



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Transfektionsoptimierung an Primärkulturen hippokampaler Neurone“

Verfasserin

Lena Rubi

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, 2011	
Studienkennzahl lt. Studienblatt:	A 439
Studienrichtung lt. Studienblatt:	Diplomstudium Zoologie (Stzw) UniStG
Betreuer:	Ao. Univ.-Prof. Dr. Axel Schmid

INHALTSVERZEICHNIS

ABSTRACT.....	7
ZUSAMMENFASSUNG.....	9
1. EINLEITUNG	11
1.1 ALLGEMEINES.....	11
1.1.1 Transiente und stabile Transfektion.....	12
1.2 GESCHICHTE.....	13
1.3 TRANSFEKTIONSMETHODEN	14
1.3.1 Chemische Verfahren.....	14
1.3.1.1 Calcium Phosphat Präzipitation.....	15
1.3.1.2 Lipofektion mit kationischen Liposomen.....	16
1.3.1.3 Kationische Polymere.....	18
1.3.2 Physikalische Verfahren	
1.3.2.1 Elektroporation.....	18
1.3.2.2 Gene gun.....	19
1.3.2.3 Mikroinjektion.....	19
1.2.3 Virale Verfahren.....	19
1.4 ZELLKULTUREN	20
1.4.1 Primäre Zellkulturen.....	20
1.4.2 Sekundäre Zellkulturen.....	21
1.5 GREEN FLUORESCENT PROTEIN.....	21
1.6 DAS NEURON.....	25
1.7 ZIEL DER ARBEIT.....	26
 2. MATERIAL UND METHODEN	
2.1 CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN.....	27
2.1.1 Transfektionsreagenzien.....	27

2.1.1.1. CalPhos™ Mammalian Transfection Kit.....	27
2.1.1.2 GenCarrier-2™.....	27
2.1.1.3 FuGENE® HD Transfection Reagent.....	27
2.1.1.4 Lipofectamine™ 2000 Reagent.....	27
2.1.2 Chemikalien, Stammlösungen und andere Materialien.....	28
2.1.3 Medien und Lösungen für die Zellkultur.....	29
2.1.4 Lösungen für die Elektrophysiologie.....	29
2.2 ZELLKULTUR	
2.2.1 Präparation und Aussaat.....	30
2.2.2 Kultivierung.....	31
2.3 TRANSFEKTIONEN.....	33
2.3.1 CalPhos™ Mammalian Transfection Kit.....	34
2.3.2 Lipofectamine™ 2000.....	35
2.3.2.1 Lipofectamine™ 2000 (Standardprotokoll).....	37
2.3.2.2 Variation der Lipofectamine™ 2000-Menge.....	37
2.3.2.2 Variation der DNA-Menge.....	37
2.3.2.1 7,5µL Lipofectamine™ 2000.....	37
2.3.3 GenCarrier-2™.....	37
2.3.4 FuGENE® HD.....	38
2.4 AUSWERTUNG.....	39
2.4.1 Transfektionseffizienz.....	40
2.5 ELEKTROPHYSIOLOGIE.....	41
2.5.1 Versuchsaufbau.....	41
2.5.2 Eröffnen der Zelle.....	44
2.5.3 Messung des Membranpotentials.....	45
2.5.4 Berechnung des Membranwiderstandes.....	47
2.6 STATISTIK.....	47
2.6.1 Test auf Normalverteilung.....	47
2.5.2 Statistische Auswertung.....	47

3. ERGEBNISSE

3.1. TRANSFEKTIONEN.....	49
3.1.1 Vergleich der Transfektionsmethoden.....	49
3.1.2. Zellalter.....	52
3.1.3 LF2000 Mengen-Vergleich.....	55
3.1.4 7,5 μ L LF2000.....	57
3.1.5 DNA-Mengen Variation bei Transfektionen mit 15 μ L LF2000.....	59
3.1.6 DNA-Mengen Variation bei Transfektionen mit 7,5 μ L LF2000.....	61
3.1.7 CalPhos.....	63
3.2 ELEKTROPHYSIOLOGIE	
3.2.1 Ruhepotential (RP).....	65
3.2.2 Aktionspotential (AP).....	65
3.2.3 Membranwiderstand (Rm).....	68
4. DISKUSSION.....	69
5. LITERATURVERZEICHNIS.....	73
6. STATISTIK.....	77
7. BILDERQUELLEN.....	79
8. ABKÜRZUNGEN.....	81

ABSTRACT

Transfection is the introduction of genetic material into eucaryotic cells. By inserting antisense-oligos, plasmids and si-RNAs, transfection allows to do research on genfunctions and on the regulation of genexpression and to localise expressed genproducts. Transfection can be used on whole organisms or on single cells, like in this work. There are various mechanisms to introduce exogenous genes into cells, including phagocytosis, cell-fusion, diffusion, force or viral vectors. Transfection of primary neurons (taken directly out of intact tissue) in culture has proven to be much more difficult than of stabel cell-lines. In this diploma thesis primary cell-cultures of neurons taken from rat hippocampus are used.

Transfection efficiency and the survival rate of the transfected cells must be optimized in several test series under gradual change of different parameters. In this diploma thesis the transfection reagents CalPhos™, Lipofectamine™ 2000, GenCarrier-2™ and FuGENE® HD, widely used, commercially available transfection reagents, have been compared and tested on primary hippocampal neurons. To identify the transfected neurons, GFP was used. Subsequently, to optimize the transfection efficiency, different parameters were varied. Additionally the condition of transfected cells was evaluated by electrophysiological measurements.

The comparison of the different transfection reagents indicated, that only CalPhos™ and Lipofectamine™ 2000 led to an acceptable transfection success. Furthermore, a dependence of transfection efficiency on the cell-age was observed. Experiments on cells of different ages showed that best transfection success was obtained with cells younger than 7 days.

The optimal concentration of Lipofectamine™ 2000 was tested in another series of experiments. An even better success with low concentration of Lipofectamine™ 2000 and a destructive effect, when high concentrations of Lipofectamine™ 2000 were used, was observed. The effect on transfection efficiency with different DNA concentrations was

tested by using 7,5 μ L and 15 μ L Lipofectamine™ 2000. With both concentrations of Lipofectamine™ 2000 a better success of transfection was observed with DNA concentrations higher than 1 μ g, but further increasing the DNA amount did not continue to enhance transfection rates.

In the last set of experiments the influence of medium-supplements, like Nuts and KYN, was investigated, but these additions did not reveal any positive effect on transfection rates.

In conclusion I report, that for hippocampal neurons in primary culture, 7,5 μ L Lipofectamine™ 2000 and more than 1 μ g DNA, when applied on young neurons (< 14 days), yields highest transfection efficiency (> 5%).

ZUSAMMENFASSUNG

Unter Transfektion versteht man das Einbringen genetischen Materials in eukaryotische Zellen. Durch das Einschleusen von Antisense-Oligos, Plasmiden oder si-RNAs dient sie einerseits der Erforschung von Genfunktionen und der Regulation von Genexpressionen und andererseits der Lokalisation exprimierter Genprodukte. Eine Transfektion kann auf einen gesamten Organismus angewendet werden oder, wie in dieser Arbeit, sich auf einzelne Zellen beschränken. Durch Endo- oder Phagocytose, Fusion mit der Zelle, Diffusion, Gewalt oder virale Vektoren kann das fremde genetische Material von der Zelle aufgenommen werden. Primäre Zellkulturen, also Zellen, die direkt aus intaktem Gewebe entnommen wurden, lassen sich erfahrungsgemäß wesentlich schwerer transfizieren als bestehende Zelllinien. Dies trifft auch auf die primären Hippokampuskulturen der Ratte zu, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Transfektionseffizienz und eine hohe Überlebensrate der Zellen müssen in mehreren Versuchsreihen unter schrittweisem Verändern einzelner Parameter optimiert werden. In dieser Diplomarbeit wurden die Transfektionsreagenzien CalPhos™, Lipofectamine™ 2000, GenCarrier-2™ und FuGENE® HD (verbreitete, kommerziell erhältliche Transfektionsreagenzien) anhand der Transfektion von GFP in hippokampalen Neuronen miteinander verglichen. Anschließend wurden einzelne Parameter variiert um die Transfektion zu optimieren. Anhand von elektrophysiologischen Messungen wird der Zustand der transfizierten Zellen beurteilt.

Der Vergleich der Transfektionsreagenzien zeigte, dass nur mit CalPhos™ und Lipofectamine™ 2000 ein verwendbarer Transfektionserfolg zu erzielen war. Des Weiteren war eine starke Abhängigkeit des Transfektionserfolges vom Alter der Neurone zu erkennen. Versuche an Zellen unterschiedlichen Alters zeigten deutlich höhere Transfektionserfolge zu Gunsten von Zellen die unter 7 Tage alt waren.

Eine weitere Versuchsreihe widmete sich der Optimierung der Lipofectamine™ 2000 Menge in der Transfektionslösung. Hierbei zeigte sich, dass niedrigere Konzentrationen

einen wesentlich höheren Erfolg lieferten als höhere Konzentrationen Lipofectamine™ 2000 und dass höhere Konzentrationen die Zellen zunehmend schädigten.

Anhand zweier unterschiedlicher Lipofectamine™ 2000 Konzentrationen wurden die Auswirkungen verschiedener DNA Mengen auf die Transfektionseffizienz getestet. Es zeigte sich bei beiden Lipofectamine™ 2000 Mengen ein weitaus höherer Transfektionserfolg mit DNA Mengen über 1 µg als mit Mengen unter 1 µg DNA.

Als letzter Parameter wurde der Einfluss von Medium-Zusatzstoffen wie Serum Supplements (Nuts) und einem Hemmer von Glutamat-Rezeptor-abhängiger Erregungstoxizität (KYN) getestet. Diese Stoffe zeigten keinen Einfluss auf den Transfektionserfolg.

Mit einer Lipofectamine™ 2000 Menge von 7,5 µL und einer DNA Menge von über 1 µg konnte ein, mit einer Effizienz von über 5 %, zumindest für elektrophysiologische Versuche ansprechender Transfektionserfolg erzielt werden.

1. EINLEITUNG

Transfektion ist die Einbringung von Fremdmolekülen wie cDNAs in eukaryote Zellen (Weiskirchen et al. 2000). Der Begriff der Transfektion hat sich aber erst im Laufe der Zeit zu seiner heutigen Bedeutung entwickelt. Die ursprüngliche Bedeutung des Wortes war eine Transformation (= die Aufnahme genetischen Materials) durch Infektion, also das Einbringen virulenter DNA oder RNA durch Viren oder Bakteriophagen in prokaryote Zellen. Heute bezeichnet Transfektion die nicht-infektiöse Einbringung von Nukleinsäuren in eukaryotische Zellen. Anders gesagt entspricht die Transfektion bei Eukaryoten dem bei den Prokaryoten als Transformation bezeichneten Prozess, bei dem fremdes genetisches Material in die Zelle eingeschleust wird.

1.1 ALLGEMEINES

In der Forschung wird das Verfahren der Transfektion unter anderem dafür eingesetzt, um Gen- und Proteinfunktionen und die Regulation von Genexpressionen zu erforschen, oder um die Lokalisation exprimierter Genprodukte (Proteine) zu bestimmen.

Eine Transfektion kann sich entweder auf einzelne Zellen beschränken, oder auf einen gesamten Organismus angewendet werden. So können zum Einen kultivierte somatische Zellen, wie bei der ex vivo Gentherapie, oder aber Keimzellen transfiziert werden, die zur Entstehung ganzer transgener Tiere führen (Buddecke, 2002).

Unter anderem werden Plasmide, Antisense-Oligos, mRNA oder siRNA eingeschleust, um entweder ein nicht endogen vorhandenes Protein zu exprimieren (heterologe Expression), die Expression eines endogenen Proteins zu erhöhen (Überexpression), oder aber um die Bildung eines endogenen Proteins abzuschwächen oder zu eliminieren ("knock-down").

Die wesentlichen Probleme bei Transfektionen stellen zum Einen die Effizienz der Transfektion selbst dar und zum Anderen die Überlebensrate der transfizierten Zellen. Die Transfektionseffizienz bezeichnet jenen prozentuellen Anteil der behandelten Zellen, der genetisches Material aufgenommen hat und das kodierte Protein exprimiert. Eine hohe

Effizienz ist vor allem bei Datenerhebungen einer Gesamtzellpopulation von Bedeutung, die unter anderem bei biochemischen Ansätzen Verwendung finden. In anderen Experimenten, wie bildgebenden Verfahren oder elektrophysiologischen Messungen, ist die Effizienz weniger von Bedeutung, da hier einzelne, transfizierte Zellen aus der Gesamtpopulation ausgewählt werden können und den darin enthaltenen nicht-transfizierten Zellen als direkte Kontrolle gegenübergestellt werden können. Bei geringer Transfektionseffizienz ist aber eine hohe Überlebensrate und ein guter Allgemeinzustand der Zellen besonders wichtig, da nur so die geringe Anzahl an Zellen, die das transfizierte Gen schließlich exprimieren auch tatsächlich für die experimentelle Bearbeitung zur Verfügung stehen.

1.1.1 Transiente und stabile Transfektion

Ein Gen kann entweder transient oder stabil transfiziert werden. Bei einer transienten Transfektion verbleibt die DNA nur vorübergehend im Zellkern der Zielzelle, ohne in das Genom inkorporiert zu werden (Buddecke, 2002). Das transfizierte Gen wird über einen gewissen Zeitraum, gemeinsam mit dem restlichen Genom der Zelle, translatiert und danach abgebaut. Oft geschieht dieser Abbau bereits nach einigen Stunden oder erst nach Tagen bei der nächsten Zellteilung.

Von einer stabilen Transfektion spricht man, wenn das eingebrachte Gen tatsächlich in das Wirtszellengenom integriert wird. Das transfizierte Gen bleibt länger erhalten und wird bei der nächsten Zellteilung gemeinsam mit dem restlichen Genom der Zelle transkribiert und anschließend translatiert. Eine stabile oder permanente Transfektion setzt voraus, dass ein Selektionsmarker, meist mit einer Resistenz gegen ein bestimmtes Antibiotikum, an die exogene DNA gekoppelt wird. Werden die Zellen nach der Transfektion mit dem entsprechenden Antibiotikum behandelt, überleben nur die Zellen, die den Marker aufgenommen und das Resistenz verleihende Genprodukt exprimiert haben (Buddecke, 2002). Sie dient vor allem der Untersuchung von Langzeitauswirkungen des transfizierten Gens (Proteins) und wird auch in der Gentherapie eingesetzt. Stabile Transfektionen dienen unter anderem der Herstellung genetisch veränderter stabiler Zelllinien. Diese Art der Transfektion ist nicht mit allen Transfektionsmethoden zu erreichen.

In meiner Diplomarbeit wurde nur mit transienten Transfektionen gearbeitet, da diese Art der Transfektion für die vorhandene Fragestellung, die sich ausschließlich mit kurzzeitigen Proteinexprimierungen beschäftigt, ausreicht und keine stabilen Transfektionen über einen längeren Zeitraum benötigt wurden.

1.2 GESCHICHTE

Die Transformation wurde erstmals 1928 vom britischen Mediziner und Bakteriologen Frederick Griffith beschrieben. Bei seiner Suche nach einem Impfstoff gegen das Lungenentzündung verursachende und meist zum Tode führende Bakterium *Streptococcus pneumoniae*, entdeckte Griffith, dass hitzeinaktivierte Bakterien des letalen S-Stammes nicht zum Tod der Versuchstiere führten. Wurden die abgetöteten pathogenen Zellen aber in Kombination mit einem harmlosen R-Stamm von *S. pneumoniae* injiziert, starben die Mäuse. Aus dem Blut der toten Tiere konnten nun lebende Bakterien des letalen S-Stammes isoliert und weiter gezüchtet werden. Eine Substanz des virulenten S-Stammes hatte also den ursprünglich harmlosen R-Stamm dauerhaft in den letalen S-Stamm transformiert (Alberts et al. 2005).

Mit diesem Versuch als Grundlage gelang es Oswald Avery, Colin McLeod und Maclyn McCarty 1944 die DNA als das „transformierende Prinzip“ und somit als den vererbbaeren Faktor zu bestimmen.

Knapp 20 Jahre später, 1965, zeigten Aniti Vaheri und Joseph S. Pagano, dass DNA in Zellen eingeschleust werden konnte, wenn man es mit dem kationischen Polysaccharid-derivat DEAE-Dextran mischte.

1972, als es Stanley Cohen, Annie Chang und Leslie Hsu gelang *Escherichia coli* Bakterien mit Hilfe von Calciumchlorid zu transfizieren, wurde die Transformation (Transfektion) zu einem routinemäßigen Verfahren in der Labortechnik, wobei zuerst nur prokaryote Zellen transformiert wurden.

1973 transfizierten Frank L. Graham und Alex J. Van Der Eb mit Hilfe eines DNA-Calciumphosphat-Präzipitates isolierte Adenoviren-DNA in Säugierzellen.

Erst 1982 wurden die ersten transgenen Tiere in Form von transgenen Mäusen erschaffen, indem das Wachstumshormon Somatotropin einer Ratte in befruchtete Mäuseeizellen mikroinjiziert wurde und so zu einem ungewöhnlichen Größenwachstum der transfizierten Tiere führte.

Ein weiterer großer Schritt in der Entwicklung DNA transformierender Substanzen geschah 1987 durch Philip L. Felgner et al., als dieser die Verwendung kationischer Lipide für hohe Transfektionseffizienzen demonstrierte (Felgner et al. 1987).

Heute gibt es eine große Bandbreite an Transfektionsreagenzien, zu denen unter anderem kationische Lipide und Polymere, aktivierte Dendrimere, aber auch mechanische und virale Methoden zählen.

1.3 TRANSFEKTIONSMETHODEN

Mittlerweile haben sich eine Reihe verschiedener Transfektionsmethoden etabliert. Sie lassen sich entweder anhand des Aufnahmemechanismus, mit dem genetisches Material eingeschleust wird, oder nach der Art des Verfahrens einteilen.

Im Grunde gibt es folgende Mechanismen, über die DNA von der Zelle aufgenommen werden kann (Mülhardt, 2002):

- Endo- bzw. Phagocytose (z.B. CaPO_4 , Transferrin, DEAE-Dextran)
- Fusion mit der Zelle (z.B. Lipofektion, Liposomenfusion, Protoplastenfusion)
- Diffusion (z.B. Elektroporation)
- Gewalt (z.B. Mikroinjektion, gene gun)
- virale Aufnahmemechanismen (z.B. Virensysteme)

Teilt man die Transfektionsmethoden nach der Art des Verfahrens ein, so lassen sich im Allgemeinen 3 Hauptgruppen unterteilen:

- das chemische Verfahren
- das physikalische Verfahren und
- das biologische, bzw. virale Verfahren

1.3.1 Chemisches Verfahren

Zu den chemischen Verfahren gehören jene Methoden, die sich Fremdkörperaufnahme-mechanismen, wie Phagocytose oder Membranfusion mit der Zellwand zu nutze machen. Chemische Transfektionsverfahren sind äußerst beliebte Methoden um Zellen zu transfizieren, da sie oft billig und unkompliziert zu handhaben sind. Zu den chemischen Transfektionsmethoden zählen die Calciumphosphatpräzipitation und die Lipofektion mit kationischen Lipiden bzw. mit kationischen Polymeren.

1.3.1.1 Calcium Phosphat Präzipitation

Die CaPO_4 -Präzipitation gehört seit ihrer Beschreibung durch Graham und Van Der Eb (1973) auf Grund ihrer einfachen Anwendung und der geringen Kosten zu einer der verbreitetsten und meist genutzten Transfektionsmethoden.

Hierbei wird eine Lösung aus DNA, Calciumchlorid und etwas sterilem H_2O hergestellt, die anschließend mit einem Phosphatpuffer vermengt, gut vermischt und für ein paar Minuten inkubiert wird (Abbildung 1). In dieser Zeit bindet das positiv geladene Calcium an das negativ geladene Phosphat und bildet so einen Niederschlag aus Calciumphosphat und DNA, der im Mikroskop als feinkörniger Niederschlag sichtbar wird. Das Präzipitāt wird auf die Zellen pipettiert und von diesen via Endo- oder Phagocytose aufgenommen.

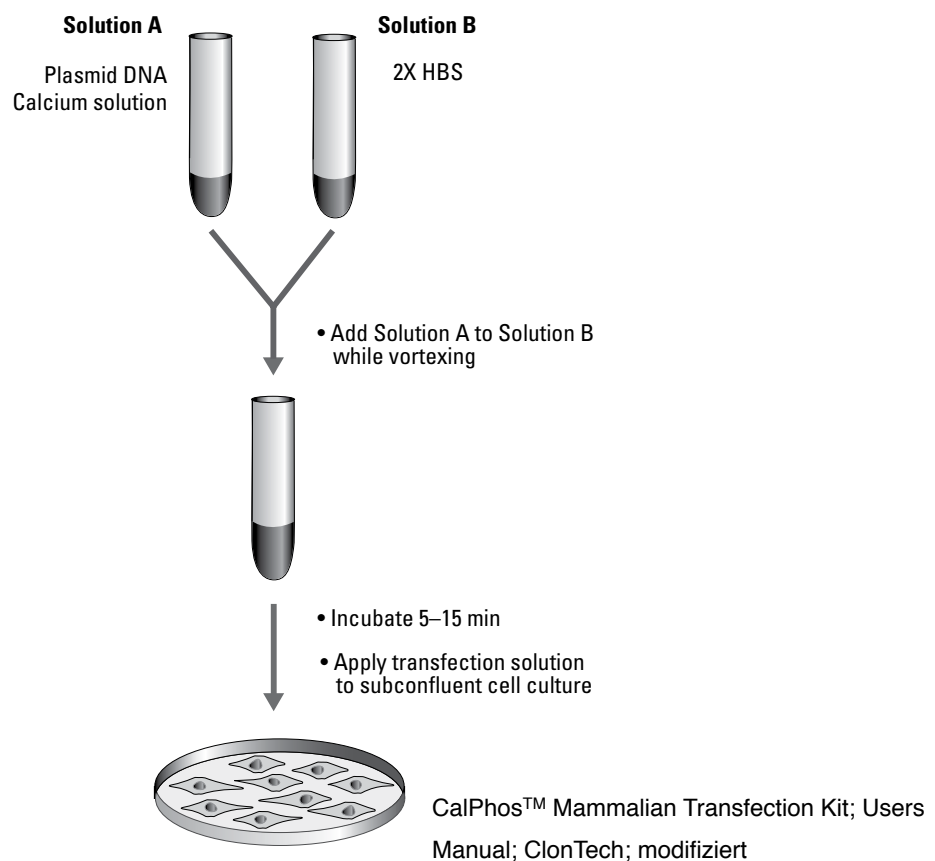


Abb. 1. **CaPO_4 -Präzipitation.** Die DNA-Calcium-Lösung und der Phosphatpuffer werden vermengt. Die gebildeten Calciumphosphat-DNA-Komplexe werden auf die Zellen pipettiert und für einige Stunden inkubiert. Nach der Inkubationszeit wird das Calciumphosphat ausgewaschen und die Zellen werden in ihr ursprüngliches Medium zurückgeführt.

Nachdem die Zellen ein paar Stunden in der Transfektionslösung inkubiert wurden, wird das Calciumphosphat ausgespült und den Zellen wird ihr ursprüngliches Medium reappliziert.

Nur ein Teil der Zellen die DNA aufgenommen haben transportieren diese auch in den Zellkern, wo sie dann transkribiert wird. Bei den meisten Zellen verbleibt die aufgenommene DNA im Cytosol, wo sie durch Lysosomen wieder abgebaut wird. Die Calciumphosphatpräzipitation lässt sich an einer großen Bandbreite von Zellen anwenden. Auch die Durchführung stabiler Transfektionen ist mit dieser Methode möglich.

1.3.1.2 Lipofektion mit kationischen Liposomen

Die Lipofektion ist inzwischen weiter verbreitet als die CaPO₄-Präzipitation, da sie in ihrer Anwendung genau so einfach, die Transfektionseffizienz aber in der Regel höher ist.

Die Lipofektion wurde erstmals 1987 durch Felgner et al. beschrieben und ist somit eine recht junge Methode um genetisches Material in Zellen einzuschleusen (Mülhardt 2002).

Für die Durchführung einer erfolgreichen Transfektion, muss negativ geladene Nukleinsäure mit einer ebenfalls negativ geladenen Zellmembran in Kontakt treten.

Bei der Lipofektion werden DNA und das Reagenz aus Liposomen getrennt in Zellmedium pipettiert und anschließend zusammengeführt (Abbildung 2). Das Gemisch wird einige Zeit inkubiert, in der die DNA von den Lipiden eingeschlossen wird und sich so die Liposomen-DNA-Komplexe bilden. Die Lösung wird auf die Zellen pipettiert, wo die Liposomen dann mit den Zellmembranen verschmelzen und die eingeschlossene DNA in das Cytoplasma der Zellen freigeben. Auch hier wird nicht jede DNA, die in die Zelle gelangt, automatisch in den Zellkern transportiert.

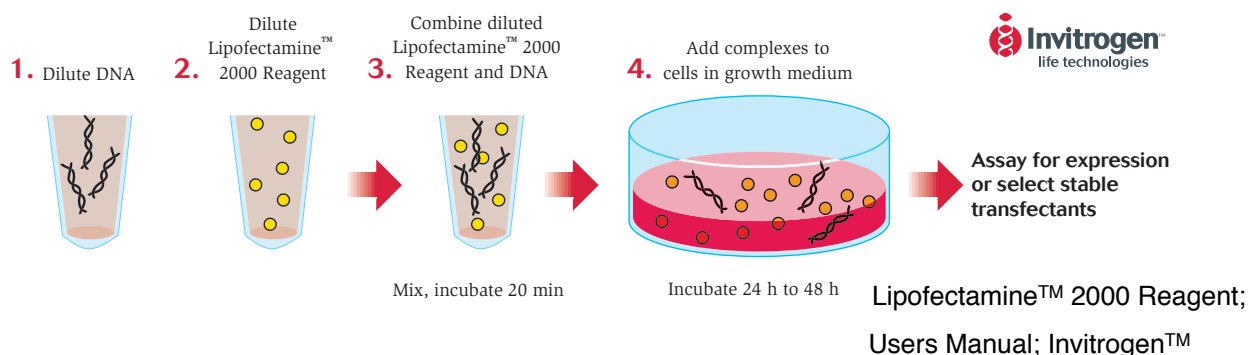


Abb. 2. Transfektion mit Lipofectamine™ 2000. DNA und LF2000 werden getrennt in Zellmedium pipettiert und anschließend zusammengeführt. Nach einer kurzen Inkubation von 15-30 Minuten wird die Lösung auf die Zellen pipettiert, wo sie für die nächsten Stunden mit den Zellen reagieren kann. Später wird den Zellen ihr ursprüngliches Medium wieder reappliziert.

Wie auch schon bei der CaPO_4 -Präzipitation muss das Transfektionsmedium nach einigen Stunden gegen das ursprüngliche Medium getauscht werden, wobei das Liposomengemisch nicht ausgespült werden muss, da sich bei dieser Transfektionsmethode kein Niederschlag aus Kristallen gebildet hat.

War die Lipofektion früher noch ein Ein-Komponenten-System (DOTMA), so ist sie heute ein Gemisch aus kationischen Lipiden, ungeladenen Helferlipiden und DNA-kompaktierenden Substanzen (Mülhardt 2002).

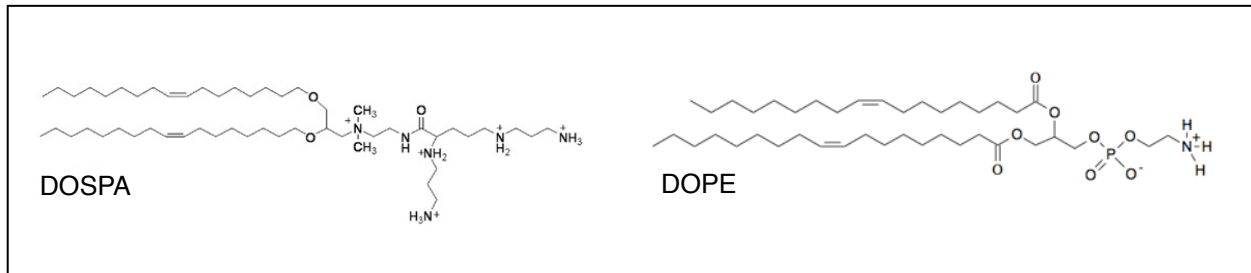


Abb. 3. **Strukturformeln des polykationischen Lipids DOSPA und des neutralen Helferlipids DOPE.** (Graphiken modifiziert aus Loney et al. 2008 und Regelin 2000)

Lipofectamine™ 2000 besteht aus dem polykationischen Lipid DOSPA und dem neutralen Helferlipid DOPE (Invitrogen™) (Abbildung 3), die einer Ultraschallbehandlung unterzogen werden und so Liposomen ausbilden. Die einzelnen Lipidmoleküle besitzen eine positiv geladene Kopfgruppe und ein oder zwei Kohlenwasserstoffketten. Die Kopfgruppe, die aus einem oder mehreren positiv geladenen Stickstoffatomen besteht, ermöglicht die Interaktion zwischen Transfektionsreagenz und dem negativ geladenen Phosphat-desoxyribose-Rückgrat der DNA (Dalby et al. 2003). Die Liposomen binden mit ihrer Außenseite an mehreren Stellen der DNA und ermöglichen es ihr so die elektrostatische Abstoßung der Zellmembran zu überwinden und in die Zelle zu gelangen (Abbildung 4).

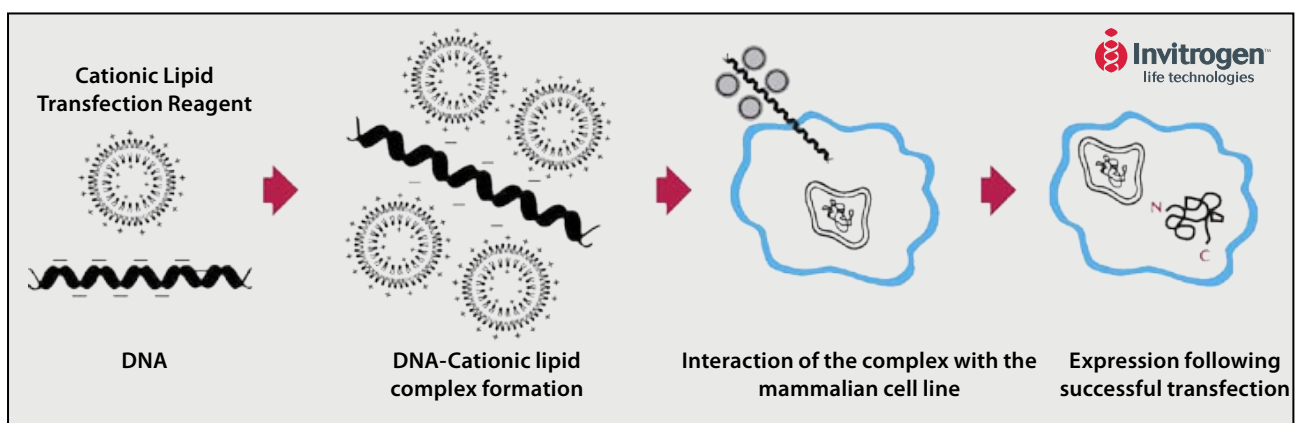


Abb. 4. **DNA-Aufnahmemechanismus bei Transfektion mit einem kationischen Liposom.**

Während der Inkubationszeit von DNA und kationischen und neutralen Lipiden bilden sich Komplexe

aus den positiven Kopfgruppen der Liposomen und dem negativ geladenen Rückgrat der DNA, wobei die Liposomen die DNA von mehreren Seiten an ihre Außenseite binden. Die Liposomen können nun, durch ihren Zellwand ähnlichen Aufbau (Lipiddoppelschicht) mit dieser verschmelzen und ermöglichen es der DNA so ins Cytosol zu gelangen, von wo aus sie auf noch unbekanntem Wege in den Zellkern gelangen, in dem die anschließende Expression stattfindet.

1.3.1.3 Kationische Polymere

Die älteste bekannte Transfektionsmethode nutzt Diethylaminoethyl-Dextran (DEAE-Dextran) um DNA in die Zelle zu schleusen. DEAE-Dextran ist ein kationisches Derivat des Polysaccharids Dextran. Auf Grund seiner positiven Ladung kann DEAE-Dextran das negativ geladene Rückgrat der DNA binden und dieses so an der negativen Zellmembran vorbei lotsen.

Die DNA wird an Polykatione gebunden und die Dextran-DNA-Komplexe auf die Zellen pipettiert, von denen sie per Endocytose aufgenommen werden (Mülhardt 2002). DEAE-Dextran wird allerdings immer weniger als Transfektionsreagenz herangezogen, da seine Anwendung auf wenige Zellarten beschränkt ist, die Transfektionseffizienz gering ist und es in Kombination mit anderen Chemikalien wie Glycerin oder DMSO toxisch wirken kann. Mit DEAE-Dextran sind nur transiente Transfektionen möglich.

1.3.2 Physikalische Verfahren

1.3.2.1 Elektroporation

Bei der Elektroporation werden die elektrischen Ladungen, die an der Zellmembran vorherrschen kurzfristig außer Kraft gesetzt, wodurch Mikro- oder Elektroporen entstehen, durch die DNA aufgenommen werden kann. Die Zellen müssen sich bei dieser Transfektionsmethode in freier Lösung befinden und dürfen noch nicht an einem Untergrund festgewachsen sein, was bedeutet, dass diese Methode nur direkt nach der Präparation bei primären Zellkulturen, bzw. nach dem Ablösen der Zellen bei langlebigen Zelllinien möglich ist.

Durch einen kurzen elektrischen Impuls von 2-4kV/cm wird die Zellmembran kurzfristig permeabilisiert und ermöglicht es der DNA so durch die entstandenen Öffnungen der

Zellmembran zu diffundieren (Mülhardt 2002). Die Transfektionseffizienz ist hierbei etwa so hoch wie die der Calciumphosphat-Präzipitation.

1.3.2.2 Gene gun/ particle delivery

Bei der Methode der gene gun, erfolgt die Transfektion durch Beschuss, also durch Gewalteinwirkung auf die Zelle. Es werden inerte Nanopartikel wie Wolfram- oder Goldpartikel mit der zu transfizierenden DNA beschichtet und anschließend mit hoher Geschwindigkeit auf die Zelle geschossen. Diese Methode kann auch beim lebenden Organismus angewandt werden, wobei die Transfektion durch die geringe Eindringtiefe, nur oberflächlich stattfindet. Die Transfektionseffizienz ist meist gering (Mülhardt 2002).

1.3.2.3 Mikroinjektion

Bei der Mikroinjektion wird die DNA mit Hilfe einer Glaskapillare direkt in den Zellkern injiziert. Diese Methode ist sehr aufwendig, da jede Zelle einzeln transfiziert werden muss. Die Effizienz ist aber dementsprechend hoch. Das Einschleusen fremder DNA mit Hilfe der Mikroinjektion wird hauptsächlich zur Herstellung transgener Tiere verwendet (Mülhardt 2002), wobei eine Transfektion der Keimzelle (Eizelle) erfolgt.

1.3.3 Virale Verfahren

Virale Verfahren sind in der Anwendung meist aufwendig. Unter anderem deswegen, weil man ein Speziallabor benötigt, in dem das Hantieren mit Viren erlaubt ist. Es gibt eine Anzahl verschiedener Viren, die als Überträger der zu transferierenden DNA dienen. Im Grunde funktionieren sie aber alle gleich.

Teile des Virusgenoms werden entfernt und durch eine Expressionskassette ersetzt, die das zu transferierende Gen enthält. Das Virusgenom kann in Form von RNA (Retrovirale Vektoren), linearer, doppelsträngiger DNA (Adenovirale Vektoren), oder in Form von nicht-pathogener, einsträngiger DNA (Adeno-assoziierte Vektoren) vorliegen.

Im Zellkern der Zielzelle angekommen, kann die Vektor-RNA bzw. DNA entweder in das Genom der Wirtszelle eingebaut werden (Retroviraler Vektor), oder extrachromosomal exprimiert werden (Adenoviraler Vektor).

Der Nachteil dieser Vektoren besteht allerdings darin, dass das viruseigene Genom vom Immunsystem als „fremd“ erkannt und somit eliminiert wird (Buddecke, 2002). Dieses Problem kann durch den Einsatz von Baculoviren umgangen werden, die als ursprüngliche Insektenviren ihr virusspezifisches Gen in Säugetierzellen nicht exprimieren können. Nur das in den Baculovirenvektor einklonierte Fremdgen wird unter der Kontrolle eines Säugetierpromotors in der eukaryoten Zelle in das aktive Protein übersetzt (Buddecke, 2002).

1.4 ZELLKULTUREN

Im Labor kann man entweder mit primären Zellkulturen, oder mit sekundären Zelllinien arbeiten.

1.4.1 Primäre Zellkulturen

Zellen einer primären Zellkultur werden direkt aus intaktem Gewebe von Mensch oder Tier entnommen, isoliert und in Kultur gebracht. Die Lebensdauer solcher Zellen ist zeitlich begrenzt, was zur Folge hat, dass sie nur für eine bestimmte Zeitspanne, oft 3-4 Wochen, kultiviert werden können. Der Vorteil von primären Zellkulturen liegt aber darin, dass sie Ereignisse und Verhältnisse im lebenden Organismus wesentlich authentischer widerspiegeln als genetisch veränderte, langlebige Zelllinien und somit physiologisch wesentlich relevantere Aussagen liefern.

Primäre Zellkulturen sind im Vergleich zu Zellen langlebiger Zelllinien in der Regel wesentlich schwerer zu transfizieren und bedürfen daher aufwendigerer Optimierungsversuche des Transfektionsprozesses. Denn Zellen primärer Kulturen sind allgemein sensibler und reagieren anfälliger auf Veränderungen ihrer Umgebung. So beträgt die Transfektions-effizienz primärer Kulturen, wie der aus dem Hippokampus von Ratten, bestenfalls 20-30 % (Dalby et al. 2003), während die Effizienz bei der Transfektion von Zelllinien auch zu Erfolgen von 99 % führen kann (Invitrogen™).

1.4.2 Sekundäre Zellkultur (Zelllinien)

Zellen einer sekundären Zelllinie werden meist aus Tumoren von Menschen oder bestimmten Tieren isoliert, können aber auch künstlich, durch Transfektion eines Krebsgens in die Zelle, hergestellt werden. Sie sind in ihrer Lebensdauer nicht beschränkt und eignen sich daher besonders für längere Versuche unter standardisierten Bedingungen. Sekundäre Zelllinien können von bestimmten Firmen erworben und dann beliebig lange weitergezüchtet, bzw. kryokonserviert werden.

1.5 GREEN FLUORESCENT PROTEIN

Das grün fluoreszierende Protein (GFP) wurde Anfang 1961 von O. Shimomura et al. als ein Begleitprotein des Ca^{2+} -abhängigen Photoproteins Aequorin entdeckt, das aus der Qualle *Aequorea victoria* gewonnen wird. *A. victoria* zeigt im Meerwasser am Unterrand ihres Schirmes ein Leuchten in den Fotoorganen (Abbildung 5).

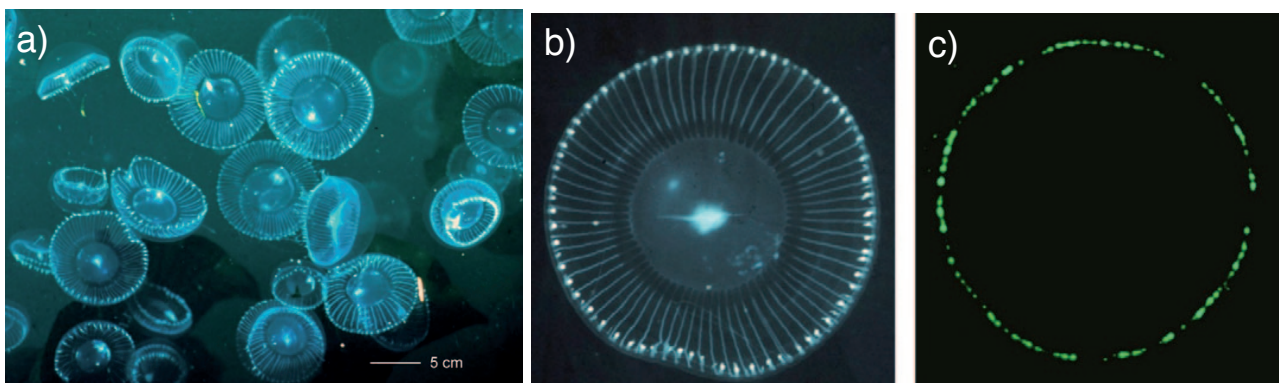


Abb. 5. Die Meduse *Aequorea victoria* a) in ihrer natürlichen Umgebung. b) bei Tageslicht im Meerwasser c) bei Stimulierung in einer Dunkelkammer. Bei Stimulierung der Qualle im Dunklen mit blauem Licht, wird in ihren Photoorganen grün leuchtendes Licht emittiert. (modifiziert aus Shimomura, 2009)

1979 gelang es O. Shimomura die Chromophorenstruktur des GFP zu entschlüsseln, die später durch Cody et al. (1993) bestätigt wurde. Die Besonderheit von GFP besteht darin, dass die fluoreszierende Komponente nicht wie bei gewöhnlichen fluoreszierenden Proteinen an einen Proteinkomplex gebunden ist, sondern in die Peptidkette integriert ist. Gereinigtes GFP besteht aus 238 Aminosäuren, wobei der eigentliche Chromophor von 3

aufeinanderfolgenden Aminosäuren gebildet wird. GFP ist ein natürlich vorkommendes Monomer, das blaues, bzw. ultraviolette Licht absorbiert und grünes Licht emittiert (Chalfie et al. 1994). Diese starke, sichtbare Absorption und Fluoreszenz geht von einem p-Hydroxybenzylidenimidazolinon Chromophor aus, der durch die Zyclisation und die Oxidation der proteineigenen Ser-Tyr-Gly Sequenz an den Positionen 65-67 generiert wird (Heim et al. 1994). In Abbildung 6 ist dieser Mechanismus der Chromophorenbildung dargestellt (aus Tsien 1998).

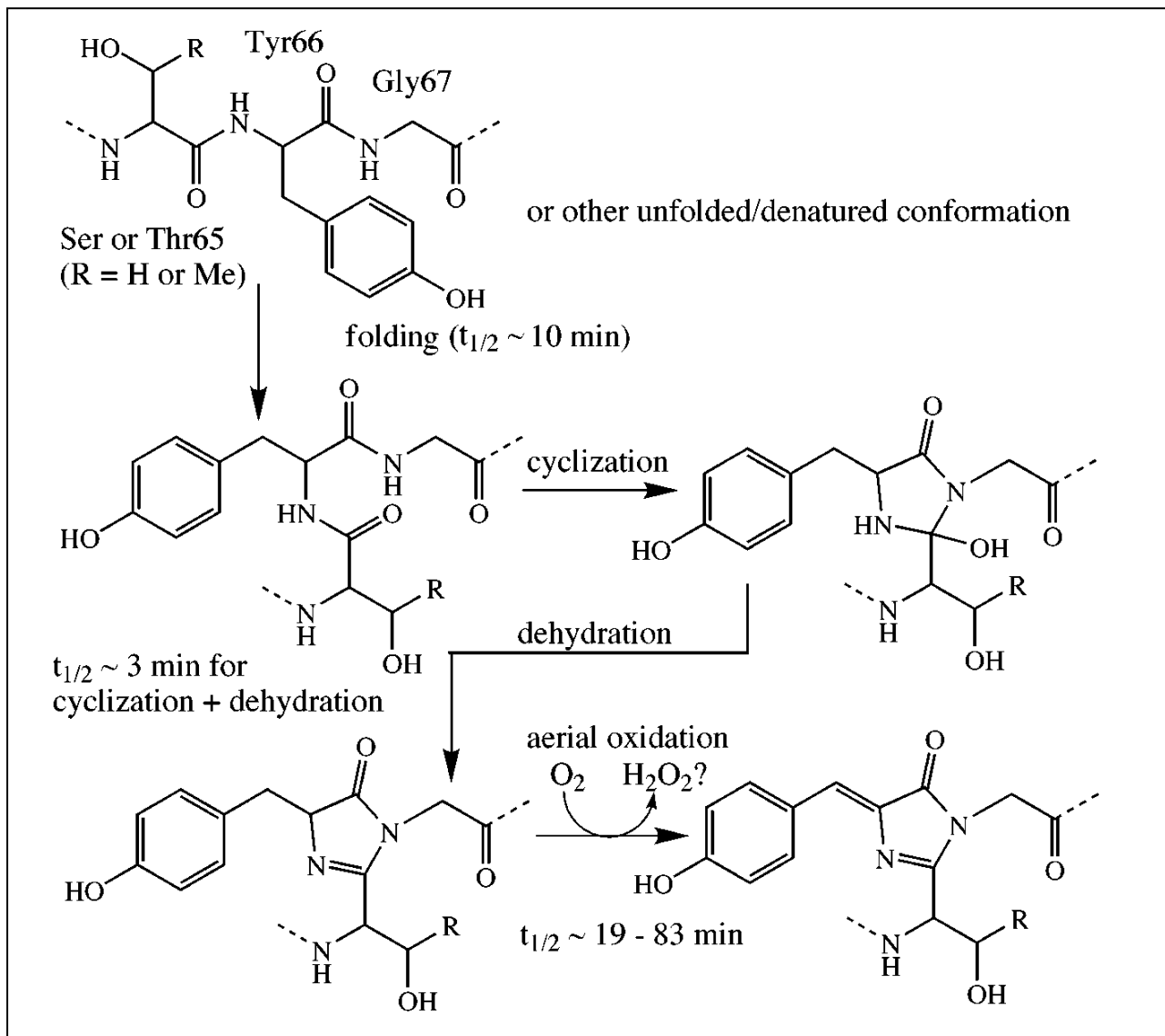


Abb. 6. **Mechanismus der Chromophorenbildung.** Das denaturierte GFP faltet sich zu einer annähernd ursprünglichen Konformation, woraufhin sich ein Imidazolinon aus den Aminosäuren Gly 67 und Ser oder Thr65 bildet. Es folgt eine Dehydrierung, die dem Imidazolinon seine ungesättigte Bindung im Ring beschafft. Anschließend erfolgt eine Oxidation an der α - β Bindung der AS 66 durch molekularen Sauerstoff, was zu einer Konjugation der aromatischen Gruppe mit dem Imidazolinon führt. Nur in diesem letzten Stadium besitzt der Chromophor seine sichtbare Absorption und Fluoreszenz. Graphik aus Tsien (1998)

Das Emissionsspektrum von GFP zeigt seinen Peak bei 509 nm (Abbildung 7). Shimomura et al. 1962 konnten zeigen, dass der Peak der grün leuchtenden Biolumineszenz von lebendem *Aequorea* Gewebe ebenfalls nahe bei dieser Wellenlänge liegt, obwohl die Chemilumineszenz von reinem Aequorin blau war und seinen Peak bei 470 nm hatte, welcher dem Erregungspeak von GFP sehr nahe ist (Tsien 1998). Durch die Überlappung des Emissionsmaximums von Aequorin mit dem Anregungsmaximum von GFP, lässt sich vermuten, dass eine Anregung von GFP durch das Photoprotein Aequorin stattfindet und GFP somit die blaue Emission des Aequorin in das charakteristische grüne Leuchten der lebenden Organismen konvertiert.

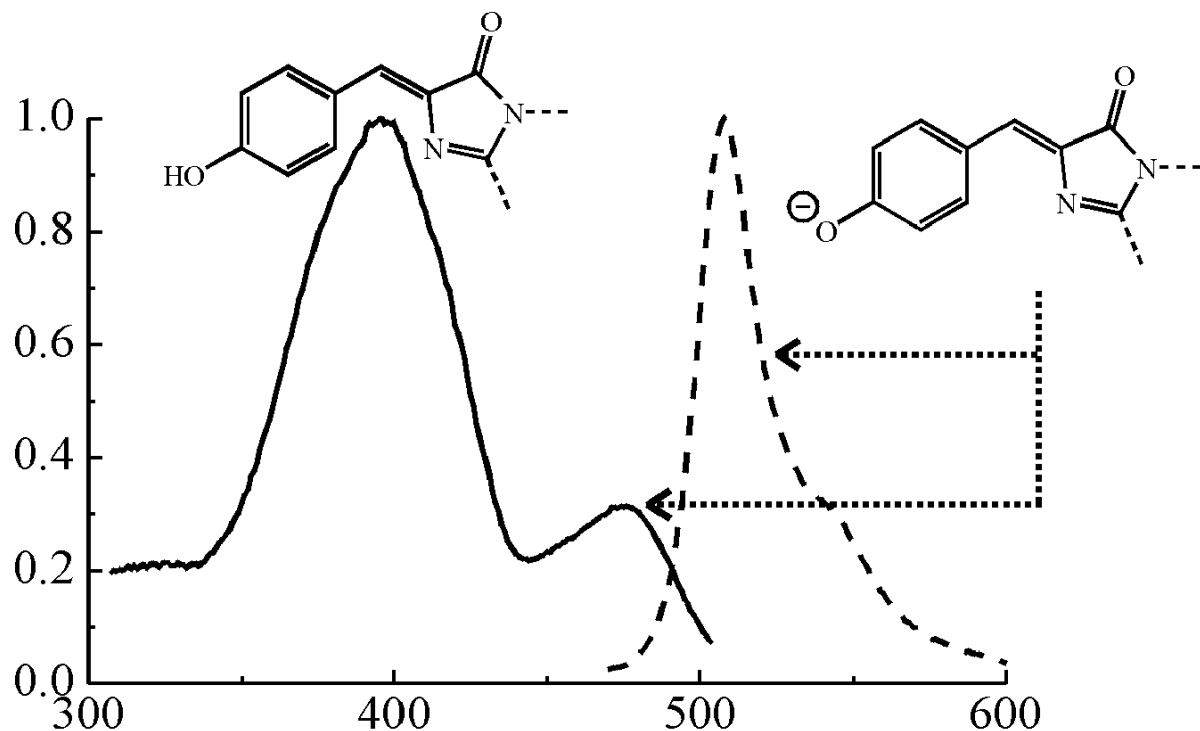


Abb. 7. **Absorptions- (-) bzw. Emissionsspektrum (---) des wild-typ GFPs in protonierter und deprotonierter Form.** Im Absorptionsspektrum sind 2 Peaks zu sehen. Der große Peak bei 395 nm ist etwa 3-mal höher als der kleinere Peak bei 475 nm. Normalerweise führt ein Erregungspeak von 395 nm zu einem Emissionspeak von 509 nm und ein Erregungspeak von 475 nm zu einem Emissionspeak von 503 nm. Die Tatsache, dass das Emissionsmaximum von der Erregungswellenlänge abhängig ist, indiziert, dass die wild-typ Population mindestens zwei, chemisch unterschiedliche Arten, beinhaltet, die sich während des Erregungszustandes nicht komplett gleichen (Tsien 1998). Der 475 nm Peak rührt von deprotonierten GFP Molekülen (angeregte Phenolat-Form) her, die zu dem Emissionspeak bei 509 nm führen. Der 395 nm Peak spiegelt die protonierten GFP Moleküle (Hydroxyl-Form) wider, die jedoch kein Licht emittieren, sondern - auf Grund der höheren

Acidität der Phenole im Erregungszustand- in die angeregte Phenolat-Form übergehen. Graphik aus Tsien (1998)

GFP besitzt eine einzigartige Struktur, bei der die 238 Aminosäuren 11 β -Faltblätter bilden, die eine α -Helix umgeben und in ihrer Anordnung einen Zylinder bilden. Die α -Helix, die entlang der Zylinderachse verläuft, hält den Chromophor, der für die eigentliche Fluoreszenz verantwortlich ist, in der Mitte des Zylinders. Diese Konstellation wird als β -can bezeichnet (Abbildung 8).

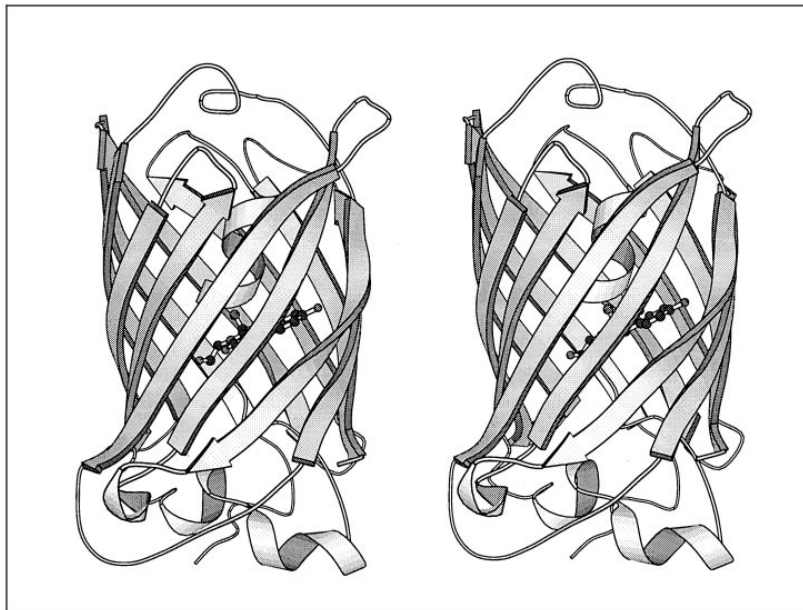


Abb. 8. **3D-Struktur von GFP.** Die zu einem hohlen Zylinder geformten β -Faltblätter schließen in ihrer Mitte die α -Helix ein, die den Chromophor in der Mitte hält. Graphik aus Tsien (1998)

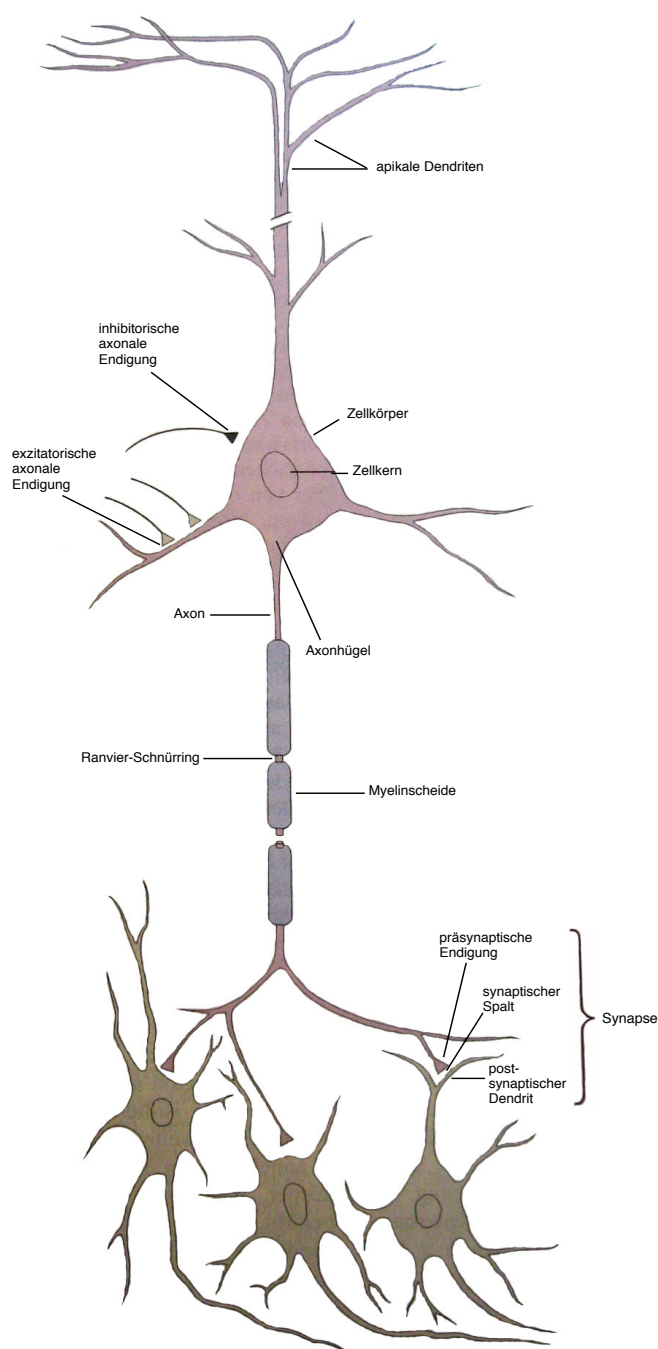
Die Fluoreszenz von GFP ist sehr stabil und zeigt auch bei längerer Bestrahlung keinen permanenten Verlust ihrer Leuchtkraft (Photobleichung).

Seit der Entdeckung des GFP 1979 und seiner ersten erfolgreichen Transfektion und Expression in einem lebenden Organismus durch Chalfie et al. 1994, und der Weiterentwicklung durch Roger Tsien, ist es, auf Grund seines Peptidkettenaufbaus, das auch den Chromophor selbst enthält, und der damit erhaltenen Fähigkeit in lebenden Organismen exprimiert zu werden, aus der biomedizinischen Forschung nicht mehr wegzudenken. GFP dient der Identifizierung transfizierter Zellen und ist somit ein Co-Transfektionsreagenz. Es wird vor allem bei transienten Transfektionen meist in

Kombination mit einem funktionellen Protein transfiziert, um die Zellen zu identifizieren, die genetisches Material aufgenommen haben. Da es sich um ein Protein handelt, kann GFP auch mittels molekularbiologischer Methoden fix an funktionelle Proteine gekoppelt werden.

1.6 DAS NEURON

Neurone sind Zellen, die der Reizleitung dienen. Sie bestehen typischerweise aus 4 morphologisch definierten Abschnitten: Zellkörper, Axon, Dendriten und präsynaptischen Endigungen (Abbildung 9).



Der Zellkörper des Neurons dient als Stoffwechselzentrum der Zelle. Er besitzt den Zellkern und das raue und glatte endoplasmatische Retikulum. Die Dendriten dienen zum Signalempfang von anderen Nervenzellen, wohingegen das Axon der Erzeugung und der Weiterleitung eines Nervenimpulses (Aktionspotential) dient.

Abb. 9. **Das Neuron.** Ein Neuron besteht aus Zellkörper, einem Axon, mehreren Dendriten und vielen synaptischen Endigungen, die Verbindungen zu den Dendriten benachbarter Neurone besitzen. Das Axon ist meist von einer Myelinscheide umgeben, die durch die Ranvier'schen Schnürringe unterbrochen ist und die der schnelleren Reizleitung dient. Am Ende verzweigt sich das Axon und endet in mehreren Synapsen, die entweder erregend (exzitatorische Synapse) oder hemmend (inhibitorische Synapse) auf das benachbarte Neuron wirken. Graphik modifiziert aus Kandel et al. 1996

Ein Nervenimpuls wird am Axonhügel der Zelle generiert und läuft von dort über das ganze Axon bis zu den präsynaptischen Endigungen, wo er zur Freisetzung der Neurotransmitter führt. Die meisten Axone sind zur schnelleren Leitung der Signale durch das Myelin umhüllt, das eine lipidreiche Isolierung darstellt. Myelin wird im ZNS durch Oligodendrozyten, die mehrere Axone umschließen können, und im PNS durch Schwann-Zellen, die immer nur ein Axon umfassen, gebildet. Die Myelinscheide wird in regelmäßigen Abständen durch nicht isolierte Stellen, die Ranvier'schen Schnürringe, unterbrochen, an denen die eigentlichen Aktionspotentiale fortlaufend regeneriert werden. Neurone halten an ihrer Zellmembran, auf Grund einer ungleichen Verteilung von Natrium-, Kalium und Chloridionen, sowie organischen Anionen, eine Potentialdifferenz von rund -65 mV aufrecht, die als Ruhepotential bezeichnet wird (Kandel et al. 1996). Bei verschiedenen Nervenzellen kann das Ruhepotential zwischen -40 mV und -80 mV variieren (Kandel et al. 1996). Das Ruhepotential von Hippokampusneuronen liegt erfahrungsgemäß bei $-65 \pm 6,7$ mV (mean $\pm$ SD)(Kubista, pers. Komm.).

1.7 ZIEL DER ARBEIT

Jede Zelllinie und jede angelegte Primärkultur reagiert unterschiedlich auf verschiedene Transfektionsmethoden, abhängig von den jeweiligen Bedingungen und dem Zelltyp. Es ist daher notwendig mehrere Versuchsreihen mit den Zellen, mit denen gearbeitet werden soll und die transfiziert werden sollen, durchzuführen, um die Effizienz und die Überlebensrate der Zellen zu steigern. Hierbei werden verschiedene Parameter, wie Inkubationszeit, das Verhältnis DNA: Transfektionsreagenz, Serum oder kein Serum, etc. variiert, um den höchst möglichen Erfolg zu erzielen. Um bei den Optimierungsversuchen nicht bei Null zu beginnen, ist es sinnvoll sich zuerst kundig zu machen, welche Transfektionsreagenzien bei dem gewünschten Zelltyp bereits Erfolge gezeigt haben.

In dieser Arbeit sollen nun verschiedene Transfektionsmethoden an Primärkulturen hippokampaler Neurone von Ratten (*Rattus sp.*) verglichen und optimiert werden. Als Transfektionsgen dient *GFP*, das in dieser Arbeit isoliert, also ohne weiteres zu untersuchendes Gen, transfiziert wird und der Identifizierung der Zellen, die genetisches Material aufgenommen haben und dieses auch exprimieren, dient. Die transfizierten Zellen werden quantitativ ausgezählt und anhand elektrophysiologischer Messungen qualitativ beurteilt.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN

2.1.1 Transfektionsreagenzien

2.1.1.1 CalPhos™ Mammalian Transfection Kit (CalPhos)

Das Transfektionsreagenz CalPhos™ Mammalian Transfection Kit wurde von der Firma Clontech bezogen. Dieser Transfektionsbausatz besteht aus einer 2M Calciumlösung, einer 2x HEPES-gepufferten Kochsalzlösung und sterilem H₂O.

2.1.1.2 GenCarrier-2™ (GenCarrier-2)

Das Transfektionsreagenz GenCarrier-2™ wurde von der Firma Epoch biolabs Inc. bezogen. GenCarrier-2™ ist ein Hybridreagenz aus Polymeren, die kovalent an kationischen Liposomen gebunden sind.

2.1.1.3 FuGENE® HD Transfection Reagent (FuGENE)

Das Transfektionsreagenz FuGENE® HD wurde von der Firma Promega bezogen. Es ist ein nicht-liposomales Transfektionsreagenz, das aus einer Mischung von Lipiden und anderen Komponenten in 90% Alkohol besteht (Promega, Technical manual FuGENE® HD).

2.1.1.4 Lipofectamine™ 2000 Reagent (LF2000)

Das Transfektionsreagenz Lipofectamine™ 2000 wurde von der Firma Invitrogen™ bezogen. Lipofectamine™ 2000 besteht aus dem polykationischen Lipid DOSPA und dem neutralen Helferlipid DOPE (Invitrogen™).

2.1.2 Chemikalien, Stammlösungen und andere Materialien

<u>Amphotericin B:</u>	MW 924,084; amphotere Eigenschaften
<u>Antibiotika (PS):</u>	25000 U/mL Penicillin; 25 mg/mL Streptomycin
<u>ARA-C:</u>	Cytosin- β -D-arabinofuranosid Hydrochlorid (MW 279,68 g/M); 100 μ M ARA-C in 350 μ L Aliquots
<u>D-MEM:</u>	D-MEM high glucose (4,5 g/L) + L-Glutamine , PAA; SFM -ABS
<u>D-MEM + PS:</u>	500 mL D-MEM high glucose (4,5 g/L); 1,25 mL PS
<u>FCS-hi:</u>	FCS - Hitze inaktiviert; „fetal calf serum“; fetales Kälberserum zur Mediumsublimierung
<u>GFP:</u>	Green Fluorescent Protein 495 ng/ μ L; pEGFP-N1 bzw. pEGFP-C1 Vektor von Clontech; CMV Promotor
<u>KYN:</u>	Kynurensäure (MW 189,17 g/M) in 0,1 M NaOH (100 mM Stammlösung);
<u>NUTS/Nutrients:</u>	5 μ L ITSS; 3,15 mg/ml Progesteron; 72,5 mg Putrescin; ITSS: Insulin 25 mg, Transferrin 25 mg, Sodium Selenite 25 μ g
<u>Papain:</u>	Endkonzentration: 25 Units/mL in L-15 Leibovitz Medium mit 2 mM KYN; gehört zu den Cysteinproteasen; eiweißspaltend
<u>PDL:</u>	Poly-D-Lysine
<u>PUCK:</u>	137 mM NaCl (58,44 g/M); 5,4 mM KCl (74,55 g/M); 1,1 mM Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O (177,99 g/M); 1,1 mM KH ₂ PO ₄ (136,09 g/M); 6,1 mM Glukose (180,16 g/M); pH 7,3 eingestellt mit NaOH; autoklaviert; sterilfiltriert
<u>TTX:</u>	Tetrodotoxin (MW 319,28 g/M); 3,132 mL Essigsäure (0,0174 M); 1 mg TTX (1mM)

2.1.3 Medien und Lösungen für die Zellkultur

<u>PUCK-KYN-Lösung:</u>	49,5 mL PUCK-Lösung; 500 μ L 100 mM KYN (1 mM); sterilfiltriert
<u>Transfektionsmedium:</u>	100 μ L 1M $MgCl_2$ (2 mM); 500 μ L 100 mM KYN (1 mM) / bzw. 125 μ L Nuts; mit D-MEM high Glucose auf 50mL (49,4 mL bzw. 49,78 mL); sterilfiltriert
<u>Zellkulturmedium - ABS:</u> („rHC-Medium -ABS“)	45 mL D-MEM high Glucose; 5 mL FCS-hi; 100 μ L 1M $MgCl_2$ (2 mM); 125 μ L Nuts; sterilfiltriert
<u>Zellkulturmedium + PS:</u> („rHC-Medium + PS “)	45 mL D-MEM high Glucose + PS; 5 mL FCS-hi; 100 μ L 1M $MgCl_2$ (2 mM); 125 μ L Nuts; sterilfiltriert

2.1.4 Lösungen für die Elektrophysiologie

Amphotericin B Stocksolution: 5 mg Amphotericin B/100 μ L DMSO

Na²⁺ - Außenlösung: NaCl (120 mM); KCl (3 mM); Glucose (20 mM); HEPES („Basislösung“) (10 mM); pH 7,4 eingestellt mit NaOH

Außenlösung komplett: 48,8mL Außenlösung + Na²⁺; 1mL NaCl; 100 μ L $CaCl_2$; 100 μ L $MgCl_2$

K⁺ -Gluconat -Innenlösung: K⁺-Gluconat (120 mM); Na²⁺-Gluconat (1,5 mM); NaCl (3,5 mM); $CaCl_2$ (1,5 mM); $MgCl_2$ (0,25 mM); HEPES (10 mM) EGTA (5 mM; Ca²⁺-Chelator); pH 7,4 eingestellt mit KOH

Amphotericin B Innenlösung: 500 μ L K⁺-Gluconat-Innenlösung; 5 μ L Amphotericin Stock Solution; Verdünnung ist 1:100

TTX-haltige Außenlösung: aus einer 1 mM TTX-Stammlösung wurde durch 1:2000 - fache Verdünnung mit Außenlösung komplett eine 0,5 μ M Endlösung hergestellt.

2.2 ZELLKULTUR

2.2.1 Präparation und Aussaat

Die Zellen wurden aus den Hippokampi von neugeborenen Ratten (*Rattus norvegicus domesticus*) isoliert und anschließend in Zellkulturschälchen kultiviert.

Für die Präparation durften die Ratten nicht älter als 2 Tage, besser aber erst einen Tag oder wenige Stunden alt sein. Die Ratten wurden mit einer großen Schere dekapitiert, die Kopfhaut entfernt, der Schädel eröffnet und das Gehirn anschließend in ein Plastikschälchen (Sarstedt) gegeben, das 2 mL einer PUCK-KYN Lösung enthielt. Unter der Stereolupe wurde die Verbindung zwischen den Hemisphären durchgeschnitten und die beiden Hemisphären wurden vom restlichen Gehirn getrennt. Nach der Entfernung der Hirnhäute wurden die Hirnhälften so platziert, dass die Innenseite nach oben zeigte und die beiden bananenförmigen Hippokampi sichtbar wurden. Die Hippokampi konnten nun mit einem Skalpell entfernt und in ein separates, mit PUCK-KYN Lösung gefülltes und auf Eis gekühltes Sammelschälchen transferiert werden. Im Sammelschälchen wurden die Hippokampi von Gewebsresten anderer Hirnregionen und Blutgefäßen befreit und mit einem Skalpell mehrfach eingekerbt, um das Eindringen des Enzyms zu erleichtern.

Die Hippokampi wurden in eine, im Inkubator bereits vorgewärmte Papain-Lösung (25 units/mL) gegeben und für 20-30 Minuten im Inkubator bei 37 °C (5 % CO₂) inkubiert.

In dieser Zeit konnten weitere Vorbereitungen für die Kultivierung der Zellen getroffen werden. Die folgenden Schritte wurden alle unter einem Laminar-Flow-Abzug durchgeführt um den Befall der Zellkulturen durch Keime zu verhindern.

In 3 Zentrifugentubes wurde je 1 mL rHC-Medium + PS pipettiert, in denen später die Trituration („Pulverisierung“; hier: Auftrennung der Zellverbindungen in Einzelzellen) des Hippokampusgewebes vorgenommen wurde. In 3 weitere Zentrifugentubes wurden 3 Pasteurpipetten bereitgestellt, deren Spitzen mit Hilfe eines Bunsenbrenners auf Öffnungen unterschiedlichen Durchmessers enger geschmolzen wurden.

Nach der ca. 30 minütigen Inkubation im Enzym wurden die Hippokampi in eine eisgekühlte STOP-Lösung (PUCK-KYN-Lösung mit 25 % FCS-hi) pipettiert, um die bindegewebsverdauende Wirkung des Enzyms zu stoppen. Die Hippokampusfragmente wurden jetzt mit einer Pasteurpipette mit großer Öffnung, in das erste der drei mit D-MEM-Lösung + PS bereits gefüllte Zentrifugentube pipettiert. Im Laufe des Triturationsvorganges wurden die Gewebefragmente durch alle 3 vorbereiteten Zentrifugentubes

geführt. Durch das Auf- und Abziehen mit Pipetten immer geringeren Durchmessers entstand eine trübe Suspension aus Hippokampuszellen. Um die Zelldichte zu bestimmen wurde die Suspension mit Hilfe eines Häemocytometers ausgezählt. Hierfür wurde ein kleines Volumen der Suspension unter das Deckglas an beiden Seiten des Häemocytometers pipettiert. Es wurden nun je 2 definierte Flächen von 1mm*1mm auf jeder Seite der Zählkammer ausgezählt und durch 4 dividiert. Da sich laut Herstellerangaben unter dem Deckglas auf einer Fläche von 1 mm² 0,1 µL Suspension befinden, erhielt man durch Multiplikation mit 10⁴ die Anzahl der Zellen, die in einem mL Suspension enthalten waren. Für die Aussaat der Zellen wurden PDL-beschichtete 35 mm Zellkulturschälchen von Nunc, die mit je einem sterilen Glasring mit einem Durchmesser von 7 mm (A= 38,5 mm²), in der Mitte bestückt waren, mit 2 mL vorgewärmtem rHC-Medium + PS gefüllt, von denen etwa 2 Tropfen in den Ring selbst getropft wurden. Die PDL-Beschichtung diente den Zellen zur Anheftung am Untergrund. In Jedes Schälchen wurden nun 35 000 Zellen - das entsprach meist einer Menge zwischen 30 µL und 45 µL der Suspension - in die Mitte der Glasringe pipettiert. Der Glasring diente dazu, die Zellen in der Mitte des Schälchens zu konzentrieren, da sie nur dort für die elektrophysiologische Messung mit der Glaselektrode erreichbar waren. Nach ca. 2 Stunden waren die Zellen auf den Boden des Schälchens abgesunken und der Glasring konnte entfernt werden.

Am folgenden Tag wurde das antibiotikahaltige Medium, das bei der Präparation eventuell eingetretene Keime abtöten sollte, gegen 3 mL einer D-MEM-Lösung -ABS getauscht, um etwaige Effekte der Antikiotika auf neuronale Funktionen auszuschließen. Etwa 4 Tage nach der Präparation, nachdem sich ein flächendeckender Gliarasen gebildet hatte, wurden 30 µL von 100 µM ARA-C (Verdünnung 1:100) zu den Kulturen gegeben, um die DNA-Replikation der Gliazellen zu stören und somit eine Überwucherung der Neurone durch die Gliazellen zu verhindern. ARA-C wird bei der DNA-Replikation anstelle des Cytosins in die DNA eingebaut und führt so zu einem Abbruch der Replikation. Da sich in diesem Entwicklungsstadium nur mehr die Gliazellen und nicht die Neurone mitotisch teilen, wirkt ARA-C nur auf Gliazellen.

2.2.2 Kultivierung

Die angelegten Zellkulturen wurden bei 37 °C in einem Inkubator mit 5 % CO₂ gehalten und einmal pro Woche mit 180 µL autoklaviertem und sterilfiltriertem deionisiertem Wasser (MQ) auf mehr oder weniger konstantem Volumen gehalten (--> Ausgleich des

Volumenverlustes durch Verdunstung). So konnten die Zellen bis zu 4 Wochen für die Transfektionen verwendet werden.

Für meine Untersuchungen wurden die Zellen in 4 Altersklassen unterteilt, die in Abbildung 10 zu sehen sind. Zellen die jünger als 7 Tage alt waren, wurden als „jung“ bezeichnet, 7-14 Tage alte Zellen als „mittel“, 15-21 Tage alte Zellen als „alt1“ und Zellen die über 21 Tage alt waren wurden mit „alt2“ bezeichnet.

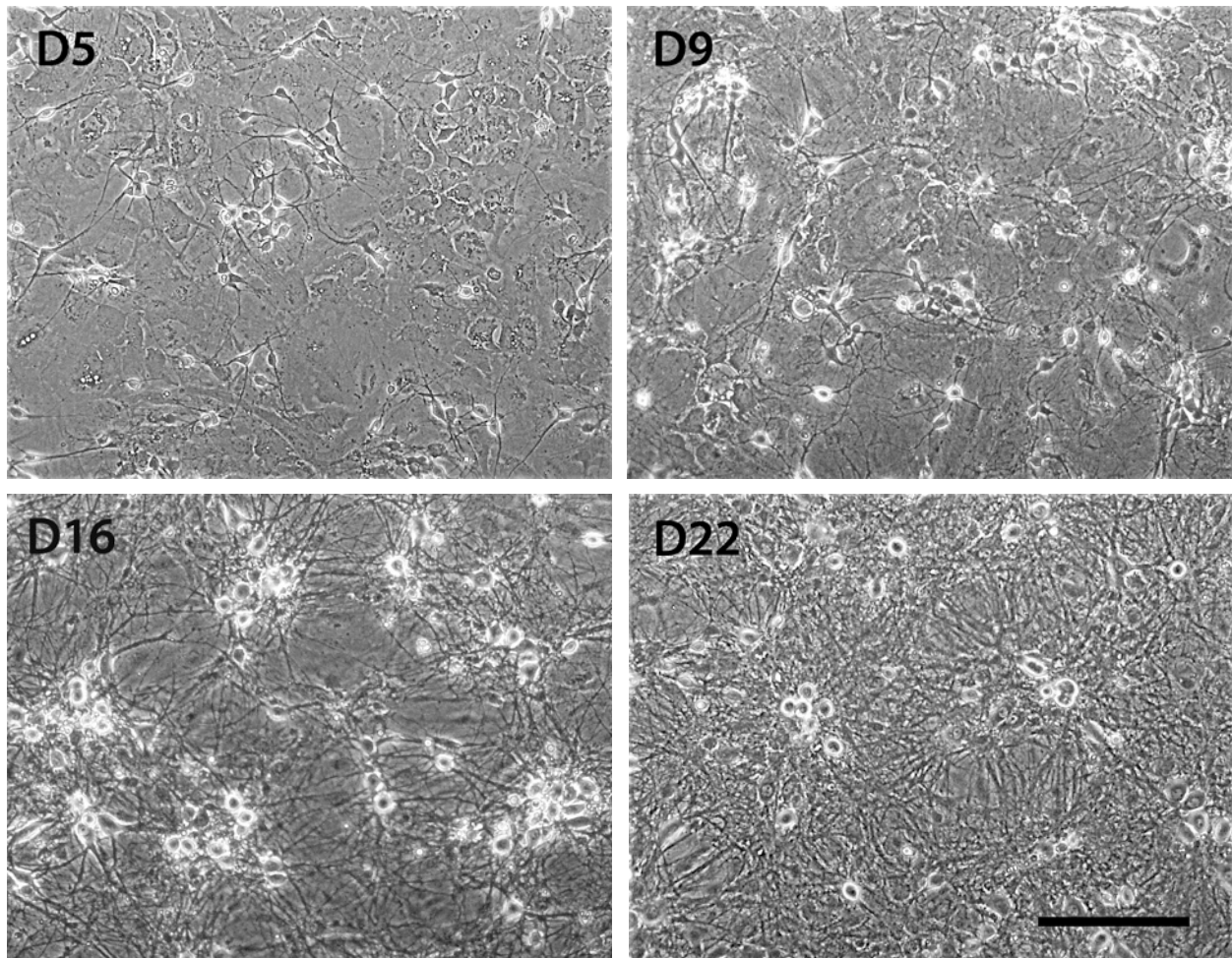


Abb. 10 . **Die 4 Altersklassen.** Junge Zellen (5 Tage). Mittlere Zellen (9 Tage). Alt1 Zellen (16 Tage). Alt2 Zellen (22 Tage). Es wurden 35 000 Zellen pro Schälchen ausgesät. Das Wachstum der Gliazellen wurde mit Hilfe von ARA-C gestoppt, sobald sich ein flächendeckender Gliarasen gebildet hatte. Die Neurone teilen sich nach dem Aussäen nicht mehr, sie bilden jedoch ausgedehnte Dendritenvernetzungen zu anderen Neuronen, die mit steigendem Alter zunächst zunehmen (D9 --> D16). Nach ca. 3-4 Wochen beginnen die Neurone abzusterben, die Neuronendichte sinkt (D22). D = day in vitro (Anzahl der Tage in denen sich die Zellen in Kultur befinden). Maßstab 100 μm

2.3 TRANSFEKTIONEN

Um Transfektionen zu optimieren können in mehreren Versuchsreihen einzelne Parameter variiert werden. Durch einen Vergleich der verschiedenen Transfektionserfolge können so Rückschlüsse auf die Auswirkung der verschiedenen Parameter gezogen werden.

Die Neurone wurden mit unterschiedlichen Transfektionsreagenzien transfiziert, wobei das Fluoreszenzprotein GFP zur Identifizierung der transfizierten Neurone diente (Abbildung 11).

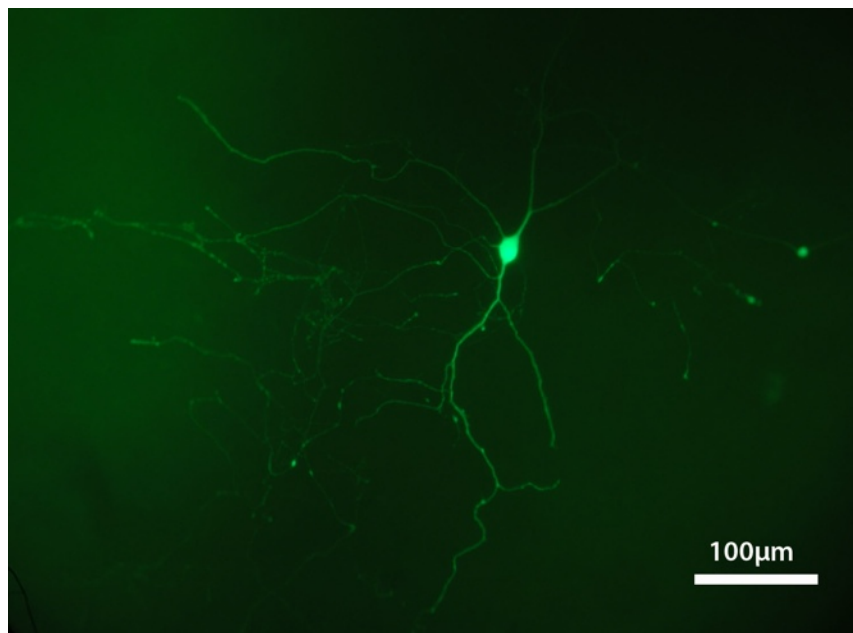


Abb. 11. **Mit GFP transfiziertes Hippokampusneuron.** Das 18 Tage alte Neuron wurde mit CalPhos™ transfiziert. Sowohl der Zellkörper, als auch die Zellfortsätze (Dentriten, Axon) emittieren bei ultravioletter Bestrahlung grünes Licht.

Neben der Austestung verschiedener Transfektionsreagenzien, war ein Schwerpunkt dieser Arbeit, die Auswirkung des Zellalters auf den Transfektionserfolg zu untersuchen. Hierfür wurden die Zellen wie im Unterpunkt 2.2.2 bereits erwähnt, in 4 verschiedene Altersgruppen eingeteilt und mit verschiedenen Transfektionsmethoden transfiziert.

Des Weiteren wurde verglichen, wie sich die Zugabe (bzw. das Weglassen) von Hilfsstoffen, im Speziellen Nuts bzw. KYN im Transfektionsmedium auswirkt. Durch die Eigenschaft der Kynurensäure als nicht-selektiver NMDA bzw. AMPA Rezeptor Antagonist, werden diese ionotropen Rezeptoren durch KYN inhibiert und die neuronale Erregbarkeit

reduziert. Nuts ist eine Mixtur verschiedener für die Nervenzelle wichtiger Nährstoffe. Um die Auswirkung von KYN bzw. Nuts auf den Zustand der Zellen bei und nach der Transfektion zu testen, wurden dem Transfektionsmedium einmal 125 μL Nuts und einmal 500 μL KYN beigegeben (2.1.3).

Vor jeder Transfektion mit dem jeweiligen Transfektionsreagenz wurde von den Kulturschälchen das ursprüngliche Nährmedium abgezogen und durch 2mL des vorgewärmten Transfektionsmediums (2.1.3) ersetzt. Das ursprüngliche Medium wurde in einem Zentrifugenröhrchen gesammelt und im Inkubator bei 37 °C aufbewahrt, um es den Zellen nach der Transfektion wieder zuzuführen.

Sämtliche Transfektionen wurden unter einem Laminar-Flow durchgeführt.

2.3.1 CalPhos™ Mammalian Transfection Kit

Mit einer mittels Alkohol und Bunsenbrenner sterilisierten Pinzette wurden autoklavierte Eppendorfröhrchen entnommen und bereitgestellt. Wie vor jeder Transfektion wurde das Zellkulturmedium gegen 2 mL eines Transfektionsmediums ausgetauscht.

Es wurden 2 unterschiedliche Lösungen (Lösung A und B) hergestellt. Pro Schälchen wurden im ersten Eppendorfröhrchen 2 μL GFP, 85,6 μL steriles H_2O und 12,4 μL 2M Calcium-Lösung in gegebener Reihenfolge vermengt, so dass insgesamt eine Menge von 100 μL entstand. In ein zweites Eppendorf wurden 100 μL einer 2x HEPES gepufferten Saline (Salzlösung) gefüllt. In der Saline wurden nun mit Hilfe einer Pasteur-Pipette und eines Gummistopfen Luftblasen erzeugt und die DNA-Calcium-Lösung wurde langsam eingetroppt. Nach einer Inkubationszeit von ca. 5 Minuten bei Raumtemperatur wurde das Transfektionsreagenz gut durchmischt (vortex) um größere Zusammenlagerungen aus Calciumphosphat zu verhindern. Danach wurden je 200 μL des Reagenz langsam auf die Zellen getropft. Um die Transfektionslösung optimal zu verteilen, wurden die eingetropften Schälchen gut geschwenkt. Nach einer fünfstündigen Inkubation bei 37 °C und 5 % CO_2 , wurden die Zellen 2 mal mit frischem Transfektionsmedium gespült um die Calciumphosphat-Ablagerungen, die sich auf dem Boden des Kulturschälchens abgelagert hatten, abzuwaschen. Anschließend wurde den Zellen ihr ursprüngliches Medium zurückgegeben. Etwa 24 Stunden nach der Transfektion konnte bestimmt werden, welche Zellen das transfizierte Gen aufgenommen und das Protein exprimiert hatten.

Transfektionsprotokoll CalPhos™:

(für 1x35mm Schälchen)

Lösung A: - 1 μg DNA (= 2 μL GFP)- 85,6 μL steriles H_2O

Reihenfolge beachten!

- 12,4 μL 2M Calcium-Lösung $\Sigma = 100 \mu\text{L}$ **Lösung B :** - 100 μL 2x HBS

- In **Lösung B** werden mit Hilfe einer Pasteur-Pipette und eines Gummistopfen Blasen erzeugt und die **Lösung A** mit Hilfe einer 1mL Pipette langsam eingetropf
- Die Transfektionslösung für 5-15 Minuten inkubieren
- Nach der Inkubationszeit die Lösung vortexen und anschließend **je 200 μL** tropfenweise zu den Zellen geben
- Schälchen gut schwenken
- Für ca. 5h bei 37°C inkubieren, danach Transfektionslösung entfernen und 2x mit Medium spülen (Abwaschen des Calcium)
- Mediumwechsel - altes Medium

2.3.2 Lipofectamine™ 2000

2.3.2.1 Lipofectamine™ 2000 (Standardprotokoll)

Mit einer mittels Alkohol und Bunsenbrenner sterilisierten Pinzette wurden abermals autoklavierte Eppendorfröhrchen entnommen und bereitgestellt. Pro Schälchen, das

transfiziert werden sollte, wurden nun je 250 μL reines D-MEM ohne Serum, Antibiotika und Ergänzungsstoffe (SFM -ABS) in zwei 1,5 mL Eppendorfröhrchen - eines für die DNA und eines für das Transfektionsreagenz - pipettiert. Anschließend wurden 1,5 μL GFP bzw. 15 μL LF2000 in die entsprechenden Eppendorfröhrchen pipettiert und vermischt. Um die Bildung der Liposomen-DNA-Komplexe zu gewährleisten, wurde die Lösung 20 - 30 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden je 500 μL Transfektionslösung pro Schälchen tropfenweise auf die Zellen pipettiert.

Nach einer Inkubation bei 37 °C und 5 % CO_2 von 5 Stunden wurde das Zellmedium mit einer Unterdruck-Pipette abgezogen und das alte, vorgewärmte Medium den Zellen reappliziert.

Transfektionsprotokoll LF2000/Standardprotokoll:

(für 1x35mm Schälchen)

- 15 μL LF2000 in 250 μL reines D-MEM high glucose pipettieren
- 0,75 μg DNA in 250 μL reines D-MEM high glucose pipettieren
- die beiden Lösungen zusammenführen und 20-30min inkubieren
- währenddessen Medium wechseln (SFM -ABS); altes Medium aufheben
- je 500 μL der Transfektionslösung langsam auf die Zellen pipettieren
- 5 Stunden bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubieren
- Mediumwechsel - altes Medium

Zunächst wurden Zellen aller Alterskategorien nach dem Standardprotokoll für Lipofectamine™ 2000 transfiziert. Anschließend wurden folgende Parameter variiert:

2.3.2.2 Variation der Lipofectamine™ 2000-Menge

Es wurden 7,5 μL bzw. 15 μL bzw. 30 μL LF2000 pro Schälchen verwendet. Transfiziert wurden Zellen der Kategorie „jung“ und „mittel“.

	7,5 μL LF2000	15 μL LF2000	30 μL LF2000
0,75 μg DNA	jung / mittel	jung / mittel	jung / mittel

2.3.2.3 Variation der DNA-Menge

Zellen der Kategorie „mittel“ wurden mit 7,5 μL und 15 μL LF2000 mit je 1,5 μg , 3 μg und 4,5 μg DNA transfiziert.

7,5 μL LF2000	15 μL LF2000
1,5 μg DNA (3,03 μL GFP)	1,5 μg DNA (3,03 μL GFP)
3 μg DNA (6,06 μL GFP)	3 μg DNA (6,06 μL GFP)
4,5 μg DNA (9,09 μL GFP)	4,5 μg DNA (9,09 μL GFP)

2.3.2.1 7,5 μL Lipofectamine™ 2000

Es wurden Zellen aller vier Alterskategorien mit 7,5 μL Lipofectamine™ 2000 und 0,75 μg DNA transfiziert.

2.3.3 GenCarrier-2™

Mit einer, mit Alkohol und Bunsenbrenner sterilisierten Pinzette wurden autoklavierte Eppendorfröhrchen entnommen und bereitgestellt. Pro Schälchen, das transfiziert werden sollte, wurden zwei Eppendorfröhrchen mit je 250 μL reinem D-MEM high glucose befüllt. In eines der Röhrchen wurden anschließend 6 μL GenCarrier-2™ und in das andere 1,5 μL GFP pipettiert. Der Inhalt der beiden Eppendorfröhrchen wurde zusammen geführt und für 20-30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden tropfenweise je 500 μL auf die Zellen pipettiert, die sich bereits in Serum freiem Transfektionsmedium befanden.

Nach einer Inkubationszeit von 5 Stunden im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂, wurde das Transfektionsmedium entfernt und durch das alte, vorgewärmte Zellkulturmedium ausgetauscht. Wie bei den anderen Transfektionen auch, wurde die Expression der transfizierten DNA 24 Stunden nach der Transfektion untersucht.

Transfektionsprotokoll GenCarrier-2™:

(für 1x35mm Schälchen)

- 6 µL GenCarrier-2™ in 250 µL reines D-MEM high glucose pipettieren
- 0,75 µg DNA in 250 µL reines D-MEM high glucose pipettieren
- die beiden Lösungen zusammenführen und 20-30min inkubieren
- währenddessen Medium wechseln (SFM -ABS); altes Medium aufheben
- je 500 µL der Transfektionslösung langsam auf die Zellen pipettieren
- 5 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubieren
- Mediumwechsel - altes Medium

2.3.4 FuGENE® HD

Mit einer mittels Alkohol und Bunsenbrenner sterilisierten Pinzette wurden wiederum autoklavierte Eppendorfröhrchen entnommen und bereitgestellt. Vor der Verwendung des FuGENE® HD musste dieses auf Raumtemperatur erwärmt und kurz gevortext werden. Die eingesetzten Volumina entsprechen den Herstellerangaben und wurden auf die benötigte Kulturschalengröße hochgerechnet. Für 1 Schälchen, das transfiziert werden sollte, wurden 55 µL reines D-MEM high glucose und 1,1 µL GFP in einem Eppendorfröhrchen vermischt und anschließend gut gevortext. Das Verhältnis von Transfektionsreagenz zu DNA sollte 3:1 betragen, weshalb nach der Vortexbehandlung

3,3 μL des FuGENE® HD's direkt zu der verdünnten DNA pipettiert und durch Auf- und Abziehen der Lösung mit der Pipette gut durchmischt wurden. Die Transfektionslösung wurde nun etwa 5 Minuten inkubiert, bevor je 57 μL langsam auf die, bereits im Transfektionsmedium befindlichen, Zellen pipettiert wurden. Auch hier wurde der Erfolg der Transfektion 24 Stunden nach der Transfektion ermittelt.

Transfektionsprotokoll FuGENE® HD:

(für 1x35mm Schälchen)

- FuGENE® HD auf Raumtemperatur erwärmen und kurz vortexen
- 0,55 μg DNA in 55 μL reines D-MEM high glucose pipettieren --> vortexen
- 3,3 μL FuGENE® HD zu dem verdünnten DNA-Gemisch (3:1 Verdünnung)
--> sofort mischen
- 0-15 min bei Raumtemperatur inkubieren
- währenddessen Medium wechseln (SFM -ABS); altes Medium aufheben
- je 57 μL der Transfektionslösung langsam auf die Zellen pipettieren
- 5 Stunden bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubieren
- Mediumwechsel - altes Medium

2.4 AUSWERTUNG

Um den Erfolg der Transfektionen zu bestimmen, wurden die Zellen 24 Stunden nach der Transfektion mit einer Kamera von Canon mit passendem Mikroskopadapter und einem inversen Mikroskop von Zeiss (Zeiss, Axiovert 40 CFL) in 50-facher (10 mm^2) und 100-facher (3 mm^2) Vergrößerung, einmal im Phasenkontrast und einmal unter UV-Licht (Quecksilberdampflampe HBO 50/AC) abfotografiert. Durch Markieren der unter UV-Licht

fluoreszierenden Neurone mit Hilfe der Microsoft Programme Paint bzw. PowerPoint, wurde die Anzahl der transfizierten Neurone auf einer Fläche von 10 mm² ausgezählt. Für die graphische Darstellung des Transfektionserfolges, wurde die Anzahl der transfizierten Neurone innerhalb dieser Fläche angegeben.

2.4.1 Transfektionseffizienz

Um die Transfektionseffizienz zu bestimmen, wurde bei 8 verschiedenen Schälchen anhand der Phasenkontrastbilder die Anzahl aller transfizierten und nicht transfizierten Neurone auf einer Fläche von 3 mm² mit Hilfe des Adobe Photoshop CS5 ausgezählt. Aus der Anzahl dieser Neurone wurde der Mittelwert berechnet, und die Anzahl wurde auf eine Fläche von 10 mm² hochgerechnet. Als Transfektionseffizienz wurde der prozentuelle Anteil der transfizierten Neurone innerhalb der bestimmten Gesamtmenge an Neuronen auf einer Fläche von 10 mm² bestimmt. In Abbildung 12 ist ein Ausschnitt einer solchen Auszählung gezeigt.

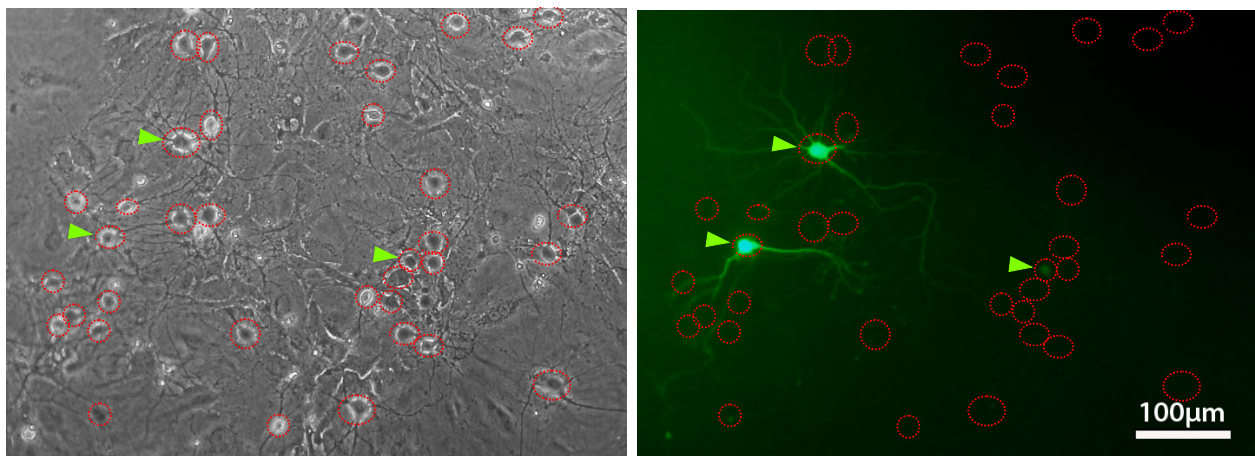


Abb. 12. **Bestimmung der Transfektionseffizienz.** Im Phasenkontrastbild wird die Anzahl aller Neurone auf einer bestimmten Fläche ausgezählt (rot umkreist). Derselbe Ausschnitt unter UV-Licht zeigt die fluoreszierenden Neurone (grüne Pfeile), die GFP aufgenommen haben und dieses auch exprimieren. Die Transfektionseffizienz bezeichnet den prozentuellen Anteil der transfizierten Neurone innerhalb der ausgezählten Gesamtpopulation an Neuronen.

2.5 ELEKTROPHYSIOLOGIE

Elektrophysiologische Messungen wurden durchgeführt, um auf den Zustand der Neurone nach der Transfektion zu schließen. Es wurden dazu current-clamp-Versuche mit Hilfe der perforated-patch Methode durchgeführt.

2.5.1 Versuchsaufbau

Mit dem horizontalen Micropipette-Puller Sutter P-97 von Sutter Instrument Co. (Novato, CA, U.S.A.) wurden Borosilikatglaskapillaren (Science Products GB150-8P, Größe 0,86 x 1.50 x 80 mm) zu Patch-Elektroden gezogen. Durch Eintippen der Elektrodenspitze in die Innenlösung (siehe 2.1.4), sog die Spitze auf Grund der wirkenden Kapillarkräfte etwas Innenlösung auf. Die restliche Elektrode wurde von hinten mit Hilfe einer dünnen Quarzglasakanüle (MF28G-5, World Precision Instruments) und einer 1 mL Spritze zu zwei Drittel mit einer Amphotericin B-Lösung (2.1.4) gefüllt. Das Amphotericin B bindet an das membrangebundene Cholesterin und erzeugt auf Grund seiner amphoteren Eigenschaft Poren in der Zellmembran. Dadurch wird ein elektrischer Zugang zum Zellinneren geschaffen, der das physiologische Milieu im Cytoplasma aber weitgehend unbeeinflusst lässt. Die beim Befüllen entstandenen Luftblasen im unteren Teil der Pipette, wurden durch leichtes Schnippen gegen die Kapillare gelöst. Die Pipette (Pip) wurde nun durch Fixieren in einer Pipettenhalterung, die sich auf einem Mikromanipulator (Luigs und Neumann SMI/Mini 25) befand, über die am Vorverstärker CV-7B (Vv; Axon Instruments) befindliche Ag/AgCl Elektrode, die in die Amphotericin B-Innenlösung ragte, an den Messkreis angeschlossen. Die Referenzelektrode (RE), die ebenfalls aus Ag/AgCl bestand, wurde in das mit Außenlösung gefüllte Kulturschälchen gehängt und an einem Magneten fixiert. Über die Messelektrode wurden die Signale zuerst über einen Vorverstärker und schließlich an den Multiclamp 700B Verstärker (V) von Axon Instruments übertragen, der durch die Software „Multiclamp 700B commander“ (Axon Instruments) gesteuert wurde. Die eingehenden analogen Signale wurden durch den Digidata 1440A (Axon Instruments) Digitalisierer (AD) digitalisiert und konnten so durch das Computerprogramm Clampex 10.2 (p-CLAMP-Softwarepaket; Axon Instruments) aufgezeichnet werden. Die transfizierten Neurone, die gemessen werden sollten, wurden mit Hilfe eines inversen Mikroskops (M) von Nikon (Nikon Eclipse TE3000) mit 100 bis 400-facher Vergrößerung unter UV-Licht und einem Breitbandfluoreszenzfilter für GFP

ausgewählt, wobei der Mikroskopisch in dem sich das Zellkulturschälchen befand in 2 Richtungen bewegt werden konnte und so die mittige Ausrichtung des Neurons ermöglichte. Die Annäherung mit der Elektrode an das Neuron fand unter normalem Licht im Phasenkontrast statt.

Zum Umspülen der Zellen mit Außenlösung, bzw. mit der TTX-Lösung, diente eine Umspülungseinheit (UE), die über 12 feine Schläuche in einer feinen Applikationsspitze (AS) mündete (ALA Scientific Instruments, Micro-Manifold, 12 x 100µm Kapillaren, 1 x 200µm Spitze), die sich ebenfalls auf einem Mikromanipulator (Luigs und Neumann SMI/Mini 25) befand und über ein DAD Superfusion System (DAD; Parallel Port Instrumentation Interface; Scientific Instruments) bedient werden konnte, das über einen separaten Computer mit dem Programm DAD 12 (ALA Scientific Instruments) gesteuert wurde. Die Applikationsspitze wurde so positioniert, dass sie bei 400-facher Vergrößerung gerade noch im Gesichtsfeld des Mikroskops zu sehen war (Abbildung14). Mit einem Druck von 175 Pa wurde das zu messende Neuron (N) und die Zellen in der näheren Umgebung mit den entsprechenden Lösungen umspült.

Um Erschütterungen von außen zu minimieren, war der Tisch (TMC; Micro-g 63-564) auf dem sich die empfindlichen Geräte befanden, mit Druckluft gedämpft. Über einen Faradaykäfig (FK) wurde der Versuchsaufbau geerdet und vor elektronischen Störeinflüssen abgeschirmt.

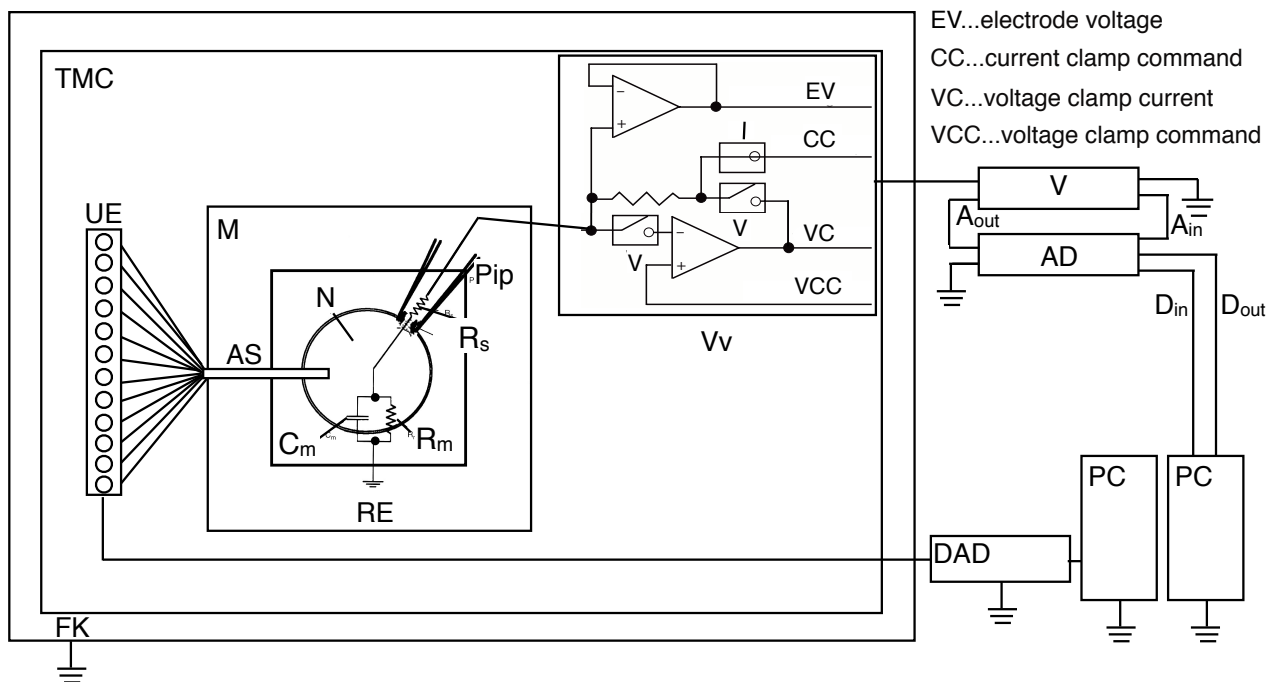


Abb. 13. **Versuchsaufbau.** Aufbau der Apparaturen zur Messung des elektrischen Potentials. AD = Analog-Digital-Wandler; AS = Applikationsspitze; C_m = Membrankapazität; DAD = Superfusionssystem; FK = Faradaykäfig; M = Mikroskop; N = Neuron; PC = Computer; Pip = Pipette; RE = Referenz-

elektrode; R_m = Membranwiderstand des Neurons; R_s = Serienwiderstand; TMC = Druckluft gedämpfter Tisch; UE = Umspülungseinheit; V = Verstärker; Vv = Vorverstärker. (Numberger und Draguhn 1996, MultiClamp 700B Microelectrode Amplifier)

Das Zellkulturschälchen wurde erst unmittelbar vor der Messung aus dem Inkubator geholt und für das Experiment vorbereitet. Dabei wurde das Zellkulturmedium entfernt und nach einem einmaligen Waschvorgang durch 2,25 mL einer auf Raumtemperatur vorgewärmten Außenlösung ersetzt. Auch die photoreaktive Amphotericin B-Innenlösung wurde erst unmittelbar vor der Messung, durch Verdünnen der Amphotericin B Stocksolution, hergestellt und nach spätestens 1,5 Stunden erneuert.

In Abbildung 14 ist ein Neuron mit aufgesetzter Patch-Pipette (= Messelektrode) zu sehen, das durch die Applikationsspitze mit Außenlösung umspült wird. Die Referenzelektrode ist nicht zu sehen, da sich diese immer am Rand des Zellkulturschälchens befand, um die in der Mitte liegenden Neurone nicht zu beschädigen.

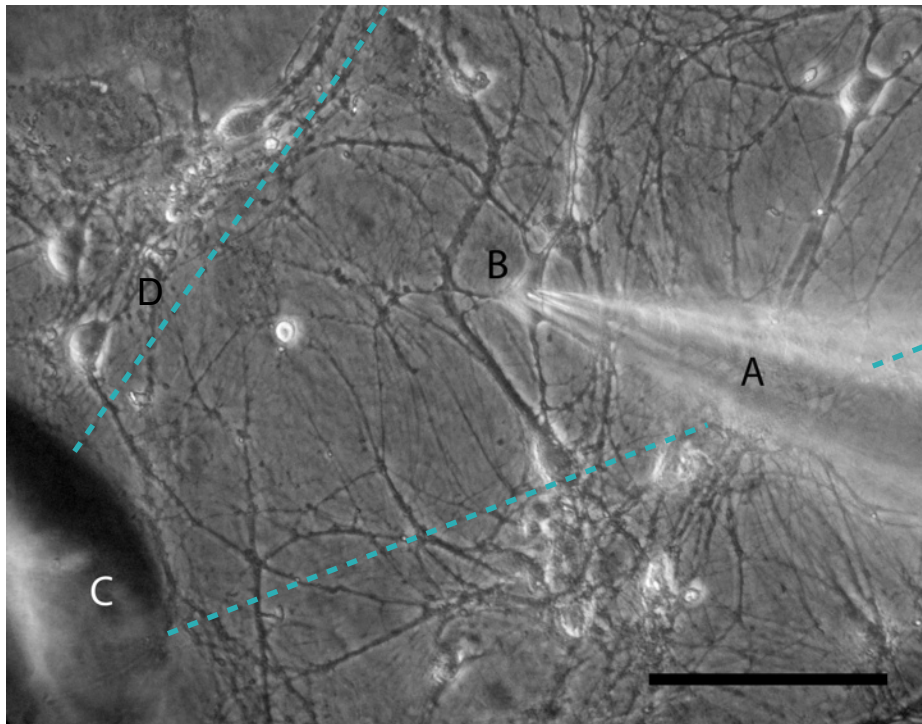
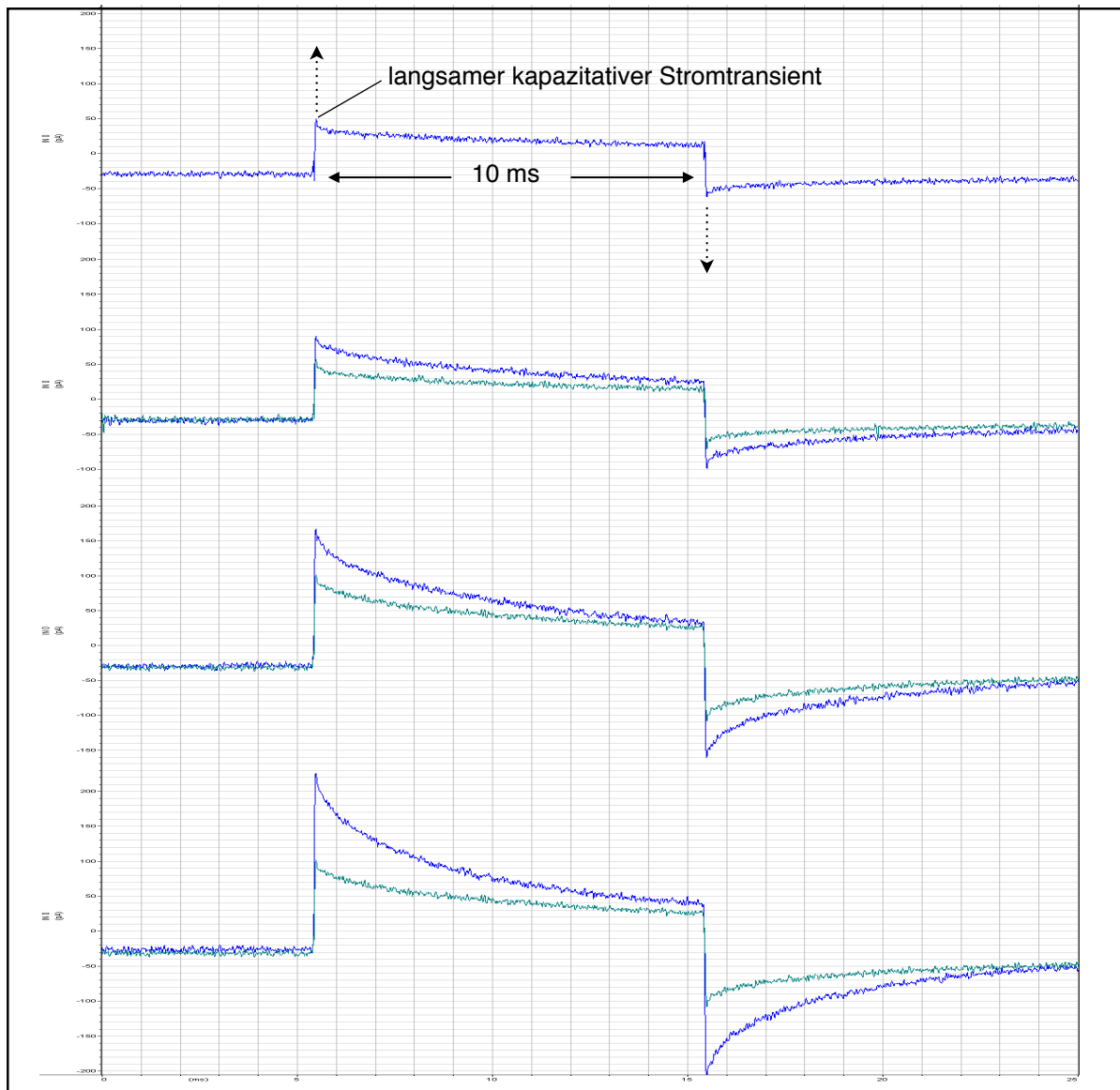


Abb. 14. **Neuron im Patch-clamp-Experiment.** Durch die mit Amphotericin B-Innenlösung gefüllte Elektrode (A) wird eine Verbindung zum Neuron (B) hergestellt. Das Amphotericin B schafft durch Porenbildung in der Zellmembran einen elektrischen Zugang und ermöglicht so die Messung von Aktions- und Ruhepotentialen, sowie die elektronische Stimulation, mit Hilfe derer der Membranwiderstand berechnet werden kann. Das Neuron befindet sich in dem von der Applikationsspitze (C) ausgehenden Umspülungskegel (D) aus Außenlösung. Maßstab: 100 μm

2.5.2 Eröffnen der Zelle

Nachdem das Neuron so ausgerichtet wurde, dass es sich genau in der Mitte des Blickfeldes befand, wurde die Applikationsspitze in einer Entfernung von wenigen 100 μm auf das Neuron ausgerichtet und die Zelle wurde umspült. An der Elektrode wurde durch eine Wassersäule ein leichter Überdruck erzeugt, sodass die Innenlösung an der Elektrodenspitze nach außen gedrückt wurde. Nach Eintauchen der Elektrode in die Außenlösung des Zellkulturschälchens, wurde bei aktiver Spannungsklemme (VC; Haltepotential = 0mV) als Antwort auf einen 100 ms langen Spannungssprung (Testpuls) von +5mV im Clampex ein rechteckiger Strompuls sichtbar, dessen Basisstrom bei ca. 0 mV liegen sollte. Da der Basisstrom auf Grund des „Pipetten-Offsets“ (das einen immer vorhandenen Strom in der Außenlösung darstellt) aber nie bei 0 mV liegt, musste dieses erst mit Hilfe des Multiclamp 700B commander eliminiert werden. Nun konnte ein Bildschirmüberlauf (= sweep) gespeichert und die Elektrode dem Neuron unter Sichtkontrolle zuerst mit Hilfe des Mikroskops und anschließend mit Hilfe der Stromkurve, angenähert werden. Ein plötzlicher Abfall der Amplitude des Strompulses zeigte die Berührung der Elektrode mit der Zellmembran und mit dieser eine Zunahme des Elektrodenwiderstandes an. Durch Anlegen eines Sogs an die Elektrode wurde ein „tight-seal“ hergestellt, das zu einem hohen Abdichtungswiderstand zwischen Pipette und Zellmembran und damit zu einem Absinken des Strompulses deutlich unter 100 pA führte. Durch Umschalten auf das Programm „1Break_Ch1.pro“ (Haltepotential: -70mV, Spannungssprung: +10mV) wurden schnelle kapazitative Stromtransienten am Haltestrom sichtbar, die ebenfalls mit Hilfe des Multiclamp 700B commander minimiert wurden. Erneut wurde ein „sweep“ gespeichert, um die nunmehr abzuwartende Zunahme der langsamen kapazitiven Stromtransienten und somit die langsame Porenbildung am Membranfleck unterhalb der Elektrode mitzuverfolgen, bis diese ihre maximale Auslenkung erreicht hatten und somit die elektrisch eröffnete Zelle signalisierten (Abbildung 15).

Abb. 15. **Eröffnung der Zellmembran.** Nach Minimierung der schnellen kapazitiven Stromtransienten, ist eine Zunahme der langsamen kapazitiven Stromtransienten und mit diesen die langsame Öffnung der Zellmembran, durch das Poren bildende Amphotericin B zu sehen. Haben die langsamen kapazitiven Stromtransienten ihr Maximum erreicht, ist die Zelle elektronisch gesehen geöffnet. Der gespeicherte „sweep“ ist in grün und der aktuelle „sweep“ in blau gehalten.



2.5.3 Messung des Membranpotentials

Sobald die Zelle vollständig geöffnet war, wurde auf Stromklemme („current-clamp“; IC) umgeschaltet. Die Zelle wurde jetzt nicht wie in der Spannungsklemme auf konstanten -70mV gehalten, sondern es wurde das elektrische Potential der Zelle selbst gemessen. Das Ruhepotential der Zellen lag meist bei Werten zwischen -55 mV und -70 mV, gelegentlich wurde ein positiveres Potential festgestellt, das als Kennzeichen beschädigter Zellen gewertet wurde. Zellen die ein Ruhepotential positiver als -30 mV hatten, zeigten meist keine Aktionspotentiale mehr.

Im Programm „Current clamp continuous.pro“ wurden den Zellen 4-6 mal 8 Sekunden lange Strompulse einer Stärke zwischen -50 pA und +40 pA mit einem Δ (= Zunahme der Stromstärke pro Strompuls) von 15 pA oder 20 pA injiziert. Dabei wurde das Neuron

einmal mit normaler physiologischer Außenlösung und einmal mit TTX versetzter Außenlösung umspült (Abbildung 16). Das TTX diente in seiner Eigenschaft als Natriumkanalblocker dazu, Aktionspotentiale zu unterdrücken und erleichterte so die Bestimmung des Membranruhepotentials und die anschließende Berechnung des Membranwiderstandes des jeweiligen Neurons.

Neben der Bestimmung des Membranwiderstandes wurde auch die Höhe des Ruhepotentials, sowie die Ausbildung von Aktionspotentialen herangezogen, um den Zustand des Neurons qualitativ zu beschreiben.

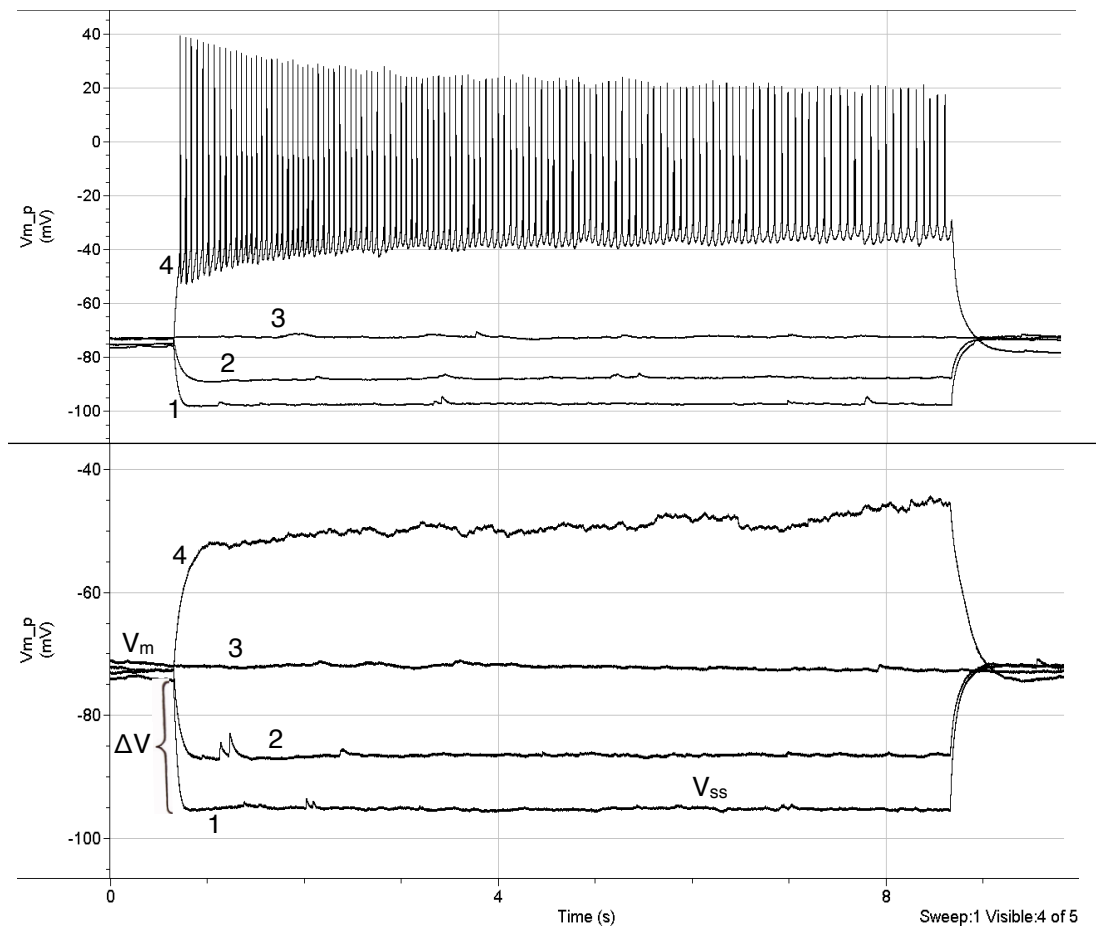


Abb. 16. **Messung des Membranpotentials.** Ein mit 7,5 μ L LF2000 transfiziertes Neuron bei der elektrophysiologischen Messung im Programm „Current clamp continuous.pro“ während dem Einspülen von Außenlösung ohne (oben) und mit (unten) TTX. Im oberen Bild sind die Auslenkungen der Spannung bei Injektion von -20 pA (1), -10 pA (2), 0 pA (3) und +20 pA (4) zu sehen. Im unteren Bild die Auslenkungen bei Stromstärken von -20 pA (1), -10 pA (2), 0 pA (3) und +10 pA (4). Im Programm *ClampFit* wurden die Werte des Ruhepotentials (V_m), des „Steady state“ (V_{ss}) und der maximalen negativen Auslenkung vom V_m (ΔV) ermittelt.

2.5.4 Berechnung des Membranwiderstandes

Im Programm *ClampFit 10.2* wurden die unter TTX-Einfluss gemessenen Aufzeichnungen zur Berechnung des Membranwiderstandes (R_m) ausgewertet. Es wurden die Spannungen des Ruhepotentials (V_m), des „Steady state“ (V_{ss}) und die maximale negative Auslenkung vom Ruhepotential (ΔV) gemessen. Durch Umformung des Ohm'schen Gesetzes $U = R \times I$ in

$$R_m [M\Omega] = \Delta V [mV] / I [pA]$$

wurde der Membranwiderstand des Neurons berechnet. Die Membranwiderstände der unterschiedlichen Transfektionsmethoden wurden in Tabellenform zur Bewertung zusammengestellt.

2.6 STATISTIK

Alle Graphiken wurden mit dem Programm GraphPad Prism 5 von GraphPad Software erstellt. Statistische Tests wurden mit den Programmen SPSS Statistics 15.0 von IBM und ebenfalls mit GraphPad Prism 5 errechnet.

2.6.1 Test auf Normalverteilung

Alle Werte mit denen statistische Tests durchgeführt wurden, wurden vor dem eigentlichen Test mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstests auf Normalverteilung getestet.

2.6.2 Statistische Auswertung

Die statistischen Auswertungen erfolgten über eine one-way ANOVA mit einem anschließenden Post-Hoc-Test nach Dunnett (für den Vergleich einer Kontrollgruppe mit allen anderen Gruppen), bzw. nach Tukey (für den Vergleich aller Gruppen untereinander).

Für den statistischen Vergleich von nur zwei Gruppen miteinander, wurde ein zweiseitiger t-Test mit einem vorgeschalteten F-Test auf Homogenität der Varianzen durchgeführt.

3. ERGEBNISSE

3.1. TRANSFEKTIONEN

3.1.1 Vergleich der Transfektionsmethoden

In Abbildung 17 sind die Expressionen von GFP 24 Stunden nach Transfektion mit CalPhos (a), LF2000 (b), GenCarrier-2 (c) und FuGENE (d) unter UV-Licht dargestellt. Es ist zu sehen, dass Transfektion mit CalPhos bzw. LF2000 zu einem ähnlichen Transfektionserfolg führten. Bei der CalPhos Transfektion wurden nicht neuronale Zellen (z.B. Glia) jedoch wesentlich seltener transfiziert als bei der Transfektion mit LF2000. Der Transfektionserfolg der Reagenzien FuGENE und GenCarrier-2 beschränkte sich hauptsächlich auf die Transfektion nicht neuronaler Zellen wie etwa Gliazellen. Mit FuGENE konnte kein einziges Neuron und mit GenCarrier-2 maximal 2 Neurone transfiziert werden.

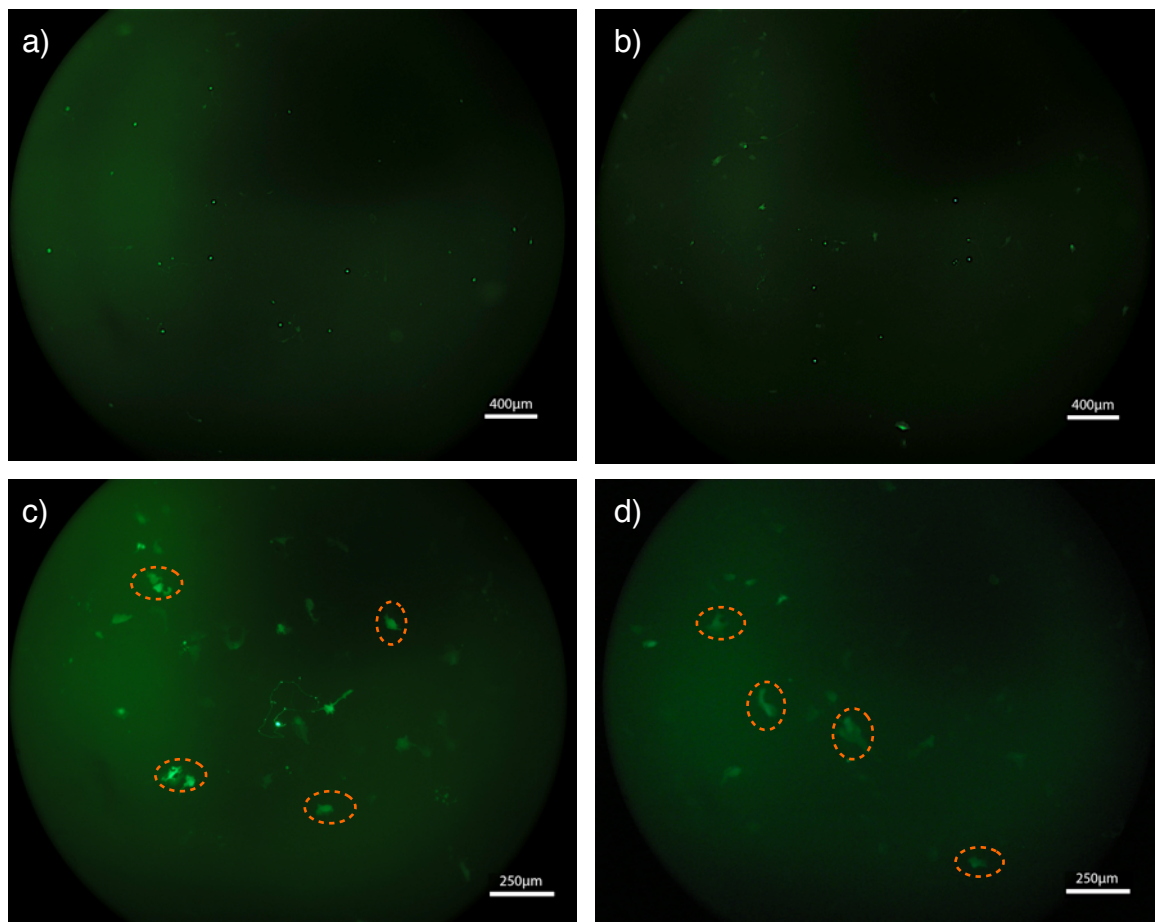
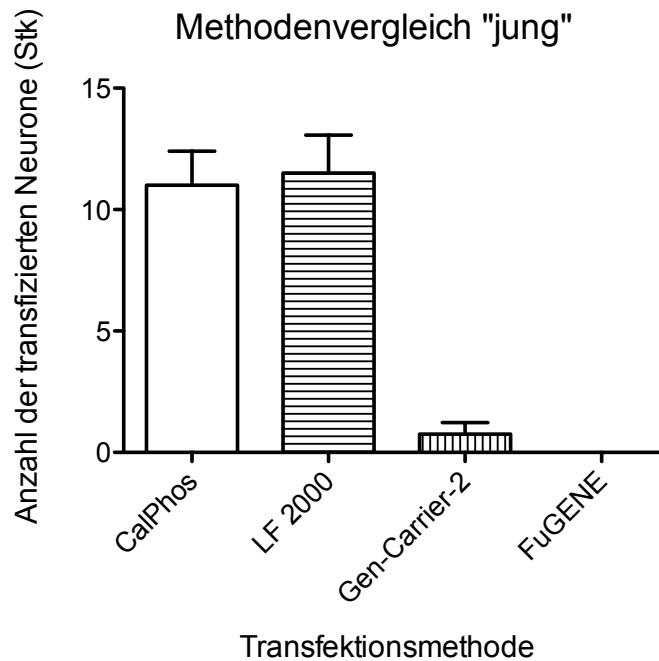


Abb. 17. **Vergleich der Transfektionsmethoden. Original.** Es sind 4 Tage alte, transfizierte Zellen nach Transfektion mit a) CalPhos™. b) Lipofectamine™ 2000. c) GenCarrier-2™ und d) FuGENE® HD unter UV-Licht dargestellt. Die Bilder a) und b) sind mit 50-facher Vergrößerung und die Bilder c) und d) mit 100-facher Vergrößerung aufgenommen.  Beispiel nicht neuronaler Zellen (z.B. Glia)

a)



b)

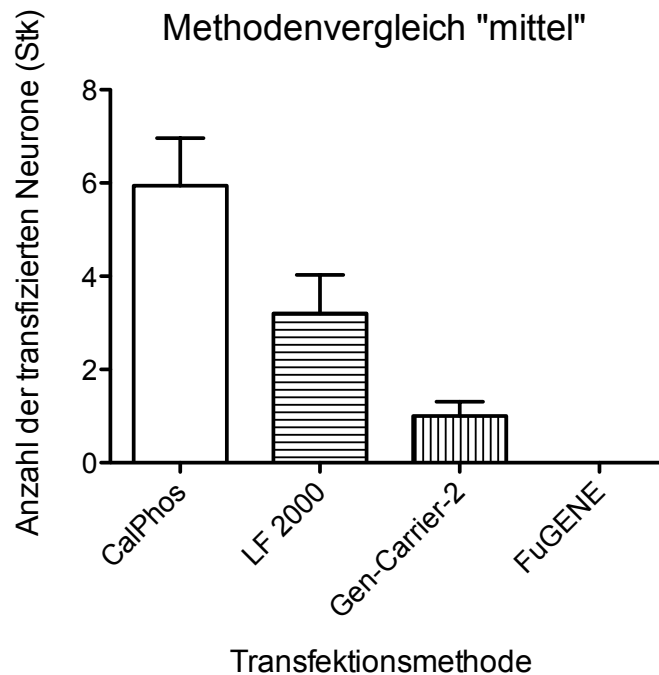


Abb. 18. **Vergleich der Transfektionsmethoden. Auswertung.** Es ist der Transfektionserfolg der verwendeten Transfektionsmethoden und -reagenzien

an a) < 7 Tage alten und b) 7 - 14 Tage alten Neuronen dargestellt. Die Werte sind als Mean $\pm$ SEM angegeben. Die y-Achse stellt die Anzahl der transfizierten Neurone auf einer Fläche von 10 mm² dar.

In Abbildung 18 sind die Transfektionserfolge der verschiedenen Methoden graphisch dargestellt. Es ist zu sehen, dass Transfektionen an < 7 Tage alten Zellen, die mit CalPhos bzw. LF2000 durchgeführt wurden, mit durchschnittlich 13 ± 2 (CalPhos) bzw. 12 ± 2 (LF2000) (Mean $\pm$ SEM) transfizierten Neuronen pro 900 Neuronen, eine ähnliche Transfektionseffizienz (Tabelle 1) von 1,4 % bei Transfektionen mit CalPhos und 1,3 % bei Transfektionen mit LF2000 liefern.

Transfektionen mittelalter Zellen wiesen eine allgemein niedrigere Erfolgsrate als jüngere Zellen auf. Hier lag der Transfektionserfolg von mit CalPhos transfizierten Zellen mit 7 ± 1 (Mean $\pm$ SEM) transfizierten Neuronen (entspricht einer Effizienz von 0,8 %) etwas überhalb des Transfektionserfolges mit LF2000 transfizierten Zellen, die mit 4 ± 2 transfizierten Neuronen eine Effizienz von 0,4 % aufwiesen.

Die durchschnittlichen Transfektionseffizienzen der verschiedenen Methoden sind in Tabelle 1 für junge und mittelalte Zellen angegeben. Es ist zu sehen, dass bei Transfektionen mit CalPhos und LF2000 die Effizienz bei mittelalten Zellen ca. nur halb so hoch ist wie jene bei jungen Zellen. Lediglich die Effizienz der mit GenCarrier-2 transfizierten Neurone bleibt mit 0,1 % in beiden Altersstufen gleich niedrig. Die maximale Effizienz, die mit CalPhos erreicht werden konnte, betrug 4 %, mit LF2000 konnte eine maximale Effizienz von 2,4 % erreicht werden. Bei mit FuGENE transfizierten Zellen, betrug die Transfektionseffizienz immer 0 %.

Tab. 1. Es sind die durchschnittlichen Transfektionseffizienzen der getesteten Transfektionsmethoden an jungen (< 7d) und an mittelalten (7 - 14d) Neuronen in % angegeben.

	CalPhos	LF2000	GenCarrier-2	FuGENE
jung (< 7d)	1,4 %	1,3 %	0,1 %	0 %
mittel (7-14d)	0,8 %	0,4 %	0,1 %	0 %

Die statistische Auswertung erfolgte durch eine one-way ANOVA, die signifikante Unterschiede im Vergleich der unterschiedlichen Transfektionsmethoden an jungen ($p < 0,001$), sowie an mittelalten ($p < 0,01$) Zellen zeigte. Ein anschließender Post-Hoc-Test nach Dunnett bzw. Tukey zeigte, dass sich bei jungen Zellen die Transfektionsmethoden CalPhos und LF2000 signifikant von den beiden anderen Methoden unterschieden (CalPhos vs GenCarrier-2: **; CalPhos vs FuGENE: **; LF2000 vs GenCarrier: **; LF2000 vs FuGENE: **). Sowohl CalPhos und LF2000, als auch GenCarrier-2 und FuGENE wiesen untereinander keine signifikanten Unterschiede auf (Statistik siehe 6. (1)). Bei mittelalten Zellen unterschied sich lediglich der Transfektionserfolg von CalPhos von dem von GenCarrier-2 (**) und FuGENE (*), nicht aber von LF2000. Zwischen dem Transfektionserfolg von LF2000 und GenCarrier-2, bzw. FuGENE konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. GenCarrier-2 und FuGENE unterschieden sich, wie bereits bei jungen Zellen nicht signifikant voneinander (6. (2)).

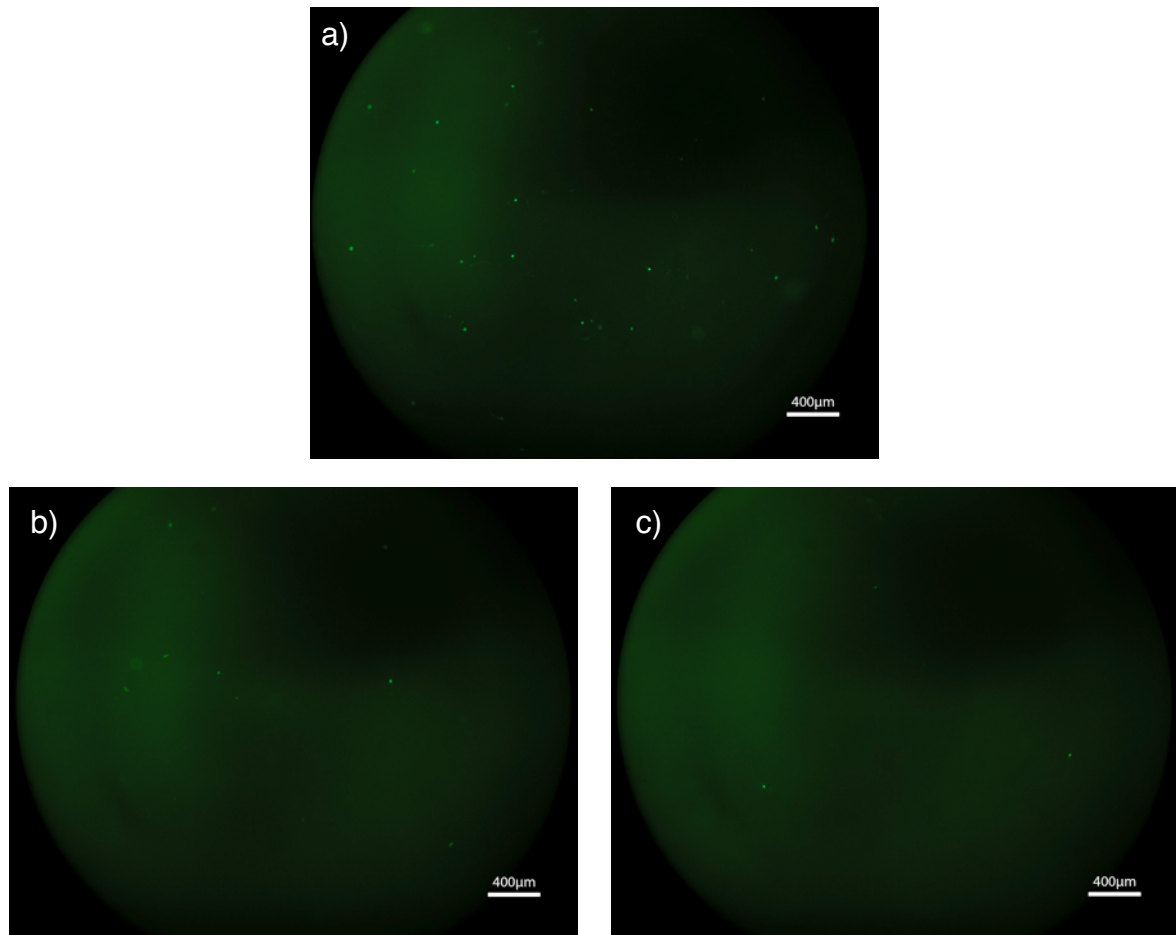
3.1.2. Zellalter

Die erhaltenen Daten wiesen auf einen Einfluss des Neuronenalters auf den Transfektionserfolg hin. Bei den folgenden Testreihen zeigten Zellen der Kategorie „jung“, also Zellen die jünger als 7 Tage alt waren, einen deutlich höheren Anteil an transfizierten Neuronen als dies bei Zellen der anderen, älteren Kategorien der Fall war. So wurden auch mittelalte Zellen häufiger transfiziert als Neurone der Kategorie „alt1“ und „alt2“, bei denen nur mehr ein geringer Unterschied im Transfektionserfolg zu beobachten war.

Der Transfektionserfolg der verschiedenen Alterskategorien ist in Abbildung 19 I) für junge, mittelalte und alt1 Zellen nach Transfektion mit CalPhos gezeigt. In Abb. 19 II) sind lediglich Bilder von jungen und mittelalten Zellen nach Transfektion mit LF2000 gezeigt, da mit dieser Methode Zellen der Kategorie „alt1“ und „alt2“ nicht transfiziert werden konnten.

Der Transfektionserfolg der unterschiedlichen Altersstufen nach Transfektionen mit CalPhos (a) und LF2000 (b) ist in Abbildung 20 graphisch in Form eines Box-Whisker-Plots dargestellt.

I)



II)

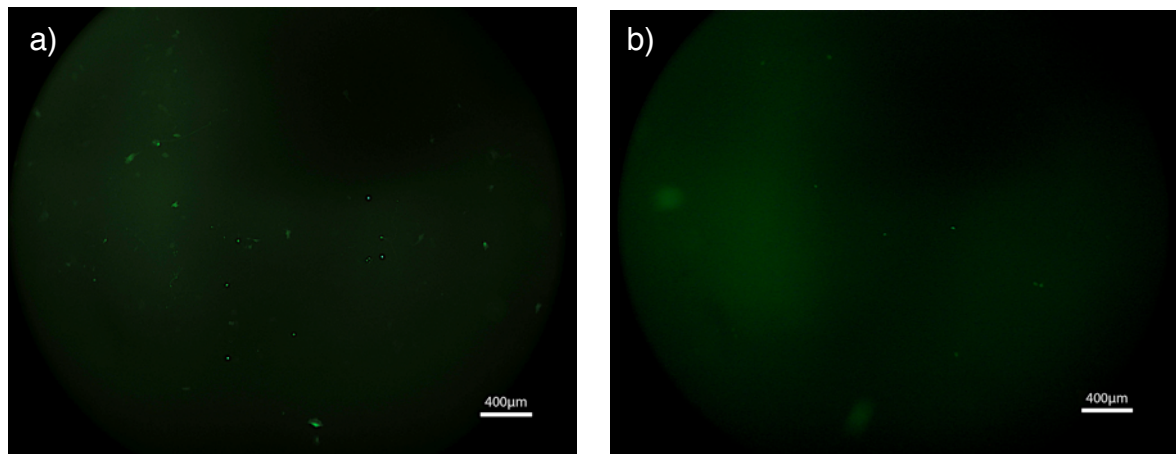


Abb. 19. **Transfektionserfolg der unterschiedlichen Altersstufen.** Transfektionserfolg bei Neuronen der Alterskategorien a) „jung“ (< 7d), b) „mittel“ (7-14d) und c) „alt1“ (14-21d) nach Transfektion mit I) CalPhos und II) Lipofectamine™ 2000. In II) sind nur Bilder von jungen und mittelalten Zellen gezeigt, da mit LF2000 Neurone die älter als 14 Tage alt waren nicht transfiziert werden konnten. Die Bilder sind mit 50-facher Vergrößerung unter UV-Licht aufgenommen.

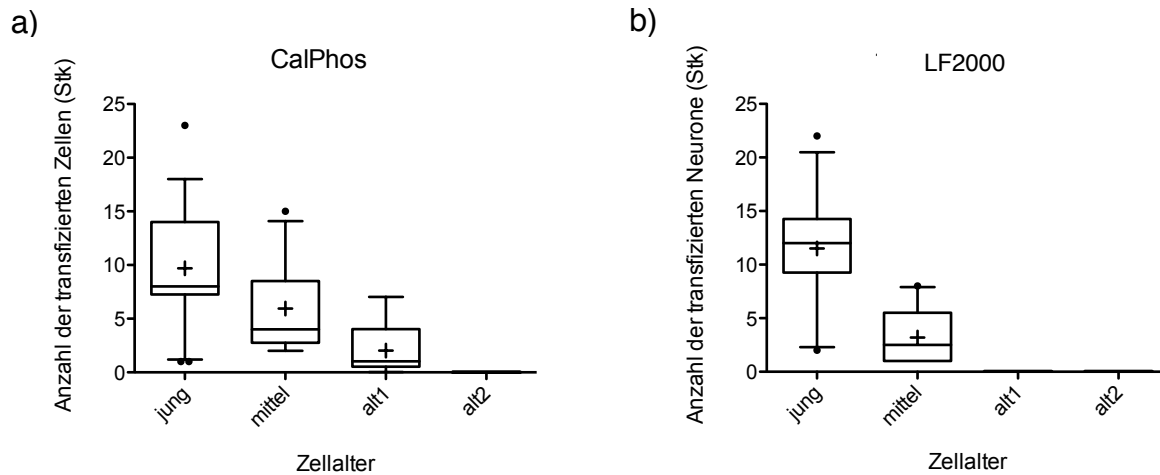


Abb. 20. **Vergleich der verschiedenen Altersstufen.** Transfektionserfolg bei Neuronen der Kategorien „jung“ (< 7d), „mittel“ (7-14d), „alt1“ (15-21d) und „alt2“ (> 21d) nach Transfektion mit a) CalPhos™ und b) Lipofectamine™ 2000. Innerhalb der Kästchen liegen 25 % - 75 % der Werte, deren Median mit einer Linie und Mittelwert als Kreuz dargestellt ist. Die Balken (Whiskers) umfassen 10 % - 90 % der Werte, Ausreißer sind als schwarze Punkte dargestellt. Die y-Werte bezeichnen die Anzahl der transfizierten Neurone auf einer Fläche von 10 mm².

In beiden Graphiken ist zu sehen, dass junge Zellen häufiger transfiziert wurden als ältere Zellen. Bei Transfektionen mit CalPhos an jungen Zellen lag die mittlere Transfektionsrate -trotz einzelner Ausreißer mit weit über 20 transfizierten Neuronen- bei etwa 13 ± 2 (mean $\pm$ SEM) transfizierten Neuronen auf einer Fläche von 10 mm². Mit zunehmendem Alter der Zellen sank die Anzahl der transfizierten Neurone auf weniger als ein Drittel des Erfolges mit jungen Neuronen ab („mittel“: 7 ± 1 tf. Neuron; „alt1“: 4 ± 3 tf. Neuronen). Auch bei Transfektionen mit LF2000 wurden Neurone die jünger als 7 Tage alt waren 3-mal häufiger (12 ± 2) transfiziert als Zellen die zwischen 7 und 14 Tagen alt waren (4 ± 2), während Neurone der Alterskategorie „alt1“ mit dem Standardprotokoll der LF2000 Transfektion zu keinem Zeitpunkt transfiziert werden konnten. Neurone der Kategorie „alt2“ konnten mit keiner der angewendeten Methoden transfiziert werden. In Tabelle 2 sind die Transfektionseffizienzen für CalPhos und LF2000 bei den verschiedenen Alterskategorien angegeben.

Tab. 2. Transfektionseffizienzen der Reagenzien CalPhos und LF2000 bei jungen (< 7d), mittelalten (7-14d), alt1 (15-21d) und alt2 (> 21d) Neuronen in %.

	jung	mittel	alt1	alt2
CalPhos	1,4 %	0,8 %	0,4 %	0 %
LF2000	1,3 %	0,4 %	0 %	0 %

Die statistische Auswertung der Alterskategorien der beiden Transfektionsmethoden mittels one-way ANOVA zeigte sowohl bei Transfektionen mit CalPhos ($p < 0,001$) als auch mit LF2000 ($p < 0,0001$) signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (Statistik siehe 6. (3) CalPhos und (4) LF2000). Der anschließende Post-Hoc-Test nach Dunnett zeigte, dass sich bei Transfektionen mit CalPhos und mit LF2000 junge von mittelalten (CalPhos: *; LF2000: ***), von alt 1 (CalPhos: **; LF2000: **) und von alt2 (CalPhos: **; LF2000: **) Zellen signifikant unterschieden. Weder bei CalPhos, noch bei LF2000 Transfektionen unterschieden sich die anderen Gruppen (mittel, alt1, alt2) voneinander, obwohl eine deutliche Tendenz des Transfektionserfolges zu Gunsten von jüngeren Neuronen zu erkennen ist.

3.1.3 LF2000 Mengen-Vergleich

In Abbildung 21 ist der Transfektionserfolg der Lipofektionen mit 7,5 μ L LF2000, 15 μ L LF2000 und 30 μ L LF2000 graphisch dargestellt. Die Graphik zeigt, dass bei Transfektion mit 7,5 μ L LF2000 durchschnittlich 30 ± 4 (Mean $\pm$ SEM) Neurone, mit 15 μ L LF2000 12 ± 2 Neurone und mit 30 μ L nur 4 ± 1 Neurone transfiziert wurden. Der Transfektionserfolg wurde also bei Halbierung der ursprünglichen LF2000 Konzentration von 15 μ L auf 7,5 μ L mehr als verdoppelt. Verdoppelte man aber die ursprünglichen 15 μ L auf 30 μ L LF2000, wurden weniger als halb so viele Neurone transfiziert.

In Abbildung 22 sind drei Phasenkontrastbilder nach Transfektion mit 7,5 μ L (a), 15 μ L (b) und 30 μ L (c) LF2000 zu sehen. Nach Transfektion mit 30 μ L LF2000 war eine deutlich stärkere Veränderung der Neurone zu erkennen als nach Transfektion mit 7,5 μ L oder 15 μ L LF2000.

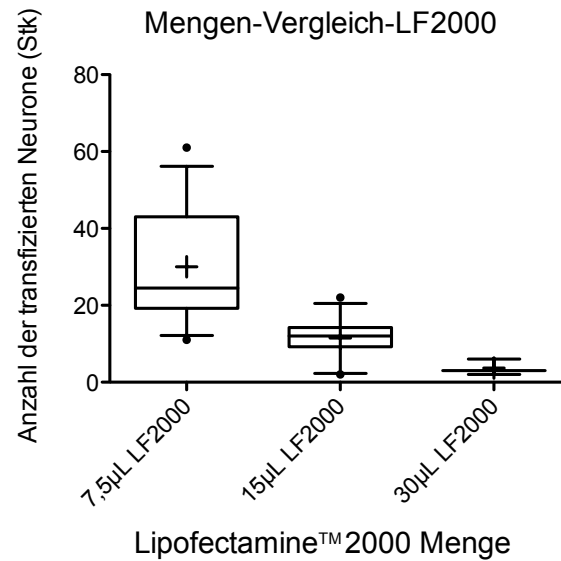


Abb. 21. **Lipofectamine™ 2000 Mengen Vergleich.** Es sind die Anzahl der transfizierten Neurone auf einer Fläche von 10 mm² gegeben. Die Einzelwerte sind aus den Altersklassen gepoolt dargestellt. Innerhalb der Kästchen liegen 25 % - 75 % der Werte, deren Median mit einer Linie und Mittelwert als Kreuz dargestellt ist. Die Balken (Whiskers) umfassen 10 % - 90 % der Werte, Ausreißer sind als schwarze Punkte dargestellt.

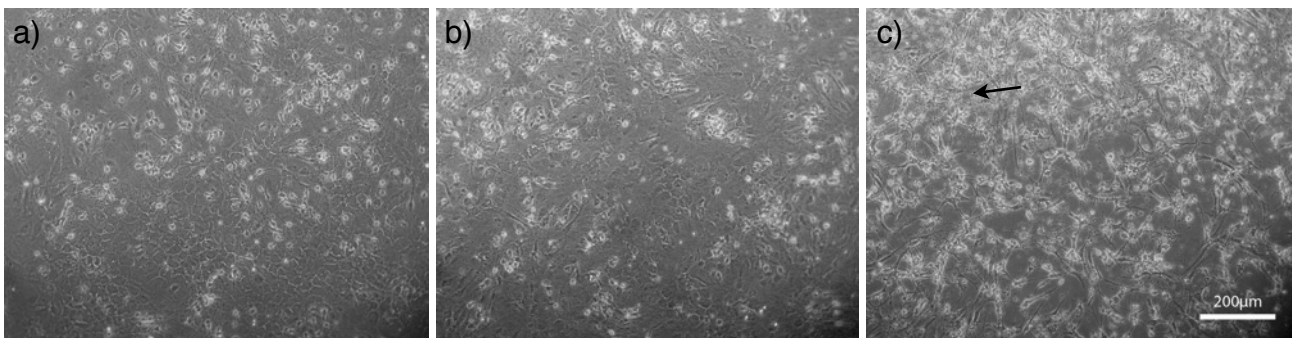


Abb. 22. **Variation der Lipofectamine™ 2000-Menge.** Es sind Phasenkontrastbilder 5 Tage alter Hippokampuskulturen etwa 24 Stunden nach Transfektion mit a) 7,5 µL, b) 15 µL und c) 30 µL LF2000 zu sehen. In Bild c) sind einige Ablagerungen (z.B. Zellbruchstücke) (Pfeil), sowie stark abgerundete Neurone zu erkennen. Abbildungen a) und b) zeigen so gut wie keine optischen Veränderungen der Zellen.

In Tabelle 3 sind die Transfektionseffizienzen der verschiedenen LF2000 Mengen bei jungen und mittelalten Zellen zusammengefasst.

Tab. 3. Transfektionseffizienzen von mit 7,5 μ L, 15 μ L und 30 μ L LF2000 transfizierten jungen (<7d) und mittelalten (7-14d) Neuronen in %.

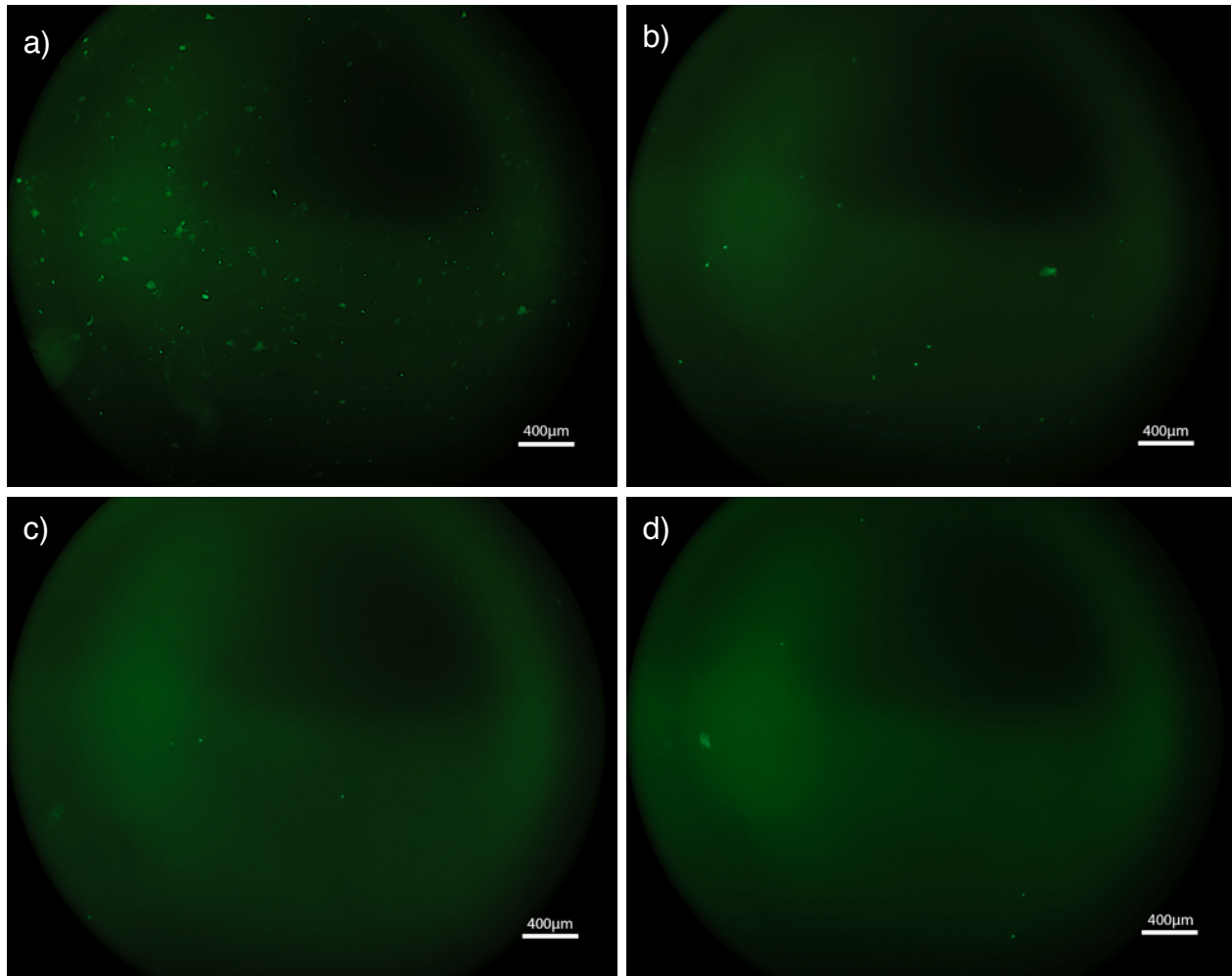
	7,5 μL	15 μL	30 μL
jung	3,3 %	1,3 %	0,6 %
mittel	1,4 %	0,4 %	0,2 %

Die statistische Auswertung des Transfektionserfolges der unterschiedlichen LF2000 Mengen ergab einen signifikanten Unterschied zu Gunsten der 7,5 μ L LF2000 Menge. Es wurde eine one-way ANOVA ($p = 0,0001$) mit einem anschließenden Post-Hoc-Test nach Dunnett durchgeführt. Der Dunnett Test zeigte, dass Transfektionen mit 7,5 μ L LF2000 signifikant erfolgreicher waren als 15 μ L oder 30 μ L (7,5 μ L vs. 15 μ L: ***; 7,5 μ L vs. 30 μ L: ***). Zwischen 15 und 30 μ L LF2000 wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt (15 μ L vs 30 μ L: $p > 0,05$) (Statistik siehe 6. (5)).

3.1.4 7,5 μ L LF2000

Auch bei einer LF2000 Menge von 7,5 μ L war eine starke Abhängigkeit des Transfektionserfolges vom Alter der Zellen zu sehen (Abbildung 23). In der Graphik ist zu erkennen, dass Transfektionen an jungen Zellen einen deutlich höheren Transfektionserfolg lieferten (30 ± 4 tf. Neurone in mean $\pm$ SEM) als an älteren Zellen. Neurone mit einem Alter zwischen 15 und 21 Tagen, bzw. Neurone die über 21 Tage alt waren, zeigten mit je 3 ± 1 transfizierten Neuron einen sehr ähnlichen Transfektionserfolg.

I)



II)

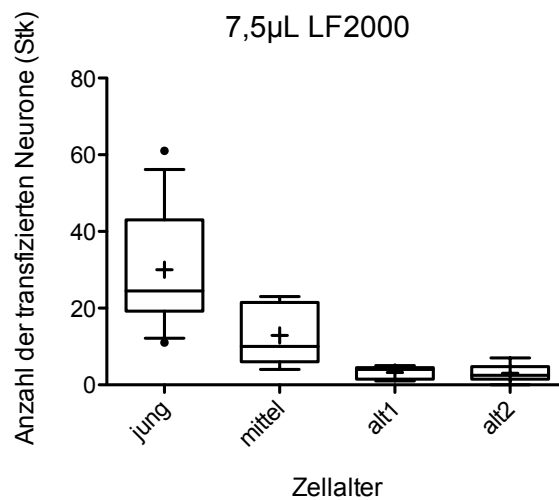


Abb. 23. **Transfektionserfolg der unterschiedlichen Altersstufen mit 7,5 µL Lipofectamine™ 2000.** Mit 7,5 µL LF2000 transfizierte Zellen der Alterskategorien a) „jung“ (< 7d), b) „mittel“ (7-14d), c) „alt1“ (15-21d) und d) „alt2“ (> 21d). I) Es ist ein deutlich höherer Transfektionserfolg bei den jungen Zellen im Vergleich zu den älteren Kategorien zu

sehen, während sich die beiden alten Zellgruppen (c und d) kaum von einander unterscheiden.
 II) In der Graphik ist die Anzahl der transfizierten Neurone auf einer Fläche von 10 mm² zu sehen (y-Achse). Innerhalb der Kästchen liegen 25 % - 75 % der Werte, deren Median mit einer Linie und Mittelwert als Kreuz dargestellt ist. Die Balken (Whiskers) umfassen 10 % - 90 % der Werte, Ausreißer sind als schwarze Punkte dargestellt.

In Tabelle 4 sind die Transfektionseffizienzen der verschiedenen Alterskategorien nach Transfektion mit 7,5 µL LF2000 angegeben.

Tab. 4. Transfektionseffizienzen nach Transfektion mit 7,5 µL LF2000 bei jungen (< 7d), mittelalten (7-14d), alt1 (15-21d) und alt2 (> 21d) Neuronen in %.

	jung	mittel	alt1	alt2
7,5 µL LF2000	3,3 %	1,4 %	0,3 %	0 %

Auch bei der Transfektion mit 7,5 µL LF2000 zeigte die statistische Auswertung mittels one-way ANOVA und anschließendem Dunnett's Post-Hoc-Test, dass sich junge Neuronen von mittelalten (**), von alt 1 (***) und von alt2 (***) Zellen signifikant unterschieden. Mittelalte Zellen zu alt1 und alt2, sowie alt1 und alt2 Zellen zeigten keine signifikanten Unterschiede im Transfektionserfolg untereinander (Statistik siehe 6. (6)).

3.1.5 DNA-Mengen Variation bei Transfektionen mit 15 µL LF2000

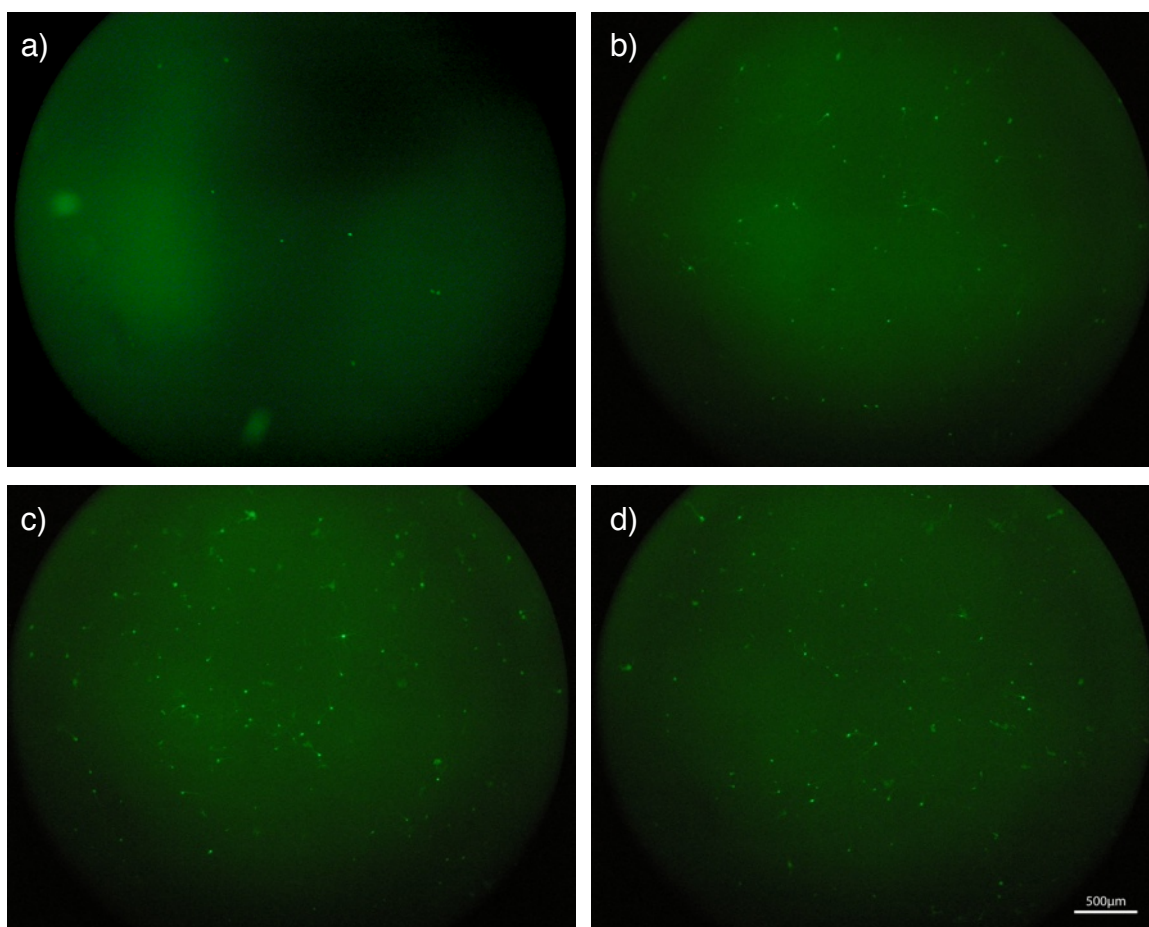
Die Variation der DNA-Mengen mit 15 µL LF2000 zeigte einen starken Anstieg der Transfektionseffizienz von 0,75 µg DNA auf höhere Mengen, während zwischen 1,5 µg, 3 µg und 4,5 µg DNA keine großen Unterschiede festgestellt werden konnte (Tabelle 5). Durchschnittlich wurden 4 ± 2 (Mean ± SD) Neurone mit 0,75 µg DNA, 38 ± 15 Neurone mit 1,5 µg DNA, 50 ± 35 Neurone mit 3 µg DNA und 26 ± 8 Neurone mit 4,5 µg DNA transfiziert, was Transfektionseffizienzen von 0,4 % (0,75 µg DNA), 4 % (1,5 µg DNA), 5,3 % (3 µg DNA) und 2,7 % (4,5 µg DNA) entspricht.

Tab. 5. Durchschnittliche Transfektionseffizienz bei Transfektionen mit 15 μ L LF2000 und 0,75 μ g, 1,5 μ g, 3 μ g und 4,5 μ g DNA in %.

	0,75 μ g DNA	1,5 μ g DNA	3 μ g DNA	4,5 μ g DNA
15 μ L LF2000	0,4 %	4,0 %	5,3 %	2,7 %

In Abbildung 24 sind die Transfektionserfolge der DNA-Mengen-Variation bei Transfektion mit 15 μ L LF2000 als Fotos (I) einzelner Transfektionen dargestellt und in einer Graphik (II) zusammengefasst. An den Fotos ist ein starker Anstieg der Transfektionseffizienz von 0,75 μ g DNA (a) auf 1,5 μ g (b), 3 μ g (c) und 4,5 μ g (d) DNA zu erkennen. Dieser starke Anstieg des Transfektionserfolges von 0,75 μ g DNA auf die höheren DNA-Mengen ist auch in der Graphik deutlich zu sehen.

(I)



(II)

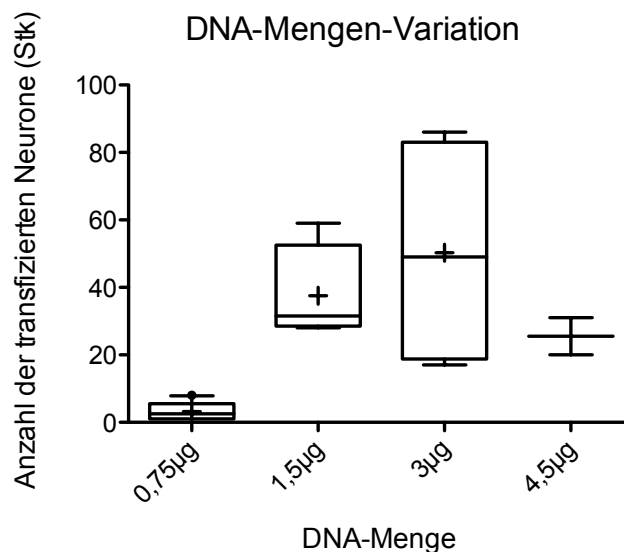


Abb. 24. **Variation der DNA Menge mit 15 µL Lipofectamine™ 2000.** Transfektion von 11 Tage alten Hippokampuskulturen mit a) 0,75 µg DNA, b) 1,5 µg DNA, c) 3 µg DNA und d) 4,5 µg DNA auf einer Fläche von 10 mm² in 50-facher Vergrößerung (I). Es ist eine deutliche Zunahme des Transfektionserfolges von 0,75 µg DNA auf 1,5 µg, 3 µg und 4,5 µg DNA zu sehen. In der Graphik (II) liegen 25 % - 75 % der Werte innerhalb der Kästchen. Der Median ist mit einer Linie, der Mittelwert als Kreuz dargestellt. Die Balken (Whiskers) umfassen 10 % - 90 % der Werte.

Die statistische Auswertung zeigte signifikante Unterschiede zwischen dem Transfektionserfolg mit 0,75 µg DNA und 1,5 µg DNA (*), sowie zwischen 0,75 µg DNA und 3 µg DNA (**). Zwischen 0,75 µg DNA und 4,5 µg DNA, sowie zwischen den anderen Konzentrationen untereinander, konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Statistik siehe 6. (7)).

3.1.6 DNA-Mengen Variation bei Transfektionen mit 7,5 µL LF2000

Bei der Variation der DNA-Mengen mit 7,5 µL LF2000 konnte ebenfalls eine Zunahme des Transfektionserfolges von 0,75 µg DNA auf höhere Mengen DNA festgestellt werden. Diese Zunahme ist auch in Tabelle 6 zu sehen. Die Effizienz der Transfektionen mit 0,75 µg DNA lag bei 1,4 %, mit 1,5 µg DNA bei 5,7 %, mit 3 µg DNA bei 5,8 % und mit 4,5 µg DNA bei 7,5 % .

Tab. 6. Durchschnittliche Transfektionseffizienz bei Transfektionen mit 7,5 μL LF2000 und 0,75 μg , 1,5 μg , 3 μg und 4,5 μg DNA in %.

	0,75 μg DNA	1,5 μg DNA	3 μg DNA	4,5 μg DNA
7,5 μL LF2000	1,4 %	5,7 %	5,8 %	7,5 %

Der Transfektionserfolg für alle drei DNA-Mengen ist in Abbildung 25 in Form von Fotos und in Abbildung 26 in Form eines Box-Whiskers-Plots dargestellt.

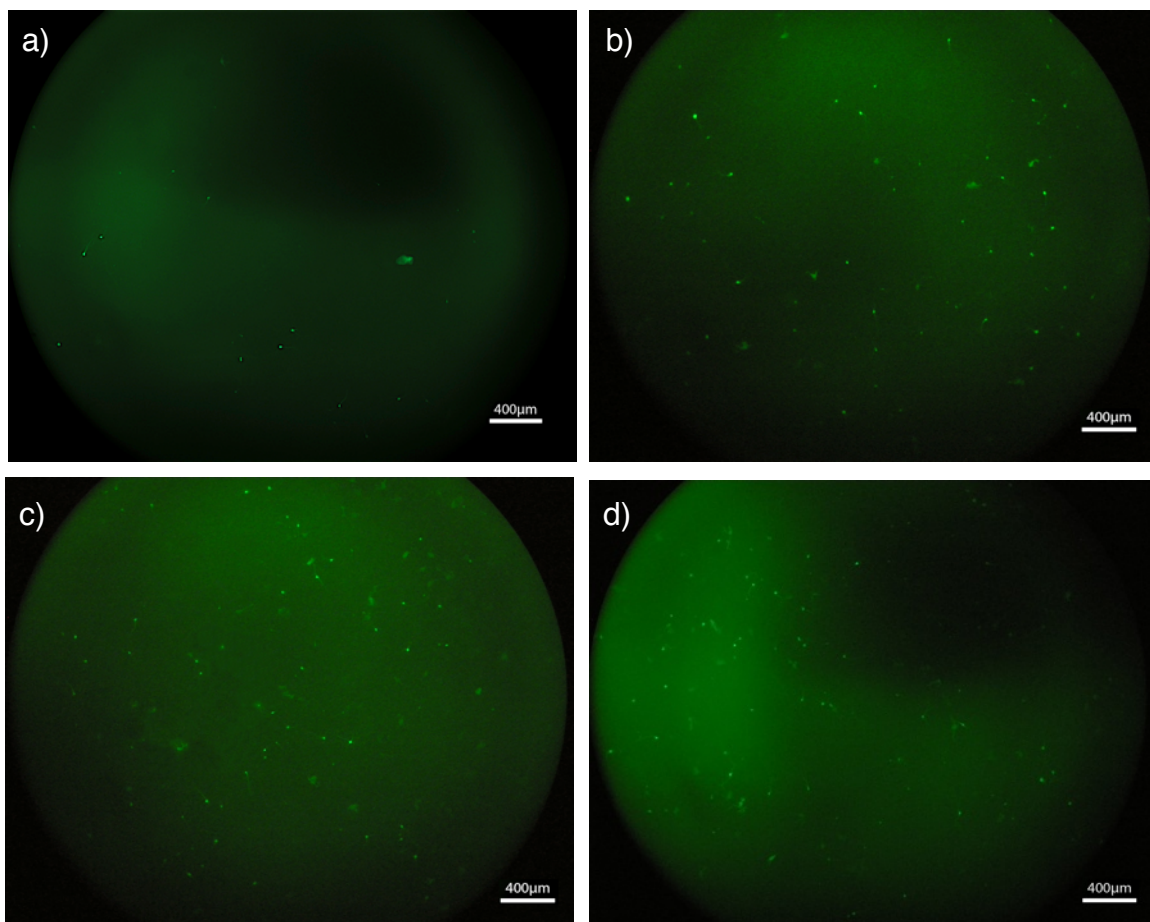


Abb. 25. **Variation der DNA Menge mit 7,5 μL Lipofectamine™ 2000.** Es sind Bilder von 11 Tage alten Zellkulturen 24 Stunden nach Transfektion mit 0,75 μg DNA (a), 1,5 μg DNA (b), 3 μg DNA (c) und 4,5 μg DNA (d) in 50-facher Vergrößerung unter UV-Licht gegeben. Es ist ein deutlicher Anstieg des Transfektionserfolges von 0,75 μg DNA auf die höheren DNA-Mengen zu sehen, die untereinander keinen signifikanten Unterschied in ihrer Effizienz aufweisen.

Abbildung 26 zeigt die Anzahl der mit 7,5 μL LF2000 transfizierten Neurone mit 0,75 μg , 1,5 μg , 3 μg und 4,5 μg DNA. Die Variation der DNA-Mengen zeigte mit durchschnittlich

13 ± 3 (Mean ± SEM) transfizierten Neuronen mit 0,75 µg DNA, 55 ± 2 transfizierten Neuronen mit 1,5 µg DNA, 55 ± 6 Neuronen mit 3 µg DNA und 72 ± 12 transfizierten Neuronen mit 4,5 µg DNA einen großen Unterschied zu Gunsten der höheren Konzentrationen im Transfektionserfolg. Dieser Unterschied im Transfektionserfolg ist auch in der statistischen Auswertung zu sehen (0,75 µg vs 1,5 µg: ***; 0,75 µg vs 3 µg: ***; 0,75 µg vs 4,5 µg: ***). Die Mengen 1,5 µg, 3 µg und 4,5 µg unterschieden sich aber nicht signifikant voneinander (Statistik siehe 6. (8)).

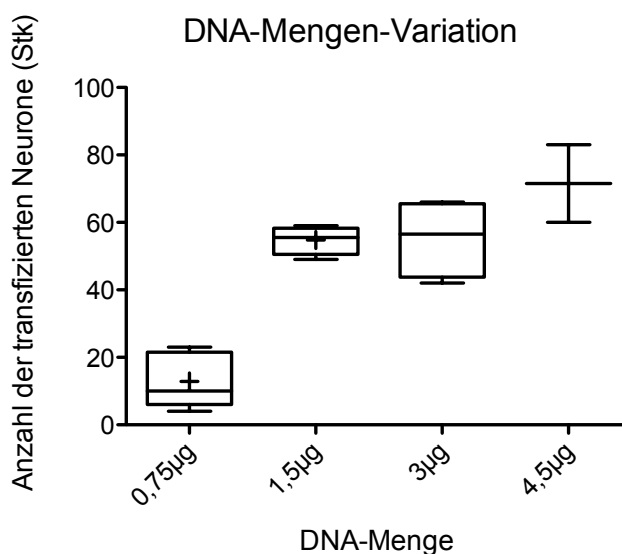


Abb. 26. **Variation der DNA Menge mit 7,5µL Lipofectamine™ 2000.** Anzahl der transfizierten Neurone auf einer Fläche von 10 mm². Das Kästchen für 0,75 µg DNA hebt sich deutlich von den anderen drei DNA Mengen ab. 25 % - 75 % der Werte liegen innerhalb der Kästchen, deren Median mit einer Linie und Mittelwert als Kreuz dargestellt ist. Die Balken (Whiskers) umfassen 10 % - 90 % der Werte.

3.1.5 CalPhos

Es wurde der Einfluss von Medium-Zusatzstoffen im Transfektionsmedium getestet. Hierbei wurden entweder das Serumsupplement Nuts, oder der Glutamatrezeptorhemmer

KYN, der zur Hemmung von Glutamat-Rezeptor-abhängiger Erregungstoxizität diene, dem Transfektionsmedium zugefügt. Mit beiden Varianten des Transfektionsmediums (50 mL D-MEM, 100 μ L 1M $MgCl_2$ + 125 μ L Nuts / 500 μ L KYN) wurden bei Transfektionen mit CalPhos ähnlich viele Neuronen transfiziert.

Bei Transfektionen mit dem Medium, das 125 μ L Nuts enthielt, wurden auf einer Fläche von 10 mm² durchschnittlich 10 ± 3 (Mean $\pm$ SEM) Neurone transfiziert. Bei dem Transfektionsmedium mit 500 μ L KYN wurden 5 ± 1 Neurone transfiziert. Diese Werte für den Transfektionserfolg sind in Abbildung 27 in Form eines Box-Whisker-Plots dargestellt.

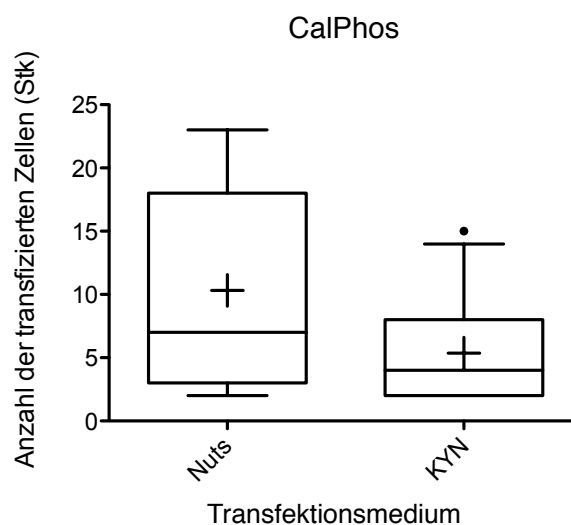


Abb. 27. **Variation des Transfektionsmediums.** Die Graphik zeigt die Anzahl der transfizierten Neurone auf einer Fläche von 10 mm² bei Transfektion mit einem Transfektionsmedium, das 125 μ L Nuts bzw. 500 μ L KYN enthielt. Innerhalb der Kästchen liegen 25 % - 75 % der Werte. Der Median ist mit einer Linie und der Mittelwert als Kreuz dargestellt. Die Balken (Whiskers) umfassen 10 % - 90 % der Werte, Ausreißer sind als schwarze Punkte dargestellt.

Die Variation des Mediums zeigte keine statistische Signifikanz im Transfektionserfolg (zweiseitiger t-Test: $t = 2,063$; $df = 17$; $p > 0,05$; F-Test: $F = 7,529$; $p > 0,05$) (Statistik siehe 6. (9)).

3.2 ELEKTROPHYSIOLOGIE

3.2.1 Ruhepotential (RP)

In Tabelle 7 sind die zusammengefassten Werte der Messungen des Ruhepotentials angegeben. Es ist zu erkennen, dass der Mittelwert des Ruhepotentials bei allen drei Transfektionsmethoden, trotz leicht positiverer Spannung, auf Grund der großen Standardabweichung mit $-54,7 \pm 7,49$ mV (mean $\pm$ SD) bei CalPhos, $-50 \pm 12,12$ mV bei 15 μ L LF2000 und $-56,6 \pm 13,17$ mV bei 7,5 μ L LF2000, dem bei untransfizierten Neuronen zu erwartenden Wert von $-65 \pm 6,7$ mV (siehe S. 20) recht nahe kamen. Des Weiteren sind die maximal und minimal auftretenden Werte dargestellt. Zellen, die ein positiveres Ruhepotential als -30 mV aufwiesen, zeigten meist keine Aktionspotentiale mehr und wurden für die Bestimmung des Ruhepotentials nicht gewertet. Obwohl Neurone, die mit 15 μ L LF2000 transfiziert wurden, ein tendenziell positiveres Ruhepotential aufwiesen, ergab die statistische Auswertung durch eine one-way ANOVA keine signifikanten Unterschiede im Ruhepotential zwischen den Transfektionsmethoden ($p = 0,391$) (Statistik siehe 6. (10)).

Tab. 7. Ergebnisse der elektrophysiologischen Messungen des Ruhepotentials von mit 7,5 μ L LF2000, CalPhos und 15 μ L LF2000 transfizierten Neuronen. Mittelwert, Median, SD, max. Wert und min Wert sind in mV angegeben.

	CalPhos (n = 14)	15 μL LF2000 (n = 8)	7,5 μL LF2000 (n = 20)
Mittelwert	-54,7	-50	-56,6
Median	-55,5	-47,25	-58,25
SD	7,49	12,12	13,17
SEM	2,00	4,28	2,95
max. Wert	-37	-35,5	-33
min. Wert	-65	-67,5	-77,5

3.2.2 Aktionspotential (AP)

Tabelle 8 zeigt die zusammengefassten Werte der Aktionspotentiale der mit CalPhos, 15 μ L LF2000 und 7,5 μ L LF2000 transfizierten Neurone. Die Höhe der Aktionspotentiale

ist als deren maximale Amplitude angegeben. Aktionspotentiale von Neuronen, die mit CalPhos und 7,5 μ L LF2000 transfiziert wurden, wiesen mit + 34,5 mV (CalPhos) und +32,5 mV (7,5 μ L LF2000) ähnliche Spannungen auf, die Spannungen von mit 15 μ L LF2000 transfizierten Zellen lagen mit durchschnittlich +20,5 mV etwas darunter. Auch im Vergleich der Aktionspotentiale konnten durch die Ausführung einer one-way ANOVA keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden ($p = 0,09$) (Statistik siehe 6. (11)).

Insgesamt zeigten von 21 mit 7,5 μ L LF2000 transfizierten gemessenen Zellen 20 Neurone Aktionspotentiale, was einem Prozentsatz von 95,2 % entspricht. Bei mit CalPhos transfizierten Zellen lag der prozentuelle Anteil der Neurone mit Aktionspotentialen bei 82,4 % und bei 15 μ L LF2000 bei 81,8 % (Tabelle 9). Es wurden alle kurzfristigen Spannungsänderungen, die mindestens 0 mV erreichten als Aktionspotential gewertet.

Tab. 8. Ergebnisse der elektrophysiologischen Messungen des Aktionspotentials von mit CalPhos, 15 μ L LF2000 und 7,5 μ L LF2000, transfizierten Neuronen. Mittelwert, Median, SD, max. Wert und min Wert sind in mV angegeben.

	CalPhos (n = 13)	15 μL LF2000 (n = 8)	7,5 μL LF2000 (n = 18)
Mittelwert	34,5	20,5	32,5
Median	35	17,5	35,5
SD	14,82	13,2	15,04
SEM	4,11	4,67	3,54
max. Wert	56	48	54
min. Wert	7	3	0,5

Tab. 9. Ausbildung von Aktionspotentialen in %. Es sind die Anzahl der gesamten Neurone, der Neurone mit Aktionspotential und der daraus errechnete Anteil von Neuronen mit Aktionspotentialen in % 24 Stunden nach Transfektion mit CalPhos, 15 μ L LF2000 und 7,5 μ L LF2000 gegeben.

	CalPhos	15 μL LF2000	7,5 μL LF2000
Neurone insg.	17	11	21
Neurone m. AP	14	9	20
APs (%)	82,40 %	81,80 %	95,20 %

In Abbildung 28 sind drei ausgewählte Aufzeichnungen der elektrophysiologischen Messung von mit 7,5 μL LF2000 (a), 15 μL LF2000 (b) und CalPhos (c) transfizierten Neuronen dargestellt. Alle drei Zellen weisen auf diesen Abbildungen ein Ruhepotential gleich oder unter -65 mV auf. Die Höhe der Aktionspotentiale ist aber bei jeder der drei Zellen unterschiedlich. Bei dem mit 7,5 μL LF2000 transfizierten Neuron beträgt das Aktionspotential etwa +35 mV, nach Transfektion mit 15 μL LF2000 +18 mV und nach Transfektion mit CalPhos ca. +45 mV. Dies dürfte aber eher auf interneuronale Unterschiede zurückzuführen sein, genauso wie die unterschiedlichen durch Depolarisation hervorgerufenen Entladungsmuster (z.B. AP-Frequenz und Amplitudenreduktion).

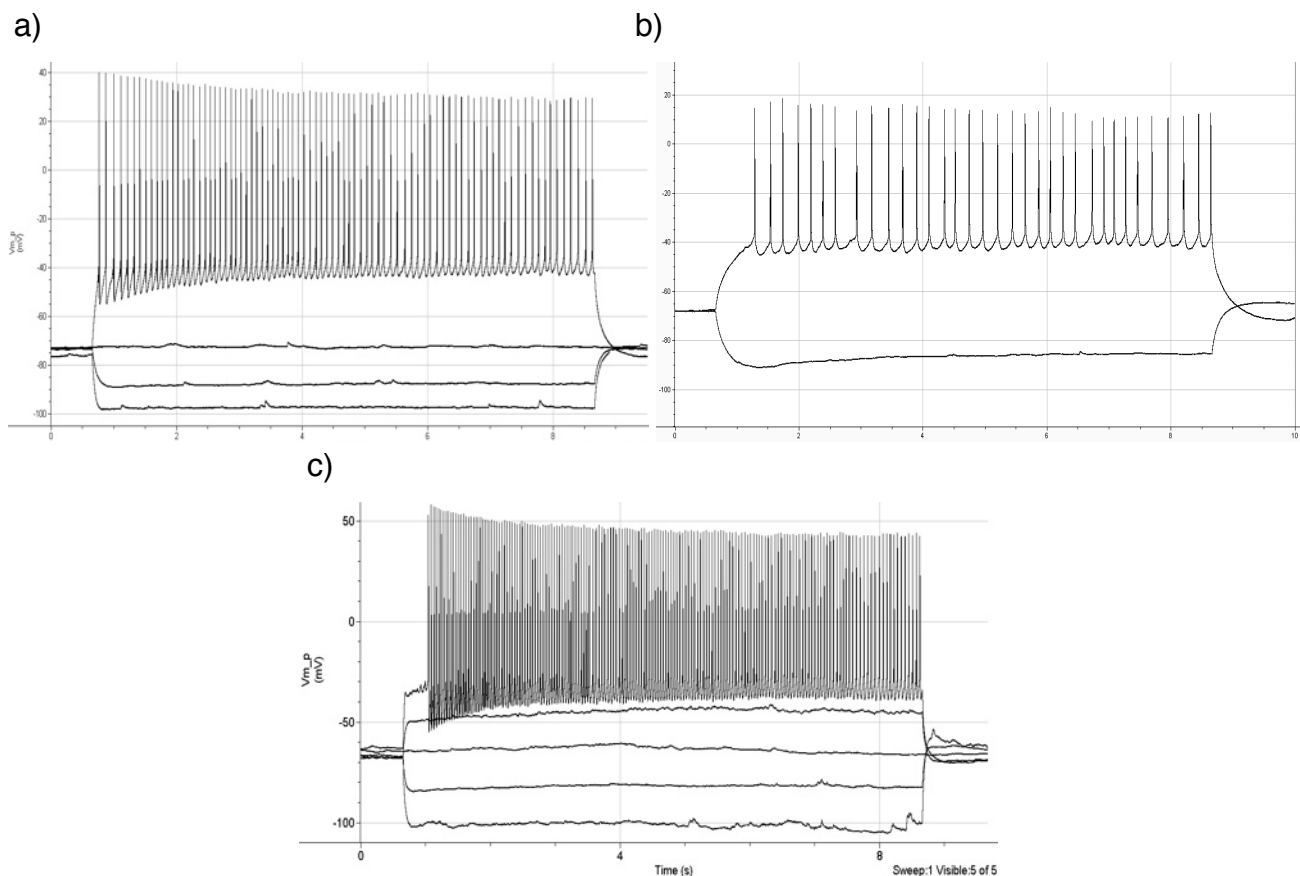


Abb. 28. **Darstellungen der elektrophysiologischen Messungen** von drei mit a) 7,5 μL LF2000, b) 15 μL LF2000 und c) CalPhos transfizierten 6d (b, c) bzw. 14d (a) alten Neuronen, während des Umspülens von Außenlösung. Es sind die Auslenkungen der Spannung bei 8 sec dauernder Injektion von -40 pA (c), -20 pA (a, c), -10 pA (a, b), 0 pA (a,c), +10 pA (b), +20 pA (a, c) und +40 pA (c) zu sehen. Auf der x-Achse ist die Zeit in Sekunden, auf der y-Achse die Spannung in mV angegeben.

3.2.3. Membranwiderstand (R_m)

Die Ergebnisse der Berechnungen der Membranwiderstände aus dem Ruhepotential und dem injizierten Strom in Anwesenheit von TTX sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Es ist zu sehen, dass der Membranwiderstand von, mit CalPhos und 7,5 μ L LF2000 transfizierten Neuronen mit durchschnittlich 1222 M Ω (CalPhos) bzw. 1299 M Ω (7,5 μ L LF2000) deutlich unter dem Widerstand von 2197 M Ω mit 15 μ L LF2000 transfizierten Neuronen liegt. Bei mit 15 μ L LF2000 transfizierten Neuronen konnte auch der maximalste Widerstand von 3900 M Ω berechnet werden.

Allgemein ist zu sagen, dass der Membranwiderstand (R_m) bei allen drei Transfektionsmethoden und Varianten höher liegt als es bei nicht transfizierten Neuronen (R_m zw. 250 M Ω und 350 M Ω) zu beobachten ist (Kubista, pers. Komm.).

Tab. 10. Zusammenfassung der Messungen des Membranwiderstandes von Neuronen, die mit CalPhos™, 15 μ L LF2000 und 7,5 μ L LF2000 transfiziert wurden. Die Messungen wurden in Anwesenheit von TTX durchgeführt. Mittelwert, Median, SD, max. Wert und min Wert sind in M Ω angegeben.

	CalPhos (n = 14)	15 μL LF2000 (n = 8)	7,5 μL LF2000 (n = 20)
Mittelwert	1222	2197	1299
Median	1167	2630	1240
SD	651,9	1156	571,3
SEM	174,2	408,5	127,8
max. Wert	2650	3900	2539
min. Wert	252,5	461	280

Die statistische Auswertung durch eine one-way ANOVA ergab einen signifikanten Unterschied der Membranwiderstände innerhalb der drei Vergleichsgruppen ($p < 0,01$). Ein Post-Hoc-Test nach Dunnett zeigte signifikante Unterschiede zwischen CalPhos und 15 μ L LF2000 (**) und zwischen 15 μ L LF2000 und 7,5 μ L LF2000 (*). CalPhos und 7,5 μ L LF2000 ($p > 0,05$) wiesen keine signifikanten Unterschiede untereinander auf (Statistik siehe 6. (12)).

4. DISKUSSION

Die ersten Vergleiche der verschiedenen Transfektionsmethoden bzw. -reagenzien zeigten, dass nur mit CalPhos und LF2000 ein verwertbarer Transfektionserfolg zu erzielen war. Obwohl Effizienzwerte von 25 % - 40 %, wie sie von Jiang et al. (2004) an hippokampalen Microisland Kulturen (bestehend aus nur einem oder wenigen autaptischen Neuronen) beschrieben, nicht erreicht werden konnten, lag die Effizienz von CalPhos Transfektionen wie auch die von LF2000 mehr als 10 mal höher als jene von GenCarrier-2 Transfektionen, bei denen maximal 2 Neurone transfiziert wurden. Trotz des geringen (GenCarrier-2) oder gar nicht vorhandenen (FuGENE) Transfektionserfolges an Neuronen, eigneten sich GenCarrier-2 und FuGENE jedoch, um nicht neuronale Zellen (wie z.B. Gliazellen) zu transfizieren.

Bei den Transfektionen mit CalPhos und LF2000 war zu erkennen, dass junge Neurone besser und in größerer Zahl transfiziert wurden als ältere Neurone. Auf Grund dieser Erkenntnis wurden weitere Versuchsreihen an Zellen unterschiedlichen Alters durchgeführt. Es war eine starke Altersabhängigkeit des Transfektionserfolges zu erkennen, die von einer Effizienz bei 15 bis 21 Tage alten Neuronen von 0,4 % bei CalPhos zu einer erhöhten Effizienz von 1,4 % bei < 7 Tagen alten Neuronen führte. Bei Transfektionen an 2 Wochen alten bzw. noch älteren Zellen, waren etwa 24 Stunden nach der Transfektion bereits viele abgestorbene Neurone zu erkennen, während jüngere Neurone meist überlebten. Die höhere Sterblichkeitsrate und die geringere Transfektionseffizienz der älteren Zellen könnte womöglich an der gesteigerten Sensitivität der älteren Neuronen gegenüber Umweltveränderungen (Mediumwechsel, Temperaturschwankungen, etc.) liegen, die bei jüngeren Neuronen noch nicht so stark ins Gewicht fielen. Ein Beispiel hierzu ist der Mediumwechsel einen Tag nach der Präparation, der von den noch jungen Zellen gut vertragen, von älteren Neuronen (Neurone > 1 Woche) aber nicht mehr toleriert wird.

Ein weiterer Parameter, der getestet wurde, war die LF2000 Konzentration. Mit steigender LF2000 Menge waren starke Veränderungen in der Transfektionseffizienz, dem Membranwiderstand und optisch, in Form von Zellschädigungen an den Neuronen selbst, zu sehen. Der stark erhöhte Membranwiderstand ist vermutlich auf eine Veränderung bzw. eine

Verschiebung des Verhältnisses von, den Membranwiderstand bestimmenden, Leitfähigkeit generierenden Proteinen (Ionenkanäle) und isolierenden Anteilen (Phosphorlipide) zurückzuführen. Obwohl der Membranwiderstand auch nach Transfektionen mit CalPhos und geringeren LF2000 Mengen wesentlich höher war als bei nicht transfizierten Zellen, so lagen die Werte für 15 μ L LF2000 etwa doppelt so hoch als jene von mit CalPhos und 7,5 μ L LF2000 transfizierten Zellen. Da bei der Transfektion mit 15 μ L LF2000 eine höhere Konzentration Transfektionsreagenz verwendet wurde, könnte dies zu einer stärkeren Verschiebung des Gleichgewichts aus Leitfähigkeit generierenden Proteinen und isolierenden Anteilen geführt haben. So zeigte sich auch bei den Versuchen der LF2000 Konzentrationsoptimierung, dass eine Halbierung der LF2000 Menge zu einer stark verbesserten Transfektionseffizienz und zu einem wesentlich niedrigeren Membranwiderstand führte.

Die vermehrten Schädigungen der Neurone nach Transfektion mit 15 μ L LF2000 spiegelten sich auch in den Werten für das Ruhe- und Aktionspotential wider. Der prozentuelle Anteil der transfizierten Neurone die Aktionspotentiale zeigten, war bei mit 7,5 μ L LF2000 transfizierten Zellen um mehr als 10 % höher als bei Neuronen, die mit CalPhos oder 15 μ L LF2000 transfiziert wurden. Die reduzierte Fähigkeit Aktionspotentiale zu generieren, die als Zeichen einer Zellschädigung aufgefasst wurde, könnte bei Transfektionen mit CalPhos durch Calcium-Phosphat-Ablagerungen zu Stande gekommen sein. Da diese Ablagerungen nicht komplett abgewaschen werden können, spielt, laut Köhrmann et al. 1999, vor allem die Größe des Calcium-Phosphat-Präzipitats eine wichtige Rolle. So könnten durch die richtige Präzipitatgröße mehr CaPO_4 -DNA-Komplexe von der Zelle aufgenommen werden und es bleiben weniger Ablagerungen zurück, welche die Zellen schädigen. Denn Zellen die CalPhos erfolgreich aufgenommen haben ohne abzusterben, zeigten ein Ruhepotential und Aktionspotentiale nahe den Normwerten. Um das Überleben der Neurone nach Transfektion mit CalPhos zu steigern, wurde der Einfluss von Medium-Zusatzstoffen (Nuts und KYN) im Transfektionsmedium getestet. Aber auch durch die Medium-Supplementierung (z.B. Verfügbarkeit von für die Zellen wichtigen Zusatzstoffen auch während der Transfektionsphase) bzw. Zugabe von neuroprotektiven Substanzen war keine Verbesserung des Transfektionserfolges fassbar.

Die bisherigen Versuchsreihen zeigten, dass die besten Transfektionserfolge mit verringerter LF2000-Konzentration und jungen Neuronen erzielt werden konnten.

Nach Optimierung der LF2000 Konzentration, wurde die Menge der DNA variiert. Bei diesen Versuchen war zu sehen, dass Transfektionen mit 0,75 μ g DNA zu einem deutlich

geringeren Transfektionserfolg führten als Transfektionen mit 1,5 μg , 3 μg oder 4,5 μg DNA. Die Tatsache, dass die Transfektionseffizienz ab einer bestimmten DNA-Menge nicht mehr gesteigert wurde, führt zu der Annahme, dass nicht die DNA-Menge sondern die Bindungskapazität von LF2000 und somit die LF2000 Menge den limitierenden Faktor der Transfektionseffizienz darstellt. Da aber, wie schon zuvor in den Optimierungsversuchen der LF2000 Menge gezeigt, zu viel LF2000 die Zellen zunehmend schädigt, kann die Transfektion durch Variation der Parameter LF2000-Menge und DNA-Menge nicht weiter optimiert werden. Nach der Optimierung der LF2000 und DNA Menge konnte aber (zumindest für elektrophysiologische Versuche) ein ansprechender Transfektionserfolg mit typischerweise mehr als 50 transfizierten Neuronen pro Zellschälchen erzielt werden.

5. LITERATURVERZEICHNIS

- ALBERTS B, BRAY D, HOPKIN K, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P. 2005. Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie. Wiley-Vch Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim
- BUDDECKE E. 2002. Molekulare Medizin: eine systematische Einführung. ecomed Verlagsgesellschaft AG & Co.KG. Landsberg
- CHALFIE M, TU Y, EUSKIRCHEN G, WARD WW, PRASHER DC. 1994. Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression. Science. Vol. 263.11
- CLONTECH. CalPhos™ Mammalian Transfection Kit. User Manual
- CRAIG AM. HUTTNER WB. (2007). Neuronal and glial cell biology. Current Opinion in Neurobiology 2007, 17:505–506
- DALBY B, CATES S, HARRIS A, OHKI EC, TILKINS ML, PRICE PJ, CICCARONE VC. 2003. Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. Elsevier Inc., 33(2):95-103
- ECKERT M. HERTEL W. 1993. Praktikum der Tierphysiologie. Gustav Fischer Verlag. Jena
- FELGNER PL. GADEK TR. HOLM M. ROMAN R. CHAN HW. WENZ M. NORTHROP JP. RINGOLD GM. DANIELSEN M. 1987. Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 84, pp. 7413-7417, November 1987 Biochemistry
- HALTERMAN MW. GIULIANO R. DEJESUS C. SCHOR NF. 2009. In-tube transfection improves the efficiency of gene transfer in primary neuronal cultures. *Neurosci Methods*. 2009 March 15; 177(2): 348–354.

- HEIM R, PRASHER DC, TSIEN RY. 1994. Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein. Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 91. pp. 12501-12504. Biochemistry
- INVITROGEN™ - life technologies. Lipofectamine™ 2000 Reagent. Achieve 99% Transfection Efficiency In a Single Stroke. Users Manual
- JIANG M. DENG L. CHEN G. 2004. High Ca²⁺-phosphate transfection efficiency enables single neuron gene analysis. Nature Publishing Group. Gene Therapy (2004) 11, 1303-1311
- KANDEL ER. SCHWARTZ JH. JESSELL TM. 1996. Neurowissenschaften: Eine Einführung. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg. Berlin. Oxford
- KÖHRMANN M. HAUBENSAK W. HEMRAJ I. KAETHER C. LEBMANN VJ. KIEBLER MA. 1999. Fast, Convenient, and Effective Method to Transiently Transfect Primary Hippocampal Neurons. Journal of Neuroscience Research 58:831–835 (1999)
- LAGLER M. 2009. The Role of L-type Voltage-Gated Calcium-Channels in the Discharge Activity of Primary Hippocampal Neurons [Diplomarbeit]. Wien. Universität Wien
- LOENING AM. FENN TD. GAMBHIR SS. 2007. Crystal Structures of the Luciferase and Green Fluorescent Protein from *Renilla reniformis*. Mol Biol. 2007 December 7; 374(4): 1017–1028. doi:10.1016/j.jmb.2007.09.078.
- LONEZ C, VANDENBRANDEN M, RUYSSCHAERT JM. 2008. Cationic liposomal lipids: From gene carriers to cell signaling. Elsevier Ltd. Progress in Lipid Research 47 (2008) 340–347
- MÜLHARDT C. 2002. Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg. Berlin

- MURPHY RC. MESSER A. 2000. Gene Transfer Methods for CNS Organotypic Cultures: A Comparison of Three Nonviral Methods. The American Society of Gene Therapy 1525-0016/01
- NAKASHIMA M. MIZUNUMA K. MURAKAMI T. AKAMINE A. 2002. Induction of dental pulp stem cell differentiation into odontoblasts by electroporation-mediated gene delivery of growth/differentiation factor 11 (Gdf11). Nature Publishing Group. Gene Therapy (2002) 9, 814–818
- NUMBERGER M. DRAGUHN A. 1996. Patch-Clamp-Technik. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg. Berlin. Oxford
- OLIVEIRA AC. FERRAZ MP. MONTEIRO FJ. SIMÕES S. 2009. Cationic liposome–DNA complexes as gene delivery vectors: Development and behaviour towards bone-like cells. Acta Materialia Inc. Published by Elsevier Ltd. Acta Biomaterialia 5 (2009) 2142–2151
- PRASHER DC. ECKENRODE VK. WARD WW. PRENDERGAST FG. CORMIER MJ. 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. Elsevier Science Publishers B.V. *Gene*. 111 (1992) 229-233
- PROMEGA. FuGENE® HD Transfection Reagent. Technical Manual.
- REGELIN A. 2000. Entwicklung eines automatisierten Screeningverfahrens zum Test neuer Transfektionslipide und Untersuchungen zum Mechanismus der Lipofektion [Dissertation]. Karlsruhe: Universität Karlsruhe. p. 7. Forschungszentrum Karlsruhe. Technik und Umwelt. Wissenschaftliche Berichte. FZKA 6505
- SHIMOMURA O. 2009. Discovery of Green Fluorescent Protein (GFP). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim. Angew. Chem. Int. Ed. 2009, 48, 5590 – 5602. Nobel Lectures

- STAMFORD JA. 1992. Monitoring Neuronal Activity. A Practical Approach. Oxford University Press. New York
- TSIEN RY. 1998. The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* 67:509–44
- WASHBOURNE P. McALLISTER AK. 2002. Techniques for gene transfer into neurons. *Current Opinion in Neurobiology* 2002, 12:566–573
- WATANABE SY. ALBSOUL-YOUNES AM. KAWANO T. ITOH H. KAZIRO Y. NAKAJIMA S. NAKAJIMA Y. 1998. Calcium phosphate-mediated transfection of primary cultured brain neurons using GFP expression as a marker: application for single neuron electrophysiology. *Neuroscience Research* 33 (1999) 71–78
- WEISKIRCHEN R. KNEIFEL J. WEISKIRCHEN S. VAN DE LEUR E. KUNZ D. GRESSNER AM. 2000. Comparative evaluation of gene delivery devices in primary cultures of rat hepatic stellate cells and rat myofibroblasts. *BMC Cell Biology* (2000) 1:4
- XIA Z. DUDEK H. MIRANTI CK. GREENBERG ME. 1996. Calcium Influx via the NMDA Receptor Induces Immediate Early Gene Transcription by a MAP Kinase/ERK-Dependent Mechanism. *The Journal of Neuroscience*, September 1, 1996, 16(17): 5425–5436
- YAMANO S, DAI J, MOURSI AM. 2010. Comparison of Transfection Efficiency of Nonviral Gene Transfer Reagents. *Mol Biotechnol* (2010) 46:287-300

6. STATISTIK

- (1) CalPhos n = 16; 15 µL LF2000 n = 12; GenCarrier-2 n = 4; FuGENE n = 3; 1way ANOVA: $F = 8,41$, $R^2 = 0,45$, $p < 0,001$; Multiple Comparison Test (Dunnett's u. Tukey's): CalPhos vs 15 µL LF2000: ns; CalPhos vs GenCarrier-2: ** ; CalPhos vs FuGENE: ** ; 15 µL LF2000 vs GenCarrier-2: ** ; 15 µL LF2000 vs FuGENE: ** ; GenCarrier-2 vs FuGENE: ns
- (2) CalPhos n = 18; 15 µL LF2000 n = 10; GenCarrier-2 n = 7; FuGENE n = 3; 1way ANOVA: $F = 5,44$, $R^2 = 0,32$, $p < 0,01$; Multiple Comparison Test (Dunnett's u. Tukey's): CalPhos vs 15 µL LF2000: ns; CalPhos vs GenCarrier-2: ** ; CalPhos vs FuGENE: * ; 15 µL LF2000 vs GenCarrier-2: ns; 15 µL LF2000 vs FuGENE: ns; GenCarrier-2 vs FuGENE: ns
- (3) jung n = 16; mittel n = 18; alt1 = 4; alt2 n = 2; 1way ANOVA: $F = 7,98$; $R^2 = 0,4$; $p < 0,001$; Multiple Comparison Test (Dunnett's u. Tukey's): jung vs mittel: * ; jung vs alt1: ** ; jung vs alt2: ** ; mittel vs alt1: ns; mittel vs alt2: ns; alt1 vs alt2: ns
- (4) jung n = 12; mittel n = 10; alt1 = 2; alt2 n = 2; 1way ANOVA: $F = 10,96$; $R^2 = 0,6$; $p < 0,0001$; Multiple Comparison Test (Dunnett's u. Tukey's): jung vs mittel: *** ; jung vs alt1: ** ; jung vs alt2: ** ; mittel vs alt1: ns; mittel vs alt2: ns; alt1 vs alt2: ns
- (5) 7,5 µL: 12; 15 µL: 12; 30 µL: 4; 1way ANOVA: $F = 13,51$; $R^2 = 0,52$; $p = 0,0001$; Multiple Comparison Test (Dunnett's u. Tukey's): 7,5 µL vs 15 µL: *** ; 7,5µL vs 30 µL: *** ; 15 µL vs 30 µL: ns
- (6) jung n = 12; mittel n = 9; alt1 = 6; alt2 n = 6; 1way ANOVA: $F = 14,03$; $R^2 = 0,59$; $p < 0,0001$; Multiple Comparison Test (Dunnett's u. Tukey's): jung vs mittel: ** ; jung vs alt1: *** ; jung vs alt2: *** ; mittel vs alt1: ns; mittel vs alt2: ns; alt1 vs alt2: ns
- (7) 0,75 µg DNA n = 10; 1,5 µg DNA n = 4; 3 µg DNA n = 4; 4,5 µg DNA n = 2; 1way ANOVA: $F = 9,37$; $R^2 = 0,64$; $p < 0,001$; Multiple Comparison Test (Dunnett's u. Tukey's): 0,75 µg DNA vs 1,5 µg DNA: * ; 0,75 µg DNA vs 3 µg DNA: ** ; 0,75 µg DNA

vs 4,5 µg DNA: ns; 1,5 µg DNA vs 3 µg DNA: ns; 1,5 µg DNA vs 4,5 µg DNA: ns; 3 µg DNA vs 4,5 µg DNA: ns

(8) 0,75 µg DNA n = 9; 1,5 µg DNA n = 4; 3 µg DNA n = 4; 4,5 µg DNA n = 2; 1way ANOVA: $F = 41,45$; $R^2 = 0,89$; $p < 0,0001$; Multiple Comparison Test (Dunnett's u. Tukey's): 0,75 µg DNA vs 1,5 µg DNA: *** ; 0,75 µg DNA vs 3 µg DNA: *** ; 0,75 µg DNA vs 4,5 µg DNA: *** ; 1,5 µg DNA vs 3 µg DNA: ns; 1,5 µg DNA vs 4,5 µg DNA: ns; 3 µg DNA vs 4,5 µg DNA: ns

(9) Nuts n = 9; KYN n = 10; zweiseitiger t-Test: $t = 2,063$; $df = 17$; $p = 0,0547$; F-Test: $F = 7,529$; $p = 0,0066$

(10) CalPhos n = 14; 15 µL LF2000: n = 8; 7,5 µL LF2000 n = 20; 1way ANOVA: $F = 0,96$; $R^2 = 0,05$; $p = 0,391$

(11) CalPhos n = 13; 15 µL LF2000: n = 8; 7,5 µL LF2000 n = 18; 1way ANOVA: $F = 2,53$; $R^2 = 0,12$; $p = 0,094$

(12) CalPhos n = 14; 15 µL LF2000: n = 8; 7,5 µL LF2000 n = 20; 1way ANOVA: $F = 5,22$; $R^2 = 0,21$; $p < 0,01$; Multiple Comparison Test (Dunnett's u. Tukey's): CalPhos vs 15 µL LF2000: ** ; CalPhos vs 7,5 µL LF2000: ns; 15µL LF2000 vs 7,5µL LF2000: *

7. BILDERQUELLEN

Abb. 1. CLONTECH. CalPhos™ Mammalian Transfection Kit. User Manual

Abb. 2. INVITROGEN™ - life technologies. Lipofectamine™ 2000 Reagent. Achieve 99% Transfection Efficiency In a Single Stroke. Users Manual

Abb. 3. LONEZ et al. 2008. Cationic liposomal lipids: From gene carriers to cell signaling und

REGELIN A. 2000. Entwicklung eines automatisierten Screeningverfahrens zum Test neuer Transfektionslipide und Untersuchungen zum Mechanismus der Lipofektion [Dissertation]

Abb. 4. INVITROGEN™ - life technologies. Mechanism of cationic lipid-mediated transfection

Abb. 5. Nobel Lectures: SHIMOMURA O. 2009. Discovery of Green Fluorescent Protein (GFP)

Abb. 6. TSIEN RY. 1998. The green fluorescent protein

Abb. 7. TSIEN RY. 1998. The green fluorescent protein

Abb. 8. TSIEN RY. 1998. The green fluorescent protein

Abb. 9. KANDEL ER. et al. 1996. Neurowissenschaften: Eine Einführung

Abb. 10. - Abb. 28. Lena Rubi

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

8. ABKÜRZUNGEN

ABS	Antibiotics
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
ANOVA	Analysis of Variances (Varianzanalyse)
AP	Aktionspotential
AS	Aminosäure
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
d	Tag
DEAE-Dextran	Diethylaminoethyl-dextran
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOPE	Dioleylethanolamin
DOSPA	2,3-dioleyloxy-N-[2(sperminecarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminium trifluoroacetate
DOTMA	N-[1-(2,3-Dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium-chlorid
FCS	fetales Kälberserum
GFP	green fluorescent protein
Gly	Glycin
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
I	Stromstärke
kV	Kilovolt
M	Molar
max.	maximal

mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
min	Minute
min.	minimal
µL	Mikroliter
mM	Millimolar
MΩ	Megaohm
MQ	MiliQ; deionisiertes Wasser
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
mV	Millivolt
MW	Molekulargewicht
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
pA	Pikoampere
pers. Komm.	persönliche Kommunikation
PNS	peripheres Nervensystem
R	Widerstand
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Ruhepotential
Σ	Summe
Ser	Serin
SFM	Serum freies Medium
siRNA	small interfering RNA
Tyr	Tyrosin
U	Spannung
UV	ultraviolett
ZNS	zentrales Nervensystem
*	statistische Signifikanz: $p \leq 0,05$
**	statistische Signifikanz: $p \leq 0,01$
***	statistische Signifikanz: $p \leq 0,001$
****	statistische Signifikanz: $p \leq 0,0001$

DANKSAGUNG

Als erstes möchte ich mich bei Mag. Dr. Helmut Kubista bedanken, der mir die Arbeit am Pharmakologischen Institut ermöglicht hat und mir beim Erstellen meiner Diplomarbeit eine große Hilfe war.

Des Weiteren möchte ich mich bei Fr. Gabriele Gaupmann bedanken, für ihre freundliche und hilfsbereite Art und für die Einführung in meine Labortätigkeit.

Bei Univ. Prof. Dr. Stefan Böhm möchte ich mich für die Benutzung seines Labors bedanken.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinem Vater Dr. Martin Seifert bedanken, der meine Arbeit auf seine gewohnt aufmerksame und gründliche Weise Korrektur gelesen hat. An dieser Stelle möchte ich mich auch beim Rest meiner Familie (Mama, Papa, Geschwistern, Freund und Oma) bedanken, dafür dass sie mich auch unabhängig meines beruflichen Erfolges immer unterstützen und lieb haben!

Finally I want to thank everybody in the lab for helping me, especially M.Sc. Giri Kuma Chandaka and Hr. Arsalan Yousuf for helping me with the preparations.

CURRICULUM VITAE



Persönliche Daten

Name	Lena Rubi
Geburtstag	26.12.1986
Nationalität	Österreich
Geburtsort	Korneuburg
Anschrift	Mortaraplatz 1 / 50 + 51, 1200 Wien
Telefon	Tel.: +43 664 99 25 153
E-mail	lena.rubi@aon.at

Ausbildung

Feb 2011 - Jun 2011	Mitarbeit am FWF Projekt P19710 unter der Leitung von Helmut Kubista am Pharmakologischen Institut der Medizinischen Universität Wien
2010 - 2011	Diplomarbeit am Pharmakologischen Institut der Medizinischen Universität Wien
2008 - 2011	Studium der Zoologie an der Universität Wien
2005 - 2008	Studium der Biologie an der Universität Wien
Juni 2005	Matura mit gutem Erfolg am BRG Anton Kriegergasse, Wien Liesing
1997 - 2005	BRG Anton Kriegergasse, Wien Liesing
1993 - 1997	Volksschule Sittendorf, NÖ

Sprachliche Fähigkeiten

Deutsch (Muttersprache)
Englisch (gut)
Spanisch (Grundkenntnisse)

Wissenschaftliche Fähigkeiten

Arbeit mit (primären) Zellkulturen (Präparation, Kultivierung)
Transfektionen (prim. Zellkultur Hippokampus, TSA)
Elektrophysiologie (Patch-Clamp Messungen)
Mikroskopie (Fluoreszenzmikroskopie, Lichtmikroskopie)
Histologie (Fixieren, Einbetten, Schneiden, Färben)

Computerkenntnisse

Windows XP
MS Office (Word, Excel, Powerpoint)
Mac OS X
Mac iWorks (Pages, Numbers, Keynote)
Adobe Photoshop
Online Literatursuche (PubMed, u:search)
Statistik (SPSS, GraphPad Prism)

Hobbys und Interessen

Klettern, Schwimmen, Skaten, Wandern, Yoga, Naturbeobachtung,
Lesen