

Neurotrophine und aktivitätsabhängige synaptische
Plastizität:
Untersuchungen zum Ort und Mechanismus der regulierten
Neurotrophin-Freisetzung in adenoviral transduzierten
hippokampalen Primärkulturen

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2000

vorgelegt von
Annette Gärtner

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Prof. Dr. Hans Thoenen in der Abteilung Neurochemie am Max-Planck-Institut für Neurobiologie in 82152 Martinsried angefertigt.

Tag der mündlichen Prüfung: 3. April 2000

Dekan: Prof. Dr. Ulrich Nagel

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Hans Thoenen
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dieter Mecke
3. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Hans-Hermann Gerdes

Danksagung

Besonders möchte ich Prof. Hans Thoenen für die Betreuung dieser Arbeit danken, vor allem dafür, daß diese Arbeit in einem stimulierenden Umfeld und in einer freien, eigenständigen Form durchgeführt werden konnte. Außerdem möchte ich ihm für die Unterstützung, an mehreren wissenschaftlichen Kongressen teilnehmen zu können, danken.

Herrn Prof. Dieter Mecke möchte ich für die Vertretung dieser Arbeit vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen danken.

Weiterhin möchte ich den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit und die Einführung in verschiedenste, vor allem zellbiologische, Techniken danken. Vor allem Oliver Griesbeck möchte ich für die Einführung in die Arbeit mit adenoviralen Vektoren, viele Diskussionen und im allgemeinen für eine gute und notwendige Starthilfe danken, Jens Richter für die Einarbeitung in die Primärkulturtechnik und für seine ständige nette und wichtige Mithilfe im Verlauf meiner Arbeit. Marco Canossa möchte ich für die zahlreichen interessanten Diskussionen, viele Ideen und seine Hilfsbereitschaft bei verschiedensten Problemen danken. Für die Kooperation in allen elektronenmikroskopischen Experimenten möchte ich Natalie Stöckli und Yuri Shostak danken. Für die sehr angenehme Zusammenarbeit und zahlreiche technische Hilfen möchte ich Claudia Huber danken.

Den Mitgliedern meiner fast zweiten Arbeitsgruppe in der Abteilung Neurophysiologie möchte ich nicht nur für die wissenschaftliche Unterstützung danken, sondern auch für die vielen gemeinschaftlichen Unternehmungen, welche die Arbeitsatmosphäre in diesem Institut in jeder Hinsicht angenehm machten. Hier möchte ich insbesondere Volker Staiger für die unermüdliche Mitarbeit in fast allen elektrophysiologischen Experimenten danken, die ansonsten in dieser Weise nicht durchführbar gewesen wären. Weiterhin möchte ich Dorit Polnau und Martin Korte für die sehr gute Kooperation in laufenden Projekten danken und Martin Korte insbesondere für die Überwindung vieler Computerhemmnisse, sehr viele Diskussionen und Anregungen.

Für das Interesse an meiner Arbeit, viele Gespräche und technische Hilfen möchte ich weiterhin Florian Engert, Magdalena Götz, Albrecht Kossel, Harald Neumann, Oliver Stoss und Michael Willem danken.

Für die Unterstützung bei der Arbeit mit dem konfokalen Mikroskop danke ich Robert Streif und Gerhard Hager in der Abteilung Neuromorphologie. Für die Entwicklung zahlreicher EM-Bilder und die Einführung in die Elektronenmikroskopie möchte ich Karin Brückner in der Abteilung Neuromorphologie danken.

Herrn James Chalcraft möchte ich für die Mithilfe bei vielen technischen Problemen der Bilderherstellung danken.

Meiner Familie und meinen Freunden verdanke ich die Energie und Lust, diese Arbeit trotz vieler Schwierigkeiten so durchführen zu können.

Publikationen:

Teile vorliegender Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Gärtner A., Y. Shostak, and Hans Thoenen. 1998. Ultrastructural analysis of activity-dependent neurotrophin release in hippocampal primary cultures transduced by adenovirus. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 318.10

Griesbeck, O., M. Canossa, G. Campana, A. Gärtner, M.C. Hoener, H. Nawa, R. Kolbeck, and H. Thoenen. 1999. 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.Techn.* 45:262-275.

Chapouton, P., A. Gärtner, and M. Götz. (1999). The role of Pax6 in restricting cell migration between developing cortex and basal ganglia. *Development* 126, 5569-5579

im Druck in *Molecular and Cellular Neuroscience*:

Gärtner A., Y. Shostak, N. Hackel, I.M. Ethell, and Hans Thoenen. Ultrastructural identification of storage compartments and localization of activity-dependent secretion of neurotrophin 6 in hippocampal neurons.

Inhaltsverzeichnis	I-IV
<i>Abkürzungen und Begriffe</i>	V-VI
1 Einleitung	1
1.1 Die Familie der Neurotrophine	2
<i>1.1.1 Struktur der Neurotrophine</i>	2
<i>1.1.2 Rezeptoren der Neurotrophine</i>	3
1.1.2.1 Signaltransduktion über Trk-Rezeptoren	3
1.1.2.2 Signaltransduktion über p75	4
<i>1.1.3 Biologische Funktionen der Neurotrophine</i>	5
1.2 Neurotrophine und synaptische Plastizität	6
<i>1.2.1 Aktivitätsabhängige Regulation der Neurotrophin-Transkription</i>	6
<i>1.2.2 Aktivitätsabhängige Freisetzung von Neurotrophinen</i>	6
1.2.2.1 Freisetzende Stimuli	7
1.2.2.2 Die Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern ist notwendig und ausreichend für die regulierte Neurotrophin-Freisetzung	7
1.2.2.3 Vergleich der Freisetzung von NGF mit anderen Neurotrophinen	8
<i>1.2.3 Ort der Neurotrophin-Freisetzung</i>	8
1.2.3.1 Dendritische Freisetzung – allgemeine Untersuchungen	9
<i>1.2.4 Physiologische Bedeutung der aktivitätsabhängigen Neurotrophin-Freisetzung</i>	9
<i>1.2.5 In vitro-Systeme zur Untersuchung der Mechanismen der Neurotrophinwirkung</i>	9
1.2.5.1 Untersuchungen zum Ort der Neurotrophin-Wirkung: prä- oder postsynaptische Modifikationen	10
1.2.5.2 Weitere schnelle synaptische Modulationen durch Neurotrophine	11
1.2.5.3 Das hippocampale CA1/CA3 System und Langzeitpotenzierung (LTP)	11
<i>1.2.6 Koinzidenz der Neurotrophin-Freisetzung mit elektrischen bzw. physiologisch relevanten Stimuli</i>	12
1.3 Lokalisierung endogener Neurotrophine und trk Rezeptoren	13
<i>1.3.1 Intrazelluläre Lokalisierung von Neurotrophinen</i>	14
<i>1.3.2 Intrazelluläre Lokalisierung von Trk-Rezeptoren</i>	14
1.4 Zusammenfassung: Neurotrophine als Mediatoren synaptischer Plastizität	15
1.5 Ziel der vorliegenden Arbeit	16
2. Material und Methoden	18
2.1 Materialien:	18
<i>2.1.1 Lösungen und Puffer:</i>	18
<i>2.1.2 Antikörper</i>	18
2.2 Methoden	20
<i>2.2.1 Molekularbiologische Methoden</i>	20
2.2.1.1 Materialien	20
2.2.1.1.1 <i>E.Coli</i> -Stämme	20
2.2.1.1.2 Primer	20
2.2.1.1.3 Plasmide	21
2.2.1.2 Aufzucht von <i>E.coli</i>	22
2.2.1.3 Plasmidpräparation aus <i>E.coli</i>	22

2.2.1.4 Spektrometrische Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen	24
2.2.1.5 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen	24
2.2.1.6 Glätten überhängender DNA-Enden	24
2.2.1.7 Agarosegelelektrophorese	24
2.2.1.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	24
2.2.1.9 Phenolextraktion von DNA	24
2.2.1.10 Präzipitation von DNA	25
2.2.1.11 Dephosphorylierung von 5' DNA-Enden	25
2.2.1.12 Ligation von DNA	25
2.2.1.13 Elektrotransformation von <i>E.coli</i>	25
2.2.1.14 Polymerasekettenreaktion (PCR)	25
2.2.1.15 Analyse der DNA-Sequenzen	26
2.2.2 <i>Proteinchemische Methoden</i>	27
2.2.2.1 SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese	27
2.2.2.2 Färbung von Proteingelen mit Coomassie-Blau	28
2.2.2.3 Western-Blot	28
2.2.2.4 Probenaufbereitung für die Immunopräzipitation	29
2.2.2.5 Analyse der Phosphorylierung von Trk-Rezeptoren	29
2.2.2.6 Enzymimmunoassays (ELISA) für BDNF und NGF	29
2.2.2.7 Reinigung monoklonaler Antikörper	30
2.2.3 <i>Zellbiologische Methoden</i>	30
2.2.3.1 Präparation von dissoziierten hippokampalen Neuronen	30
2.2.3.2 Präparation von hippokampalen Explantatkulturen	31
2.2.3.3 Präparation von hippokampalen organotypischen Schnittkulturen	32
2.2.3.4 Zelllinien	32
2.2.3.5 Einfrieren von Zellen	32
2.2.3.6 Nachweis zytotoxischer Effekte mit Propidiumiodid und Fluoresceindiacetat	33
2.2.4 <i>Immunocytochemische Methoden</i>	33
2.2.5 <i>Kalzium-Fluoreszenzmikroskopie</i>	33
2.3 Spezielle Methoden	34
2.3.1 <i>Methoden zum Gentransfer</i>	34
2.3.1.1 Transfektionen	34
2.3.1.2 Viraler Gentransfer	35
2.3.1.2.1 Adenovirus	35
2.3.1.2.2 Sindbisvirus	36
2.3.1.2.3 Viraler Gentransfer: Methoden	37
2.3.2 <i>Freisetzungsstudien</i>	37
2.3.2.1 Nachweis der Freisetzung von NT6myc mittels Westernblot	37
2.3.2.2 Freisetzung von NGF und BDNF unter Perfusionsbedingungen	38
2.3.2.3 Freisetzung induziert durch Stimulation mit Feldelektroden	38
2.3.2.4 Freisetzung von NT6myc analysiert durch Immunogoldoberflächenfärbung auf EM-Ebene	39
2.3.3 <i>EM-Methoden</i>	39
2.3.3.1 Einbetten der Zellen nach preembedding Immunocytochemie	39
2.3.3.2 Postembedding Goldimmunocytochemie	40
2.3.3.3 Statistische Analyse der Immunogold-Oberflächenfärbung	40
2.3.4 <i>Elektrophysiologische Methoden</i>	41
2.3.4.1 Patch-Clamp-Messungen	41
2.3.4.2 Analyse von mEPSC	41

3 Ergebnisse	42
3.1 Untersuchungen zum Gentransfer in dissoziierte hippocampale Kulturen und hippocampale Schnittkulturen	42
3.1.1 <i>Herstellung adenoviraler Vektoren</i>	42
3.1.1.1 Herstellung eines NT6myc Adenovirus (AdV5NT6myc)	43
3.1.1.2 Test der adenoviralen Konstrukte	44
3.1.1.3 Toxizität durch Adenovirustransduktion	45
3.1.1.4 Wirtsselektivität von Adenoviren	46
3.1.2 <i>Herstellung von Sindbisviren</i>	48
3.1.2.1 Toxizität von Sindbisviren	49
3.1.2.2 Wirtsspezifität von Sindbisviren	49
3.1.3 <i>Vergleichende Untersuchungen Adenoviren-Sindbisviren</i>	49
3.1.3.1 Zeitspanne zwischen viraler Transduktion und Expression des Transgens	49
3.1.3.2 Toxizität	51
3.1.3.3 Transduktion von Schnittkulturen	51
3.2 Ultrastrukturelle Analyse der Orte der aktivitätsabhängigen Freisetzung von NT6myc	51
3.2.1 <i>Voraussetzungen für die Verwendung von NT6myc als repräsentatives Modellmolekül für die aktivitätsabhängige Freisetzung von Neurotrophinen</i>	51
3.2.2 <i>Subzelluläre Verteilung von NT6myc in transduzierten hippocampalen Neuronen im Vergleich mit NGF und BDNF</i>	51
3.2.3 <i>Aktivitätsabhängige Freisetzung von NT6myc</i>	53
3.2.4 <i>Bindung von NT6myc an Heparin und Heparansulfatproteoglykane an der Oberfläche hippocampaler Neuronen</i>	54
3.2.5 <i>Lokalisierung der Orte der aktivitätsabhängigen NT6myc-Freisetzung auf EM-Ebene</i>	55
3.2.5.1 Etablierung der experimentellen Parameter	55
3.2.5.2 Ergebnisse der Oberflächenmarkierung	56
3.2.6 <i>Weiterführende Untersuchungen zum Ort der aktivitätsabhängigen Freisetzung</i>	59
3.2.6.1 Etablierung eines experimentellen Systems mit definiert prä- und postsynaptischer Region	61
3.2.7 <i>Experimenteller Ansatz zur Bestimmung des Ortes der Neurotrophinwirkung</i>	64
3.3 Untersuchungen zur Identifizierung des intrazellulären Kompartimentes der Neurotrophin-Speicherung und -Freisetzung	65
3.3.1 <i>Lichtmikroskopische Untersuchungen zur Neurotrophin-Lokalisierung</i>	65
3.3.2 <i>Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Neurotrophin-Verteilung</i>	67
3.4 Neurotrophin-Freisetzung durch elektrische Stimulation von dissoziierten hippocampalen Neuronen	69
3.4.1 <i>Stimulation mit Feldelektroden</i>	70
3.4.2 <i>Freisetzung von NT6myc nach elektrischer Stimulation</i>	71
3.4.3 <i>Die NT6myc-Freisetzung ist abhängig von der Frequenz der evozierten Aktionspotentiale</i>	72
3.4.4 <i>Mögliche Mechanismen zur differentiellen Neurotrophin-Freisetzung</i>	73
3.4.5 <i>Physiologische Relevanz frequenzabhängiger Neurotrophin-Freisetzung</i>	75

4 Diskussion	77
4.1 Gentransfer in postmitotische Neuronen	77
4.1.1 <i>Viral vermittelter Gentransfer in neuronale Gewebe</i>	78
4.1.2 <i>Vergleich adenoviraler Vektoren und Sindbisviren für den neuronalen Gentransfer unter definierten experimentellen Bedingungen</i>	79
4.2 In vitro System zur Untersuchung der Neurotrophin-Freisetzung	81
4.2.1 <i>Hippokampale dissoziierte Primärneuronen: ein geeignetes experimentelles in vitro System für Studien zur regulierten Neurotrophin-Freisetzung</i>	81
4.2.2 <i>Neurotrophin-Freisetzung und Lokalisierung nach Überexpression im Vergleich zur physiologischen Situation</i>	82
4.3 Untersuchungen zum Ort der Neurotrophin-Freisetzung	83
4.3.1 <i>Verwendung von NT6myc</i>	83
4.3.2 <i>Oberflächenfärbung von NT6myc nach regulierter Freisetzung</i>	84
4.3.3 <i>Die Freisetzung von NT6myc erfolgt hauptsächlich von den Neuriten aber ohne klare Ortsspezifität entlang der Neuriten</i>	85
4.4 Identifikation intrazellulärer Neurotrophin Speicher- und Freisetzungskompartimente	87
4.4.1 <i>Intrazelluläre Lokalisierung von Neurotrophinen: immunocytochemische Untersuchungen</i>	88
4.4.2 <i>Vergleich mit verwandten Freisetzungsmechanismen : Neuropeptide, Opoide</i>	90
4.5 Mechanismen der Neurotrophin-Freisetzung: Freisetzung von Neurotrophinen durch definierte elektrischer Stimulation	92
4.6 Ausblick	93
4.6.1 <i>Möglichkeiten zur funktionellen Verbindung der intrazellulären Kompartimente mit der Neurotrophin-Freisetzung: dynamische Untersuchungen</i>	93
4.6.2 <i>Ort der Freisetzung von Neurotrophinen</i>	94
5. Zusammenfassung	95
6. Literatur	96
<i>akademische Lehrer</i>	
<i>Lebenslauf</i>	

Abkürzungen und Begriffe

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Masseprozent
9E10	mAk, der ein Epitop des c-myc Proteins erkennt
ACh	Acetylcholin
AdV5	Adenovirus Serotyp 5
Ak	Antikörper
AMPA	α -Amino-3-Hydroxy-5-Methylisoxazole-4-Propionsäure
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BAPTA	1,2-Bis-(2-Aminophenoxy)-Ethan-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
BAPTA-AM	BAPTA-Pentacetoxymethylester
BBS	BES gepufferte Lösung (2 fach)
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
BES	N,N-Bis(2-Hydroxyethyl)-2-Aminoethansulfonsäure
BGH	Rinderwachstumshormon (bovine growth hormone)
blot	Transfer
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
cDNA	cistronische DNA
CMV	Cytomegalovirus
CREB	cAMP responsive element binding protein
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
E	Tag der Embryonalentwicklung
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
EGFP	verstärktes GFP (enhanced GFP)
ELISA	Enzyme-linked immunosorbant assay
EM	Elektronenmikroskopie/ elektronenmikroskopisch
EPSCs	erregende postsynaptische Ströme (excitatory postsynaptic currents)
EPSPs	erregende postsynaptische Potentiale (excitatory postsynaptic potentials)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
FCS	Fötale Kälberserum (fetal calf serum)
Fura-AM	1-[2-(5-Carboxyoxazol-2-yl)-6-Aminobenzofuran-5-oxy]-2-2'-Amino-5'-Methylphenoxy)-Ethan-N,N,N',N',-Tetraessigsäurepentaacetoxymethylester
GABA	γ -Aminobuttersäure (gamma amino butyric acid)
GFP	grün fluoreszierendes Protein (green fluorescent protein)
Glu	Glutamat
GluR	Glutamatrezeptor
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-Ethansulfonsäure
HP	modifizierter Hankspuffer
HRP	Meerrettichperoxidase (horse raddish peroxidase)
IF	Immunofluoreszenz
Ig	Immunglobulin
IP	Immunopräzipitation
IR	Immunoreaktivität
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani Medium
LDCV	große sekretorische Vesikel mit einem elektronendichten Kern (large dense core vesicle)
LTP	Langzeitpotenzierung (long term potentiation)
m.u.	map units , Größenangabe bei viraler DNA: 1 m.u. = 360 bp
mAChR	muskarinischer Acetylcholinrezeptor
mAk	monoklonaler Antikörper
mEPSC	Miniatur EPSC (miniature excitatory postsynaptic potential)

mGluR	metabotroper GluR
MOI	multiplicity of infection (Verhältnis pfu/Zellanzahl bei einer Infektion)
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
MW	Molekulargewicht (molecular weight)
NGS	Ziegen Serum (normal goat serum)
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NPY	Neuropeptid-Y
NR1	NMDA-Rezeptor Untereinheit 1
NS	Nervensystem
NTP	Nukleotidtriphosphat
OD ₆₀₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600nm
P	Tag nach der Geburt (postnatal)
p75NTR	p75-Neurotrophinrezeptor
PB	Phosphatpuffer
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PC12	Rat pheochromocytoma
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
Pellet	Bodensatz
PFA	Paraformaldehyd
pfu	plaque forming unit
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNS	Peripheres Nervensystem
POD	Peroxidase
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (rotations per minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecylsulfate)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Sin	Sindbis
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TB	Terrific Broth
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung (tris buffered saline)
TBS	Theta-burst Stimulation
TBST	TBS-Tween
TCA	Trichloressigsäure (trichloric acid)
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TGN	Trans-Golgi Netzwerk
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
Trk	Tropomyosin Kinase
Trk-R	Trk-Rezeptor/en
TTX	Tetrodotoxin, Inhibitor spannungsabhängiger Natriumkanäle
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
ÜN	über Nacht
WB	Westernblot
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galaktosid
ZNS	Zentralnervensystem
β-Gal	β-Galaktosidase

1. Einleitung

Eine Besonderheit neuronaler Zellen liegt in ihrer Fähigkeit, funktionelle und auch strukturelle Eigenschaften in Abhängigkeit von ihrer Aktivität und der Aktivität ihrer Umgebung zu verändern. Gut dokumentiert ist diese Plastizität¹ während der Ontogenese des Nervensystems (NS), wo sie wichtig für funktionelle Verfeinerungen von neuronalen Verbindungen ist. Aber auch das adulte NS ist kein stabiles Netz neuronaler Verbindungen, sondern ein von externen Faktoren beeinflusstes plastisches System, was sich besonders in der Fähigkeit zu Lernen und Gedächtnis zeigt. Lern- und Gedächtnisprozessen liegt eine Veränderung der Effizienz synaptischer Transmission zugrunde, die über orts- und zeitspezifische elektrische Aktivitätsmuster, wie z.B. die koinzidente Erregung eines prä- und postsynaptischen Neurons (Hebb, 1949) reguliert wird. Prozesse, welche die veränderte Erregbarkeit von Neuronen induzieren, verlaufen sehr schnell und finden deshalb direkt in der Synapse statt. Erst durch die nachfolgende Signalweiterleitung über „second messenger“ und Veränderungen in der Genexpression kommt es zur Konsolidierung der zunächst transienten Veränderungen. Wie und warum bestimmte Signale zu spezifischen Modifikationen neuronaler Verbindungen führen, kann nur über die Aufklärung der zugrundeliegenden molekularen Mechanismen verstanden werden.

Die Entdeckung, daß die Synthese der Neurotrophine durch neuronale Aktivität reguliert wird (Lindholm et al., 1994*²), unterstützte die Hypothese, daß sie als Mediatoren aktivitätsabhängiger synaptischer Plastizität fungieren (Thoenen, 1991*). In weiteren Studien wurde und wird versucht, diese Hypothese zu evaluieren und die Kriterien, die ein solcher Mediator erfüllen muß, experimentell zu untersuchen (Thoenen, 1995*; Schuman, 1999*; McAllister et al., 1999*):

- Die Expression von Neurotrophinen und ihre Freisetzung sollte aktivitätsabhängig reguliert werden. Es sollte eine Koinzidenz ihrer Freisetzung mit plastizitätsinduzierenden Reizen geben, wozu sie in einer schnell verfügbaren Form gespeichert werden müssen.
- Neurotrophine sollten in der Lage sein, synaptische Eigenschaften zu modifizieren (z.B.: Membranerregbarkeit, Freisetzungswahrscheinlichkeit von Neurotransmittern, Morphologie synaptischer Verbindungen).
- Neurotrophine und ihre Rezeptoren müssen an den entsprechenden Orten (z.B. Synapsen) während definierter Zeiten (z.B. verstärkter neuronaler Plastizität) exprimiert werden.

Im folgenden Kapitel sollen diese Kriterien diskutiert werden, um die vorliegende Arbeit in den Kontext dieser Untersuchungen einzuordnen.

¹ Da der Begriff neuronaler Plastizität sehr weitgefaßt wird, soll er hier näher definiert werden. Neuronale Plastizität in einer generellen Bedeutung beschreibt die Fähigkeit von Neuronen, ihre Struktur (und damit Verbindungen) und Funktion auf äußere Reize hin zu verändern. Diese Definition schließt Prozesse in der Entwicklung und in Regenerationsprozessen nach Verletzungen und aktivitätsabhängige Struktur- und Funktionsänderungen im adulten Tier ein. Die Effektivität von chemischen Synapsen kann für längere oder kürzere Zeit verändert werden, ein Phänomen, was als synaptische Plastizität bezeichnet wird und oft von der Aktivität der Neuronen abhängig ist (aktivitätsabhängige synaptische Plastizität). Synaptische Plastizität beinhaltet zum einen eine Veränderung in der Stärke der synaptischen Übertragung, aber auch Veränderungen, die zu längeranhaltenden funktionellen und strukturellen Änderungen führen.

² * Übersichtsartikel werden mit einem Stern kenntlich gemacht.

1.1 Die Familie der Neurotrophine

1.1.1 Struktur der Neurotrophine

Neurotrophine umfassen eine Familie strukturverwandter, sezernierter Proteine, deren biologische Wirkungen vor allem auf Zellen des NS beschränkt sind.

Bislang wurden sieben Neurotrophine in Vertebraten identifiziert: Nervenwachstumsfaktor (NGF, nerve growth factor; Levi-Montalcini, 1987), BDNF (brain-derived neurotrophic factor; Barde et al., 1982; Leibrock et al., 1989), Neurotrophin 3 (NT3; Hohn et al., 1990; Ernfors et al., 1990; Maisonpierre et al., 1990), Neurotrophin 4 (NT4; Hallbook et al., 1991) und Neurotrophin 5 (NT5; Berkemeier et al., 1991)³. Zwei weitere NGF verwandte Neurotrophine wurden bislang nur in Teleostiern nachgewiesen: Neurotrophin 6 (NT6; in Xiphophorus: Götz et al., 1994) und Neurotrophin 7 (NT7; in Zebrafisch: Nilsson et al., 1998; in Karpfen: Lai et al., 1998).

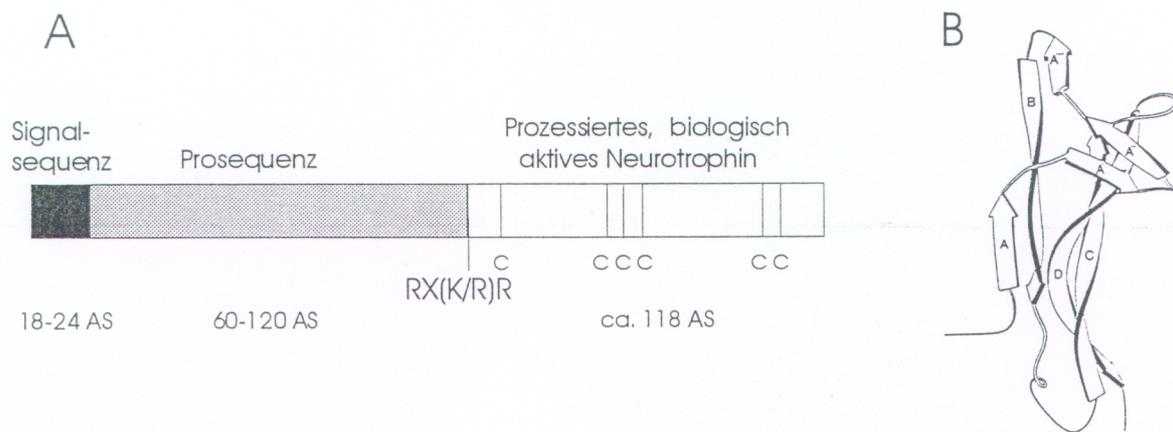


Abb.1.1: A: Schematische Darstellung der Neurotrophin-Struktur (nach Thoenen, 1995*). Neurotrophine werden an klassischen dibasischen Schnittstellen (RX^K/R) von Prohormonkonvertasen prozessiert. Die konservierten Cysteinreste (C) sind angegeben. B: Die β -Faltblattstruktur des NGF-Monomers (McDonald et al., 1991) ist dargestellt. Die sieben durch Wasserstoffbrücken stabilisierten β -Strukturen bilden drei antiparallele β -Faltblätter und formen die für die Dimerisierung verantwortliche hydrophobe Oberfläche. Da die für die Ausbildung dieser spezifischen Struktur benötigten AS in der Neurotrophin-Familie hochkonserviert sind, ist diese Darstellung wahrscheinlich für alle Neurotrophine repräsentativ.

Alle Neurotrophine werden als Präproproteine synthetisiert und von Prohormonkonvertasen an charakteristischen, dibasischen Sequenzen geschnitten (Abb. 1.1 A). Die prozessierten, matten Proteine sind ca. 118 Aminosäuren (AS) lang und stärker (ca. 50%) konserviert als die Prodomäne, die zwei Subdomänen enthält, die für die Expression eines biologisch aktiven, richtig prozessierten Proteins notwendig sind (Suter et al., 1991). Eventuell unterstützt die Prodomäne die Ausbildung der drei Disulfidbrücken zwischen den absolut konservierten Cysteinresten (Acklin et al., 1993), welche das charakteristische Faltungsmuster bewirken. Die Röntgenstrukturanalyse von NGF (McDonald et al., 1991) zeigt, daß die Neurotrophin-Monomere aus drei Paaren antiparaller β -Faltblattstrukturen bestehen (Abb. 1.1 B), die eine hydrophobe Oberfläche bilden, über welche die Monomere zu nicht kovalent gebundenen Homodimeren assoziieren. Vier flexible Schleifenregionen enthalten die meisten der variablen AS und bewirken wahrscheinlich die unterschiedlichen Rezeptorspezifitäten (Ibanez, 1994*).

³ NT4 (bislang nur in *Xenopus laevis* gefunden) und NT5 (wahrscheinlich das Homologe zu NT4 in Säugern) haben in vielen in vitro Systemen ähnliche Wirkungen, so daß sie i.d.R. als NT4/5 zusammengefaßt werden.

1.1.2 Rezeptoren der Neurotrophine

Zwei Arten von Neurotrophin-Rezeptoren sind für die Signalweiterleitung verantwortlich: ein niedriger affiner Rezeptor (p75NTR), der alle Neurotrophine mit ähnlicher Affinität ($K_D \approx 10^9 M$) bindet, und die Mitglieder der Familie der Trk⁴-Rezeptoren (Trk-R), die Neurotrophine weitgehend spezifisch mit hoher Affinität ($K_D \approx 10^{-11} M$) binden (Bothwell, 1995*).

1.1.2.1 Signaltransduktion über Trk-Rezeptoren

Trk-R sind Transmembrannglykoproteine von ca. 140-145 kDa (Barbacid, 1995*; Lewin und Barde, 1995*). Liganden werden über die zwei extrazellulären Ig-Domänen gebunden (Pérez et al., 1995), während die Signalweiterleitung über die Tyrosinkinasedomäne vermittelt wird.

In Säugern wurden drei verschiedene Trk-R identifiziert: TrkA bindet NGF, TrkB bindet BDNF und NT4/5 und TrkC NT3 (Barbacid, 1995*): NT3 kann unter bestimmten Bedingungen mit etwas niedrigerer Affinität auch TrkA und TrkB binden (Davies et al., 1995). Die Fischneurotrophine NT6 und NT7 können spezifisch TrkA aus Säugern phosphorylieren (Lai et al., 1998); allerdings ist die biologische Aktivität von NT6 im Vergleich zu NGF etwa 1000x geringer (Götz et al., 1994). TrkB und TrkC werden auch als Isoformen exprimiert, denen die Kinasedomänen fehlen (TrkBT1 und T2, TrkCKT) oder die eine verlängerte Kinasedomäne (TrkCKI) besitzen (Middlemas et al., 1991; Lamballe et al., 1993). Die physiologische Bedeutung dieser Isoformen ist bislang nur unzureichend untersucht. Wie die über die Trk-Rezeptoren vermittelten Neurotrophin-Signale die Vielfalt an zellulären Antworten bewirken, wurde bislang sehr intensiv an der neuroendokrinen PC12-Zelllinie (PC12: Rat pheochromocytoma) untersucht, die TrkA und p75NTR exprimiert und sehr spezifisch auf NGF-Stimulation reagiert. Nach NGF Stimulation differenzieren PC12 Zellen zu Zellen, die viele Ähnlichkeiten zu sympathetischen Neuronen aufweisen, indem sie ihre Proliferation stoppen, Neuriten bilden, ihr Soma vergrößern und ihr Überleben im serumfreien Medium von NGF abhängig wird. Abbildung 1.2. zeigt eine Übersicht der wichtigsten über Trk-R vermittelten Signaltransduktionswege und die Zuordnung zu biologischen Funktionen. Diese Zuordnung wurde in der Regel über die spezifische Inhibition definierter Signaltransduktionswege oder über die Verwendung von Trk-R, die in der Kinasedomäne definiert mutiert sind und nur spezifische Signaltransduktionsmoleküle binden (Inagaki et al., 1995; Minichiello et al., 1998), erreicht, ist aber durch die Querverbindungen zwischen den Signaltransduktionswegen recht problematisch.

Da PC12 Zellen aus Tumorzellen gewonnen wurden, die i.d.R. ein anderes Muster an Signaltransduktionsmolekülen aufweisen, wird inzwischen versucht, diese Ergebnisse in Primärneuronen (Transduktionsexperimente mit Adenoviren, eigene vorläufige Untersuchungen) und *in vivo* (transgene Mäuse, die Rezeptormutanten exprimieren; Minichiello et al., 1998) zu verifizieren.

Bislang wurden zwar keine Unterschiede in der Signaltransduktionskaskade der verschiedenen Trk-R beschrieben, aber verschiedene Neurotrophine können unterschiedliche biologische Antworten in einer Zelle hervorrufen (Ghosh und Greenberg, 1995) und NT4/5 und BDNF können sogar über die Aktivierung des gleichen Rezeptors (TrkB) unterschiedliche Antworten hervorrufen (Minichiello et al., 1998).

⁴ Trk-steht für den ursprünglichen Namen: tropomyosin receptor kinase, da diese Tyrosinkinase in ihrer onkogenen Version als Fusionsprotein mit Tropomyosin vorkommt

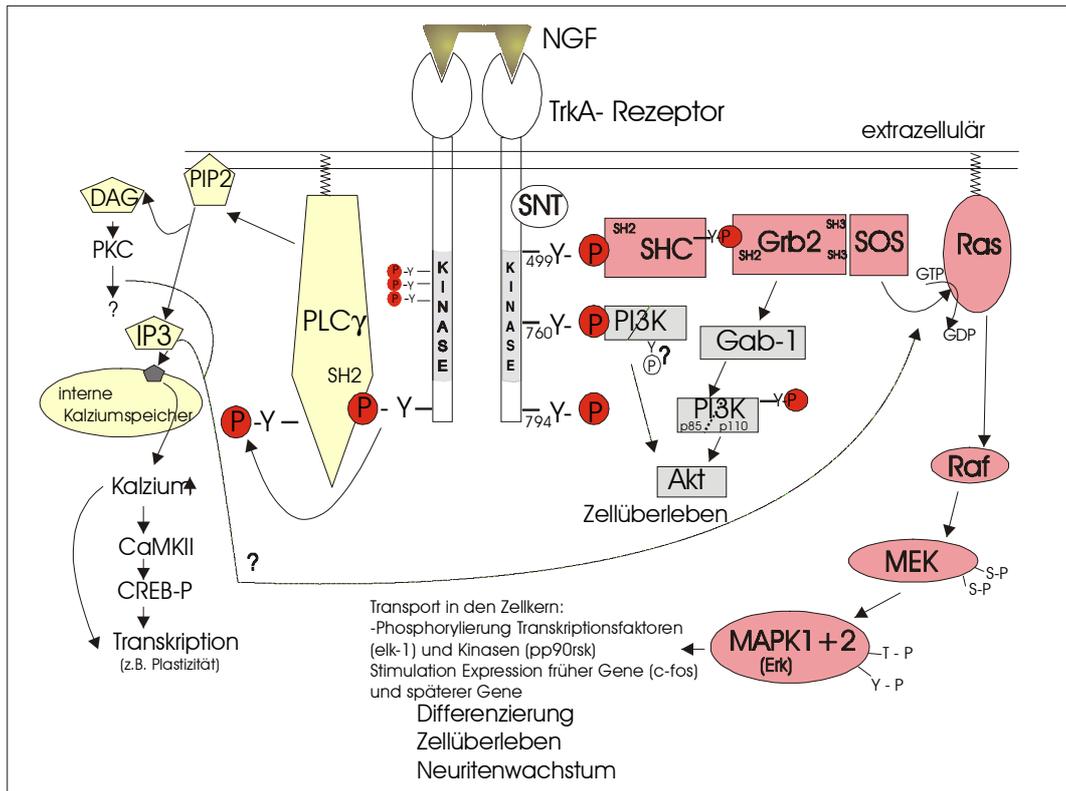


Abb. 1.2: Die wichtigsten Signaltransduktionswege exemplarisch für TrkA-Stimulation dargestellt (Zusammenfassung aus Segal und Greenberg, 1996*; Kaplan und Miller, 1997*; Kaplan, 1998*; Minichiello et al., 1998). Da die signalvermittelnden Tyrosine auch in TrkC und TrkB konserviert sind, werden sie ähnliche Signaltransduktionswege initiieren (zur Vereinfachung sind diese Tyr je nur an einem Trk Monomer dargestellt). Die Bindung von NGF an TrkA bewirkt eine Dimerisierung des TrkR und die Aktivierung der Kinasedomäne. Eine trans-Autophosphorylierung verstärkt die Tyr-kinaseaktivität, so daß auch die Tyr außerhalb der Kinasedomäne phosphoryliert werden. Das Tyr499 bindet in seiner phosphorylierten Form das zytosolische Adaptormolekül Shc, welches in seiner Tyr-phosphorylierten Form Grb-2 bindet. Grb-2 wirkt ebenfalls als Adaptor für die Bindung von SOS, welches somit in die Nähe der Zellmembran gebracht wird und den Austausch von GTP gegen GDP an dem farnesyliertem kleinen G-Protein Ras katalysiert. Ras-GTP stimuliert Raf, eine Ser-, Thr –Kinase, die wiederum Mek, eine Kinase mit zweifacher Spezifität, aktiviert. Mek phosphoryliert MAP-Kinase, die in ihrer phosphorylierten Form in den Nukleus transportiert wird und dort weitere Kinasen und Transkriptionsfaktoren phosphoryliert, wie z.B. Elk1, was letztendlich zur spezifischen Genexpression führt (am besten untersucht ist die Expression von c-fos). Diese Ras-MAPK-Signaltransduktion führt zur Zelldifferenzierung, Neuritogenese und zum Zellüberleben. Über diesen Weg wird auch die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB bewirkt. Über die Shc-Bindung wird auch der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) Weg aktiviert, wahrscheinlich über ein Grb-2 assoziiertes Protein (Gab-1), welches PI3K stimuliert. Es wird auch eine direkte Interaktion von PI3K mit TrkA über Tyr760 diskutiert. Auf diesem Weg wird ebenfalls das Zellüberleben, wahrscheinlich über die Aktivierung einer Akt-Ser/Thr-Kinase ermöglicht. Eine unabhängige Kaskade wird über die Bindung von PLCγ an das Tyr794 katalysiert, wodurch es zur Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-phosphat (PIP2) in Diacylglycerol (DAG) und Inositoltriphosphat (IP3) kommt. DAG stimuliert die Proteinkinase C (PKC). IP3 bindet an den IP3Rezeptor der intrazellulären Kalziumspeicher, wodurch Kalzium freigesetzt wird. Die erhöhte Kalziumkonzentration stimuliert CaMKII und somit die Phosphorylierung von CREB und kann zum einen die Transkription beeinflussen und, auch über andere Mechanismen, für Plastizitätsvorgänge von Bedeutung sein. SNT ist wahrscheinlich auch für manche Differenzierungsprozesse und für das Stoppen der Mitose verantwortlich.

1.1.2.2 Signaltransduktion über p75NTR

Zwei Funktionen werden p75NTR zugeordnet (Kaplan und Miller, 1997*). Einerseits kann p75NTR die Trk Rezeptorfunktion modifizieren (Erhöhung der hochaffinen Bindungsstellen, Verstärkung der Trk-Phosphorylierung und Erhöhung der Selektivität für den jeweiligen Liganden), andererseits wurden auch Trk-unabhängige Funktionen beschrieben.

Diese Signaltransduktion ist bislang noch sehr wenig verstanden und wird durch eine starke Trk-Aktivierung antagonisiert. Bislang wurde eine Erhöhung der Ceramidkonzentration, eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B und jun-Kinase-Aktivierung beobachtet. Die Verstärkung der Apoptose ist die am besten untersuchte biologische Konsequenz der p75NTR Aktivierung (wenn p75NTR isoliert aktiviert wird; z.B. Frade et al., 1996).

Die Qualität der Signalweiterleitung wird somit stark von dem relativen Trk-R : p75NTR Verhältnis in den jeweiligen Zellen abhängen, so daß man zusammenfassend sagen kann, daß die zeitlich und räumlich begrenzte Expression bestimmter Neurotrophin-Rezeptoren in einem bestimmten zellulären Kontext die biologische Aktivität der entsprechenden Neurotrophine determiniert.

1.1.3 Biologische Funktionen der Neurotrophine

Die biologische Bedeutung der Neurotrophine wurde mittels zahlreicher Experimente *in vitro* an isolierten Zellen oder Explantaten und *in vivo* durch externe Zugabe der Faktoren oder Neutralisierung ihrer Wirkung mit blockierenden Antikörpern (Ak) untersucht. Transgene Mäuse, bei denen die Neurotrophine oder deren Rezeptoren inaktiviert oder mutiert sind, lassen verfeinerte *in vivo* Analysen zu (Lewin und Barde, 1996*; Reichardt und Fariñas, 1997*, Minichiello et al., 1998).

Diese Experimente zeigen übereinstimmend, daß im Peripheren Nervensystem (PNS), vor allem in sensorischen und sympathischen Ganglien, spezifische Neuronenpopulationen während definierter Entwicklungsphasen von der Verfügbarkeit bestimmter Neurotrophine abhängen. Die „klassische“ Funktion der Neurotrophine in der Entwicklung des PNS wird durch die „Neurotrophe Hypothese“ beschrieben und hauptsächlich durch NGF erfüllt. Sie besteht darin, daß die Neurotrophine in limitierender Menge von den Zielgeweben ausgeschüttet und retrograd transportiert werden (Barde, 1989*). Die Konkurrenz um den Überlebensfaktor reguliert somit die Innervation des Zielgewebes (Levi-Montalcini, 1987*, Oppenheim, 1996*). Das Funktionsspektrum der Neurotrophine ist allerdings weitreichender. NT3 und TrkC werden ontogenetisch früher, nämlich vor der Innervation der Zielgewebe, exprimiert (z.B. NT3-Abhängigkeit migrierender Neuralleistenneuronen; Pinco et al., 1993) und beeinflussen die Differenzierung von Neuroblasten. In späteren Entwicklungsstadien können diese Neuronen von NGF abhängig werden. Eine veränderte Neurotrophin-Verfügbarkeit während der Entwicklung kann die Differenzierung steuern und phänotypische Veränderungen hervorrufen (z.B. Lewin et al., 1992), ein Charakteristikum, das auch im adulten NS durch den Einfluß von Neurotrophinen auf die Expression bestimmter Proteine (z.B. Neuropeptide und Transkriptionsfaktoren) und Neurotransmitter wichtig ist. Im Hinblick auf die durch Neurotrophine bewirkten plastischen Veränderungen (siehe 1.2.4) ist es interessant, daß die Richtung des Auswachsens von axonalen Wachstumskegeln sehr rapide durch Neurotrophin-Gradienten beeinflusst wird (Gallo et al., 1997).

Ganz im Gegensatz zu den genannten definierten Neurotrophin-Abhängigkeiten bestimmter Zellpopulationen in PNS, gibt es im Zentralen Nervensystem (ZNS) keine so deutlichen Effekte, wenn einzelne Neurotrophine blockiert werden, was durch die Redundanz trophischer Faktoren erklärt werden kann. Damit wird das Überleben einer gegebenen Population von Neuronen durch mehr als einen neurotrophen Faktor sichergestellt. Allerdings kann das Fehlen schon eines neurotrophen Faktors den Verlust spezifischer Funktionen im ZNS bedeuten. Die weite Expression von Neurotrophinen und ihrer Rezeptoren auch im adulten ZNS und dort vor allem im Kortex und Hippokampus läßt auf weitere, subtilere Funktionen einzelner Neurotrophine vor allem in Prozessen der aktivitätsabhängigen Plastizität schließen.

1.2 Neurotrophine und synaptische Plastizität

1.2.1 Aktivitätsabhängige Regulation der Neurotrophin-Transkription

Im ZNS werden BDNF, NGF und NT3 unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich von Neuronen exprimiert, welche die Synthese der mRNAs für NGF und BDNF (Lindholm et al., 1994*) und für NT3 (Patterson et al., 1992) über ihre Aktivität regulieren können. Dieses Phänomen wurde zuerst nach sehr starken Stimulationen in epileptischen Entladungen beobachtet (Gall und Isackson, 1989; Zafra et al., 1990) und eingehender in *in vitro* Systemen untersucht, in denen ein kalziumabhängiger (über L-Typ Kalziumkanäle) Anstieg der BDNF- und NGF-mRNA nach Depolarisation nachgewiesen wurde (Zafra et al., 1990). Eine Hochregulation wird durch Glutamat (über NMDA- und Nicht-NMDA-Rezeptoren), über ACh (über muskarinische Rezeptoren) und eine Herunterregulation über den inhibitorischen Transmitter GABA (über GABA_A-Rezeptoren) bewirkt (Zafra et al., 1990; 1991). Auch physiologisch relevante Stimuli beeinflussen die BDNF-Transkription: Im visuellen Kortex von Ratten wird die BDNF-mRNA nach Inhibition des sensorischen Inputs durch intraokuläre Injektion von Tetrodotoxin (TTX) oder Aufzucht im Dunklen schnell herunterreguliert und steigt schon 1 h nach Lichtexposition wieder auf Normalwerte an (Castrén et al., 1992). Langzeitpotenzierung (LTP) induzierende Stimuli (siehe 1.2.5, Abb. 1.3) sind ebenfalls in der Lage, eine Hochregulation der mRNA für BDNF und NT3 zu bewirken (Patterson et al., 1992). Die Synthese von BDNF wird über vier verschiedene Promotoren⁵ geregelt (allerdings wird von jedem Transkript das gleiche Protein transkribiert), die differentiell in Abhängigkeit von neuronaler Aktivität aktiviert werden (Metsis et al., 1993). Das Transkript III (welches am stärksten durch Aktivität induziert wird) enthält in seiner Promotorregion Bindungsstellen für kalziumabhängige (abhängig von Kalziumeinstrom über L-Typ Kanäle) Transkriptionsfaktoren der CREB-Familie, die mit vielfältigen aktivitätsabhängigen Langzeitveränderungen in Verbindung gebracht werden. Durch die kalziumabhängige Bindung dieser Transkriptionsfaktoren an die Promotorregion wird die BDNF Transkription verstärkt, so daß ein Mechanismus vorliegt, durch den die BDNF Synthese mit neuronaler Aktivität verbunden ist (Shieh et al., 1998; Tao et al., 1998).

Inwieweit die verstärkte Neurotrophin-mRNA Synthese zur Erhöhung der Neurotrophin-Proteinsynthese führt, ist bislang unzureichend untersucht und kann nur vermutet werden, da z.B. nach starker Stimulation mit Kainat im Kortex nach ca. 12 h siebenfach erhöhte BDNF Werte gemessen wurden (Aloyz et al., 1999) und auch, wie im nächsten Kapitel beschrieben wird, die Neurotrophin-Freisetzung aktivitätsabhängig verstärkt wird.

Interessanterweise werden auch die mRNAs für die Trk-R durch eine verstärkte Aktivität z.B. nach einer Glutamatstimulation (Falkenberg et al., 1996) hochreguliert.

1.2.2 Aktivitätsabhängige Freisetzung von Neurotrophinen

Physiologische Bedeutung erlangen die Neurotrophine erst nach ihrer Freisetzung in den Extrazellulärraum; als Mediatoren synaptischer Plastizität sollte ihre Verfügbarkeit lokal streng reguliert und mit Aktivität gekoppelt sein.

Eine aktivitätsabhängige Neurotrophin-Freisetzung wurde bislang aus Zelllinien (welche die Fähigkeit zur regulierten Sekretion besitzen, wie PC12 oder ATT20-Zellen: Heymach et al., 1996) und dissoziierten Neuronen des Hippokampus (Blöchl und Thoenen, 1995, Goodman et al., 1996; Griesbeck et al., 1999) gezeigt. Da die verfügbaren Nachweismethoden nicht sensitiv genug sind, die sehr geringen endogenen Neurotrophin-Mengen zu messen, wurden Neurotrophine für diese Studien in der Regel mittels Transfektion oder viraler Transduktion überexprimiert. Nur die Verwendung akuter hippokampaler Schnittkulturen ermöglichte eine

⁵ Das Gen für BDNF enthält vier verschiedene kurze 5' Exone und ein 3' Exon welches für das BDNF Protein kodiert. Jedes 5' Exon steht unter der Kontrolle eines spezifischen Promotors, so daß nach alternativen Spleißen vier verschiedene Transkripte erhalten werden mit je zwei unterschiedlichen 3'UTRs (untranslatierte Regionen).

Bestimmung freigesetzter endogener NT (Blöchl und Thoenen, 1995; Griesbeck et al., 1999). Die in diesem System gewonnenen Ergebnisse waren in guter Übereinstimmung mit den Freisetzungsexperimenten aus überexprimierenden Kulturen, die demnach ein geeignetes Modellsystem darstellen.

1.2.2.1 Freisetzende Stimuli

Neuronen, die 5 min mit KCl, Glutamat oder Carbachol (ein Agonist des muskarinischen ACh-Rezeptors) stimuliert wurden, zeigen eine ca. 3-4 mal höhere NGF-Sekretion als unter Kontrollbedingungen (Blöchl und Thoenen, 1995). Die Freisetzung von NGF durch KCl konnte durch TTX blockiert werden, was zeigt, daß die Freisetzung entweder von einem Natriumeinstrom per se oder der Auslösung von Aktionspotentialen abhängig ist. Die glutamatinduzierte Freisetzung wird über AMPA-Rezeptoren vermittelt. Dies konnte gezeigt werden, da ein spezifischer Inhibitor des AMPA-Rezeptors (aber nicht des NMDA-Rezeptors und auch nicht TTX) die Freisetzung blockiert. Neuere Untersuchungen zeigten allerdings eine Erhöhung der BDNF-Sekretion nach Stimulation mit NMDA für 2-5 min (Marini et al., 1998) aus Körnerzellen des Cerebellums. Sehr wahrscheinlich stimuliert Glutamat die Sekretion auch über die Aktivierung metabotroper Glutamatrezeptoren (mGluR; Blöchl und Thoenen, 1996; mündliche Mitteilung M. Canossa).

Interessanterweise induzieren die Neurotrophine selbst ihre Freisetzung (Canossa et al., 1997; Krüttgen et al., 1998) und initiieren somit eine positive Rückkopplung über Trk-R. Die so induzierte Freisetzung ist ebenfalls transient (vergleichbar mit glutamatinduzierter Freisetzung) und somit zeitlich limitiert.

1.2.2.2 Die Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern ist notwendig und ausreichend für die regulierte Neurotrophin-Freisetzung

Die stimulierte Freisetzung ist ungewöhnlicherweise nicht abhängig von der Verfügbarkeit extrazellulären Kalziums, aber abhängig von der Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären, koffeinsensitiven Kalziumspeichern, da die durch KCl- oder Glutamat stimulierte Freisetzung blockiert wurde, wenn entweder intrazelluläres Kalzium chelatiert wurde (BAPTA-AM) oder die intrazellulären Kalziumspeicher vorher entleert wurden (Blöchl und Thoenen, 1995; Griesbeck et al., 1999). Außerdem ist die Freisetzung von Kalzium aus diesen Speichern (z.B. durch Koffein) ausreichend, um Neurotrophine freizusetzen. Auch die Stimulation von mGluR, TrkR und mAChR bewirkt eine Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern und gleichzeitig eine Neurotrophin-Freisetzung. Andere Untersuchungen zeigten allerdings eine Abhängigkeit der BDNF-Freisetzung von extrazellulärem Kalzium (Goodman et al., 1996), ein Phänomen, welches bislang nur durch die unterschiedlichen experimentellen Bedingungen erklärt werden kann (Griesbeck et al., 1999). In der Regel ist die Exozytose klassischer Neurotransmitter aus synaptischen Vesikeln und die von Neuropeptiden aus sekretorischen Granula abhängig vom Einstrom von Kalzium aus dem Extrazellulärraum. In einigen Studien wurden allerdings auch kalziumunabhängige Freisetzungseignisse, z.B. für Dopamin (Bergquist et al., 1998), gezeigt. Mechanismen dafür sind hypothetisch: wahrscheinlich ist die Mobilisierung von Kalzium aus intrazellulären Speichern ausreichend (z.B. in *Aplysia* wird in kalziumfreiem Medium durch Insulinzugabe Kalzium allein aus intrazellulären Speichern freigesetzt, was für eine Peptidsekretion ausreicht: Jonas et al., 1997), in manchen Fällen könnte auch eine artifizielle Umkehr des Austauschers diese Freisetzung verursachen (Adam-Vizi, 1992). Insofern ist es wichtig, die Freisetzungsmechanismen für Neurotrophine und ihre intrazellulären Speicherkompartimente zu identifizieren, um den Mechanismus der ungewöhnlichen Freisetzung zu verstehen und die zum Teil unterschiedlichen Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen zu erklären.

1.2.2.3 Vergleich der Freisetzung von NGF mit anderen Neurotrophinen

Die Freisetzung von BDNF ist unter identischen experimentellen Bedingungen vergleichbar mit der von NGF (Griesbeck et al., 1999); auch in der NT3-, NGF- und BDNF-Sekretion aus PC12 Zellen konnten keine Unterschiede festgestellt werden (Heymach et al., 1996). Im Gegensatz dazu steht eine Studie (Mowla et al., 1999), die Unterschiede zwischen den Neurotrophinen zeigt. Demnach wird NGF nur auf konstitutivem Wege und BDNF über den regulierten Weg freigesetzt. Die Diskrepanz zu vorangegangenen Untersuchungen wird durch die Fehlleitung des „überschüssigen“ NGF in den regulierten Sekretionsweg auf Grund der artifiziellen Überexpression erklärt. Diese Hypothese wird allerdings dadurch entkräftet, daß eine aktivitätsabhängige NGF-Freisetzung aus nichttransduzierten hippokampalen Schnittkulturen (Blöchl et al., 1995) und aus stabil (und somit in geringen Mengen) NGF-exprimierenden Zelllinien (Heymach et al., 1996) gemessen wurde (siehe ausführlicher Erläuterungen in Abschnitt 4.2.2).

Verglichen mit Glutamat scheinen die Neurotrophine etwas zeitverzögert nach Stimulation freigesetzt zu werden (Griesbeck et al., 1999); allerdings ist die zeitliche Auflösung der Freisetzung in den Perfusionskammern experimentell bedingt limitiert (Limitierung: Totvolumen der Kammer und Schläuche, Zeit bis zum vollständigen Erreichen der maximalen Konzentration in der Kammer nach Pufferaustausch, Perfusionsgeschwindigkeit). Die Freisetzung ist auch bei längerandauernder Stimulation mit KCl oder Glu nur transient (wahrscheinlich < 1 min, Griesbeck et al., 1999). Eine bessere Auflösung kinetischer Parameter der Neurotrophin-Freisetzung sollte es ermöglichen, detailliertere Informationen über ihre Speicherform, das Vorhandensein eventueller Reservepools und ihre Kalziumabhängigkeit zu erhalten.

1.2.3 Ort der Neurotrophin-Freisetzung

Wie und ob die Neurotrophinwirkung lokal beschränkt bleibt, ist vor allem im Hinblick auf das Verständnis ihrer Funktion in Prozessen aktivitätsabhängiger synaptischer Plastizität von entscheidender Bedeutung. Die Funktion der Neurotrophine in der Modulation synaptischer Effizienz (siehe unter 1.2.5) würde auf eine auf die Synapse beschränkte Neurotrophin-Sekretion hindeuten (dann könnten Neurotrophine eventuell auch spezifisch individuelle Synapsen beeinflussen⁶). Andererseits ist die Wirkung eines Neuromodulators im Gegensatz zu klassischen Neurotransmittern oft extrasynaptisch. Bislang gibt es noch keine detaillierten Untersuchungen zu Neurotrophin-Freisetzungsorten. Eine grobe Lokalisierung der Neurotrophin-Sekretion wurde durch Studien erreicht, die NGF nach Freisetzung auf der neuronalen Oberfläche mittels Immunofluoreszenz nachwies und eine präferentiell neuritische Freisetzung (von Axonen und Dendriten) im Vergleich zum Zellsoma feststellten (Blöchl et al., 1996). Da Neurotrophine (nach Überexpression, siehe 1.3.1) sowohl in die Axone als auch in die Dendriten transportiert werden (Blöchl und Thoenen, 1996; Haubensak et al., 1998), ist eine dendritische Freisetzung durchaus möglich.

⁶ Eine auf individuelle Synapsen beschränkte Neurotrophin-Sekretion könnte durch verschiedene Mechanismen reguliert werden:

-Die Aktivität einer spezifischen Synapse könnte eine Freisetzung lokal an dieser Synapse ermöglichen, wenn die lokale Erregung so groß ist, daß der resultierende lokale Kalziumeinstrom für eine Sekretion ausreicht oder durch das Anschalten spezifischer Signaltransduktionswege, die eine Freisetzung ermöglichen. Dann würden Neurotrophine sich eventuell wie „retrograde messenger“ verhalten, die postsynaptisch nur von spezifisch verstärkten Synapsen freigesetzt werden und der präsynaptischen Seite diese Veränderungen signalisieren (Hawkings et al., 1993).

-Neurotrophine oder deren mRNA könnten auch spezifisch an bestimmte Synapsen oder Spines transportiert werden. Diese Spezifität würde mit der Theorie des „synaptic tags“ übereinstimmen (Frey und Morris, 1997), die postuliert, daß synaptische Modifikationen die Ausbildung eines bestimmten proteinsyntheseunabhängigen Markers bewirken, der die potenzierte Synapse markiert und Langzeitveränderungen vorbereitet.

1.2.3.1 Dendritische Freisetzung – allgemeine Untersuchungen

Eine dendritische Freisetzung von Neurotransmittern und -peptiden wurde von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt. Vor allem die Freisetzung von Dopamin wurde in dieser Hinsicht gut untersucht (Ludwig et al., 1998*), aber auch die von Neuropeptiden wie Oxytocin und Vasopressin (Kombian et al., 1997). Dynorphin wurde im Gyrus Dentatus in LDCV („large dense core vesicles“: große Vesikel mit einem elektronendichten Kern) von Axonen und Dendriten nachgewiesen (Drake et al., 1994). Eine kalziumabhängige dendritische Exozytose wurde auch in dissoziierten hippokampalen Neuronen beschrieben (Maletic-Savatic, 1998). In diesen Experimenten wurden die Postgolgi-Kompartimente durch einen Membranfarbstoff (FM1-43) sichtbar gemacht, so daß die Exozytose aus den Dendriten direkt fluoreszenzmikroskopisch beobachtet werden konnte. Ein weiterer, indirekter Nachweis für dendritische Exozytosevorgänge und deren physiologischer Bedeutung wurde durch Experimente erbracht, in denen die postsynaptische Injektion von Agenzien, die spezifisch mit Exozytoseprozessen interferieren, die Entwicklung einer LTP (siehe auch 1.2.5, Abb. 1.3) nach tetanischer Stimulation verhinderte (Lledo et al., 1998).

1.2.4 Physiologische Bedeutung der aktivitätsabhängigen Neurotrophin-Freisetzung

Ein gut untersuchtes *in vivo* Modellsystem für Studien zur aktivitätsabhängigen Plastizität ist der visuelle Kortex von Katzen, in dem es während der Entwicklung zu einer deutlichen Segregation axonaler Projektionen in Abhängigkeit von visuellen Erfahrungen kommt (Hubel und Wiesel, 1970). Lokale Infusion von BDNF während dieser Entwicklungsperiode verhindert die axonale Segregation (Cabelli et al., 1995). Eine interferierende Bindung der TrkB Liganden (BDNF und NT4/5) durch Infusion von TrkB-IgG Fusionsproteinen zeigt gleiche Effekte, was durch die fehlende Konkurrenz der Axone um BDNF oder NT4/5 (Cabelli et al., 1997) oder durch eine Beeinflussung der GABAergen Interneuronen über BDNF (Marty et al., 1997; Galuske et al., 1996) erklärt werden kann. Diese Experimente zeigen die physiologische Bedeutung der Neurotrophine in plastischen Veränderungen *in vivo*, doch eignet sich dieses recht komplexe System nicht, um Mechanismen der Neurotrophinwirkung aufzuklären. Deshalb wurden *in vitro* Systeme (Kokulturen aus Myozyten und Motoneuronen aus *Xenopus*, hippokampale oder kortikale Schnittkulturen, dissoziierte Kulturen hippokampaler oder kortikaler Neurone, Synaptosomenpräparationen) herangezogen, die Untersuchungen synaptischer Parameter unter vereinfachten Bedingungen auch auf molekularer Ebene gestatten.

Außerdem wird es durch diese detaillierteren Methoden möglich zu unterscheiden, ob die Neurotrophine im ZNS wie im PNS über die Beeinflussung von Entwicklungsprozessen wirken oder ob sie auch an akuten Veränderungen synaptischer Funktionen innerhalb kurzer Zeitperioden von wenigen Minuten beteiligt sind⁷.

1.2.5 *In vitro*-Systeme zur Untersuchung der Mechanismen der Neurotrophinwirkung

In diesem Abschnitt sollen neurotrophinvermittelte, schnelle synaptische Modulationen beschrieben werden, die vor dem Einsatz definierter Genexpression wirksam sind (Berninger und Poo, 1996*; McAllister et al., 1999*; Schuman, 1999*), wobei unterschieden werden soll, ob die präsynaptische Seite (Wahrscheinlichkeit von Freisetzungsprozessen; Anzahl synaptischer Vesikel) oder die postsynaptische Seite (Erregbarkeit der postsynaptischen Membran über Modulation der Rezeptorsensitivität) beeinflusst wird.

⁷ Dieser Aspekt muß vor allem bei der Analyse von Neurotrophin- oder Trk-defizienten Mäusen berücksichtigt werden, die im PNS im Gegensatz zum ZNS starke Defekte aufweisen, und auch schwächere Effekte im ZNS über die Zeit akkumulieren können.

1.2.5.1 Untersuchungen zum Ort der Neurotrophinwirkung: prä- oder postsynaptische Modifikationen

Präsynaptische Modifikationen

Erste Untersuchungen an Kokulturen von Myozyten und Motoneuronen aus *Xenopus* zeigten eine spezifisch NT3-vermittelte Erhöhung der Frequenz spontaner postsynaptischer Ströme⁸ und eine verstärkte Amplitude evozierter synaptischer Ströme (Lohof et al., 1993); was auf eine verstärkte ACh-Freisetzung aus den Terminalien hinweist. Auch an ZNS-Synapsen hippokampaler Kulturen wurde nach Neurotrophin-Zugabe die glutamaterge Transmission über AMPA-Rezeptoren durch eine transient erhöhte Glutamatfreisetzung (spontan und evoziert) verstärkt (Leßmann et al., 1994). Biochemische Messungen der ACh- und Glutamatfreisetzung aus hippokampalen oder kortikalen Synaptosomen (Knipper et al., 1994a/b; Takei et al., 1998; Sala et al., 1998) oder der Dopaminfreisetzung aus mesenzephalischen Neuronen (Blöchl und Sirrenberg, 1996) zeigten ebenfalls eine verstärkte Neurotransmitterfreisetzung nach Neurotrophin-Zugabe, wobei in manchen Fällen nur die stimulusinduzierte, aber nicht die basale Freisetzung modifiziert wurde (Knipper et al., 1994; Sala et al., 1998). Andererseits wird die inhibitorische Transmission an der CA3/CA1 Synapse in hippokampalen Schnitten durch die Zugabe von Neurotrophinen transient vermindert (Frerking et al., 1998). Diese Veränderung der Transmitterfreisetzung kann durch Modifikationen von Proteinen synaptischer Vesikel ausgelöst werden; so z.B. der Phosphorylierung von Synapsin-1 über einen MAP-Kinase Weg (Jovanovic, 1996). Über Zeiträume von 2-3 Stunden beeinflusst BDNF den Gehalt an synaptischen Vesikelproteinen (Pozzo-Miller et al., 1999). So konnte durch die Zugabe von BDNF zu Schnittkulturen von BDNF defizienten Mäusen der Gehalt an den vesikulären Transmembranproteinen Synaptophysin und Synaptobrevin auf die Mengen in Wildtyp-Tieren erhöht werden. Die Anzahl der synaptischen Vesikel, die nahe an der Plasmamembran lokalisiert und somit wahrscheinlich im freisetzungskompetenten Zustand sind, ist in den BDNF defizienten Mäusen erniedrigt (bei gleicher Vesikelzahl insgesamt), so daß Neurotrophine eventuell auf die selektive Beeinflussung der Freisetzungskompetenz synaptischer Vesikel über schnelle posttranslationale Modifikationen und Translationskontrolle (Takei et al., 1997) einwirken.

Postsynaptische Modifikationen

Da die BDNF abhängige Potenzierung der synaptischen Transmission durch postsynaptische Injektionen eines Tyrosinkinase-Rezeptorblocker (K252a) spezifisch verhindert und durch Injektion eines Phosphataseinhibitors (Okadaäure) verstärkt werden kann (Levine et al., 1995), wurde nach postsynaptischen Modifikationen gesucht. BDNF phosphoryliert die NR1 Untereinheit des NMDA-Rezeptors (Suen et al., 1997), was zur erhöhten Transmission, zum Beispiel über eine höhere Öffnungswahrscheinlichkeit dieses Rezeptors (Levine et al., 1998), führt. Die inhibitorische Transmission wird innerhalb von 5 min durch BDNF über die Wirkung auf GABA_A-Rezeptoren vermindert, ein Effekt, der durch postsynaptische Injektionen von entweder K252a, eines PLC-Inhibitors, oder des Kalziumchelators BAPTA blockiert werden kann (Tanaka et al., 1997). Dieser Effekt könnte durch CaMKII vermittelt werden, die nach Neurotrophin-Stimulation phosphoryliert wird (Blaque et al., 1997; Crozier et al., 1999).

⁸ Die erhöhte Frequenz spontaner postsynaptischer Ströme wird in der Regel durch eine erhöhte Transmitterfreisetzung begründet, da die Anzahl der Freisetzungseignisse zunimmt, während eine erhöhte Amplitude über die verstärkte Aktivierbarkeit der postsynaptischen Rezeptoren erklärt wird. Diese Interpretation ist nicht in allen Fällen gültig, da es zum Beispiel auf der postsynaptischen Seite zur zusätzlichen Integration von Glutamatrezeptoren (eventuell mit anderer Zusammensetzung der Untereinheiten) kommen kann, die auch die Frequenz spontaner Ereignisse erhöhen würden (Isaac, 1997). Außerdem liegt dieser Interpretation zugrunde, daß die Freisetzung in Quanten, also homogenen Transmitterpäckchen, geschieht: eine Hypothese die zur Zeit auch umstritten ist (Liu, 1998).

1.2.5.2 Weitere schnelle synaptische Modulationen durch Neurotrophine

Auch morphologische Änderungen können innerhalb von Sekunden bis Minuten durch Neurotrophin-Applikation verursacht werden. So verändern axonale Wachstumskegel ihre Orientierung (Wang und Zheng, 1998) und kortikale Spinestrukturen werden nach Überexpression von BDNF destabilisiert (Horch et al., 1999).

Auch postranslationale Einflüsse auf Ionenkanäle durch Neurotrophine wurden beschrieben (Li et al., 1999: unselektiver Kationenkanal wird PLC (Phospholipase) abhängig in seiner Leitfähigkeit verstärkt; Holm et al., 1997: Aktivierung eines kalziumabhängigen Kaliumkanals vermindert Membranerregbarkeit).

Diese Daten zeigen deutlich, daß die schnellen Wirkungen der Neurotrophine über prä- und /oder postsynaptische Effekte vermittelt werden können⁹, wobei zu untersuchen bleibt, welche Effekte unter definierten physiologischen Bedingungen vorherrschen. Ein System, in dem prä- und postsynaptische Mechanismen sehr gut isoliert untersucht werden können, ist die CA3/CA1 Verschaltung im Hippokampus.

1.2.5.3 Das hippokampale CA1/CA3 System und Langzeitpotenzierung (LTP)

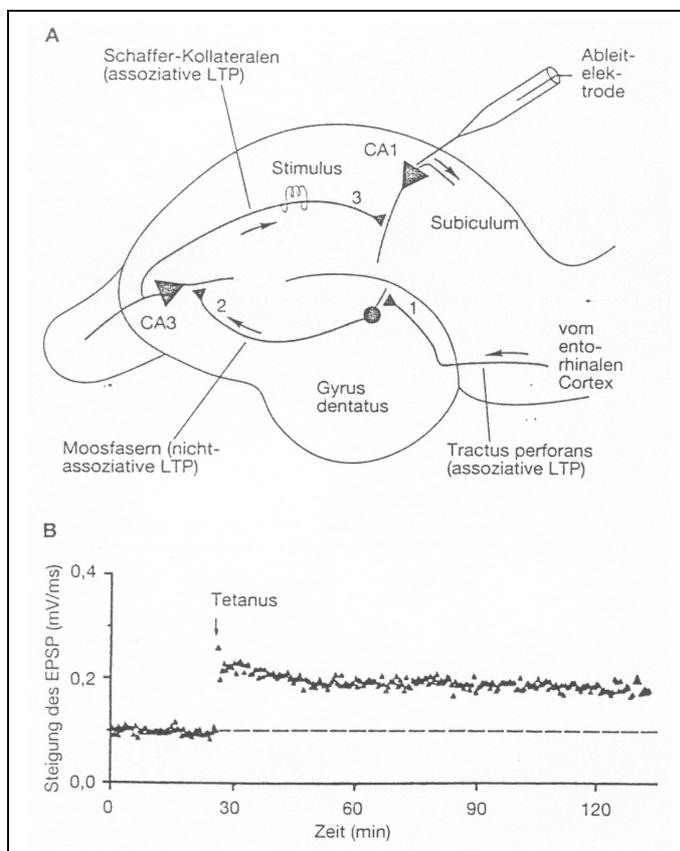


Abb. 1.3: Langzeitpotenzierung im Hippokampus.

A: Schematische Darstellung des Hippokampus mit den wichtigsten Verbindungen. Die mehrheitliche erregenden Axone des Tractus perforans (1) enden an den Körnerzellen des Gyrus dentatus, deren Axone die Moosfasern (2) bilden, die an den Pyramidenzellen der CA3 Region terminieren. Die CA3 Pyramidenzellen projizieren über die Schaffer Kollateralen (3) zu den Pyramidenzellen der CA1 Region. Die CA3/CA1 Verbindung wurde bislang am besten hinsichtlich der Ausbildung einer LTP untersucht. **B:** Das Diagramm zeigt exemplarisch eine LTP-Messung in der CA1 Region nach tetanischer Stimulation der Schaffer-Kollateralen. Alle 10 s wurde ein Testreiz gegeben und die EPSPs (excitatory postsynaptic potentials = exzitatorische postsynaptische Potentiale) extrazellulär abgeleitet. Die Steigung der EPSPs ist ein Maß für die synaptische Effizienz, die deutlich und langanhaltend nach tetanischer Stimulation zunimmt (aus Kandel et al., 1996)

⁹, Auch die Trk-R wurden immunohistochemisch sowohl prä- als auch postsynaptisch lokalisiert (Drake et al., 1999).

Das Phänomen der Langzeitpotenzierung (LTP; Bliss und Collinridge, 1993) wurde besonders intensiv an der synaptischen Verbindung zwischen den CA3 Axonen (Schaffer-kollateralen) und den CA1-Pyramidenzellen untersucht und ist ein zelluläres Modell für Gedächtnis- und Lernvorgänge (Abb. 1.3). Durch entweder gleichzeitig prä- und postsynaptische Reizung der CA3 und CA1 Pyramidenzellen oder hochfrequente tetanische Stimulation der Schaffer-kollateralen kommt es zu einer erhöhten glutamatergen Transmission an diesen Synapsen, die abhängig von NMDA-Rezeptoren und postsynaptischem Kalzium ist und über mehrere Stunden anhalten kann. Dieses System ist pharmakologisch gut zu beeinflussen, außerdem ist eine klare Unterscheidung zwischen prä- und postsynaptischen Neuronen möglich. Ob die synaptische Transmission durch die Applikation von Neurotrophinen per se beeinflusst wird ist auch hier umstritten (McAllister et al., 1999*, Schuman, 1999*), doch ein Einfluß von Neurotrophinen auf evozierte LTP wurde von etlichen Gruppen beschrieben. In Mäusen, deren BDNF-Gen inaktiviert oder mutiert wurde, ist die LTP drastisch reduziert (Korte et al., 1995; Patterson et al., 1996; Pozzo-Miller et al., 1999). Da eine Reapplikation von BDNF durch adenoviral vermittelten Gentransfer (Korte et al., 1996) oder exogene Zugabe von BDNF (Patterson et al., 1996) die LTP fast auf Normalwerte herstellen konnte, sind die BDNF vermittelten Effekte spezifisch, innerhalb von kurzer Zeit wirksam und nicht durch Entwicklungsdefekte in den BDNF-defizienten Mäusen verursacht. Diese Beobachtungen werden durch Experimente unterstützt, in denen mit der Verfügbarkeit des endogenen BDNF interferiert wird (Applikation von TrkB-IgG oder anti-BDNF-Ak: Figurov et al., 1996; Kang et al., 1997; Chen et al., 1999), wodurch die LTP innerhalb kurzer Zeit reduziert wird. Interessanterweise ist die nach 3 h gemessene Potenzierung (die abhängig von Proteinsynthese ist) in BDNF defizienten Mäusen vollständig blockiert (Korte et al., 1998), was darauf hinweist, daß BDNF in den Prozessen, die durch eine Neusynthese von Proteinen einen Übergang von kurz- zu langfristigen synaptischen Veränderungen bewirken, von Bedeutung ist. Die Fähigkeit, eine LTP zu entwickeln, setzt in der Entwicklung parallel mit der Expression von BDNF ein. Eine exogene BDNF-Applikation zu einem früherem Entwicklungszeitpunkt, an dem normalerweise keine LTP induziert werden kann, ermöglicht eine LTP-Expression (Figurov et al., 1996).

Diese Experimente zeigen zwar, daß die Verfügbarkeit von BDNF für die LTP wichtig ist, doch können sie die Frage nach dem Zeitpunkt, an dem BDNF tatsächlich benötigt wird, nur recht grob beantworten [Chen et al., (1999) zeigen, daß endogenes BDNF kurz vor und während der LTP-Induktion, doch nicht während der gesamten Zeit der LTP benötigt wird]. Auch ob die Funktion von BDNF eine eher permissive ist (d.h. die basale Verfügbarkeit von BDNF wichtig ist) oder ob BDNF durch den LTP-induzierenden Stimulus freigesetzt wird, muß noch genauer untersucht werden.

1.2.6 Koinzidenz der Neurotrophin-Freisetzung mit elektrischen bzw. physiologisch relevanten Stimuli

Trotz zahlreicher Untersuchungen zur Freisetzung der Neurotrophine und ihrer modulatorischen Wirkung, ist es bislang noch nicht gelungen, einen kausalen Zusammenhang herzustellen. Für das Verständnis der Neurotrophinwirkung ist es wichtig zu unterscheiden, ob die konstitutive Verfügbarkeit der Neurotrophine ausreichend (Bereitstellung über die Freisetzung durch z.B. Basalaktivität) für ihre Funktionen in synaptischen Prozessen ist oder ob sie diese Funktion erst dann erfüllen, wenn ihre Konzentration zu definierten Zeiten lokal durch eine aktivitätsabhängige Freisetzung stark erhöht ist. D.h. wird die Neurotrophinwirkung durch transiente Konzentrationserhöhungen qualitativ verändert? Im ersten Falle wären phänotypische Veränderungen an den Synapsen über längere Zeiträume wichtig, welche die generelle Erregbarkeit der Zelle erhöhen (Pozzo-Miller et al., 1999 zeigen beispielsweise, daß BDNF synaptische Proteine hochreguliert und die Anzahl synaptischer Vesikel erhöht). Im zweiten Falle würden sehr schnelle Effekte der Neurotrophine eine Veränderung der synaptischen

Transmission bewirken. In Experimenten, in denen die LTP durch BDNF-Adenoviren wiederhergestellt werden konnte (Korte et al., 1996), wurde die notwendige zeitliche Auflösung nicht erreicht, da BDNF auch schon während der Infektionszeit aus nichtneuronalen Zellen freigesetzt wird. Die Zeitauflösung bei Zugabe von exogenem BDNF (Patterson et al., 1996) oder bei der Blockade endogenem BDNF durch Ak (Chen et al., 1999) ist ebenfalls limitiert, da BDNF bzw. die Ak nicht sofort in den Schnitt penetrieren. Experimente, mit denen direkt eine BDNF-Freisetzung nach LTP Induktion gezeigt werden könnte, sind technisch schwierig auf Grund der sehr geringen endogenen Mengen an BDNF, die durch Stimulation von nur wenigen Zellen freigesetzt werden können.

Eventuell ist ein spezifisches Erregungsmuster und nicht nur Aktivität per se zur Neurotrophin-Freisetzung notwendig. Ein Hinweis darauf gaben Untersuchungen, die zeigen, daß die LTP nur nach bestimmten LTP-Induktionsprotokollen (TBS, Tetanus oder koinzidente prä- und postsynaptische Reizung) BDNF-abhängig ist (Schuman et al., 1996, Figurov et al., 1996; Chen et al., 1999). Wie dieses Phänomen erklärt werden kann, ist noch umstritten, aber eine Erklärung könnte sein, daß BDNF nur durch bestimmte LTP-induzierende Stimuli freigesetzt wird und die LTP auch nur unter diesen Stimulationsbedingungen BDNF abhängig ist.

Eine Form synaptischer Plastizität konnte direkt mit der aktivitätsabhängigen BDNF-Freisetzung korreliert werden, und zwar die Veränderung der quantalen Amplitude⁸ (entspricht der Stärke AMPA-Rezeptor vermittelter synaptischer Ströme) intrakortikaler Synapsen (Rutherford et al., 1998). Rutherford et al. (1998) beobachteten, daß die quantale Amplitude vergrößert wird, wenn die generelle neuronale Aktivität in der Kultur reduziert ist und umgekehrt. Die Zugabe von BDNF zu diesen Kulturen verhinderte den Effekt der Aktivitätsblockade, während die Blockade von endogenem BDNF durch TrkB-IgG-Applikation ebenfalls die quantale Amplitude vergrößert, also den Effekt der Aktivitätsblockade reproduzierte. Folgendes Modell der BDNF-Wirkung wurde daraufhin vorgeschlagen: bei hoher Aktivität wird BDNF aus exzitatorischen Neuronen ausgeschüttet und bewirkt eine Verminderung der Erregbarkeit exzitatorischer Neuronen, d.h. die BDNF Sekretion wird direkt durch die Aktivität von Neuronen verursacht. Da BDNF dosisabhängig auf die quantale Amplitude wirkt, wäre eine kontinuierliche Regulation der BDNF-Freisetzung und der Aktivitätsregulation möglich.

Um zeit- und ortsspezifische Wirkungen von Neurotrophinen in plastischen Prozessen zu verstehen, muß aufgeklärt werden, inwieweit die aktivitätsabhängige Neurotrophin-Freisetzung von physiologischer Bedeutung ist und wie weit ihre Wirkung in situ tatsächlich reicht (z.B. ist die Diffusion durch den Extrazellulärraum erschwerter als unter Kulturbedingungen).

1.3 Lokalisierung endogener Neurotrophine und Trk-Rezeptoren

Es gibt prinzipiell mehrere Möglichkeiten, ein lokales, eventuell sogar auf einzelne Synapsen beschränktes Neurotrophin-Signal zu erzeugen:

- Unter 1.2.3 wurde bereits die Möglichkeit einer ortsspezifischen Neurotrophin-Freisetzung diskutiert.
- Auch eine lokale membranständige Expression der Trk-R würde den Wirkungsort der Neurotrophine lokal begrenzen.
- Die Modulation der Neurotrophinwirkung durch gleichzeitig ausgelöste Signale, die entweder synergistisch (z.B. Synergismus der BDNF und CTNF Wirkung: Stoop und Poo, 1995; Synergismus mit neuronaler Aktivität: in manchen Fällen können Neurotrophine nur in aktiven Neuronen wirken: McAllister, 1996; oder die Neurotrophinwirkung wird durch die Aktivität an einer spezifischen Synapse bestimmt: Berninger et al., 1999) oder antagonistisch mit Neurotrophinsignalen interagieren, kann den Wirkungsort von Neurotrophinen einschränken.

Insofern ist es von Bedeutung zu untersuchen, an welchen Orten Neurotrophine theoretisch wirken können, weshalb im folgenden Kapitel die Daten zur subzellulären Lokalisierung

endogener Neurotrophine und ihrer Rezeptoren zusammengefaßt werden.

1.3.1 Intrazelluläre Lokalisierung von Neurotrophinen

Bislang gibt es nur unbefriedigende und sehr konträre Untersuchungen zur Lokalisierung endogener Neurotrophine, was hauptsächlich an ihrer sehr geringen Expression liegt. Deshalb wurden oft immunohistochemische Verfahren mit Signalamplifikation verwendet, was eine präzise subzelluläre Lokalisierung erschwerte. Hinzu kommt die Verwendung unterschiedlichster polyklonaler Ak, deren Verwendung zu unterschiedlichen Ergebnissen führte. Ein weiteres Problem ist die Interpretation der Immunfärbungen; ein schwaches Signal kann im Kontext stärkerer Signale unterbewertet werden (z.B. durch die subjektiv gewählte Entwicklungszeit), obwohl eine geringere Expression ebenso eine stärkere Kontrolle durch regulierende Faktoren bedeuten kann¹⁰.

So wurden eine präferentiell axonale (Conner et al., 1997) oder dendritische Lokalisierung (Goodman et al., 1996) beschrieben. Intrazelluläre Auflösung der BDNF-Immunoreaktivität (IR) wurde bislang nur im PNS in Zellen der Hinterwurzelganglien beschrieben. Hier wurde BDNF in den „dense cored“ Vesikeln von Nervenendigungen gefunden (Michael et al., 1997).

Neurotrophine, als sekretorische Präproteine, sollten theoretisch als Vorläuferproteine im endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert werden und in den Golgizisternen posttranslational modifiziert werden. Im trans-Golgi (trans Golgi network: TGN) werden sekretorische Proteine z.B. über selektive Aggregation (Huttner et al., 1988) in Subdomänen angereichert und in sekretorische Granula sortiert. Ob die Prozessierung durch Prohormonkonvertasen in die biologisch aktiven Proteine im TGN oder erst später geschieht, wurde im Falle der Neurotrophine noch nicht präzise aufgeklärt (z.B. Mowla et al., 1999). Die ebenfalls als Präproteine synthetisierten und reguliert freigesetzten Neuropeptide sind hauptsächlich in LDCV¹¹ lokalisiert worden, deren Exozytose kalziumabhängig ist (Strand, 1999). Allerdings ist die Anzahl von LDCV vor allem in den Dendriten hippokampaler Neuronen sehr gering (eigene Untersuchungen, Nirenberg et al., 1996); außerdem wurde die Neurotrophin-Freisetzung auch in Abwesenheit extrazellulären Kalziums nachgewiesen (Blöchl und Thoenen, 1995; Griesbeck et al., 1999)– zwei Argumente, die gegen eine Speicherung der Neurotrophine in LDCV sprechen. Damit bleibt die Frage nach dem Speicher- und Freisetzungskompartiment offen und macht es notwendig, daß neue Formen regulierter Freisetzung postuliert werden.

1.3.2 Intrazelluläre Lokalisierung von Trk-Rezeptoren

Die spezifische Lokalisierung endogener Trk-Rezeptoren wird durch Expression mehrerer Isoformen zusätzlich erschwert. Ak gegen alle Isoformen gestatteten eine lichtmikroskopische Lokalisierung von TrkB-Rezeptoren in Zellkörpern, Axonen und Dendriten (Yan et al., 1997). Eine licht- und elektronenmikroskopische Lokalisierung spezifisch der langen Isoform der TrkB-Rezeptoren (die spezifisch von Neuronen exprimiert werden) im Vergleich zu einer TrkB Isoform mit fehlender Kinasedomäne (Expression in Gliazellen und Neuronen) wurde im Hippokampus erstmalig von Drake et al. (1999) beschrieben. Die Unterscheidung der Isoformen ist im Hinblick auf ihre unterschiedliche Funktion notwendig (Bothwell, 1995*). Mit diesem Ak wurde die lange Isoform des Trk-R in diskret verteilten Aggregaten in initialen Segmenten von Axonen, in den Axonterminalien, in dendritischen Spines und in geringen Mengen in den

¹⁰ Zum Beispiel könnte eine Regulation einen sehr raschen Transport der Neurotrophine an die Stellen der Freisetzung bewirken oder eine Aktivierung der Translation, so daß eine Heraufregulation von Proteinen spezifisch erreicht wird.

¹¹ Der Terminus „dense core“ leitet sich aus dem elektronenmikroskopisch beobachteten elektronendichten inneren Kern dieser Vesikel ab, der oft recht komplex organisiert ist. Granine bilden eine geladene Matrix in den LDCV (Huttner et al., 1988). Unter den recht sauren Bedingungen kommt es zur Kondensation der Proteine; eine Disaggregation und somit Freisetzung der Inhalte wird während der Exozytose durch Erhöhung des pH ermöglicht.

dendritischen Schäften und den Zellkörpern nachgewiesen. In den dendritischen Spines wurde TrkB auf der Plasmamembran, ansonsten bevorzugt intrazellulär (hier ist die IR mit ER, tubovesikulären Membranen, undefinierten zytoplasmatischen Organellen, Mikrotubuli, z.T. Plasmamembran und in Terminalien mit synaptischen Vesikeln assoziiert) nachgewiesen. Ak, die sowohl die lange als auch die verkürzte Form des TrkB erkennen, markieren diese Kompartimente mit anderer Gewichtung: die Zellkörper, initiale Axonensegmente und dendritische Schäfte sind stark, Spines und Axonterminalien sehr schwach markiert. Diese Daten bestätigen die prä- und postsynaptische Wirkung von Neurotrophinen. Die Lokalisierung der IR in dendritischen Spines und die Anhäufung der IR an bestimmten Stellen der Zellmembran sind ein Indiz für die Funktion in lokalen Prozessen synaptischer Plastizität.

Einen weiteren Hinweis darauf, daß eine Signaltransduktion über Trk-R für aktivitätsabhängige Prozesse bedeutend ist, ergaben Untersuchungen, die eine Translokation intrazellulärer Trk-R an die Membranoberfläche speziell nach Aktivierung der Neuronen zeigten (Meyerfranke et al., 1998).

1.4 Zusammenfassung: Neurotrophine als Mediatoren synaptischer Plastizität

Obenstehende Untersuchungen belegen deutlich, daß Neurotrophine in Prozessen der synaptischen Plastizität von Bedeutung sind. Neurotrophine und ihre hochaffinen Trk-R werden in Neuronen des ZNS, vor allem in den Regionen (Kortex und Hippokampus), in denen die aktivitätsabhängige neuronale Plastizität für die Entwicklung und für Lern- und Gedächtnisfunktionen im adulten Tier eine Rolle spielt, relativ stark exprimiert. Die Transkription von Neurotrophinen wird durch die Aktivität der Neuronen kontrolliert, aber auch die Freisetzung der Neurotrophine aus hippokampalen oder kortikalen Neuronen verläuft aktivitätsabhängig und ist von der Verfügbarkeit intakter intrazellulärer Kalziumspeicher abhängig. Interessanterweise werden Neurotrophine wahrscheinlich sowohl axonal als auch dendritisch sekretiert, was ihnen die Möglichkeit zu vielfältiger aktivitätsabhängiger Modulation der synaptischen Effizienz gibt. In zahlreichen experimentellen *in vitro*-Systemen verändern exogen applizierte Neurotrophine innerhalb von Minuten die Stärke synaptischer Verbindungen entweder durch Beeinflussung der Neurotransmitterfreisetzung oder der Sensitivität der postsynaptischen Membran. Auch Langzeitwirkungen von Neurotrophinen auf die synaptische Übertragung, über wahrscheinlich transkriptionelle Regulationen, wurden beschrieben, die sich oft in qualitativen synaptischen Veränderungen manifestieren.

Viele Fragen, vor allem in Hinblick auf zugrundeliegende molekulare Mechanismen der Neurotrophin-Freisetzung und -wirkung, bleiben allerdings noch offen:

- Wo werden Neurotrophine freigesetzt, durch welche Stimuli und aus welchem Kompartiment?
- Wo wirken Neurotrophine unter definierten experimentellen Bedingungen? Können differentiell prä- oder postsynaptische Effekte verursacht werden?
- Kann die Art der Stimulation und deren zeitlicher Verlauf die Neurotrophin-Freisetzung, den Ort ihrer Freisetzung und den Ort und die Art ihrer Wirkung beeinflussen?
- Wirken Neurotrophine modulierend nur in aktiven Systemen?

Die Beantwortung dieser Fragen könnte den Mechanismus der Neurotrophin-Freisetzung auch auf molekularer Ebene, ihre räumliche und zeitliche Verfügbarkeit und eventuelle Korrelationen mit physiologischen Stimulationsparametern erklären. Damit könnte auch ihre tatsächliche Wirkung *in vivo* besser verstanden werden.

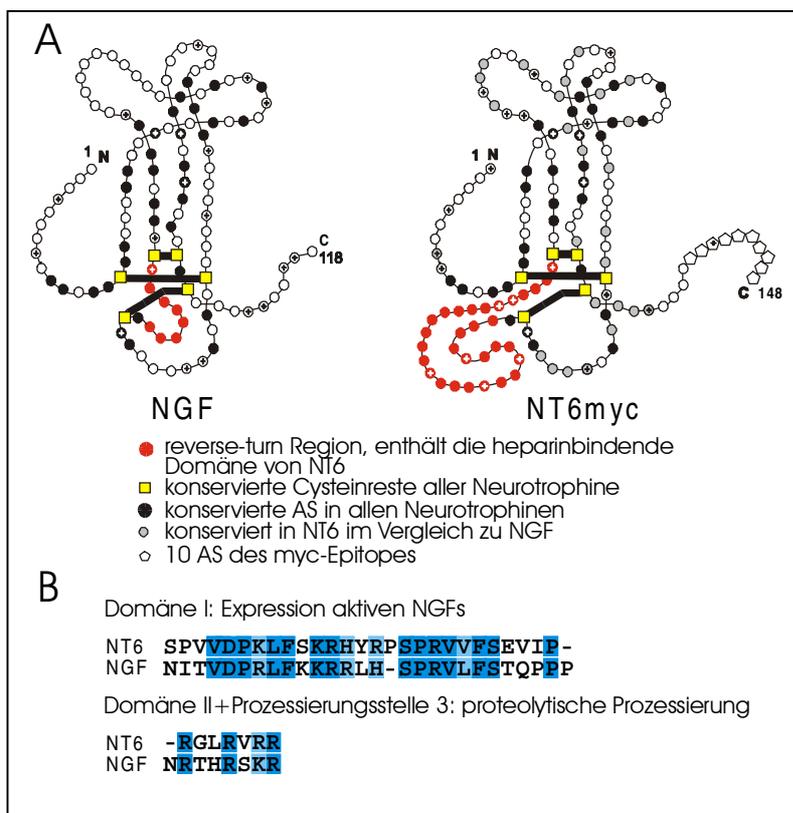
1.5 Ziel der vorliegenden Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Teilaspekte der unter 1.4 aufgeworfenen Probleme experimentell untersucht:

1. Der Ort der aktivitätsabhängigen Neurotrophin-Freisetzung sollte mit elektronenmikroskopischen Methoden auf Einzelzellebene präzise identifiziert werden. Ein Kultursystem sollte entwickelt werden, mit dem analysiert werden kann, ob Neurotrophine prä- oder postsynaptisch freigesetzt werden.
2. Die Lokalisation der Neurotrophine in intrazellulären Kompartimenten sollte einerseits durch Koloalokalisationstudien mit spezifischen Markern und mit höherer Auflösung auf elektronenmikroskopischer Ebene untersucht werden.
3. Weiterhin sollte ein System entwickelt werden, in welchem es möglich ist zu untersuchen, welche elektrischen Stimuli die Freisetzung von Neurotrophinen induzieren und welche nicht. Wie verhalten sich diese experimentell erarbeiteten Stimulusparameter im Vergleich zu physiologischen Aktivitätsmustern?

1. Um die Freisetzung von Neurotrophinen mit ultrastruktureller Auflösung zu untersuchen, verwendeten wir NT6, ein Fisch-Neurotrophin (Götz et al., 1994), welches in einer der variablen Schleifenregionen (reverse turn) eine im Vergleich zu den anderen Neurotrophinen zusätzliche Insertion von 22 AS (davon 6 basische AS und 8 Glycine) besitzt, durch die das Molekül an Heparin bindet (Götz et al., 1994; Lai et al., 1998; Abb.1.4 A).

Abb. 1.4: Vergleich der AS-Sequenzen der prozessierten Moleküle und Sequenzen der Propeptiddomäne von NT6myc und NGF.



A: Die schematische Darstellung der prozessierten Neurotrophine (verändert nach: McDonald et al., 1991) hebt die wichtigen AS hervor und macht deutlich, daß die AS, die notwendig für die Ausbildung eines biologisch aktiven, korrekt gefalteten Moleküls zwischen NT6 und NGF stark konserviert sind. Deshalb ist anzunehmen, daß NT6 die gleiche prinzipielle Struktur wie NGF aufweist. Schwarze Markierung: die in allen Neurotrophinen konservierten AS sind auch in NT6 konserviert; graue Markierung: NT6 stimmt in weiteren AS mit NGF überein; rote Markierung: heparinbindende Domäne von NT6, die einer variablen Schleife in NGF entspricht und 6 basische AS und 8 Glycine (Flexibilität von Strukturen durch Glycine erhöht) enthält; Quadrate: hochkonservierte Cysteine mit den ausgebildeten Disulfid-brücken; Pentagone: myc-Epitop.

B: Konservierte Abschnitte der Prodomänen von NT6 im Vergleich mit

NGF. Zwei Sequenzen der NGF-Prodomäne sind essentiell für die Expression des aktiven NGF (Domäne I) und dessen proteolytischer Prozessierung (Domäne II und Prozessierungsstelle; Suter et al., 1991). In diesen Bereichen ist NT6 stärker konserviert als in anderen Bereichen der Prodomäne.

Da sich die NT6-Primärstruktur vor allem in den für die korrekte Faltung und die Expression

eines biologisch aktiven Moleküls kaum von den anderen Neurotrophinen unterscheidet (Abb. 1.4 A/B), kann vermutet werden, daß sich NT6 auch in anderen Eigenschaften wie diese verhält. Die heparinbindende Eigenschaft nutzen wir aus, da NT6 sofort nach seiner aktivitätsinduzierten Freisetzung an die Heparan-Sulfat-Proteoglykane (HSPG) der Zelloberfläche binden sollte, wodurch Diffusionsartefakte vermieden werden. Zudem aktiviert NT6 nicht die in hippocampalen Neuronen hauptsächlich exprimierten Trk-R (TrkB/C; Lai et al., 1998), so daß eine interferierende Bindung an spezifische Rezeptoren (die oft eine Internalisierung bewirkt) ausgeschlossen werden kann. NT6 kann mit Heparin von der Oberfläche der NT6-exprimierenden Neuronen vollständig, aber sehr schonend entfernt werden, so daß die Oberfläche vor Beginn der Stimulation „frei“ ist. Die Anfügung eines myc-Epitopes an NT6 ermöglicht die Immunlokalisierung von NT6 mit dem gut charakterisierten 9E10myc-Ak. Da die Antigenizität des myc-Epitopes auch nach starker Fixierung, die notwendig für eine gute Erhaltung der Membranstruktur ist, erhalten bleibt, können die Experimente unter Bedingungen optimaler Strukturhaltung durchgeführt werden. Für die Expression des Fremdgens und die Überexpression von Neurotrophinen (um die Detektionsschwelle verfügbarer Nachweismethoden zu erreichen) wurden adenovirale Vektoren konstruiert, welche die jeweiligen Neurotrophine unter der Kontrolle des starken CMV-Promotors exprimieren und in der Lage sind, auch postmitotische neuronale Zellen sehr effektiv zu transduzieren, wobei toxische Nebeneffekte sehr gering sind (Griesbeck et al., 1996).

2. Auch zur intrazellulären Lokalisierung von Neurotrophinen ist ihre Überexpression in hippocampalen Neuronen notwendig. Intrazelluläre Speicher- und Freisetzungskompartimente wurden mit entsprechenden Ak markiert. Diese Daten sollten durch Lokalisierungen GFP-markierter Neurotrophine in lebenden Zellen verifiziert werden, um Fixierungsartefakte auszuschließen. Letztendlich sollte eine präzise Identifizierung des/der Speicher- und Freisetzungskompartimente(s) durch elektronenmikroskopische Untersuchungen erreicht werden. Experimente in hippocampalen Schnittkulturen ermöglichen einen Vergleich der Neurotrophin-Verteilung in einem System, in dem die Zellen in einem organotypischen Kontext stehen.

3. Hinsichtlich der physiologischen Bedeutung der Neurotrophin-Freisetzung ist es wichtig zu untersuchen, ob sie auch durch physiologische, elektrische Stimuli freigesetzt werden können, und ob sich ihre Freisetzung durch das Stimulationsmuster verändern läßt, weiterhin ob die zur Freisetzung notwendigen molekularen Mechanismen vergleichbar mit denen der KCl- und glutamatinduzierten Freisetzung sind (Blöchl und Thoenen, 1995; Griesbeck et al., 1999).

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

Geräte und Materialien, die speziell für eine Technik verwendet wurden, werden im Methodenteil gesondert aufgeführt.

Die Chemikalien stammen, sofern nicht speziell angegeben, von Serva, Sigma und Merck. Zellkultureinwegmaterialien wurden von Falcon, Costar, Nunc und Greiner bezogen.

2.1.1 Lösungen und Puffer

PBS (Phosphat gepufferte Saline) (Ca²⁺/Mg²⁺ frei)

4.3 mM Na₂HPO₄
137 mM NaCl
1.4 mM KH₂PO₄
2.7 mM KCl
pH 7,4

TE (Tris-EDTA) Puffer

10 mM Tris
1 mM EDTA
pH 8

TBS (Trisgepufferte Saline) 10x

1,5 M NaCl
0,5 M Tris-HCl, pH 7,4

HP

(modifizierter Hanks-Puffer)

125 mM NaCl
5 mM KCl
1.2 mM NaH₂PO₄
1 mM CaCl₂
1.2 mM MgCl₂
1 µM ZnCl₂
10 mM Glukose
25 mM HEPES
0.25% (w/v) BSA
pH 7,4

TAE (Trisacetat-EDTA) 50x

400 mM Tris-Acetat
10 mM EDTA
pH 8

PB (Phosphatgepufferte Saline)

11 1M Na₂HPO₄ mit 1M NaH₂PO₄ auf
pH 7.15 einstellen

2.1.2 Antikörper

Primärantikörper

Antikörper Hersteller Spezies	Erkanntes Epitop	Verdünnung Konzentration
9E10myc C.Dotti, Heidelberg Maus mAk	myc-Epitop (10 AS)	Hybridomaüberstand 1:10 (ca. 2µg/ml) (IF) 1:5 (WB und IP)
Anti NGF Calbiochem Kaninchen pAk	2,5S NGF (Maus Speicheldrüse)	1:1000 (IF)
BG9512 R.Götz, Würzburg Kaninchen pAk	NT6 N-terminales Peptid (15 AS)	1:1000 (WB)

27/21 H. Thoenen mAk Maus	Natives NGF	0,5 µg/ml (ELISA) Hybridomaüberstand 1:5 (IP)
Anti BDNF Promega pAk Huhn	Humanes BDNF	1:200=2,5 µg/ml (IF)
# 9 Y.A.Barde, Boehringer mAk Maus	Maus BDNF	1 µg/ml (ELISA) 5 µg (IP)
anti pan Trk Santa Cruz, Ismaning pAk, Kaninchen	alle Trk-R	1:1000 (WB)
# 1 Y.A. Barde, Boehringer mAk Maus	Maus BDNF	POD-gekoppelt, 800 mU/ml (ELISA) 1µg/ml (IF) 5 µg/ ml (IP)
Anti MAP2 Boehringer mAk Maus	Mikrotubuliassoziiertes Protein, neuronenspezifisch (Dendriten)	5 µg /ml (IF)
clone tau 1 Boehringer mAk Maus	Tau Axone	5 µg/ml (IF)
SY 38 Boehringer mAk Maus	Synaptophysin, präsynaptische Vesikel	1 µg/ml (IF)
GFAP Boehringer mAk Maus	Glial fibrillary protein Astrozyten	1:200 (IF)
219-6 W.B. Huttner mAk Maus	Ratte Sekretogranin I/ ChromograninB	unverdünnter Hybridomaüberstand (IF)
Anti NPY Amersham pAk Kaninchen	Neuropeptid Y	1:200 (IF)
BIP StressGen pAk Kaninchen	luminaler ER Marker (Grp78)	1:200 (IF)
ER Daniel Louvard, Institute Curie, Paris pAk Kaninchen	ER Marker Membranfraktion	1:50 Serum (IF)
Golgi Michel Bornens, Institute Curie, Paris mAk Maus	uncharakterisiertes TritonX-100 extrahierbares Antigen des medialen Golgi Apparates	1:2 Hybridomaüberstand (IF)
anti-Phosphotyrosin Upstate UBI 05-321	tyrosinphosphorylierte Proteine	1:4000 (WB)

Verwendete Sekundärantikörper

Alle sekundären Ak wurden, wenn nicht anders angegeben, von Dianova (Hamburg) bezogen und aus Ziege gewonnen.

Antikörper	Verdünnung (Konzentration)
Anti Huhn Biotin (aus Kaninchen, IgG H+L)	1:1000 (0,6 µg/ml)
Anti Kannichen Biotin (IgG H+L)	1:1000 (0,5 µg/ml)
Anti Maus Biotin (IgG H+L)	1:2000 (0,25 mg/ml)
Anti Maus Lissamin Rhodamin (IgG H+L)	1:150 (5 µg/ml)
Anti Maus FITC (IgG H+L)	1:100 (5µg/ ml)
Anti Maus cy3 (IgG H+L)	1:1000 (1 µg/ml)
Anti Kaninchen Lissamin Rhodamin (IgG H+L)	1:150 (5 mg/ ml)
Anti Maus 4 nm goldkonjugiert (IgG H+L)	1:20 (EM)
Anti Maus 12 nm goldkonjugiert (IgG H+L)	1:20 (EM)
Anti Maus 18 nm goldkonjugiert (IgG H+L)	1:20 (EM)
Anti Maus HRP (Jackson Immunresearch)	1:10000 (WB)
Anti Kaninchen HRP (Jackson Immunresearch)	1:10000 (WB)

WB Westernblot

IF Immunofluoreszenz

IP Immunopräzipitation

EM Elektronenmikroskopie

HRP horse radish peroxidase (Meerrettichperoxidase)

2.2 Methoden**2.2.1 Molekularbiologische Methoden**

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Enzyme von New England Biolabs bezogen. Medien für die Bakterienkultur wurden von Gibco BRL bezogen.

DNA-Längenstandard: 1kb Leiter (Boehringer)

2.2.1.1 Materialien**2.2.1.1.1 E.Coli-Stämme**

Stamm	Phänotyp
DH5α	$\Delta(lacZYA -argF)$ U169, <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁺), <i>sup</i> E44, <i>thi-1</i> , <i>gyrA</i> , <i>relA1</i>
XL1-blue MRF ⁷	$\Delta(mcrA)183$, $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)$ 173, <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F ⁷ <i>proAB</i> , <i>lac</i> ^q Δ M15, Tn10 (tet ^r)]

2.2.1.1.2 Primer**Primer für die Klonierung**

5'NT6myc

CGAGAAGCTT**GCCACCATGAGGTCATCACTACTGGTTC**

HindIII Restriktionsschnittstelle, *Kozak* Konsensussequenz, NT6 cDNA

3'NT6myc

TGCTCTAGATCATCACAAGTCTTCTTCAGAAATGAGTTTTTGGTCTGACCAAGAAGA
ATTCCGGCTGAG

XbaI Restriktionsschnittstelle, myc- 9E10 Epitop, NT6 cDNA

5'NGFmyc

CGAGAAGCTTGCCGCCATGTCCATGTTGTTCTACACTCHindIII Restriktionsschnittstelle, Kozak Konsensussequenz, NGF cDNA

3'NGFmyc

TGCTCTAGATCATCACAAGTCTTCTTCAGAAATGAGTTTTTGTCTGTAGCCTTCCTGC
TGAGCAC*myc-9E10 Epitop, NGF cDNA*

Oli1 (5' Primer, BDNF-GFP):

CCAGAAGCTTGCCACCATGACCATCCTTTTCCTTACHindIII Restriktionsschnittstelle, Kozak Konsensussequenz, BDNFcDNA

Olgbg2 (3' Primer, BDNF-GFP):

CGCGGGATCCGCTTTAATGGTCAGTGTACBamHI Restriktionsschnittstelle, BDNF cDNA**Primer für die Sequenzierung und analytische PCR**

AdV1	TTCATCGTACCTCAGCAC (5' pXCJL1 Vektor)
AdV2	TTCCGGGTCAAAGTTGGCG (3' pXCJL1 Vektor)
T7	AATACGACTCACTAT (5' pRC/CMV und pXCJLCMVVBGH Vektor)
NT6 5' 2499	CCAAACTTCATATCAGC
2500	CCTTCGCATGACGTTCTG
3' 2498	CGCCAGGCTGTCTGTTCC
BDNF 5' SJ21	AGCACGTCATCGAAGAGCT
3' JK5	CACTTGACTGCTGAGCAT
Sindbis 5'	AGCATAGTACATTTTCATCTG (Sinrep5)
TrkA s	CGCAACTGTCTGGTGGGTCAGGGA
TrkA as	GCCTGCAGCCGCGCGTGCAC

2.2.1.1.3 Plasmide

Plasmidname	Hersteller
pXCJL1 pXCJL2, pJM17 (McGrory et al., 1988) pXCJLCMVVBGH	diese Plasmide wurden freundlicherweise von Claude Gravel, Université Laval, Quebec, Canada zur Verfügung gestellt:
N1-EGFP	Clontech
C1-EGFP	Clontech
SK9+ (Blueskript Vektor mit NGF-cDNA)	Abteilung Neurobiochemie; MPI Martinsried

pCIneo.NPY-GFPmutII	wurde freundlicherweise von W. Almers; MPI für experimentelle Medizin, Heidelberg zur Verfügung gestellt: Lang et al., 1997
trkA Plasmide Y794F F8 Re794Y wildtyp	Inagaki et al., 1995
pREP7	Invitrogen
pRC/CMV	Invitrogen
Sinrep	Invitrogen
DH(26S)	Invitrogen

2.2.1.2 Aufzucht von *E.coli*

E.coli Flüssigkulturen wurden bei 37°C mit 250 rpm geschüttelt. Agarplatten wurden im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Für Flüssigkulturen wurde LB- oder TB-Medium verwendet. Für Platten wurde dem LB-Medium 1,5% (w/v) (w/v) Bacto Agar (GibcoBRL) hinzugefügt.

Zur Selektion auf bestimmte plasmidvermittelte Resistenzen wurde das Medium mit den entsprechenden Antibiotika versetzt: 100 µg/ml Ampicillin, 12,5 µg/ml Tetracyclin bzw. 50 µg/ml Kanamycin.

Einfrieren von E.coli:

Es wurden 300 µl einer Übernachtskultur zentrifugiert (Tischzentrifuge, 3 min, 4000 rpm, RT), das Pellet in 900 µl LB mit 15% (w/v) (w/v) Glycerin resuspendiert und die Zellsuspension bei –80°C aufbewahrt.

LB-Medium:

20 g Lennox L broth base (GIBCO)
1000 ml ddH₂O

TB-Medium:

12 g Bacto Trypton
12 g Bacto Hefeextrakt
4 ml Glycerin
900 ml ddH₂O
nach dem Autoklavieren zugeben:
100 ml 0,17 M KH₂PO₄/ 0,72 M K₂HPO₄

2.2.1.3 Plasmidpräparation aus *E.coli*

Es wurde das Prinzip der alkalischen Lyse mit NaOH/SDS ausgenutzt unter deren Bedingungen die Zellen platzen, die bakteriellen Proteine zerstört werden und die chromosomale als auch die Plasmid-DNA freigesetzt werden. Bei der anschließenden Neutralisierung unter Hochsalzbedingungen renaturiert die Plasmid-DNA, während alle anderen makromolekularen Komponenten als Präzipitat ausfallen.

Analytische Plasmidisolierung

Das Bakterienpellet wurde in 250 µl Puffer P1 resuspendiert und die alkalische Lyse durch Zugabe von 250 µl Puffer P2 durchgeführt. Die Ansätze wurden einige Male invertiert und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 350 µl eiskaltem Puffer P3 und fünfminütiger Inkubation auf Eis wurde zentrifugiert (Tischzentrifuge, 15000 rpm, 10 min, RT). Die Plasmid-DNA wurde wie oben beschrieben mit Isopropanol gefällt (die Puffer P1-P3 wurden dem Qiagen Maxi-Kit (tip-500) entnommen).

Präparative Plasmidisolierung

Für die Isolierung größerer Mengen an Plasmid-DNA wurde das Qiagen Maxi-Kit (tip-500) verwendet.

Dazu wurden Zellen einer 150 ml Übernachtskultur in LB-Selektionsmedium sedimentiert (Sorvall-Zentrifuge, GSA-Rotor, 15 min, 3000 rpm) und das Bakterienpellet in 10 ml Puffer P1 resuspendiert. Danach wurden 10 ml Puffer P2 zugegeben, die Ansätze vorsichtig mehrere Male invertiert und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 10 ml vorgekühltem Puffer P3 wurde die Suspension mehrere Male invertiert und 20 min auf Eis inkubiert. Das entstandene Präzipitat wurde abzentrifugiert (Sorvall-Zentrifuge, SS34-Rotor, 30 min, 15000 rpm) und der Überstand sofort abgenommen.

Inzwischen wurde die Qiagen-Säule (tip-500) mit 10 ml Puffer QBT äquilibriert. Dann wurde das Zellysate auf die Säule aufgetragen und die Säule zweimal mit 30 ml Puffer QC gewaschen. Die Plasmid DNA wurde mit 10 ml Puffer QF eluiert.

Die DNA wurde aus dem Eluat durch Zugabe von 0,7 Volumen (7 ml) Isopropanol gefällt und pelletiert (Sorvall-Zentrifuge, SS34-Rotor, 30 min, 12000 rpm, 4°C) und anschließend mit kaltem 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Das getrocknete DNA-Pellet wurde in 200 µl ddH₂O aufgenommen.

Puffer P1: 100 µg/ml RNase A
50 mM Tris/HCl
50 mM Tris/HCl, pH 8,0

Puffer P2: 200 mM NaOH
1% (w/v) SDS

Puffer P3: 3 M Kaliumacetat pH 5,5

Puffer QF: 1,25 M NaCl
50 mM Tris/HCl
15% (v/v) Ethanol, pH 8,5

Puffer QBT: 750 mM NaCl
50 mM MOPS
15% (v/v) Ethanol
0,15% (v/v) TritonX-100,
pH 7,0

Puffer QC: 1 M NaCl
50 mM MOPS
15% (v/v) Ethanol
pH 7,0

Propagation von pJM17 in E.coli:

Für die Isolierung des 40 kb großen pJM17 Plasmides wurde dieses Protokoll modifiziert, um Umlagerungen und Fragmentierungen der DNA zu verhindern. 1/10 Volumen einer Vorkultur wurde zum Animpfen einer 1 l Übernachtskultur (super broth) verwendet, deren Wachstum nach max. 14 h in der logarithmischen Phase gestoppt wurde. Die Aufreinigung erfolgt wie oben beschrieben. Ein Restriktionsverdau mit HindIII sollte DNA-Fragmente charakteristischer Größe ergeben.

Super Broth: 128 g Trypton
80 g Hefeextrakt
20 g NaCl
4 g Glukose
20 ml 1 M NaOH
pH 7,5

2.2.1.4 Spektrometrische Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

Zur Konzentrationsbestimmung wurde die Absorption der Purin- und Pyrimidinbasen im Bereich von 260 nm ausgenutzt. Eine Extinktion von 1 entspricht bei Doppelstrang-DNA einer Konzentration von ca. 50 µg/ml.

Als Anhaltspunkt für die Reinheit der DNA-Lösung wurde eine zweite Extinktionsmessung bei 280 nm durchgeführt, bei der die aromatischen Reste von Proteinen stark absorbieren. Das Verhältnis von E_{260}/E_{280} sollte für saubere DNA zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

Für die Extinktionsmessungen (UV-Spektrometer, Beckmann) wurde die DNA 1:50 bzw. 1:100 mit ddH₂O verdünnt.

2.2.1.5 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen vom Typ II schneiden doppelsträngige DNA an jeweils spezifischen, palindromischen Sequenzen, so daß dabei entweder 5'- oder 3'-überhängende Enden oder glatte Enden entstehen.

Es wurde unter den vom Hersteller (Biolabs) empfohlenen Bedingungen (Puffer, Temperatur) gearbeitet. Pro µg DNA wurde 1 Unit des Enzyms eingesetzt. Das Endvolumen des Reaktionsansatzes wurde so gewählt, daß die zugegebene Menge an Enzym 10% des Gesamtvolumens nicht überschreitet. Die Reaktionszeit lag zwischen einer und drei Stunden.

2.2.1.6 Glätten überhängender DNA-Enden

Zum Auffüllen von überhängenden 5' Enden wurde die 5'-3' Polymeraseaktivität des Klenow-Fragmentes ausgenutzt, indem die DNA mit Klenow Puffer (10fach), 0,2 mM dNTPs und 2 µl Klenow Enzym für 20 min bei 25°C inkubiert wurde. Um überhängende 3' Enden zu entfernen, wurde der Reaktionsansatz zunächst ohne dNTPs für 20 min bei 37°C inkubiert, wobei die 3'-5' Exonukleaseaktivität des Klenow-Fragmentes wirksam wurde.

2.2.1.7 Agarosegelelektrophorese

Zur analytischen Auftrennung von DNA-Fragmenten im Bereich von 50 bp bis 8 kb wurden Agarosegele von 4,0% (w/v) bis 0,5% Agarose in TAE-Puffer hergestellt. Nach Verflüssigen der Agarose wurden 50 µg Ethidiumbromid pro 100 ml zugesetzt. Zu den Proben wurde vor dem Auftragen 1/10 Volumen Auftragspuffer (10 fach) gegeben. Die Elektrophorese erfolgte in TAE-Puffer bei 6 V pro cm Elektrodenabstand. Die Fluoreszenz des in die DNA interkalierten Ethidiumions wurde durch UV-Licht angeregt, so daß die DNA-Banden sichtbar wurden.

TAE-Puffer (50 fach):	2,0 M Tris-Base 1,0 M Essigsäure 0,1 M EDTA pH 8,3 mit Essigsäure einstellen	Auftrags- puffer (10 fach):	30% (w/v) Glycerin 0,25% (w/v) Xylencyanol FF 0,25% (w/v) Bromphenolblau in TAE
----------------------------------	---	--	--

2.2.1.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente zwischen 100 bp und 10 kb wurden mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) entsprechend der Anleitung gereinigt. Hierbei wird die Adsorption von DNA in einer chaotropen Salzlösung an eine Silikagelmatrix ausgenutzt.

2.2.1.9 Phenolextraktion von DNA

Ein Volumen (500 µl) Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) wurde zur DNA-Lösung gegeben. Nach Mischen wurden die Phasen durch Zentrifugation getrennt (Tischzentrifuge, 1 min, 15000 rpm, RT). Phenolreste wurden durch zwei Extraktionen mit Chloroform entfernt.

2.2.1.10 Präzipitation von DNA

DNA wurde nach Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat pH 5,2 und 2 Volumen EtOH mindestens 30 min bei -20°C inkubiert, anschließend zentrifugiert (Tischzentrifuge, 2 min, 15000 rpm, 4°C) und das Pellet einmal mit 70% (v/v) EtOH gewaschen.

2.2.1.11 Dephosphorylierung von 5' DNA-Enden

Um Religationen bei passenden Schnittstellen zu verhindern, wurde die DNA nach dem Restriktionsverdau mit 10-20 U Alkalischer Phosphatase (calf, intestinal) für 60 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 75°C (10 min) gestoppt.

2.2.1.12 Ligation von DNA

Ligationen dieser Art wurden mit ca. 10 ng Vektor-DNA und einem 4-5 fachen Überschuß an Insert-DNA in einem 10 μl Ligationsansatz zusammen mit 1 μl Ligationspuffer (10 fach) und 1 μl T4-Ligase (1Unit / μl) durchgeführt. Die Ligationen wurden über Nacht bei 16°C inkubiert. Ligationen von Fragmenten mit glatten Enden erforderten oft ein anderes Verhältnis von Insert DNA zu Vektor-DNA (ca. 2:1).

2.2.1.13 Elektrotransformation von *E.coli*

Präparation transformationskompetenter Zellen für die Elektroporation

Bakterienzellen werden auf die Elektroporation vorbereitet, indem das Kulturmedium mit hoher Ionenkonzentration gegen Wasser und schließlich gegen eine glyzerinhaltige Lösung, die Kristallbildung beim Einfrieren verhindert, ausgetauscht wird.

1000 ml LB-Medium wurden 1:100 mit einer *E.coli* Übernachtskultur angeimpft und die Zellsuspension bis zu einer OD_{600} von 0,4 (exponentielle Wachstumsphase) bei 37°C geschüttelt. Die Zellen wurden pelletiert (15 min, 4000xg, 4°C) und zweimal mit 1000 ml eiskaltem, sterilem Wasser gewaschen. Abschließend wurden die Zellen mit 20 ml 10% (v/v) Glycerin gewaschen und in 3 ml 10% (v/v) Glycerin resuspendiert, um eine Zelldichte von ca. 2×10^{10} Zellen pro ml. zu erreichen. Aliquots wurden auf Trockeneis eingefroren und bei -70°C aufbewahrt.

Elektroporation

Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, für 1 min mit 1 μl des Ligationsansatzes inkubiert und in eine gekühlte Elektroporationsküvette (BioRad, 0,2 μm Spalt) überführt. Nach einem Strompuls [GenePulser (BioRad), Einstellungen: 2,2 kV, 25 μF und Pulscontroller (BioRad): 400 Ω ,] wurde 1 ml SOC Medium zugegeben und diese Suspension 1h bei 37°C geschüttelt. Die Bakterien wurden auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert.

SOB-Medium:

2% (w/v) Bacto Trypton

0,5% (w/v) Bacto Hefeextrakt

10 mM NaCl

2,5 mM KCl

pH 7,0 mit NaOH einstellen

nach Autoklavieren zugeben: 10 mM MgCl_2 10 mM MgSO_4

SOC-Medium:

SOB mit 20 mM Glukose

(1 M Glukose sterilfiltrieren)

2.2.1.14 Polymerasekettenreaktion (PCR)

PCR für Klonierungen

Für diesen Zweck wurden Primer mit einem Überhang von Nukleotiden verwendet, welcher nicht mit der Zielsequenz hybridisierte. Auf diese Weise wurden Restriktionsschnittstellen oder

andere Sequenzen (Kozak-Sequenz, myc-tag) an den Enden des DNA-Fragmentes eingeführt. Außerdem konnte der zu amplifizierende Bereich durch Auswahl der Primer definiert werden. Es wurde eine „Heißstart-PCR“, bei der die Taq-Polymerase erst nach 5 min Denaturierungszeit bei 94°C dazugegeben wurde, verwendet. Damit wird DNA-Synthese durch unspezifische Hybridisierung der Primer vor den eigentlichen Zyklen verhindert. Danach wurden die Temperaturzyklen für Denaturierung, Primer-Hybridisierung (ca. 4°C über der Schmelztemperatur der Primer gewählt) und DNA-Polymerisierung durchlaufen (PCR-Gerät: Biometra). Der letzte Schritt der DNA-Polymerisierung wurde um 8 min verlängert, um zu gewährleisten, daß alle Stränge fertig synthetisiert werden können.

Ansatz:	0,1 µg je 50 pmol je 20 nmol 1,6 U	Plasmid-DNA Primer (je 1 µl einer 50 µM Stammlösung in ddH ₂ O) dATP, dTTP, dCTP, dGTP (2 µl 10 mM dNTP-Mix) Taq-Reaktionspuffer (5 µl 10fach Vent-Puffer) Vent-Polymerase (0,8 µl) ddH ₂ O, auf 50 µl auffüllen mit 50 µl Mineralöl überschichten
----------------	---	--

Temperaturverlauf:

	10 min	„hot start“ 94°C, nach 5 min Zugabe der Vent-Polymerase
Zyklen:	60 s	94°C (Denaturierung)
20 x	60 s	50-70°C (Primer-Hybridisierung, erfolgte in der Regel bei etwa 4°C über der Schmelztemperatur)
	1-2 min	72°C (Extension, Faustregel: pro kb DNA 1 min)
	8 min	72°C

PCR zur Analyse

Analytische PCRs wurden analog dem oben beschriebenen Protokoll durchgeführt mit dem Unterschied, daß Taq-Polymerase (Perkin Elmer) und der entsprechende Puffer (10 fach) verwendet wurde. Es wurden i.d.R. 30 Zyklen verwendet.

PCR zur Plaqueanalyse

Lysate der Virusplaques (2.3.1.2.1) wurden zunächst mittels PCR analysiert. Dazu wurden Primer verwendet, die zum kodierenden Bereich des eingefügten Genfragmentes und zu einer Adenovirussequenz nahe des Insertes komplementär sind, so daß DNA-Fragmente von ca. 1 kb amplifiziert wurden. Das Protokoll entspricht dem oben beschriebenen. Es wurde jeweils 1 µl Lysat eingesetzt und 30 Zyklen durchlaufen.

2.2.1.15 Analyse der DNA-Sequenzen

Die Analyse der DNA-Sequenzen erfolgte mit der GCG Software (GCG sequence analysis software). Von den verfügbaren Programmen wurden folgende verwendet:

SeqEd für die Eingabe von Nukleotid-oder AS-Sequenzen

Reverse invertiert und komplementiert die Nukleotidsequenz

Map für die Bestimmung von Restriktionsschnittstellen, Angabe der zur Nukleotidsequenz zugehörigen AS-Sequenz in den 6 möglichen Leserahmen

Translate	Übersetzung einer Nukleotidsequenz in eine AS-Sequenz
Assemble	Zusammenfügen mehrerer Fragmente zu einer längeren DNA-Sequenz
Bestfit	Vergleich zweier Nukleotid oder AS-Sequenzen
Gap	Vergleich zweier Nukleotid oder AS-Sequenzen
PileUp	Vergleich mehrerer Nukleotid-oder AS-Sequenzen
StemLoop	Primerdesign, erkennt Haarnadelstrukturen
FastA	Suche in der Datenbank nach ähnlichen Nukleotid-bzw. AS-Sequenzen
Fetch	importiert Sequenzen aus der Datenbank

2.2.2 Proteinchemische Methoden

2.2.2.1 SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte durch die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen in einer Vertikalkammer (Werkstatt des Institutes).

Die Lösung für Trenngel enthält 5 bis 15% (w/v) Acrylamid, 0,375 M Tris-HCl pH 8,8 und 0,1% (w/v) SDS.

Die Lösung für die Sammelgele enthält 4% (w/v) Acrylamid, 0,125 M Tris-HCl pH 6,8 und 0,1% (w/v) SDS.

Die Polymerisation wurde jeweils durch Zugabe von 0,1% (v/v) TEMED und 0,1% (w/v) Ammoniumpersulfat ausgelöst.

Vor dem Auftrag auf das Gel wurden die Proben in Laemmli-Puffer bei 95°C 5 min erhitzt.

Die Spannung bei der Elektrophorese betrug 60 V, solange die Proben im Sammelgel waren, und 120 V im Trenngel.

Als Molekulargewichtsstandard wurden ein vorgefärbter (prestained) LMWR („low molecular weight range“ Marker, BioRad) oder ein Rainbow marker (Amersham) benutzt.

Acrylamidlösung:

30% (w/v) Acrylamid

0,8% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid

Trenngelpuffer (4fach):

1,5 M Tris-HCl pH 8,8

0,4% (w/v) SDS

Sammelgelpuffer (4fach):

0,5 M Tris-HCl pH 6,8

0,4% (w/v) SDS

Laempuffer (10fach):

2 M Glyzin

0,25 M Tris

1% (w/v) SDS

Laemmli-Puffer (5fach):

0,2 M Tris-HCl pH 8,0

5 mM EDTA

40% (w/v) Saccharose

15% (w/v) SDS

10% (w/v) β -Mercaptoethanol

0,02% (w/v) Bromphenolblau

2.2.2.2 Färbung von Proteingelen mit Coomassie-Blau

Mit dieser Methode können Proteine im Mikrogrammbereich visualisiert werden.

Die Gele wurden 10 bis 20 min in einer sauren, alkoholischen Färbelösung geschüttelt, welche das denaturierte Protein im Gel fixiert. Der nicht vom Protein komplexierte Farbstoff wurde durch Schütteln in der Entfärbelösung ausgewaschen.

Färbelösung:

0,2% (w/v) Coomassie-Blau-R
50% (v/v) Methanol
10% (v/v) Essigsäure

Entfärber:

25% (v/v) Methanol
10% (v/v) Essigsäure

2.2.2.3 Western-Blot

Proteintransfer

Proteine wurden mit Hilfe einer Halbtrockenapparatur auf eine Nylonmembran (Immobilon P; 0,45µm; Millipore) übertragen, um sie einer immunochemischen Analyse zugänglich zu machen. Das Gel wurde dafür horizontal auf die vorbehandelte (30 s MeOH, 10 min ddH₂O, 10 min Blotpuffer) Nylonmembran gelegt und beides zwischen mit Blotpuffer getränkten Whatmanpapieren in die Apparatur eingespannt. Die Proteine wurden elektrophoretisch in Richtung Anode auf die Membran überführt (1 h; 0,8 mA/ cm²).

Blotpuffer:

48 mM Tris
39 mM Glyzin
1,3 mM SDS
20% MeOH

Immunomarkierung

Alle Inkubationen wurden bei RT unter leichtem Schütteln durchgeführt. Zunächst wurde die Nylonmembran 2 h in PVP (Polyvinylpyrrolidon) -Blockierungslösung inkubiert, um die unspezifischen Bindungsstellen abzusättigen. Nach zweimaligem Waschen in PVP-Waschlösung wurde die Membran mit dem ersten Ak in PVP-Waschlösung ÜN (über Nacht) bei 4°C inkubiert. Nach 30 min Waschen wurde für 1 h mit dem entsprechenden zweiten HRP-gekoppelten Ak (1:10000 in PVP-Waschlösung) inkubiert und dann erneut gewaschen.

Zur Detektion der TrkA-R wurde das Protokoll etwas modifiziert. Die Membran wurde zunächst 1 h blockiert (Blotto), ÜN in Blotto mit dem ersten Ak (panTrk: 1:1000) inkubiert und nach dreimaligem Waschen in TBST mit dem zweiten HRP-konjugiertem Ak inkubiert.

Die Detektion der Proteine erfolgt durch die HRP-katalysierte Umsetzung eines Substrates (Super Signal Luminescence Substrate, Pierce) zu einer lumineszierenden Substanz. Die Chemolumineszenzsignale wurden durch kurzes (1 s bis 5 min) Auflegen eines X-OMAT Röntgenfilmes detektiert.

PVP-Konzentrat (22%):

10% (w/v) PVP MW 10.000
10% (w/v) PVP MW 40.000
2% (w/v) PVP MW 360.000

Transferpuffer:

20 mM Glyzin
25 mM Tris
20% (v/v) Methanol

PVP-Waschlösung:

8 ml PVP-Konzentrat
0,5 ml Tween 20
in 1000 ml PBS

PVP-Blockierungslösung:

1 ml PVP Konzentrat in 9 ml PBS

TBST:

150 mM NaCl
50 mM Tris-HCl pH 7,4
0,1% (v/v) Tween 20

Blotto:

2% (w/v) Magermilchpulver
in TBST

2.2.2.4 Probenaufbereitung für die Immunopräzipitation

Freigesetzte Neurotrophine in Zellüberständen wurden durch Zugabe von ca. 5 µg eines Primär-Ak und anschließende Zugabe von 70 µl Sepharose-A präzipitiert. PMSF (0,4 mM) wurde zu allen Präzipitaten bzw. Lysepuffern zugegeben. Die Protein-A Sepharose wurde 3 mal mit IP-Waschpuffer gewaschen und anschließend die Proteine durch Kochen in 20 µl Laemmli-puffer (95°C für 5 min) eluiert und auf das Gel aufgetragen.

Neurotrophine wurden z.T. durch Präzipitation mit TCA (Trichloressigsäure) konzentriert. Dazu wurden die serumfreien Medienüberstände mit 0,015% (w/v) Natriumdesoxycholat (15 min, RT) und 6% (w/v) TCA versetzt, 20 min auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (Tischzentrifuge, 15 min, 12000 rpm, 4°C). Das Pellet wurde einmal mit 10% (v/v) Trifluoressigsäure gewaschen und unter Vakuum getrocknet.

Sollten intrazelluläre oder membranständige Proteine nachgewiesen werden, wurden die Zellen mit Lysepuffer für 30 min bei 4°C geschwenkt, das Lysat 1 min stark gemischt (Vortex) und Zellrückstände pelletiert (Tischzentrifuge, 30 min, 15000 rpm, 4°C). Proteine des Überstandes wurden wie oben beschrieben konzentriert.

IP-Waschpuffer:

50 mM HEPES- pH 7,4
150 mM NaCl
10% (w/v) Glycerol
0,1% (v/v) TritonX-100

Lysepuffer:

50 mM HEPES pH 7,4
150 mM NaCl
10% (v/v) Glycerol
1% (v/v) TritonX-100

2.2.2.5 Analyse der Phosphorylierung von Trk-Rezeptoren

Nach Stimulation der Zellen (konfluente 10 cm Kulturschalen) mit den entsprechenden Neurotrophinen für 5 min bei 37°C wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und auf Eis lysiert (Lysepuffer mit 5 mM Vanadat und 3 mM EDTA). Trk-R wurden über Nacht mit einem anti panTrk Ak inkubiert und nach Zugabe von ProteinA Sepharose präzipitiert. Die Präzipitate wurden mit IP Waschpuffer (+ 1 mM Vanadat) gewaschen und Proteine in einem 6% Proteingel aufgetrennt. Phosphorylierte Proteine wurden mittels eines Phosphotyrosin-Ak detektiert (in diesem Fall wurden unspezifische Bindungsstellen mit 0,5% (w/v) Gelatine, 5 mM EDTA in TBST blockiert und die Blots in TBST gewaschen; der Primär-Ak wurde in 0,5% (w/v) Gelatine, TBST und der Sekundär-Ak in TBST gelöst).

2.2.2.6 Enzymimmunoassays (ELISA) für BDNF und NGF**BDNF ELISA (Canossa et al., 1997)**

Mikrotiterplatten (Nunc-Immuno plate) wurden ÜN bei 4°C mit einem monoklonalen anti-BDNF-Ak (#1, 0.1 µg/ml Endkonzentration in Karbonatpuffer, 200 µl pro Probe) beschichtet; unspezifische Bindungsstellen wurden durch nachfolgende Inkubation (4°C, ÜN) blockiert. 170 µl der Probe (in Hankspuffer) wurden zusammen mit 30 µl des zweiten Ak (peroxidasekonjugierter anti BDNF mAk, # 9; 800 mU/ml gelöst in Hankspuffer 6.7% (w/v) BSA, 0.67% (v/v) TritonX-100) aufgetragen. Parallel dazu wurde eine Standardreihe von 0,5 ng/ml bis 1000 ng/ml rekombinanten BDNF analysiert. Nach erneuter Inkubation ÜN bei 4°C wurden die Platten dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Gebundene Peroxidase (POD) katalysiert die Umsetzung eines Substrates (BM blue POD-substrate, Boehringer; 200 µl pro Probe). Die Absorption wurde bei 492 nm gemessen.

Karbonatpuffer:

50 mM NaHCO₃/ Na₂CO₃
pH 9,7

Waschpuffer:

PBS
0,1% (v/v) TritonX-100

Blockierungspuffer:

Hankspuffer
2% (w/v) BSA
0,1% (v/v) TritonX-100

NGF-ELISA

Der NGF-ELISA wurde entsprechend der Instruktionen der Hersteller (Boehringer) durchgeführt. Die Sensitivität ist vergleichbar mit der des BDNF-ELISAs (bis ca. 0,5 pg/ml).

2.2.2.7 Reinigung monoklonaler Antikörper

Serumfreie Hybridomaüberstände wurden auf eine mit 0,1 M PB (pH 7,0) äquilibrierte Protein-G Sepharosesäule gegeben. Die Säule wurde mit mindestens 5 Säulenvolumen PB oder TBS gewaschen (Kontrolle über die OD₂₈₀). Über den F_c Teil gebundene Ak wurden mit 0,2 mM Glyzin (pH 3) in ein Volumen vorgelegten 1 M Trispuffer (pH 8) eluiert (500 µl Fraktionsvolumen) und anschließend gegen PBS oder TBS dialysiert. Eine Ak-konzentration von mindestens 0,5 µg/ml wurde durch Zentrifugation (Sorvall-Zentrifuge, SS-34-Rotor, 3000 x g, 3-5 h, 4°C) in Ultrafiltrationsröhrchen (centriplus concentrators, Ausschlußgrenze 30 kD, Amicon) erreicht (die Extinktion sollte ca. 1 betragen, was in etwa 0,7 mg/ml entspricht).

2.2.3 Zellbiologische Methoden

Soweit nicht anders angegeben, wurden Medien, Seren und Trypsin von Gibco verwendet. Chemikalien für die Zellkultur wurden, wenn nicht anders erwähnt, von Sigma bezogen.

2.2.3.1 Präparation von dissoziierten hippokampalen Neuronen

Trächtige Wistar-Ratten (Tierhaus des MPIs für Neurobiologie, embryonaler Tag 17 oder 18) wurden durch CO₂ getötet und die Embryonen entnommen. Die weitere Präparation erfolgte unter sterilen Bedingungen in PBS/BSA. Die Gehirne wurden entnommen und von den Meninges befreit. Die Hippokampi wurden für 20 min in Papainlösung inkubiert, in DMEM/10% (v/v) FCS überführt und anschließend mittels einer abgeflamten Pasteurpipette trituriert. Dissoziierte Zellen wurden pelletiert (110 xg, 5 min, 4°C), in 10 ml DMEM/10%(v/v) FCS aufgenommen und in einer Dichte von 50 000 bis 300 000 Zellen pro Deckgläschen (d=10 mm) in Deckglaskammern kultiviert. Nach dem Anhaften der Zellen (2-3 h) wurde das Medium durch Kompletmedium ersetzt. Die Kultivation erfolgte auf Glasdeckgläschen (Assistent), die folgendermaßen vorbereitet wurden: ÜN schütteln in konz. HCl, 10x in ddH₂O waschen, 4 h 100% EtOH, 5 x in ddH₂O waschen, vereinzeln und trocknen auf Filterpapier, 1 h 130°C backen. Kurz vor der Präparation wurden die Deckgläschen mit einer Poly-DL- Ornithin-Lösung (0,5 mg/ ml) für 1-2 h bei 37°C beschichtet und anschließend dreimal mit PBS gewaschen.

Kompletmedium (100 ml):

DMEM wurde mit BSA, Transferrin und Insulin versetzt, und nach Lösen der Komponenten wurden die unten angegebenen wässrigen (1:1000) und ethanolischen Lösungen (1:100.000) (Aliquots der Stammlösungen wurden bei -20°C aufbewahrt) zugegeben. Das Medium wurde filtriert (0,22 µm Filter).

DMEM	100 ml		
BSA	250 mg		
Transferrin	500 µg		
Insulin	400 µg		
<i>Wässrige Lösungen:</i>		<i>Ethanolische Lösungen:</i>	
L-Alanin	200 µg	Linolsäure	100 µg
Biotin	10 µg	Linolensäure	100 µg
L-Carnitin	200 µg	Tocopherol	100 µg
Ethanolamin	100 µg	Tocopherolacetat	100 µg
D(+)-Galaktose	1,5 mg	All-trans-Retinol	10 µg
L-Prolin	776 µg	Retinylacetat	10 µg
Putrescin	1,61 mg	Progesteron	630 ng
Na-Pyruvat	2,5 mg		
Na-Selenit	1,6 µg		
Vitamin B12	34 µg		
Zn-Sulfat	19,4 µg		
Katalase	1,6 mg		
Glutathion	100 µg		
Superoxiddismutase	250 µg		
PBS/BSA:		Papainlösung:	
1 g BSA		2,5 mg Papain	
10 mM Glukose		50 µg DNase	
1000 ml PBS, sterilfiltrieren		5 ml PBS/BSA, sterilfiltrieren	

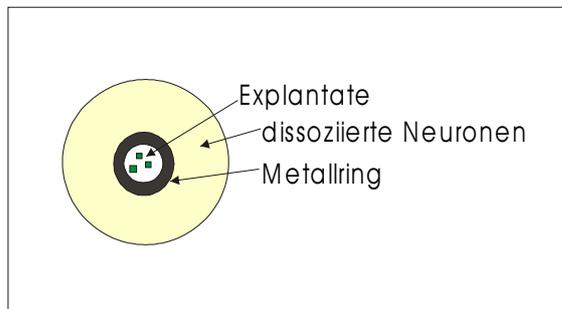
2.2.3.2 Präparation von hippokampalen Explantatkulturen

Explantate wurden entweder durch die Aggregation von dissoziierten hippokampalen Neuronen oder durch das Schneiden von E18 Hippokampi in ca. 500 x 500 µm große Gewebstücke erhalten.

Um Aggregatkulturen zu erhalten, wurden 1 Mill. dissoziierter hippokampaler Neuronen in DMEM/ 10% (v/v) HS über Nacht bei 37°C und 10% CO₂ geschüttelt. Während dieser Inkubationszeit war eine gleichzeitige Infektion mit geringen Virustitern [0,2 µl/ml; 10¹⁰ plaque forming units (pfu)] möglich. Die Aggregate wurden dreimal mit DMEM/ 10% (v/v) HS gewaschen und jeweils bei 300 rpm für 1 min pelletiert. Zwei bis fünf Aggregate wurden jeweils in 5 µl Medium in die Mitte eines Deckgläschen (Durchmesser: 13 oder 15 mm) gegeben. Die Deckgläschen wurden für diese Kulturen nach der Poly-DL-ornithinbeschichtung noch zusätzlich mit Laminin beschichtet (2 µg/ml Laminin in PBS für mindestens 12 h bei 37°C inkubieren, anschließend zweimal mit ddH₂O waschen und 5 min trocknen lassen), um ein besseres Auswachsen der Axone zu gewährleisten. Nach ca. 30 min sind die Aggregate etwas abgesunken, so daß nun vorsichtig vom Rand mit 300µl DMEM/ 10 % (v/v) HS aufgefüllt werden konnte. Das Medium wurde nach 3 h gegen Komplettmedium ausgetauscht.

Für Explantatkulturen wurden E18 Hippokampi in PBS/ BSA in ca. 300 – 500 µm große Quadrate geschnitten und diese für 2 h in DMEM/ 10% (v/v)HS inkubiert (37°C, 10% CO₂) und für manche Experimente während dieser Zeit mit AdV5 transduziert. Die darauffolgenden Schritte entsprechen denen für Aggregatkulturen.

Sobald die Explantate bzw. Aggregate axonales Wachstum zeigen (nach ca. 3-5 Tagen), wurden dissoziierte Zellen (E18, Hippokampus) in einer Weise auf die Deckgläschen gegeben, daß zunächst eine räumliche Trennung dissoziierter Neuronen und Explantate erreicht wird, die erst durch das Einwachsen der Axone in die dissoziierten Kulturen aufgehoben wird. Dazu werden



die Explantate mit einem Metallring (ca. 3 mm Außendurchmesser) umgeben und die dissoziierten Neuronen um diesen herum ausplattiert. Nach 2 h wurde der Ring entfernt und das Medium gegen Komplettmedium ausgetauscht. Funktionelle Synapsen zwischen Explantat und dissoziierten Zellen wurden nach ca. 6 Tagen ausgebildet.

Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Herstellung von Kokulturen. In die Mitte eines Deckgläschens werden die Explantate gegeben. Nach 3-5 Tagen werden die dissoziierten Neuronen außerhalb des Metallringes ausgesät. Der Metallring wird nach Anhaften der Neuronen entfernt. Wahlweise können das Explantat oder die dissoziierten Zellen transduziert werden.

2.2.3.3 Präparation von hippokampalen organotypischen Schnittkulturen

Hippokampale Schnittkulturen wurden entsprechend der Methode von Stoppini et al. (1991) präpariert mit Modifikationen bezüglich des Mediums. Sechs Tage alte Wistar Ratten wurden decapitiert, die Gehirne schnell entnommen und Hippokampi in Geys balanced salt solution (GIBCO) überführt. Hippokampi wurden transversal mit einem Gewebeschnneider (Tissue chopper; McIlwain) 400 µm dick geschnitten, und im Kulturmedium separiert. Einzelne Schnitte wurden auf Millicell Membranen gegeben (Millipore) und bei 37°C in 5% CO₂ inkubiert. Das Medium wurde alle vier Tage gewechselt.

Kulturmedium: 50% (v/v) BME (Eagles basal medium)
 25% (v/v) Pferdeserum
 25% (v/v) HBSS (Hanks balanced salt solution)
 1 mM Glutamin
 5mg/ml D-Glukose

2.2.3.4 Zelllinien

PC12 (Rat pheochromozytoma) Zellen wurden in DMEM mit 5% (v/v) FCS und 10% (v/v) Pferdeserum (Boehringer) bei 37° C und 10% CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden jeweils nach drei bis vier Tagen mechanisch von der Platte gelöst, resuspendiert und ausplattiert.

HEK („human embryonal kidney“) 293 Zellen niedriger Passage (Microbix, Ontario, Kanada) wurden in DMEM mit 10% (v/v) FCS bei 37° C und 5% CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden im dreitägigen Abstand nach Behandlung mit Trypsin-EDTA für 3 min und anschließende Trituration verdünnt ausgesät. Nach ca. 25 Passagen wurden die Zellen verworfen.

BHK („baby hamster kidney“) Zellen wurden in Alpha-MEM Medium mit 10% (v/v) FCS kultiviert und nach jeweils drei Tagen durch Trypsin-EDTA Behandlung vereinzelt und 1:20 verdünnt.

2.2.3.5 Einfrieren von Zellen

Zellen wurden mittels Trypsin-EDTA oder mechanisch von der Kulturschale abgelöst, resuspendiert und pelletiert (110 xg; 5 min, 4°C). Die Zellen wurden im entsprechenden Kulturmedium, welches mit 10% (v/v) DMSO versetzt wurde, resuspendiert (Zellen einer 10 cm Schale wurden in 3ml resuspendiert) und in 1 ml Aliquots in einer Einfrierkammer, die ein

langsam abkühlen auf -80°C erlaubt, eingefroren. Über längere Zeiträume (ab 2 Monate) wurden die Zellen in flüssigem N_2 aufbewahrt.

2.2.3.6 Nachweis zytotoxischer Effekte mit Propidiumiodid und Fluoresceindiacetat

Propidiumiodid (5 ng/ml) gelangt durch die beschädigte Zellmembran toter Zellen in deren Zellkern und interkaliert dort in die DNA-Doppelstränge, wodurch tote Zellen unter Fluoreszenzanregung als scharf umrissene rote Punkte erscheinen. Fluoresceindiacetat (20 $\mu\text{g/ml}$) überwindet die Membran intakter Zellen als Ester, der im Zytoplasma durch endogene Esterasen gespalten wird und dort akkumuliert. Somit erscheinen lebende Zellen unter Fluoreszenzanregung grün. Beide Substanzen wurden 5 min mit den Zellen inkubiert und die Zellen sofort unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet.

2.2.4 Immunozytochemische Methoden

Hippokampale Zellen

Für die lichtmikroskopische intrazelluläre Lokalisation von Proteinen oder Peptiden in fixierten hippokampalen Zellen wurden hippokampale Neuronen in geringer Dichte (5×10^4 Zellen pro Deckgläschen, 10 mm Durchmesser) verwendet. Diese wurden (in manchen Experimenten 30 h nach Adenovirustransduktion) mit PBS gewaschen, anschließend mit 4% (w/v) PFA in PBS für 20 min fixiert und durch Inkubation (5 min) in 0.2% (v/v) TritonX-100 permeabilisiert. Diese und alle nachfolgenden Schritte (außer Inkubation mit dem ersten Ak) wurden bei RT durchgeführt. Durch PFA verursachte Hintergrundfluoreszenz auf Grund reaktiver Aldehydgruppen wurde durch dreimaliges Waschen (je 8 min) mit 0.1 M Glyzin in PBS vermieden; unspezifische Bindungsstellen wurden durch Inkubation mit 20% (v/v) NGS (normal goat serum, Ziegenserum: Sigma) in PBS für 1 h blockiert. Die Zellen wurden ÜN bei 4°C mit dem ersten Ak in 2% (v/v) NGS in PBS inkubiert, anschließend für 30 min mit PBS gewaschen und für 1 h mit dem sekundären Ak (in 1% (v/v) NGS in PBS) inkubiert. In den Fällen, in denen ein biotinylierter zweiter Ak verwendet wurde, wurde die IR über eine Bindung eines Streptavidin gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffes (Streptavidin-cy3 oder Streptavidin-FITC) sichtbar gemacht. Zum Teil wurden auch direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte sekundäre Ak verwendet. Nach abschließendem Waschen (dreimal 10 min PBS) wurden die Deckgläschen eingebettet (Immuno Fluore Mounting Medium; ICN, Eschwege).

Immunofluoreszenz wurde mittels eines Axiophot Fluoreszenzmikroskopes (Zeiss, Standard TRITC und FITC Filteranordnungen) analysiert. Für Koloralisierungsstudien wurden die Fluoreszenzen mittels konfokaler Mikroskopie (Leica, Heidelberg, Germany) analysiert. Das erlaubt eine sehr präzise Überlagerung zweier Fluoreszenzsignale in einer definierten Fokusebene. Zur Auswertung der konfokalen Daten (als flat-Dateien gespeichert) wurde das Programm Image Quant (Molecular Dynamics) verwendet.

Zelllinien

Das obenstehende Protokoll wurde für die Immunomarkierung intrazellulärer Epitope in Zelllinien leicht verändert: es wurde 2 h mit 10% (v/v) NGS und 10% (w/v) BSA in PBS blockiert. Außerdem wurden für Zelllinien ausschließlich direkt gekoppelte Sekundär-Ak verwendet, da der Hintergrund mit biotinkoppelten Ak speziell in den verwendeten Zelllinien sehr hoch war.

2.2.5 Kalzium-Fluoreszenzmikroskopie

Für die Bestimmung der Konzentration an intrazellulärem freiem Kalzium wurde Fura-2 verwendet, da es sein Absorptionsspektrum kalziumabhängig verschiebt und sehr hohe Affinität zu Kalzium besitzt. Damit ist es möglich, duale Messungen¹² der Kalziumkonzentration bei

¹² bei geeigneter Wahl zweier Anregungsfrequenzen spiegelt das Verhältnis der beiden resultierenden Fluoreszenzen den Anteil des Farbstoffes in freier bzw. kalziumbindender Form wider

Einsatz geringer Farbstoffkonzentrationen durchzuführen. Die Veresterung (AM= Pentacetoxymethylester) von Fura-2 macht es membranpermeabel; die Esterbindungen werden nach Permeation intrazellulär durch endogene Esterasen gespalten.

Dissoziierte hippokampale Neuronen geringer Dichte (100.000 Zellen per 15 mm Deckgläschen) wurden nach 9 bis 11 Tagen in Kultur mit Fura-2-AM (Calbiochem, 2 μ M Endkonzentration, Stammlösung: 1 mM Fura-2-AM in DMSO mit 10% (w/v) Pluronic F127, Calbiochem) für 40 min bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit HP wurden die Deckgläschen mittels Silikon dicht an eine Kammer angeschlossen und weitere 10 min in HP äquilibriert. Während der gesamten Messung wurden die Zellen in HP aufbewahrt.

Die Neuronen wurden mittels eines invertierten Mikroskopes beobachtet (Axiovert 100, Zeiss, Zeiss Fluor 40 x 1,30 Öbobjektiv). Die Fluoreszenz wurde bei zwei Wellenlängen (340 nm und 380 nm) mittels einer ICCD (intensified charge coupled device) Kamera (Hamamatsu, Joko-Cho, Japan, Typ: C2400-87) bestimmt. Für jedes Bild (ein Bild pro 0.75s) wurden 8 Bilder gemittelt. Die Bilder wurden mit Argus 50/CA Software (Hamamatsu) prozessiert.

2.3 Spezielle Methoden

2.3.1 Methoden zum Gentransfer

2.3.1.1 Transfektionen

Stabil /Transient: Stabile und transiente Transfektionen wurden unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Um Klone zu selektieren, die das Transgen in das Genom integriert hatten, wurden eine dem Transgen benachbarte Geneticinresistenz ausgenutzt. Die Selektion der Klone erfolgte durch Zufügen von 0,5 mg/ml Geneticin ab zwei Tagen nach der Transfektion.

Elektroporation

PC12 Zellen wurden sehr effizient (ca. 50%) mittels Elektroporation transfiziert (Kaether et al., 1997). Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Zellen von ca. fünf 10 cm Kulturschalen wurden dreimal mit kaltem PBS gewaschen, mechanisch von der Platte gelöst und in einer Dichte von 1,5 bis 4 x 10⁷ Zellen/ml resuspendiert. Anschließend wurden 0,8 ml der Zellsuspension für 5 min mit 30 bis 50 μ g DNA inkubiert, anschließend resuspendiert und in eine Elektroporationsküvette überführt (BioRad, 0,4 mm Spalt). Die Zellen wurden mittels eines Pulses elektroporiert (BioRad gene pulser: 960 μ F, 250 V), sofort in 12 ml Medium resuspendiert und in Kulturschalen gegeben.

Kalziumphosphattransfektion

Die Methode basiert auf der Bildung eines Kalziumphosphat-DNA Kopräzipitates, welches von den Zellen endozytiert wird.

Zellen wurden am Vortag ausplattiert und etwa 70-80% konfluent verwendet. Für die Transfektion von Zellen einer 6 cm Kulturschale wurden 6 μ g DNA in einem Volumen (ddH₂O) von 225 μ l verwendet. Unter Schütteln wurden 25 μ l 2,5 M CaCl₂ Lösung zugegeben und ebenfalls unter Schütteln 250 μ l 2x BBS. Nach 20 minütiger Inkubation bei RT wurde der gesamte Ansatz unter Schwenken der Platte langsam auf die Zellen (mit 450 μ l Medium bedeckt) getropft. Die Zellen wurden für 3 bis 6 h bei 3% CO₂ und anschließend für 12 bis 20 h bei 5% (oder 10%) inkubiert. Das Präzipitat wurde durch dreimaliges Waschen entfernt und die Zellen mit 5 ml frischem Medium kultiviert.

2x BES-gepufferte Saline (BBS):	50 mM BES
	280 mM NaCl
	1,5 mM Na ₂ HPO ₄

2.3.1.2 Viraler Gentransfer

2.3.1.2.1 Adenovirus

Mit Hilfe replikationsdefizienter Adenoviren (Typ5) können postmitotische Zellen transient transduziert werden. Die Integration der zu exprimierenden cDNA in das Adenovirusgenom erfolgt über eine homologe Rekombination in 293 Zellen¹³, da eine direkte Klonierung in das Virusgenom nicht möglich ist.

Das zu klonierende Gen wurde zunächst in einen bakteriellen Vektor (pXCJL1/2 oder pXCJLCMVBGH) kloniert, der den E1 deletierten Teil des linken Arms (11%) des Adenovirus enthält. Dieser Vektor wurde mit einem Vektor pJM17, der das gesamte Adenovirusgenom mit Ausnahme der E1A-Region enthält, in 293 Zellen kotransfiziert. Nach homologer Rekombination dieser Vektoren entstehen replikationsdefiziente Viruspartikel. Nach ca. 2-3 Wochen sichtbar werdende zytotoxische Effekte sind ein Indikator für eine erfolgreiche Rekombination (siehe detailliertere Beschreibung unter 3.1.1; Abb. 3.1).

Kotransfektion zur Herstellung adenoviraler Vektoren

Für die Kotransfektion zur Adenovirusherstellung wurde eine Kalziumphosphattransfektion verwendet. Dazu wurden 3 µg des pJM17 und 3 µg pXCJL mit dem insertierten Transgen für eine 6 cm Kulturschale benötigt. Zytopathische Effekte, die auf die Entstehung von viralen Partikeln hindeuten, wurden nach 14-20 Tagen beobachtet. In der Regel wurde zunächst getestet, ob der Überstand genügend Viruspartikel enthielt, um zytopathische Effekte in nichttransfizierten 293 Zellen auszulösen und anschließend ein Plaque Assay durchgeführt.

Plaque-assay

Der Plaque Assay wurde einerseits zur Vereinzelung der Viruspartikel (um eventuell entstehende Wildtypviren zu isolieren und Virusklone zu erhalten) im Prozeß der Virusherstellung und andererseits zur Bestimmung des Virustiters benutzt.

Nahezu konfluent gewachsene 293-Zellen in 6 cm Schalen wurden für eine Stunde mit 500 µl Medium mit einer definierten Verdünnung (10^{-3} bis 10^{-11}) des Virusüberstandes bzw. gereinigten Virus inkubiert, wobei die Platten im 10 min Abstand geschwenkt wurden. Anschließend wurden die Zellen mit 0,6% (w/v) niedrigschmelzender Agarose in Kulturmedium überschichtet und nach Aushärten der Agarose (30 min RT) inkubiert. Plaques konnten nach ca. 5 Tagen detektiert werden.

Plaquesisolierung

Plaques wurden unter mikroskopischer Kontrolle isoliert. Dazu wurde der Agar an der Stelle eines deutlich abgegrenzten Plaques mit einer Eppendorfpipettenspitze ausgestochen und in 100 µl PBS/10% (v/v) Glycerol überführt. 50 µl dieser Lösung wurden zu 293 Zellen (6 cm Kulturschale) gegeben. Zytopathische Effekte sind nach ca. 3 Tagen deutlich. Überstände positiver Plaques wurden in 10% (v/v) Glycerol bei -80°C aufbewahrt.

Test der Plaques

Um festzustellen, welche Plaques tatsächlich den Virus mit dem gewünschten Transgen enthielten, wurde zunächst eine PCR mit passenden Primerpaaren durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde in der Regel sequenziert; außerdem wurde die Expression des richtigen Proteins mittels Westernblot überprüft.

Sobald zytopathische Effekte sichtbar waren, wurden Zellen aus 500 µl des Überstandes (enthält genügend Zellen für eine Zellyse und PCR) pelletiert und mit 80 µl Lysepuffer für 3 h bei 37°C inkubiert. Das Lysat wurde 1:10 mit ddH₂O verdünnt und 1 µl dieser Lösung direkt in der PCR (siehe 2.2.1.14) eingesetzt.

¹³ 293 Zellen ermöglichen eine Amplifikation der Adenoviren, da sie den in den replikationsdefizienten Viren deletierten essentiellen E1-Transaktivator exprimieren (siehe 3.1.3).

Lysepuffer :	0,01 M Tris-HCl 0,01 M EDTA 0,5% (w/v) SDS pH 7,5	0,5 mg/ ml Pronase (Sigma) frisch zugeben (Stammlösung: 5 mg/ml Pronase in 0,01 M Tris-HCl werden für 15 min bei 56°C und für 1 h bei 37°C inkubiert, aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt)
---------------------	--	--

Propagation von Adenoviren in 293-Zellen und Virusreinigung

Adenoviren besitzen keinen speziellen Mechanismus, mit dem sie die Zelle verlassen können (außer nach Disintegration der Zellen), weshalb ca. 90% der Viruspartikel auch in späten Infektionsphasen zellassoziiert sind. Deshalb ist es am effizientesten, die Viren nach Zellaufschluß aus 293 Zellen zu gewinnen.

Dazu wurden 10 x 14 cm Kulturschalen (mit 293 Zellen konfluent bedeckt) mit je 10^9 pfu (entspricht ca. 1 μ l eines konzentrierten Virus oder 100 μ l Mediumüberstand aus infizierten Zellen) AdV infiziert. Nach 2 – 3 Tagen sollten sich 70% der Zellen von der Schale gelöst haben. Zellen aus den Überständen wurden pelletiert (172 xg, 5 min, 4°C) und Zellen die noch an der Schale haften mit einem Zellschaber vorsichtig gelöst. Das gesamte Zellpellet wurde in 10 ml Medium / 10% (v/v) Glycerol resuspendiert und bei -80°C aufbewahrt. Die Zellen wurden durch sukzessives Einfrieren und Auftauen (dreimal -80°C, 37°C) und anschließendes Homogenisieren (auf Eis, Dounce Homogenisator) mechanisch aufgeschlossen. Zelltrümmer wurden pelletiert (1550 xg, 15 min, 4°C) und ein zweites Mal homogenisiert. Die Überstände aus beiden Homogenisationen wurden mittels eines CsCl-Dichtegradienten weiter aufgereinigt und konzentriert.

Dazu wurden in ein 12 ml Ultrazentrifugationsröhrchen (Quick-Seal, Beckmann) zunächst 1,5 ml einer 1,45 g/cm³ (43 g CsCl in 60 ml 10 mM Tris pH 8,0) und darüber 2,5 ml einer 1,32 g/cm³ (56 g CsCl in 116 ml Tris pH 8,0) dichten CsCl – Lösung gegeben. Über diese CsCl-Lösung wurde vorsichtig der Zellextrakt gegeben. Die Proben wurden bei 90.000xg für 3-4 h zentrifugiert (4°C). Unter diesen Bedingungen bilden Adenoviren auf Grund ihrer Auftriebsdichte von 1,34 g/cm³ eine lichtbrechende, sichtbare Bande aus, die mit einer Spritze abgezogen wurde. Diese virushaltige Lösung wurde auf einen zweiten Gradienten aufgetragen (mit 10 mM Tris pH 8 auffüllen) und für 16 bis 24 h zentrifugiert. Die Bande ist danach sehr klar sichtbar und wurde abgezogen. CsCl wurde durch Gelfiltration entfernt, wozu eine NAP-25 Säule von Pharmazia verwendet wurde (entsprechend der Anleitung des Herstellers). Eluiert wurde mit 10 mM Tris/ 10% (v/v) Glycerol. Alternativ kann der Virus gegen 10 mM Tris/ 10% (v/v) Glycerol dialysiert werden. 10 μ l Virusaliquots wurden auf Trockeneis eingefroren und bei -80°C aufbewahrt. Die Virustiter lagen in der Regel bei 10^{10} bis 10^{11} pfu.

2.3.1.2.2 Sindbisvirus

Für die Herstellung von Sindbisviren wurde das Sindbis Expression System von Invitrogen verwendet (siehe für Details auch 3.1.2; Abb. 3.5). Abweichungen vom angegebenen Prozedere werden im folgenden beschrieben.

Linearisierte Vektoren wurden mittels des Qiaquick gel extraction Kits (Qiagen) unter RNase freien Bedingungen gereinigt und direkt für die in vitro Transkription eingesetzt.

Elektroporation von BHK Zellen zur Sindbisvirusherstellung (nach: Liljeström et al., 1991)

Rekombinante RNAs von SinRep5 mit dem Transgen und der Helfer-RNA DH(26S) wurden nach in vitro Transkription (in vitro Transkription wurde mit dem InvitroScriptTMCap SP6 in vitro Transkriptionskit, Invitrogen synthetisiert) in BHK Zellen kotransfiziert.

Für die Elektroporation wurden BHK Zellen einer geringen Passagenzahl (bis Passage 10) in einer Konfluenz von 70% verwendet, um Aggregation der Zellen zu vermeiden. Für eine Elektroporation wurden 5×10^6 Zellen benötigt. Die Zellen wurden zunächst zweimal mit PBS

gewaschen und mit 4 ml Trypsin-EDTA dissoziiert. Die Zellen wurden in Kulturmedium resuspendiert, pelletiert (80 x g, 5 min, RT) und anschließend mit 10 ml eiskaltem RNase freiem PBS resuspendiert. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt, und die Zellen schließlich in einer Dichte von 10^7 / ml PBS aufgenommen. Kurz vor der Elektroporation wurden 500 μ l der Zellsuspension mit je 10 μ l DH26S und Sinrep5 RNA (es wurde direkt der Reaktionsansatz der in vitro Transkription verwendet) in einer Elektroporationsküvette (BioRad, 0.2 mm Spalt) gemischt. Anschließend wurden die Zellen mit zwei Pulsen elektroporiert (BioRad Gene Pulsar™ mit Pulse Controller: 1.5kV, 25 μ F; Widerstand 8), 10 min bei RT äquiliert und schließlich in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und für 24 h bis 30 h inkubiert.

Für die meisten Anwendungen kann man direkt den Überstand der BHK-Zellen verwenden. Dazu wurde der Überstand von Zelltrümmern befreit (1550 xg, 15 min, 4°C) und in 50 μ l Aliquots in einem Trockeneis-EtOH-Bad eingefroren. Die Aliquots wurden bei -80°C aufbewahrt.

Für lokale Injektionen ist es von Vorteil, die Viren zu konzentrieren und das Medium gegen einen serumfreien Puffer auszutauschen, um eine Verstopfen der Injektionskanülen zu verhindern. Eine Sedimentation der Viruspartikel wurde durch eine Ultrazentrifugation (160.000 x g, 2 h, 4°C) erreicht. Das Pellet wurde in einem Hepespuffer aufgenommen und wie oben in Aliquots eingefroren.

2.3.1.2.3 Viraler Gentransfer: Methoden

Transduktion von Zellkulturen

In der Regel wurden dissoziierte Zellen mit einem μ l gereinigten Viruses (ca. 10^7 pfu)/300 μ l für 30 h inkubiert. Ob unter diesen Bedingungen eine effiziente Transduktion erreicht werden konnte, wurde i.d.R. durch parallele lichtmikroskopische Färbungen oder die Verwendung von AdV5EGFP kontrolliert.

Lokale Injektionen

Ein großer Vorteil bei der Anwendung viraler Gentransfermethoden liegt in der potentiell möglichen lokalen Transduktion von Zellen im Gewebsverband (in vivo oder in vitro, z.B. Schnittkulturen oder akute Schnitte).

Injektionen in Schnittkulturen

Schnittkulturen nach 1-2 Wochen in Kultur oder akute hippokampale Schnitte wurden für einen lokalen Gentransfer mittels Adeno- oder Sindbisviren verwendet. Dazu wurden Mikropipetten aus Borosilikatglas (K 120-3, 7.5 cm, World Precision Instruments) mittels eines automatischen Pipettenziehers (Falming/Brown Micropipette Puller) gezogen, deren Öffnungsdurchmesser auf 10 – 20 μ m durch Abschmelzen der Spitze vergrößert wurde.

Aufbau des Arbeitsplatzes:

Mikromanipulator M3301R mit 12 mm Klemme

Magnetische Halterung M10

Druckkontrolle PicoPump w/pressure (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA)

magnetischer Metalltisch

Mikroskop (Diavert, Leica)

Adeno- oder Sindbisviren wurden mit 4-6 200ms anhaltenden Pulsen mit minimalem Druck in die CA1 oder CA3 Region druckinjiziert.

2.3.2 Freisetzungsstudien

2.3.2.1 Nachweis der Freisetzung von NT6myc mittels Westernblot:

Da für NT6 kein sensitiver ELISA existiert und ein myc-ELISA im Bereich der Sensitivität eines Westernblots liegt, wurde die NT6-Freisetzung per Westernblot analysiert. Dazu wurden 3×10^6 hippokampale Neuronen auf einer 6 cm Kulturschale benötigt, die für 40 h mit AdV5NT6myc transduziert wurden. Die Zellen wurden 2 mal mit HP gewaschen, 30 min in HP bei 37°C äquiliert und dreimal mit HP gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 15 min in 1,2

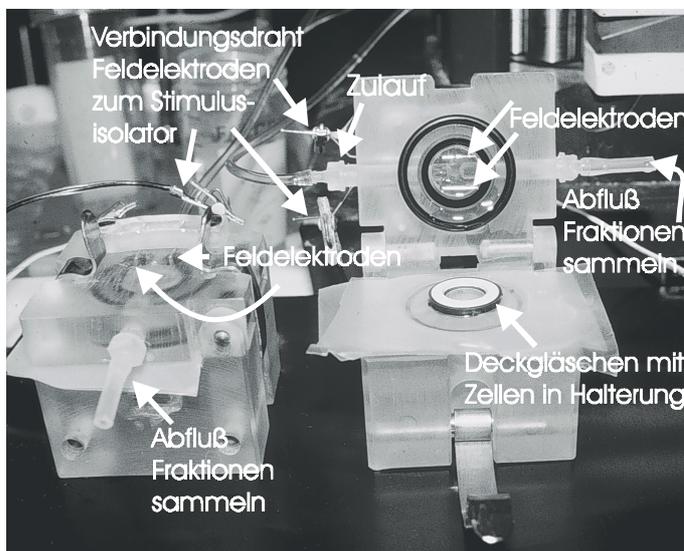
ml HP (Basalwert der Freisetzung) und anschließend 15 min in Stimulationspuffer (HP: 50 mM NaCl wurden durch 50 mM KCl ersetzt: stimulusinduzierte Freisetzung) inkubiert. Die Überstände wurden zentrifugiert (Tischzentrifuge, 1000 rpm, 10 min, 4°C), um eventuell abgelöste Zellen zu pelletieren. NT6myc wurde mit Heparinsepharose präzipitiert und mittels Westernblot mit dem NT6 -Ak nachgewiesen.

2.3.2.2 Freisetzung von NGF und BDNF unter Perfusionsbedingungen

Für diese Studien wurden Perfusionskammern (Minucell and Minutissu, Bad Abbach, Deutschland) verwendet. Deckgläschen (10 mm Durchmesser) mit 100.000 bis 300.000 für 24 h transduzierten, dissoziierten hippocampalen Neuronen (7-10 Tage nach Präparation) wurden in die Kammern gegeben und mit HP bei mit einer Geschwindigkeit von 0.1 ml/min perfundiert. Die Proben wurden nach 30 minütiger Äquilibrierungszeit im 5 min Abstand gesammelt. BDNF bzw. NGF Mengen in den Proben wurden durch ELISA (siehe 2.2.2.6) bestimmt. In der Regel wurden die Zellen zweimal stimuliert, um unterschiedliche Stimulationsbedingungen vergleichen zu können. Zunächst wurden zwei Basalwerte genommen, dann 5 min stimuliert und vier Proben analysiert. Nach 20 min wurden erneut zwei Basalwerte gesammelt, bevor erneut stimuliert wurde.

2.3.2.3 Freisetzung induziert durch Stimulation mit Feldelektroden

Um die Zellen gezielt mit einem elektrischen Feld stimulieren zu können, wurden die Deckgläschen mit den dissoziierten hippocampalen Neuronen zwischen parallel zueinander verlaufenden Feldelektroden angebracht. Die Feldelektroden bestehen aus Platindrähten, die im Abstand von ca. 8 mm befestigt sind und jeweils 7 mm lang sind. Diese Feldelektroden liegen nicht direkt auf den Zellen auf, sondern sind in einer Höhe von 1 mm angebracht, um die Zellen nicht mechanisch zu zerstören. Die Platindrähte wurden über Zuleitungskabel mit der Anode bzw. Kathode eines Stimulusisolators (HG.106B, Hivotronic LTD) verbunden. Die Drähte verliefen parallel zueinander, um über einer möglichst großen Fläche ein homogenes Feld aufzubauen. Die Stimulusstärke wurde über den Stimulusisolator reguliert (i.d.R. 15 V). Das



Stimulismuster (z.B.: 10 Hz, 50 Hz, TBS) wurde über einen Master-8 (A.M.P.I., Israel) Pulsgenerator programmiert, mit dem die Dauer der Einzelpulse, deren Interstimulusintervall und die Gesamtlänge der Stimuli reguliert werden konnte. Für Freisetzungsstudien unter statischen Bedingungen wurden die auf einem Deckgläschen kultivierten Zellen in eine kleine Zellkulturschale (die Deckgläschen wurden durch in der Kulturschale angebrachte Ringe an ihrem Platz gehalten) gegeben, in deren Deckel die Feldelektroden befestigt wurden. Sollten Zellen unter Durchflußbedingungen analysiert werden, wurden die Feldelektroden direkt in die Perfusionskammer eingelassen.

Abb. 2.2: Versuchsaufbau für die Freisetzungsstudien unter Perfusions-

bedingungen. In diesem Beispiel sind Perfusionskammern mit Feldelektroden gezeigt. Die rechte Kammer ist zur besseren Veranschaulichung im geöffneten, die linke im geschlossenen Zustand gezeigt.

2.3.2.4 Freisetzung von NT6myc analysiert durch Immunogoldoberflächenfärbung auf EM-Ebene

Freisetzungsexperiment:

Hippokampale Neuronen einer Dichte von 10^5 Zellen pro Deckgläschen (13mm Durchmesser) wurden für 30 h mit AdV5NT6myc transduziert. Alle folgenden Schritte wurden bei 15°C durchgeführt, um den Anteil der konstitutiven Freisetzung möglichst gering zu halten (Blöchl und Thoenen, 1995) und unter Verwendung von HP ohne BSA (das spezifische Oberflächensignal konnte deutlich erhöht werden, wenn BSA vermieden wurde). Die Zellen wurden nach einer Äquilibrationszeit von 20 min dreimal 3 min mit HP mit 100 µg/ml Heparin gewaschen. Heparin wurde durch Waschen (dreimal 3 min) mit HP entfernt. Anschließend wurden die Zellen entsprechend des Protokoll (z.B. 3 min KCl-Stimulationspuffer) stimuliert. Kontrollzellen wurden zur Ermittlung der basalen Freisetzung während der Stimulationszeit in HP inkubiert. Nach Stimulation wurden die Zellen sofort auf Eis mit 1% (v/v) GA in PBS fixiert (30 min auf Eis und 30 min bei RT). Zellen, die als Positivkontrolle dienten, wurden vor der Fixierung nur einmal mit HP gewaschen, um die maximale Dichte an oberflächengebundenem NT6myc zu ermitteln.

„Preembedding“ Immunohistochemie:

Bei „preembedding“ Techniken werden die fixierten Zellen erst nach der Färbung mit den entsprechenden Ak eingebettet (siehe auch 2.3.3).

Die folgenden Schritte wurden bei RT in PBS-haltigen Lösungen durchgeführt. Die fixierten Zellen wurden mit PBS (dreimal 10 min) gewaschen und GA durch gründliches Waschen (dreimal 10 min) mit 0.1 M Glyzin desaktiviert. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch 2 h Inkubation mit 20% (v/v) NGS blockiert. Die Zellen wurden mit dem ersten Ak (9E10 monoklonaler anti myc-Ak, Hybridomaüberstand 1:10) in 2% (v/v) NGS bei 4° C ÜN inkubiert, anschließend gewaschen (dreimal 10 min) und mit einem anti-Maus Ak (gekoppelt mit 4 nm kolloidalem Gold: 1:20 in 2% (v/v) NGS) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die Zellen postfixiert (1 h in 2,5% (v/v) GA) und weiter entsprechend des in 2.3.3 beschriebenen Protokoll prozessiert.

2.3.3 EM-Methoden

Die in diesem Kapitel beschriebenen Techniken wurden in Zusammenarbeit mit Yuri Shostak und Natalie Stöckle durchgeführt. An dieser Stelle möchte ich mich bei der EM-Gruppe in der Abteilung für Neuromorphologie für die Hilfe beim Schneiden der Proben und für die Entwicklung unzähliger Fotos bedanken.

2.3.3.1 Einbetten der Zellen nach „preembedding“ Immunogoldzytochemie

Alle Schritte wurden bei RT in PB Puffer durchgeführt. Postfixierte Zellen wurden zweimal mit PB gewaschen, zusätzlich in 1% (v/v) OsO₄ 1 h postfixiert, in 1% (w/v) Tanninsäure für 1 h inkubiert und anschließend in Uranylacetat (1% (v/v) Lösung in 70% (v/v) EtOH) für 18-24 h bei 4° C inkubiert. Die Proben wurden in einer aufsteigenden EtOH Reihe dehydriert und schließlich in Epon 812/Araldite eingebettet. Mit Hilfe eines Diamantmessers (Ultratome III 8800, LKB) wurden ultradünne Schnitte (ca. 60 nm) vorzugsweise an der Oberfläche der Blöckchen geschnitten und auf Nickelnetzen (200 Maschen, EM Sciences, München, Deutschland) gesammelt. Nach einer abschließenden Färbung mit Uranylacetat und Bleicitrat wurden die Proben mit einem Zeiss Transmissionselektronenmicroscopes analysiert (60 kV Beschleunigungsspannung).

2.3.3.2 „Postembedding“ Immunogoldzytochemie

Bei dieser Technik werden die Zellen zunächst eingebettet und ultradünn geschnitten, bevor sie auf den Netzen immunogefärbt werden. Diese Technik wurde für den Nachweis der intrazellulären Neurotrophin-Verteilung verwendet, da eine Permeabilisierung der Zellen und die damit verbundene Zerstörung zellulärer Strukturen, vor allem der Membranen, vermieden werden kann. In einigen Fällen wurden direkt die Proben (Netze) verwendet, die für die Oberflächenmarkierung prozessiert wurden. Für weitere Untersuchungen wurde ein leicht modifiziertes Protokoll zur Einbettung und Probenvorbereitung etabliert.

Auch hier wurden alle Schritte bei RT in PB durchgeführt. Es wurden verschiedene Methoden zur Fixierung verwendet (Variation der PFA- und GA-Konzentrationen und Zusatz von Pikrinsäure); am vielversprechendsten hinsichtlich Strukturhaltung und Antigenizität war eine 30 min Fixierung mit 4% (w/v) PFA/ 0,1% (v/v) GA/ 1% (v/v) Pikrinsäure. Die Zellen wurden zweimal mit PB und zweimal 10 min mit 50 mM NH₄Cl gewaschen und nach gründlichem Waschen 30 min mit 1% (v/v) OsO₄ in 6,86% (w/v) Sukroselösung fixiert. Nach Waschen in PB und ddH₂O wurden die Zellen schrittweise in EtOH (30 – 100% (v/v) EtOH) und schließlich mit 100% Aceton dehydriert. Die Zellen wurden in Durcupan ACM (Fluka: 10 ml 44611; 10 ml 44612; 0,3 ml 44613; 0,2 ml 44614) eingebettet (30 min 2 Volumen Aceton : 1 Volumen Durcupan; 30 min 1 Volumen Aceton : 2 Volumen Durcupan; 48 h 60°C Durcupan). Ultradünne Schnitte wurden auf unbeschichteten Nickelnetzen gesammelt. Die Färbung wurde auf den Netzen durchgeführt, die auf Tropfen der entsprechenden Lösungen auf einer wachsbeschichteten Platte inkubiert wurden. Zunächst wurden unspezifische Bindungsstellen mit 10% (w/v) BSA, 0,1% (v/v) Fischgelatine blockiert und die Proben ÜN bei 4°C mit dem ersten Ak (5.7 µg/ml 9E10 myc-Ak, 1% (w/v) BSA) inkubiert. Nach grünlichem Waschen mit PB wurde ein goldgekoppelter sekundärer Ak (1:20 in 1% (w/v) BSA) für 2 h zugegeben und nach weiterem Waschen in PB und ddH₂O die Proben mit Bleicitrat und Uranylacetat gefärbt.

Schnittkulturen wurden mit 4% (w/v) PFA/ 0,2% (v/v) GA fixiert und ansonsten identisch behandelt, außer daß zur Fixierung 0,5% (v/v) OsO₄ verwendet wurde.

2.3.3.3 Statistische Analyse der Immunogold-Oberflächenfärbung

Für die quantitative Auswertung der Daten wurden drei unabhängige Experimente ausgewertet. Dazu wurden die Anzahl der Goldpartikel, die mit der Membranoberfläche assoziiert sind und die Länge der Zellmembran mittels morphometrischer Methoden bestimmt („randomized systematic sampling“, Cruz-Orive und Weibel, 1981). 24 elektronenmikroskopische Bilder (42000 fache Vergrößerung) je Experiment wurden in einer zufälligen, aber systematischen Methode fotografiert (die Netze wurden entlang der Stege angeschaut und in jeder oberen rechten Ecke wurde ein Bild genommen; leere Gebiete wurden vernachlässigt). Anschließend wurden die oberflächenassoziierten Goldpartikel ausgezählt und pro Membraneinheit (10 µm) angegeben. Die Membranoberfläche wurde durch eine morphometrische Methode („isotrope uniform random test system of parallel lines“; Cruz-Orive, 1989) bestimmt¹⁴. Die Daten wurden statistisch mit dem Student t-Test ausgewertet. Für die Quantifizierung der oberflächenassoziierten Goldpartikel der Zellsomata wurde die Methode etwas modifiziert. Da die Somataoberfläche, die durch die Zufallsmethode fotografiert wurde sehr gering gegenüber der der Neuriten war, wurden Somata in einer gezielteren Weise gesammelt, ohne eine Selektion durch den Beobachter zuzulassen: die Probe wurde von links nach rechts bewegt und die jeweils erste so gefundene Somaoberfläche fotografiert. Somit war es möglich, von jedem Zellkörper des Netzes eine zufällig ausgewählte Probe zu nehmen. Wenn weniger als 24 Zellkörper pro Probe

¹⁴ Eine Folie mit parallelen Linien im Abstand von 1,5 cm (h) wird in zufälliger Orientierung über das EM-Bild gelegt, und die Überkreuzungspunkte der Membranoberfläche mit den Linien (N) werden gezählt. Danach wird unter Berücksichtigung des Vergrößerungsfaktors (M) die Membranoberfläche (L) berechnet:

$$L = \pi/2 \times h \times N \times 1/M.$$

vorhanden waren, wurde eine zweite Stelle fotografiert. Die Zählungen wurden blind ausgeführt; einige der Experimente wurden von drei verschiedenen Beobachtern ausgezählt, um Variationen durch die Zählung an sich abschätzen zu können, die hier allerdings vernachlässigbar waren.

2.3.4 Elektrophysiologische Methoden

Die in diesem Kapitel beschriebenen Techniken wurden in Zusammenarbeit mit Volker Staiger in der Abteilung Neurophysiologie durchgeführt und sollen nur kurz beschrieben werden.

2.3.4.1 Patch-Clamp-Messungen

Die Reizantworten von Einzelzellen wurden mittels Patch-Clamp-Methoden analysiert. Dazu wurde die gesamte Zelle gepatcht und die Zellmembran an der Patchstelle mittels AmphotericinB (Sigma) perforiert. Glaselektroden mit einem Öffnungsdurchmesser von 1,5 μm wurden mit interner Lösung gefüllt (110 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 40 mM HEPES, 0,6 mM EGTA, 200 $\mu\text{g/ml}$ AmphotericinB pH 7.2). Die Zellen in der Ableitkammer wurden ständig mit frischem Medium (0.5 ml/min) perfundiert. Die Zellen wurden zunächst im Voltage-Clamp-Modus (Axoclamp 2B amplifier, Axon Instruments) gemessen. Nach Ausbildung eines stabilen Patches wurden die Ableitungen im Current-Clamp-Modus durchgeführt, um das Membranpotential unter verschiedenen Bedingungen zu messen. Die Daten wurden mit 5 kHz aufgenommen.

2.3.4.2 Analyse von mEPSC (miniature excitatory postsynaptic currents = Miniatur Exzitatorische postsynaptische Ströme)

Eine Analyse der mEPSC erfolgte ebenfalls im Current-Patch-Clamp-Modus. Spontane Aktionspotentiale wurden durch die Zugabe von 5nM TTX unterdrückt, GABAerge Inhibition wurde durch 50 μM Picrotoxin blockiert. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels eines in der Programmiersprache Labview geschriebenen Programms.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zum Gentransfer in dissoziierte hippokampale Kulturen und hippokampale Schnittkulturen

Der adenoviral vermittelte Gentransfer ist eine sehr effiziente Methode, um postmitotische Zellen transient und ohne toxische Nebeneffekte zu transduzieren (Griesbeck et al., 1996). Da diese Methode die Grundlage der meisten im folgenden beschriebenen Experimente bildet, soll zunächst die methodische Seite der Adenovirusherstellung und -anwendung beschrieben und im weiteren ein weiteres virales Gentransfersystem, Sindbisviren, eingeführt werden. Anschließend sollen die beiden Systeme hinsichtlich ihrer experimentellen Anwendbarkeit verglichen werden; in der Diskussion werden Vor- und Nachteile beider Transduktionsmethoden zusammenfassend dargestellt.

3.1.1 Herstellung adenoviraler Vektoren

Die Kapazität der Virions für die Verpackung zusätzlich integrierter DNA beträgt 5% des Wildtypgenomes (2 kb). Die Deletion der E1 Region, die für einen Transaktivator codiert, erlaubt eine Insertion von insgesamt 5 kb und gleichzeitig die Propagation replikationsdefizienter Adenoviren, die sich nur in Wirtszellen (in unserem Falle die 293-Zelllinie) die E1 in trans exprimieren (Graham, 1977) vervielfältigen können.

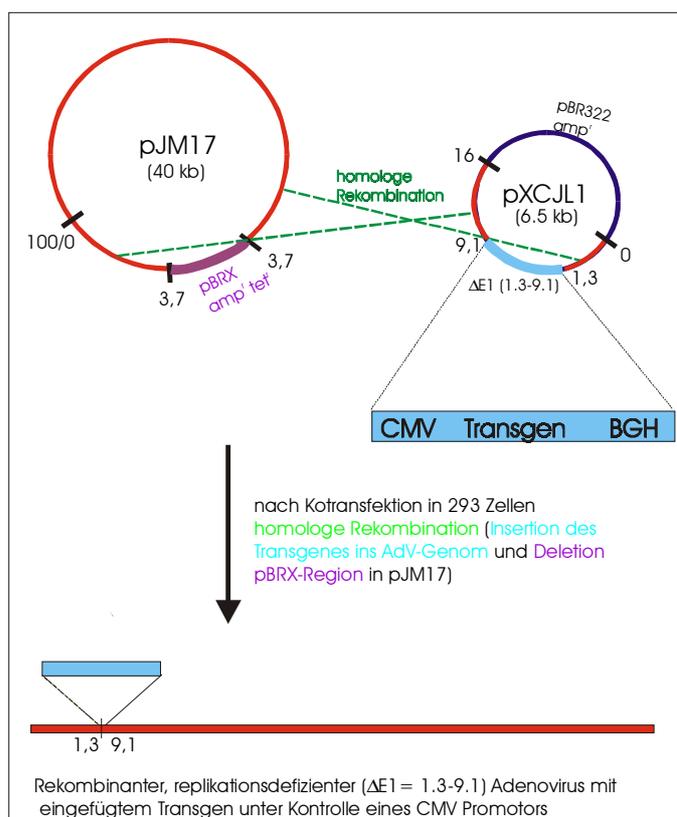


Abb. 3.1: Schema zur Herstellung replikationsdefizienter Adenoviren. Eine ca. 2 kb große Expressionskassette mit dem Transgen wurde zunächst in ein Transferplasmid (pXCJL1) kloniert. Rekombinanter, replikationsdefizienter Adenovirus wurde nach Kofransfektion von pXCJL1CMVTransgenBGH und pJM17 in 293 Zellen erhalten. 293 Zellen enthalten den viralen E1-Transaktivator und ermöglichen eine Replikation des Virus. PJM17 (McGrory et al., 1988) enthält das gesamte Adenovirusgenom, bis auf die E1 Region, die durch eine größere Sequenz (eines resistenzvermittelnden Gens) aus dem Plasmid pBRX ersetzt wurde. Dadurch wird pJM17 2 kb zu groß, um in Kapside verpackt zu werden. Nur nach homologer Rekombination mit pXCJL1 wird diese Sequenz durch das kleinere Transgen ersetzt, und das Genom ist wieder "klein genug", um verpackt zu werden, wodurch eine effiziente Selektion für Viren mit rekombinierter DNA geschieht. Größenangaben in map units (m.u.), 1 m.u. entspricht 360 bp.

Die Größe des Adenovirusgenoms von 36 kb schließt eine direkte Klonierung der cDNA-Konstrukte in das Virusgenom aus. Deshalb wird das zu klonierende Gen zunächst in einen bakteriellen Vektor (pXCJL1/2 oder pXCJLCMVVBGH) kloniert, der den E1 deletierten Teil des linken Arms (11%) des Adenovirusgenoms enthält. Dieser Vektor wird mit einem Vektor

pJM17, der das gesamte Adenovirusgenom mit Ausnahme der E1-Region enthält, in 293 Zellen kotransfiziert. Nach homologer Rekombination dieser Vektoren entstehen replikationsdefiziente Viruspartikel (Abb. 3.1).

Im folgenden soll kurz die Klonierung der verwendeten Vektoren beschrieben werden.

Da Neurotrophine natürlicherweise keine Kozak-Sequenz (Kozak, 1991) enthalten, wurde diese mittels PCR eingefügt¹⁵, ebenso in manchen Fällen ein myc-Epitop. Alle Adenoviruskonstrukte stehen unter Kontrolle eines CMV-Promotors und enthalten die Terminationssequenz des Rinderwachstumshormones (BGH).

3.1.1.1 Herstellung eines NT6myc Adenovirus (AdV5NT6myc)

Eine aminoternale Kozak-Konsensussequenz und ein karboxyterminales myc-Epitop wurden NT6 durch eine PCR Amplifikation der NT6-cDNA mit dem 5'NT6myc- und 3'NT6myc Primer angefügt (NT6-cDNA wurde freundlicherweise von R. Götz, Neurologische Klinik, Universität Würzburg zur Verfügung gestellt). Die letzten sieben karboxyterminalen AS und somit eine potentielle Proteasenschnittstelle (RRPGH) wurden dabei entfernt. Die PCR-Bedingungen wurden so gewählt (siehe 2.2.1.14), daß Polymerasefehler vermieden wurden (Kontrolle durch Sequenzierung). Das gereinigte PCR-Fragment wurde über die durch PCR eingefügten Schnittstellen in den pRC/CMV Vektor und anschließend, zusammen mit dem CMV-Promotor und der BGH-Terminationssequenz, in den pXCJL1-Transfervektor kloniert. Der so konstruierte Vektor pXCJL1CMVNT6myc wurde für die Kotransfektion mit pJM17 verwendet.

- Weitere Adenoviren wurden im Verlauf der Arbeit hergestellt:

AdV5BDNFEGFP

Ein Fusionsprotein aus BDNF (auch hier wurden die letzten 3 AS entfernt) und EGFP wurde durch Klonierung eines PCR-Fragmentes (Oli1 und Olgbg2 Primer) in den N1-EGFP Vektor und anschließende Überführung des BDNF-EGFP Fragmentes über HindIII/NotI in den pXCJLCMVVBGH Vektor hergestellt.

AdVNGFmyc

NGFmyc wurde ebenfalls mittels PCR unter Verwendung des 5' und des 3' NGFmyc Primers hergestellt (siehe NT6myc). Das NGFmyc Fragment wurde über HindIII und eine ungeschnittene Stelle in den pXCJL1 Vektor kloniert.

AdV5EGFP

Ein Hind III/ Not I Fragment aus N1-EGFP wurde in die multiple Klonierungsstelle des pXCJL-CMV-BGH- Vektors eingefügt.

TrkA-Rezeptormutanten

Ein 2,7 kb großes XbaI-Fragment [aus dem pEF-BOS Vektor, diese Konstrukte sind detailliert in Inagaki et al. (1995) beschrieben], welches die cDNA für Ratten TrkA bzw. Mutanten dieses Rezeptors enthält, wurde in den pXCJLCMVVBGH Vektor kloniert.

- Folgende Viruskonstrukte wurden nicht von mir hergestellt, sollen aber an gleicher Stelle erwähnt werden:

AdV5lacZ

AdV5lacZ wurde freundlicherweise von C. Gravel (Université Laval, Quebec, Kanada) zur Verfügung gestellt und enthält die cDNA des β -Galactosidasogens aus E.coli.

AdV5NGF

Dieses Konstrukt wurde freundlicherweise von O. Griesbeck (Howard Hughes Medical Institute, San Diego, CA) zur Verfügung gestellt und enthält das Intron II des Insulingens der Ratte und Maus präpro-NGF.

¹⁵ theoretisch sollte dadurch die Neurotrophin-Expression verstärkt werden

AdV5BDNFmyc

AdV5BDNFmyc (ebenfalls von O. Griesbeck zur Verfügung gestellt) enthält die Sequenz für Maus-präpro-BDNF. Die letzten 3 AS und somit eine potentielle Proteaseschnittstelle wurden entfernt, um ein myc-Epitop an den C-Terminus anzufügen (Möller et al., 1998).

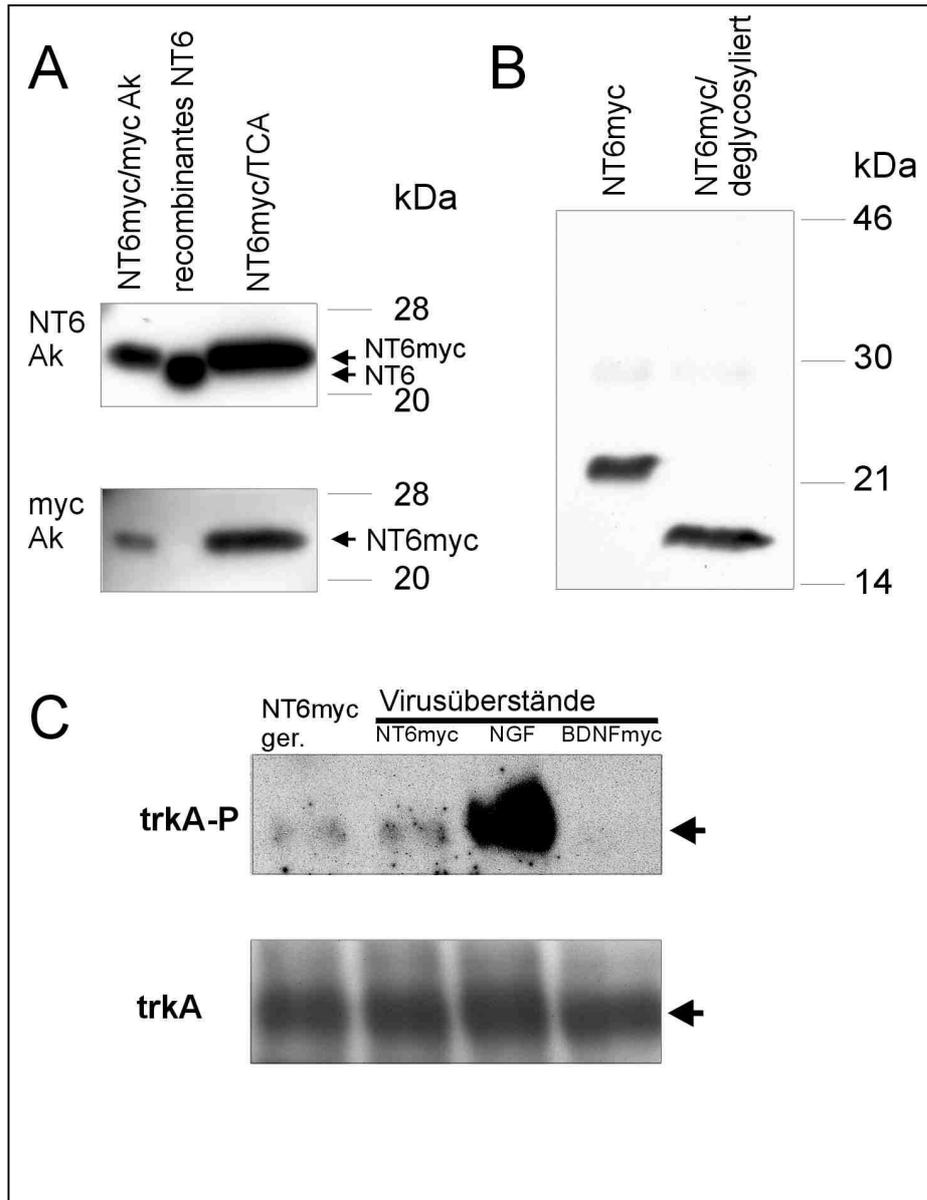
3.1.1.2 Test der adenoviralen Konstrukte

Obgleich pJM17 zu groß ist, um verpackt zu werden, können durch Umlagerungen und Deletionen im pJM17 Vektor Viren entstehen, die kein Transgen enthalten. Zudem könnte es unter Umständen zu homologen Rekombinationsereignissen des pJM17 Vektors mit der genomischen DNA der 293 Zellen kommen, wobei infektiöse Wildtypviren entstehen könnten. Demzufolge ist es notwendig, Virusklone zu isolieren (Plaquesisolierung) und diese zu charakterisieren. Zunächst wurde eine PCR mit einem Primer im Virusgenom und einem Primer im Transgen durchgeführt (PCR-Daten nicht gezeigt); positive Plaques wurden hinsichtlich der Expression des entsprechenden Proteins in transduzierten Zellen charakterisiert und rekombinante Proteine auf ihre biologische Wirksamkeit überprüft.

AdV5NT6myc transduzierte Zellen exprimieren ein richtig prozessiertes, biologisch aktives, N-glykosyliertes Protein

Hippokampale Neuronen und PC12 Zellen wurden mit AdV5NT6myc transduziert, was zu einer Akkumulation von NT6myc im Zellüberstand (konstitutive und durch Basalaktivität induzierte Freisetzung) führt. NT6myc aus dem Kulturmedium wurde entweder durch TCA präzipitiert (in serumfreiem Medium, da sonst Serumproteine im Überschuss gefällt würden) oder mit einem myc-Ak (9E10) immunpräzipitiert und mittels Westernblot nachgewiesen (Abb. 3.2 A). Das Molekulargewicht von etwa 22 kDa ist höher als das berechnete von 16.55 kDa, da NT6 N-glykosyliert wird (Götz et al., 1994). Eine enzymatische Abspaltung der N-Glykoside mit N-Glykosidase-F ergibt ein Protein der erwarteten Größe von 16 kDa (Abb. 3.2 B) und zeigt, daß von transduzierten Zellen exprimiertes NT6myc normal N-glykosyliert wird. Die Anfügung des myc-Epitopes verändert die Größe und vermindert somit die elektrophoretische Mobilität im Vergleich zu gereinigtem NT6 (Abb. 3.2 A). Von AdV5NT6myc-transduzierten Zellen freigesetztes NT6myc besitzt weiterhin biologische Aktivität. Dazu wurden NT6myc-haltige (Überprüfung des NT6myc-Gehaltes mittels Westernblot) Überstände transduzierter PC12 Zellen direkt oder nach teilweiser Aufreinigung von NT6myc auf nichttransduzierte PC12 Zellen gegeben. Nach fünfminütiger Inkubation mit NT6myc wurde die Phosphorylierung der mit einem anti panTrk-Ak präzipitierten TrkA-R mit Hilfe eines anti-Phosphotyrosin-Ak im Westernblot überprüft. Nach Stimulation mit NT6myc, aber nicht mit BDNFmyc, war eine schwache, aber deutliche Phosphorylierung nachweisbar (Abb. 3.2C, oberer Immunoblot). Das mit NGF verglichen sehr geringe TrkA-Phosphorylierungssignal ist in Übereinstimmung mit der geringeren biologischen Aktivität von NT6 (ca. 1000x geringer) im Vergleich zu NGF in anderen Untersuchungen (Götz et al., 1994, Lai et al., 1998).

Die anderen Virusstrukturen wurden ebenfalls zunächst hinsichtlich der korrekten Expression ihres Transgens mittels Westernblot überprüft. Weiterhin wurde die subzelluläre Verteilung der entsprechenden Proteine in transduzierten hippokampalen Neuronen oder PC12 Zellen mit Hilfe immunocytochemischer Techniken nachgewiesen. Die biologische Aktivität der exprimierten Proteine wurde im Falle von Neurotrophinen durch die Fähigkeit, die jeweiligen Trk-R zu phosphorylieren, gezeigt. Weiterhin wurden funktionelle Parameter überprüft, wie eine regulierte Sekretion im Falle der Neurotrophine und eine Phosphorylierung nach Stimulation mit NGF im Falle der TrkA-Konstrukte. Diese Experimente sind unter dem jeweiligen Kapitel näher beschrieben.

Abb. 3.2: Expression von NT6myc in AdV5NT6myc-transduzierten PC12 Zellen

A: NT6myc aus Überständen transduzierter PC12 Zellen wurde mittels IP (9E10myc Ak) oder TCA konzentriert und im Westernblot mit einem NT6 Ak und anschließend mit dem 9E10 myc-Ak nachgewiesen. Beide Ak erkennen ein Protein von 22 kDa, welches der prozessierten Form von NT6myc entspricht. Das Signal ist sehr spezifisch, wie ein Vergleich mit rekombinantes NT6 (ohne myc-Epitop) in der mittleren Spur zeigt (das MWG ist durch das myc-Epitop etwas höher).

B: Von transduzierten Zellen exprimiertes prozessiertes NT6myc ist glykosyliert und kann in der denaturierten Form durch Behandlung mit N-Glykosidase F deglykosyliert werden. Die Proteinbande ist danach bei ca. 16 kDa, entsprechend dem berechneten MWG (16,6 kDa), nachweisbar.

C: NT6myc, welches aus Überständen transduzierter PC12 Zellen mittels Heparin-Sepharose angereichert wurde, ist biologisch aktiv, wie durch die Phosphorylierung der TrkA-Rezeptoren von nicht transduzierten PC12 Zellen gezeigt wird (linke Spur). Auch die Zugabe von Überständen AdV5NT6myc transduzierter Zellen bewirkt eine nachweisbare TrkA-Phosphorylierung. Zugabe von Überständen AdV5NGF-transduzierter Zellen induzierte erwartungsgemäß eine sehr starke TrkA-Phosphorylierung, während BDNFmyc aus Überständen AdV5BDNFmyc transduzierter Zellen TrkA nicht aktivierte. Die untere Abb. zeigt denselben Blot nach Immunomarkierung mit einem anti pan Trk-Ak und demonstriert, daß der Gehalt an TrkA in allen Experimenten vergleichbar war.

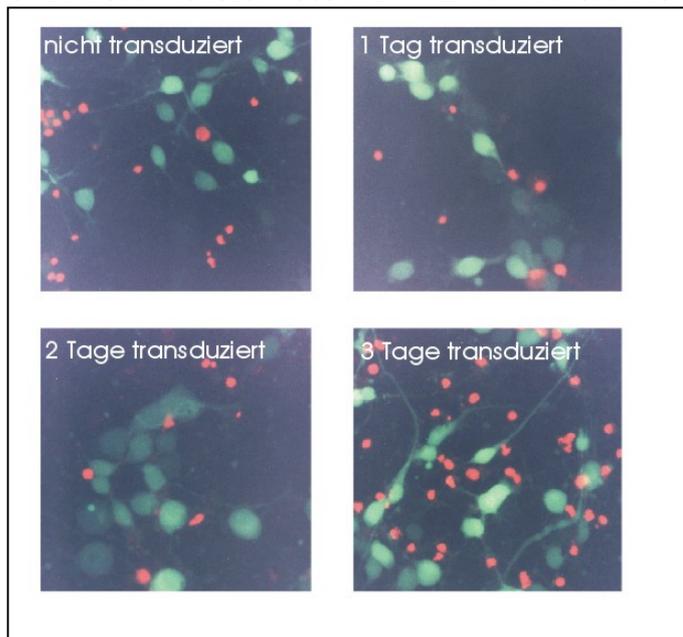
zierten PC12 Zellen gezeigt wird (linke Spur). Auch die Zugabe von Überständen AdV5NT6myc transduzierter Zellen bewirkt eine nachweisbare TrkA-Phosphorylierung. Zugabe von Überständen AdV5NGF-transduzierter Zellen induzierte erwartungsgemäß eine sehr starke TrkA-Phosphorylierung, während BDNFmyc aus Überständen AdV5BDNFmyc transduzierter Zellen TrkA nicht aktivierte. Die untere Abb. zeigt denselben Blot nach Immunomarkierung mit einem anti pan Trk-Ak und demonstriert, daß der Gehalt an TrkA in allen Experimenten vergleichbar war.

3.1.1.3 Toxizität durch Adenovirustransduktion

Transduzierte Zellen exprimieren hauptsächlich die transgene DNA unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Trotz Fehlens des, für die virale Transkription essentiellen, E1-Transaktivators, werden zum Teil auch Virusproteine exprimiert, welche zytotoxische Effekte hervorrufen können (Easton et al., 1998). Zudem sind toxische Effekte auf Grund der starken Expression der transgenen DNA nicht auszuschließen.

Einige Untersuchungen zur Zytotoxizität nach Adenovirustransduktion im verwendeten System dissoziierter, hippokampaler Zellen lagen bereits vor (Wilkemeyer et al., 1996; Griesbeck et al., 1996), so daß vorwiegend zytotoxische Effekte unter den in den durchgeführten Experimenten etablierten Bedingungen (Titer, Transduktionszeit) untersucht wurden. Die Stärke der

zytotoxischen Effekte wurde durch die Höhe des AdV5-Titers (pro Volumen und pro Zelle) und die Transduktionszeit bestimmt. Eine Transduktion



dissoziierter hippocampaler Zellen mit einem Titer von AdV5NT6myc, der nach 30 h ca. 70 % der Zellen transduziert (ca. 200 MOI), erhöhte die Anzahl Propidiumiodid positiver Zellen erst nach einer Transduktionszeit von drei Tagen (Abb. 3.3). Somit ist unter den für unsere Experimente gewählten Versuchsbedingungen (siehe 3.2.5, 3.3, 3.4.2; Transduktionszeit: 24-30 h) eine effektive Transduktion ohne sichtbare zytotoxische Effekte zu erwarten.

Abb. 3.3: Zytotoxische Effekte durch eine Adenovirustransduktion sind neben dem verwendeten Titer abhängig von der Transduktionszeit. Hippokampale Neuronen, die mit 200 MOI AdV5NT6myc transduziert wurden, zeigen erst nach 72 h einen deutlich erhöhten Anteil toter Zellen. Die Zellkerne toter

Zellen wurden mit Propidiumiodid rot angefärbt; Fluoreszindiaceetat (Di-O-Acetyl-fluorescein) – grün fluoreszierend – wird durch die Abspaltung der Estergruppe (die das Molekül membranpermeabel macht) in lebenden Zellen akkumuliert.

In Experimenten, in denen wir Explantatkulturen bzw. hippocampale Kulturen über 7-9 Tage transduzierten (siehe 2.2.3.2), wurden der Titer und die Expositionszeit zum Virus so gering gewählt (20 MOI für 2 h oder 4 MOI für 16 h), daß die Neuronen in elektrophysiologischen Ableitungen noch funktionelle synaptische Kontakte zeigten (Abb. 3.13D). Weitere elektrophysiologische Eigenschaften hippocampaler Zellen [Strom-Spannungskennlinie, Membranwiderstand, Membranzeitkonstante (Abb. 3.6B), Antwort auf hochfrequente Stimulation] waren nach zweitägiger Transduktion mit einem hohen Titer (200 MOI) und selbst nach 1,5 wöchiger Transduktion mit einem geringen Titer von AdV5EGFP (2 MOI für 2 h) normal. Da die Auswertung vieler Experimente (siehe unter 3.2 und 3.3) auf EM-Ebene stattfand, wären auftretende zytotoxische Effekte sofort sichtbar gewesen (Abb. 3.10; 3.12), was nicht der Fall war: Vergleicht man die Ultrastruktur transduzierter (Abb. 3.16D/E) mit der nichttransduzierter Neuronen (Abb. 3.16F) wird deutlich, daß die Zellstruktur durch die Transduktion nicht geschädigt wird. In Experimenten, in denen elektrophysiologische Parameter (z.B. LTP-Expression) an AdV5-transduzierten hippocampalen Schnitten untersucht wurden, konnten keine Unterschiede zu nichttransduzierten Schnitten beobachtet werden (siehe 3.2.7).

3.1.1.4 Wirtsselektivität von Adenoviren

Adenoviren binden mittels des viralen Faserproteins an Rezeptoren der IgG Familie (Bergelson et al., 1997) an der Oberfläche der Zellen. Eine sekundäre Interaktion zwischen dem Pentonfaserprotein und $\alpha\beta 5$ Integrinen der Zelloberfläche vermittelt die Endozytose der Viruspartikel. Somit wird die Zellelektivität durch die Expression dieser Oberflächenrezeptoren bestimmt.

In Experimenten mit dissoziierten hippocampalen Neuronen war eine effektive Transduktion der Neuronen (je nach Titer und Expressionszeit bis zu 100%) deutlich, was durch die Transduktion mit einem GFP-exprimierenden Kontrollvirus aus der Zellmorphologie ersichtlich wird (Abb. 3.4A) oder durch Doppelfärbungen mit neuronalen Markern (Tau1 oder MAP-2) direkt gezeigt

wurde. Allerdings wurden Astrozyten sehr viel effektiver transduziert¹⁶ (Doppelfärbung mit Gliazellmarker: GFAP), weshalb astrozytenarme Kulturen für unsere Experimente unabdingbar waren.

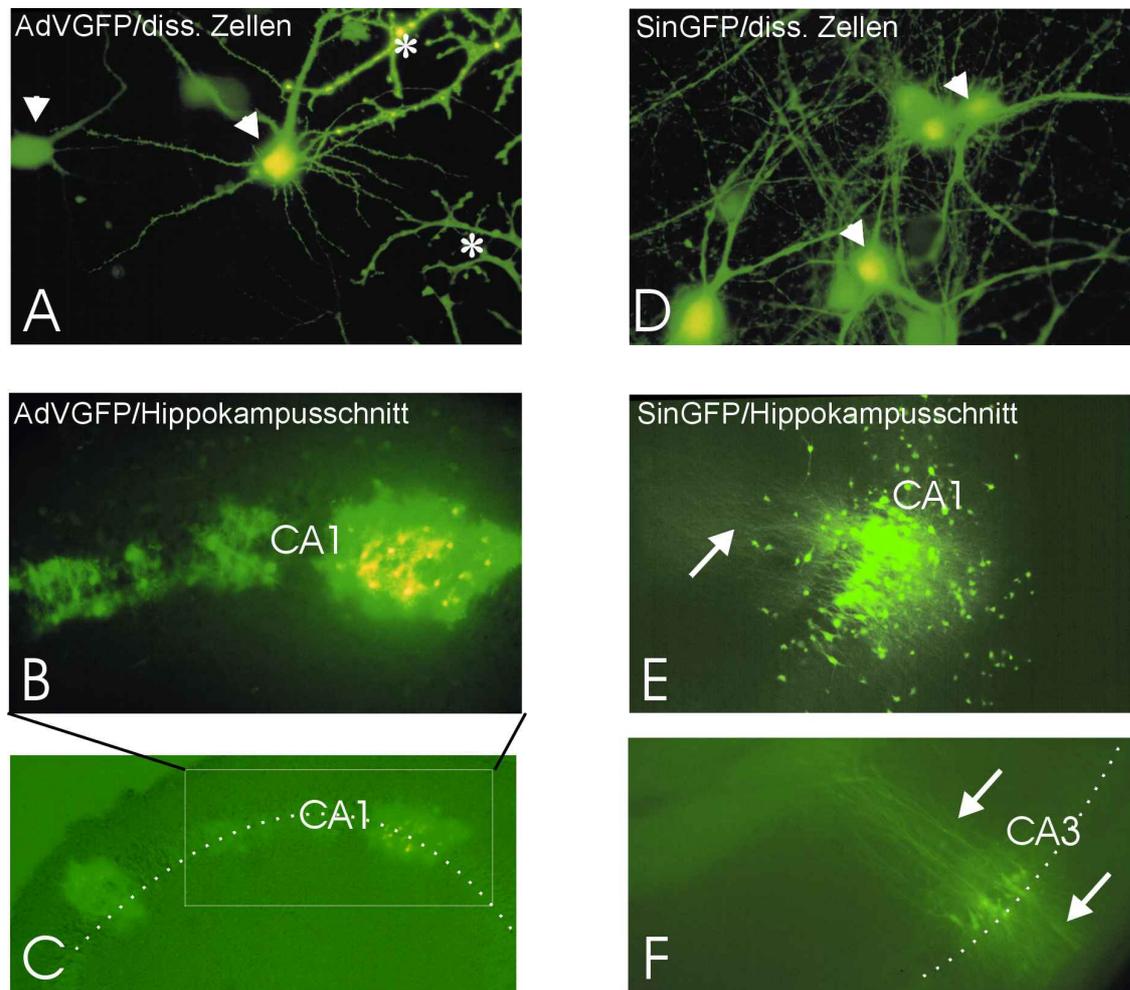


Abb. 3.4: Vergleich der Wirtsselektivität von Adenoviren und Sindbisviren

A/D: In dissoziierten hippocampalen Zellen, die einen hohen Anteil an Neuronen gegenüber Astrozyten aufweisen, ist die neuronale Expression von GFP nach Transduktion mit einem GFP-Adenovirus oder GFP-Sindbisvirus vergleichbar sehr hoch (einige Neuronen sind durch Pfeilspitzen markiert). In A sind allerdings auch deutlich Ausläufer von AdV5EGFP transduzierten Gliazellen (markiert mit Stern) zu erkennen, während Sindbisviren ausschließlich Neuronen infizieren. **B/C/E/F:** Dieser Effekt wird noch deutlicher in hippocampalen Schnittkulturen, die mit AdV5EGFP (B/C) oder SinrepEGFP (E/F) lokal transduziert wurden. Die AdV5 vermittelte GFP-Expression ist hauptsächlich in Gliazellen sichtbar, die oft etwas neben der Pyramidenzellschicht liegen und keine langen Ausläufer ausbilden. In diesen Kulturen sind einzelne neuronale Ausläufer in so geringer Anzahl vorhanden, daß sie in der Abbildung nicht zu sehen sind, da die starke GFP-Expression der Gliazellen dieses Signal überstrahlt. Nach lokaler Transduktion mit SinrepEGFP (E/F) sind nahezu ausschließlich Neuronen GFP-positiv, die sehr gut an ihrer Morphologie (die neuronale Zellmorphologie wird erst bei höherer Vergrößerung als dargestellt deutlich erkennbar), ihrer präzisen Lage in der CA1 oder CA3 Pyramidenzellschicht und den langen axonalen Projektionen (durch Pfeile markiert) im Fluoreszenzmikroskop zu erkennen sind. Aus Abb. C und F wird ersichtlich, daß lokal beschränkte Transduktionen ohne Diffusion von Viruspartikeln in benachbarte Regionen möglich sind. Die Pyramidenzellschicht wird in C und F durch die weiß gepunktete Linie angedeutet.

¹⁶ Wenn die Kulturen sehr dicht (3×10^5 pro 10 mm Deckgläschen) waren, ist der Anteil an Gliazellen i.d.R. viel höher. In diesen Kulturen konnten nur bis zu ca. 30 % der Neuronen transduziert werden, während nahezu alle Astrozyten transduziert waren und das Transgen stärker exprimierten.

Eine Transduktion von Neuronen in hippokampalen Schnitten bzw. Schnittkulturen mit AdV5EGFP war auf Grund der massiven Transduktion der Astrozyten fast nicht nachweisbar (Abb. 3.4B/C), da die GFP Expression in Astrozyten sehr stark war und die schwächere Fluoreszenz der Neuronen überstrahlte. Allerdings konnte durch immunohistochemische EM-Untersuchungen eine Transduktion von Neuronen in Schnittkulturen nachgewiesen werden (Abb. 3.16D, E).

Da für die Experimente (siehe 3.2.7) in Schnittkulturen eine sehr effiziente Transduktion von Neuronen wichtig war und auch für Freisetzungsstudien aus hippokampalen Neuronen eine selektive Transduktion von Neuronen vorteilhaft wäre, wurde ein alternatives, neuronenselektives Expressionssystem mittels Sindbisviren etabliert.

3.1.2 Herstellung von Sindbisviren

Durch Transduktion mit Sindbisviren wird ebenfalls nur eine transiente Expression des entsprechenden Transgenes erreicht. Die Transgen cDNA wird in einen Sinrep5 Vektor kloniert und steht somit unter der Kontrolle eines Sindbis subgenomischen Promotors. Dieses DNA Konstrukt wird zur Herstellung rekombinanter, polyadenylierter RNA mit CAP-Strukturen verwendet, die anschließend in BHK Zellen transfiziert wird. Die RNA wird translatiert; viruseigene Replikationsenzyme synthetisieren genomische und subgenomische RNA. Die subgenomische RNA, die im Virus für Strukturproteine (für Verpackung und Zusammensetzung

der Viren) kodiert, ist in diesem System (Sinrep5-Vektor) durch das Transgen ersetzt, das somit in hoher Kopienzahl produziert wird. Um infektiöse Viruspartikel zu erhalten, sind Helfer RNAs (ebenfalls in vitro translatierte, polyadenylierte RNA mit CAP-Struktur) notwendig, die für die entsprechenden Strukturproteine codieren. Da dieses Helferkonstrukt keine Verpackungssignale enthält, werden ausschließlich die aus Sinrep5 generierten RNAs verpackt (Replikasen, Transgen), so daß replikationsdefiziente Viren entstehen. Die Wahl des Helfervirus bestimmt durch die Expression spezieller Oberflächenproteine die Wirtsspezifität. Die Anwendung von DH(26S) bewirkt eine bevorzugte Transduktion von Neuronen, da die E2 und E1 Glykoproteine von einem neurovirulenten Virus gewonnen wurden (Abb. 3.5).

Für initiale Studien zur Wirtsspezifität, Expressionstärke und Toxizität wurde EGFP (XbaI/NheI-Fragment aus dem C1-EGFP Clontech) in das Sinrep5 Plasmid kloniert. Infektiöse Viruspartikel wurden aus dem Überstand gewonnen und zum Teil konzentriert.

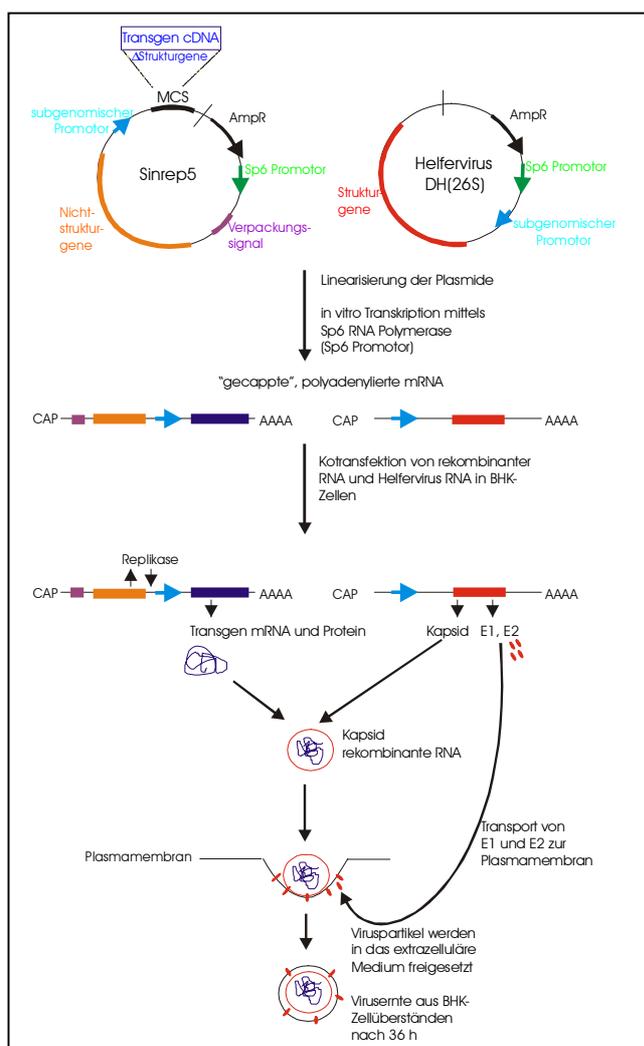


Abb. 3.5: Herstellung von Sindbisviren (detaillierte Beschreibung des Ablaufes im Text; Abschnitt: 3.1.2).

3.1.2.1 Toxizität von Sindbisviren

Da die Ribosomen sindbistransduzierter Zellen hauptsächlich durch die Translation viruseigener und Transgen-DNA okkupiert sind, wird die wirtseigene Proteinsynthese stark gehemmt. Zudem werden Virusproteine in großer Menge mit potentiell zytotoxischen Effekten exprimiert. Deshalb war es notwendig, die Physiologie transduzierter Zellen zu untersuchen. Nach zweitägiger Transduktion dissoziierter hippocampaler Neuronen (Titer wurde so gewählt, daß mindestens 90 % der Zellen transduziert sind) waren keine zytotoxischen Effekte nachweisbar: Die Anzahl propidiumiodidpositiver Zellen war vergleichbar mit nichttransduzierten Kontrollzellen, die im Phasenkontrastmikroskop beobachtete Morphologie der Neuronen war unverändert und die Strom-Spannungskennlinie (Abb. 3.6B) war nicht unterscheidbar von nicht transduzierten Zellen. Weiterhin konnte von hippocampalen Schnitten, die lokal in der CA3 oder CA1 Region mit SinrepEGFP transduziert wurden, eine LTP gemessen werden (siehe 3.2.7). Ob die Expression einer proteinbiosyntheseabhängigen Langzeit-LTP möglich ist, muß noch bestimmt werden und würde zeigen, in welchem Maße die zelleigene Proteinbiosynthese tatsächlich gehemmt ist.

3.1.2.2 Wirtsspezifität von Sindbisviren

Die Verwendung des DH(26S) Helfervirus ermöglicht eine sehr selektive Transduktion von Neuronen gegenüber Astrozyten, die nach Transduktion mit SinrepEGFP nahezu 100% GFP-negativ sind. Dies wurde durch Transduktion dissoziierter hippocampaler Kulturen (Abb. 3.4D) gezeigt und wurde besonders deutlich in Kulturen mit einer hohen Zelldichte, die einen hohen Anteil an Astrozyten aufweisen. Auch durch lokale Injektionen von Sinrep5EGFP in hippocampale Schnittkulturen wurden hauptsächlich Neuronen transduziert (Abb. 3.4E/F), die sich durch ihre GFP positiven Projektionen und charakteristische Morphologie, vor allem in der Pyramidenzellschicht sehr deutlich erkennen lassen. Die neuronalen Ausläufer wurden bereits nach 7 h Transduktion mit dem EGFP-Kontrollvirus deutlich GFP positiv und konnten über eine Distanz von mehreren 100 µm beobachtet werden. Die Effizienz der Transduktion ist sehr hoch: 1 µl des ungereinigten Überstandes war ausreichend, um 10^5 Neuronen innerhalb von 20 h zu transduzieren; ca. 200 nl des Virusüberstandes waren ausreichend, um ca. 200 µm x 200 µm einer Schnittkultur zu transduzieren.

3.1.3 Vergleichende Untersuchungen Adenoviren-Sindbisviren

3.1.3.1 Zeitspanne zwischen viraler Transduktion und Expression des Transgens

Neben der Neuronenselektivität war die potentiell schnellere Expression mittels Plus-Strang-RNA-Viren ein weiterer Grund, dieses System zu etablieren. Außerdem erforderten elektrophysiologische Experimente an akuten Schnittkulturen (siehe 3.2.7) ein Arbeiten bei 32°C, so daß auch die Effizienz der Transduktion unter diesen Bedingungen überprüft werden mußte. Die Zeit bis zur Expression des Transgens wird durch mehrere temperaturabhängige Faktoren, wie Diffusion zu den Virusrezeptoren, Internalisierung der Viruspartikel und die Expression der Transgen-mRNA beeinflusst. Um den zeitlichen Verlauf einer Adeno- und Sindbisvirustransduktion vergleichen zu können, wurden lacZ oder GFP-Kontrollviren vergleichbaren Titer (Titer, der nach 24 h eine maximale Transduktion zuläßt) auf dissoziierte hippocampale Zellen gegeben und die Expression nach 2-24h beobachtet. In einigen Experimenten wurden die Ergebnisse quantifiziert (Abb. 3.6A), wobei es problematisch ist, nur über die Anzahl positiver Zellen eine Aussage bezüglich der Expressionszeit zu machen, da anfänglich die Zellen nur sehr wenig Transgen exprimieren und eine bestimmte Schwelle der Expression für die Nachweisbarkeit von GFP oder β-Gal notwendig ist. In dissoziierten hippocampalen Kulturen wurde β-Gal-Aktivität nach Transduktion mit einem Sindbis-lacZ Virus bei 37 °C bereits nach 2 h sichtbar und nach 3 h deutlich. Bei 32 °C konnte in einigen Zellen der Beginn der Expression nach 3 h beobachtet werden, aber erst nach 4 h wurde deutlich

β -Gal exprimiert. Die deutliche Expression nach Transduktion mit AdV5lacZ war bei beiden Temperaturen ca. eine Stunde später sichtbar (Abb. 3.6A), obwohl auch hier schon nach 2 h erste schwache Expression des Transgenes beobachtet wurde. Die Transduktion mit Adenoviren bei 32 °C war etwas ineffektiver als die mittels Sindbisviren, eine Beobachtung die wir auch in akuten oder chronischen Schnitten machen konnten (Daten nicht quantifiziert). Die sindbisvermittelte Genexpression war in der Regel sehr stark; in den meisten transduzierten Zellen war die GFP- oder β -Gal-Expression schon nach 3 Stunden maximal, während adenoviral vermittelte Expression graduell und langsamer verlief. Dieser Effekt könnte auch die langsamere Akkumulation der exprimierten Proteine in AdV5 transduzierten Zellen erklären.

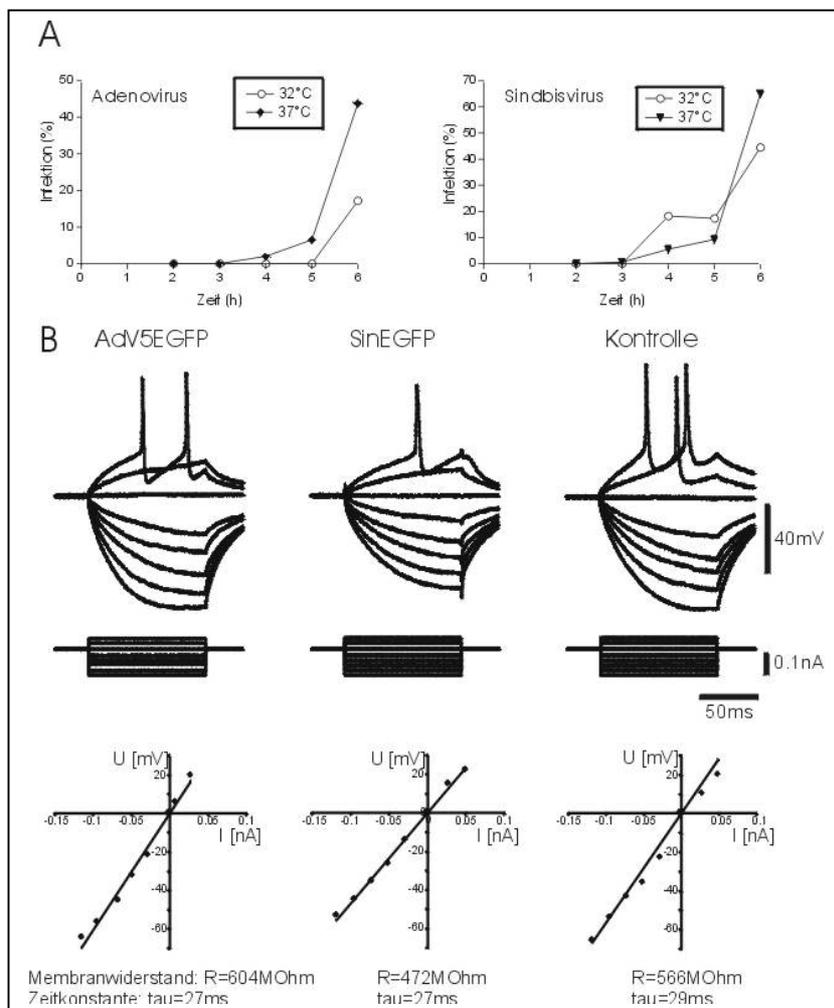


Abb. 3.6: Vergleich Adenovirus und Sindbisvirus vermittelter Gentransfer; Beginn der Expression des Transgens und Einfluß längerer Transduktionszeiten auf physiologische Eigenschaften von Neuronen.

A: Zeitlicher Verlauf viraler Transduktion in Abhängigkeit von der Temperatur. Dissoziierte hippocampale Neuronen wurden mit vergleichbaren Mengen AdV5lacZ oder Sinrep5lacZ transduziert und der Anteil β -Gal positiver Zellen nach den angegebenen Zeiten ermittelt. Sindbisvirusvermittelte Expression ist ca. 1 h vor adenoviral vermittelter nachweisbar und ist weniger temperaturabhängig.

B: Messung der passiven Membraneigenschaften einer transduzierten (GFP-exprimierenden) Pyramidenzelle einer hippocampalen Primärkultur nach 48-stündiger Transduktion mit AdV5EGFP oder SinEGFP im Vergleich mit einer nicht-transduzierten Kontrollzelle. Die Veränderung des Membranpotentials (jeweils obere Abbildung) auf depolarisierende und hyperpolarisierende Strompulse (in mittleren Abbildungen dargestellt) verläuft linear mit der Stärke der

Strompulse. In den jeweils unteren Abb. sind die dazugehörigen Strom-Spannungskurven dargestellt, die aus den oben dargestellten Werten ermittelt wurden und in allen drei Fällen sehr ähnlich sind. Die elektrophysiologisch ermittelten Membraneigenschaften (Strom-Spannungs-Abhängigkeit, Membranwiderstand und Membranzeitkonstante) ändern sich demnach nach Transduktion der Zellen nicht; d.h. durch die Virusapplikation wurden selbst nach 48 h keine meßbaren zytotoxischen Effekte hervorgerufen.

In Schnittkulturen konnte bereits nach 6h eine schwache GFP Expression nachgewiesen werden, wenn die Schnitte lokal mit AdV5EGFP oder SinrepEGFP injiziert wurden und anschließend für 1 h bei 37°C und 5h bei 32°C inkubiert wurden. Unter diesen Bedingungen waren elektrophysiologische Experimente sehr gut durchführbar (siehe auch 3.2.7). Nach 8 –10 h war die GFP-Expression deutlich erhöht und eine LTP-Induktion immer noch möglich.

3.1.3.2 Toxizität

Wurden für die Transduktion dissoziierter hippokampaler Kulturen Virustiter eingesetzt, die innerhalb von 48 h ca. 80 % der Zellen transduzierten, wurden keine zytotoxischen Effekte beobachtet. Das elektrophysiologische Profil der Neuronen war noch nach 48 stündiger Transduktion mit dem jeweiligen Virus unverändert gegenüber nichttransduzierten Zellen, was durch Messungen der passiven Membraneigenschaften eines transduzierten Neurons überprüft wurde (Abb. 3.6B). Insofern ist der Einsatz beider Gentransfermethoden für Kurzzeitexpression verschiedener Transgene geeignet (siehe auch 3.1.1.3 und 3.1.2.1).

3.1.3.3 Transduktion von Schnittkulturen

Der Vorteil viraler Transduktionssysteme wird besonders durch die Möglichkeit eines lokalen Gentransfers in komplexe *in vitro* Systeme (z.B. Schnittkulturen) oder *in vivo* deutlich. Eine lokale Applikation von Adeno- oder Sindbisviren mittels lokaler Druckinjektionen ist möglich (Abb. 3.4), ohne daß das Gewebe durch die Injektionspulse zerstört wird, was durch die Möglichkeit anschließender normaler elektrophysiologischer Ableitungen und durch die deutliche Erhaltung der Zellmorphologie GFP-exprimierender Neurone geprüft werden konnte. Dabei konnte weder eine Diffusion noch retrograder Transport von Viren über größere Distanzen beobachtet werden (in Abb. 3.4C und F sind deutlich isoliert transduzierte Bereiche in der Pyramidenzellschicht sichtbar; die Größe dieser Bereiche konnte durch die Anzahl und Dauer der Injektionspulse kontrolliert werden). Insofern sollte eine definiert räumlich getrennte, viral vermittelte Expression von Proteinen (z.B. CA1 vs. CA3) möglich sein.

3.2 Ultrastrukturelle Analyse der Orte der aktivitätsabhängigen Freisetzung von Neurotrophin-6

3.2.1 Voraussetzungen für die Verwendung von NT6myc als repräsentatives Modellmolekül für die aktivitätsabhängige Freisetzung von Neurotrophinen

Zur Analyse der Freisetzungsorte von Neurotrophinen auf Einzelzellebene verwendeten wir paradigmatisch NT6 auf Grund seiner Eigenschaft an Heparin und somit auch an Heparansulfatproteoglykane an der neuronalen Oberfläche zu binden. Da NT6 bezüglich seiner Freisetzungsscharakteristika nicht untersucht wurde und Vergleiche mit den anderen Neurotrophinen – eine Voraussetzung, um Aussagen über Neurotrophine anhand von NT6-Daten machen zu können – ausstehen, wurde zunächst NT6 hinsichtlich der Prozessierung des Vorläuferproteins, seiner subzellulären Verteilung und aktivitätsabhängigen Freisetzung unter den verwendeten experimentellen Bedingungen im Vergleich mit NGF und BDNF überprüft.

Unter Berücksichtigung vorhandener Informationen ist es sehr wahrscheinlich, daß sich NT6 in diesen Parametern nicht von NGF und BDNF unterscheidet. Ein Vergleich der NT6-Sequenz mit derjenigen von NGF in Abb. 1.4A verdeutlicht, daß NT6 vor allem in den AS mit NGF übereinstimmt, die wichtig für die richtige Faltung und somit für ihre biologische Aktivität sind. In der Prodomäne sind die AS konserviert, die für die korrekte Prozessierung verantwortlich sind (Abb. 1.4 B).

Im Folgenden soll gezeigt werden, daß sich NT6myc unter den gegebenen experimentellen Bedingungen wie NGF und BDNF verhält.

3.2.2 Subzelluläre Verteilung von NT6myc in transduzierten hippokampalen Neuronen im Vergleich mit NGF und BDNF

Die subzelluläre Verteilung der Neurotrophine in dissoziierten hippokampalen Kulturen wurde nach 30 stündiger Transduktion mit den entsprechenden AdV5 analysiert. Unter diesen auch für die Oberflächenfärbung (siehe 3.2.5) gewählten Transduktionsbedingungen war die Neurotrophin-Expression gut im Perikaryon und auch in den neuronalen Ausläufern

nachweisbar. Das Expressionsmuster veränderte sich auch nach längeren Transduktionszeiten nicht mehr, obgleich die Expressionsstärke zunahm.

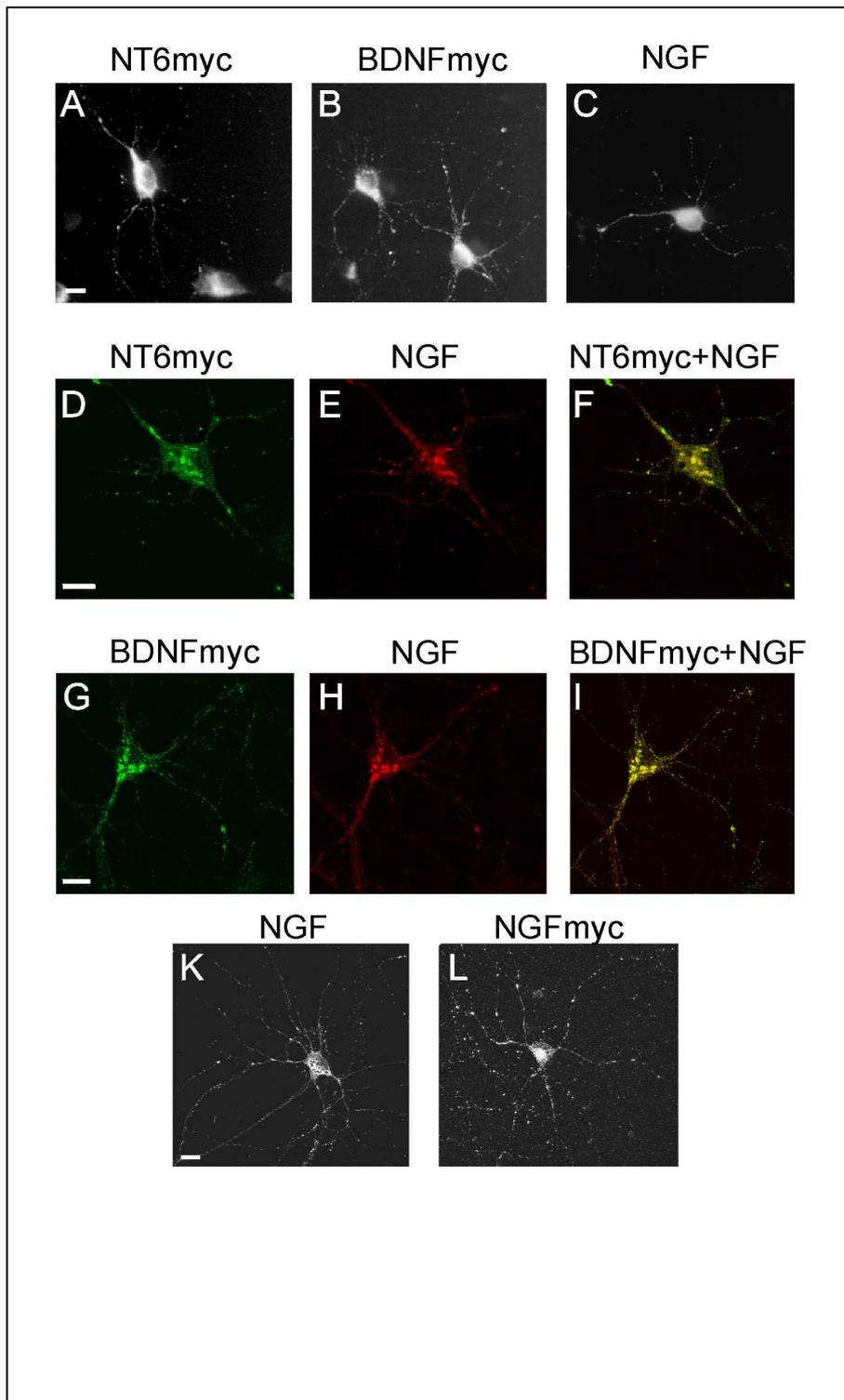


Abb. 3.7: Vergleich der intrazellulären Verteilung verschiedener Neurotrophine. Hippokampale Neuronen wurden nach 9 Tagen in Kultur mit gleichen Titern AdV5NT6myc, AdV5-BDNFmyc, AdV5NGFmyc oder AdV5NGF transduziert, nach 30h fixiert und Neurotrophine entweder mit dem 9E10myc-Ak oder einem polyklonalen anti-NGF-Ak immunomarkiert. Die IR wurde mittels

Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Als interne Kontrollen dienen nicht-transduzierte oder in den Doppelfärbungen ein-fach transduzierte Neuronen.

A-C: Die Verteilung von NT6myc ist ähnlich punktiert in den neuronalen Ausläufern verteilt und im Soma akkumuliert wie NGF oder BDNFmyc in transduzierten Neuronen (Aufnahmen mit einem Axiophot Fluoreszenzmikroskop).

D-I: NT6myc oder BDNFmyc kolokalisieren nahezu vollständig mit NGF in individuellen Neuronen, die beide Neurotrophine koexprimieren und mit dem 9E10-Ak und dem NGF-Ak doppelmarkiert wurden. Einzelne Ebenen konfokaler Aufnahmen sind gezeigt, die eine bessere subzelluläre Auflösung zulassen.

Doppeltmarkierte Bereiche werden durch die rot-grün Überlagerung in F und I als gelbe Färbung deutlich.

K/L: Die Anfügung eines myc-Epitopes verändert die subzelluläre Verteilung der

Neurotrophine nicht, wie hier am Beispiel von NGF in konfokalen Aufnahmen gezeigt wird. Skalierung, 10 μm .

In Abb. 3.7A-C wird deutlich, daß die intrazelluläre Verteilung von NT6myc mit der von NGF und BDNFmyc vergleichbar ist: Die IR ist im Perikaryon am stärksten; in den Neuriten sind die Neurotrophine diskret, punktuell über die gesamte Länge verteilt. Da die Transduktionseffizienz und die Form der Neuronen variiert, ist es schwierig, eine direkte Aussage über die

Kolokalisierung der Neurotrophine zu machen. Deshalb wurden in weiteren Experimenten die Zellen entweder mit AdV5NT6myc und AdV5NGF (Abb. 3.7D-F) oder mit AdV5BDNFmyc und AdV5NGF kotransduziert (Abb. 3.7G-I), um die Kolokalisierung dieser Neurotrophine in individuellen Zellen mittels konfokaler Mikroskopie zu analysieren. Die Kotransduktionsrate war sehr hoch, so daß eine Doppelimmunofärbung mit Antikörpern gegen das myc-Epitop (9E10 mAk) und einem polyklonalen Ak gegen NGF möglich war. Das Verteilungsmuster der jeweiligen Neurotrophine wurde durch die Koexpression nicht verändert. In diesen Experimenten wurde direkt eine Kolokalisierung von NT6myc mit NGF nachgewiesen. Daß NT6myc mit BDNF kolokalisiert ist, wurde indirekt durch die nahezu vollständige Überlappung der IR von NGF und BDNFmyc gezeigt. Die Anfügung des myc-Epitopes verändert die intrazelluläre Verteilung der Neurotrophine nicht, wie durch vergleichende Studien mit NGF und NGFmyc¹⁷ in hippocampalen Zellen gezeigt werden konnte (Abb. 3.7K/L) und bereits in PC12 Zellen gezeigt wurde (Möller et al, 1998). Eingehendere Untersuchungen zur subzellulären Neurotrophin-Lokalisierung werden unter 3.3 beschrieben.

3.2.3 Aktivitätsabhängige Freisetzung von NT6myc

AdV5NT6myc transduzierte Zellen sezernieren ein korrekt prozessiertes NT6-Molekül (Abb. 3.2A) und sortieren NT6myc identisch wie BDNFmyc, NGFmyc und NGF. Somit ist zu erwarten, daß NT6 ebenfalls aktivitätsabhängig von hippocampalen oder PC12 Zellen freigesetzt wird. Da kein sensitiver ELISA für den Nachweis von NT6myc existiert¹⁸, wurde freigesetztes NT6 mittels Westernblot nachgewiesen, womit gleichzeitig gezeigt werden konnte, daß NT6 in seiner prozessierten, glykosylierten Form freigesetzt wird.

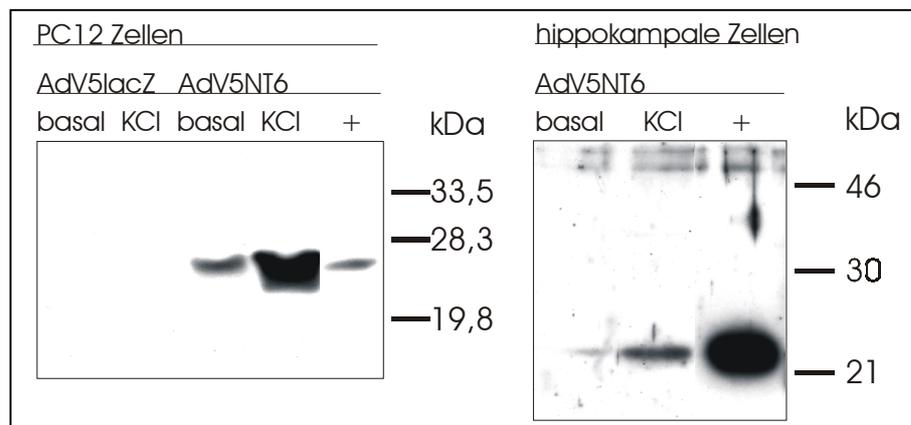


Abb. 3.8: NT6myc wird aus dissoziierten hippocampalen Neuronen und PC12 Zellen aktivitätsabhängig freigesetzt.

Nach 8 Tagen Kultivierung wurden die Zellen mit AdV5NT6myc für 20 h transduziert und in HP bei 37°C äquilibriert. Danach wurden die Zellen 15 min in Abwesenheit und 15 min in Gegenwart von 50 mM KCl in isoosmolaren Puffern

inkubiert. In diesen Zellüberständen akkumuliertes NT6myc wurde mit Heparin-Sepharose präzipitiert und mit einem anti-NT6 Ak nach Separation in einem denaturierenden 15 % SDS Proteingel im Westernblot nachgewiesen. Gereinigtes NT6myc dient als Positivkontrolle, AdV5lacZ transduzierte Zellen als Negativkontrolle, um Kreuzreaktivitäten mit anderen Proteinen inkl. Virusproteinen auszuschließen. Diese Daten sind repräsentativ für je vier Experimente, die mit verschiedenen Zellpräparationen durchgeführt wurden.

Die Präproform von NT6 (ca. 36 kDa) ist in den Zellüberständen nicht nachweisbar. Es ist auszuschließen, daß dies durch eine eventuell schlechtere Erkennung der unprozessierten Form durch den (gegen den N-Terminus gerichteten) NT6-Ak begründet werden kann, da auch mit dem myc-Ak nur die prozessierte Form nachgewiesen wurde. Eine Depolarisation (15 min,

¹⁷ Da ein anti NT6 Ak für IF Studien nicht vorhanden war, wurde NGF mit NGFmyc verglichen. Auch für BDNFmyc wurde in vorangegangenen Experimenten gezeigt, daß die Anfügung des myc-Epitopes die biologische Aktivität (Klose, 1998; Krüttgen et al., 1998) und die Freisetzungseigenschaft (Griesbeck et al., 1999) nicht verändern.

¹⁸ Ein Versuch, einen myc-ELISA zu etablieren, ergab eine Detektionsgrenze von ca. 20 bis 50 ng/ml vergleichbar mit einem Westernblot. Da der NT6 Ak nur denaturiertes NT6 erkennt (eine Immunopräzipitation von NT6 war nicht möglich, ebenfalls Versuche den Ak für Immunofärbungen zu verwenden waren nicht erfolgreich), wurde nicht versucht, einen NT6 ELISA zu etablieren.

50mM KCl) hippocampaler Neuronen oder PC12 Zellen bewirkt eine verstärkte Sekretion von NT6myc im Vergleich mit der basalen NT6myc-Freisetzung während einer vorangehenden 15 min Inkubation in HP. Ein Nachweis von NT6myc im Überstand war möglich, da an der Zelloberfläche akkumuliertes NT6myc nicht mit Heparin entfernt wurde und somit die Oberfläche der Zellen zu Beginn des Experimentes bereits gesättigt war. Da spätere Experimente (siehe 3.2.5) deutlich zeigten, daß die Freisetzung von NT6myc aus einem intrazellulären Kompartiment erfolgte, wurde auf Experimente verzichtet, NT6myc vor KCl-Stimulation von der Oberfläche zu entfernen.

3.2.4 Bindung von NT6myc an Heparin und Heparansulfatproteoglykane an der Oberfläche hippocampaler Neuronen

Die Verwendung von NT6 für diese Untersuchungen wurde hauptsächlich durch die Bindung von NT6 an Heparin und somit an HSPG der Zelloberfläche begründet (Götz et al., 1994; Lai et al., 1998), was eine gründlichere Untersuchung dieser Eigenschaft in unserem verwendeten System transduzierter, hippocampaler Zellen notwendig machte. HSPG wurden in Membranfraktionen aus Rattengehirnen verschiedener Entwicklungsstadien nachgewiesen (Herndon und Lander, 1990); insofern sollte die Verwendung von hippocampalen Primärkulturen möglich sein.

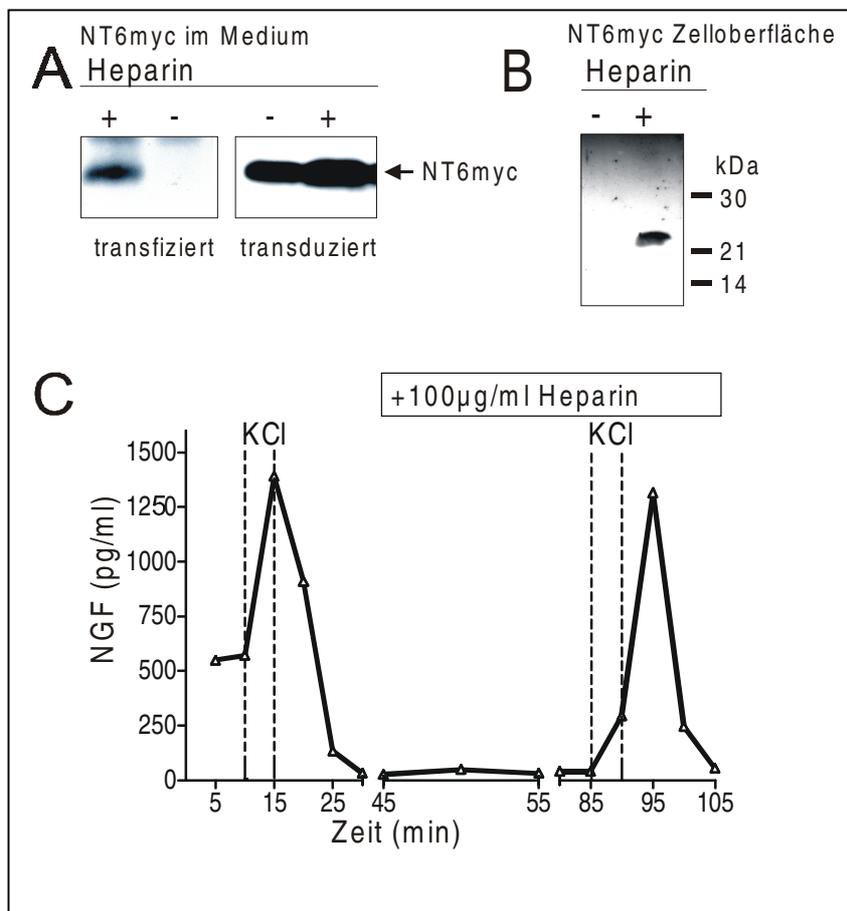


Abb. 3.9: NT6myc bindet selektiv an die Oberfläche hippocampaler Neuronen und kann mittels Heparin von dort entfernt werden. **A:** Mit NT6myc transfizierte 293 Zellen sezernierten nur geringe Mengen an NT6myc, so daß NT6myc zum großen Teil oberflächenassoziiert bleibt und nur nach Heparinbehandlung im Überstand nachgewiesen werden kann. Die Oberfläche stark NT6myc-exprimierender 293 Zellen nach Adv5NT6myc-Transduktion war bereits gesättigt, so daß NT6myc bereits ohne Heparinzugabe im Überstand nachweisbar war.

B: Um selektiv oberflächenassoziiertes NT6myc nachzuweisen, wurden hippocampale Neuronen nach 8-tägiger Kultivierung mit Adv5NT6myc für 20 h transduziert. Die Zellen wurden nach Äquilibration nacheinander mit normalem und mit heparinhaltigem Puffer für 30 min inkubiert. NT6 wurde präzipitiert und mit einem anti-NT6-Ak im Westernblot nachgewiesen.

NT6myc wurde spezifisch durch die Heparinzugabe in den Überstand freigesetzt. **C:** Heparin per se bewirkt keine Mobilisierung von NGF weder von der neuronalen Oberfläche noch aus intrazellulären Kompartimenten und interferiert auch nicht mit der KCl-induzierten Sekretion von NGF. Neuronen wurden nach 8 Tagen in Kultur mit Adv5NFG transduziert und nach 24 h in Perfusionskammern transferiert und mit einer Geschwindigkeit von 0.1ml/min perfundiert. Nach Äquilibration von 20 min wurden im Abstand von 5 min Fraktionen gesammelt und deren NGF-Gehalt mit ELISA bestimmt. 30 min nach dem ersten Stimulationspuls mit 50mM KCl wurde Heparin zum Medium gegeben und in dessen Gegenwart ein zweites Mal stimuliert.

Erste Studien in transient mit NT6myc transfizierten 293 Zellen zeigten – übereinstimmend mit vorhandenen Daten (Götz et al., 1994) – eine Bindung von NT6myc an die Zelloberfläche indirekt, da nur eine Kompetition um die NT6-Bindungsstellen an der Zelloberfläche mit Heparin, eine Detektion von NT6myc im Zellüberstand möglich machte (Abb. 3.9A). Dieser Effekt ist weniger deutlich in 293 Zellen, die mit AdV5NT6myc transduziert wurden und sehr große Mengen an NT6myc produzieren und freisetzen (Abb. 3.9A), da die Bindungsstellen an der Zelloberfläche bereits durch die basale NT6-Sekretion gesättigt sind. Ein direkter Nachweis der Bindung von NT6myc an die Oberfläche AdV5NT6myc transduzierter hippocampaler oder PC12 Zellen war dadurch möglich, daß NT6myc nach Entfernung des im Überstand akkumulierten NT6myc von der Zelloberfläche spezifisch durch die Zugabe von Heparin freigesetzt und im Westernblot nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.9B). Diese heparininduzierte Freisetzung ist nur mit einer Entfernung oberflächengebundenen NT6myc zu erklären, da Heparin keine Freisetzung von NGF (weder von der Oberfläche noch aus einem intrazellulären Kompartiment) bewirkt, wie in Freisetzungsexperimenten in einer Durchflußkammer gezeigt wurde (Abb. 3.9C). Dieses Ergebnis bestätigt gleichzeitig die Besonderheit von NT6, denn über HSPG zelloberflächenassoziierter NGF wäre durch die Heparinzugabe im Überstand nachgewiesen worden¹⁹. Die depolarisationsinduzierte Freisetzung von NGF von AdV5NGF transduzierten hippocampalen Neuronen wird durch die Gegenwart von 100 µg/ml Heparin nicht beeinflusst, so daß die Verwendung von Heparin mit der regulierten Freisetzung von NT6myc nicht interferieren sollte (Abb. 3.9C).

3.2.5 Lokalisierung der Orte der aktivitätsabhängigen NT6myc-Freisetzung auf EM-Ebene

3.2.5.1 Etablierung der experimentellen Parameter

Die vorangegangenen Experimente bestätigten, daß die Verwendung von NT6myc als Modellmolekül für die Untersuchung der Neurotrophin-Freisetzung auf EM-Ebene gerechtfertigt ist.

Für die im folgenden beschriebenen Experimente wurden hippocampale Neuronen nach 9 bis 10 Tagen in Kultur verwendet. Die Neuronen wurden mit Virustitern (i.d.R. 10^7 pfu pro 100 000 Zellen in 500 µl Medium) transduziert, die eine lichtmikroskopisch nachweisbare Expression von NT6myc in 70 % der Neuronen nach einer 30 stündigen Inkubationszeit mit dem Virus erlaubten. Diese Zeit sollte für eine Prozessierung und intrazelluläre Sortierung von NT6 ausreichend sein, da sich das Verteilungsmuster auf lichtmikroskopischer Ebene auch nach längerer Transduktionszeit nicht mehr verändert. Dieses Protokoll gewährleistet, daß in EM-Untersuchungen genügend transduzierte Zellen untersucht werden können. Alle Experimente, die diesen Anforderungen nicht entsprachen (jedes Experiment wurde von einer lichtmikroskopischen Analyse begleitet), wurden verworfen. Anfänglich entschieden wir uns, alle Experimente bei 15°C durchzuführen, da bei dieser Temperatur eine konstitutive Neurotrophin-Sekretion deutlich gegenüber der regulierten gehemmt wird (Blöchl und Thoenen, 1995), außerdem sollte die mögliche laterale Diffusion in der Membran vermindert werden. Allerdings wurde in einer anschließenden Serie von Experimenten, die bei 32°C durchgeführt wurden (siehe 3.4.2), deutlich, daß die konstitutive Freisetzung die Ergebnisse nur wenig beeinflusst. Die Zellen wurden vor jedem Experiment 30 min in dem entsprechenden Puffer (HP) bei 15°C äquilibriert, da es durch den Pufferwechsel und den damit verbundenen pH-, Osmolaritäts- und Temperaturschwankungen zu Freisetzungseignissen kommen kann. 30 min sind ausreichend, die Neurotrophin-Speicher wieder aufzufüllen (Griesbeck et al., 1999) und die Zellen an die neuen Bedingungen zu adaptieren. Während der Transduktions- und

¹⁹ Ähnliche vergleichende Untersuchungen wurden mit BDNFmyc in transduzierten PC12 Zellen durchgeführt. Diese zeigten, daß auch BDNFmyc nicht mittels Heparin von der Oberfläche freigesetzt werden kann (Daten nicht gezeigt).

Äquilibrierungszeit an der Zelloberfläche akkumuliertes NT6myc (hervorgerufen durch konstitutive Freisetzung und Freisetzung durch spontane Aktivität der Neuronen) wurde durch Waschen mit Heparin-HP (100µg/ml) entfernt. Heparin wurde anschließend durch sorgfältiges Waschen mit HP entfernt. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 50 mM KCl²⁰ stimuliert und nach 3 min sofort auf Eis fixiert (1 % GA in PBS, 4 °C), um sämtliche Exo- und Endozytoseprozesse zu stoppen. Um die basale Sekretion während dieser Zeit zu zeigen, wurden Neuronen 3 min in HP inkubiert und fixiert. Weiterhin wurde ermittelt, wie hoch die maximale Bindungskapazität der hippokampalen Neuronen für NT6myc ist. Dazu wurden die Neuronen nach einmaligem Waschen in HP sofort fixiert. Der Einfluß der Virustransduktion auf das Experiment (eventuelle Kreuzreaktivitäten mit Virusproteinen oder subtile toxische Effekte) wurde kontrolliert, indem Zellen mit AdV5lacZ transduziert wurden und entweder stimuliert oder wie die Basalkontrollen behandelt wurden. Die oberflächenassoziierte IR wurde mittels konventioneller „pre-embedding“ Immunofärbungen mit 4 nm goldgekoppelten, sekundären Ak sichtbar gemacht. Diese relativ kleinen Goldpartikel wurden gewählt, da größere Partikel leichter durch Konvektionen während der anschließenden Waschschritte entfernt werden können²¹.

3.2.5.2 Ergebnisse der Oberflächenmarkierung:

Verteilung von freigesetztem NT6myc auf der Oberfläche hippokampaler Neuronen

Repräsentative Beispiele der Ergebnisse der Oberflächenmarkierung von NT6myc werden in Abb. 3.10 gezeigt. Da die stimulationsinduzierte Freisetzung bereits hoch genug ist, um ein deutlich sichtbares Signal zu ergeben, kann man sich anhand dieser EM-Abbildungen bereits ein Bild von der Stärke und Verteilung der Oberflächenmarkierung machen. Neuronen, die ohne vorhergehende Heparinbehandlung fixiert wurden, zeigen erwartungsgemäß die höchste Dichte an Goldpartikeln (Abb. 3.10A), die sehr homogen entlang der Neuronen verteilt sind. In diesen Experimenten ist die Oberfläche aller Neuronen markiert, da NT6myc bereits im Überstand akkumuliert²² und somit auch auf nichttransduzierten Zellen nachgewiesen wird. Auf der Oberfläche AdV5lacZ transduzierter Zellen konnten selbst nach Stimulation mit KCl fast keine Goldpartikel nachgewiesen werden. AdV5NT6myc transduzierte Neuronen, die den Basalwert der Freisetzung demonstrierten (waschen mit Heparin und HP), zeigen ebenfalls kaum oberflächenassoziierte IR (Abb. 3.10B). Wurden gleichermaßen behandelte Neuronen nur noch zusätzlich für 3 min mit 50 mM KCl stimuliert, dann wurde eine deutliche Zunahme der oberflächenassoziierten Goldpartikel nachgewiesen (Abb. 3.10C und D). Diese sind in isolierten Aggregaten über die Oberfläche der gesamten Neuronen verteilt. Einige Ausläufer, wahrscheinlich von nichttransduzierten Zellen, sind nicht immunomarkiert, ein Hinweis darauf, daß NT6myc während der Stimulationszeit nicht oder nur minimal vom Ort der Freisetzung diffundiert.

²⁰ Um Osmolaritätsveränderungen zu vermeiden, wurden 50 mM NaCl durch 50 mM KCl ersetzt.

²¹ Experimente, die mit größeren Goldpartikeln durchgeführt wurden, zeigten ein deutlich geringeres Signal, was auch durch den größeren Ausschlußradius mitbestimmt wird.

²² In einigen Experimenten wurde gezeigt, daß unter den für EM-Experimente gewählten Bedingungen NT6myc im Überstand akkumuliert und mittels Westernblot nachgewiesen werden konnte.

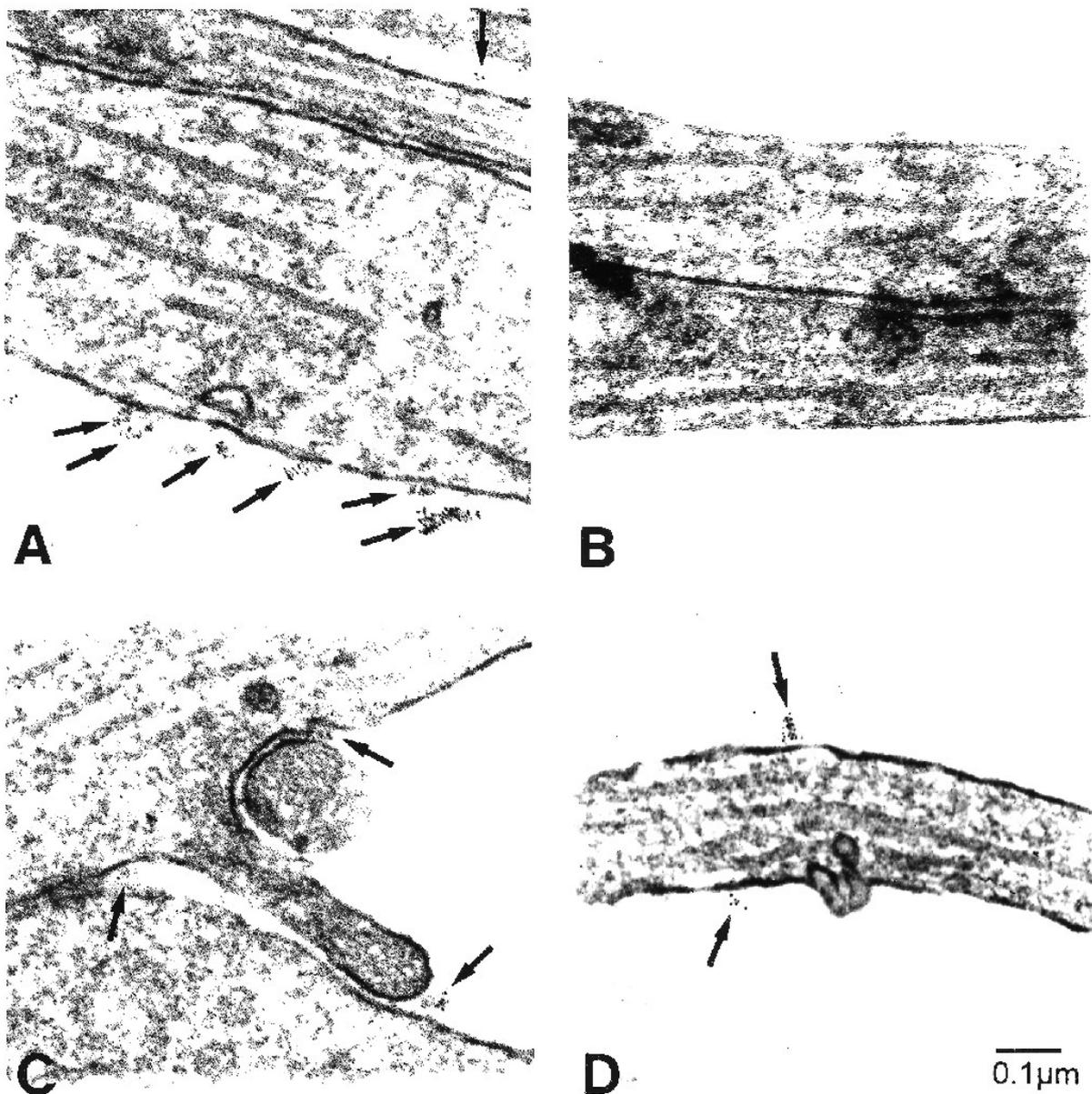


Abb.3.10: Repräsentative Beispiele für die Oberflächenverteilung von NT6myc auf elektronenmikroskopischer Ebene unter verschiedenen experimentellen Bedingungen. Hippokampale Neuronen nach 10 Tagen in Kultur wurden für 30 h mit AdV5NT6myc transduziert und bei 15 °C äquilibriert. Während der Transduktionsperiode freigesetztes NT6myc wurde mit Heparin von der Oberfläche entfernt. Heparin wurde entfernt, die Neuronen für 3 min mit KCl stimuliert und anschließend sofort bei 4 °C mit 1% Glutaraldehyd fixiert. Oberflächengebundenes NT6myc wurde mit konventionellen immunocytochemischen Methoden unter Verwendung des 9E10myc-Ak und goldmarkierter sekundärer Ak auf den nichtpermeabilisierten Zellen nachgewiesen (durch Pfeile markiert). **A:** Maximal mögliche Oberflächenfärbung von Neuronen, die nach 30 stündiger Transduktion mit AdV5NT6myc sofort fixiert wurden, ohne NT6myc von der Oberfläche zu entfernen (das Signal wird durch die Akkumulation von NT6myc während der Transduktionszeit durch konstitutive und durch Spontanaktivität-induzierte Freisetzung bewirkt). **B:** Neuronen, die wie in A behandelt, aber vor der Fixierung mit Heparin und HP gewaschen wurden, zeigen nahezu keine myc-IR, d.h. daß die Hintergrundmarkierung für das eigentliche Experiment (C/D) sehr gering ist. **C, D:** Wenn Neuronen, die wie unter B behandelt wurden, zusätzlich für 3 min mit 50 mM KCl stimuliert wurden, konnte eine deutliche größere Anzahl an Goldpartikeln an der Oberfläche nachgewiesen werden, die entlang der Neuriten in isolierten Aggregaten sichtbar sind und die aktivitätsinduzierte NT6myc-Sekretion veranschaulichen. Skalierung: 0,1 μm .

Quantitative Auswertung der Daten

Für die quantitative Analyse der Daten wurde die Anzahl der Goldpartikel und die Oberflächenmembranlänge mit Hilfe stereologischer Methoden ermittelt. Diese Methoden erlauben eine objektive Selektion von repräsentativen Gebieten zur Datenauswertung und sind im Detail unter 2.3.3.3) beschrieben. Daten von drei unabhängigen Experimenten wurden für die Auswertung verwendet; allerdings wurden insgesamt mehr als drei Experimentserien durchgeführt, die qualitativ vergleichbar waren. Die Anzahl oberflächenassoziierter Goldpartikel wurde auf eine Membranlängeneinheit von 10 μm bezogen. Mit dieser Methode werden auch nichttransduzierte Zellen (ca. 20–30 %) in die Analyse einbezogen, so daß die Werte geringer als die tatsächlichen sind²³. Tabelle 1 zeigt neben den zusammengefaßten Werten auch die Einzelergebnisse, um die Reproduzierbarkeit zu veranschaulichen. Die Variationen zwischen den Experimenten sind gering, d.h. daß die Transduktionseffizienz verschiedener Zellpräparationen vergleichbar war. Die Angabe der insgesamt analysierten Membranoberfläche (Tabelle 1) zeigt, daß ähnlich große Gebiete verglichen wurden.

Vergleicht man AdV5lacZ transduzierte Zellen mit Zellen die mit Heparin gewaschen und nicht stimuliert wurden, ist nahezu kein Unterschied festzustellen (aus diesem Grund wurden auch nur einige Experimente für lacZ ausgezählt, da der Hintergrund bereits durch den Basalwert veranschaulicht wird). Das zeigt deutlich, daß Heparin NT6myc effektiv von der Oberfläche entfernt. Nach KCl-Stimulation wurden 20 fach höhere als die Basalwerte ermittelt. Die Bindungskapazität der Zelloberfläche für NT6myc war allerdings noch ca. 6x höher (kumulativ), so daß es theoretisch möglich sein sollte, in dem Bereich zwischen Sättigung und Basalwert Unterschiede in der Freisetzungstärke nachzuweisen.

Dieser Aspekt wird wichtig, da es das Ziel dieser Arbeit war, eine subzelluläre Auflösung der Neurotrophin-Freisetzung (eventuell als ein quantitativer Vergleich spezifischer zellulärer Strukturen wie Synapsen, Dendriten, Axone etc.) zu erreichen. Zunächst ermittelten wir Unterschiede in der Freisetzung von Neuriten im Vergleich zu Zellkörpern. Für diese Untersuchungen wurde es notwendig, die zu analysierenden Gebiete mit einer anderen Methode nach objektiven Kriterien unvoreingenommen auszuwählen (detailliert in 2.3.3.3 beschrieben), da Zellkörper im Vergleich zu Neuriten sehr selten waren und die in einem Foto erfaßte Membranoberfläche der Zellkörper gering ist. Mit diesem Selektionsverfahren analysierten wir nur 1/16 Somaoberfläche im Vergleich zu Neuriten, was allerdings ausreichend ist, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten.

Die Basalwerte zeigen für die Somata 2,6-fach höhere Werte als die Neuriten. Das könnte ein Hinweis darauf sein, daß die konstitutive Freisetzung aus den Zellkörpern höher ist (wie bereits beschrieben von Blöchl und Thoenen, 1996); allerdings sollten die Daten in diesem Bereich sehr kleiner Zahlen nicht überbewertet werden. Die stimulusinduzierte Freisetzung aus den Zellkörpern entsprach nur dem 2,4 fachen des Basalwertes. Diese Erhöhung war statistisch zwar nicht signifikant ($P > 0,05$), wurde aber konsistent in allen Experimenten beobachtet. Im Vergleich mit der KCl-induzierten Freisetzung aus Neuriten war die aus den Somata 9-fach geringer. Um sicherzustellen, daß diese Unterschiede nicht durch eine unterschiedliche Zusammensetzung der Neuriten- bzw. Somaoberflächenmembranen, vor allem hinsichtlich der HSPG, hervorgerufen werden, wurden die maximalen Bindungskapazitäten (kumulative Werte) verglichen. Die Anzahl der Goldpartikel im Falle der Sättigung mit NT6myc war sogar ein wenig höher (1,8-fach), wenn Somata mit Neuriten verglichen wurden, so daß eine präferentielle Bindung von NT6 an Neuriten keine Erklärung für die beobachteten Unterschiede sein kann.

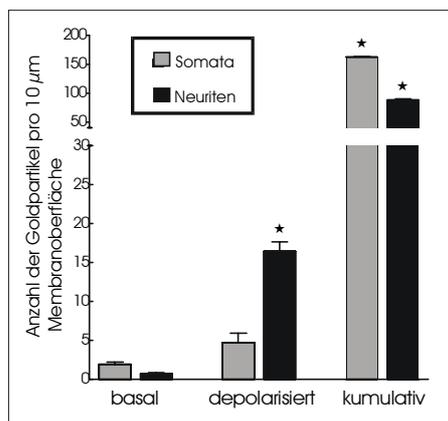
²³ Da eine Zunahme der Freisetzung ermittelt wird, würde dieser Effekt eher gegen die erwarteten Ergebnisse sprechen und keine artifiziellen Freisetzungsergebnisse „erzeugen“.

Tabelle 1: Quantitative Analyse der Oberflächenmarkierung nach Immunogoldzytochemie; Vergleich Neuriten - Somata unter den entsprechenden experimentellen Bedingungen

	Lac Z M ± SEM	Basal M ± SEM	Depolarisation M ± SEM	Kumulativ M ± SEM
Anzahl der Goldpartikel insgesamt (Neuriten)	80 ± 7	67 ± 8	1333 ± 190	7819 ± 724
Anzahl der Goldpartikel insgesamt (Somata)	ND	12 ± 2	23 ± 2	935 ± 12
Membranlänge insgesamt in µm (Neuriten)	1106 ± 212	938 ± 131	856 ± 98	935 ± 24
Anzahl der Goldpartikel insgesamt (Somata)	ND	60 ± 7	51 ± 5	59 ± 1
Experiment 1	0.77 ± 0.13	0.77 ± 0.15	16.0 ± 1.5	91 ± 8
Experiment 2	0.84 ± 0.12	0.52 ± 0.12	14.6 ± 0.7	85 ± 3
Experiment 3	ND	1.00 ± 0.19	16.4 ± 1.2	ND
Goldpartikel / 10 µm (Neuriten)	0.80 ± 0.04	0.76 ± 0.14	16 ± 1*	88*
Experiment 1	ND	1.7 ± 0.5	3.2 ± 0.7	164 ± 23
Experiment 2	ND	2.5 ± 0.6	7.1 ± 1.9	162 ± 13
Experiment 3	ND	1.6 ± 0.5	4.0 ± 1.3	ND
Goldpartikel / 10 µm (Somata)	ND	2.0 ± 0.3	4.8 ± 1.2	163*

Es werden jeweils die zusammengefaßten Werte von drei unabhängigen Experimenten gezeigt. Für die Ermittlung der Goldpartikel pro Längeneinheit werden zum besseren Vergleich der Experimente untereinander auch die Einzeldaten gezeigt. Die Mittelwerte (M) ± Standardabweichung werden gezeigt (die Mittelwerte der Einzelexperimente wurden aus den Zählungen für jedes Foto ermittelt: n=24; die Mittelwerte der zusammengefaßten Daten wurden aus den Mittelwerten der Einzelexperimente berechnet: n=3).

*statistisch signifikante Unterschiede (p<0.001) im Vergleich zu den korrespondierenden Werten linksstehend (d.h. Depolarisation vs Basal und Kumulativ vs Depolarisation; nicht für Einzelexperimente angegeben). ND=nicht ausgewertet.



Die gemittelten Werte sind im folgenden Balkendiagramm noch einmal dargestellt (Abb. 3.11).

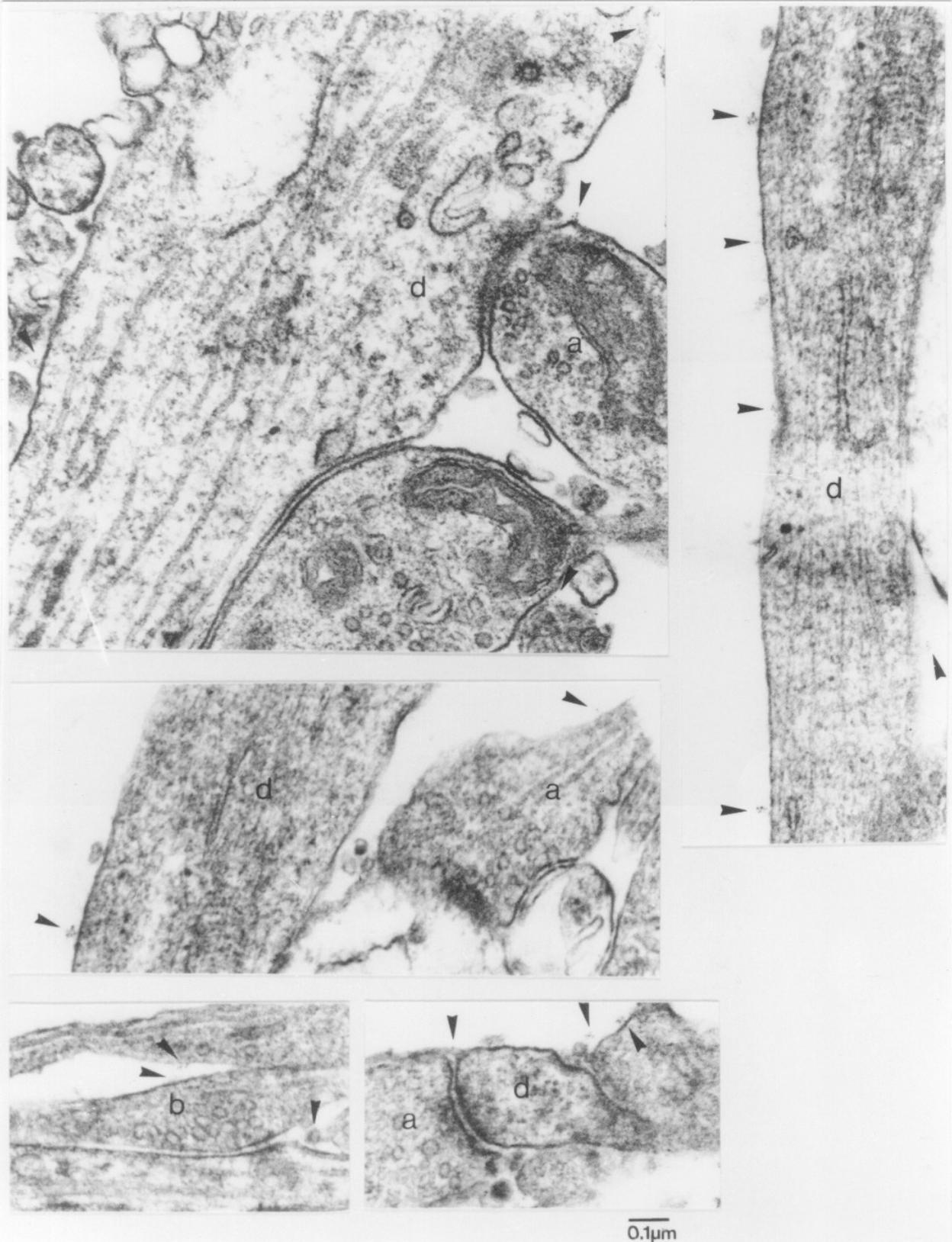
Abb. 3.11: Quantitative Analyse der Oberflächenmarkierung nach Immunogoldzytochemie (siehe auch Tabelle 1).

Die zusammengefaßten Daten aus drei unabhängigen Freisetzungsexperimenten (Tabelle 1) wurden in diesem Balkendiagramm veranschaulicht, um die Unterschiede zwischen den stimulierten und unstimulierten Kulturen hervorzuheben.

* statistisch signifikante Zunahme des Oberflächensignals (p<0.001 d.h. Depolarisation vs Basal und Kumulativ vs Depolarisation).

3.2.6 Weiterführende Untersuchungen zum Ort der aktivitätsabhängigen Freisetzung

In den vorangegangenen Experimenten wurden Unterschiede in der Freisetzung von NT6myc von Neuriten und Zellkörpern festgestellt. Im weiteren wäre eine detailliertere Aufklärung der Freisetzungsorte auf subzellulärer Ebene interessant. Vor allem die Frage, ob Neurotrophine von Synapsen (wenn ja, ob prä- oder postsynaptisch), Axonen, Dendriten, Spines oder anderen speziellen Strukturen freigesetzt werden, wäre mit dieser Technik mit ultrastruktureller Auflösung prinzipiell beantwortbar.



zu vorheriger Seite, **Abb. 3.12:** Oberflächenmarkierung 3-4 Wochen alter hippocampaler Neuronen in Kultur, die für 30 h mit AdV5NT6myc transduziert und bei 15° C äquilibriert wurden. Während der Transduktionsperiode freigesetztes NT6myc wurde mit Heparin von der Oberfläche entfernt. Heparin wurde entfernt, die Neuronen für 3 min mit KCl stimuliert und anschließend sofort bei 4 °C mit 1 % Glutaraldehyd fixiert. Oberflächengebundenes NT6myc wurde mit konventionellen immunocytochemischen Methoden unter Verwendung des 9E10myc-Ak und goldmarkierter (4nm) sekundärer Ak auf den nichtpermeabilisierten Zellen nachgewiesen. Diese Beispiele demonstrieren, daß NT6myc synaptisch und auch extrasynaptisch freigesetzt wird. D.h. trotz des Vorhandenseins vieler synaptischer Spezialisierungen in diesen älteren Kulturen, konnte keine synapsenspezifische NT6-Freisetzung beobachtet werden. An einem repräsentativen Beispiel in der rechten oberen Abb. wird gezeigt, daß die Freisetzung entlang der Oberfläche eines einzelnen Neuriten von vielen Stellen erfolgen kann. Skalierung: 0,1 µm.

In den bereits durchgeführten Experimenten wurde NT6myc nach Stimulation mit 50 mM KCl auf der Oberfläche der meisten Neuriten nachgewiesen, ohne daß Ortspräferenzen sichtbar wurden. In manchen Fällen war es möglich, einen neuronalen Ausläufer über etliche µm zu verfolgen. In diesen Fällen war die IR entlang der gesamten Oberfläche in Freisetzungssspots nachweisbar (Abb. 3.12 rechtes oberes Bild), ein weiterer Hinweis, daß die Freisetzung nicht auf bestimmte Orte beschränkt bleibt. Die Unterscheidung von Dendriten und Axonen war nicht in jedem Falle möglich, da oft nur kleine Abschnitte der Strukturen sichtbar waren, so daß auf eine quantitative Auswertung verzichtet wurde. Doch läßt sich mit Sicherheit sagen, daß, wenn Axone oder Dendriten eindeutig identifiziert werden konnten, eine NT6-Freisetzung von beiden Strukturen nachgewiesen wurde.

In weiteren Versuchen wurden diese Studien auf 3 bis 4 Wochen alte Kulturen erweitert, um festzustellen, ob eine lokalisierte Neurotrophin-Freisetzung eventuell nur in stärker differenzierten Neuronen möglich ist. Neuronen nach 3 Wochen in Kultur haben deutlich mehr synaptische Kontakte untereinander ausgebildet (Papa et al., 1995; Boyer et al., 1998) und weisen eine veränderte Spinemorphologie auf²⁴ (Papa et al., 1995). In EM-Untersuchungen konnte ein deutlicher Anstieg an synaptischen Spezialisierungen nachgewiesen werden mit deutlicher Ausprägung der postsynaptischen dichten Struktur und präsynaptischer Strukturen mit einer großen Anzahl synaptischer Vesikel (Abb. 3.12). Allerdings konnte auch in diesen Experimenten keine Struktur mit einer verstärkten Neurotrophin-Freisetzung assoziiert werden, wovon Abb. 3.12 einen Eindruck vermittelt. Ein Limit dieser Untersuchungen ist, daß keine quantitativen Studien durchgeführt wurden. Insofern wäre es möglich, daß subtile Unterschiede in der Freisetzungstärke nicht wahrgenommen werden.

3.2.6.1 Etablierung eines experimentellen Systems mit definiert prä- und postsynaptischer Region

Eine mögliche Erklärung für die ortsunspezifische Freisetzung von NT6 aus Neuriten könnte in der globalen Depolarisierung aller Zellen liegen. Physiologisch relevant wären Reizungen, die lokal beschränkt und unter Umständen synapsenspezifisch sind. Vielleicht würde ein lokaler Stimulus, der einen lokalen Kalziumanstieg auslöst, auch eine lokal beschränkte Neurotrophin-Freisetzung bewirken. Das würde heißen, daß zwar das Potential für eine Neurotrophin-Freisetzung von vielen Stellen vorhanden ist, was mechanistisch betrachtet von Bedeutung ist, aber daß die Spezifität durch den Stimulus definiert wird. Von Interesse wäre es, die prä- und postsynaptische Seite so zu separieren, daß eine getrennte Stimulation möglich wird und somit die Frage untersucht werden kann, ob Neurotrophine prä- oder postsynaptisch freigesetzt werden und ob die Freisetzung auf die Synapsenregion beschränkt bleibt.

²⁴ Spines in 1-1,5 Wochen alten Kulturen haben eine elongierte filopodienähnliche Form. In 3 Wochen alten Kulturen (Abb. 3.15D) ist die Dichte an Spines deutlich erhöht und die Form verändert zu kurzen Strukturen mit einem globulärem Kopf, die oft mit präsynaptischen Terminalien assoziiert sind. Diese Untersuchungen wurden in AdV5EGFP transduzierten Neuronen gemacht, da sich die Spines durch die GFP Fluoreszenz deutlicher abzeichnen.

Ein solches Kultursystem sollte folgende Bedingungen erfüllen:

- 1) definierte prä – und postsynaptische Zellen
- 2) gezieltes Auswachsen der Axone und Etablierung synaptischer Kontakte zu räumlich isolierten, postsynaptischen Zellen
- 3) eine Transduktion mit AdV5NT6myc nur prä- oder nur postsynaptisch sollte möglich sein (Diese Experimente sollen auf EM-Ebene durchgeführt werden. Da eine Zuordnung zu prä- und postsynaptischen Neuronen auf EM-Ebene schwierig ist, würde eine getrennte Transduktion der prä- oder postsynaptischen Seite die Lokalisierung der Freisetzung eindeutig ermöglichen, da eine Freisetzung nur von der transduzierten Seite stattfinden kann.)
- 4) eine ausschließlich präsynaptische Stimulation sollte möglich sein

Folgendes Kultursystem wurde etabliert (ausführlich unter 2.2.3.2 beschrieben) und erfüllt die genannten Bedingungen:

zu 1) Ein Explantat aus embryonalen Hippokampi wurde als präsynaptisches Zellaggregat in die Mitte eines Deckgläschens plaziert. Es kommt bereits nach ca. 3 Tagen zum Auswachsen axonaler Ausläufer, die positive IR für den axonalen Marker (tau-1) zeigen. Außerdem sind deutlich Wachstumskegel nachweisbar (einen Eindruck vermitteln Abb. 3.13B,C). Alternativ zu Explantatkulturen wurden Zellaggregatkulturen verwandt, die sich besser transduzieren lassen. Nach 2-3 Tagen werden – durch einen Klonierungsring räumlich von den Explantaten getrennt – dissoziierte Zellen in ca. 2-4 mm Abstand ausplattiert, welche die postsynaptischen Zellen bilden.

zu 2, 4) Nach weiteren 4-7 Tagen kommt es zum radialen Auswachsen der Explantate, zur Innervation der dissoziierten Zellen durch die Axone der Explantatkulturen und zur Bildung funktioneller Synapsen, wie durch elektrophysiologische Experimente überprüft wurde (Abb. 3.13D). Dazu wurde das gesamte Explantat mit einer bipolaren Elektrode²⁵ stimuliert und von einer dissoziierten Zelle (mit einer Patch-Clamp-Elektrode) intrazellulär abgeleitet, die bei synaptischer Verbindung eine reizkorrelierte Antwort zeigt (Abb. 3.13A/D). Diese Verbindungen zwischen den aus dem Explantat auswachsenden Axonen und den dissoziierten Neuronen sind in der Nähe des Explantates am häufigsten. Problematischer ist es zu überprüfen, ob eine retrograde Reizung über eventuell einwachsende Axone der dissoziierten Zellen erfolgt. Dies kann nur dadurch verhindert werden, daß das Explantat mindestens 3 Tage vor den dissoziierten Zellen ausplattiert wird. Zudem sind die Ausläufer gut im Phasenkontrast oder – im Falle GFP-transduzierter Zellen – im Fluoreszenzmikroskop sichtbar (Abb. 3.13C), so daß bei starkem retrograden Einwachsen in die Explantate die Kultur verworfen werden kann.

zu 3) Eine getrennte Transduktion der Zellen und Explantate erwies sich als schwierigster Punkt, da die Virustransduktion sehr effektiv noch mit geringsten Titern über den Zeitraum der Kultivierung möglich ist und Viruspartikel wahrscheinlich auch am Substrat anhaften. Eine selektive Transduktion war nur möglich, wenn die Zellen vor der Kultivierung mit sehr geringen Titern über eine kurze Zeit inkubiert wurden (siehe 2.2.3.2) und erst nach gründlichem Waschen kultiviert wurden. Unter diesen Bedingungen wurde eine recht gute Transduktion der Explantate (Abb. 3.13B/C) und der dissoziierten Zellen über 1,5 Wochen erreicht²⁶. Wurden diese transduzierten Explantate auf dissoziierten Neuronen ausgesät, blieb die GFP-Fluoreszenz auf das Explantat beschränkt (Abb. 3.13C). Nichttransduzierte Explantatkulturen wurden gleichermaßen nicht durch den Kontakt mit transduzierten dissoziierten Zellen transduziert; d.h. eine getrennte Transduktion unter diesen Bedingungen ist möglich. Allerdings erfordert dieses Protokoll eine 1,5 wöchige Transduktion der Neuronen. Mittels elektrophysiologischer Methoden konnte gezeigt werden, daß die Neuronen auch nach dieser langen Transduktion

²⁵ da die Größe der Explantate variierte, konnten die Elektroden der bipolaren Elektrode so verstellt werden, daß ca. 80% der jeweiligen Explantatkultur zwischen den Elektroden lag; die Reizhöhe wurde in vorangegangenen Experimenten auf 15 V festgelegt, bei der es eine reproduzierbare Antwort der postsynaptischen Zelle gab.

²⁶ Zur Etablierung der Parameter wurde i.d.R. AdV5EGFP verwendet.

physiologisch intakt sind: Transduzierte, dissoziierte Zellen reagierten normal auf depolarisierende Strompulse, und transduzierte Explantate bildeten funktionelle Synapsen zu dissoziierten Zellen aus (Abb. 3.13D). Erste elektronenmikroskopische Studien zeigten, daß die Zellstruktur nach dieser langen Transduktionszeit keine pathologischen Veränderungen aufwies.

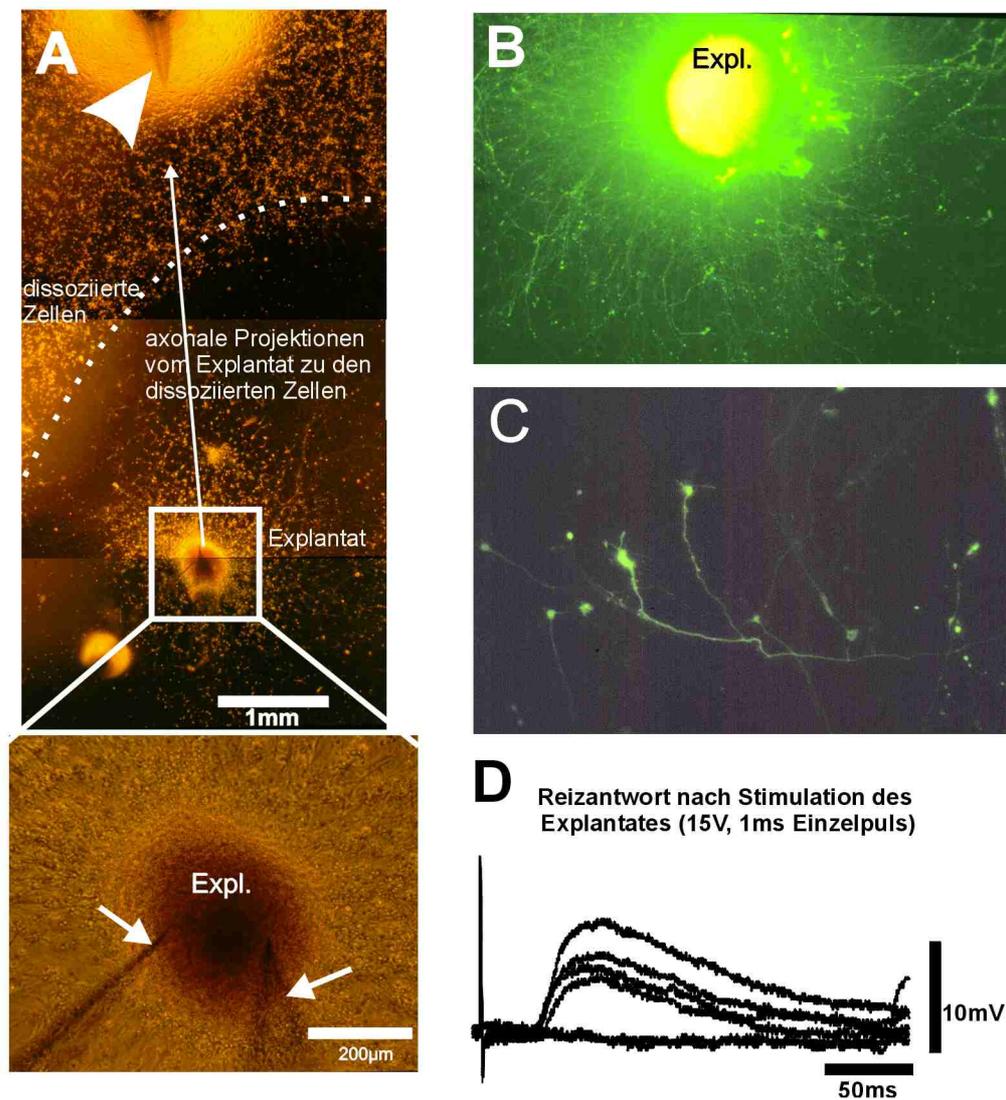


Abb. 3.13: Kultursystem mit räumlich separierten prä- und postsynaptischen Neuronen. **A:** Experimenteller Aufbau im Überblick: Das Explantat (im unteren Bildteil, und in der unteren Abb. vergrößert dargestellt) wurde mit einer bipolaren Elektrode stimuliert (durch Pfeile markiert), während gleichzeitig von einem postsynaptischen Neuron mit einer Patch-Elektrode abgeleitet wurde (im oberen Bildteil; die Elektrode ist durch die Pfeilspitze markiert; die helle kreisförmige Struktur ist ein optisches Artefakt durch das Eintauchen der Elektrode). Die räumliche Separation der Explantatkultur von den dissoziierten Zellen ist hier deutlich zu erkennen (gepunktete Linie). **B:** Eine mit AdV5EGFP transduzierte Aggregatkultur exprimiert auch 1,5 Wochen nach Transduktion noch GFP. Die GFP-Fluoreszenz wurde mit einem Axiophot-Fluoreszenzmikroskop beobachtet. Die axonalen Ausläufer sind dadurch sehr deutlich zu erkennen. **C:** Eine ausschließliche Transduktion der Aggregatkultur ist möglich und wird hier sichtbar, da nur die Ausläufer des Explantates, aber nicht die (nur im Phasenkontrast sichtbaren) dissoziierten Neuronen GFP-positiv sind. In diesem Falle wurden die Explantate vor der Kokultivation mit AdV5EGFP transduziert und der Virus durch gründliches Waschen entfernt. **D:** Die in A dargestellte Explantatkultur wurde mit Einzelpulsen über eine bipolare Elektrode stimuliert. Gleichzeitig wurde eine mit der Stimulation deutlich korrelierte Reizantwort in einem der dissoziierten Neuronen gemessen, was auf funktionelle synaptische Kontakte hinweist. In der Abbildung sind Einzelantworten eines Neurons überlagert dargestellt. Funktionelle synaptische Verbindungen zwischen Explantat und dissoziierten Zellen konnten nach 1,5 wöchiger Transduktion der dissoziierten Zellen (diese Abbildung) oder des Explantates gezeigt werden.

In ersten Experimenten wurden elektronenmikroskopisch klar die axonalen Ausläufer identifiziert. Durch asymmetrisches Kultivieren dreier Explantate war es möglich, Regionen zu definieren, die auf EM-Ebene untersucht werden sollen. Die Experimente sollen letztlich so durchgeführt werden, daß entweder nur die prä- oder nur die postsynaptische Seite mit AdV5NT6myc transduziert wird und die NT6myc Freisetzung nach definierter Stimulation des Explantates mit den bereits etablierten EM-Methoden nachgewiesen werden kann.

3.2.7 Experimenteller Ansatz zur Bestimmung des Ortes der Neurotrophinwirkung

In diesem Kapitel soll ein experimentelles System vorgestellt werden, mit dem wir begonnen haben zu untersuchen, ob Neurotrophine prä- oder postsynaptisch bei der Induktion von LTP benötigt werden. Dieses Kapitel soll einen Ausblick auf weitere Möglichkeiten gestatten (und insofern die Idee nur kurz skizzieren), schnelle Neurotrophinwirkungen in physiologischen Systemen zu untersuchen und an dieser Stelle eine Ergänzung zu den vorangegangenen Experimenten, zur Lokalisierung des Ortes der Neurotrophin-Freisetzung, darstellen.

Im einleitenden Kapitel (1.2.5.3) wurde erwähnt, daß LTP in BDNF defizienten Mäusen drastisch verringert ist und durch viral vermittelte BDNF-Reexpression wieder hergestellt werden kann (Korte et al., 1996). Mit diesen Experimenten wurde zwar deutlich gezeigt, daß der Effekt auf die LTP tatsächlich direkt durch BDNF vermittelt wird, aber nicht an welchem Ort (prä- oder postsynaptisch) und Zeitpunkt BDNF für die LTP-Expression benötigt wird. Wahrscheinlich wurde BDNF in diesen Experimenten zum großen Teil bereits während der Transduktionsperiode konstitutiv aus AdV5BDNF-transduzierten Gliazellen freigesetzt. Eine virale Reexpression des Trk-R anstelle des Liganden gäbe die Möglichkeit, zwischen einer definiert prä- oder postsynaptischen Expression (eines Transmembranproteins) und somit Lokalisierung der Neurotrophinwirkung zu unterscheiden.

Voraussetzung für diese Experimente ist die Verfügbarkeit von Mäusen, die keinen funktionellen Trk-R exprimieren, da dieser auf definiertem Wege viral exprimiert werden soll. Da im Hippokampus TrkA in der CA3/CA1 Region nur in sehr geringen Mengen vorkommt und funktionell nicht ins Gewicht fällt, kann der Hippokampus als „knock out“ System für TrkA angesehen werden. Damit ist die Möglichkeit gegeben, die LTP in BDNF-defizienten Mäusen durch ein „homologes“ System – und zwar die Expression von TrkA-Rezeptoren – wiederherzustellen²⁷. Das angestrebte Experiment ist in Abb. 3.14D skizziert: AdV5TrkA wird lokal entweder in die CA3 (präsynaptisch) oder in die CA1-Region (postsynaptisch) hippocampaler Schnittkulturen (frisch aus BDNF-defizienten Mäusen präpariert) injiziert. Gleichzeitig wird AdV5NGF prä- und/oder postsynaptisch injiziert, da NGF im Hippokampus nicht in genügenden Mengen vorhanden ist. Nach ca. 6 h sollten die Rezeptoren exprimiert sein und es kann bestimmt werden, ob dies zur Rekonstitution der LTP führt. Zunächst muß allerdings überprüft werden, ob das TrkA/NGF-System tatsächlich in der Lage ist, wie TrkB/BDNF die LTP vergleichbar zu beeinflussen. Dazu soll der gesamte Schnitt mit TrkA und NGF transduziert werden und eine LTP-Expression gemessen werden.

Einige technische Details, die Voraussetzung für dieses Projekt sind, wurden bereits unter 3.1 diskutiert (Wirtselektivität von Adenoviren im Vergleich zu Sindbisviren: 3.1.1.4 und 3.1.2.2; Zeit bis zur Expression: 3.1.3.1; Toxizität der Viren: 3.1.1.3 und 3.1.2.1; Transduktion von Schnittkulturen: 3.1.3.3).

Dieses System eröffnet weitere Möglichkeiten, indem TrkA-Rezeptormutanten, die spezifische Mutationen in den signalvermittelnden Tyrosinresten aufweisen (Inagaki et al., 1995; Abb. 3.14A), auf ihrer Fähigkeit, die LTP wiederherzustellen, untersucht werden können. Damit

²⁷ Auch die Verwendung von TrkB-defizienten anstelle der BDNF-defizienten Mäuse wäre möglich, da hier direkt TrkB reexprimiert werden könnte, ohne den Umweg über das TrkA-System zu machen. Da die BDNF-defizienten Mäuse hinsichtlich der LTP-Expression sehr gut untersucht wurden (Korte et al., 1995/1996), und uns diese Mauslinie zur Verfügung steht, entschieden wir uns für dieses System.

könnte zusätzlich geklärt werden, welche Signaltransduktionskaskaden für die LTP im Hippokampus wichtig sind. In Abb. 3.14A sind zwei wichtige²⁸ Rezeptormutanten dargestellt, die in dem Tyrosin, welches die Signaltransduktion über PLC γ vermittelt, mutiert sind (Y794) oder nur dieses Tyr besitzen (Re794). Diese Rezeptoren wurden in adenovirale Vektoren kloniert; transduzierte Zellen exprimieren TrkA (Abb. 3.14B) wie im Westernblot gezeigt wurde. Diese Rezeptoren werden membranständig exprimiert (Abb.3.14C), da sie an der Oberfläche transduzierter Zellen lokalisiert sind²⁹.

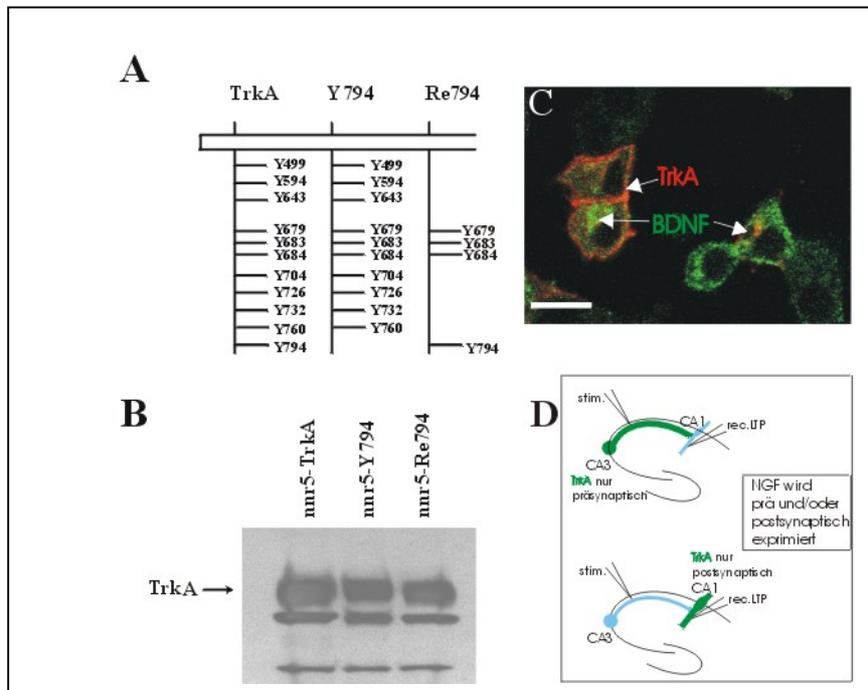


Abb. 3.14: System zur Untersuchung der prä- oder postsynaptischen Wirkung von Neurotrophinen bei der Induktion von LTP. **A:** TrkA wt-Rezeptor im Vergleich zu Rezeptormutanten, die entweder im Tyr794 mutiert sind (Y794) oder nur das Tyr, welches die Signaltransduktion über PLC γ vermittelt, besitzen (Re794).

B: Die in A dargestellten Rezeptoren wurden in Adenoviren kloniert und die Expression der TrkA-Rezeptoren im Westernblot getestet: AdV5TrkA-transduzierte NNR5 Zellen (diese besitzen natürlicherweise keine Trk-R) wurden lysiert, die Trk-R mit WGA-Sepharose präzipitiert und im Westernblot mit einem pan Trk-Ak

nachgewiesen. **C:** PC12 Zellen wurden mit AdV5TrkA transduziert und anschließend die TrkR immunocytochemisch nachgewiesen. Die rote Färbung markiert die Trk-R-IR und ist z.T. intrazellulär aber hauptsächlich in der Zellmembran nachweisbar. Im Vergleich dazu ist stabil exprimiertes BDNF-GFP (grün) hauptsächlich in intrazellulären Kompartimenten lokalisiert. Die TrkA-Rezeptormutanten unterscheiden sich in der subzellulären Lokalisierung nicht vom wt-Rezeptor. Die beiden nichttransduzierten Zellen (unten rechts) zeigen keine IF und somit die Spezifität des Signals (endogenes TrkA wird so schwach exprimiert, daß es in der Färbung nicht sichtbar wurde). **D:** Experimentelles System zur Untersuchung der prä- oder postsynaptischen Wirkung von Neurotrophinen. (Erläuterungen ausführlich im Text, Abschnitt: 3.2.7).

3.3 Untersuchungen zur Identifizierung des intrazellulären Kompartimentes der Neurotrophin-Speicherung und -Freisetzung

3.3.1 Lichtmikroskopische Untersuchungen zur Neurotrophin-Lokalisierung

Die vorangegangenen Experimente (3.2.5.2) zeigen deutlich, daß NT6myc aus einem intrazellulären Kompartiment freigesetzt wurde. Allerdings gab es keine Korrelation der Freisetzungsorte mit intrazellulär assoziierten definierten Strukturen. In folgenden Experimenten soll versucht werden, das Neurotrophin-Speicherkompartiment mit Hilfe licht- und elektronenmikroskopischer Untersuchungen besser zu charakterisieren.

²⁸ Die Entscheidung für die Herstellung speziell dieser Mutanten erfolgte auf Grund vorangegangener Experimente, in denen gezeigt wurde, daß die Signaltransduktion über PLC γ (weiter über IP $_3$ und Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Speichern) ausreichend und notwendig für die neurotrophinvermittelte Neurotrophin-Freisetzung ist (M. Canossa; persönliche Mitteilung).

²⁹ Eine membranständige Expression der TrkA-Rezeptoren in Neuronen wurde durch die Fähigkeit von NGF, diese viral exprimierten Rezeptoren zu phosphorylieren, indirekt gezeigt.

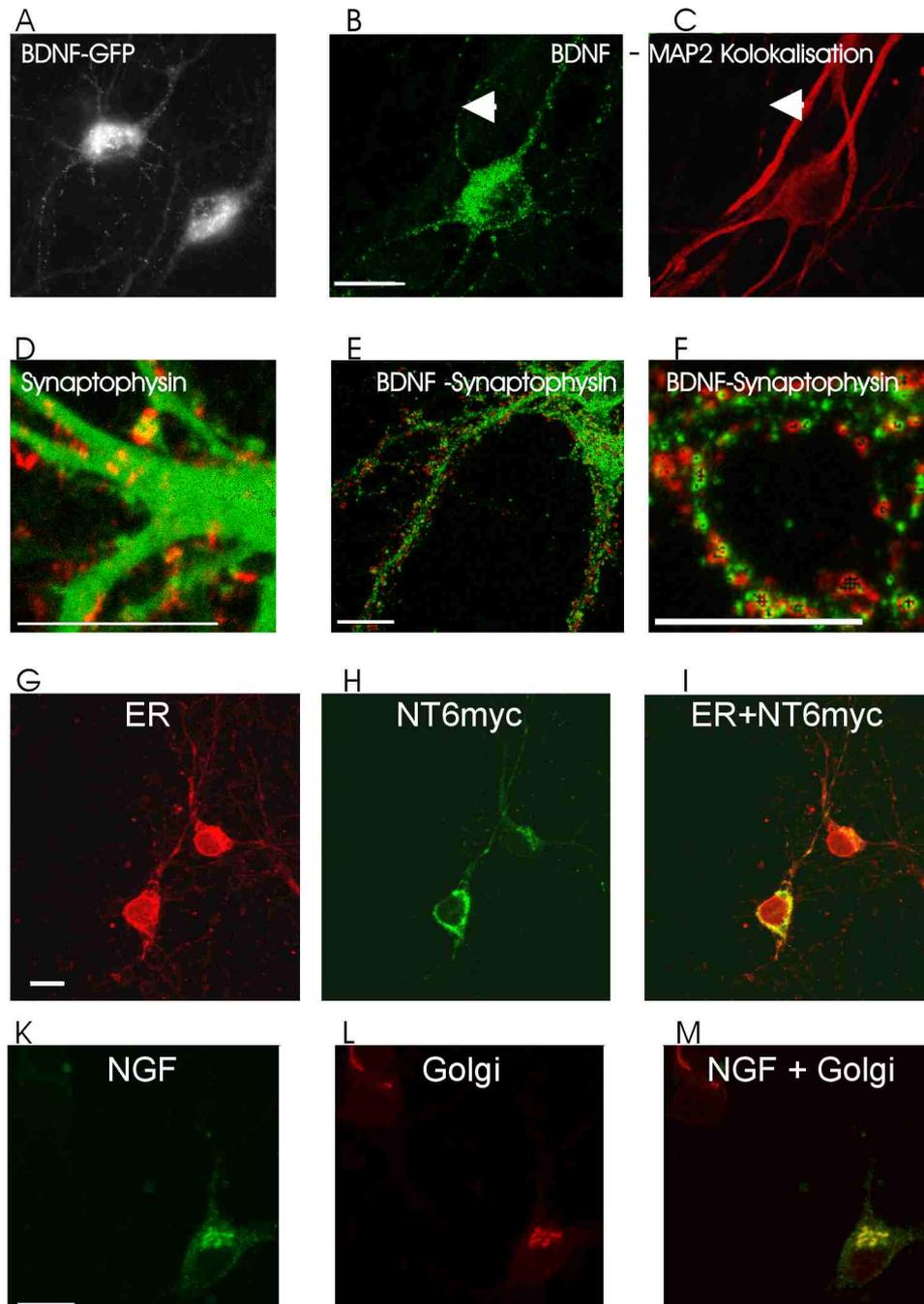


Abb. 3.15: Die intrazelluläre Verteilung von Neurotrophinen in dissoziierten hippocampalen Neuronen wurde mit Immunfluoreszenzmethoden untersucht. Hippokampale Neuronen wurden mit Adv5NT6myc, Adv5BDNFmyc oder Adv5NGF transduziert, nach 30h fixiert und Neurotrophine mit entweder dem 9E10myc-Ak oder einem polyklonalen anti-NGF-Ak immunomarkiert. Die IR wurde mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. Zum Teil wurden Doppelmarkierungsstudien durchgeführt und die Kolokalisierung zweier Signale mittels konfokaler Mikroskopie bestimmt. Zur besseren Auflösung wurden i.d.R. nur einzelne konfokale Ebenen dargestellt. Kolokalisierung zweier Marker (grün/rot) wird durch die gelbe Färbung auf Grund der Überlagerung der Signale deutlich. In G-M wurden parallel die Einzelfärbungen gezeigt. **A:** BDNF-GFP Verteilung in lebenden Zellen; **B/C:** Kolokalisierung von BDNF (grün) und MAP2 (rot); das MAP2-negative Axon ist mit einem Pfeil markiert und ist BDNF positiv (diese Neuronen waren 21 Tage alt, da die Unterscheidung von Dendriten und Axonen über MAP2-IR erst dann eindeutig möglich ist). **D:** Ein GFP exprimierendes Neuron ist mit einem Synaptophysin-Ak markiert (rot). Auch hier wurden 21 Tage alte Neuronen verwendet, die deutlich mehr Spines aufweisen. Synapsen sind an den dendritischen Spines und Schäften nachweisbar. **E/F:** BDNFmyc (grün) – Synaptophysin (rot)-Kolokalisierung ebenfalls in 21 Tage alten Kulturen gezeigt. **G-I:** ER (rot)-NT6myc (grün) Kolokalisierung: Einzelfärbungen und

Überlagerung sind dargestellt; **K-M**: NGF (grün)-Golgi (rot) –Kokolisierung, Einzelfärbungen und Überlagerung sind dargestellt. Skalierung jeweils 10 µm.

Alle immunozytochemischen Untersuchungen wurden nach Transduktion mit den entsprechenden Neurotrophin-AdV5 durchgeführt, da die endogene Neurotrophin-Expression sehr niedrig ist. Nichttransduzierte Zellen derselben Präparation können somit als Negativkontrolle dienen. Die meisten Studien wurden, je nach Ak- Verfügbarkeit, mit verschiedenen Neurotrophinen durchgeführt. Da NGF, NGFmyc, NT6myc und BDNFmyc kolokalisiert sind (Abb. 3.7D-I), sollten die Befunde repräsentativ für alle Neurotrophine sein.

Ein Problem bei der Untersuchung der intrazellulären Verteilung mit immunozytochemischen Methoden ist die Notwendigkeit der Fixierung und Permeabilisierung der Zellen und damit eine mögliche Strukturveränderung. Deshalb wurde zunächst die intrazelluläre Verteilung eines BDNF-GFP-Fusionsproteins in lebenden hippocampalen Neuronen untersucht (Abb. 3.15A). Diese unterscheidet sich nicht von der intrazellulären Neurotrophin-Verteilung in fixierten Zellen (Vergleich: Abb. 3.15A mit B), d.h. Artefakte, die durch die Fixierung der Zellen oder die anschließende Immunofärbung entstehen könnten, sind vernachlässigbar.

Wie bereits beschrieben (Abschnitt 3.2.2), sind Neurotrophine punktiert über alle Neuriten verteilt und im Soma akkumuliert. Dieses Verteilungsmuster blieb innerhalb der Detektionsgrenzen der Methode auch bei geringerer Neurotrophin-Expression (nach Transduktion mit sehr geringen Virustitern) qualitativ gleich. Dies zeigt, daß die Überexpression von Neurotrophinen ihre intrazelluläre Lokalisierung nicht verändert.

Neurotrophine sind sowohl in Axonen wie auch in Dendriten hippocampaler Neuronen lokalisiert, wie durch Doppelmarkierung mit einem BDNF- oder myc-Ak (für BDNFmyc) und dem dendritenspezifischen Marker MAP-2 gezeigt werden konnte (Abb. 3.15B/C), was in Übereinstimmung mit den Freisetzungsorten ist (siehe 3.2.6).

Eine speziell synaptische Akkumulation von BDNFmyc konnte in Kokolisierungsstudien mit dem präsynaptischen Marker Synaptophysin, unabhängig vom Alter der Kulturen, nicht gezeigt werden (Abb. 3.15E/F, 21 Tage alte Kulturen). BDNFmyc ist über die gesamte Länge der Neuriten verteilt und zum Teil auch mit Synapsen assoziiert. Die IF Signale liegen oft nebeneinander, was auf eine postsynaptische BDNFmyc-Lokalisierung schließen läßt (Haubensak et al., 1998). Synapsen sind oft an Spines aber auch an den dendritischen Schäften zu finden (Boyer et al., 1998; Abb. 3.15D, die Spines wurden hier durch die GFP-Expression deutlicher). In älteren Kulturen ist die BDNFmyc IR zwar auch in Spinestrukturen nachweisbar (nicht gezeigt), aber auch dort nicht präferentiell akkumuliert.

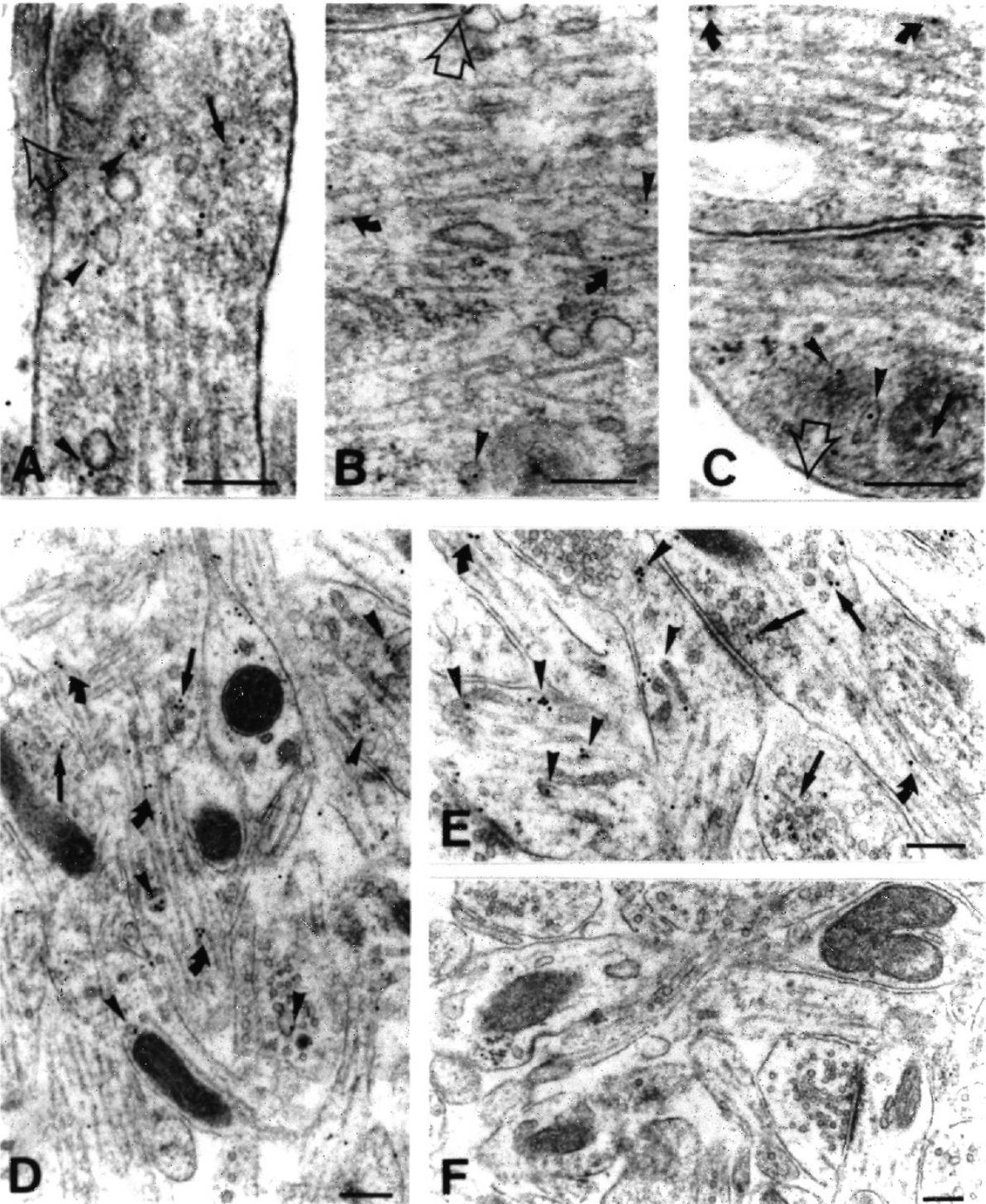
In weiteren Studien wurden Ak gegen intrazelluläre Marker verwendet, um die Neurotrophin-IR mit spezifischen Kompartimenten zu korrelieren. Wie bereits für NGF gezeigt (Blöchl und Thoenen, 1996), konnte eine Kokolisierung von BDNFmyc und NT6myc (Abb. 3.15G-I) mit ER-Markern nachgewiesen werden. Zwei verschiedene anti-ER-Ak – ein Ak gegen ein luminales Protein BiP und eine weitere Ak gegen eine ER Membranfraktion (Abb. 3.15G) – erkennen ER auch in den Neuriten. Die Kokolisierung mit BDNFmyc oder NT6myc (Abb. 3.15I) ist nicht 100%, da die Neurotrophin-IR oft punktiert lokalisiert ist. Ein Ak gegen den Golgi (Michel Bornens, Institut Curie, Paris) kolokalisiert 100 % mit BDNFmyc und NGF (Abb. 3.15K-L) und zeigt, daß Neurotrophine in den gesamten Golgizisternen vorkommen.

3.3.2 Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Neurotrophin-Verteilung

Auf lichtmikroskopischer Ebene ist die Auflösung limitiert und zudem wird das Signal durch die Streuung der Fluoreszenz gestört. Deshalb wurden in Zusammenarbeit mit Natalie Stöckli elektronenmikroskopische Experimente durchgeführt.

Diese Experimente wurden mit transduzierten hippocampalen Neuronen durchgeführt und auf lokal transduzierte Schnittkulturen erweitert, um Veränderungen der Neurotrophin-Verteilung durch die Kultivierung dissoziierter Neuronen auszuschließen. Die myc-Markierung der

Neurotrophine (BDNF und NT6) ermöglicht eine starke Fixierung. „Postembedding“ Immunogoldtechniken wurden von N. Stöckli etabliert, um eine möglichst optimale Strukturhaltung und -auflösung zu gewährleisten.



zur vorangegangenen Seite: Abb. 3.16: Intrazelluläre Verteilung von Neurotrophinen mit ultrastruktureller Auflösung. **A-C:** AdV5NT6myc transduzierte hippocampale dissoziierte Neuronen wurden doppelmarkiert (Verwendung des 9E10 myc Ak) für oberflächenassoziiertes NT6myc (Immunogoldfärbung nicht permeabilisierter Zellen vor dem Einbetten mit goldgekoppelten Ak, 4 nm; siehe dazu Abb. 3.10; 3.12) und intrazellulär verteiltes NT6myc (Immunogoldfärbung ultradünner Schnitte nach dem Einbetten, 12 nm Gold). **D/E:** Chronische hippocampale Schnittkulturen wurden lokal mit AdV5BDNFmyc in der CA1-Region transduziert und eingebettet. Ultradünne Schnitte wurden immunmarkiert unter Verwendung des 9E10myc Ak und eines goldmarkierten (18 nm) anti-Maus Ak. **F:** Nichttransduzierter Bereich der CA-Region (dieselbe Kultur wie unter (D/E) diente als interne Negativkontrolle und zeigt die Spezifität der Ak für das myc-Epitop. Offene Pfeile: oberflächenassoziierte IR; Pfeilspitzen: Membranstrukturen; gekrümmte Pfeile: mit Mikrotubuli assoziierte Goldpartikel; Pfeile: IR in der Nähe synaptischer Vesikel. Skalierung: 0.1 μm .

In Abb. 3.16A-C sind Experimente gezeigt, in denen nach „preembedding“ Oberflächenfärbung an dissoziierten hippocampalen Neuronen eine zweite intrazelluläre Färbung unter Verwendung größerer Goldpartikel durchgeführt wurde³⁰. NT6myc IR ist meist in ER-ähnlichen unterschiedlich geformten Membranstrukturen verschiedener Größen lokalisiert, oft an Mikrotubuli assoziiert und in der Nähe synaptischer Vesikel zu finden. Die parallel dazu untersuchte Verteilung von BDNFmyc in transduzierten hippocampalen Neuronen war nicht unterscheidbar von der NT6myc-Verteilung. Wenn lokal AdV5EGFP³¹ und AdV5BDNFmyc-kotransduzierte hippocampale Schnittkulturen untersucht wurden (Abb. 3.15D/G), konnten die Neurotrophine in vergleichbaren Strukturen lokalisiert werden. In beiden Präparationen wurden Neurotrophine in Axonen und Dendriten nachgewiesen; LDCVs wurden sehr selten gefunden und waren zudem fast nie immunmarkiert. Die Spezifität der Färbung wurde durch folgende Kontrollen überprüft: nichttransduzierte Zellen der gleichen Präparation (interne Kontrolle Abb. 3.16F), AdV5GFP transduzierte Zellen (um Kreuzreaktivitäten zu Adenovirusproteinen auszuschließen) und Preadorption des myc-9E10 Ak mit dem myc-Peptid. In allen Kontrollexperimenten war die IR sehr deutlich reduziert.

Somit wurden in diesen Experimenten mit höherer Auflösung ähnliche Ergebnisse erzielt, wie in lichtmikroskopischen Untersuchungen: eine Neurotrophin-Lokalisierung in ER-Membranstrukturen, in Axonen und in Dendriten.

3.4 Neurotrophin-Freisetzung durch elektrische Stimulation von dissoziierten hippocampalen Neuronen

Ein System zur elektrischen Stimulation von hippocampalen Neuronen wurde aus verschiedenen Gründen etabliert. Nur mittels elektrischer Stimulation ist es möglich, das zeitliche Muster des Stimulus zu variieren, da kurze Reize ausgelöst werden können. Zunächst soll untersucht werden, ob es eine Korrelation zwischen elektrischen Reizen und der Neurotrophin-Freisetzung gibt. Dies wird vor allem im Zusammenhang mit der Untersuchung der Modulation der LTP durch Neurotrophine interessant, da noch nicht geklärt ist, ob eine Koinzidenz des LTP induzierenden Stimulus mit der Neurotrophin-Freisetzung besteht und notwendig ist. Sollte die Neurotrophin-Sekretion abhängig von der Natur (Frequenz, Dauer, Anzahl der Pulse etc.) des induzierenden Stimulus sein, wäre es naheliegend, die Neurotrophin-Sekretion durch LTP und LTD-induzierende Stimuli zu vergleichen. Zudem könnte man über die für eine Neurotrophin-Freisetzung notwendigen Stimulationsparameter möglicherweise indirekte Informationen erhalten, aus welchem Kompartiment diese Freisetzung stattfindet. So werden für die Freisetzung von Peptiden in der Regel hochfrequenter elektrische Reize benötigt als für Neurotransmitter (Lundberg und Hökfelt, 1983). In den vorangegangenen Experimenten wurde

³⁰ Parallel dazu wurden unter Verwendung verschiedener Fixierungsprozeduren Experimente an hippocampalen Neuronen ohne vorherige Oberflächenmarkierung durchgeführt, die ähnliche Ergebnisse zeigten.

³¹ Die GFP-Expression von transduzierten Neuronen ermöglichte eine Lokalisierung des transduzierten Gebietes, welches für Immunofärbungen herangezogen wurde.

eine Neurotrophin-Sekretion durch die Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration und die damit verbundene Depolarisierung der Zellen durch Kaliumstrom hervorgerufen. Diese Stimulation ist unphysiologisch, da das gesamte Ionengleichgewicht gestört wird und direkt durch Kalium vermittelte Effekte nicht ausgeschlossen werden können. Das Aktivierungsmuster der Zelle ist bei konstanter Kaliumkonzentration (50 mM) abhängig von der Geschwindigkeit der Kaliumapplikation (in einer Flußkammer von der Zeit die nach Pufferaustausch tatsächlich benötigt wird, um 50 mM K^+ zu erreichen; bei statischer Applikation wird diese Konzentration sofort erreicht), während elektrische Stimulation unabhängig von diesen experimentellen Parametern sein sollte.

3.4.1 Stimulation mit Feldelektroden

Mit Hilfe von parallel angeordneten (8mm Abstand, 8mm lang) Platinfeldelektroden ist es möglich, ein weitgehend homogenes elektrisches Feld zu produzieren und alle dazwischenliegenden Zellen einer Kultur gleichzeitig zu stimulieren (siehe 2.3.2.3). Zunächst wurde die Reaktion von Einzelzellen³² einer Kultur auf eine Feldelektrodenstimulation untersucht. Die Stärke und Form der Reizantworten waren unabhängig von der Entfernung der Zelle von den Feldelektroden, d.h. das Feld ist tatsächlich homogen. Eine Reizstärke von 15 V war ausreichend, um in Neuronen eine konsistente Reizantwort nach Einzelpulsen zu erhalten. Deshalb wurde in den folgenden Experimenten mit 15 V gearbeitet und nur das Stimuluster modifiziert. Eine Zellschädigung durch die Feldelektrodenstimulation war nicht nachweisbar: Die Anzahl propidiumiodidpositiver Zellen war auch nach den stärksten verwendeten Reizungen nicht erhöht³³, außerdem waren Neuronen selbst nach sehr massiver Reizung (20 V, 100 Hz, 1 min) noch in der Lage, unverändert auf Einzelpulse zu reagieren.

3.4.2 Freisetzung von NT6myc nach elektrischer Stimulation

Zunächst wurde untersucht, ob Neurotrophine nach elektrischer Stimulation freigesetzt werden und ob unterschiedliche Reizmuster Unterschiede in der Neurotrophin-Sekretion ergeben. Diese Experimente wurden wie unter 3.2.5 beschrieben bei 32°C³⁴ durchgeführt. In allen Experimentserien wurden Kontrollzellen mit KCl stimuliert oder überhaupt nicht stimuliert, um einen Vergleich mit den bereits unter 3.2 beschriebenen Experimenten zu haben und gleichzeitig den Einfluß der erhöhten Temperatur auf die Freisetzung zu kontrollieren.

Drei verschiedene Stimuluster wurden verwendet:

- A) eine Stimulation mit 10 Hz Pulsen
- B) eine Stimulation mit 50 Hz Pulsen
- C) eine Stimulation mit „theta bursts“ (TBS; ein „burst“=10 x 4 100 Hz-Signale dazwischen 200 ms Pause; wiederholt nach 10 s).

Die Pulslänge betrug jeweils 1 ms.

Die Neuronen wurden für 1 min (50 Hz, TBS) oder 5 min (10 Hz, hier wurde eine 5fach längere Stimulationszeit gewählt, um die Anzahl der Pulse konstant zu halten) stimuliert.

In Abb. 3.17 (Tabelle 2) sind die Daten der quantitativen Analyse der Immunogoldmarkierung nach elektrischer Stimulation dargestellt. Eine Stimulation der Neuronen mit 10 Hz war nicht ausreichend, um NT6myc auch nur in geringen Mengen freizusetzen, während eine Stimulation mit 50 Hz oder TBS eine deutliche Sekretion von NT6myc bewirkte. Im Vergleich zur KCl-induzierten war die elektrisch induzierte Sekretion etwas geringer (statistisch nicht signifikant;

³² Die Reizantworten wurden mittels Patch-Clamp-Elektroden im Current-Clamp-Modus gemessen. Dabei wurde darauf geachtet, daß von einer morphologisch eindeutig identifizierbaren Pyramidenzelle abgeleitet wurde, deren Membranpotential zwischen -60 mV und -70 mV lag.

³³ Auch Neuronen in der Nähe der Enden der Feldelektroden, die durch das Zusammenlaufen der Feldlinien stärkeren Reizungen ausgesetzt waren, wurden nicht beschädigt.

³⁴ Eine Temperatur von 32 °C wurde gewählt, um bessere Vergleichsmöglichkeiten mit anderen elektrophysiologischen Experimenten zu haben, die konventionell bei 32 °C durchgeführt werden.

$p > 0,05$). Die basale NT6myc-Freisetzung ist bei 32°C, vergleichbar mit der bei 15°C nachgewiesenen, ebenfalls sehr gering. Allerdings ist die KCl-induzierte Freisetzung durch die erhöhte Temperatur erwartungsgemäß etwas stärker (siehe Tabelle 1 und Abb. 3.17).

Auch nach elektrischer Reizung wurden keine weiteren Ortspräferenzen der Freisetzung deutlich; die Verteilung der IR ist vergleichbar diffus über die Neuriten verteilt wie nach KCl Stimulation (Bilder werden nicht gezeigt, da das Ergebnis qualitativ vergleichbar mit den in Abb. 3.10 dargestellten Daten ist).

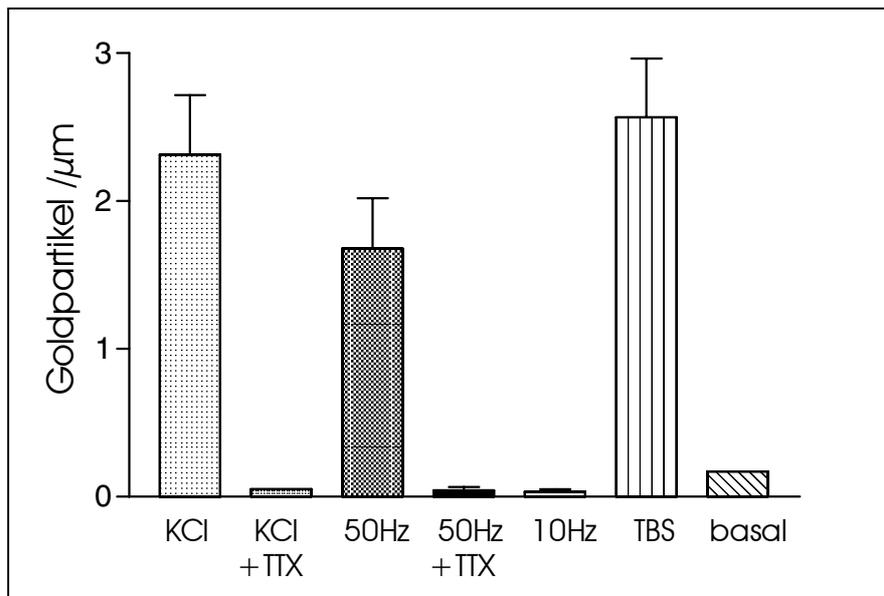


Abb. 3. 17: Quantifizierung der NT6myc-Freisetzung aus Neuriten nach Stimulation mit definierten elektrischen Stimulismustern. Der Mittelwert dreier unabhängiger Experimente ist dargestellt. Insgesamt wurden für jede experimentelle Gruppe fünf Experimente durchgeführt, die allerdings nicht alle in die Zählung einbezogen wurden, aber alle sehr deutlich zeigen, daß die Freisetzung durch 50Hz Pulse (und TBS), aber nicht durch 10Hz-Pulse induziert werden kann. Sowohl KCl als auch elektrisch induzierte NT6myc Freisetzung kann durch TTX

blockiert werden (für den Basalwert und die Blockierung der KCl stimulierten Freisetzung wurde jeweils nur ein Experiment ausgezählt, um als Vergleich zu dienen; auf eine weitere Auszählung wurde verzichtet, da hier der Schwerpunkt auf der elektrisch stimulierten Freisetzung liegt; allerdings wurden diese Experimente ebenfalls fünfmal durchgeführt und ergaben qualitativ gleiche Ergebnisse). Daten in Tabelle 2.

Tabelle 2: Quantitative Analyse der Oberflächenmarkierung von Neuriten nach Immunogoldzytochemie; Vergleich verschiedener elektrischer Stimulismuster.

	KCl M ± SEM	50Hz M ± SEM	50Hz + TTX M ± SEM	10 Hz M ± SEM	TBS M ± SEM
Anzahl Goldpartikel gesamt je Experiment (n=12)	1223 ± 890	691 ± 286	11 ± 6	5,7 ± 3,7	747 ± 2
Membranlänge gesamt in µm je Experiment (n=12)	467 ± 322	531 ± 224	257 ± 42	311 ± 43	298 ± 48
Goldpartikel/ µm (n=3)	2,31 ± 0,40*	1,68 ± 0,34*	0,04 ± 0,02	0,03 ± 0,02	2,57*

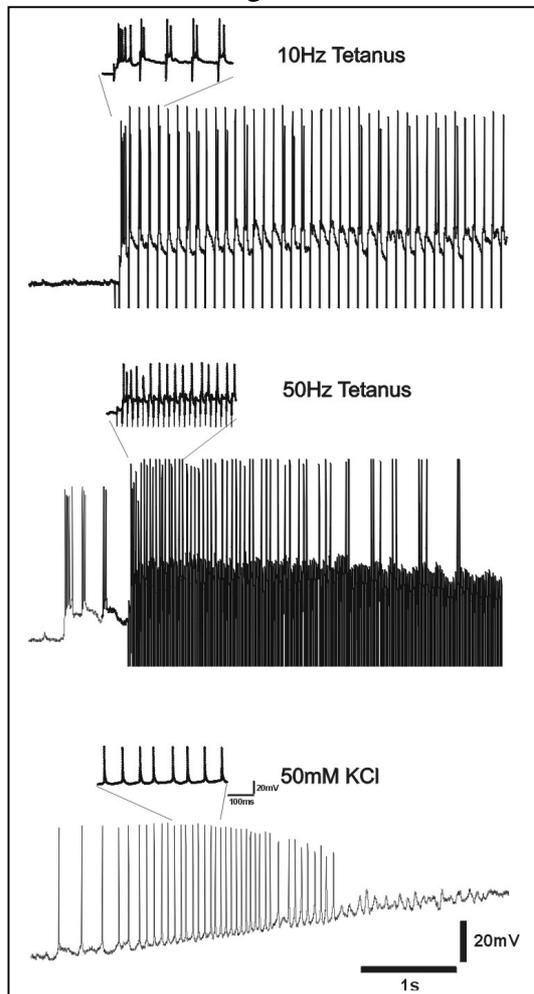
Es werden jeweils die zusammengefaßten Werte von drei (TBS nur 2 Experimente) unabhängigen Experimenten gezeigt. Die Mittelwerte (M) ± Standardabweichung (SEM) werden gezeigt.

*statistisch signifikante Unterschiede (Goldpartikel/µm; $p < 0,05$) Vergleich zu einer Stimulation mit 10Hz (vorletzte Spalte).

3.4.3 Die NT6myc-Freisetzung ist abhängig von der Frequenz der evozierten Aktionspotentiale

Ein unerwartetes Ergebnis war, daß ein 10 Hz Stimulus überhaupt keine Sekretion von NT6myc bewirkte. Anscheinend muß eine bestimmte Reizfrequenzschwelle überschritten werden, um

eine Freisetzung zu induzieren. In Kontrollexperimenten wurden die Reizantworten von Neuronen auf die unter 3.4.2 beschriebenen Reize durch intrazelluläre („whole cell“) Patch-Clamp-Ableitungen kontrolliert. Die Zellen reagieren auf jeden Stimulus des hochfrequenten Reizes mit einem Aktionspotential (Abb. 3.18). Allerdings kommt es nach einer anfänglichen Salve von Aktionspotentialen, die der Stimulusfrequenz folgen, in den meisten Zellen zur Blockierung der Reizantwort. Der Grund könnte in der Inaktivierung spannungsabhängiger Natriumkanäle liegen³⁵. Insofern scheint eine ca. 5-10 Sekunden andauernde Abfolge von



Aktionspotentialen einer Frequenz von 50 Hz auszureichen, um eine Neurotrophin-Freisetzung zu induzieren. Die Stimulation mit 50 mM KCl erzeugt in den Neuronen ebenfalls eine kurze Salve von ca. 20-100 Aktionspotentialen (abhängig von der Geschwindigkeit der KCl Applikation), bis die Zellen in einem stark depolarisierten Zustand keine Aktionspotentiale mehr auslösen können, wahrscheinlich weil spannungsabhängige Natriumkanäle blockiert werden.

Abb. 3.18: Elektrophysiologische Reizantworten hippocampaler dissoziierter Neuronen während einer Stimulation mit Feldelektroden. Einzelne, morphologisch deutlich als Pyramidenzellen identifizierbare Neuronen wurden mit Patchelektroden (im Current-Clamp-Modus) intrazellulär abgeleitet, während die gesamte Kultur mit Feldelektroden oder KCl stimuliert wurde. Die Reizantworten wurden in den kleineren oberen Abb. jeweils vergrößert dargestellt. Die nach unten verlaufenden Signale sind Artefakte, die durch die elektrischen Stimulationssignale entstehen, während die nach oben verlaufenden Signale den Reizantworten entsprechen und der Stimulusfrequenz in den ersten Sekunden sehr gut folgen.

Wurden die Neuronen mit 50mM KCl in Gegenwart von $1\mu\text{M TTX}$ ³⁶ stimuliert, dann wurde zwar die Auslösung von Aktionspotentialen verhindert, aber die Zellen wurden trotzdem depolarisiert (Abb.

3.19B). Unter diesen Umständen wurden keine Neurotrophine freigesetzt (Abb. 3.17, weitere eigene Beobachtungen, Blöchl und Thoenen, 1995). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß eine Depolarisierung der Neuronen allein nicht ausreichend für die Neurotrophin-Sekretion ist, sondern daß eine bestimmte Anzahl an Aktionspotentialen dazu notwendig ist. Die durch 50 Hz Pulse induzierte NT6myc-Sekretion wurde ebenfalls durch $1\mu\text{M TTX}$ blockiert (Tabelle 2; Abb. 3.17); ein weiterer Hinweis darauf, daß die stimulationsinduzierte Neurotrophin-Freisetzung durch Aktionspotentiale induziert wird. Da durch TTX die Neurotrophin-Freisetzung vollständig inhibiert wurde, ist dieses Experiment zugleich ein sehr gutes Kontrollexperiment und zeigt, daß durch die Stimulation per se keine toxischen Effekte ausgelöst werden, die eine artifizielle Freisetzung bewirken, denn diese sollten nicht durch TTX blockiert werden. Da durch eine Stimulation der Neuronen mit 10 Hz Pulsen auch über mehrere Minuten keine Neurotrophine

³⁵ Bei TBS Reizen sollten demnach mehr Aktionspotentiale ausgelöst werden, da die 100 Hz Pulse durch 200 ms unterbrochen werden. Trotzdem war kein Unterschied zwischen TBS- und 50 Hz induzierter Freisetzung nachweisbar.

³⁶ TTX: Tetrodotoxin, inhibiert spannungsabhängige Natriumkanäle

freigesetzt wurden, ist dazu wahrscheinlich eine definierte Stimulationsfrequenz und damit eine bestimmte Frequenz von Aktionspotentialen notwendig. Weiterhin läßt sich aus diesem Experiment schließen, daß eine kurze Salve von Aktionspotentialen von wenigen Sekunden für die Induktion der Neurotrophin-Freisetzung ausreicht.

Zusammenfassend läßt sich schließen, daß eine Abfolge nur relativ weniger Aktionspotentiale mit einer Mindestfrequenz (zwischen 10 und 50 Hz) notwendig für die Neurotrophin-Freisetzung ist.

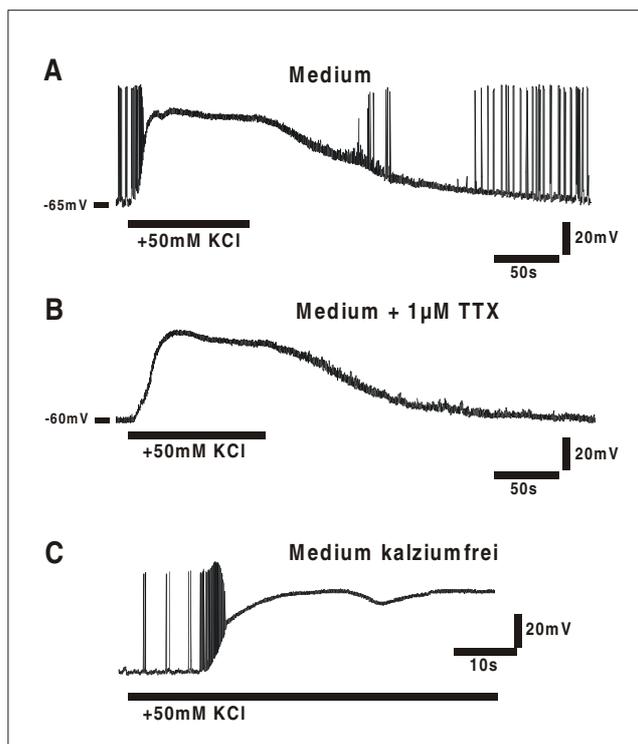


Abb. 3.19: Reizantwort hippokampaler Neuronen während einer Stimulation mit KCl. Einzelne, morphologisch deutlich als Pyramidenzellen identifizierbare Neuronen wurden mit Patchelektroden (im Current-Clamp-Modus) intrazellulär abgeleitet, während die gesamte Kultur mit 50 mM KCl stimuliert wurde (der Pufferaustausch erfolgte in einer Durchflußkammer mit einer Geschwindigkeit von 0,5 ml pro min).

A: Eine Stimulation mit 50 mM KCl löst eine kurze Abfolge von Aktionspotentialen aus, bis in einem depolarisierten Zustand die spannungsabhängigen Natriumkanäle deaktiviert werden und die Zelle in einem depolarisiertem Zustand verharrt, bis die KCl Konzentration auf Normalwerte von ca. 5 mM zurückgeht (Zeitverzögerung auf Grund des Totvolumens in der Kammer und der Zeit bis zum vollständigen Pufferaustausch).

B: Neuronen, deren spannungsabhängige Natriumkanäle bereits während der KCl-Applikation durch TTX inhibiert sind, werden zwar durch das veränderte Ionengleichgewicht depolarisiert, können aber keine Aktionspotentiale mehr auslösen.

C: Eine Applikation von 50 mM KCl in

Abwesenheit extrazellulären Kalziums verhindert weder die Depolarisation der Neuronen noch die Auslösung von Aktionspotentialen.

3.4.4 Mögliche Mechanismen zur differentiellen Neurotrophin-Freisetzung

Obengenannte Experimente werfen die Frage auf, wie die Zellen die Aktionspotential-Frequenzen „übersetzen“, um spezifisch mit Neurotrophin-Freisetzung oder nicht zu reagieren.

Da ein Natriumeinstrom per se keine Neurotrophin-Freisetzung bewirkt (Hoener et al., persönliche Mitteilung), kann die Freisetzung nicht einfach durch den Natriumeinstrom während eines Aktionspotentials erklärt werden; auch die Frequenzabhängigkeit wäre durch einen Natriumeinstrom allein nicht erklärbar. Wahrscheinlicher ist es, daß je nach Aktionspotential-Frequenz unterschiedliche Zellantworten, z.B. unterschiedliche Signaltransduktionskaskaden, ausgelöst werden. Alternativ könnte die Neurotrophin-Sekretion auch indirekt über eine differentielle Glutamatfreisetzung vermittelt werden. Allerdings bliebe dann die Frage bestehen, über welche Mechanismen Unterschiede in der Glutamatfreisetzung induziert werden.

Da die Neurotrophin-Freisetzung von der Verfügbarkeit von Kalzium aus intrazellulären Speichern abhängig ist, wurde zunächst überprüft, ob verschiedene Stimulationsfrequenzen Unterschiede im Kalziumeinstrom verursachen. Die Kalziumeinströme nach Stimulation mit 10 Hz oder 50 Hz waren in der Regel vergleichbar: ein sehr schneller Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration und ein langsames Absinken der Konzentration. In einigen Neuronen war

der Kalziueinstrom nach einer 50 Hz Stimulation etwas schneller als bei 10 Hz, allerdings waren die Kalziumsignale heterogen: In manchen Neuronen wurden Kalziumwellen ausgelöst, in anderen nahm die Kalziumkonzentration nach einem schnellen Anstieg sehr langsam ab. Da für die Freisetzung von Neurotrophinen die Mobilisierung von Kalzium aus intrazellulären Kalziumspeichern von Bedeutung ist, wurde der Kalziueinstrom aus diesen Speichern während verschiedener Stimulationen untersucht. Dazu wurde entweder das extrazelluläre Kalzium völlig entfernt (unter Zugabe eines Kalziumchelators, BAPTA) oder auf 5 μM reduziert. Als Kontrollstimulus für diese Versuche wurde Glutamat verwendet, welches über metabotrope Glutamatrezeptoren die Freisetzung von Kalzium aus IP_3 sensitiven Speichern stimuliert. Auch hier wurden sehr heterogene Kalziumsignale gemessen. In den meisten Fällen gab es weder nach Stimulation mit 10 Hz noch nach 50 Hz Stimulation einen Kalziueinstrom. In den Experimenten, wo ein Kalziueinstrom stattfand, wurde er durch 50 Hz Pulse aber nicht durch 10 Hz Pulse ausgelöst³⁷.

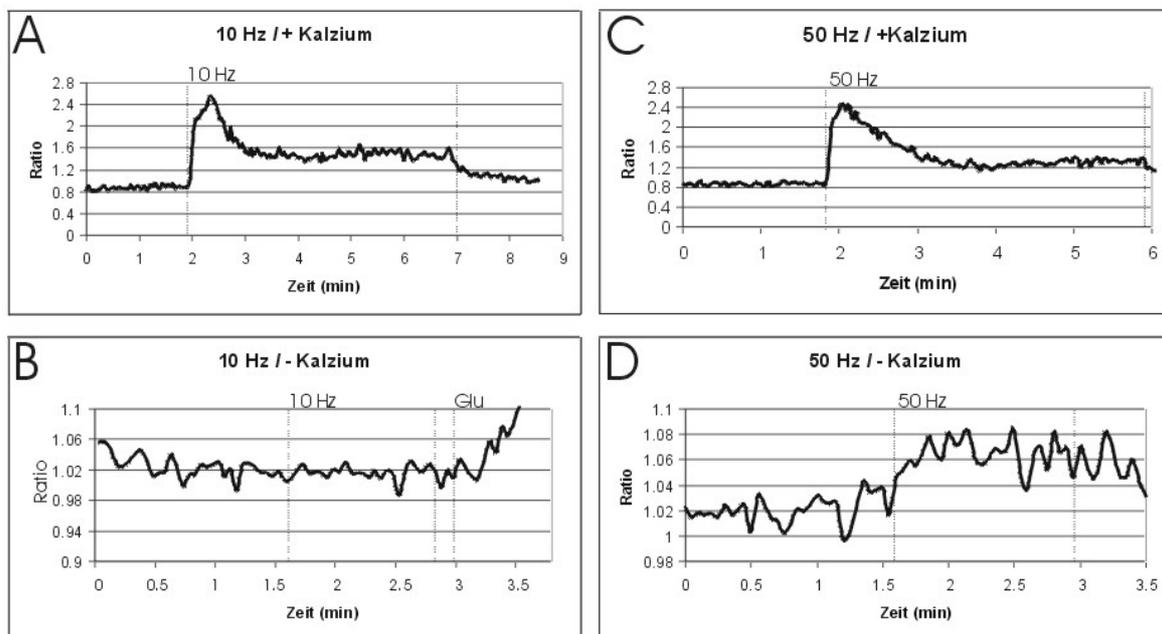


Abb. 3.20: Kalziueinstrom während der Stimulation hippocampaler Neuronen mit Feldelektroden. Zeitverlauf des Kalziumanstiegs in 10 Tage alten hippocampalen Neuronen: dargestellt ist das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten (340/380 nm = Ratio, Y-Achse), welches ein Maß für die Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration ist. **A:** Stimulation mit 10 Hz Pulsen in Gegenwart und **B:** in Abwesenheit extrazellulären Kalziums. In **B:** wurde als Kontrolle mit Glu stimuliert. **C:** Stimulation mit 50 Hz Pulsen ebenfalls in Gegenwart und **D:** Abwesenheit extrazellulären Kalziums.

³⁷ Es wurden nur Experimente berücksichtigt, in denen Glutamat einen Kalziueinstrom bewirkte.

Vorläufige Experimente zeigten, daß eine Stimulation der Zellen mit 50 Hz in Abwesenheit extrazellulären Kalziums eine NT6myc-Freisetzung induziert, die allerdings geringer als in Gegenwart von Kalzium ist. Erst nach zusätzlicher Komplexierung des intrazellulären Kalziums (BAPTA-AM) wurde die Freisetzung blockiert. Diese Experimente deuten darauf hin, daß bei 50 Hz Stimulation ein für die Neurotrophin-Freisetzung ausreichende Kalziummobilisierung aus intrazellulären Speichern stattfindet.

3.4.5 Physiologische Relevanz frequenzabhängiger Neurotrophin-Freisetzung

Von physiologischer Relevanz wären vorangegangene Ergebnisse, wenn Neurotrophin-freisetzende (bzw. nichtfreisetzende) Stimuli mit definierten Zellantworten korreliert wären. Die Induktion von LTP oder LTD in hippocampalen Schnitten ist zum Beispiel abhängig von der Frequenz des induzierenden Stimulus und der Gegenwart von BDNF (Kinoshita, 1999). Eine Möglichkeit, Modifikationen der synaptischen Transmission in unserem System dissoziierter hippocampaler Zellen zu untersuchen und mit den vorangegangenen Experimenten zur Neurotrophin-Freisetzung zu korrelieren, ist die Messung der Verstärkung oder Abschwächung synaptischer Übertragung nach Stimulation. Dazu wurden hippocampale dissoziierte Kulturen mit Feldelektroden stimuliert und die Änderung synaptischer Eigenschaften über die Messung der Miniaturströme³⁸ vor und nach der Stimulation beobachtet. Es wurden zunächst die Veränderung der mEPSC-Frequenzen durch 10 Hz und 50 Hz Stimuli untersucht. Die Neuronen wurden in Gegenwart von 50 µM Picrotoxin und 5 nM TTX für eine Minute stimuliert. Unter diesen Bedingungen sind Aktionspotentiale noch induzierbar, Aktionspotentiale durch spontane Transmission sind stark reduziert und die inhibitorische Transmission ist blockiert. mEPSC wurden 10 min vor bis 30 min nach Stimulation aufgenommen.

In einigen vorläufigen Experimenten, die allerdings statistisch noch nicht auswertbar sind, wurden folgende Beobachtungen gemacht: In einigen Fällen kam es nach 50 Hz Stimulation zu einer Erhöhung der mEPSC Frequenz, während 10 Hz Stimuli eine Verringerung dieser Frequenz bewirkten (Abb. 3.21 zeigt 2 Beispiele). Allerdings wurden in manchen Zellen keine signifikanten Veränderungen in der mEPSC Frequenz bemerkt. Wenn es nach 50 Hz Stimulationen zur Verringerung der Frequenz kam, dann war diese Depotenzierung meist weniger stark ausgeprägt, als nach einer 10 Hz Stimulation. Eine Potenzierung durch 10 Hz Stimulation wurde in keinem Falle beobachtet. Bei diesen Untersuchungen wurden Pyramidenzellen nach rein morphologischen Kriterien ausgewählt, deshalb ist es eventuell möglich, daß die Heterogenität der Antworten durch verschiedenen Subgruppen von Neuronen verursacht wird.

³⁸ Miniaturströme: mEPSC miniature excitatory postsynaptic currents, sind die Ströme, die nach Inhibition GABAerger (Picrotoxin oder Bicucullin) und spontaner (AP-abhängiger) Freisetzungseignisse (TTX oder Lidocain) gemessen werden. Die Frequenz dieser Ströme repräsentieren die Freisetzungswahrscheinlichkeit synaptischer Vesikel; ihre Amplitude ist ein Maß für die Sensitivität der postsynaptischen Seite, wobei diese strenge Unterscheidung zwischen post- und präsynaptischen Phänomenen mittels quantaler Analysen umstritten ist.

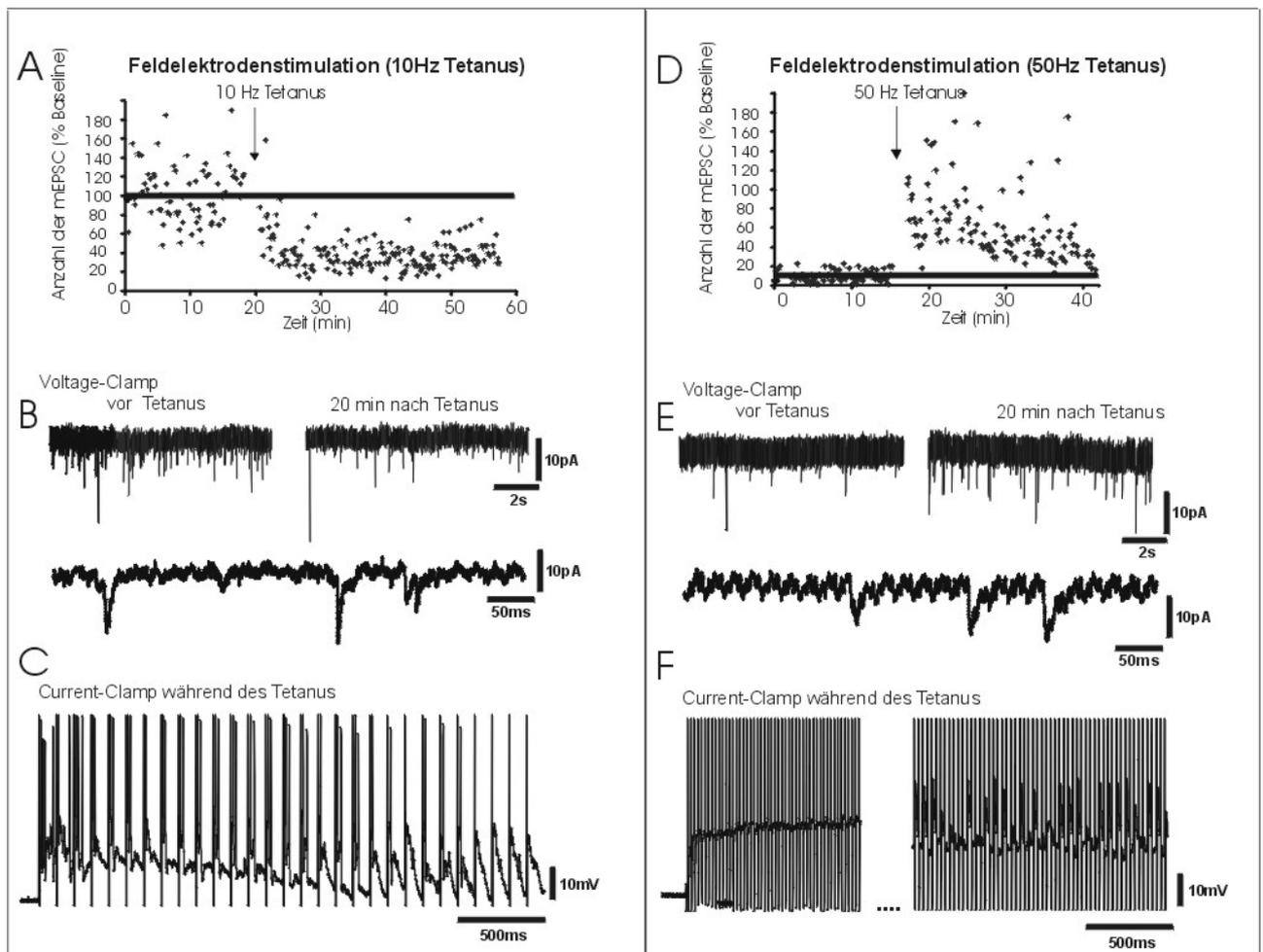


Abb. 3.21: Analyse der Miniaturströme nach Stimulation hippocampaler Neuronen mit Feldelektroden. Hippokampale Neuronen nach 10 Tagen Kultivierung wurden für eine Minute mit 10 Hz oder 50 Hz Pulsen stimuliert. Ab 10 min vor der Stimulation bis 20 min danach wurde die Anzahl der mEPSCs ermittelt. **A/D:** Der zeitliche Verlauf der Änderung der Anzahl der mEPSCs (in % bezogen auf das Hintergrundsignal) zeigt eine Abnahme nach 10 Hz Stimulation und Zunahme der mEPSCs nach 50 Hz Stimulation. **B/E:** Beispiele für die gemessenen mEPSC-Signale vor und nach tetanischer Stimulation; die Form der mEPSC ist in der unteren Darstellung durch die höherer Zeitauflösung besser zu erkennen. **C/F:** Während des Stimulus wurden die Zellen im Current-Clamp-Modus gehalten, da im Voltage-Clamp-Modus keine Aktionspotentiale ausgelöst werden können. Diese Abb. veranschaulicht noch einmal die Reizantwort der Zellen auf die 10 Hz bzw. 50 Hz Pulse.

4 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Wirkung von Neurotrophinen in Prozessen aktivitätsabhängiger neuronaler Plastizität unter besonderer Berücksichtigung ihrer räumlichen und zeitlichen Verfügbarkeit bei definierten physiologischen Bedingungen zu untersuchen. Neurotrophine, Proteine mit hoher spezifischer biologischer Aktivität, werden unter physiologischen Bedingungen in solch geringen Mengen exprimiert und freigesetzt, daß ihre Überexpression in den meisten Fällen notwendig ist, um sie nachweisen zu können. In vielen Untersuchungen wurden Neurotrophine exogen zugegeben (z.B.: Lessmann et al., 1994; Schuman et al., 1996; Patterson et al., 1996) und ihre synapsenmodulierende Wirkung untersucht. Um den intrazellulären Transport und die Freisetzung von Neurotrophinen zu untersuchen, ist allerdings ihre Expression in Neuronen notwendig. Außerdem muß in Betracht gezogen werden, daß von den Neuronen exprimierte Neurotrophine in Prozessen der synaptischen Plastizität anders wirken als exogen applizierte, da ihre Wirkung von ihrer lokalen Freisetzung abhängig ist, deren Regulation ein entscheidender Schritt in ihrer Wirkungsweise darstellt. Deshalb entschieden wir uns für eine Überexpression der entsprechenden Neurotrophine mittels viraler Vektoren. Neben der einfachen Überexpression von Transgenen bietet diese Methode eine Vielzahl von Vorteilen gegenüber anderen genetischen und molekularbiologischen Ansätzen. Mit dieser Gentransfermethode ist es möglich, Transgene räumlich und zeitlich kontrolliert in postmitotischen Zellen unter definierten Bedingungen *in vitro* und *in vivo* zu exprimieren. Dabei muß ausgeschlossen werden, daß die Transduktion an sich die physiologischen Parameter beeinflusst, die untersucht werden sollen. Durch spezifische Überexpression oder das Ausschalten bestimmter Gene an definierten Stellen und zu bestimmten Zeiten durch virale Gentransfermethoden kann die Beteiligung weiterer Genprodukte an Prozessen synaptischer Übertragung und neuronaler Plastizität untersucht werden. Weiterhin kann diese Methode *in vivo* Studien an transgenen Mäusen ersetzen oder sehr gut ergänzen, da Gene lokal und zu bestimmten Zeiten während der Entwicklung an- oder ausgeschaltet werden können (z.B. durch den Einsatz von Cre-Rekombinase exprimierenden Adenoviren in loxP transgenen Mäusen; Anton und Graham, 1995).

4.1 Gentransfer in postmitotische Neuronen

Aus oben genannten Gründen wurde im Rahmen dieser Arbeit nach Methoden gesucht, Transgene effektiv, kontrolliert und möglichst ohne toxische Nebeneffekte in Neuronen zu exprimieren.

Der Gentransfer in postmitotische, differenzierte Neuronen ist technisch problematisch, aber von solch großer Bedeutung für die therapeutische Forschung und Grundlagenforschung, daß alternative Möglichkeiten zu den bekannten (für Neuronen sehr ineffizienten) DNA Transfektionsmethoden gesucht wurden. Ein partikelvermittelter Gentransfer, bei dem DNA, an Goldpartikel adsorbiert, mit hohem Druck auf das Gewebe geschossen wird, konnte erfolgreich bisher nur in Frettschennuronen angewendet werden (Lo et al., 1994). DNA oder RNA Mikroinjektionen in Einzelzellen ist eine für biochemische Untersuchungen zu aufwendige Methode, aber durchaus für elektrophysiologische Studien geeignet, zumal die Neuronenselektivität gewährleistet ist und nichttransfizierte von transfizierten Zellen unterschieden werden können. Die Anwendung viraler Gentransfermethoden ist zur Zeit die erfolgreichste und eine stark expandierende Methode.

Bevor die in dieser Arbeit verwendeten und für unsere speziellen Anwendungen etablierten viralen Gentransfermethoden bezüglich ihrer Anwendbarkeit diskutiert werden, soll ein kurzer Überblick über die zur Zeit verwendeten Virusvektoren für den neuronalen Gentransfer gegeben werden.

4.1.1 Viral vermittelter Gentransfer in neuronale Gewebe

Folgende Anforderungen werden an ein Virussystem gestellt, mit dem Neuronen transduziert werden sollen:

1. Eine effektive Transduktion postmitotischer Neuronen sollte möglich sein (wenn möglich sollten die Viren neuronenselektiv sein).
2. Die Vektoren sollten eine Expressionskassette übertragen können, d.h. eine Aufnahmekapazität für Fremd-DNA verschiedener Größen besitzen.
3. Die Handhabung der Virusvektoren sollte relativ einfach sein (einfache Herstellung der Konstrukte, Aufreinigung der Viren zu hohen Titern sollte möglich sein, die aufgereinigten Viruspartikel sollten stabil und über längere Zeiträume lagerbar sein).
4. Die Expression der übertragenen Transgene sollte in einem dem Experiment entsprechenden zeitlichen Rahmen geschehen (in manchen Anwendungen ist eine möglichst schnelle Expression, in anderen eine möglichst langanhaltende und stabile Expression notwendig).
5. Die Stärke der Expression sollte kontrollierbar sein (das ist in manchen Fällen durch den Virustiter oder durch die Zeit der Transduktion möglich).
6. Die Transduktion sollte keine zytotoxischen Effekte hervorrufen und die Physiologie der untersuchten Zellen nicht verändern. Die zelleigene Proteinbiosynthese sollte nicht beeinflusst werden.
7. Die Anwendung der Viren sollte sicher sein (keine humanpathogenen Viren; in der Regel werden replikatinsdefiziente Viren hergestellt, deren Wildtypviren können in manchen Fällen als Nebenprodukte entstehen und sollten somit auch sicher für den Experimentator sein).
8. Bei *in vivo* Anwendungen sollten möglichst keine immunologischen antiviralen Reaktionen ausgelöst werden.

In Tabelle 4.1 werden die am häufigsten verwendeten viralen Vektoren unter diesen Gesichtspunkten vorgestellt.

Eine Anwendung retroviraler Vektoren ist in postmitotischen Zellen nicht möglich; allerdings wurden in letzter Zeit lentivirale Vektoren entwickelt, die postmitotische Neuronen transduzieren können (Naldini et al., 1996). Eine stabile Integration der Transgen DNA ins Wirtsgenom kann auch mit Hilfe adenoassoziierter Viren (AAV; Kotin, 1994*) erreicht werden, die allerdings den Nachteil haben, schwierig und nur in geringen Titern herstellbar zu sein. Eine Anwendung von HSV-Viren ist dann sinnvoll, wenn große Transgene übertragen werden sollen, ansonsten - trotz einer hohen Selektivität für Neuronen - durch die recht hohe Toxizität in der Anwendung limitiert (Leib und Olivio, 1993*). Die Verwendung von Vaccinia Viren für Transduktion von Neuronen wurde von einigen Gruppen beschrieben (z.B. Mowla et al., 1999), allerdings werden bei dieser Transduktion sehr schnell virale mRNAs in großer Menge hergestellt, und die zelleigene Proteinsynthese inhibiert (Moss, 1987).

Wir entschieden uns aus verschiedenen, unter 4.1.2 diskutierten, Gründen für die Verwendung von Adeno- und Sindbisviren für unsere Experimente.

wichtigste virale Vektoren für den Gentransfer in postmitotische Neuronen

	Herpes Simplex Virus (HSV)	Adenovirus (AdV)	Adenoassoziierter Virus (AAV)	Sindbisvirus
Virusgenom	lineare ds DNA	lineare ds DNA	ss DNA (+) oder (-)	(+) Strang - RNA
Wirtsspezifität	bevorzugt Neuronen, aber auch andere Zellen	Neuronen, aber bevorzugt Gliazellen; andere Zelltypen	Neuronen, aber auch andere Zellen	abhängig von der Art des Helfervirus, mit DH(26S) neuronenselektiv
Aufnahmekapazität für Fremd DNA	rekombinanter Virus: <30 kb Amplikon [#] : <15 kb	<7,5 kb helfervirusabhängiges System [§] : bis 37 kb	<5 kb	ca. 8 kb (mündliche Angabe des Herstellers)
Titer gereinigter Viruslösungen	niedrig	hoch	niedrig	hoch
Integration in die Wirts-DNA	nein, episomal	nein, episomal	gezielte Integration	nein
Toxizität in transduzierten Zellen	toxischer als Adenovirus	niedrige Toxizität, je nach Titer und Zeit der Expression	niedrige Toxizität	unzureichend untersucht, Kurzzeitexpression ohne toxische Effekte möglich
Helfervirus benötigt	rekombinanter Virus: nein Amplikon [#] : ja	AdV erster Generation: nein; aber benötigt in Vektoren mit hoher Kapazität für Transgene [§]	ja, aber AAV kann vom Helfervirus getrennt gereinigt werden	ja, aber Helfervirus wird nicht verpackt und nicht ins Medium abgegeben
Potentielle Gefährdung für Menschen	rekombinanter Virus: hoch Amplikon [#] : niedrig	niedrig	niedrig	niedrig

Tabelle 4.1: Die wichtigsten Eigenschaften viraler Vektoren zusammengefaßt (aus: Karpati et al., 1996*; Slack und Miller, 1996*; Ehrengruber et al., 1999). #: Amplikons enthalten neben der Expressionskassette nur die minimal notwendigen Sequenzen, wie den HSV-Replikationsursprung und HSV-Verpackungssequenzen. §: Seit einiger Zeit werden helfervirusabhängige Konstrukte für die Expression großer Transgene und für *in vivo* Studien verwendet (Clemens et al., 1996). Diese Vektoren enthalten nur die Verpackungssequenzen und besitzen eine hohe Kapazität für die Aufnahme von Transgenen. Die essentiellen Funktionen für die Virusreplikation und die Verpackung der Viren werden von Helferviren übernommen, wobei eine anschließende vollständige Trennung von Helferviren und transgenenthaltender Viren bislang problematisch ist. Mit diesen Vektoren können gleichzeitig immunologische Reaktionen in *in vivo* Studien verhindert werden.

ds: doppelsträngig; ss: einzelsträngig

4.1.2 Vergleich adenoviraler Vektoren und Sindbisviren für den neuronalen Gentransfer unter definierten experimentellen Bedingungen

Adenovirale Vektoren, die sowohl für die Kurzzeitexpression von Transgenen (z.B. Griesbeck et al., 1996) aber auch langanhaltende Genexpression (z.B. Wilkemeyer et al., 1996) in Neuronen *in vitro* und *in vivo* verwendet wurden, können in sehr hohen Titern produziert werden und stellen für den Experimentator ein sehr sicheres System dar. Die Transduktion von Neuronen unter Kulturbedingungen ist sehr effizient, je nach Titer und Expressionszeit bis zu 100 %, möglich (Griesbeck et al., 1996). Problematisch ist für manche Anwendungen die höhere Selektivität adenoviraler Vektoren zu Gliazellen. Der Anteil an Gliazellen in unseren hippokampalen Primärkulturen wurde deshalb durch die Wahl der Kulturbedingungen, vor allem durch die Verwendung serumfreien Mediums mit definierten Zusätzen, gering (ca. 10 %) gehalten, so daß Neuronen sehr effizient transduziert wurden (Abb. 3.4A). Wurden allerdings die Neuronen in sehr hoher Dichte (300 000 Zellen pro 10 mm Deckgläschen) kultiviert, dann war die Menge an

Gliazellen insgesamt höher, womit der Anteil transduzierter Neuronen stark abnahm. Diesen Effekt konnten wir nach Transduktion mit einem AdVEGFP Kontrollvirus, aber auch nach Transduktion mit den Neurotrophin-exprimierenden Viren und anschließender Immunofärbung feststellen. Gliazellen wurden nicht nur in größerer Anzahl transduziert, sondern exprimierten das Transgen auch sehr viel stärker als Neuronen. Dieser Effekt erschwert zusätzlich den Nachweis von transduzierten Neuronen, da deren schwache Fluoreszenzsignale durch die starken Signale der Gliazellen „überstrahlt“ wurden. Dies wurde nach lokalen Transduktionen hippocampaler Schnittkulturen sehr deutlich. In Schnittkulturen, die nach Transduktion mit AdV5EGFP lokal GFP exprimierten, waren GFP-positive Neuronen kaum sichtbar (Abb. 3.4B/C); trotzdem konnte mit elektronenmikroskopischen Methoden gezeigt werden, daß in diesen Kulturen viele Neuronen transduziert waren (Abb. 3.16D/E).

Ein großer Vorteil adenoviraler Vektoren ist ihre Anwendbarkeit ohne toxische Nebeneffekte, wenn die Transduktionsbedingungen (Titer, Transduktionszeit) entsprechend etabliert werden. Wurden in unseren Experimenten hippocampale Zellen mit relativ hohen AdV-Titern (mit denen nach 24 h ca. 70 % der Neuronen transduziert wurden) transduziert, dann konnten erst nach drei Tagen zytotoxische Effekte festgestellt werden (Abb. 3.3). Die elektrophysiologischen Parameter waren nach 48 h noch unverändert (Abb. 3.6B). Langzeitexpressionen (bis zu zwei Wochen) mit adenoviralen Vektoren waren ebenfalls ohne zytotoxische Effekte durchführbar, allerdings mußten die Transduktionsbedingungen verändert werden: die Neuronen wurden mit zehnfach geringeren Titern für 16 h oder für 2 h mit hohen Titern transduziert. Eine Transgenexpression konnten wir bis zu zwei Wochen beobachten (Abb. 3.13B/C). In anderen Untersuchungen wurde eine Transgenexpression bis zu zwei Wochen in Kulturen (Wilkemeyer et al., 1996) und bis zu fünf Wochen *in vivo* (Kammesheidt et al., 1996) ohne toxische Effekte beobachtet. Allerdings interferieren AdV nach ca. 5 Tagen mit der zelleigenen Proteinbiosynthese (Easton et al., 1998), ein Effekt der sich nicht in direkt meßbaren physiologischen Veränderungen äußern muß.

Um eine Neuronenselektivität der Adenoviren zu erreichen, gibt es mehrere Ansätze. Eine Verwendung neuronenselektiver Promotoren (eigene vorläufige Versuche mit einem neuronenspezifischen Enolasepromotor; Hashimoto et al., 1996) oder die Verwendung von NRSE Sequenzen (neural-restriktive silencer element; Miyaguchi et al., 1999) erlaubt eine Transgenexpression nur in Neuronen. In letzter Zeit wurden viele Versuche durchgeführt, um die Wirtsspezifität von AdV einzuschränken oder zu verändern, indem das adenovirale Faserprotein (der AdV Rezeptor) genetisch manipuliert wird (z.B. Reynolds et al., 1999). Somit wäre theoretisch auch eine selektive Bindung viraler Kapside an neuronenspezifische Oberflächenrezeptoren möglich.

Eine sehr selektive Transduktion von Neuronen, sowohl in dissoziierten als auch in organotypischen Kulturen, konnten wir durch die Anwendung des Sindbisvirussystems (bei Verwendung des neuronenselektiven Helfervirus DH(26S)) erreichen (Abb. 3.4D-F). Sindbisviren wurden bereits für einige Untersuchungen, z.B. in hippocampalen Schnitten, angewandt (Maletic-Savatic et al., 1999), in denen noch drei Tage nach Transduktion eine LTP induziert werden konnte. Allerdings sind Sindbisviren bezüglich ihrer toxischen Effekte noch unzureichend untersucht, so daß die physiologischen Eigenschaften transduzierter Neuronen unter den jeweiligen experimentellen Bedingungen getestet wurden, zumal Sindbisviren durch die starke Produktion von mRNAs in kurzer Zeit mit der zelleigenen Proteinbiosynthese konkurrieren. Dadurch werden auch die Transgene schon nach sehr kurzer Zeit in hoher Konzentration produziert (siehe 3.1.2), was für Kurzzeitstudien von Vorteil sein kann, aber auch zu einer starken und schwer kontrollierbaren Expression führt (die Stärke AdV vermittelter Expression dagegen kann sehr gut über den Titer gesteuert werden). Allerdings konnten wir im Zeitrahmen unserer Experimente keine toxischen Schädigungen nachweisen. So waren passive Membraneigenschaften hippocampaler Neuronen nach 48 stündiger Transduktion noch

unverändert (Abb. 3.6B). Auch Aktionspotentiale konnten in diesen Zellen ausgelöst werden; in transduzierten Schnittkulturen konnte eine LTP normal induziert werden.

Insofern wird die Wahl des Virussystems in erster Linie von der Art des Experimentes abhängig sein: Für Experimente, in denen dissoziierte Neuronen (die effizient zu 70-100 % transduziert werden konnten) transduziert werden sollten oder für Langzeitexpressionen von Transgenen bevorzugt wird als Gentransfersystem, auf Grund ihrer geringen Toxizität, Adenoviren. Sollen in Kurzzeitstudien neuronenspezifisch Transgene in großer Menge exprimiert werden, dann ist das Sindbisvirussystem zu bevorzugen, vor allem für gliareiche Kulturen oder Schnitte. Allerdings ist die Anwendung der Sindbisviren dadurch limitiert, daß sie in kurzer Zeit mit der zelleigenen Proteinsynthese interferieren und eine sehr hohe Transgenexpression bewirken, die nur über die Expressionszeit zu kontrollieren ist.

4.2 *In vitro* System zur Untersuchung der Neurotrophin-Freisetzung

4.2.1 Hippokampale dissoziierte Primärneuronen: ein geeignetes experimentelles *in vitro* System für Studien zur regulierten Neurotrophin-Freisetzung

Viele der im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden mit Primärkulturen dissoziierter hippocampaler Neuronen durchgeführt, in denen individuelle Neuronen gut zu erkennen sind. Für die eindeutige Identifizierung der Freisetzungsorte von NT6myc war die Verwendung dissoziierter Neuronen unumgänglich, da nur auf diese Weise die Immunogoldmarkierungen an der neuronalen Oberfläche eindeutig mit den spezifischen Stellen der Neuronen in Verbindung gebracht werden konnten, von denen NT6myc sezerniert wurde. Diese Untersuchungen wären in einem organotypischen Kontext in dieser Weise nicht durchführbar, da während der Transduktionszeit freigesetztes NT6myc zu Beginn des Experimentes nicht vollständig von der Zelloberfläche entfernt werden könnte (weil der Zugang zum Extrazellulärraum in den Schnittkulturen durch Diffusion limitiert ist). Außerdem wäre durch die dichte Packung der Neuronen eine eindeutige Zuordnung der Oberflächen-IR zu den Freisetzungsorten nicht möglich. Zudem stellen adenoviral transduzierte, dissoziierte Neuronenkulturen ein sehr gutes experimentelles Modellsystem für die Untersuchung der Sortierung und Freisetzung von Neurotrophinen dar, da die aktivitätsabhängige Freisetzung von endogenem NGF (Blöchl und Thoenen, 1995) und BDNF (Griesbeck et al., 1999) aus akuten hippocampalen Schnitten keine Unterschiede zu der Freisetzung aus transduzierten dissoziierten Neuronen zeigte. Die intrazelluläre Verteilung von BDNFmyc war auf elektronenmikroskopischer Ebene in AdV5BDNFmyc transduzierten Schnittkulturen und dissoziierten Neuronen vergleichbar (Abb. 3.16): In beiden Kultursystemen wurde BDNFmyc IR in Axonen und Dendriten und in den gleichen intrazellulären Kompartimenten nachgewiesen.

Die Verwendung hippocampaler Primärkulturen ist zum einen dadurch begründet, daß viele Untersuchungen zu zellulären Phänomenen synaptischer Plastizität, wie LTP, an hippocampalen Synapsen durchgeführt wurden. Hippokampale dissoziierte Kulturen haben zudem den Vorteil, daß eine relativ homogene Population von Neuronen³⁹ präpariert wird, die eine charakteristische Morphologie zeigen. Außerdem können Pyramidenzellen untereinander synaptische Kontakte ausbilden, die auch *in vivo* zwischen diesen Neuronen etabliert werden (Goslin et al., 1998). Die von uns gewählte Kultivierungszeit von 10 Tagen ist ausreichend für die Ausbildung der neuronalen Polarität (Bartlett und Banker, 1984a,b; Dotti et al., 1988) und synaptischer Kontakte, die an den dendritischen Schäften und Spines lokalisiert sind und qualitativ nicht von denen *in situ* zu unterscheiden sind (Boyer et al., 1998). Die Dichte an Synapsen erhöht sich und

³⁹ 85 % bis 90 % der Zellen entsprechen Pyramidenzellen, außerdem sind einige Interneuronen vorhanden. Da der Gyrus Dentatus zum Zeitpunkt der Präparation noch nicht ausgebildet ist, sind diese Neuronen nicht in den Kulturen zu finden.

die Form der Spines⁴⁰ verändert sich nach längerer Kultivierung (Abb. 3.12/3.14D), so daß einige Experimente auch an älteren Kulturen (3-4 Wochen) durchgeführt wurden. Daß Neuronen auch unter Kulturbedingungen einige ihrer charakteristischen Eigenschaften vergleichbar zu denjenigen *in vivo* entwickeln können, wird durch zahlreiche Experimente belegt. Zum Beispiel wurde ein aktivitätsabhängiger spezifischer Transport von AMPA-Rezeptoren, aber nicht von NMDA-Rezeptoren, auch in hippocampalen dissoziierten Neuronen beobachtet (Carroll et al., 1999; Lissin et al., 1998). Dies ist in guter Übereinstimmung mit in hippocampalen Schnitten gewonnenen Daten und unterstützt die Hypothese, daß die LTP von der aktivitätsabhängigen Insertion von AMPA-Rezeptoren in vorher „stille“ Synapsen (silent synapses: Synapsen die nur NMDA-Rezeptoren und nicht AMPA-Rezeptoren exponieren) abhängig ist (Shi et al., 1999). Kultivierte Neuronen zeigen zum Teil auch „Entwicklungsphänomene“, die ontogenetische Veränderungen *in vivo* widerspiegeln. Beispielsweise ändert sich die Zusammensetzung der NMDA-Rezeptoren während der Entwicklung: In einem frühen Entwicklungsstadium wird ausschließlich die NR2B und später die NR2A Untereinheit exprimiert. Dieses Umschalten der Isoformen wurde auch *in vitro* in dissoziierten Neuronen beobachtet (Williams et al., 1993).

4.2.2 Neurotrophin-Freisetzung und Lokalisierung nach Überexpression im Vergleich zur physiologischen Situation

Eine adenoviral vermittelte Expression von Neurotrophinen war für viele unserer Experimente notwendig. Da β -Galaktosidase schon 4 h nach Transduktion mit AdV5lacZ (Abb. 3.6A) nachweisbar war, sollte die gewählte Transduktionszeit von 24-30 h ausreichend für die Expression und Sortierung der Neurotrophine sein, zumal sich das Verteilungsmuster der Neurotrophine auch nach einer längeren Transduktionszeit nicht veränderte (Daten nicht gezeigt). Nach einer Transduktion für 30 h war die Physiologie und Ultrastruktur der Neuronen unverändert (Abb. 3.6B, Abb. 3.10, Abb. 3.12 und Abb. 3.16). Die Überexpression der jeweiligen Neurotrophine verstärkte ihre Expression um ein Vielfaches der endogenen.

Diese starke Expression führte allerdings nicht zu einer Fehlverteilung in andere intrazelluläre Kompartimente, da die Freisetzung weiterhin aktivitätsabhängig und in allen untersuchten Charakteristika vergleichbar mit der Freisetzung endogen exprimierter Neurotrophine aus hippocampalen, nichttransduzierten Schnittkulturen war (Blöchl und Thoenen, 1995; Griesbeck et al., 1999). Allerdings wurden nach Transduktion verschiedener Zelllinien mit einem Vaccinia-Virussystem (Mowla et al., 1999) Unterschiede in der Verteilung und Freisetzung von NGF festgestellt, die abhängig von dem jeweiligen Expressionsgrad war. Mowla et al. (1999) schlossen aus diesen Experimenten, daß die Überexpression von NGF zu einer artifiziellen Sortierung von NGF in den regulierten Sekretionsweg führt (nach ihrer Hypothese wird NGF unter normalen Bedingungen, also bei niedriger Expression, nur konstitutiv freigesetzt). Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu unseren eigenen Beobachtungen (Blöchl und Thoenen, 1995; Griesbeck et al., 1999), aber auch zu Untersuchungen an stabil NGF exprimierenden PC12 Zellen, die zeigten, daß es keine Unterschiede in der Freisetzung und Verteilung von NGF gibt (Heymach et al., 1996). Diese PC12 Zell-Klone setzten, unabhängig von der Stärke der NGF Expression, NGF über einen regulierten Weg frei.

Weiterhin wurden NGF, NGFmyc, NT6myc und BDNFmyc nach adenoviral vermittelter Überexpression unter unseren Transduktionsbedingungen in hippocampalen Neuronen in den gleichen intrazellulären Kompartimenten lokalisiert (Abb. 3.7; für NT6myc und BDNFmyc auch auf EM-Ebene gezeigt: Abb. 3.16). Wurden diese Neuronen mit geringeren Virustitern transduziert, dann war die Transduktionseffizienz und auch die Neurotrophin-Expression pro Zelle niedriger, aber das Muster der intrazellulären Neurotrophin-Verteilung änderte sich nicht, bis die Expression zu gering wurde und mit immunocytochemischen Methoden nicht mehr

⁴⁰ Nach 7 Tagen waren längere filopodienförmige Spines und nach 3 Wochen kurze globuläre Spines nachweisbar, wenn diese Feinstrukturen mittels GFP sichtbar gemacht wurden.

nachweisbar war (Daten nicht gezeigt). Mowla et al. (1999) dagegen zeigten, daß die NGF-IR nach Transduktion hippokampaler Neuronen mit niedrigen Titern eines NGF-Vaccinia Virus im Perikaryon konzentriert war, während BDNF_{myc} auch in neuronalen Ausläufern nachweisbar war. Ihre Schlußfolgerung, daß NGF unter physiologischen Bedingungen ausschließlich konstitutiv und nicht reguliert freigesetzt wird, ist allerdings problematisch, denn auch für diese Experimente wurden die Neurotrophine um ein Vielfaches ihrer endogenen Konzentrationen überexprimiert, um die Detektionsschwelle der Nachweismethoden zu erreichen. Insofern wird eine Überexpression von Mowla et al. (1999) sehr artifiziell allein durch die Nachweisgrenze ihrer Experimente festgelegt. Es ist deshalb nicht gerechtfertigt, diese Experimente als „physiologischer“ einzustufen, zumal eine Transduktion mit Vaccinia-Viren in kurzer Zeit zu einer sehr massiven mRNA-Synthese führt. Diese viralen mRNAs kompetieren mit zelleigenen mRNAs um die Proteinsynthesemaschinerie, zusätzlich wird die zelleigene Proteinbiosynthese über einen weiteren Mechanismus direkt gehemmt (Moss, 1987). Dies könnte eventuell auch begründen, warum Mowla et al. (1999) sehr große Mengen an unprozessiertem BDNF-Vorläuferprotein in den Überständen transduzierter, nichtstimulierter Neuronen nachwies, was auf eine unzureichende Prozessierung hinweist. In unseren Experimenten konnte selbst nach 72 stündiger Transduktion mit Adv5NT6_{myc} kein unprozessiertes NT6 in den Zellüberständen nachgewiesen werden. Unprozessierte Neurotrophin-Moleküle wurden nach adenoviraler Transduktion mit Adv5NT ausschließlich in den Zellysaten nachgewiesen.

Auf Grund dieser vorliegenden Informationen erwiesen sich adenoviral transduzierte, dissoziierte Neuronenkulturen als geeignetes System, um die regulierte Neurotrophin-Freisetzung zu untersuchen, da sich unter den gewählten experimentellen Bedingungen keine Veränderungen physiologischer Funktionen ergaben, die mit den Untersuchungen interferieren sollten.

4.3 Untersuchungen zum Ort der Neurotrophin-Freisetzung

Neurotrophine können ihre biologische Wirkung nur nach ihrer Freisetzung, die hauptsächlich aktivitätsabhängig reguliert ist, entfalten. Sollte diese Freisetzung auf bestimmte zelluläre Strukturen beschränkt sein, wäre ein Mechanismus für eine ortsspezifische Neurotrophinwirkung gegeben, vorausgesetzt, daß die entsprechenden Neurotrophinrezeptoren an diesen Orten vorhanden sind.

4.3.1 Verwendung von NT6_{myc}

NT6 ist für die Untersuchung der Neurotrophin-Freisetzungsorte sehr geeignet, da es als einziges Neurotrophin nicht nur über elektrostatische Kräfte, sondern auch über die spezifische Interaktion mit HSPG (Götz et al., 1994) an die Zelloberfläche gebunden wird. Dadurch sollte NT6 sofort nach seiner Freisetzung an die HSPG der neuronalen Oberfläche binden, ohne vorher über größere Distanzen zu diffundieren. Hochaffine Rezeptoren (Trk) für NT6, die mit dieser HSPG-Bindung interferieren könnten, sind im Hippokampus nicht vorhanden. Die Verwendung von BDNF war für diese Untersuchungen nicht möglich, da auf der Oberfläche hippokampaler Neuronen in großer Menge TrkB-Rezeptoren exprimiert werden (Drake et al., 1999). Diese hochaffinen BDNF-Rezeptoren würden mit den unspezifischen elektrostatischen Interaktionen von BDNF zu anderen Oberflächenproteinen konkurrieren, und die BDNF-Lokalisierung nach der induzierten Freisetzung würde indirekt den Ort der Rezeptoren widerspiegeln. Die Bindung von BDNF an TrkB kann zudem eine rezeptorvermittelte Endozytose bewirken.

Obwohl NT6 sehr stark an die neuronale Oberfläche gebunden ist, kann es vollständig (Abb. 3.10B) und sehr schonend (die Ultrastruktur der Neuronen ist nach dem Waschen mit Heparin unverändert; vergleiche Abb. 3.10A/B) mit Heparin entfernt werden (Abb. 3.9B), so daß

spezifisch das NT6 nachgewiesen werden kann, welches durch die Stimulation freigesetzt wurde (vergleiche Abb. 3.10 B mit C/D). Heparin verhält sich in diesen Experimenten inert, da es weder Neurotrophine aus intrazellulären Kompartimenten freisetzen kann, noch mit der aktivitätsabhängigen Freisetzung interferiert (Abb. 3.9C).

Zu Beginn der Experimente lagen allerdings noch keine Daten vor, inwieweit NT6 sich vergleichbar zu den anderen Neurotrophinen verhält. Durch einen Vergleich der AS-Sequenz von NT6 mit den anderen Neurotrophinen (Abb. 1.4) ließ sich vermuten, daß NT6 ähnlich prozessiert, gefaltet und sezerniert wird, da die zwischen allen Neurotrophinen konservierten AS auch in NT6 konserviert sind, und zudem Sequenzen, die für die Prozessierung und die Expression eines aktiven Neurotrophin-Moleküls wichtig sind, in NT6 und NGF fast vollständig übereinstimmen. Diese Voraussagen ließen sich experimentell bestätigen, da NT6myc wie NGF und BDNF prozessiert, sortiert und reguliert freigesetzt wird (Abb. 3.7 und Abb. 3.8). Die drei Neurotrophine wurden in individuellen kotransduzierten Neuronen kolokalisiert (Abb. 3.7D-I).

Die Anfügung des myc-Epitopes an NT6 war wichtig, um das Molekül mit EM-Methoden nachzuweisen, da das myc-Epitop auch nach starker Fixierung, die für eine gute Strukturhaltung wichtig ist, noch antigen wirkt. Diese karboxyterminale Modifikation veränderte die Sortierung und Freisetzung von Neurotrophinen nicht (Abb. 3.7K/L; Möller et al., 1998; Griesbeck et al., 1999). Auch die biologische Aktivität wurde dadurch nicht vermindert (Klose, 1998).

4.3.2 Oberflächenfärbung von NT6myc nach regulierter Freisetzung

Diese Untersuchungen wurden an dissoziierten hippokampalen Neuronen durchgeführt, die in so geringer Dichte kultiviert wurden, daß eine Freisetzung von einzelnen Zellen aufgelöst werden konnte. Unter Berücksichtigung der Transduktionseffizienz von 70-80 % ergibt sich die Möglichkeit, auch differentielle Zellantworten nachzuweisen.

Mit unserer Methode zur Immunogoldoberflächenmarkierung wurde spezifisch nur freigesetztes NT6myc nachgewiesen. Kreuzreaktionen zu anderen Proteinen, einschließlich viral exprimierter Proteine, konnten ausgeschlossen werden, da das Immunogoldsignal sowohl auf AdV5NT6myc transduzierten Neuronen, deren Oberfläche mit Heparin gewaschen wurde, als auch auf AdV5lacZ transduzierten Neuronen vergleichbar sehr gering war (Tabelle 1). Auch eine Kreuzreaktivität zu Substanzen, die durch den Stimulus freigesetzt wurden, ist unwahrscheinlich, da auf Neuronen, die mit einem Kontrollvirus (AdV5lacZ) transduziert wurden, auch nach Stimulation kein Oberflächensignal erhalten wurde (Daten nicht gezeigt).

Prinzipiell ist es mit dieser Methode möglich, eine Freisetzung von allen Stellen entlang der neuronalen Oberfläche nachzuweisen. In Experimenten in denen NT6myc im Überschuß vorhanden war und die maximale Bindungskapazität für NT6myc ermittelt wurde⁴¹, konnte gezeigt werden, daß die myc-IR gleichmäßig über die Oberfläche der Neuronen verteilt ist und es keine sichtbaren Ortspräferenzen oder Substrukturen gab, die nicht markiert wurden (Abb. 3.10A). Das zeigt, daß die HSPG sehr homogen über die neuronale Oberfläche verteilt sind und somit in den Freisetzungsexperimenten Unterschiede der Oberflächengoldmarkierung tatsächlich auf einer ortsspezifischen NT6myc-Freisetzung beruhen.

Nach dreiminütiger Stimulation der Neuronen mit 50 mM KCl wurde ein deutliches Immunogoldsignal auf den Neuronenoberflächen nachgewiesen, welches den Ort und die Stärke der Freisetzung widerspiegelt (Abb. 3.10C/D; Tabelle 1). In den meisten Fällen wurden die Goldpartikel in Aggregaten und nicht einzeln gefunden. Die Depolarisation bewirkte einen

⁴¹ In diesen Experimenten wurden AdV5NT6myc transduzierte Neuronen vor der Fixierung nicht mit Heparin gewaschen und somit das gesamte während der Transduktionsphase auf der Zelloberfläche akkumulierte NT6myc nachgewiesen.

20 fachen Anstieg des Oberflächensignals, welches aber noch unter dem maximal möglichen lag, also die Bindungskapazität für NT6myc nicht erschöpfte.

4.3.3 Die Freisetzung von NT6myc erfolgt hauptsächlich von den Neuriten, aber ohne klare Ortsspezifität entlang der Neuriten

Nach Stimulation der Neuronen mit 50 mM KCl lokalisierten wir die NT6myc-IR hauptsächlich auf Neuriten im Vergleich mit Zellkörpern (Abb. 3.11/ Tabelle 1). Diese neuritenspezifische Freisetzung war für ein Molekül, welches Prozesse synaptischer Plastizität beeinflusst, nicht unerwartet und stimmte mit Experimenten überein, in denen mit geringerer lichtmikroskopischer Auflösung die Neurotrophin-Freisetzung von hippokampalen Neuriten gezeigt wurde (Blöchl und Thoenen, 1996). Auch für humanes GFP-Chromogranin wurden „docking“ Stellen meist entlang der Neuriten differenzierter PC12 Zellen gefunden, von denen es hauptsächlich freigesetzt wurde (Kaether et al., 1997).

Dendritische und axonale Freisetzung

Die Freisetzung wurde in unseren Experimenten sowohl aus Axonen als auch aus Dendriten nachgewiesen. Auch intrazellulär wurden Neurotrophine dendritisch und axonal lokalisiert (Abb. 3.15 B/C und Abb. 3.16). Da eine eindeutige Unterscheidung von Axonen und Dendriten auf Grund morphologischer Parameter auf EM-Ebene nicht immer möglich war, wurde auf eine quantitative Unterscheidung der NT6myc-Freisetzung von Axonen oder Dendriten verzichtet. In diesem Zusammenhang ist es von Interesse zu untersuchen, ob und unter welchen Bedingungen die Neurotrophin-Freisetzung selektiv von Axonen oder Dendriten erfolgt, da sich die Mechanismen der Sekretionsinduktion theoretisch unterscheiden könnten: Axone werden hauptsächlich über natriumabhängige Aktionspotentiale stimuliert, während die Aktivierung der Dendriten über die Art der Synapse (inhibitorisch: Hyperpolarisation; exzitatorisch: Depolarisation der postsynaptischen Seite und anschließender Kalziumeinstrom) und über einen, durch zurückpropagierende Aktionspotentiale vermittelten, dendritischen Kalziumeinstrom (Yuste und Denk, 1995) bestimmt wird.

Dendritische Freisetzungsprozesse (ausführlicher dargelegt in Abschnitt 1.2.3.1) wurden erst in den letzten Jahren eingehender untersucht, vor allem im Hinblick auf eine mögliche Exozytose von Molekülen, welche die synaptische Übertragung beeinflussen könnten. Eine dendritische Freisetzung ist z.B. für die Expression einer LTP sehr wichtig und wird über Synaptobrevin, NSF und SNAP (vergleichbar zu den sehr gut untersuchten Exozytosvorgängen synaptischer Vesikel) vermittelt (Lledo et al., 1998).

Entlang der Neuriten konnten in unseren Experimenten keine spezifischen Strukturen wie z.B. Synapsen, die präferentiell immunogoldmarkiert wurden, erkannt werden. Insofern scheint die Neurotrophin-Sekretion ohne klare Ortspräferenzen von neuritischen Strukturen zu erfolgen, was ein unerwartetes Ergebnis war. Eine eventuell unzureichende Differenzierung der Neuronen unter unseren Kulturbedingungen kann diese Ergebnisse nicht erklären, da wir auch Experimente mit 3-4 Wochen alten dissoziierten Neuronen, die eine höhere Dichte an synaptischen Strukturen und Spines aufwiesen, durchführten. Auch in diesen Kulturen konnten wir entlang der Neuriten keine ortsspezifische Freisetzung nachweisen (Abb. 3.12). Eventuell artifizielle, unspezifische Reaktionen der Neuronen auf den KCl Stimulus konnten wir ebenfalls ausschließen, da sich auch nach Stimulation der Kulturen mit elektrischen Pulsen das beobachtete Freisetzungsmuster nicht änderte (Abschnitt: 3.4.2).

Werden Neurotrophine auch unter physiologischen Bedingungen ortsunspezifisch entlang neuronaler Ausläufer freigesetzt?

Unsere Experimente zeigten, daß zumindest das Potential vorhanden ist, Neurotrophine von allen Stellen entlang der Neuriten freizusetzen und demnach die entsprechenden Freisetzungskompartimente und eventuell spezielle Strukturen für ihre Freisetzung („docking sites“) recht homogen innerhalb der Neuriten verteilt sind. Tatsächlich war die intrazelluläre Verteilung der Neurotrophine (Abb. 3.7, Abb. 3.15 und Abb. 3.16) in den Neuriten weder auf Synapsen noch auf andere spezifische Strukturen konzentriert, was diese Vermutung unterstützt. Inwieweit dieses Freisetzungspotential unter physiologischen Bedingungen tatsächlich ausgenutzt wird, konnte im Rahmen dieser Experimente nicht geklärt werden, da alle Neuronen der Kultur (prä- und postsynaptisch) gleichzeitig stark mit KCl oder elektrischen Pulsen stimuliert wurden.

Unter physiologischen Bedingungen ist allerdings der Stimulus definierter, so daß Neuronen sehr viel lokaler stimuliert werden, was zu einem lokal beschränkten Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration führt, die letztlich auch nur eine lokale Freisetzung ermöglichen sollte⁴². Lokalisierte dendritische Kalziumsignale wurden bereits *in vivo* in CA1 Pyramidenzellen nachgewiesen und sind teilweise auf einzelne Spines beschränkt (Yuste und Denk, 1995). Diese Lokalisierung des Kalziumsignals wird einerseits durch eine lokale Aktivierung bzw. eine lokale Expression spannungsabhängiger Kalziumkanäle bewirkt (Destexhe et al., 1996). Aber auch die Kalziummobilisierung aus intrazellulären Speichern kann sehr lokalisierte Kalziumsignale erzeugen (Koizumi et al., 1999), die eventuell, je nach ihrer Stärke, eine Freisetzung von Neurotrophinen induzieren können. So wurde gezeigt, daß der Kalziumanstieg in Spines durch eine Aktivierung von NMDA Rezeptoren zwar initiiert wird, aber hauptsächlich durch Kalzium aus intrazellulären Speichern bewirkt wird (Emptage et al., 1999). Die Mobilisierung von Kalzium aus intrazellulären Speichern kann durch eine kalziuminduzierte Kalziumfreisetzung über Ryanodinrezeptoren (Sandler und Barbara, 1999) lokal verstärkt werden. Theoretisch sollten diese Kalziumsignale auch über neurotrophinvermittelte Signale selbst amplifiziert werden, da Neurotrophine einerseits Kalzium aus intrazellulären Speichern freisetzen und gleichzeitig eine Neurotrophin-Freisetzung induzieren (Canossa et al., 1997).

Um die physiologische Situation einer gezielten Stimulation einzelner definierter Neuronen besser zu simulieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Kokultursystem (Abb. 3.13) entwickelt, mit dem es möglich ist, selektiv präsynaptische Neuronen zu stimulieren und die Neurotrophin-Freisetzung an selektierten Stellen (prä- oder postsynaptisch) mit hoher Auflösung nachzuweisen. In diesen Kulturen werden nur die Synapsen, über die das Explantat Kontakte zu den dissoziierten postsynaptischen Zellen etabliert, stimuliert.

Mit diesem Kultursystem (in Abschnitt 3.2.6.1 beschrieben) ist es möglich:

- Neuronen präsynaptisch mit definierten Mustern elektrisch zu stimulieren,
- gleichzeitig die Freisetzung von Neurotrophinen auf prä- und / oder postsynaptischer Seite mit hoher Auflösung zu beobachten,
- und die Neuronen prä- und postsynaptisch getrennt mit adenoviralen Vektoren zu transduzieren.

Dieses Kultursystem kann generell für weitere Studien, in denen getrennt prä- und postsynaptische Phänomene untersucht werden sollen, angewandt werden, zumal durch die getrennte Transduktion die Neuronen unterschiedlich beeinflusst werden können.

⁴² Auch der zeitliche Verlauf des Kalziumanstiegs und die Amplitude bestimmen die biochemische Antwort der Zelle.

Eine lokale beschränkte Neurotrophinwirkung kann über andere Mechanismen, als eine lokale Neurotrophin-Freisetzung reguliert werden.

Freisetzungseignisse, die nicht auf Synapsen oder Axonen beschränkt sind, wurden zum Beispiel für „large dense core“ Vesikel (LDCV) beschrieben (Zaidi et al., 1997). Auch dendritische Exozytosevorgänge in hippocampalen Neuronen wurden teilweise außerhalb synaptischer Spezialisierungen nachgewiesen (Maletic-Savatic, 1998). Wenn auch Neurotrophine unter physiologischen Bedingungen nichtsynaptisch freigesetzt werden, dann könnte die Lokalisierung der Neurotrophinwirkung über andere Mechanismen erreicht werden:

- 1.) Es wurde gezeigt, daß TrkB-Rezeptoren aktivitätsabhängig in die Plasmamembran integriert werden (Meyerfranke et al. 1998), wodurch die Neurotrophinwirkung auf aktive Neuronen oder einzelne Synapsen beschränkt bleibt. Die Verteilung der TrkB-Rezeptoren in hippocampalen Neuronen wurde auf EM-Ebene detailliert beschrieben (Drake et al., 1999; ausführlich unter 1.3.2): TrkB-Rezeptoren wurden in Pyramidenzellen des Hippokampus in aggregierter Form in Axonen, aber auch in Dendriten lokalisiert, wo sie vor allem in den Spines auf der Plasmamembran exprimiert werden, während sie in den dendritischen Schäften meist zytoplasmatisch lokalisiert sind. Das zeigt, daß TrkB-Rezeptoren sehr lokal an der neuronalen Oberfläche sowohl prä- als auch postsynaptisch exprimiert werden und dadurch die TrkB-Liganden nur sehr lokal wirken können.
- 2.) Auch der Status der Synapse scheint ihre Reaktivität auf Neurotrophine zu bestimmen. So können hippocampale glutamaterge Synapsen des gleichen Neurons unterschiedlich auf exogen appliziertes BDNF reagieren: Die synaptische Transmission von Synapsen mit anfänglich niedriger Freisetzungswahrscheinlichkeit wird durch BDNF stärker erhöht als die von Synapsen mit einer hohen Freisetzungswahrscheinlichkeit (Berninger et al., 1999).
- 3.) Theoretisch könnte die Neurotrophinwirkung auch dadurch beeinflußt werden, daß ein zweites, koinzidentes und eventuell lokal beschränktes Signal für eine biologische Neurotrophinwirkung notwendig ist. Zum Beispiel wurde eine stärkere Potenzierung der synaptischen Transmission erreicht, wenn BDNF nicht alleine sondern gleichzeitig mit KCl appliziert wurde oder BDNF bei gleichzeitiger Stimulation der präsynaptischen Zelle zugegeben wurde (Boulangier und Poo, 1999). Dieser Effekt könnte unter anderem durch die gleichzeitige Freisetzung eines synergistisch wirkenden Moleküls erklärt werden⁴³.

4.4 Identifikation intrazellulärer Neurotrophin Speicher- und Freisetzungskompartimente

Der Nachweis der Neurotrophin-Freisetzung durch die Oberflächenimmunofärbungen (Abb. 3.10; Abb. 3.12) zeigte eindeutig, daß die Freisetzung aus einem intrazellulären Kompartiment stattfindet, da mit diesen Experimenten eine artifizielle Freisetzung von eventuell an der Oberfläche gebundenen Neurotrophinen auszuschließen ist.⁴⁴

Die Identifizierung der Kompartimente, die für die Speicherung und Freisetzung von Neurotrophinen verantwortlich sind, ist aus vielerlei Gründen von Bedeutung. Die Freisetzung von Neurotrophinen wird über einen Mechanismus reguliert, der unabhängig von extrazellulärem Kalzium ist. Allerdings ist die Freisetzung aus intrazellulären Kalziumspeichern notwendig und ausreichend für eine Freisetzung (Griesbeck et al., 1999). Diese

⁴³ So könnte zum Beispiel die gleichzeitige Freisetzung von Glutamat eine zusätzlich Depolarisierung bewirken, aber auch eine weitere Neurotrophin-Freisetzung induzieren.

⁴⁴ Da die Basalwerte nahezu null sind, kann die Freisetzung nur aus einem intrazellulären Kompartiment geschehen. Diese Überlegungen sind wichtig, da in vorangegangenen Experimenten zur Neurotrophin-Freisetzung die Neurotrophine vor und nach Stimulation mittels ELISA nachgewiesen wurden. Diese Freisetzung könnte theoretisch auch von der Oberfläche der Neuronen erfolgen und durch die Umladungen der Membran durch die Stimuli verursacht werden. Unsere Experimente sind ein direkter Beweis dagegen, indirekt zeigten pharmakologische Experimente, daß es sich um eine Exozytose handelte (Blöchl, 1998).

Kalziumabhängigkeit ist ungewöhnlich, da Exozytosevorgänge i.d.R. durch den Kalziumeinstrom über plasmamembranständige Kalziumkanäle vermittelt werden. Warum eine erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration per se nicht ausreicht, d.h. daß die Freisetzung von Kalzium aus den Speichern für eine NT Freisetzung notwendig ist, ist noch ungeklärt. Doch kann daraus geschlossen werden, daß eine neue Form der Exozytose oder ihrer Regulation bzw. ein unkonventionelles Kompartiment postuliert werden muß, aus dem die Exozytose erfolgt. Die regulierte Freisetzung von Neuropeptiden erfolgt normalerweise aus LDCV und ist abhängig von extrazellulärem Kalzium. Da allerdings LDCV in hippokampalen Neuronen und vor allem in den Dendriten nur in sehr geringer Zahl vorhanden sind, können sie als Freisetzungskompartiment für Neurotrophine ausgeschlossen werden. Eine weitere Frage ist, ob die Freisetzungskompartimente direkt den Speicherkompartimenten entsprechen oder ob sie aus diesen gebildet werden. Es ist bislang ungeklärt, ob die Neurotrophin-Freisetzung aus bestimmten freisetzungskompetenten Kompartimenten erfolgt, die in einem „gedockten Zustand“ sehr viel schneller als die anderen freisetzen können, wie es zum Beispiel bei der Exozytose synaptischer Vesikel und LDCV der Fall ist (Steyer et al., 1997).

Ziel unserer Untersuchungen war es deshalb, die Freisetzungs- und Speicherkompartimente zu identifizieren und wenn möglich zu unterscheiden.

4.4.1 Intrazelluläre Lokalisierung von Neurotrophinen: immunozytochemische Untersuchungen

Eine immunozytochemische Untersuchung der intrazellulären Neurotrophin-Verteilung sollte eine morphologische Identifizierung der Speicher- und Freisetzungskompartimente und ihrer subzellulären Verteilung zulassen. Über Kolokalisierungsstudien mit Markern, die mit definierten intrazellulären Strukturen assoziiert sind, können die Kompartimente physiologisch charakterisiert werden.

Eine Lokalisierung endogener, nur in sehr geringen Mengen vorhandener, Neurotrophine erwies sich als sehr schwierig, was die oft sehr widersprüchlichen Ergebnisse erklärt: So wurden Neurotrophine mit verschiedenen polyklonalen Antikörpern und Fixierungsprozeduren, z.B. präferentiell axonal (Conner et al., 1997) oder dendritisch (Goodman et al., 1996), nachgewiesen. Eine Feinauflösung wurde nur in wenigen Studien versucht, wobei eine Amplifikation des IR-Signals mit HRP notwendig wurde, was durch Diffusionsartefakte unweigerlich zu einer schlechteren Auflösung führt: In diesen Untersuchungen wurden z.B. Neurotrophine in LDCV in Hinterwurzelganglien nachgewiesen (Zhou und Rush, 1996). Allerdings wurden Neurotrophine auf EM-Ebene bislang nicht in kortikalen Neuronen nachgewiesen.

Wir entschieden uns deshalb auch für diese Untersuchungen, mit einem myc-Epitop markierte Neurotrophine überzuexprimieren, um eine eindeutige Immunlokalisierung zu erreichen. Das myc-Epitop ist auch nach starker Fixierung und Einbettung der Kulturen antigen, so daß eine Immunogoldfärbung nach starker Fixierung und „postembedding“ Techniken, die eine maximale Strukturhaltung zulassen, möglich ist. Die Überexpression erlaubt einen eindeutigen Nachweis der Neurotrophine mit immunogoldgekoppelten Ak ohne Amplifikationstechniken, außerdem stellen nicht transduzierte Zellen eine gute Negativkontrolle dar.

In vorbereitend durchgeführten lichtmikroskopischen Studien konnten wir zeigen, daß die Fixierung und anschließende immunochemische Behandlungen die generelle Verteilung der Neurotrophine nicht ändern, da die Verteilung von GFP-markiertem BDNF in hippokampalen Neuronen mit der Verteilung von BDNFmyc nach immunochemischen Nachweis des myc-Epitopes (Abb. 3.15A/B) vergleichbar war: Die Neurotrophine waren in beiden Fällen im Soma akkumuliert und punktiert entlang der gesamten Ausläufer verteilt. Auch eine Verwendung anderer neurotrophinspezifischer Antikörper ergab das gleiche IR-Muster, womit die Verwendung des myc-Ak eine sehr spezifische Lokalisierung erlauben sollte.

Lokalisierung der Neurotrophine in glatten ER-Strukturen

Eine präzise Lokalisierung in definierten Kompartimenten war mit lichtmikroskopischen Methoden nur indirekt über Kolokalisierungsstudien mit bekannten Markern möglich. Dadurch konnten wir eine Verteilung der Neurotrophine in ER-Strukturen, die sich entlang der Neuriten und im Zellsoma lokalisiert sind, nachweisen (Abb. 3.15G-I). Eventuell sind die Neurotrophine nur in Subkompartimenten des ER vorhanden, da das ER weiter und weniger punktiert als die Neurotrophine verteilt war (Abb. 3.15G-I). Mit Golgimarkern wurden Neurotrophine komplett kolokalisiert (Abb. 3.15K-M).

Diese Ergebnisse konnten wir mit hoher Auflösung auf EM-Ebene bestätigen: in diesen Untersuchungen wurde eine präferentielle Verteilung der Neurotrophine in ER-ähnlichen, glatten Membranstrukturen nachgewiesen (Abb. 3.16). Im Rahmen dieser EM-Experimente wurden auch mit AdV5NT6myc oder AdV5BDNFmyc transduzierte dissoziierte Kulturen mit lokal transduzierten hippokampalen Schnittkulturen verglichen, um eventuelle Kulturartefakte durch den Vergleich mit Neuronen in einem organotypischen Kontext auszuschließen. In allen Fällen wurden die Neurotrophine in vergleichbaren Strukturen lokalisiert, was einerseits zeigt, daß die unterschiedlichen Neurotrophine gleich sortiert werden und andererseits, daß es in dissoziierten Neuronen zu keiner Fehlsortierung kommt. Obwohl es kein Kompartiment gab, welches ausschließlich immunomarkiert war, konnte eine präferentielle Lokalisierung der Neurotrophine in ER-ähnlichen glatten Membranstrukturen unterschiedlicher Formen und Größen nachgewiesen werden (Abb. 3.16).

Diese Strukturen sind sehr ähnlich zu tubovesikulären Strukturen, die mit einem luminalen ER-Marker, BIP, in EM-Studien markiert wurden (Rubio und Wenthold, 1999) und mit verschiedenen Untereinheiten von AMPA-Rezeptoren kolokalisiert wurden. Außerdem konnte die IR oft in der Nähe synaptischer Vesikel oder Mikrotubuli nachgewiesen werden. In einigen Fällen konnten keine definierten Strukturen mit dem Immunogoldsignal assoziiert werden, was nicht durch unspezifische Hintergrundsignale erklärt werden kann, da diese in Kontrollzellen (Abb. 3.16F) nicht nachgewiesen wurden, sondern nur durch die schlechte Erhaltung einiger Strukturen bedingt sein kann. Ähnliche Probleme bezüglich der Strukturhaltung speziell von ER-Strukturen wurden beschrieben (Westrum und Gray, 1986), die wahrscheinlich auch in anderen Studien zur Markierung undefinierter Zellstrukturen (ultrastrukturelle Lokalisierung von Glutamatrezeptoruntereinheiten: Rubio und Wenthold, 1999 oder TrkB-R: Drake et al., 1999) führten. Obwohl vereinzelt LDCV in unseren Präparationen gefunden werden konnten, waren sie in den meisten Fällen nicht markiert, so daß sie als Speicherkompartiment auszuschließen sind.

Glattes ER wurde auch in den axonalen und dendritischen Ausläufern nachgewiesen und reicht bis in synaptische Strukturen und durch den gesamten Dendritenbaum, wo es in Spines in Form von speziellen Spineapparaten, vesikulären oder tubulären Strukturen endet (Spacek und Harris, 1997; Berridge, 1998*). Zum Teil reichen diese ER-Strukturen sehr dicht an die Plasmamembran heran (Berridge, 1998*) und könnten direkt als Freisetzungskompartiment dienen. In tubovesikulären Strukturen des glatten ER wurden mit immunohistochemischen Methoden weitere Moleküle gefunden, die unter bestimmten Bedingungen aktivitätsabhängig an die Plasmamembran transportiert werden können, wie AMPA-Rezeptoren (Rubio und Wenthold, 1999, Shi et al., 1999) und Trk-R (Meyerfranke et al., 1998; Drake et al., 1999). Da diese Kompartimente bislang nur mit konstitutiven Transportprozessen in Verbindung gebracht wurden, wurde bislang nicht untersucht, wie dieser Transport reguliert wird, ob spezielle Moleküle daran beteiligt sind und ob es Subkompartimente gibt, die speziell für einen regulierten Transport verantwortlich sind. Allerdings wurde kürzlich ein tetanustoxininsensitives vesikelassoziertes Membranprotein identifiziert (VAMP7; Coco et al., 1999), welches spezifisch in glatten Membranstrukturen, wie Tubuli und Vesikeln, in der somatodendritischen

Domäne hippokampaler Neuronen gefunden wurde, aber nicht mit LDCV oder synaptischen Vesikeln assoziiert ist. Ob VAMP7 tatsächlich das Neurotrophin-Kompartiment definiert, könnte durch Kolokalisierungsstudien geprüft werden.

Diese Befunde zeigen, daß die von uns nachgewiesene Lokalisierung von Neurotrophinen in ER-Strukturen auch unter theoretischen Gesichtspunkten durchaus möglich ist, da eine Lokalisierung in ER Strukturen auch für andere aktivitätsabhängig regulierte Proteine gefunden wurde und diese Strukturen für die Freisetzung adäquat lokalisiert sind.

Inzwischen wurden einige sehr spezifische Toxine identifiziert, die definierte Proteine der Exozytosemaschinerie ausschalten können. Durch eine spezifische Inhibition einzelner dieser Proteine und anschließende Messung der regulierten Neurotrophin-Freisetzung ist es möglich, die Besonderheit der Exozytose im Vergleich zu bekannten Exozytoseereignissen synaptischer Vesikel oder LDCV aufzudecken. So wurde gezeigt, daß die Neurotrophin-Freisetzung nicht über VAMP2 aber über SNAP-25 und Syntaxin vermittelt wird (Blöchl, 1998). Auch subtilere Kolokalisierungsstudien auf licht- und EM-Ebene mit definierten Exozytosemarkern könnten weitere Erkenntnisse bringen.

Die intrazelluläre Verteilung von BDNF_{myc} oder NT6_{myc} vor und nach Stimulation der Neuronen war nicht unterscheidbar (vorläufige Untersuchungen). Insofern wird das Kompartiment nicht nachweisbar entleert. Parallel durchgeführte Oberflächen- und intrazelluläre Färbungen (Abb. 3.16) zeigten, daß eine Korrelation der IREN schwierig war, das heißt, es konnte kein spezifisches intrazelluläres Kompartiment unter den Freisetzungstellen nachgewiesen werden.

4.4.2 Vergleich mit verwandten Mechanismen : Neuropeptide, Opoide

Das Vorhandensein eines „unklassischen“ Kompartimentes für die Speicherung und Freisetzung von Neurotrophinen wirft zwei Fragen auf:

1. Handelt es sich tatsächlich um ein ausschließlich mit der Neurotrophin-Freisetzung assoziiertes Kompartiment? Wahrscheinlicher ist, daß auch andere Neuropeptide über vergleichbare Mechanismen kontrolliert freigesetzt werden, zumal sie viele Parallelen zu Neurotrophinen zeigen (Morris und Johnston, 1995^{*45}).
2. Ist dieses Kompartiment eine spezifische Adaptation von Neuronen oder können vergleichbare Kompartimente in anderen Zelltypen, wie neuroendokrinen Zellen, die häufig als Modellsystem herangezogen werden, gefunden werden?

zu 1.)

In der Regel wurden Neuropeptide in LDCV lokalisiert, wobei ultrastrukturelle Untersuchungen diesbezüglich, vor allem in ZNS-Neuronen, sehr rar sind. In vorläufigen Experimenten konnten wir endogenes Neuropeptid-Y (NPY) in hippokampalen Neuronen nachweisen, welches ähnlich punktiert über die neuronalen Ausläufer verteilt war, wie Neurotrophine. Insofern stellt sich dieselbe Frage nach dem Neuropeptidkompartiment, da LDCV in diesen Kulturen kaum vorhanden sind, und in LDCV gespeichertes NPY nicht für dieses relativ stark ausgeprägte IR-Signal verantwortlich sein kann.

Um dieser Frage detaillierter nachgehen zu können, konstruierten wir einen NPY-Adenovirus, mit dem es möglich sein wird, BDNF und NPY in den gleichen Neuronen parallel nachzuweisen und außerdem die parallele Freisetzung dieser Moleküle nach definierten Stimuli in kalziumhaltigen oder -freien Medien zu vergleichen.

⁴⁵ So z.B. beeinflussen Opoide ebenfalls synaptische Prozesse (wie z.B. LTP), werden durch hochfrequente Stimuli freigesetzt und im Hippokampus stark exprimiert.

zu 2.)

In neuroendokrinen Zellen findet die Sortierung sekretierter Proteine, vergleichbar mit Neuronen, hauptsächlich im TGN statt. Allerdings sind PC12 Zellen als neuronales Modellsystem limitiert, da sich die Proteinsortierung im Detail betrachtet von Neuronen unterscheidet, vor allem, da keine Polarisierung der Zellen stattfindet und ein Vergleich der PC12 Zellneuriten mit Axonen oder Dendriten problematisch ist. Die Anzahl von LDCVs - Kompartimente, die für die Speicherung und kalziumabhängige Exozytose von Peptiden verantwortlich sind - ist in PC12 Zellen sehr hoch. Trotzdem ist die regulierte Exozytose der Neurotrophine auch von PC12 Zellen unabhängig von extrazellulärem Kalzium, was gegen ihre ausschließliche Speicherung in LDCV spricht. Es wäre möglich, daß Neurotrophine in PC12 Zellen in LDCV und in einem anderen Kompartiment gespeichert werden und in Neuronen ausschließlich in dem postulierten anderen Kompartiment gespeichert werden.

Deshalb entschieden wir uns, immunozytochemische Studien auch an PC12 Zellen (Daten nicht gezeigt) durchzuführen. Diese zeigten, daß die IR ebenfalls punktförmig im Zellsoma und sehr deutlich über den Golgi verteilt ist. Dieses Muster ist in differenzierten PC12-Zellen⁴⁶ ähnlich, allerdings ist hier eine Anhäufung der Neurotrophin-IR in punktförmigen Aggregaten in den Ausläuferenden nachweisbar. Die IR von BDNFmyc überlappte in manchen vesikulären Strukturen vollständig mit der IR von SekretograninII – ein Marker für sekretorische Vesikel – in anderen hingegen gab es keine Überlagerung. Eine deutliche Kolo-kalisierung beider Signale wurde in den Ausläuferenden der Neuriten differenzierter PC12 Zellen beobachtet, in denen auf EM-Ebene eine starke Anhäufung von LDCV beobachtet wurde. Diese Untersuchungen würden darauf hindeuten, daß Neurotrophine teilweise in LDCV gespeichert werden, daß es aber auch zusätzliche Kompartimente (SekretograninII-negative) für ihre Speicherung gibt. Alternativ wäre es möglich, daß die Ak unterschiedlich guten Zugang zu den Epitopen haben oder daß die Moleküle unterschiedlich stark exprimiert werden. In vorläufigen Kolo-kalisierungstudien von BDNF mit NPY in PC12 Zellen wurde ebenfalls gezeigt, daß diese Moleküle nur in Subkompartimenten kolo-kalisieren. Damit diese Untersuchungen aussagekräftig werden, muß allerdings noch nachgewiesen werden, ob Neuropeptide, in dem Fall NPY, tatsächlich in PC12 Zellen nur in LDCV lokalisiert ist.

Aus diesen Studien alleine läßt sich allerdings noch nicht schließen, ob es in PC12 Zellen neben LDCV noch ein weiteres Kompartiment gibt, welches für eine regulierte Neurotrophin-Freisetzung verantwortlich ist, was allerdings zu vermuten wäre, da die Freisetzung aus PC12 Zellen auch unabhängig von extrazellulärem Kalzium ist. Da Neurotrophine weder vollständig mit Neuropeptiden noch mit LDCV-Markern kolo-kalisiert waren, ist noch unklar, ob eventuell auch Peptide in PC12 Zellen in andere Kompartimente als LDCV sortiert werden.

Diese Fragen ließen sich dann beantworten, wenn spezifische Proteine, die in Neuronen die regulierte Exozytose von Neurotrophinen steuern, auch in PC12 Zellen gefunden werden.

⁴⁶ Eine Zugabe von NGF induziert in PC12 Zellen ein Auswachsen neuritenähnlicher Ausläufer, einen Proliferationsstopp und eine somatische Hypertrophie, so daß diese Zellen viele Ähnlichkeiten zu sympathetischen Neuronen aufweisen.

4.5 Mechanismen der Neurotrophin-Freisetzung: Freisetzung von Neurotrophinen durch definierte elektrischer Stimulation

Eine Stimulation neuronaler Kulturen mittels elektrischer Pulse erlaubte detailliertere Untersuchungen zum Mechanismus der Neurotrophin-Freisetzung. Es war möglich, die Stimuli zeitlich sehr genau zu definieren, das Reizmuster zu verändern und sich damit den physiologischen Bedingungen anzunähern. Im Gegensatz zur Stimulation durch exogene Zugabe von Glutamat oder KCl sind keine pharmakologischen Nebeneffekte zu erwarten. Da es bislang noch nicht möglich war, die Neurotrophin-Freisetzung mit elektrischen Stimuli direkt zu korrelieren, sollten diese Ergebnisse, vor allem im Hinblick auf die Rolle von Neurotrophinen in LTP-Prozessen, neue Impulse geben.

Die Neurotrophin-Freisetzung ist abhängig von der Art des Stimulismusters

Stimuli, mit denen eine LTP in den CA3/CA1-Synapsen hippokampaler Schnitte induziert werden können, waren auch in der Lage, Neurotrophine in unseren dissoziierten Neuronenkulturen freizusetzen (Abschnitt: 3.4.2). Mit einer niedrigeren Stimulationsfrequenz von 10 Hz ist weder eine reproduzierbare LTP-Induktion möglich (Kinoshita et al., 1999), noch konnten wir eine Neurotrophin-Freisetzung nachweisen. Ob diese Beobachtung von physiologischer Relevanz ist, d.h., ob durch LTP-induzierende Stimuli *in vivo* oder in Schnitten ebenfalls spezifisch Neurotrophine freigesetzt werden, ist auf Grund der geringen Menge endogener Neurotrophine, die durch eine Stimulation freigesetzt werden und ihrer Akkumulation im Extrazellulärraum sehr schwierig. Deshalb entschieden wir uns, eine Potenzierung oder Depotenzierung in dissoziierten Neuronen nach Feldelektrodenstimulation nachzuweisen⁴⁷, um so die Neurotrophin-Freisetzung in dem gleichen Kultursystem direkt mit Potenzierungs- oder Depotenzierungsphänomenen der Synapsen zu korrelieren (siehe 3.4.5). Eine LTD-Induktion nach niederfrequenter Feldelektrodenstimulation wurde bereits in dissoziierten Neuronen beobachtet (Carroll et al., 1999). Eine LTP-Induktion war in diesen Studien in dissoziierten Neuronen nicht möglich⁴⁸, wurde aber von anderen Gruppen bereits beschrieben (Deisseroth et al., 1996). In vorläufigen Experimenten konnten wir zeigen, daß eine Potenzierung durch 50 Hz Stimulation und eine Depotenzierung durch 10 Hz Stimulation in einigen der Neuronen möglich war. Auch in unseren Untersuchungen war eine Depotenzierung durch 10 Hz Stimuli reproduzierbarer nachweisbar als eine Potenzierung nach 50 Hz Stimulation. Ein generelles Problem in Studien mit dissoziierten Neuronen könnte sein, daß eventuell freigesetzte synapsenmodulierende Moleküle im Medium stark verdünnt werden, da der Extrazellulärraum als „Kompartiment“ nicht vorhanden ist. Sollten sich diese Ergebnisse als statistisch relevant erweisen, dann wäre ein direkter Zusammenhang zwischen einer Potenzierung von Synapsen und einer Neurotrophin-Freisetzung gegeben. Ob ein kausaler Zusammenhang besteht, könnte zum Beispiel dadurch festgestellt werden, ob eine Blockade endogener BDNF Wirkung (z.B. durch blockierende BDNF Ak) die Potenzierung verhindern kann, bzw. ob eine exogene Zugabe von BDNF auch bei niederfrequenter Stimulation eine Potenzierung bewirken kann⁴⁹.

⁴⁷ Als Maß für die Stärke der Synapse wurden in unseren Experimenten die mEPSC gemessen (spontane synaptische Aktivität). Diese korrespondieren sehr gut mit der Stärke der Reizantwort nach einer Stimulation (Prange und Murphy, 1999).

⁴⁸ Die Schwierigkeit eine LTP in Kulturen zu induzieren begründen Carroll et al. (1999) damit, daß in dissoziierten Neuronen schon im nichtaktivierten Zustand mehr AMPA-Rezeptoren synaptisch lokalisiert sind als in Schnittkulturen, womit eine Potenzierung durch eine Insertion von weiteren AMPA-Rezeptoren weniger effektiv ist.

⁴⁹ Einige Experimente zeigten bereits, daß BDNF per se die synaptische Übertragung verstärkt (Berninger et al., 1999).

Wie wird die frequenzabhängige Freisetzung der Neurotrophine reguliert?

Ein unerwartetes Ergebnis war, daß eine 10 Hz Stimulus keine Neurotrophin-Freisetzung induzierte und nicht einfach nur eine Verminderung der Freisetzung bewirkte (Abb. 3.17, Tabelle 2). Weiterhin scheint eine Depolarisierung per se für eine Neurotrophin-Freisetzung nicht auszureichen, da TTX die KCl-induzierte Neurotrophin-Freisetzung (Abb. 3.17; Tabelle 2) und die Aktionspotentiale inhibierte, aber eine Depolarisation der Neuronen unter diesen Bedingungen immer noch möglich war (Abb. 3.19B). Daraus kann geschlossen werden, daß Aktionspotentiale einer bestimmten Mindestfrequenz für eine Freisetzung der Neurotrophine notwendig sind.

Wie können die Neuronen die Frequenz des Stimulus bzw. der ausgelösten Aktionspotentiale in eine biologische Antwort „übersetzen“ und mit einer Neurotrophin-Freisetzung oder nicht reagieren? Über mögliche Erklärungen wurde bereits unter 3.4.4 spekuliert.

Da die Neurotrophin-Freisetzung abhängig von der Kalziummobilisierung aus intrazellulären Speichern ist, wäre es möglich, daß die unterschiedlichen Stimulationen Kalziumsignale unterschiedlicher Länge und Stärke bewirken (z.B. dadurch, daß die intrazellulären Kalziumspeicher unterschiedlich beeinflußt werden). In unseren Experimenten konnten in Gegenwart extrazellulären Kalziums keine Unterschiede im Kalziumeinstrom nach entweder 10 Hz- oder 50 Hz-Stimulation festgestellt werden. In kalziumfreiem Medium wurde nach einer 10 Hz-Stimulation kein Kalziumeinstrom gemessen, während einige wenige Neuronen auf 50 Hz Pulse mit einem Kalziumeinstrom, der in diesem Falle nur aus intrazellulären Kalziumspeichern stammen kann, reagierten. Sollten sich diese Ergebnisse in weiteren Experimenten bestätigen lassen, wäre es interessant zu untersuchen, über welche Mechanismen die Kalziumspeicher unterschiedlich beeinflußt werden. Ein Kalziumeinstrom allein, ohne begleitende Aktionspotentiale (durch Stimulation mit 50 mM KCl in Gegenwart von TTX), scheint aber für eine Freisetzung nicht ausreichend zu sein.

Durch die verschiedenen Stimulismuster könnten unterschiedliche Signaltransduktionskaskaden ausgelöst werden, die sich nicht unbedingt in einem veränderten Kalziumeinstrom manifestieren müssen.

Unter Umständen könnte die Neurotrophin-Freisetzung auch über freigesetztes Glutamat indirekt induziert werden, wobei aber die Frage bleibt, warum Glutamat differentiell freigesetzt wird. Einen möglichen Einfluß von Glutamat auf die feldelektrodeninduzierte Neurotrophin-Freisetzung könnte man durch die Zugabe von spezifischen Glutamatrezeptorantagonisten (metabotrope Glutamatrezeptoren und AMPA-Rezeptoren) überprüfen.

4.6 Ausblick

In diesem Kapitel sollen kurz mögliche weiterführende Projekte erläutert werden.

4.6.1 Möglichkeiten zur funktionellen Verbindung der intrazellulären Kompartimente mit der Neurotrophin-Freisetzung: dynamische Untersuchungen

Ein Ziel weiterführender Arbeiten wäre es, das Neurotrophin-Kompartiment aus welchem die Freisetzung direkt stattfindet zu identifizieren, d.h. den Freisetzungsvorgang entweder auf eine Weise einzufrieren, daß er sichtbar gemacht werden kann oder zu versuchen, die Freisetzung online mittels fluoreszenzmikroskopischer Methoden zu verfolgen. Es sollte damit möglich sein festzustellen, inwieweit die intrazelluläre Verteilung mit den Freisetzungsorten übereinstimmt und welche Morphologie das Freisetzungskompartiment hat. Da Exozytosevorgänge sehr schnell verlaufen, ist es schwierig, den naszierenden Sekretionsprozeß so schnell zu blockieren, daß die Kompartimente noch während ihrer exozytotischen Fusion mit der Plasmamembran auf EM-Ebene nachgewiesen werden können. Eine Alternative wäre, die Kompartimente retrograd mit einem Farbstoff, der während der Exozytose in die Kompartimente aufgenommen wird, zu

markieren⁵⁰. Ähnliche Studien wurden bereits unter Verwendung von HRP⁵¹ (Neale et al., 1978) oder eines amphiphilen Farbstoffes, der nur nach Integration in Membranen fluoresziert (FM1-43; Betz et al., 1996), durchgeführt. Mit solchen Untersuchungen könnten auch Aussagen über die Kinetik der Exozytose gemacht werden. Problematisch wäre dieser Ansatz, wenn das Kompartiment zu groß ist, da die Markersubstanz verdünnt würde. Auch ist nichts über das Recycling des Neurotrophin-Kompartimentes⁵² bekannt. Theoretisch kann das Kompartiment nur durch einen Transport aus dem Golgi aufgefüllt werden. Auch dieser Aspekt könnte durch solche retrograden Markierungen geklärt werden.

Eine weitere, schon angedeutete Möglichkeit ist, das Kompartiment biochemisch zu definieren, indem Freisetzungprozesse mit pharmakologischen Agenzien blockiert werden. So könnte die Exozytose direkt (siehe auch 4.4.1) oder das Auffüllen der Neurotrophin-Speicher (Transport vom Golgi) bzw. der freisetzungskompetenten Kompartimente⁵³ spezifisch inhibiert werden.

Ein direkte Beobachtung der Freisetzung von BDNF-GFP mittels Fluoreszenzmikroskopie war problematisch, da wir keine signifikante Abnahme der Fluoreszenz während der Stimulation der Neuronen beobachten konnten. Das könnte daran liegen, daß nur ein sehr kleiner Anteil des BDNF-GFP freigesetzt wird und die damit verbundene Fluoreszenzabnahme nicht nachweisbar ist. Allerdings sollte es mit GFP-markiertem BDNF möglich sein, die subzelluläre Sortierung der Neurotrophine und den Transport entlang der Neuriten direkt zu verfolgen.

4.6.2 Ort der Freisetzung von Neurotrophinen

Durch die Verwendung von Explantatkokulturen kann die Neurotrophin-Freisetzung auf prä- oder postsynaptischer Seite lokalisiert werden. Es ist auch möglich, von synaptisch gekoppelten Paaren dissoziierter Neuronen abzuleiten, diese zu stimulieren und eine LTP in diesen zu induzieren (Deisseroth et al., 1996). Prinzipiell könnte man ein Neuron stimulieren und gleichzeitig von einem NT6myc exprimierenden Neuron ableiten (oder umgekehrt) und anschließend die Oberflächenfärbung analysieren. Die beiden analysierten Neuronen werden während der Ableitung mit einem Marker (z.B. Biozytin) gefüllt und können so für EM-Studien markiert werden. Dieser Versuchsansatz würde sehr detaillierte Studien zur Neurotrophin-Freisetzung zulassen, da auch sehr lokal, z.B. einzelne Ausläufer, stimuliert werden könnten und die Freisetzung in jedem Experiment mit der elektrophysiologischen Antwort der Neuronen korreliert werden könnte.

⁵⁰ Ob damit tatsächlich das Neurotrophin-Kompartiment markiert wird, könnte durch Doppelmarkierung mit einem Neurotrophin-Ak geprüft werden

⁵¹ In diesen Studien katalysierte HRP anschließend die Umsetzung von Diaminobenzidin in ein elektronendichtes Produkt.

⁵² In den meisten Studien wurden synaptische Vesikel mit FM1-43 markiert, was durch ihr schnelles Recycling möglich war (Betz et al., 1996). Wie gut der Farbstoff in kurzer Zeit von anderen Kompartimenten aufgenommen wird, ist noch nicht geklärt, könnte aber durch andere Kinetiken problematisch sein.

⁵³ Direkt nach einer stimulationsinduzierten Neurotrophin-Freisetzung konnten durch eine zweite Stimulation keine Neurotrophine freigesetzt werden. 20 min nach der ersten Stimulation war die Menge durch einen zweiten Stimulus freigesetzter Neurotrophine noch deutlicher geringer (Griesbeck et al., 1999). Die intrazelluläre Verteilung der Neurotrophine änderte sich nach einer Stimulation nicht sichtbar. Insofern muß es einen Mechanismus geben, der diese, direkt mit der Freisetzung assoziierten Kompartimente, auffüllt und mit dem man spezifisch interferieren könnte. Dieses postulierte freisetzungskompetente Kompartiment könnte z.B. ein direkt unter der Plasmamembran liegendes abgeschlossenes Kompartiment sein und durch den Nachtransport neuer Kompartimente aufgefüllt werden. Alternativ könnte es auch mit dem Speicherkompartiment in direktem Kontakt stehen und über andere Mechanismen (z.B. lokale Disaggregation, Transport innerhalb dieses Kompartimentes) aufgefüllt werden. In diesem Falle müßte die Exozytose durch eine nur transiente Fusion mit der Plasmamembran bewirkt werden.

5. Zusammenfassung

Eine modulatorische Rolle von Neurotrophinen in Prozessen aktivitätsabhängiger Plastizität wurde in zahlreichen Untersuchungen (zusammengefaßt von Thoenen, 1996*, Schuman, 1999*, McAllister et al., 1999*) gezeigt. Neurotrophine können diese Effekte über prä- und/oder postsynaptische Mechanismen in sehr kurzer Zeit bewirken. Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Neurotrophin-Verfügbarkeit zu definierten Zeiten und an definierten Orten zu untersuchen, und die zugrundeliegenden Mechanismen aufzuklären.

Da Neurotrophine nur in sehr geringen Mengen exprimiert werden, war ihre Überexpression notwendig, die durch die Verwendung adenoviraler Vektoren oder Sindbisviren sehr effizient in postmitotischen Neuronen möglich war. Im ersten Teil der Arbeit wurden diese beiden viralen Systeme miteinander verglichen: für eine Transduktion dissoziierter hippocampaler Neuronen war die Verwendung von Adenoviren zu bevorzugen, da Neuronen ohne zytotoxische Nebeneffekte Transgene bis zu zwei Wochen exprimieren konnten, während für einen lokalen Gentransfer in Kulturen hippocampaler Schnitte die Verwendung von Sindbisviren erfolgreicher war, da diese im Gegensatz zu Adenoviren auch in einer gliareichen Umgebung selektiv Neuronen transduzierten.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die Orte der Neurotrophin-Freisetzung mit ultrastruktureller Auflösung identifiziert. Dazu verwendeten wir NT6myc, da dieses Neurotrophin spezifisch an die Heparansulfatproteoglykane der neuronalen Oberfläche binden kann. Somit wird NT6 sofort nach seiner stimulusinduzierten Freisetzung an der Oberfläche gebunden, wo es mittels immunozytochemischer Methoden nachgewiesen wurde. Die myc-Markierung ermöglichte eine Epitoperkennung auch noch nach starker Fixierung, die notwendig für eine bestmögliche Strukturhaltung war. Die KCl-induzierte NT6myc-Freisetzung erfolgte vorwiegend aus neuronalen Ausläufern im Vergleich zum Soma. Allerdings konnte keine ortsspezifische Freisetzung, z.B. von synaptischen Strukturen oder Spines, entlang der neuronalen Ausläufer nachgewiesen werden, sondern eine sehr homogene Verteilung der Freisetzungstellen über die neuronale Oberfläche. Ob diese ortsunspezifische Freisetzung auch unter physiologischen Stimulusbedingungen erfolgt, sollte durch definierte Reizungen präsynaptischer Neuronen in Kokulturen präsynaptischer Explantate mit postsynaptischen dissoziierten Neuronen gezeigt werden. In diesen Kulturen ist sowohl eine räumlich isolierte Kultivierung als auch eine isolierte Transduktion prä- und postsynaptischer Neuronen möglich. Diese Untersuchungen zur NT6-Freisetzung zeigten zudem eindeutig, daß die regulierte Freisetzung aus einem intrazellulären Kompartiment erfolgt.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde versucht, die Speicher- und Freisetzungskompartimente von Neurotrophinen zu identifizieren, um Aussagen über die Regulation und die Art dieser speziellen Freisetzung machen zu können. Alle untersuchten Neurotrophine (NT6myc, NGF, NGFmyc und BDNFmyc) waren in hippocampalen Kulturen gleich verteilt: die Immunoreaktivität war im Soma akkumuliert und homogen in punktförmigen Strukturen über die neuronalen Ausläufer verteilt. Auf elektronenmikroskopischer Ebene wurde die Neurotrophine hauptsächlich in glatten Membranstrukturen unterschiedlicher Formen und Größen, oft auch in der Nähe von Mikrotubuli und synaptischen Vesikeln, lokalisiert. Eine Lokalisierung von Neurotrophinen in LDCV konnte in hippocampalen Neuronen nicht nachgewiesen werden.

Im letzten Teil der Arbeit wurden Neurotrophine mit definierten elektrischen Stimuli freigesetzt, wobei eine vom Stimuluster abhängig Sekretion beobachtet wurde: eine Freisetzung wurde zwar durch Stimulation mit 50 Hz Pulsen oder mit Theta-Bursts (100 Hz), aber nicht durch eine Stimulation mit 10 Hz Pulsen, induziert. Die Freisetzung ist somit abhängig von der Frequenz der Stimulation und auch von den Aktionspotentialen selbst, da eine Depolarisation der Neuronen alleine nicht ausreichte, die Freisetzung zu induzieren. Interessant bei diesen Untersuchungen ist, daß die Neurotrophin-Freisetzung sehr gut mit LTP-induzierenden Stimulustern korrelierte, während LTD-induzierende Pulse keine Freisetzung bewirkten.

6. Literatur

1. Acklin, C., K. Stoney, R.A. Rosenfeld, J.A. Miller, M.F. Rohde, and M. Haniu. 1993. Recombinant human brain-derived neurotrophic factor (rHuBDNF). Disulfide structure and characterization of BDNF expressed in CHO cells. *Int.J.Pept.Prot.Res.* 41:548-552.
2. Adam-Vizi, V. 1992. External Ca^{2+} -independent release of neurotransmitters. *J.Neurochem.* 58:395-405.
3. Aloyz, R., J.P. Fawcett, D.R. Kaplan, R.A. Murphy, and F.D. Miller. 1999. Activity-dependent activation of TrkB neurotrophin receptors in the adult CNS. *Learning & Memory* 6:216-231.
4. Anton, M. and F.L. Graham. 1995. Site-specific recombination mediated by an adenovirus vector expressing the Cre recombinase protein: a molecular switch for control of gene expression. *J. Virol.* 69:4600-4606.
5. Barbacid, M. 1995. Neurotrophic factors and their receptors. *Curr.Opin.Cell Biol.* 7:148-155.
6. Barde, Y.-A. 1989. Trophic factors and neuronal survival. *Neuron* 2:1525-1534.
7. Barde, Y.-A., D. Edgar, and H. Thoenen. 1982. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.* 1:549-553.
8. Bartlett, W.P. and G.A. Banker. 1984a. An electron microscopic study of the development of axons and dendrites by hippocampal neurons in culture. I. Cells which develop without intercellular contacts. *J. Neurosci.* 4:1944-1953.
9. Bartlett, W.P. and G.A. Banker. 1984b. An electron microscopic study of the development of axons and dendrites by hippocampal neurons in culture. II. Synaptic relationships. *J. Neurosci.* 4:1954-1965.
10. Bergelson, J.M., J.A. Cunningham, G. Droguett, E.A. Kurt-Jones, A. Krithivas, J.S. Hong, M.S. Horwitz, R.L. Crowell, and R.W. Finberg. 1997. Isolation of a common receptor for Cocksackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275:1320-1323.
11. Bergquist F., J. Jonason, E. Pileblad, and H. Nissbrandt. 1998. Effects of local administration of L-, N-, and P/Q-Type calcium channel blockers on spontaneous dopamine release in the substantia nigra: A microdialysis study in rat. *J. Neurochem.* 70: 1532-1540.
12. Berkemeier, L.R., J.W. Winslow, D.R. Kaplan, K. Nikolics, D.V. Goeddel, and A. Rosenthal. 1991. Neurotrophin-5: A novel neurotrophic factor that activates trk and trkB. *Neuron* 7:857-866.
13. Berninger, B. and M.M. Poo. 1996. Fast actions of neurotrophic factors. *Curr. Opin.Neurobiol.* 6:324-330.
14. Berninger, B., A.F. Schinder, and M.M. Poo. 1999. Synaptic reliability correlates with reduced susceptibility to synaptic potentiation by brain-derived neurotrophic factor. *Learning & Memory* 6:232-242.
15. Berridge, M.J. 1998. Neuronal calcium signaling. *Neuron* 21:13-26.
16. Betz, W.J., F. Mao, and C.B. Smith. 1996. imaging exocytosis and endocytosis. *Curr.Opin.Neurobiol* 6:365-371.
17. Blanquet, P.R. and Y. Lamour. 1997. Brain-derived neurotrophic factor increases ca^{2+} /calmodulin-dependent protein-kinase-2 activity in hippocampus. *J. Biol. Chem.* 272:24133-24136.
18. Blöchl, A. 1998. Snap-25 and syntaxin, but not synaptobrevin-2, cooperate in the regulated release of nerve growth-factor. *Neuroreport.* 9:1701-1705.
19. Blöchl, A. and C. Sirrenberg. 1996. Neurotrophins stimulate the release of dopamine from rat mesencephalic neurons via trk and p75(Intr) receptors. *J.Biol.Chem.* 271:21100-21107.

20. Blöchl, A. and H. Thoenen. 1995. Characterization of nerve growth factor (NGF) release from hippocampal neurons: Evidence for a constitutive and an unconventional sodium-dependent regulated pathway. *Eur.J.Neurosci.* 7:1220-1228.
21. Blöchl, A. and H. Thoenen. 1996. Localization of cellular storage compartments and sites of constitutive and activity-dependent release of nerve growth factor (NGF) in primary cultures of hippocampal neurons. *Mol.Cell.Neurosci.* 7:173-190.
22. Bothwell, M. 1995. Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors. *Annu.Rev.Neurosci.* 18:223-253.
23. Boulanger, L. and M. Poo. 1999. Presynaptic depolarization facilitates neurotrophin-induced synaptic potentiation. *Nature Neurosci.* 2:346-351.
24. Boyer, C., T. Schikorski, and C.F. Stevens. 1998a. Comparison of hippocampal dendritic spines in culture and in brain. *J. Neurosci.* 18:5294-5300.
25. Cabelli, R.J., A. Hohn, and C.J. Shatz. 1995. Inhibition of ocular dominance column formation by infusion of NT-4/5 or BDNF. *Science* 267:1662-1666.
26. Cabelli, R.J., D.L. Shelton, R.A. Segal, and C.J. Shatz. 1997. Blockade of endogenous ligands of TrkB inhibits formation of ocular dominance columns. *Neuron* 19:63-76.
27. Canossa, M., O. Griesbeck, B. Berninger, G. Campana, R. Kolbeck, and H. Thoenen. 1997. Neurotrophin release by neurotrophins - Implications for activity-dependent neuronal plasticity. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 94:13279-13286.
28. Carroll, R.C., D.V. Lissin, M. von Zastrow, R.A. Nicoll, Malenka, and RC. 1999. Rapid redistribution of glutamate receptors contributes to long-term depression in hippocampal cultures. *Nature Neurosci.* 2:454-460.
29. Castrén, E., F. Zafra, H. Thoenen, and D. Lindholm. 1992. Light regulates expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat visual cortex. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 89:9444-9448.
30. Chen, G.Q., R. Kolbeck, Y.A. Barde, T. Bonhoeffer, and A. Kossel. 1999. Relative contribution of endogenous neurotrophins in hippocampal long-term potentiation. *J. Neurosci.* 19:7983-7990.
31. Clemens P.R., S.Kochanek, Y. Sunada, S. Chan, H.-H. Chen, K.P. Campbell, and C.T. Caskey. 1996. In vivo muscle gene transfer of full-length dystrophin with an adenoviral vector that lacks all viral genes. *Gene Therap.* 3: 965-972
32. Coco S., G. Raposo, S. Martinez, J.J. Fontaine, S. Takamori, A. Zahraoui, R. Jahn, M. Matteolie, D. Louvard, and T. Galli. 1999. Subcellular localization of tetanus neurotoxin-insensitive vesicle-associated membrane protein (VAMP)/VAMP7 in neuronal cells: Evidence for a novel membrane compartment. *J. Neurosci* 15: 9803-9812
33. Conner, J.M., J.C. Lauterborn, Q. Yan, C.M. Gall, and S. Varon. 1997. Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and messenger-RNA in the normal adult-rat CNS - evidence for anterograde axonal-transport. *J. Neurosci.* 17:2295-2313.
34. Crozier, R.A., I.B. Black, and M.R. Plummer. 1999. Blockade of NR2B-containing NMDA receptors prevents BDNF enhancement of glutamatergic transmission in hippocampal neurons. *Learning & Memory* 6:257-266.
35. Cruz-Orive, L.M. and E.R. Weibel. 1981. Sampling designs for stereology. *J. Microsc.* 122:235-257.
36. Cruz-Orive, L.M. 1989. On the precision of systematic sampling: A review of Matheron's transitive methods. *J. Microsc.* 153: 315-333.
37. Davies, A.M., L. Minichiello, and R. Klein. 1995. Developmental changes in NT3 signalling via TrkA and TrkB in embryonic neurons. *EMBO J.* 14:4482-4489.

38. Deisseroth, K., H. Bito, and R.W. Tsien. 1996. Signaling from synapse to nucleus: Postsynaptic CREB phosphorylation during multiple forms of hippocampal synaptic plasticity. *Neuron* 16:89-101.
39. Destexhe, A., D. Contreras, M. Steriade, T.J. Sejnowski, and J.R. Huguenard. 1996. In vivo, in vitro, and computational analysis of dendritic calcium currents in thalamic reticular neurons. *J.Neurosci.* 16:169-185.
40. Dotti, C.G., C.A. Sullivan, and G.A. Banker. 1988. The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J.Neurosci.* 8:1454-1468.
41. Drake, C.T., T.A. Milner, and S.L. Patterson. 1999. Ultrastructural localization of full-length trkB immunoreactivity in rat hippocampus suggests multiple roles in modulating activity-dependent synaptic plasticity. *J.Neurosci* 19:8009-8026.
42. Drake, C.T., G.W. Terman, M.L. Simmons, T.A. Milner, D.D. Kunkel, P.A. Schwartzkroin, and C. Chavkin. 1994. Dynorphin opioids present in dentate granule cells may function as retrograde inhibitory neurotransmitters. *J. Neurosci.* 14:3736-3750.
43. Easton, R.M., E.M. Johnson, and D.J. Creedon. 1998. Analysis of events leading to neuronal death after infection with e1-deficient adenoviral vectors. *Mol.Cell.Neurosci* 11:334-347.
44. Ehrenguber, M.U., K. Lundstrom, C. Schweitzer, C. Heuss, S. Schlesinger, and B.H. Gähwiler. 1999. Recombinant Semliki Forest virus and Sindbis virus efficiently infect neurons in hippocampal slice cultures. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 96:7041-7046.
45. Emptage, N., T.V.P. Bliss, and A. Fine. 1999. Single synaptic events evoke NMDA receptor-mediated release of calcium from internal stores in hippocampal dendritic spines. *Neuron* 22:115-124.
46. Ernfors, P., C.F. Ibáñez, T. Ebendal, L. Olson, and H. Persson. 1990. Molecular cloning and neurotrophic activities of a protein with structural similarities to nerve growth factor: Developmental and topographical expression in the brain. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 87:5454-5458.
47. Falkenberg, T., N. Lindfors, F. Camilli, M. Metsis, and U. Ungerstedt. 1996. Glutamate release correlates with brain-derived neurotrophic factor and TrkB messenger-RNA expression in the CA1 region of rat hippocampus. *Mol.Brain Res.* 42:317-327.
48. Figurov, A., L.D. Pozzo-Miller, P. Olafsson, T. Wang, and B. Lu. 1996. Regulation of synaptic responses to high-frequency stimulation and LTP by neurotrophins in the hippocampus. *Nature* 381:706-709.
49. Frade, J.M., A. Rodrigueztebar, and Y.A. Barde. 1996. Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor. *Nature* 383:166-168.
50. Frerking, M., R.C. Malenka, and R.A. Nicoll. 1998. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) modulates inhibitory, but not excitatory, transmission in the CA1 region of the hippocampus. *J.Neurophysiol.* 80:3383-3386.
51. Frey, U. and R.G.M. Morris. 1997. Synaptic tagging and long-term potentiation. *Nature* 385:533-536.
52. Götz, R., R. Köster, C. Winkler, F. Raulf, F. Lottspeich, M. Scharl, and H. Thoenen. 1994. Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. *Nature* 372:266-269.
53. Gall, C.M. and P.J. Isackson. 1989. Limbic Seizures Increase Neuronal Production of Messenger RNA for Nerve Growth Factor. *Science* 245:758-761.
54. Gallo, G., F.B. Lefcort, and P.C. Letourneau. 1997. The trkA receptor mediates growth cone turning toward a localized source of nerve growth factor. *J. Neurosci.* 17:5445-5454.
55. Galuske, R.A.W., D.S. Kim, E. Castren, H. Thoenen, and W. Singer. 1996. Brain-derived neurotrophic factor reverses experience-dependent synaptic modifications in kitten visual cortex. *EurJ.Neurosci* 8:1554-1559.

56. Ghosh, A. and M.E. Greenberg. 1995. Distinct roles for bFGF and NT-3 in the regulation of cortical neurogenesis. *Neuron* 15:89-103.
57. Goodman, L.J., J. Valverde, F. Lim, M.D. Geschwind, H.J. Federoff, A.I. Geller, and F. Hefti. 1996. Regulated release and polarized localization of brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons. *MolCell Neurosci.* 7:222-238.
58. Goslin K., H. Asmussen, and G. Banker. 1998. Rat hippocampal neurons in Low-density culture. In : *Culturing nerve cells.* (ed. Banker G. and K. Goslin) pp339-370. 2. Auflage. MIT press: Cambridge.
59. Graham, F.L., J. Smiley, W.C. Russell, and R. Nairn. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36:59-74.
60. Griesbeck, O., M. Canossa, G. Campana, A. Gärtner, M.C. Hoener, H. Nawa, R. Kolbeck, and H. Thoenen. 1999. 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.Techn.* 45:262-275.
61. Griesbeck, O.; M. Korte, C. Gravel, T. Bonhoeffer, and H. Thoenen. 1997. Rapid gene-transfer into cultured hippocampal-neurons and acute hippocampal slices using adenoviral vectors. *Mol. Brain Res.* 44: 171-177
62. Hallbook, F., C.F. Ibanez, and H. Persson. 1991. Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron* 6:845-858.
63. Hashimoto M., J. Aruga, Y. Hosaya, Y. Kanegae, I. Saito, K.A. Mikoshiba, 1996. Neural cell-type specific expression system using recombinant adenovirus vectors. *Hum. Gene Ther.* 7: 149-158
64. Haubensak, W., F. Narz, R. Heumann, and V. Lessmann. 1998. BDNF-GFP containing secretory granules are localized in the vicinity of synaptic junctions of cultured cortical-neurons. *J. Cell Sci.* 111:1483-1493.
65. Hawkins R.D., E.R. Kandel, and S.A. Siegelbaum. 1993. Learning to modulate transmitter release: Themes and variations in synaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* 16: 625-665
66. Hebb D.O. 1949. The organisation of behavior. A neuropsychological theory. New York: Wiley.
67. Herndon, M.E. and A.D. Lander. 1990. A diverse set of developmentally regulated proteoglycans is expressed in the rat central nervous system. *Neuron* 4:949-961.
68. Heymach, J.V., A. Kruttgen, U. Suter, and E.M. Shooter. 1996a. The regulated secretion and vectorial targeting of neurotrophins in neuroendocrine and epithelial-cells. *J. Biol. Chem.* 271:25430-25437.
69. Hohn, A., J. Leibrock, K. Bailey, and Y.-A. Barde. 1990. Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature* 344:339-341.
70. Hökfelt T., 1991. Neuropeptides in Perspective: The last ten years. *Neuron*, 7: 867-879
71. Holm, N.R., P. Christophersen, S.P. Olesen, and S. Gammeltoft. 1997. Activation of calcium-dependent potassium channels in rat- brain neurons by neurotrophin-3 and nerve growth-factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 94:1002-1006.
72. Horch, H.W., A. Kruttgen, S.D. Portbury, and L.C. Katz. 1999. Destabilization of cortical dendrites and spines by BDNF. *Neuron* 23:353-364.
73. Hubel, D.H. and T.N. Wiesel. 1970. The period of susceptibility to the physiological effects of unilateral eye closure in kittens. *J.Physiol.* 206:419-436.
74. Huttner W.B., E. Friedrich, H.-H. Gerdes, C. Niehrs, and P. Rosa. 1988. Tyrosine sulfation and tyrosine sulfated proteins common to endocrine secretory granules. In *Progress in endocrinology* (ed. H. Imura et al.). p 325, Exertpta Medica, Elsevier Amsterdam.

75. Ibanez, C.F. 1994. Structure-function relationships in the neurotrophin family. *J. Neurobiol.* 25:1349-1361.
76. Inagaki, N., H. Thoenen, and D. Lindholm. 1995. TrkA tyrosine residues involved in NGF-induced neurite outgrowth of PC12 cells. *Eur.J.Neurosci.* 7:1125-1133.
77. Jonas, E.A., R.J. Knox, T.C.M. Smith, N.L. Wayne, J.A. Connor, and L.K. Karzmarek. 1997. Regulation by insulin of a unique neuronal Ca²⁺ pool and of neuropeptide secretion. *Nature* 385:343-346.
78. Jovanovic, J.N., F. Benfenati, Y.L. Siow, T.S. Sihra, J.S. Sanghera, S.L. Pelech, P. Greengard, and A.J. Czernik. 1996. Neurotrophins stimulate phosphorylation of synapsin I by MAP kinase and regulate synapsin I-actin interactions. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 93:3679-3683.
79. Kaether, C., T. Salm, M. Glombik, W. Almers, and H.H. Gerdes. 1997. Targeting of green fluorescent protein to neuroendocrine secretory granules – A new tool for real time studies of regulated protein secretion. *Eur.J. Cell Biol.* 74:133-142.
80. Kammesheidt, A., K.I. Ito, K. Kato, L.P. Villarreal, and K. Sumikawa. 1996. Transduction of hippocampal CA1 by adenovirus in-vivo. *Brain Res.* 736:297-304.
81. Kandel E.R., J.H. Schwartz, T.M.Jessel. 1996. *Neurowissenschaften: Eine Einführung*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
82. Kang, H.J., A.A. Welcher, D. Shelton, and E.M. Schuman. 1997. Neurotrophins and time - different roles for trkB signaling in hippocampal long-term potentiation. *Neuron* 19:653-664.
83. Kaplan, D.R. 1998. Studying signal transduction in neuronal cells: The Trk/NGF system. *Progr.Brain Res.* 117:35-46.
84. Kaplan, D.R. and F.D. Miller. 1997. Signal transduction by the neurotrophin receptors. *Curr.Opin.Cell Biol.* 9:213-221.
85. Karpati, G., H. Lochmüller, J. Nalbantoglu, and H. Durham. 1996. The principles of gene therapy for the nervous system. *Trends Neurosci.* 19:49-54.
86. Kinoshita, S., H. Yasuda, N. Taniguchi, R. Katohsema, H. Hatanaka, and T. Tsumoto. 1999. Brain-derived neurotrophic factor prevents low-frequency inputs from inducing long-term depression in the developing visual cortex. *J.Neurosci* 19:2122-2130.
87. Klose, J. 1998. Lokalisierung des Neurotrophins BDNF durch Gensubstitution in transgenen Mäusen. *Dissertation, Fakultät für Biologie der Universität München*.
88. Knipper, M., M. da Penha Berzaghi, A. Blöchl, H. Breer, H. Thoenen, and D. Lindholm. 1994. Positive feedback between acetylcholine and the neurotrophins nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in the rat hippocampus. *Eur.J.Neurosci.* 6:668-671.
89. Knipper, M., L.S. Leung, D. Zhao, and R.J. Rylett. 1994. Short-term modulation of glutamatergic synapses in adult rat hippocampus by NGF. *NeuroReport* 5:2433-2436.
90. Koizumi, S., M.D. Bootman, L.K. Bobanovic, M.J. Schell, M.J. Berridge, P. Lipp, and M. Bootman. 1999. Characterization of elementary Ca²⁺ release signals in NGF-differentiated PC12 cells and hippocampal neurons. *Neuron* 22:125-137.
91. Kombian, S.B. and R.C. Malenka. 1994. Simultaneous LTP of non-NMDA- and LTD of NMDA-receptor-mediated responses in the nucleus accumbens. *Nature* 368:242-246.
92. Korte, M., P. Carroll, E. Wolf, G. Brem, H. Thoenen, and T. Bonhoeffer. 1995. Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 92:8856-8860.

93. Korte, M., O. Griesbeck, C. Gravel, P. Carroll, V. Staiger, H. Thoenen, and T. Bonhoeffer. 1996. Virus-mediated gene transfer into hippocampal CA1 region restores long-term potentiation in brain-derived neurotrophic factor mutant mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 93:12547-12552.
94. Korte, M., H. Kang, T. Bonhoeffer, and E. Schuman. 1998. A role for BDNF in the late-phase of hippocampal long-term potentiation. *Neuropharmacology* 37:553-559.
95. Kotin, R.M. 1994. Prospects for the use of adeno-associated virus as a vector for human gene therapy. *Hum.Gene Ther.* 5:793-801.
96. Kozak, M. 1991. An analysis of vertebrate mRNA sequences: Intimations of translational control. *J.Cell Biol.* 115:887-903.
97. Krüttgen, A., J.C. Möller, J.V. Heymach, and E.M. Shooter. 1998. Neurotrophins induce release of neurotrophins by the regulated secretory pathway. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 95:15867-15867.
98. Lai, K.O., W.Y. Fu, F.C.F. Ip, and N.Y. Ip. 1998. Cloning and expression of a novel neurotrophin, NT-7, from carp. *Mol.Cell Neurosci.* 11:64-76.
99. Lamballe, F., P. Tapley, and M. Barbacid. 1993. *TrkC* encodes multiple neurotrophin-3 receptors with distinct biological properties and substrate specificities. *EMBO J.* 12:3083-3094.
100. Leib, D.A. and P.D. Olivo. 1993. Gene delivery to neurons: Is herpes simplex virus the right tool for the job. *BioEssays* 15:547-554.
101. Leibrock, J., F. Lottspeich, A. Hohn, M. Hofer, B. Hengerer, P. Masiakowski, H. Thoenen, and Y.-A. Barde. 1989. Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature* 341:149-152.
102. Lessmann, V., K. Gottmann, and R. Heumann. 1994. BDNF and NT-4/5 enhance glutamatergic synaptic transmission in cultured hippocampal neurones. *NeuroReport* 6:21-25.
103. Levi-Montalcini, R. 1987. The nerve growth factor 35 years later. *Science* 237:1154-1162.
104. Levine, E.S., R.A. Crozier, I.B. Black, and M.R. Plummer. 1998. Brain-derived neurotrophic factor modulates hippocampal synaptic transmission by increasing N-methyl-D-aspartic acid receptor activity. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 95:10235-10239.
105. Levine, E.S., C.F. Dreyfus, I.B. Black, and M.R. Plummer. 1995. Brain-derived neurotrophic factor rapidly enhances synaptic transmission in hippocampal neurons via postsynaptic tyrosine kinase receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 92:8074-8077.
106. Lewin, G.R. and Y.A. Barde. 1996. Physiology of the neurotrophins. *Annu. Rev. Neurosci.* 19:289-317.
107. Lewin, G.R., S.J.W. Lisney, and L.M. Mendell. 1992. Neonatal anti-NGF treatment reduces the A δ - and C-fibre evoked vasodilator responses in rat skin: Evidence that nociceptor afferents mediate antidromic vasodilatation. *Eur.J.Neurosci.* 4:1213-1218.
108. Li H.-S., X.-Z. S. Xu, and C. Montell. 1999. Activation of a TRPC3-dependent cation current through the neurotrophin BDNF. *Neuron.* 24: 261-273
109. Liljeström, P. and H. Garoff. 1991. A new generation of animal cell expression vectors based on the Semliki Forest virus replicon. *BioTechnology* 9:1356-1361.
110. Lindholm, D., E. Castrén, M. Berzaghi, A. Blöchl, and H. Thoenen. 1994. Activity-dependent and hormonal regulation of neurotrophin mRNA levels in the brain--Implications for neuronal plasticity. *J.Neurobiol.* 25:1362-1372.
111. Lissin, D.V.; S.N. Gomperts, R.C. Carroll, C.W. Christine, Kalman, M. Kitamura, S. Hardy, R.A. Nicoll, R.C. Malenka, and M. Vonzastrow. 1998. Activity differentially regulates the surface expression of synaptic AMPA and NMDA glutamate receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 95:7097-7102

- 112.Liu, G.S., S.W. Choi, and R.W. Tsien. 1999. Variability of neurotransmitter concentration and nonsaturation of postsynaptic AMPA receptors at synapses in hippocampal cultures and slices. *Neuron* 22:395-409.
- 113.Lledo, P.M., X.Y. Zhang, T.C. Sudhof, R.C. Malenka, and R.A. Nicoll. 1998. Postsynaptic membrane-fusion and long-term potentiation. *Science* 279:399-403.
- 114.Lo, D.C., A.K. McAllister, and L.C. Katz. 1994. Neuronal transfection in brain slices using particle-mediated gene transfer. *Neuron* 13:1263-1268.
- 115.Lohof, A.M., N.Y. Ip, and M. Poo. 1993. Potentiation of developing neuromuscular synapses by the neurotrophins NT-3 and BDNF. *Nature* 363:350-353.
- 116.Ludwig M. 1998. Dendritic release of Vasopressin and Oxytocin. *J. Neuroendocrinol.* 10: 881-895
- 117.Lundberg J.M., and T. Hökfelt. 1983. *Trends Neurosci.* 6: 325-333
- 118.Maisonpierre, P.C., L. Belluscio, S. Squinto, N.Y. Ip, M.E. Furth, R.M. Lindsay, and G.D. Yancopoulos. 1990. Neurotrophin-3: A neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science* 247:1446-1451.
- 119.Maletic-Savatic, M., T.R. Malinow, K. Svoboda. 1999. Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity. *Science* 283: 1923-1927.
- 120.Maletic-Savatic, M. and R. Malinow. 1998. Calcium-evoked dendritic exocytosis in cultured hippocampal neurons. Part I: Trans-Golgi network-derived organelles undergo regulated exocytosis. *J.Neurosci.* 18:6803-6813.
- 121.Marini, A.M., S.J. Rabin, R.H. Lipsky, and I. Mocchetti. 1998. Activity-dependent release of brain-derived neurotrophic factor underlies the neuroprotective effect of N-methyl-D-aspartate. *J.Biol.Chem.* 273:29394-29399.
- 122.Marty, S., M.D. Berzaghi, and B. Berninger. 1997. Neurotrophins and activity-dependent plasticity of cortical interneurons. *Trends Neurosci.* 20:198-202.
- 123.McAllister, A.K., L.C. Katz, and D.C. Lo. 1996. Neurotrophin regulation of cortical dendritic growth requires activity. *Neuron* 17:1057-1064.
- 124.McAllister, A.K., L.C. Katz, and D.C. Lo. 1999. Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu.Rev. Neurosci.* 22:295-318.
- 125.McDonald, N.Q., R. Lapatto, J. Murray-Rust, J. Gunning, A. Wlodawer, and T.L. Blundell. 1991. New protein fold revealed by a 2.3-Å resolution crystal structure of nerve growth factor. *Nature* 354:411-414.
- 126.McGrory, W.J., D.S. Bautista, and F.L. Graham. 1988. A simple Technique for the Rescue of Early Region I Mutations into Infectious Human Adenovirus Type 5. *Virology* 163:614-617.
- 127.Metsis, M., T. Timmusk, E. Arenas, and H. Persson. 1993. Differential usage of multiple brain-derived neurotrophic factor promoters in the rat brain following neuronal activation. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90:8802-8806.
- 128.Meyerfranke, A., G.A. Wilkinson, A. Kruttgen, M. Hu, E. Munro, M.G. Hanson, L.F. Reichardt, and B.A. Barres. 1998. Depolarization and cAMP elevation rapidly recruit TrkB to the plasma membrane of CNS neurons. *Neuron* 21:681-693.
- 129.Michael, G.J., S. Averill, A. Nitkunan, M. Rattray, D.L.H. Bennett, Q. Yan, and J.V. Priestley. 1997. Nerve growth-factor treatment increases brain-derived neurotrophic factor selectively in trka-expressing dorsal- root ganglion-cells and in their central terminations within the spinal-cord. *J.Neurosci.* 17:8476-8490.
- 130.Middlemas, D.S., R.A. Lindberg, and T. Hunter. 1991. *trkB*, A neural receptor protein-tyrosine kinase: Evidence for a full-length and two truncated receptors. *Mol.Cell.Biol.* 11:143-153.

131. Minichiello, L., F. Casagrande, R.S. Tatche, C.L. Stucky, A. Postigo, Lewin, GR, A.M. Davies, and R. Klein. 1998. Point mutation in *trkB* causes loss of NT4-dependent neurons without major effects on diverse BDNF responses. *Neuron* 21:335-345.
132. Miyaguchi, K., Y. Maeda, T. Kojima, Y. Setoguchi, and N. Mori. 1999. Neuron-targeted gene transfer by adenovirus carrying neural- restrictive silencer element. *Neuroreport*. 10:2349-2353.
133. Möller, J.C., A. Krüttgen, J.V. Heymach, N. Ghori, and E.M. Shooter. 1998. Subcellular localization of epitope-tagged neurotrophins in neuroendocrine cells. *J. Neurosci. Res.* 51:463-472.
134. Morris, B.J. and H.M. Johnston. 1995. A role for hippocampal opioids in long-term functional plasticity. *Trends Neurosci.* 18:350-355.
135. Moss B. 1987. The molecular basis of poxviruses. In *The molecular basis of viral replication*. (R.P. Bercoff, Ed), pp. 499-516. Plenum Press, New York and London.
136. Mowla, S.J., S. Pareek, H.F. Farhadi, K. Petrecca, J.P. Fawcett, N.G. Seidah, S.J. Morris, W.S. Sossin, and R.A. Murphy. 1999. Differential sorting of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 19:2069-2080.
137. Naldini, L., U. Blömer, P. Gallay, D. Ory, R. Mulligan, F.H. Gage, I.M. Verma, and D. Trono. 1996. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272:263-267.
138. Neale, J.H., J.L. Barker, G.R. Uhl, and S.H. Snyder. 1978. Enkephalin-containing neurones visualized in spinal cord cultures. *Science* 201:467-468.
139. Nilsson, A.S., M. Fainzilber, P. Falck, and C.F. Ibanez. 1998. Neurotrophin-7 - a novel member of the neurotrophin family from the zebrafish. *FEBS Letters* 424:285-290.
140. Nirenberg, M.J.; J. Chan, Y.J. Liu, R.H. Edwards, and V.M. Pickel. 1996. Ultrastructural localization of the vesicular monoamine transporter-2 in midbrain dopaminergic neurons - potential sites for somatodendritic storage and release of dopamine. *J. Neurosci.* 16:4135-4145
141. Oppenheim R.W. 1996. The concept of uptake and retrograde transport of neurotrophic molecules during development. *Neurochem. Res.* 35: 445-451
142. Papa, M., M.C. Bundman, V. Greenberger, and M. Segal. 1995. Morphological analysis of dendritic spine development in primary cultures of hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 15:1-11.
143. Patterson, S.L., T. Abel, T.A.S. Deuel, K.C. Martin, J.C. Rose, and E.R. Kandel. 1996. Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice. *Neuron* 16:1137-1145.
144. Patterson, S.L., L.M. Grover, P.A. Schwartzkroin, and M. Bothwell. 1992. Neurotrophin expression in rat hippocampal slices: a stimulus paradigm inducing LTP in CA1 evokes increases in BDNF and NT-3 mRNAs. *Neuron* 9:1081-1088.
145. Pérez, P., P.M. Coll, B.L. Hempstead, D. Martín-Zanca, and M.V. Chao. 1995. NGF binding to the *trk* tyrosine kinase receptor requires the extracellular immunoglobulin-like domains. *Mol. Cell. Neurosci.* 6:97-105.
146. Pinco, O., C. Carmeli, A. Rosenthal, and C. Kalcheim. 1993. Neurotrophin-3 affects proliferation and differentiation of distinct neural crest cells and is present in the early neural tube of avian embryos. *J. Neurobiol.* 24:1626-1641.
147. Pozzo-Miller, L.D., W. Gottschalk, L. Zhang, K. McDermott, J. Du, R. Gopalakrishnan, C. Oho, Z.H. Sheng, and B. Lu. 1999. Impairments in high-frequency transmission, synaptic vesicle docking, and synaptic protein distribution in the hippocampus of BDNF knockout mice. *J. Neurosci.* 19:4972-4983.

148. Prange, O.; and T.H. Murphy. 1999. Analysis of multiquantal transmitter release from single cultured cortical neuron terminals. *J. Neurophysiol.* 81: 1810-1817
149. Reichardt L.F., and I. Farinas. 1997. Neurotrophic factors and their receptors. pp 220-263. In *Molecular and cellular approaches to neural development* (ed. Cowan et al.). Oxford University press: New York and Oxford.
150. Reynolds P. N. 1999. Insertion of an RGD motif into the HI loop of adenovirus fiber protein. *Gene Therapy.* 6: 1336-1339
151. Rubio, M.E. and R.J. Wenthold. 1999. Differential distribution of intracellular glutamate receptors in dendrites. *J. Neurosci.* 19:5549-5562.
152. Rutherford, L.C., S.B. Nelson, and G.G. Turrigiano. 1998. BDNF has opposite effects on the quantal amplitude of pyramidal neuron and interneuron excitatory synapses. *Neuron* 21:521-530.
153. Sala, R., A. Viegi, F.M. Rossi, T. Pizzorusso, G. Bonanno, M. Raiteri, and L. Maffei. 1998. Nerve growth-factor and brain-derived neurotrophic factor increase neurotransmitter release in the rat visual-cortex. *Eur.J. Neurosci.* 10:2185-2191.
154. Sandler, V.M. and J.G. Barbara. 1999. Calcium-induced calcium release contributes to action potential-evoked calcium transients in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J. Neurosci.* 19:4325-4336.
155. Schuman, E.M. 1999. Neurotrophin regulation of synaptic transmission. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9:105-109.
156. Segal, R.A. and M.E. Greenberg. 1996. Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Annu. Rev. Neurosci.* 19:463-489.
157. Shi, S.H., Y. Hayashi, R.S. Petralia, S.H. Zaman, R.J. Wenthold, K. Svoboda, and R. Malinow. 1999. Rapid spine delivery and redistribution of AMPA receptors after synaptic NMDA receptor activation. *Science* 284:1811-1816.
158. Shieh, P.B., S.C. Hu, K. Bobb, T. Timmusk, and A. Ghosh. 1998. Identification of a signaling pathway involved in calcium regulation of bdnf expression. *Neuron* 20:727-740.
159. Slack, R.S. and F.D. Miller. 1996. Viral vectors for modulating gene expression in neurons. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6:576-583.
160. Spacek, J. and K.M. Harris. 1997. 3-dimensional organization of smooth endoplasmic-reticulum in hippocampal ca1 dendrites and dendritic spines of the immature and mature rat. *J. Neurosci.* 17:190-203.
161. Steyer, J.A., H. Horstmann, and W. Almers. 1997. Transport, docking and exocytosis of single secretory granules in live chromaffin cells. *Nature* 388:474-478.
162. Stoop, R.; Poo, M. 1995. Potentiation of transmitter release by ciliary neurotrophic factor requires somatic signaling. *Science* 267:695-699
163. Stoppini, L., P.A. Buchs, and D. Muller. 1991. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J. Neurosci. Meth.* 37:173-182.
164. Strand F.L. 1998. Neuropeptides: Regulators of physiological processes. MIT-press: Cambridge.
165. Suen, P.C., K. Wu, E.S. Levine, H.T.J. Mount, J.L. Xu, S.Y. Lin, and I.B. Black. 1997. Brain-derived neurotrophic factor rapidly enhances phosphorylation of the postsynaptic N-methyl-D-aspartate receptor subunit-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:8191-8195.
166. Suter, U., J.V. Heymach, Jr., and E.M. Shooter. 1991. Two conserved domains in the NGF propeptide are necessary and sufficient for the biosynthesis of correctly processed and biologically active NGF. *EMBO J.* 10:2395-2400.

167. Takei, N., T. Numakawa, S. Kozaki, N. Sakai, Y. Endo, M. Takahashi, and H. Hatanaka. 1998. Brain-derived neurotrophic factor induces rapid and transient release of glutamate through the non-exocytotic pathway from cortical-neurons. *J. Biol. Chem.* 273:27620-27624.
168. Tanaka, T., H. Saito, and N. Matsuki. 1997. Inhibition of GABA(A) synaptic responses by brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in rat hippocampus. *J. Neurosci.* 17:2959-2966.
169. Tao, X., S. Finkbeiner, D.B. Arnold, A.J. Shaywitz, and M.E. Greenberg. 1998. Ca²⁺ influx regulates bdnf transcription by a creb family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron* 20:709-726.
170. Thoenen, H. 1991. The changing scene of neurotrophic factors. *TINS* 14:165-170.
171. Thoenen, H. 1995. Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science* 270:593-598.
172. Wang, Q. and J.Q. Zheng. 1998. cAMP-mediated regulation of neurotrophin-induced collapse of nerve growth cones. *J. Neurosci.* 18:4973-4984.
173. Westrum L. E., and E.G. Gray. 1986. New observations on the substructure of the active zone of brain synapses and motor endplates. *Proc.R.Soc.Lond.* 229: 29-38
174. Wilkemeyer, M.F., K.L. Smith, M.M. Zarei, T.A. Benke, J.W. Swann, K.J. Angelides, and R.C. Eisensmith. 1996a. Adenovirus-mediated gene transfer into dissociated and explant cultures of rat hippocampal neurons. *J.Neurosci.Res.* 43:161-174.
175. Williams, K., S.L. Russell, Y.M. Shen, and P.B. Molinoff. 1993. Developmental switch in the expression of NMDA receptors occurs in vivo and in vitro. *Neuron* 10:267-278.
176. Yan, Q., M.J. Radeke, C.R. Matheson, J. Talvenheimo, A.A. Welcher, Feinstein, and SC. 1997. Immunocytochemical localization of trkB in the central nervous system of the adult. *J. Comp. Neurol.* 382:546-547.
177. Yuste, R. and W. Denk. 1995. Dendritic spines as basic functional units of neuronal integration. *Nature* 375:682-684.
178. Zafra, F., E. Castrén, H. Thoenen, and D. Lindholm. 1991. Interplay between glutamate and gamma-aminobutyric acid transmitter systems in the physiological regulation of brain derived neurotrophic factor and nerve growth factor synthesis in hippocampal neurons. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 88:10037-10041.
179. Zafra, F., B. Hengerer, J. Leibrock, H. Thoenen, and D. Lindholm. 1990. Activity dependent regulation of BDNF and NGF mRNAs in the rat hippocampus is mediated by non-NMDA glutamate receptors. *EMBO J.* 9:3545-3550.
180. Zaidi, Z.F. and M.R. Matthews. 1997. Exocytotic release from neuronal cell bodies, dendrites and nerve terminals in sympathetic ganglia of the rat, and its differential regulation. *Neuroscience* 80:861-891.
181. Zhou, X.F. and R.A. Rush. 1996. Endogenous brain-derived neurotrophic factor is anterogradely transported in primary sensory neurons. *Neuroscience* 74:945-951.

Meine akademischen Lehrer in alphabetischer Reihenfolge:

Universität Tübingen

Dr. Martin Bähler
Prof. emer. Dr. Ernst Bayer
Prof. Dr. Hans Bisswanger
Prof. Dr. Peter Bohley
Prof. Dr. Volkmar Braun
Prof. Dr. Karl Eisele
Priv.-Doz. Kai-Uwe Fröhlich
Prof. Dr. Rolf Gebhardt
Dr. Arthur Günzel
Prof. Ph. Dr. Hanspaul Hagenmaier
Prof. Dr. Bernd Hamprecht
Prof. Dr. Dr. Michael Hanack
Prof. Dr. Volker Hoffmann
Prof. Dr. Günther Jung
Dr. Hubert Kalbacher
Prof. Dr. Ekkehard Lindner
Prof. Dr. Dieter Mecke
Prof. Dr. Ulrich Nagel
Prof. Dr. Helga Ninnemann
Prof. Dr. Heinz Oberhammer
Prof. Dr. Dieter Oelkrug
Prof. Dr. Wolfgang Pfeiffer
Dr. Helmut Pommer
Prof. Dr. Karl Poralla
Prof. Dr. Hansgeorg Probst
Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee
Prof. Dr. Klaus Reutter
Prof. Dr. Hans-Ulrich Schnitzler
Prof. emer. Dr. Hartmut Stegmann
Prof. Dr. Joachim Strähle
Prof. emer. Dr. Hans Thoenen
Prof. Dr. Dr. Wolfgang Voelter
Prof. Dr. Dr. Klaus Wegmann
Prof. Dr. Ulrich Weser
Prof. Dr. Heinrich Wiesinger

Universität Göttingen

Dr. E. Puschmann
Prof. Georg-M. Sheldrick
Prof. Dr. Jürgen Troe

University of Arizona, Tucson

Prof. Dr. Jennifer D. Hall
Prof. David T. Harris
Richard B. Levine
Prof. John W. Little
Prof. Roger Miesfeld
Prof. David Morton
Prof. Bruce L. McNaughton
Prof. Nicholas J. Strausfeld
Prof. Leslie P. Tolbert

Lebenslauf

1970	Geburt am 7.4.1970 in Osterburg (Altmark) als ältestes Kind der Eltern Elisabeth Gärtner, geb. Kannicht, PTA und Joachim Gärtner, Kellner.
1974	Geburt des jüngeren Bruders Christian.
1974	Umzug von Oberhof (Thüringen) nach Leipzig.
1976 - 1986	Besuch der Polytechnischen Oberschule Georgi-Dimitroff in Leipzig. 1986 Abschluß mit der mittleren Reife.
1986	Scheidung der Eltern.
1986 - 1988	Besuch der Erweiterten Oberschule Georgi-Dimitroff in Leipzig. 1988 Abitur.
1988 - 1989	Praktisches Jahr als Bauhelfer bei der Denkmalpflege Leipzig als Vorbereitung auf ein Architekturstudium an der TU Dresden.
1989	Im Juni 1989 Übersiedlung in die Bundesrepublik Deutschland.
1989	Im Wintersemester 1989/90 Studium der Chemie an der Georg-August-Universität Göttingen.
1990	Seit dem Sommersemester 1990 Studium der Biochemie an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen.
1991	Im April 1991 Biochemie-Vordiplom Teil I.
1992	Im Juli 1992 Biochemie-Vordiplom Teil II.
1992 - 1993	Einjähriger Auslandsaufenthalt an der University of Arizona, Tucson, im Rahmen eines Austauschprogrammes der Universität Tübingen.
1995	Biochemie-Diplomprüfung in den Fächern Biochemie, Organische Chemie und Immunologie (Wahlpflichtfach).
1995 - 1996	Im Juli 1995 Beginn der Diplomarbeit mit dem Thema „Charakterisierung des unkonventionellen Myosins IXA aus Ratte und Mensch“ in der Arbeitsgruppe von Dr. Bähler am Friedrich-Miescher-Laboratorium der Max-Planck Institute in Tübingen.
1996-1999	Doktorarbeit mit dem Thema: „Neurotrophine und aktivitätsabhängige synaptische Plastizität: Untersuchungen zum Ort und Mechanismus der regulierten Neurotrophin-Freisetzung in adenoviral transduzierten hippokampalen Primärkulturen“ in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hans Thoenen am Max-Planck-Institut für Neurobiologie