimbo, Y. Axonal conduction slowing induced by spontaneous bursting activity in cortical neurons cultured in a microtunnel device. *Integr Biol (Camb)*, 7(1):64–72, Jan 2015.

- 
- Shinoda, Y., Sadakata, T., Nakao, K., Katoh-Semba, R., Kinameri, E., Furuya, A., Yanagawa, Y., Hirase, H., und Furuichi, T. Calcium-dependent activator protein for secretion 2 (CAPS2) promotes BDNF secretion and is critical for the development of GABAergic interneuron network. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 108(1):373–378, Jan 2011.
- Sikdar, S. K., Zorec, R., und Mason, W. T. cAMP directly facilitates Ca-induced exocytosis in bovine lactotrophs. *FEBS Lett.*, 273(1-2):150–154, Oct 1990.
- Sikdar, S. K., Kreft, M., und Zorec, R. Modulation of the unitary exocytic event amplitude by cAMP in rat melanotrophs. *J. Physiol. (Lond.)*, 511 ( Pt 3):851–859, Sep 1998.
- Sipila, S. T., Huttu, K., Soltesz, I., Voipio, J., und Kaila, K. Depolarizing GABA acts on intrinsically bursting pyramidal neurons to drive giant depolarizing potentials in the immature hippocampus. *J. Neurosci.*, 25(22):5280–5289, Jun 2005.
- Skelin, M. und Rupnik, M. cAMP increases the sensitivity of exocytosis to Ca<sup>2+</sup> primarily through protein kinase A in mouse pancreatic beta cells. *Cell Calcium*, 49(2):89–99, Feb 2011.
- Slack, J. R. und Pockett, S. Cyclic AMP induces long-term increase in synaptic efficacy in CA1 region of rat hippocampus. *Neurosci. Lett.*, 130(1):69–72, Sep 1991.
- Song, H. J., Ming, G. L., und Poo, M. M. cAMP-induced switching in turning direction of nerve growth cones. *Nature*, 388(6639):275–279, Jul 1997.
- Soppet, D., Escandon, E., Maragos, J., Middlemas, D. S., Reid, S. W., Blair, J., Burton, L. E., Stanton, B. R., Kaplan, D. R., Hunter, T., Nikolics, K., und Parada, L. F. The neurotrophic factors brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 are ligands for the trkB tyrosine kinase receptor. *Cell*, 65(5):895–903, May 1991.
- Spruston, N. Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nat. Rev. Neurosci.*, 9(3):206–221, Mar 2008.
- Ster, J., de Bock, f., Bertaso, F., Abitbol, K., Daniel, H., Bockaert, J., und Fagni, L. Epac mediates PACAP-dependent long-term depression in the hippocampus. *J. Physiol.*, 587(1):101–113, Jan 2009.
- Stojilkovic, S. S., Tabak, J., und Bertram, R. Ion channels and signaling in the pituitary gland. *Endocr. Rev.*, 31(6):845–915, Dec 2010.
- Stoppini, L., Buchs, P. A., und Muller, D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J. Neurosci. Methods*, 37(2):173–182, Apr 1991.
- Swanwick, C. C., Harrison, M. B., und Kapur, J. Synaptic and extrasynaptic localization of brain-derived neurotrophic factor and the tyrosine kinase B receptor in cultured hippocampal neurons. *J. Comp. Neurol.*, 478(4):405–417, Oct 2004.

- 
- Takei, N., Sasaoka, K., Inoue, K., Takahashi, M., Endo, Y., und Hatanaka, H. Brain-derived neurotrophic factor increases the stimulation-evoked release of glutamate and the levels of exocytosis-associated proteins in cultured cortical neurons from embryonic rats. *J. Neurochem.*, 68(1):370–375, Jan 1997.
- Tartaglia, N., Du, J., Tyler, W. J., Neale, E., Pozzo-Miller, L., und Lu, B. Protein synthesis-dependent and -independent regulation of hippocampal synapses by brain-derived neurotrophic factor. *J. Biol. Chem.*, 276(40):37585–37593, Oct 2001.
- Teng, H. K., Teng, K. K., Lee, R., Wright, S., Tevar, S., Almeida, R. D., Kermani, P., Torkin, R., Chen, Z. Y., Lee, F. S., Kraemer, R. T., Nykjaer, A., und Hempstead, B. L. ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75<sup>NTR</sup> and sortilin. *J. Neurosci.*, 25(22):5455–5463, Jun 2005.
- Timmusk, T., Palm, K., Metsis, M., Reintam, T., Paalme, V., Saarma, M., und Persson, H. Multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat BDNF gene. *Neuron*, 10(3):475–489, Mar 1993.
- Tolon, R., Franco, F. S., Villuendas, G., Vicente, A. B., Palacios, N., und Cacicedo, L. Potassium depolarization-induced cAMP stimulates somatostatin mRNA levels in cultured diencephalic neurons. *Brain Res.*, 868(2):338–346, Jun 2000.
- Tongiorgi, E. Activity-dependent expression of brain-derived neurotrophic factor in dendrites: facts and open questions. *Neurosci. Res.*, 61(4):335–346, Aug 2008.
- Tongiorgi, E., Righi, M., und Cattaneo, A. Activity-dependent dendritic targeting of BDNF and TrkB mRNAs in hippocampal neurons. *J. Neurosci.*, 17(24):9492–9505, Dec 1997.
- Tongiorgi, E., Armellin, M., Giulianini, P. G., Bregola, G., Zucchini, S., Paradiso, B., Steward, O., Cattaneo, A., und Simonato, M. Brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein are targeted to discrete dendritic laminae by events that trigger epileptogenesis. *J. Neurosci.*, 24(30):6842–6852, Jul 2004.
- Trudeau, L. E., Emery, D. G., und Haydon, P. G. Direct modulation of the secretory machinery underlies PKA-dependent synaptic facilitation in hippocampal neurons. *Neuron*, 17(4):789–797, Oct 1996.
- Vandael, D. H., Mahapatra, S., Calorio, C., Marcantoni, A., und Carbone, E. Cav1.3 and Cav1.2 channels of adrenal chromaffin cells: emerging views on cAMP/cGMP-mediated phosphorylation and role in pacemaking. *Biochim. Biophys. Acta*, 1828(7):1608–1618, Jul 2013.
- Waltereit, R. und Weller, M. Signaling from cAMP/PKA to MAPK and synaptic plasticity. *Mol. Neurobiol.*, 27(1):99–106, Feb 2003.
- Wang, H., Han, Y. F., Chan, Y. S., und He, J. Stimulus-specific adaptation at the synapse level in vitro. *PLoS ONE*, 9(12):e114537, 2014.

- 
- Waterhouse, E. G., An, J. J., Orefice, L. L., Baydyuk, M., Liao, G. Y., Zheng, K., Lu, B., und Xu, B. BDNF promotes differentiation and maturation of adult-born neurons through GABAergic transmission. *J. Neurosci.*, 32(41):14318–14330, Oct 2012.
- Weisskopf, M. G., Castillo, P. E., Zalutsky, R. A., und Nicoll, R. A. Mediation of hippocampal mossy fiber long-term potentiation by cyclic AMP. *Science*, 265(5180):1878–1882, Sep 1994.
- Wetmore, C., Cao, Y. H., Pettersson, R. F., und Olson, L. Brain-derived neurotrophic factor: subcellular compartmentalization and interneuronal transfer as visualized with anti-peptide antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88(21):9843–9847, Nov 1991.
- Wetmore, C., Olson, L., und Bean, A. J. Regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression and release from hippocampal neurons is mediated by non-NMDA type glutamate receptors. *J. Neurosci.*, 14(3 Pt 2):1688–1700, Mar 1994.
- Wong, S. T., Athos, J., Figueroa, X. A., Pineda, V. V., Schaefer, M. L., Chavkin, C. C., Muglia, L. J., und Storm, D. R. Calcium-stimulated adenylyl cyclase activity is critical for hippocampus-dependent long-term memory and late phase LTP. *Neuron*, 23(4):787–798, Aug 1999.
- Woo, N. H., Abel, T., und Nguyen, P. V. Genetic and pharmacological demonstration of a role for cyclic AMP-dependent protein kinase-mediated suppression of protein phosphatases in gating the expression of late LTP. *Eur. J. Neurosci.*, 16(10):1871–1876, Nov 2002.
- Yan, Q., Rosenfeld, R. D., Matheson, C. R., Hawkins, N., Lopez, O. T., Bennett, L., und Welcher, A. A. Expression of brain-derived neurotrophic factor protein in the adult rat central nervous system. *Neuroscience*, 78(2):431–448, May 1997.
- Yang, J., Siao, C. J., Nagappan, G., Marinic, T., Jing, D., McGrath, K., Chen, Z. Y., Mark, W., Tessarollo, L., Lee, F. S., Lu, B., und Hempstead, B. L. Neuronal release of proBDNF. *Nat. Neurosci.*, 12(2):113–115, Feb 2009.
- Yoshihara, M., Suzuki, K., und Kidokoro, Y. Two independent pathways mediated by cAMP and protein kinase A enhance spontaneous transmitter release at Drosophila neuromuscular junctions. *J. Neurosci.*, 20(22):8315–8322, Nov 2000.
- Yoshii, A. und Constantine-Paton, M. Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease. *Dev Neurobiol*, 70(5):304–322, Apr 2010.

---

# Anhang

## A. Firmensitze

Advanced Instruments, Inc	Norwood, MA, USA
Axon Instruments	Sunnyvale, CA, USA
Bandelin electronic GmbH & Co. KG	Berlin, Deutschland
Binder	Tuttlingen, Deutschland
biolog	Bremen, Deutschland
Bio-Rad Laboratories	Hercules, CA, USA
Bitplane Scientific Software	Zürich, Schweiz
Brandt GmbH & Co. KG	Wertheim, Deutschland
Braun	Melsungen, Deutschland
Cenco (übernommen von VWR International GmbH)	
Charles-River	Sulzfeld, Deutschland
Chroma Technology Corporation	Bellow Falls, VT, USA
Clontech Laboratories Inc. gehört zu Takara Bio Inc.	
Corel Corporation	Ottawa, ON, Kanada
Dow Corning	Wiesbaden, Deutschland
Duran Group	Wertheim / Main, Deutschland
Eppendorf	Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Feather	Osaka, Japan
Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
Fluka gehört zu Sigma-Aldrich	
Gibco® gehört zu Life Technologies	
Goodfellow Camebridge Ltd.	Huntington, England
greiner bio-one	Frickenhausen, Deutschland
HEKA	Lambrecht, Deutschland
Heraeus	Hanau, Deutschland
Hettich	Tuttlingen, Deutschland
IBM Corp.	Armonk, NY, USA
Invitrogen™ gehört zu Life Technologies	
JULABO GmbH	Seelbach, Deutschland
Kulzer gehört zu Heraeus	
Luigs & Neumann	Ratingen, Deutschland
McIlwain gehört zu Warner Instruments, LLC	



---

membraPure	Bodenheim, Deutschland
Menzel-Gläser	Braunschweig, Deutschland
Merck	Darmstadt, Deutschland
Microsoft Corporation	Redmond, WA, USA
Molecular Devices gehört zu Axon Instruments	
Neolab	Heidelberg, Deutschland
npi	Tamm, Deutschland
Nunc <sup>TM</sup> gehört zu Fisher Scientific	
OriginLab Corporation	Northampton, MA, USA
Panasonic	Hamburg, Deutschland
Paul Marienfeld GmbH & Co. KG	Lauda-Königshofen, Deutschland
Photometrics	Tucson, AZ, USA
Qiagen	Venlo, Niederlande
Roche	Basel, Schweiz
Roth	Karlsruhe, Deutschland
SAFC gehört zu Sigma-Aldrich	
Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Sartorius	Göttingen, Deutschland
Sci-Ed Central	Morrisville, NC, USA
Science Products	Hofheim, Deutschland
Schott AG	Mainz
Serva	Heidelberg, Deutschland
SI Analytics	Mainz, Deutschland
Sigma gehört zu Sigma-Aldrich	
Sigma-Aldrich	Munich, Deutschland
Takara Bio Inc.	Otsu, Japan
Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Tocris Bioscience	Bristol, Großbritannien
TPP	Trasadingen, Schweiz
VisitronSystems	Puchheim, Deutschland
VWR International GmbH	Darmstadt
Wacker Chemie	Stuttgart, Deutschland
Warner Instruments, LLC	Hamden, CT, USA
WLD-TEC GmbH	Göttingen, Deutschland
World Precision Instruments, Inc.	Sarasota, FL, USA
Zeiss	Jena, Deutschland

## B. Lebenslauf

Nachname: Lichtenecker  
Vorname: Petra  
Geburtsdatum: 18.11.1982  
Geburtsort: Frankfurt am Main  
Staatsangehörigkeit: Deutsch

2002 - 2008 Studium der Biologie im Fachbereich Biologie der Johannes  
Gutenberg Universität, Mainz  
Abschluss: Diplom-Biologin (Dipl.-Biol.)  
2009 - 2015 Promotion am Institut für Physiologie, Medizinische Fakultät,  
Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

## C. Publikationen

Leschik J, Eckenstaler R, Nieweg K, Lichtenecker P, Brigadski T, Gottmann K, Lessmann V, Lutz B. Embryonic stem cells stably expressing BDNF-GFP exhibit a BDNF-release-dependent enhancement of neuronal differentiation. *Journal of Cell Science*, 126(21):5062-5073, Nov 2013.

Edelmann, E, Cepeda-Prado, E, Franck, M, Lichtenecker, P, Brigadski, T, Lessmann, V (2015). Theta Burst Firing Recruits BDNF Release and Signaling in Postsynaptic CA1 Neurons in Spike-Timing-Dependent LTP. *Neuron*, 86(4):1041-1054, May 2015.

## D. Danksagung

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

Mein besonderer Dank gilt außerdem Frau Jun.-Prof. Dr. Tanja Brigadski\* für die Betreuung dieser Doktorarbeit, die vielen angeregten fachlichen und nicht-fachlichen Diskussionen sowie die Einarbeitung in die Kunst der Elektrophysiologie, des wissenschaftlichen Schreibens und Präsentierens.

Außerdem möchte ich an dieser Stelle dem gesamten Institut für die tolle Zusammenarbeit danken. Mein ganz spezieller Dank gilt hierbei meinen Büromitbewohnern Julia, Laura und Robert, aber auch Bianca, Dijana und Efrain für die Zeit in- und außerhalb des Instituts. Außerdem danke ich Elke, Susanne, Thomas E. und Thomas M. sowohl fachlich als auch privat für viele unvergesslichen Diskussionen und Momente. Viel Lob und Dank gebe ich ausserdem an Sabine und Regina weiter, bei denen Zellkulturen und Doktoranden stets in besten Händen waren. Besonders gefreut hat mich die Zusammenarbeit mit Jan-Hendrik und unserer Kollaborationspartnerin Julia. Ein großes Dankeschön richte ich außerdem an Anja, Margit, Sybille, Colette und Evelyn.

Meiner lieben Familie danke ich für all ihre Unterstützung. Meine Mutter Doris, mein Vater Helmut und meine Geschwistern Bernd, Marion und Sebastian waren immer für mich da - auch in schweren Zeiten. *A most special thanks goes out to my fiancée Angela who has been my greatest supporter at all times.*

In persönlicher Sache möchte ich außerdem meinen Dank an Steffi und Tao, Anna, Meike, Eli, Wilma, Judit, Günter, Florica und viele andere sowie an die Partnern meiner Eltern und Geschwister aussprechen. Zusätzlich danke ich Frau Dr. Hennig und Frau Dr. Balzer-Kuna *et al.* für die lehrreichen Momente. Und natürlich: Danke an unsere Vierbeiner Cosmo, Rocky und Lili.

Petra Lichtenecker  
Breslauer Str. 3  
61191 Rosbach-Rodheim

## Erklärung

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

*Modulation der Sekretion des Neurotrophins 'Brain-Derived Neurotrophic Factor' durch  
zyklisches Adenosinmonophosphat*

selbstständig verfasst, nicht bereits 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.

Rosbach v.d.H., 7. Februar 2017

Petra Lichtenecker