

Max-Planck-Institut für Psychiatrie, Abteilung Klinische Neuropharmakologie
und
Institut für Neurowissenschaften der Technischen Universität München

**In vitro Imaging neokortikaler Pyramidenneuronen nach patch-
clamp gestützter Beladung mit Quantum Dots**

Ruben M. E. Bullinger

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin (Dr. med.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. H. K. H. Adelsberger
2. Univ.-Prof. Dr. A. Konnerth

Die Dissertation wurde am 11.01.2012 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 18.04.2012
angenommen.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Das Neuronale Netzwerk	1
1.2	Aufbau der Nervenzelle	1
1.3	Der zerebrale Kortex beim Säugetier und seine Funktion	2
1.3.1	Aufbau, Funktion und Entwicklung	2
1.3.1.1	Laminäre Organisation	2
1.3.1.2	Kolumnäre Organisation	4
1.3.2	Ausdifferenzierung von Nervenzellen	4
1.4	Pyramidenneurone der Lamina V	5
1.5	Was sind Quantum Dots?	7
1.5.1	Quantum Dots und ihr Stellenwert in der Wissenschaft	10
1.5.2	Entwicklung der Quantum Dots	12
1.5.3	Eigenschaften der Quantum Dots	13
1.5.4	Vorteile und Nachteile der Quantum Dots	14
1.6	Untersuchungsgegenstand der Arbeit	16
2	MATERIAL UND METHODEN	18
2.1	Präparation der neokortikalen Hirnschnitte	18
2.2	Infrarot-Videomikroskopie	19
2.3	Elektrophysiologie	20
2.3.1	Versuchsaufbau	20
2.3.2	Ganzzellaufbau	21
2.3.3	Pipetten	22
2.3.4	Die Etablierung der Ganzzellaufbau	23
2.3.5	Patchvorgang und Farbstoffinjektion	24

2.3.6	Tippfilling	24	
2.3.7	Patchlösung	25	
2.4	Andere angewandte Techniken	25	
2.4.1	Elektroporation	25	
2.5	Histologie	26	
3	ERGEBNISSE		27
3.1	Auswahlkriterien der Pyramidenzellen	27	
3.2	Histologische Auswertung	28	
3.3	Überblick der Färbesubstanzen	28	
3.4	Morphologische Klassifikation der Pyramidenzellen	29	
3.5	Abbildungen	32	
3.5.1	Klassifikation der Pyramidenneurone nach Qualität	42	
3.5.2	Vergleich der QD-Klassen	43	
3.5.3	Methodenvergleich	44	
4	DISKUSSION		45
4.1	Ziel, Intention und Ergebnisse	46	
4.2	Diskussionen der Ergebnisse	48	
4.3	Diskussion der Methodik	52	
5	ZUSAMMENFASSUNG		59
6	AUSBLICK		60
7	ANHANG		62
7.1	Literaturverzeichnis	62	

7.2	Abbildungsverzeichnis	77
7.3	Abkürzungsverzeichnis	78
7.4	Verwendete Substanzen	79
7.5	Danksagung	81
7.6	Lebenslauf	82
7.7	Erlärung	84

1 Einleitung

1.1 Das Neuronale Netzwerk

„Nervenzellen können als die kleinste unabhängige Funktionseinheit des Nervensystems verstanden werden. Ihre Aufgabe ist die Aufnahme, Weiterleitung, und Verarbeitung von Reizen und Informationen. Die Informationsweiterleitung von Zelle zu Zelle geschieht durch die Freisetzung von Neurotransmittern an den Nervenenden (Synapsen). Diese führt letztendlich zur Regulation der Aktivität der nachgeschalteten Zielzellen“, (Carneiro, Kelley, Junqueira, 2002).

1.2 Aufbau der Nervenzelle

Morphologisch können die meisten Nervenzellen in drei Abschnitte unterteilt werden. Vom Zellkörper gehen in der Regel ein oder mehrere Dendriten aus. Dendriten sind lang gestreckte Fortsätze, die darauf spezialisiert sind Reize aus der Umgebung von Sinneszellen oder von anderen Nervenzellen aufzunehmen. Der Zellkörper (Perikaryon) bildet das trophische Zentrum für die gesamte Zelle und dient ebenso wie die Dendriten der Reizaufnahme. Das Axon ist ein Fortsatz über den Signale elektrisch auf andere Nerven,- Muskel,- und Drüsenzellen weitergeleitet werden. An Synapsen wird die Information von der Nervenzelle durch Neurotransmitter über den synaptischen Spalt hinweg auf die nachgeschalteten Zellen übertragen. Der Zellkörper und die Fortsätze von Nervenzellen können sehr verschieden aufgebaut sein. Dabei variiert ihre Größe von 120 μm großen Pyramidenzellen bis 4 μm kleiner Körnerzellen. Neben den Purkinjezellen, mit inhibitorischer Funktion, die in der Kleinhirnrinde zu finden sind, stellen die Korbzellen der Molekularschicht ein gutes Beispiel für Interneuronen dar. Diese wissenschaftliche Arbeit befasst sich primär mit den Eigenschaften und der Morphologie von Pyramidenneuronen (Lamina V) des Neokortex, wesshalb deren Aufbau und deren Vernetzung genauer beleuchtet wird.

1.3 Der zerebrale Kortex beim Säugetier und seine Funktion

1.3.1 Aufbau, Funktion und Entwicklung

„Die Großhirnrinde der Säugetiere gliedert sich in das limbische System und den Neokortex, der beim Menschen ungefähr 80 % des Gehirnvolumens ausmacht“, (Eder et al., 2000). Dabei hat der Neokortex eine Ausdehnung von etwa 2600 cm²; ist 3-4 mm dick und besteht aus grauer Substanz. Er enthält 28 Mrd. Nervenzellen und ist mehrlagig geschichtet aufgebaut.

Die Nervenzellen unterscheiden sich in den einzelnen Schichten hinsichtlich ihrer Morphologie, synaptischen Afferenzen (Eingänge), ihrer Efferenzen (Ausgänge) und ihrer funktionellen Eigenschaften und Aufgaben. „Funktionell unterscheidet man innerhalb des Neokortex zwischen sensorischen, motorischen und Assoziations-Arealen. Die Kommunikation zwischen den einzelnen Kortexregionen findet ipsilateral über so genannte Assoziationsfasern statt. Die über den Balken laufenden Kommissuren-Fasern verbinden Areale, die in unterschiedlichen Hemisphären liegen.

Innerhalb der ersten zwei postnatalen Wochen finden im Neokortex starke, entwicklungsbedingte, anatomische und physiologische Veränderungen statt. Die Neuronen nehmen in dieser Zeit an Größe und Komplexität zu, etablieren die charakteristische laminäre Schichtung und bilden ein nahezu adultes Innervationsmuster aus“ (Wise & Jones, 1978; Burgard & Hablitz, 1993; Sutor & Luhmann, 1995; Eder et al., 2000).

1.3.1.1 Laminäre Organisation

„In Analogie zum Bulbus olfactorius, dem Hippokampus und dem Cerebellum zeichnen sich der gesamte Neokortex und somit auch der somatosensorische Kortex durch einen geschichteten Aufbau aus. Für diese Schichtung sind Unterschiede in der Zusammensetzung und Dichte der Zellen, der Form und Größe ihrer Somata sowie der Faserprojektionen verantwortlich (zur Übersicht siehe Sheperd, 1990). Nach Brodman (1909) wird der Neokortex in sechs Laminae I-VI eingeteilt, die zwischen der Pia Mater und der weißen Substanz liegen“ (Schierloh et al., 2003). Jedoch überschreiten die Dendriten und Axone der meisten Nervenzellen die Schichtgrenzen.

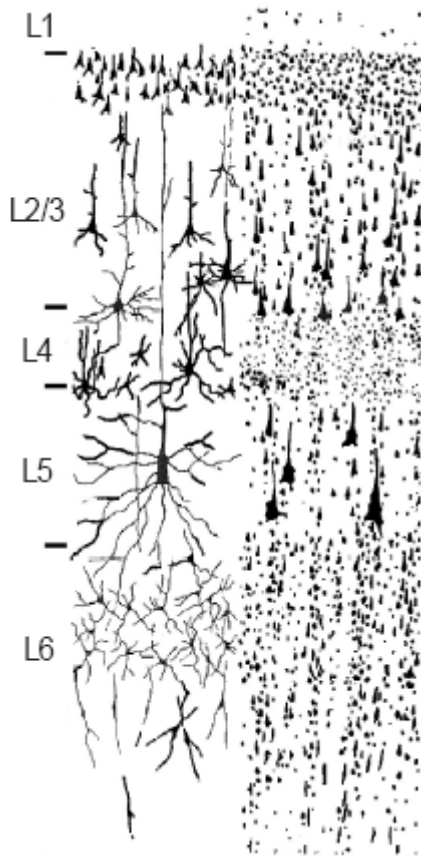


Abbildung 1 Schichtung des Neokortex höherer Säugetiere. Links: Golgi-Imprägnation. Rechts: Nisselfärbung. Verändert nach Creutzfeld (1983).

Lamina 1:

Die äußere plexiforme Schicht enthält nur wenige Somata und besteht vorwiegend aus den Ausläufern apikaler Dendriten sowie aus horizontal verlaufenden Axonen.

In Lamina 2/3

sind vorwiegend Pyramidenneurone kleiner und mittlerer Größe sowie Interneurone (z.B. Sternzellen) lokalisiert.

Lamina 4

wird als granuläre oder Körnerschicht bezeichnet und enthält hauptsächlich Sternzellen. Diese Schicht ist besonders in den sensorischen Arealen ausgeprägt und fehlt in den motorischen Gebieten.

Lamina 5:

In der ganglionären Schicht, sind große Pyramidenneurone und Interneurone lokalisiert.

Lamina 6

wird von Spindelzellen und wenigen mittelgroßen Pyramidenneuronen gebildet.

1.3.1.2 Kolumnäre Organisation

„Der somatotopen und laminären Organisation überlagert sich eine vertikale Differenzierung, die den Kortex in säulenförmige Unterareale (Kolumnen) gliedert. Histologische Belege für die anatomisch kolumnäre Organisation des Kortex existieren schon seit langem (Lorente De Nó, 1938). Mountcastle postulierte (Mountcastle, 1957) die Kolumne als funktionelle Grundeinheit, aus der sich der gesamte Kortex zusammensetzt. Mit Hilfe elektrophysiologischer Methoden (Mountcastle, 1978) konnte er nachweisen, dass jeder Kolumne des somatosensorischen Kortex einheitliche Reizsubmodalitäten (z.B. Adaptionverhalten) zugeordnet werden können. Außerdem stellt jede Kolumne eine basale Verarbeitungseinheit kortikaler synaptischer Schaltkreise dar (Douglas & Martin, 1991)“ (Schierloh et al., 2003).

1.3.2 Ausdifferenzierung von Nervenzellen

Neokortikale Zelltypen können nach verschiedenen Kriterien eingeteilt werden. Eine Möglichkeit ist die Differenzierung entsprechend dem Vorhandensein dendritischer Dornfortsätze „spines“ (Sheperd, 1990). Vieles deutet darauf hin, dass neokortikalen Nervenzellen mit dendritischen Dornfortsätzen eine exzitatorische Funktion zukommt. Die Mehrheit der mit dendritischen Dornen versehenen Neuronen sind Pyramidenzellen. Sie machen ungefähr zwei Drittel der Gesamtpopulation der Neurone im Neokortex aus. Die Nervenzellen mit „glatten“ Dendriten („smooth cells“ oder „non-spiny neurons“) bilden die

Population der lokal projizierenden, inhibitorischen Interneurone. Diese morphologisch äußerst heterogenen Nervenzellen können nach der Form und Verteilung der axonalen Ramifikationen klassifiziert werden. Als Beispiel seien Korbzellen, Kandelaberzelle und „Double-Bouquet“ Zellen genannt (Szentagothai, 1978; Peters & Kimerer, 1981). Die meisten neokortikalen Interneurone enthalten neben dem Neurotransmitter GABA neuroaktive Peptide, zum Beispiel das Neuropeptid Y, Somatostatin und Cholecystokinin, deren physiologische Bedeutung jedoch weitgehend ungeklärt ist. Inhibitorische Synapsen vermitteln im Neokortex entweder eine rekurrente Hemmung oder eine Vorwärtshemmung (Benardo, 1995; Wong & Crumley, 1995).

1.4 Pyramidenneurone der Lamina V

Die morphologische Gestalt des Pyramidenneurons korreliert mit ihrer Funktion als Nervenzelle. Der Zellkörper ähnelt der Form einer Pyramide. „Die Pyramidenneurone der Lamina V sind die größten Zellen, die im Neokortex vorkommen. Ihr großes Soma ist für die Versorgung der ausgedehnten Dendriten- und Axonbäume notwendig“ (Eder et al., 2000). Die Zellen sind regelmäßig angeordnet und mit ihrem Hauptdendriten, dem Apikaldendriten zur Rindenoberfläche hin ausgerichtet, der die Lamina I–V durchläuft. Dabei unterscheiden sie sich in ihrer Größe (10 μ -50 μ m) erheblich. „Im Kortex des Menschen kann der Apikaldendrit eine Länge von 2,5 mm erreichen“ (Marin-Padilla, 1967; Eder et al., 2000). Im neokortikalen Netzwerk nehmen die Lamina V-Pyramidenneurone eine besondere Stellung ein. Sie integrieren zehntausende exzitatorische und inhibitorische synaptische Eingänge aus allen Laminae und dem Thalamus. Die so erhaltenen Informationen werden an subkortikale Regionen, wie das Tectum, das Striatum, die Pons, das Mittelhirn und das Rückenmark, weitergeleitet. „Erregende Nervenzellen bilden mit Lamina V-Pyramidenneuronen asymmetrische Axon-Dornfortsatz-Synapsen, hemmende Interneurone dagegen symmetrische Axon-Dendrit-, Axon-Soma-, und Axon-Axon-Synapsen aus“ (Eder et al., 2000). Der Apikaldendrit entlässt zahlreiche Seitenäste und endet meist mit konusförmig angeordneten Endaufzweigungen in Lamina I. Von den tiefen Randbereichen der Zelleiber gehen Basaldendriten ab, die horizontal gerichtet sind oder schräg abwärts verlaufen. In der Regel sind die Pyramidenzellen verschiedener Schichten so übereinander angeordnet, dass ihre Apikaldendriten einander nahe kommen und sog. Dendritenbündel bilden. Ein Bündel kann zwischen zehn und dreißig Dendriten enthalten. Die Bündelung ist wahrscheinlich der

morphologische Ausdruck einer funktionellen Zusammenarbeit zwischen den Zellen (Modulkonzept) dendritischer Integration. Sämtliche Dendriten der Pyramidenzellen weisen einen mehr oder weniger dichten Besatz mit Dornen ("Spines") auf. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass Endaufzweigungen vom Axon aus den verschiedensten Quellen synaptische Kontakte mit der Dornoberfläche bilden. Die Dichte des Dornenbesatzes unterliegt starken Schwankungen und ist abhängig von der Art des Dendriten, vom Typus der Pyramidenzelle, dem kortikalen Feld, von der Schicht und von dem Alter des Individuums. Der Zellkörper enthält einen runden chromatinarmen Zellkern mit großen Kernkörperchen. Als Transmitter dient bei Pyramidenneuronen überwiegend das Glutamat. Das Axon der Pyramidenzelle entspringt zumeist an der Zellbasis oder an einem starken Basaldendriten aus einem konischen Initialsegment. Das Axon läuft senkrecht zur Rindenoberfläche in Richtung weißer Substanz und gibt dabei zahlreichen Kollateralen ab. Der Hauptast des Axon der meisten Pyramidenzellarten zieht in die weiße Substanz und erreicht mit seinen Endaufzweigungen andere Bereiche der Hirnrinde oder subkortikale Gebiete. Dementsprechend sind die Pyramidenzellen ihrer Natur nach entweder Assoziations-Kommissural oder Projektionsneurone, indem sie aus dem gesamten Kortex Informationen beziehen.

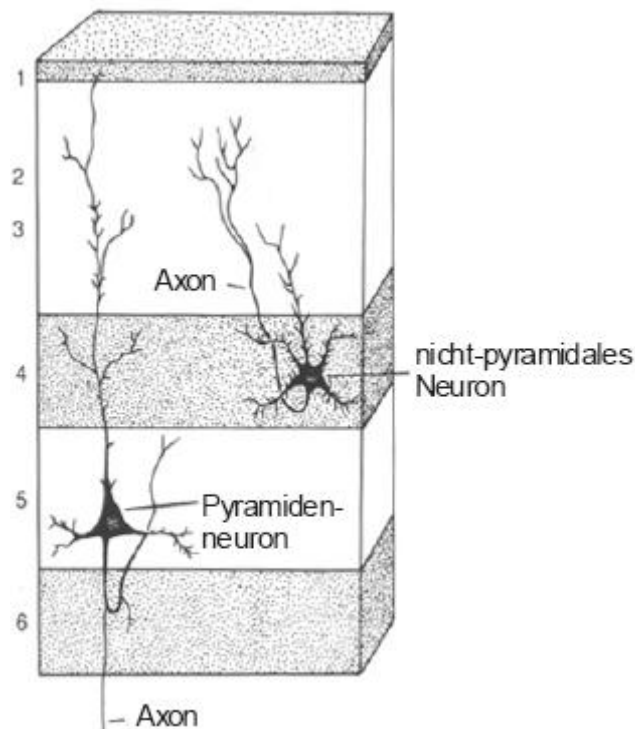


Abbildung 2 Schichtung des Neokortex 1-6. Exemplarisch ein Pyramidenneuron der Lamina 5 und ein nicht-pyramidales Neuron der Lamina 4. Verändert nach Kelley und Dodd (1991).

1.5 Was sind Quantum Dots?

Quantum Dots stellen eine neue Klasse von fluoreszierenden "Farbstoffen" dar, und ermöglichen eine Fülle von neuartigen Darstellungsmethoden in Geweben, Zellen sogar ganzen Zellverbänden. Dabei sind sie auf Grund Ihrer Vielseitigkeit mit einigen Vorteilen behaftet, die bei der Rekonstruktion von Nervenzellgewebe zum tragen kommen. Quantum Dots sind halbleitende, nanometergroße (10 nm bis 100 nm), kristalline Strukturen mit speziellen optischen Eigenschaften (Portney & Ozkan, 2006). Jedes dieser „Kügelchen“ beherbergt im Inneren einen Kern, bestehend aus halbleitendem Kadmium Selenide (CdSe) und ist von einer Zinksulfatschale (ZnS) umgeben, die deren optische Eigenschaften verbessert. Die Schale ist von einer polymeren Hülle umgeben, an diese Substanzen wie Streptavidin, Biotin und andere Biomoleküle gekoppelt werden können, ohne die optischen Eigenschaften der Quantum Dots zu verändern (Goldman, Anderson et al., 2002; Medintz, Clapp et al., 2003).

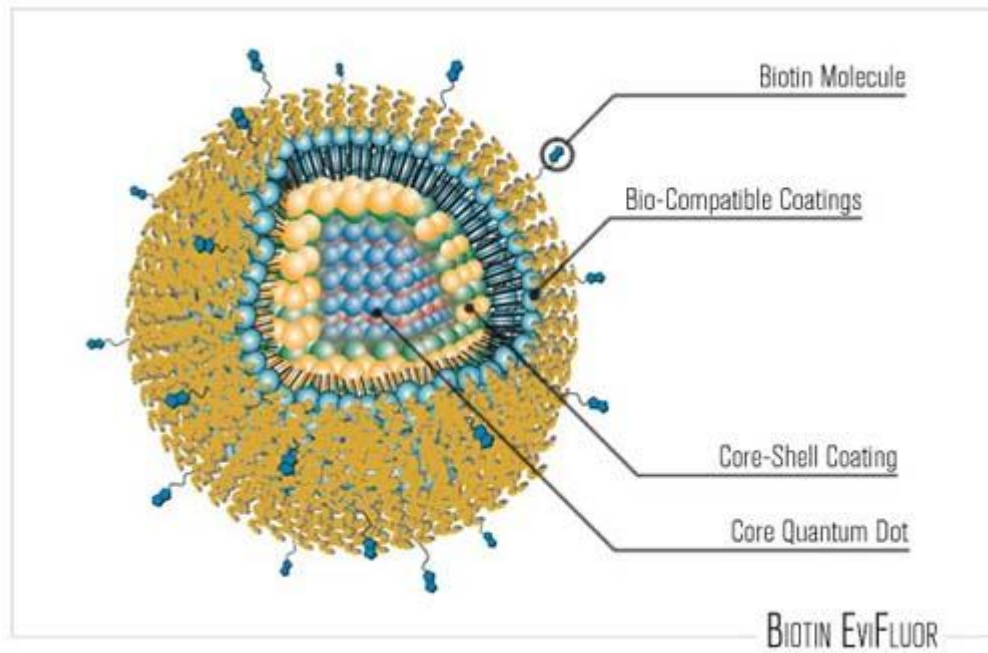


Abbildung 3 Schematische Zeichnung des Quantum Dot-Moleküls. Evident Technologies, USA (2004).

Bezeichnung von Innen nach Außen:

Kern des Quantum Dots

Schale des Kerns

Polymere Hülle der Schale

Biomolekül z.B. hier Biotin an die polymere Hülle gekoppelt.

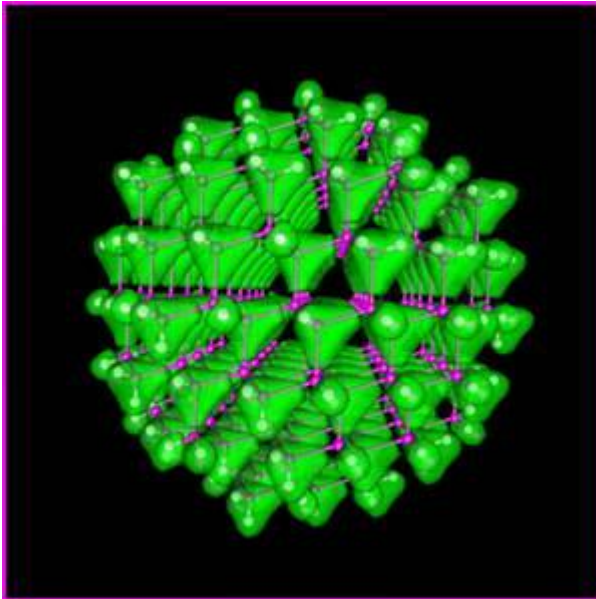


Abbildung 4 3-D-Modell eines Quantum Dot. Evident Technologies, USA (2004).

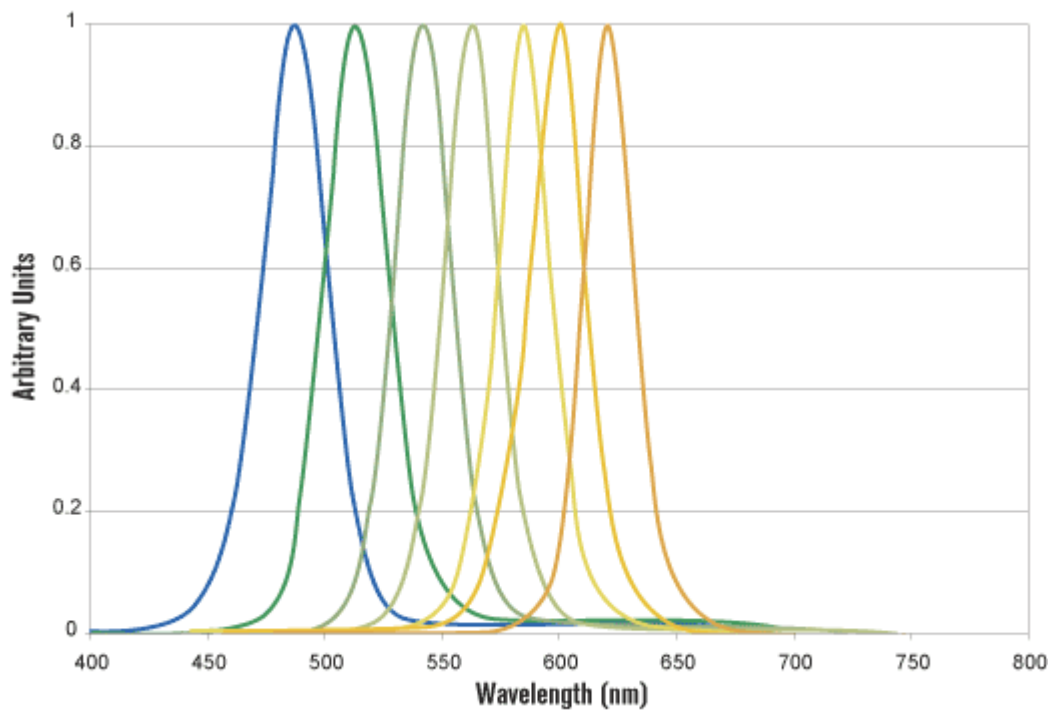


Abbildung 5 Absorptionsspektrum von QDs. Evident Technologies, USA (2004).

Quantum Dots weisen ein sehr breites Absorptionsspektrum im Wellenlängenbereich und einen hohen Extinktionskoeffizienten auf. Die Farbe, also Licht unterschiedlicher Wellenlänge, wird allein durch die Größe der Quantum Dots bestimmt.

Ordinate: Willkürliche Einheit

Abszisse: Wellenlänge in nm

1.5.1 Quantum Dots und ihr Stellenwert in der Wissenschaft

Eine Redensart unter Neurowissenschaftler sagt, „The gain in brain is mainly in the stain“ und macht damit die Wichtigkeit von Färbetechniken für neurowissenschaftliche Forschung deutlich (Helmchen & Nevian, 2007). Geeignete Färbetechniken von Neuronen waren und sind immer noch von entscheidender Bedeutung, um neuroanatomische Fragen mit Hilfe von histologischen Methoden, kombiniert mit modernen und aktivitätsabhängigen Färbesubstanzen, aufzuklären. So erzielte z.B. Camillo Golgi Ende des 19. Jahrhunderts den erfolgreichsten Einblick in die Organisation des Nervensystems, der hauptsächlich auf der Entwicklung der Silberchromatin-Färbetechnik basierte. Die Golgi-Methode färbt nur eine kleine Gruppe von Zellen, diese aber mit hohem Kontrast. Diese eingeschränkt einsetzbare und spezielle Methode wurde zu einer der Bedeutendsten, da sie die Zuordnung individueller Zellen und untergeordneter Zellbestandteile ermöglichte und somit Vorstellungen förderten wie das neuronale Netzwerk organisiert sein könnte. Heutzutage sind Neurowissenschaftler immer noch mit dem alten Problem konfrontiert, geeignete Färbemethoden für Neurone zu finden.

In der wissenschaftlichen Forschung stellen Quantum Dots ein neues Werkzeug von großer Bedeutung dar, um standardisierte Fluoreszenzmikroskopie zu betreiben (Jaiswal, Mattoussi et al., 2003; Watson, Wu et al., 2003; Michalet, Pinaud et al., 2005). Darüber hinaus bieten sie eine Alternative zur traditionellen Immunocytochemie, Immunohistochemie und sind ganz besonders für die Studien an Neuronen und Neuroglia wertvoll. Quantum Dots können dazu benutzt werden, einzelne Ereignisse auf molekularer Ebene, mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie, darzustellen, zu messen, und zu verfolgen. Des Weiteren ermöglichen sie die Darstellung und Verfolgung, von in Bewegung befindlichen, molekularen Prozessen über einen längeren Zeitraum. Diese Eigenschaften sind mit anderen Techniken schwer zu erzielen. So sind Quantum Dots für Experimente, die durch die gegebene Anatomie, von Interaktionen zwischen Neuron und Neuroglia begrenzt sind, wie z.B. der kleine Raum eines synaptischen Spalts oder der Prozess zwischen Astrozyt und Neuron, sehr nützlich. Auf Grund ihrer winzigen Größe und hohen optischen Auflösung sind sie sehr gut geeignet, um die molekularen Bewegungen von intrazellulären und molekularen Vorgängen über längere Zeiträume darzustellen. Jedoch sollte beachtet werden, dass der hydrodynamische Radius verwandter Quantum Dots größer ist (15-20 nm) als ihre tatsächliche Größe von 5-8 nm (Larson, Zipfel et al., 2003). Kurz zurück liegende Studien

machen das Potential dieser Technik deutlich, bei der Quantum Dots in der Neurowissenschaft verwendet wurden. Triller und Kollegen (Dahan, Levi et al., 2003) verwendeten Antikörper gebundene Quantum Dots, um die Diffusionswege von Glycerinrezeptoren in Kulturen von primären Rückenmarkskulturen zu veranschaulichen. Sie waren in der Lage das Bewegungsmuster einzelner Glycerinrezeptoren für mehrere Stunden in einer räumlichen Auflösung von 5-10 nm darzustellen. Damit machen sie deutlich, wie sehr die Diffusionswege, abhängig davon, ob die Rezeptoren synaptisch, perisynaptisch oder extrasynaptisch, variieren konnten. So inkubierten und konjugierten Sundara Rajan & Vu (2006) Quantum Dots selektiv an Trka-Rezeptoren, brachten die Vesikel via Endozytose in PC12-Zellkulturen und konnten mit dem QD-Trka-Rezeptorkomplex gekoppelt an betaNGF ebenso einen bidirektionalen Transport und sogar ein Wachstum an den Nerverknospen innerhalb des Neurons darstellen. Ganz besonders konnten diese Fortschritte dazu verwendet werden, funktionelle Interaktionen innerhalb von Neuronen zu verfolgen und darzustellen. Jedoch hat jede neu entwickelte Technologie auch ihre Schwächen. So beschreibt Vu, Maddipati et al., (2005), das betaNGF gekoppelt an Quantum Dots seine biologische Aktivität gegenüber ungebundenem betaNGF einbüßen würde. Andere Forschungsgruppen trieben die Entwicklung der Quantum Dots voran, indem sie neue Quantum Dot-assoziierte Werkzeuge entwickeln. So reicherte Hongyou Fan (Fan, Leve et al., 2005) Lipidmizellen mit Quantum Dots an, inkubierte und depolarisierte die Nervenzellen, um Endozytose zu erzielen und konnte darauf den Transport der Quantum Dots in Lysosomen innerhalb des hippocampalen Neurons als auch eine Anreicherung der Quantum Dots in Nuclei sichtbar machen. Bisher waren Quantum Dots an das zu beobachtende Protein mit Hilfe der Drei-Layer-Strategie gekoppelt worden: Erster Antikörper gefolgt von einem biotinierten zweiten Antikörper, der schließlich an einem Streptavidin-Quantum Dot gekoppelt wurde. Da dieser Rezeptorkomplex aber verhältnismäßig groß (ca. 50 nm) ist und dabei der in das Neuron gerichtete Transport via Endozytose behindert werden kann, entwickelten Ting und Kollegen (Howarth, Takao et al., 2005) eine neue Strategie. Er koppelte Zelloberflächenproteine an ein so genanntes Akzeptor-Protein, nachdem es biotiniert worden war um darauf hin als ein Zielprotein für Streptavidin konjugierte Quantum Dots zu fungieren. Dieser Rezeptorkomplex beträgt nur eine Größe von ca. 20 nm. Mit dieser Technik wurde es ihm möglich, AMPA Rezeptoren in kultivierten Hippocampusneuronen selektiv zu markieren und zu verfolgen. Bei Betrachtung der einzigartigen Eigenschaften, die Quantum Dots in der Neurowissenschaft zu bieten haben, sieht ihre Zukunft sehr viel versprechend aus.

1.5.2 Entwicklung der Quantum Dots

Bei einer Vielzahl von Erkrankungen ist eine möglichst frühe und aussagekräftige Diagnose von entscheidender Bedeutung. Das betrifft sowohl die Wahl, als auch die Abstimmung und Ausführung der notwendigen medizinischen Maßnahmen. Dies gilt vor allem für eine Vielzahl von Tumorarten, für deren Bestimmung und Therapie die Diskriminierung zwischen gesundem und karzinogenem Gewebe wesentlich ist. Demnach hängt die Genesung und sogar das Überleben eines Patienten entscheidend davon ab, ob und zu welchem Differenzierungsgrad der behandelnde oder operierende Arzt zwischen verschiedenen Gewebetypen unterscheiden kann. Zur Verbesserung der Diagnose und der medizinischen Maßnahmen wurden in der Vergangenheit bereits Kontrastmittel entwickelt mit deren Hilfe, Funktionen und Strukturen im Körper über bildgebende Verfahren sichtbar gemacht werden konnten. Diese Verfahren werden unter anderem zur gezielten Detektion krebsassoziierter Zellveränderungen verwendet.

Zu den ersten Techniken von Färbemethoden und der zellulären Illustration gehören unter anderem die Silberimprägnation nach Golgi, das Nisselpräparat, das Pigmentpräparat, das Markscheidenpräparat und die Golgi–Silbersalz-Niederschlagsmethode. In den 80igern stieg das wissenschaftliche Interesse für eine ausgereifte Technik zur Darstellung von Zellen, Nervenzellen und ganzen Zellverbänden an. Konventionelle Farbstoffe wie Luzifer Yellow und Lissamine Rhodamine B. waren nicht mehr in der Lage, hellere Signale und eine höhere Photostabilität in den Präparaten zu sichern. So haben beispielsweise Hsu & Lu (2004) ein molekular-spezifisches Kontrastmittel auf der Basis eines organischen Fluorophors als Marker für die frühe karzinogene Transformation entwickelt. Hierin wurde die tumorassoziierte Überexpression des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR, epidermal growth factor receptor) ausgenutzt, um verändertes Gewebe in der Mundhöhle über ein rot fluoreszierendes Anti-EGFR-Antikörper-Konjugat (Alexa 660) zu identifizieren. Auch die Farbstoffe der 90iger, wie Biocytin, Neurobiotin, Alexa Fluor 568 und Streptavidin Conjugate, konnten nicht den immer höher werdenden Anforderungen, zur Rekonstruktion von Nervenzellverbänden, gerecht werden. Generell ist ein Nachteil organischer Fluorophore, deren Metabolisierung im Körper, bei der das Fluorochrom abgebaut oder inaktiviert wird. Die Metabolisierung wirkt damit der für die Diagnostik notwendigen hohen Markierungsintensität entgegen. Mit zunehmender Verweildauer des organischen Fluorophors in vivo, verschärft sich diese Problematik und stellt insbesondere bei der Markierung von

Zellen in tieferen Gewebeschichten eine erhebliche Schwierigkeit dar (Levene, Dombeck et al., 2004). Des Weiteren haben längerwellig emittierende organische Fluorophore den Nachteil, dass sich deren Quantenausbeute durch den chemischen Konjugationsprozess reduziert. Zudem sind organische Fluorophore sehr anfällig gegenüber „Photobleaching“, was schon nach kurzer Bestrahlung zu einem substanziellen Fluoreszenzverlust führen kann (Chan, Maxwell et al., 2002; Bruchez, Moronne et al., 1998; Hoshino, Hanaki et al., 2004). Dadurch weist ein Kontrastmittel auf der Basis der Fluorophore eine zu geringe Fluoreszenzstärke und Stabilität bei längerer Anregungsdauer auf, um für die Markierung von Zellen in tieferen Gewebeschichten geeignet zu sein. Bis es nach der Entdeckung der Quantum Dots, Ende der 90iger Dr. Pauli Alivisatos und Dr. Mounji Bawendi gelang, Quantum Dots in einen wasserlöslichen Zustand zu versetzen. Bald konnten weitere Wissenschaftler über eine vier-jährige Entwicklungsphase, die vorteilhaften Eigenschaften der Quantum Dots wie Qualität, Reproduktivität, Wellenlängenspektrum, Signalintensität und Photostabilität verbessern (Chan & Nie, 1998; Gao, Chan et al., 2002; Goldman, Anderson et al., 2002).

1.5.3 Eigenschaften der Quantum Dots

Eine Eigenschaft, die Quantum Dots von konventionellen Farbstoffen unterscheidet, ist ihre Helligkeit und Sensibilität zur Visualisierung von biologischen Strukturen (Alivisatos, 2004). Dies geht mit einer starken Fluoreszenz-intensität einher (Alivisatos, Gu et al., 2005). Ihr hoher Extinktionskoeffizient ermöglicht alle verfügbaren Wellenlängen im Bereich von 350–633 nm, so dass nahezu alle Laser zur Erzeugung eines helleren Emissionssignals verwendet werden können. Zum Vergleich: der Extinktionskoeffizient von Quantum Dots Streptavidin liegt bei $650,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und der Extinktionskoeffizient von Fluorescein liegt bei $80,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Bisherige organische Farbstoffe haben ein enges Excitationsspektrum und ein breites Emissionsspektrum mit einem nahe liegendem Gipfel (Lin, Xie et al., 2007). Quantum Dots weisen ein sehr breites Absorptionsspektrum im Wellenlängenbereich und ein hohen Extinktionskoeffizienten auf und da ihr enges Emissionsspektrum unabhängig von der Excitations-Wellenlänge ist, kann somit ein helleres Signal mit einer besseren Ausnutzung der Lichtintensität erreicht werden (Michalet, Pinaud et al., 2005). Dieses breite Absorptionsspektrum macht nahezu alle Farben durch eine einzige Lichtquelle evozierbar und gibt beinahe monochromatisches Licht einer Wellenlänge wieder (Wu, Liu et al., 2003). Die

Farbe, also das Licht unterschiedlicher Wellenlänge, wird allein durch die Größe der Quantum Dots bestimmt (Arya, Kaul et al., 2005; Vanmaekelbergh & Liljeroth, 2005). Quantum Dots fluoreszieren in einem sehr engen und symmetrischen Emissionsspektrum. Dies verhindert die Überlappung von Farbkanälen und verbessert die Unterscheidbarkeit der unterschiedlichen Farben. Quantum Dots sind wasserlöslich stabil und weisen einen Emissionsgipfel von 20 nm Breite auf.

1.5.4 Vorteile und Nachteile der Quantum Dots

Quantum Dots bieten eine Fülle von Vorteilen in der Darstellung und Rekonstruktion von Zellen und Zellverbänden. Ihr Signal ist heller und sauberer (Ballou, Lagerholm et al., 2004) als bei traditionellen, fluoreszierenden, organischen Farbstoffen wie z.B. Alexa Fluor 488/568. Quantum Dots absorbieren mehr Licht, waraus eine intensivere Leuchtkraft resultiert. Somit kann einerseits ein Signal mit geringerer Lichtintensität erzeugt werden (Larson, Zipfel et al., 2003) und andererseits können Biomoleküle von geringerer Menge quantifiziert werden (Michalet, Pinaud et al., 2005). Trotz intensiver Lichteinwirkung sind Quantum Dots sehr photostabil (Medintz, Uyeda et al., 2005). Das Signal hält länger an, wodurch wiederholte Analysen möglich sind (Rieger, Kulkarni et al., 2005). Trotz Laserstimulation weisen Quantum Dots kein „Photobleaching“ auf, sodass keine Stoffe zur Herabsetzung des Photobleaching notwendig sind (Wu, Liu et al., 2003). Dies macht Quantum Dots ideal für konfokale Mikroskopie (Lacoste, Michalet et al., 2000). Auch der Hintergrund wirkt optisch klarer und heller wie bei herkömmlichen Farbstoffen. Zum Vergleich: Die Quantum Dots Streptavidin 655 nm, bei roter Emission, haben eine niedrigere Autofluoreszenz und bessere biologische Ausleuchtung wie Alexa Fluor 568. Quantum Dots haben keine toxische Wirkung auf Neurone (Chan, Maxwell et al., 2002; Ross, Grafham et al., 2005) und beeinflussen das Wachstum der Zelle kaum (Jaiswal, Mattoussi et al., 2003). Dies macht erneut die Stoffe zur Herabsetzung der Zytotoxizität überflüssig. Ebenso erhält man ein unbeeinflusst, hohes Signal in Pufferlösungen (Immunfluoreszenz). Herkömmliche Farbstoffe können unterschiedliche Farben nicht gleichzeitig emittieren (Lin, Xie et al., 2007). So sind verschiedene Lichtquellen und bestimmte Chemikalien (Pathak, Cao et al., 2006) nötig, um unterschiedliche Farben sichtbar zu machen. Die Quantum Dot-Konjugatenfamilie benötigt nur eine einzelne Lichtquelle für die Erregung aller ihrer Farben. Ein weiterer Vorteil der Quantum Dots ist, dass zur Fluoreszenz Mikroskopie weniger

Filtersets notwendig sind, also nur ein einzelner Filterblock und der dazu passende Emissionsfilter zur Erregung verwendet wird. Es gibt keine sogenannten „Red tails“ wie bei organischen Farbstoffen (Lin, Xie et al., 2007); darüber hinaus auch kein „Überlappen“ von angrenzenden Farben (Slotkin, Chakrabarti et al., 2007). Es können vier Farben (Quantum Dots, Streptavidin) simultan im Fluoreszenzmikroskop analysiert und dokumentiert werden und weisen nur eine geringfügige Überlappung der verschiedenen Farben auf. Dazu kann eine Arbeit von Giepmans, Deerinck et al., (2005) präsentiert werden, in der untergeordnete Zellbestandteile, wie Rezeptoren, Proteine, Moleküle und Antikörper, simultan- und selektiv unterscheidbar nach ihren Farben beobachtet werden können.

1.6 Untersuchungsgegenstand der Arbeit

Seit der Erfindung von Quantum Dots, haben sich wissenschaftliche Gruppen weltweit neue Methoden und Techniken erarbeitet, um Nervengewebe, Gliazellen und Pyramidenzellen für medizinisch-diagnostisch wichtige Fragestellungen darstellen zu können. Dabei kombinieren die Forschungsgruppen, ausgehend von verschiedenen Grundmethoden, eine dieser Methoden mit einer neuen Substanz oder Technik. Zunächst einmal muss man sich veranschaulichen, mit welcher Methode oder Technik der Farbstoff in das Neuron gebracht werden kann. Eine sehr oft angewandte Methode ist die der Inkubation. Die Quantum Dots werden mittels direkter oder indirekter rezeptorvermittelter Endozytose durch aktiven Transport in das Neuron aufgenommen und zirkulieren frei oder verpackt in Endosomen und Vesikeln in der Zelle. Das Prinzip der rezeptorvermittelten Endozytose wird immer wieder neu abgewandelt, indem die zu endozytierende Farbesubstanz, hier, Quantum Dots in Peptid,- und Lipidmoleküle oder in Mizellen angereichert werden können. Eine weitere Methode ist die der photoelektrischen Stimulation mit Lasertechnik. Hierbei werden Neurone, die auf einem Nanopartikelfilm gewachsen sind mit Laser stimuliert, um deren Depolarisation mit der Voltage oder Current Clamp Technik als Signal abzuleiten. Eine selten eingesetzte und nicht etablierte Technik beschreibt die direkte Lichtstimulation der Neurone, doch ist der genaue Mechanismus und die durch temperatur,- oder lichtbedingten möglichen Schäden noch nicht bekannt. Als eine invasive Methode gilt die multiphotonen-mikroskopische Darstellung. Dabei werden Neuronen des Layers V in der oberflächlichen Zone des Kortex bei anästhesierten und craniotomierten Mäusen, mit Hilfe von GRIN-Linsen (Gradient Index), dargestellt.

In dieser Arbeit werden alt bekannte Methoden, wie Mikroinjektion, unter zu Hilfenahme von Patchclamptechnik (Pappas, Wickramanyake et al., 2007), und Elektroporation (Dorvee, Derfus et al., 2004) mit einer neu entwickelten Substanz, den Quantum Dots mit ihren positiv optischen, physiologischen und chemischen Eigenschaften, kombiniert. So zielt diese Arbeit maßgeblich darauf ab, die viel versprechenden Quantum Dots, mit einer optimierten Technik, die hier entwickelt werden soll, in Neurone zu bringen, um in der Nervenzell Darstellung neue Wege und möglicherweise sogar einen Durchbruch für die medizinische Diagnostik, zu erlangen.

Doch die Verwendung von Quantum Dots ist nur eingeschränkt möglich, da sie eine Fülle von Eigenschaften und Probleme mit sich bringen, die bei der Arbeit mit ihnen beachtet werden müssen. Da es in der Literatur Hinweise auf Aggregation gibt, kann die Konzentration in der Patchpipette auf der einen Seite nicht beliebig hoch sein, jedoch da eine Mindestkonzentration der gelösten Quantum Dots notwendig ist, um ein ausreichend starkes Signal zu erhalten, muss auf der anderen Seite eine Mindestanzahl von Quantum Dots in Lösung gebracht werden. Ein bekanntes Phänomen aus der Literatur, das so genannte „Blinking“ bei dem eine bestimmte Anzahl von Quantum Dots unvermittelt in einen signallosen Zustand verfällt, muss hier auch beachtet werden. Auf Grund der anorganischen Beschaffenheit der Quantum Dots, stellt sich hier die Frage nach einer möglicherweise toxischen Wirkung auf die Neurone. Die Quantum Dot Corporation hat mittlerweile ein ganzes Portfolio (Streptavidin, Biotin, Streptavidin-Arg-Quantum Dots und Q-tracks) an verschiedenen Signalstoffträgern im Angebot, worauf anhand von Versuchen, die am besten verwendbare Färbesubstanz ermittelt werden sollte. Als erste Zielsetzung am Setup sollte versucht werden geeignete Pyramidenneurone optisch zu isolieren, in Brücken- und „Current-Clamp“-Modus dem Widerstand und der Kapazität der Elektrode abzugleichen, die „Cell-Attached“-Konfiguration herzustellen, und anschließend den Membranbereich unter der Pipettenspitze zu durchbrechen. Nun sollte anhand des Patchvorgangs versucht werden, einzelne Pyramidenneurone mit den Quantum Dots zu füllen. Verlieh dies erfolgreich, sollte versucht werden einzelne Axone oder basale und apikale Dendriten eines Pyramidenneurons zu patchen, und mit Quantum Dots zu füllen, um noch feinere Strukturen sichtbar machen zu können. Dieses Prozedere sollte bis hin zur eventuellen Darstellung von Spines gesteigert werden, mit dem Ziel, neuartige Strukturen sichtbar zu machen. Als letzter Schritt sollte versucht werden, die Patchtechnik soweit weiter zu entwickeln, dass es möglich wird, die Quantum Dots via Axone und Dendriten über mehrere Pyramidenneurone ja sogar über mehrere Laminae des Kortex hinweg, anzureichern und sichtbar zu machen.

Da derzeit keine veröffentlichte Arbeit existiert, die sich mit der Kombination aus Mikroinjektion mit Hilfe von Patchclamptechnik, Elektroporation und Quantum Dots befasst, darf ich mich nach dem heutigen Kenntnisstand als Erstbeschreiber dieser Methoden ansehen.

2 Material und Methoden

2.1 Präparation der neokortikalen Hirnschnitte

Es wurden für alle Experimente männliche Albinoratten (*Rattus norvegicus famillaris*, Zuchtreihe Sprague Dawley) verwendet. Zur Anfertigung der Schnitte wurden Tiere mit einem Alter von 14–21 Tagen benutzt, da bei Tieren dieses Alters die erregenden Netzwerke im Neokortex bereits ausgebildet sind (Sutor & Luhmann, 1995). Die Verwendung junger Tiere bietet den Vorteil, dass deren Neurone unempfindlicher gegen Anoxie sind und leichter mit der Patch-Clamp-Technik abgeleitet werden können, als die von erwachsenen Ratten.

Die Tiere wurden mit Isofluran narkotisiert und dann dekapitiert. Alle weiteren Präparationsschritte erfolgten unter gekühlter (2–4°C) und mit Carbogen (95 % O₂/5 % CO₄) gesättigter künstlicher Cerebrospinalflüssigkeit (ACSF, Zusammensetzung (mM): NaCl 125; KCl 2,5; NaH₂PO₄ 1,25; MgCl₂ 1; Glukose 25; NaHCO₃ 25; CaCl₂; pH 7,38). Sie wurden rasch und mit äußerster Vorsicht durchgeführt, um das Gehirn weder durch Berührung noch durch Druck zu schädigen. Mittels einer Schere wurde mit einem sagittal geführten Schnitt durch die Kopfhaut der Schädel freigelegt. Anschließend folgten zwei Transversalschnitte von kaudal und ein flach geführter Sagittalschnitt entlang der Mittellinie nach rostral. Die so eröffnete Schädelkalotte wurde mit der Knochenzange nach beiden Seiten bis zum Bregma abgehoben. Das Gehirn konnte nun, nach der Durchtrennung der Nervi optici und des verlängerten Rückenmarks, mit einem gerundeten Spatel aus dem Schädel herausgelöst werden. Nach gründlicher Kühlung (1–2 min) wurde das Gehirn mit der Basis nach unten auf ein mit ACSF getränktes Filterpapier gelegt. Durch einen Sagittalschnitt ungefähr 3 mm von der Mittellinie mit einer in Aceton und Ethanol gereinigten Rasierklinge wurde nun die Schnittfläche hergestellt, mit der der Gehirnblock später auf einen Plexiglasquader geklebt wurde. Die andere Hirnhälfte, das Kleinhirn, der frontale Teil des Endhirns sowie das basale Gehirn wurden abgetrennt. Nachdem der Gehirnblock mit Cyanoacrylatklebstoff auf einen Plexiglasquader aufgeklebt und in ein mit ACSF gefülltes Schneidegefäß überführt worden war, wurden mit einem Vibratom (FTB, Mayer) 300 µm dicke Sagittalschnitte angefertigt (Klingen: Vibratom Blades, TIM Ltd.). Die fertigen Hirnschnitte wurden mit dem weiten Ende der Pasteurpipette in Gefäße mit Carbogen gesättigter ACSF überführt und ungefähr 20 min.

bei 34 °C inkubiert. Anschließend wurden sie bis zur Überführung in die Ableitkammer bei einer Raumtemperatur von 22–24 °C aufbewahrt.

2.2 Infrarot-Videomikroskopie

Mit Hilfe der Infrarot (IR)-Videomikroskopie können Soma, Dendrit und Axon einzelner Nervenzellen im lebenden Hirnschnitt sichtbar gemacht werden (Mac Vicar, 1984; Dodt & Zieglgansberger, 1990; Dodt & Zieglgansberger, 1994; Abbildung 6). Das grundlegende Prinzip besteht darin, dass energiearmes IR-Licht biologisches Gewebe leichter durchdringt, als sichtbares Licht. Die Verwendung von langwelligem Licht hat einen Verlust von räumlicher Auflösung zufolge, die jedoch in Kauf genommen werden kann, da entsprechend feine Strukturen auf Grund des geringen Kontrastes in ungefärbten Präparaten ohnehin nicht ausgemacht werden können.

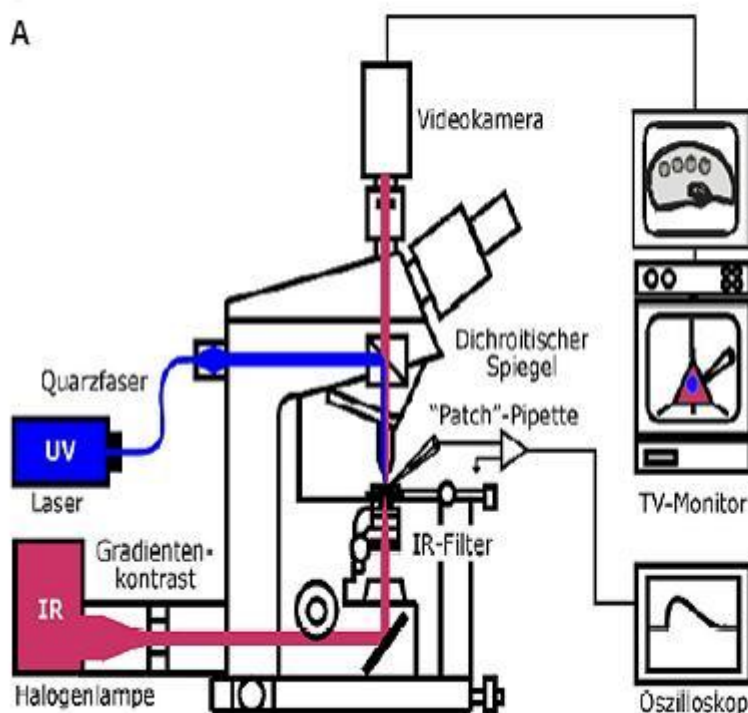


Abbildung 6 „Whole-Cell“-Ableitung in neokortikalen Hirnschnitten der Ratte. Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Verändert nach Eder (2000).

Durch einen zwischen Halogenlampe und Kondensator positionierten Infrarot-Interferenzfilter (Bandpassfilter $\lambda_{\max} = 780 \pm 50$ nm) gelangte IR-Licht mit einer Wellenlänge von 780 ± 50 nm in den Strahlengang des Mikroskops (Axioskop FS, der Fa. Zeiss). Das Mikroskop war mit einem Öl-Immersionskondensator (numerische Apertur 1,4; Zeiss) und einem 60X Wasser-Immersionsobjektiv (numerische Apertur 0,9; Olympus) ausgestattet. Durch einen Strahlenteiler wurde das Bild gleichzeitig auf zwei infrarotsensitive Videokameras (Hamamatsu) projiziert. Ein zwischen Mikroskop und Videokamera positionierter Vergrößerungstubus vergrößerte das Bild für eine der beiden Kameras um den Faktor 4. Eine Verstärkung des Kontrastes wurde zum einen durch eine in den Videokameras eingebaute Kontrastverstärkung und zum anderen durch ein neu entwickeltes Gradientenkontrast (GC)-Verfahren (Dodt, Eder et al., 1999) erreicht. Das Prinzip dieser Technik ist die Minimierung von Streulicht und die Erzeugung eines Beleuchtungsgradienten in zwei orthogonalen Richtungen. Im Vergleich zum Differential-Interferenzkontrast nach Nomarski (DIC) wird mit dem Gradientenkontrast (Abbildung 6) eine um ungefähr 50% größere Visualisierungstiefe im Schnitt und ein sehr viel höherer Kontrast erreicht. Da für das GC-System keine optischen Elemente zur Kontrastverstärkung hinter dem Objektiv plaziert werden müssen, gelangt auch bei hohen Vergrößerungen genügend Licht in die Videokamera. Die Videobilder wurden auf zwei schwarz-weiß-Monitoren sichtbar gemacht. Sie konnten mit Hilfe von Videorekordern (Panasonic) aufgezeichnet werden. Während oder nach dem Experiment konnten die Bilder entweder auf einem Thermo-Videoprinter (Panasonic) ausgedruckt oder über ein Digitalisierungssystem (Argus-20, Hamamatsu) direkt von einem Computer weiterverarbeitet werden. Dadurch konnten elektrophysiologische neuroanatomische Daten miteinander korreliert werden.

2.3 Elektrophysiologie

2.3.1 Versuchsaufbau

Das verwendete Infrarot-Mikroskop war für die elektrophysiologischen Experimente mit einem System motorisierter Mikromanipulatoren (Luigs & Neumann) ausgestattet. Somit konnten das Mikroskop, die Patch-Pipette und eine Stimulationselektrode unabhängig voneinander in allen drei Freiheitsgraden bewegt werden. Für die Ableitung wurden die Hirnschnitte nach brauchbaren Neuronen durchsucht und der apicale Dendrit identifiziert.

Während der Versuche wurde eine Ableitkammer vom „submerged“-Typ (Alger, 1984) verwendet, die für die Vitalität der Schnitte und für die Ganzzelleableitung vorteilhaft ist (Blanton, Lo Turco et al., 1989). Am Kammerboden diente ein mit dünnen Nylonfäden bespannter Platinrahmen (Grid) zur Fixierung der Hirnschnitte.

Eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Neurone in der Kammer wurde mit Carbogen-gesättigter ACSF-Lösung gewährleistet. Der Zufluss aus einem Vorratsgefäß erfolgte mittels Schwerkraft und wurde auf einen Wert von ca. 3 ml pro Minute eingestellt. Der Abfluss erfolgte ebenfalls mittels Schwerkraft. Bei einem Teil der Patchvorgängen wurde die Elektroporation als zusätzliche Technik angewandt. In diesen Fällen wurde die Carbogen-gesättigte ACSF-Lösung zunächst auf 34 °C erwärmt und dann erst in die Ableitkammer geleitet. Nachdem im Hirnschnitt für die Ableitung brauchbare Neurone (plastisch wirkende Zellen mit einer glatten Membran) ausgewählt worden waren, konnte mit dem Patchvorgang begonnen werden.

2.3.2 Ganzzelleableitung

Mit der „Patch-Clamp“-Technik (Stuart et al., 1993) erfolgte die Ableitung einzelner Lamina V-Pyramidenneurone des somatosensorischen Neokortex der Ratte. Der Vorteil dieser Methode gegenüber der Ableitung mit scharfen Mikroelektroden besteht vor allem in dem sehr hohen Abdichtungswiderstand zwischen der Pipettenspitze und der Zellmembran im Bereich von G Ohm („Giga-seal“). Das daraus resultierende gute Signal/Rausch-Verhältnis ermöglicht die Messung sehr kleiner Ströme beziehungsweise Potentialänderungen. Als Beispiel sei die Ableitung von Einzelkanalströmen an einem Membranfleck („Patch“) genannt (Neher, Sakmann et al., 1978). Weiterhin kann die elektrische Aktivität ganzer Zellen in der so genannten „Whole-Cell“-Konfiguration gemessen werden (Blanton, Lo Turco et al., 1989; Edwards, Konnerth et al., 1989). Da für die Ganzzelleableitung normalerweise niederohmige Pipetten verwendet werden, können der Pipettenlösung zugesetzte Stoffe/Pharmaka in die Zelle diffundieren. Dies ermöglicht zum Beispiel eine intrazelluläre Anreicherung mit den unterschiedlichsten Farbstoffen, deren Ausbreitung im Axon oder Dendriten für mehrere 100 µm visualisiert werden kann. Aber auch eine Blockade von Ionenkanälen oder eine Pufferung von Ca²⁺-Ionen durch Komplexbildner ist möglich. In der vorliegenden Arbeit wurden alle Ableitungen in der „Whole-Cell“-Konfiguration durchgeführt.

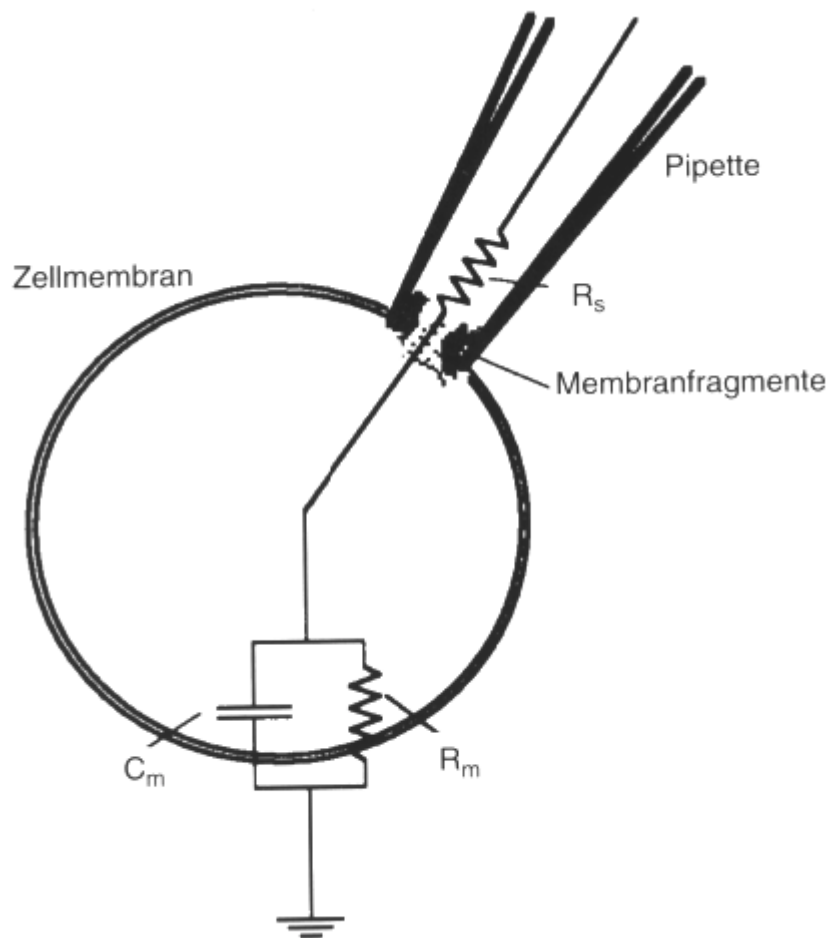


Abbildung 7 Ersatzschaltbild der Ganzzelleableitung

Nach dem Durchbrechen der Membran erhält man die „Whole-Cell“-Konfiguration. Dabei werden Membranfragmente und anderes Zellmaterial in die Nähe der Pipettemündung gesaugt, was dem Serienwiderstand R_s erhöht. R_m Membranwiderstand, C_m Membrankapazität. Verändert nach Numberger und Draguhn, (1996).

2.3.3 Pipetten

Aus Borosilikatglas-Kapillaren mit Innenfilament (Clark, Elektromedical Instruments) wurden die Pipetten mit einem Horizontalziehgerät (DMZ-Universalpuller, Zeitz) angefertigt und hitzepoliert. Der Innendurchmesser der Kapillaren betrug 0,86 mm, der Außendurchmesser 1,5 mm. Durch Veränderung verschiedener Parameter am Ziehgerät konnten der Spitzendurchmesser und die Spitzenform der Pipetten für die jeweilige Anwendung optimal eingestellt werden. Die Intrazellulärlösung hatte folgende

Zusammensetzung (in mM): K⁺-Gluconat 130; KCL 5; HEPES 10; EGTA 0,5; Mg-ATP 2; Glucose 5. Der pH-Wert wurde mit 1 molarer KOH auf 7,2 eingestellt. Die Osmolarität betrug 260–270 mosM (Andreasen & Hablitz, 1994). Für die Ableitungen der Neurone am Soma betragen die Gleichstromwiderstände der gefüllten Pipetten 4–7 M Ohm. Somit ergibt sich ein Spitzendurchmesser von ungefähr 1 µm.

2.3.4 Die Etablierung der Ganzzelleableitung

In der „Whole-Cell“-Konfiguration wurden die Neuronen entweder im Brücken- oder im „Voltage-Clamp“-Modus abgeleitet. Dazu waren die mit Intrazellulärlösung gefüllten Pipetten über einen chlorierten Silberdraht mit dem Verstärker (SEC 1L, Firma npi, Tamm) elektrisch verbunden. Der Stromkreis war über ein Silber/Silberchloridplättchen im Bad angeschlossen. Die abgeleiteten Potentiale (Brückenmodus) beziehungsweise Ströme („Voltage-Clamp“-Modus) wurden mit einem AD-Wandler (ITC 16, HEKA) digitalisiert und mit einem Macintosh-Computer und der entsprechenden Software (Pulse, HEKA) veranschaulicht und aufgezeichnet. Der verwendete Verstärker arbeitet nach dem Prinzip des diskontinuierlichen Einzelelektroden-“Voltage-Clamp“-Verfahrens (dSEVC, “discontinuous single electrode voltage clamp“). Dies bedeutet das der Verstärker zyklisch zwischen Spannungsmessung und Injektion des Kompensationsstroms wechselt. Der Vorteil gegenüber konventionellen “Patch-Clamp“-Verstärkern besteht darin, daß die Spannungsmessung echt ist, das heißt das Membranpotential entspricht real dem eingestellten Haltepotential. Nachdem der Hirnschnitt nach einem für die Ableitung und Patchvorgang geeigneten Neuron durchsucht worden war, wurde die Ableitkammer um ungefähr 1 mm abgesenkt und die Pipettenspitze in die Fokalebene auf einen Punkt in die Bildmitte positioniert. Anschließend wurde die Elektrode zurückgezogen, der Hirnschnitt mit der Ableitkammer wieder angehoben und das abzuleitende Neuron bei maximaler Vergrößerung auf diesen Punkt scharf gestellt. Durch langsames Wiedervorfahren der Ableitelektrode gelangte die Pipettenspitze in die unmittelbare Nähe der Nervenzelle. Um ein Verstopfen der Pipette im Hirnschnitt zu verhindern, wurde Initial ein positiver Druck (ca. 10 cm H₂O) angelegt. Die Druckdosierung erfolgte extern über eine 100 ml-Spritze und einen Druckluftregler. Nachdem im Brücken- und „Current-Clamp“-Modus der Widerstand und die Kapazität der Elektrode abgeglichen worden waren, wurde die Pipette vorsichtig der Zellmembran angenähert, mit langsam stärker werdenden negativen Druck die „Cell-Attached“-Konfiguration hergestellt und anschließend

der Membranbereich unter der Pipettenspitze durchbrochen. Der niedrige Zugangswiderstand zwischen Elektrode und Neuron erlaubte die freie Passage von Ionen. Anschließend wurden der Serienwiderstand und die Serienkapazität abgeglichen und die Strom-Spannungskennlinie aufgezeichnet. Dieser Zustand wurde 1-3 Minuten abgewartet, um dann mit dem Patchvorgang fort zu fahren. Die meisten Ableitungen/Patchvorgänge wurden bei Raumtemperatur (22–24 °C) durchgeführt. Bei Abweichungen wird dies konkret geäußert.

2.3.5 Patchvorgang und Farbstoffinjektion

Die „Whole-Cell“-Konfiguration wurde für 1-3 Minuten belassen, um die Zelle in einen elektrophysiologisch stabileren Zustand zu überführen. Der Farbstoff (Quantum Dots) gelangte nun durch passive Diffusion von der Pipette in den Intrazellularraum. Dieser Zustand wurde für 10 bis 15 Minuten beibehalten. Nach Ablauf von mindestens 10 Minuten wurde die Pipette vorsichtig zurückgezogen. Die zweite Patch-Technik, die zur Anwendung kam, unterschied sich von der Beschriebenen nur darin, dass, nachdem Initial ein positiver Druck (ca. 10 cm H₂O) angelegt worden war, der Farbstoff (Quantum Dots) mit einem positiv gehaltenen Druck von 10-15 cmH₂O aktiv in die Nervenzelle injiziert wurde. Daraufhin wurde auf einer Skizze die exakte Stelle des Patchvorgangs notiert, um später weniger Probleme beim Auffinden der Zelle im histologischen Schnitt zu haben.

2.3.6 Tippfilling

Bei dieser angewandten Technik wurde die Spitze der frisch gezogenen Pipette zunächst mit der unter 2.3.3 beschriebenen Intrazellulärlösung, mit 2-5 µl angefüllt. Daraufhin wurde die Pipette mit der unter 2.3.7 beschriebenen Patchlösung angefüllt und in die Headstage eingespannt. Ziel war es, mit der in der Pipette vorgeschalteten Intrazellulärlösung, ein angefärbtes Pyramidenneuron ohne den obligaten Hof als Signal zu erzielen. Auch hier wurde die „Whole-Cell“-Konfiguration für 1-3 Minuten belassen, um die Zelle in einen elektrophysiologisch stabileren Zustand zu überführen. Der Farbstoff (Quantum Dots) gelangte nun durch passive Diffusion von der Pipette in den Intrazellularraum. Dieser Zustand wurde für 10 bis 15 Minuten beibehalten. Nach Ablauf von mindestens 10 Minuten wurde Pipette vorsichtig zurückgezogen.

2.3.7 Patchlösung

Die Patchlösung wurde für jeden Versuchstag neu angesetzt. Es wurden 2 µl Quantum Dots (Streptavidin, Biotin, oder Q-tracks) in 200 µl Ringerlösung mit Hilfe eines Schüttlers gelöst. Anschließend wurde die Lösung in einer Zentrifuge für 10 min. bei 12000 Umdrehungen/min. zentrifugiert. Beim Patchvorgang wurde jede einzelne Pipette mit einer Diabetikerspritze, die mit einem Filter von einer Porengröße von 0,5 µm bestückt war, mit der Quantum Dots-Lösung angefüllt.

2.4 Andere angewandte Techniken

2.4.1 Elektroporation

Elektroporation wurde bereits oft zur Applikation von DNA, RNA, Proteinen, und Färbesubstanzen in Zellen von Zellkulturen, Hirnschnittkulturen und kürzlich auch in vivo eingesetzt (Teruel, Blanpied et al., 1999; Haas, Sin et al., 2001; Inoue & Krumlauf, 2001; Rae & Levis, 2002; Rathenberg, Nevian et al., 2003). Diese Technik macht sich einen oder mehrere kurze Stromimpulse zu Nutze, um das dielektrische Feld der Zellmembran zusammen brechen zu lassen (Tryfona & Bustard, 2006). Dabei entstehen Poren, (De Bruin & Krassowska, 1999; Krassowska & Filev, 2007) die unselektiv für kleine Moleküle und Ionen (De Bruin & Krassowska, 1999; Golzio, Teissie et al., 2002) als auch für Quantum Dots durchlässig werden, und dabei dem elektrochemischen Gradienten nach, in die Zelle transportiert werden (Teruel & Meyer, 1997; Neumann, Toensing et al., 1998; Ryttsen, Farre et al., 2000). Dies kommt durch einen kurzzeitigen Zusammenbruch des Membranpotentials zu Stande (De Bruin & Krassowska, 1999), der sich erst wieder nach dem Verschluss der Poren erholt (Ryttsen, Farre et al., 2000).

Für die Technik der Elektroporation (Strominjektion) wurde ein Single-Pulsestimulator (Firma: LA Macdonald, Isolated Modell 2100) verwendet. Auch hier wurde die Kammer mit einer Carbogen- gesättigten ACSF Lösung durchspült, nur dass bei dieser Versuchsanordnung zusätzlich diese Lösung mit einer Heizung auf 34 °C erwärmt wurde, um eine Verbesserung der Diffusion zu erzielen. Eine dünne Mikroelektrode, die kurz vor der Spitze in der Pipette endete, war der Überträger der Stromimpulse. Nachdem im Hirnschnitt eine für die Elektroporation geeignete Zelle ausfindig gemacht worden war, wurde die Pipette langsam

und vorsichtig der Zelle genähert. Auch hier wurde auf die Spitze der gefüllten Pipette mit dem Druckluftregler initial ein positiver Druck von 10 cmH₂O ausgeübt, um dem Verstopfen der Pipette vorzubeugen und um den geeigneten Abstand der Pipette zur Zelle leichter wählen zu können. Der Abstand lag im Bereich < 1 µm, und der positive Druck auf der Pipette war an einer leicht konkaven Verformung der Zellwand zu erkennen. Die Einstellung des Pulsstimulators wurde auf 200 Hz. (1 ms Impuls, 4 ms Verzögerung, Pulsdauer: 1 sec.) und eine Amplitude zwischen 5 und 10 V gewählt, da sich mit diesen Werten die besten Ergebnissen erzielen ließen (Nevian & Helmchen, 2007). Bei kleineren Zellen wurden eher Werte um 6 V, bei größeren Zellen eher > 8 V gewählt. Nach Abgabe eines Stromimpulses, der auf der Oberfläche der Zellwand genau durch kleinere Erschütterungen zu erkennen war, wurde die mit Quantum Dots aufgefüllte Pipette für 5 min. auf die Zelle gerichtet stehen gelassen. Der Theorie nach bewirken die Stromimpulse eine Auflockerung der Moleküle in der Zellwand, was wiederum den Eintritt der Quantum Dots in den intrazellulären Raum ermöglicht.

2.5 Histologie

Die Gehirnschnitte wurden nach dem Patchvorgang aus der Ableitkammer entnommen und für eine Nacht in 4 % Formalin-Ringerlösung gekühlt. Am darauf folgenden Tag wurden die Schnitte in 40 %, 60 %, 75 %, 96 % und 100 % Alkohol schrittweise entwässert. Methylsalicylat, ein Klärmittel oder auch Xylol wurde verwendet um die Schnitte zu klären. Die Schnitte wurden darauf mit dem Depex oder Ethellan infiltriert und auf Objektträgern „eingedeckelt“.

3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit ist, Möglichkeiten zu suchen, Pyramidenzellen aus dem Kortex in Lamina V mit neu entwickelten Substanzen wie „Quantum Dots“ darzustellen. Das erste Ziel hierbei ist, das Soma eines Neuronen mit der jeweiligen Substanz zu füllen und in histologischen Schnitten über einen längeren Zeitraum (Monate bis Jahre) sichtbar zu machen. Im weiteren wird in dieser Studie untersucht, inwieweit sich ebenso Axon, apikale und basale Dendriten nachvollziehbar anfärben lassen. Zuletzt wird die Erfassungsmöglichkeit der Konnektivität verschiedener Pyramidenneuronen aus unterschiedlichen Layern nach qualitativen und quantitativen Gesichtspunkten hin untersucht.

3.1 Auswahlkriterien der Pyramidenzellen

Die im Folgenden dargestellten histologischen Befunde wurden an 52 Pyramidenneuronen erhoben. Dabei erfolgte die Auswahl der einzelnen Neurone nach den Kriterien, Größe, Morphologie und räumlicher Lage, um ein besser repräsentierbares und einheitlicheres Ergebnis erzielen zu können. Die Neurone entstammten aus dem Kortex in Lamina V, von einer 14-20 Tage jungen, weiblichen oder männlichen Ratte. Hierzu wurden histologische Schnitte angefertigt, aus denen wiederum mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops und einer Digitalkamera verschiedene Aufnahmen von den Pyramidenneuronen gewonnen werden konnten. Elektrophysiologisch musste das Ruhemembranpotential des Neurons negativer als -60 mv sein. Weiterhin musste das Aktionspotential bei den somatischen Ableitungen eine Amplitude von mehr als 65 mv besitzen. Vergleichbare Kriterien werden auch von anderen Arbeitsgruppen verwendet (Burgard & Hablitz, 1993; Conti, Reale et al., 1994; Gottlieb & Keller, 1997).

3.2 Histologische Auswertung

Eine mikroskopische Betrachtung der histologisch angefertigten Hirnschnitte erfolgte unter zu Hilfenahme eines Fluoreszenz-Mikroskops. Die Pyramidenzellen wurden mehrmals nach morphologischen und klassifizierbaren Kriterien mit optisch unterschiedlichen Vergrößerungen beurteilt. Die Kriterien sind: Qualität des Neurons, Farbintensität, Ausdehnung der Anfärbung bei Dendriten und Spines, Kontrast der Nervenzelle zum Hintergrund und Konstellation zu weiteren Pyramidenzellen im Umfeld. Eine allgemeine, morphologische Klassifikation der Neuronen wird im späteren Teil des Kapitels Ergebnisse präsentiert. Die endgültigen Aufnahmen der Bildausschnitte wurden mit einer mikroskopisch gekoppelten Digitalkamera (Sony, SFX 8S) gewonnen.

3.3 Überblick der Färbesubstanzen

Quantum Dots Streptavidin 655 nm Konjugate

Quantum Dots Biotin 655 nm Konjugate

Quantum Tracks 705 nm Konjugate

Neurobiotin

Streptavidin-Arg9

Sulforhodamine

3.4 Morphologische Klassifikation der Pyramidenzellen

Neokortikale Pyramidalzellen wurden bereits vielfältig aufgrund ihrer morphologischen, elektropysiologischen und immunhistochemischen Kriterien klassifiziert (Cobas, Welker et al., 1987; Bayraktar, Welker et al., 2000; Peters, Moss et al., 2000). Die morphologischen Zelltypen können aufgrund der Zellkörperform (Cobas, Welker et al., 1987) des Dendritenbaumes (Feldman & Peters, 1978) oder ihres axonalen Verzweigungsmusters klassifiziert werden (Jin, et al., 2001). Die hier vorgelegten Ergebnisse basieren auf einer Betrachtung des Zelltyps, der Zellgröße, und der Zahl der abgehenden Dendriten. Weiterhin wurden als nichtnumerische Eigenschaften der Neurone die Zellkörperform und Qualität des Neurons, Farbintensität, Ausdehnung der Anfärbung bei Dendriten und Spines, Kontrast der Nervenzelle zum Hintergrund und Konstellation zu weiteren Pyramidenzellen im Umfeld, beurteilt. Für die Einteilung in Subpopulationen bzw. Typen von Interneuronen/Pyramidenzellen wurde hier eine Einteilung nach (Cobas, Welker et al., 1987; Bayraktar, Welker et al., 2000) herangezogen, die in den folgenden schematischen Abbildungen grafisch verdeutlicht werden.

Bipolare Neurone (single or bitufted) können in mehrere Subtypen unterteilt werden. Die Somata aller Subtypen lassen zwei gegenüberliegende Pole erkennen, die Ausgangspunkt für die Verzweigung von Dendriten sind. Folgende Zelltypen können aufgrund der dendritischen Morphologie unterschieden werden.

1.)

- a) Einfach bipolar: Dem ovoiden Soma entspringt jeweils ein langer Dendrit und diese verzweigen sich entweder nicht oder erst in weiterer Entfernung vom Zellkörper in Dendriten höherer Ordnung.



- b) **Einzeln verzweigt:** Ein Dendrit entspringt einem Pol des Somas, während ein weiterer oder auch mehrere dem anderen Pol entspringen und sich in der Nähe Somas weiter verzweigen.



Doppelt verzweigt: Zwei oder mehrere Dendriten entspringen den beiden Polen und verzweigen sich in der Nähe des Somas.



Modifizierte bipolare Zellen entsprechen den Kriterien von a) bis c), weisen aber zusätzlich seitlich einen kleinen Dendriten auf.



2.) **Multipolare Zellen:** Das Soma ist eher rundlich und mehrere Dendriten haben unterschiedliche Ursprungsstellen am Soma.



3.) **Tropfenförmige Zellen:** Ein dicker Dendrit entspringt dem Pol des Somas, während andere, kleinere Dendriten der gegenüberliegenden Seite entspringen („bulb“ und „radish“ nach (Cobas, Welker et al., 1987).



4.) Trianguläre Zellen: Ein Hauptdendrit verzweigt sich von einem Pol des annähernd dreieckigen Somas, während zwei weitere den zwei gegenüberliegenden Polen entspringen.



5.) Nicht klassifizierbare Zellen: Seltene, aufgrund des Somas und der Dendriten nicht klassifizierbare Zellen.



3.5 Abbildungen

Abbildung Nr. 8 zeigt ein isoliert dargestelltes Pyramidenneuron vom bipolaren Typ, in Lamina V aus dem Kortex einer jungen Ratte. Das Signal der Färbesubstanz ist kräftig und leuchtend. Trotz des ebenso relativ starken Signals perineuronal, ist die Form und Kontur des Neurons gut erkennbar. Der Ausschnitt der Blende ist relativ klein gewählt, um eine zu starke Ausleuchtung des umliegenden Bereichs und damit eine zu starke Herabsetzung des Signals zu verhindern. Das im Zentrum liegende Soma zeigt die typische Form eines Neurons mit angedeutetem basalem Hof, apikalen und basalen Dendriten. Beide Dendriten (apikal und basal) weisen zur Peripherie hin eine deutliche Verjüngung auf. Auch das Signal wird geringfügig schwächer. Bei dieser Aufnahme wurde die Patchclamptechnik angewendet, wobei ein leicht positiver Druck (12 cm H₂O) auf der Pipette initial gewählt wurde und nach dem „Attached Modus“ die QDs durch passive Diffusion in das Zellsoma appliziert wurden.

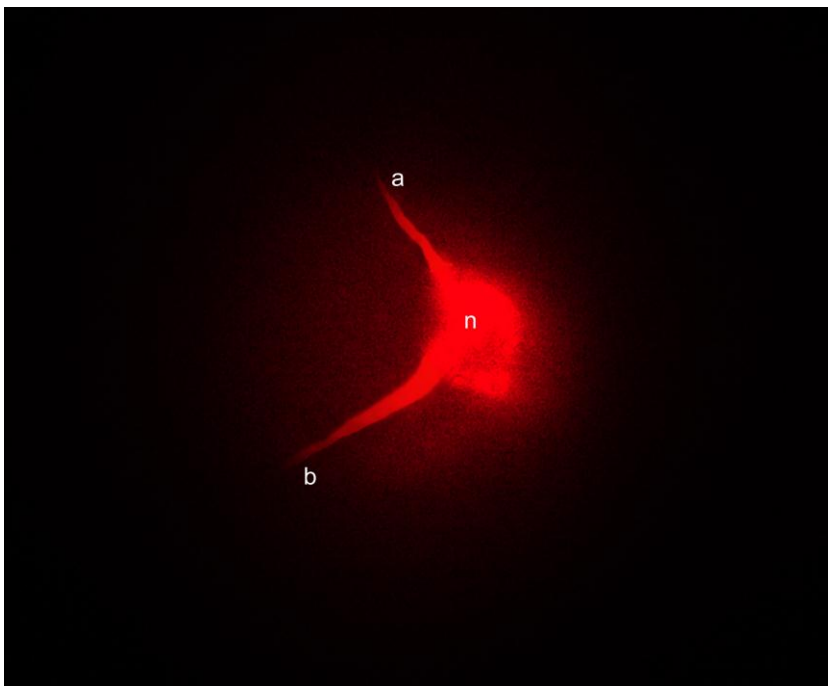


Abbildung 8 Pyramidenneuron bipolar

Verwendete Substanz: QDs, Streptavidin 655 nm, 18.12.2003

n: Pyramidenneuron

a: apikaler Dendrit

b: basaler Dendrit

Abbildung Nr. 9 zeigt drei verschiedene Pyramidenneurone in Lamina V aus dem Kortex einer jungen Ratte, wovon zwei innerhalb der Fokusebene zum Liegen kommen und eines außerhalb angeordnet ist. Trotz der verschobenen Fokusebene ist das Soma des Pyramidenneurons z gut zu erkennen, was der starken Leuchtkraft der QDs zu verdanken ist. Zentral ist hier eine begonnene Zellkernlyse zu beobachten. Das Pyramidenneuron x hat eine typische trapezartige Form mit apikal verlaufendem Dendriten und gehört zum Typ der monopolaren Zellen. Das Pyramidenneuron n gehört der Einteilung nach zum Typ der bipolaren Zellen. Deutlich ist jeweils ein Dendrit nach apikal und nach basal verfolgbar, die Zellgrenze ist nach außen hin relativ scharf begrenzt und das Soma macht einen homogenen Eindruck. Bei dieser Aufnahme wurde die Patchclamptechnik verwendet, wobei ein leicht positiver Druck (10 cmH₂O) initial gewählt wurde und nach dem „Attached Modus“ die QDs mit einem stärkeren Druck (ca. 15-20 cm H₂O) durch die Pipette in das Soma appliziert wurden.

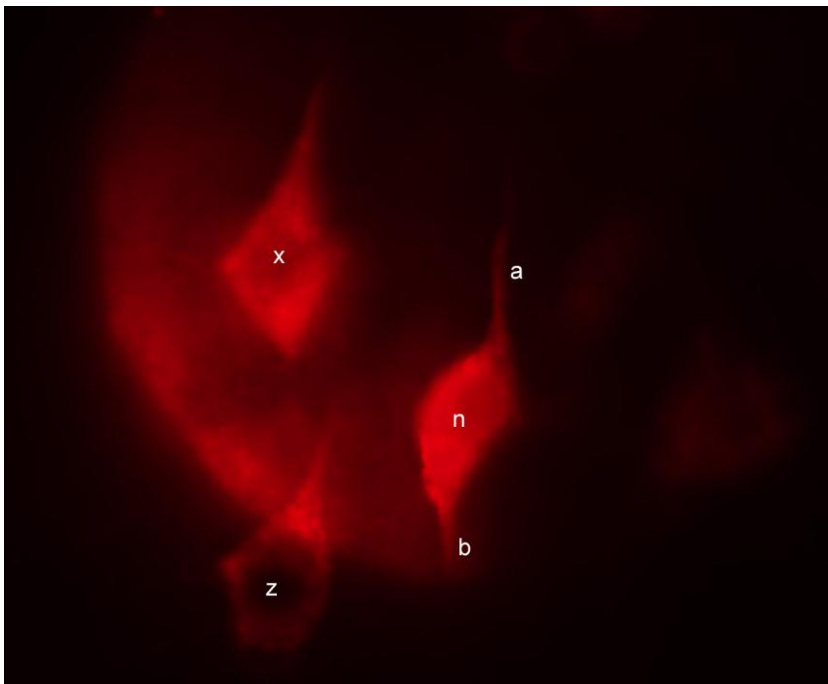


Abbildung 9 Pyramidenneurone monopolar und bipolar

Verwendete Substanz: QDs, Biotin 655 nm, 28.01.2004

x: trapezförmiges Neuron

n: Pyramidenneuron mit: **a:** apikaler Dendrit, **b:** basaler Dendrit

z: Zellkernlyse

Abbildung Nr. 10 zeigt ein von Glia umgebenes, sternförmiges Neuron vom Typ der multipolaren Zelle in Lamina V aus dem Kortex einer jungen Ratte. Der Ausschnitt der Blende ist relativ groß gewählt, um das Umfeld der in Zentrum liegenden Nervenzelle zu veranschaulichen. In einiger Entfernung sind noch weitere Zellen auszumachen. Das Signal der angefärbten Zelle ist kräftig, bildet einen deutlichen Kontrast zur Zellperipherie und ist auch bei einem der Dendriten länger nachverfolgbar. Die Zelle weist zwei apikale und drei basale Dendriten auf, wovon die zwei apikalen aber nur angedeutet sind. Die basalen Dendriten b1, b2, b3 sind deutlich erkennbar, wovon der Dendrit b1 über min. 40 μm zu verfolgen ist. Bei dieser Aufnahme wurde die Patchclamptechnik verwendet, wobei ein leicht positiver Druck (10 cm H_2O) initial gewählt wurde und nach dem „Attached Modus“ die QDs mit einem stärkeren Druck (ca. 15-20 cm H_2O) durch die Pipette in das Soma appliziert wurden.

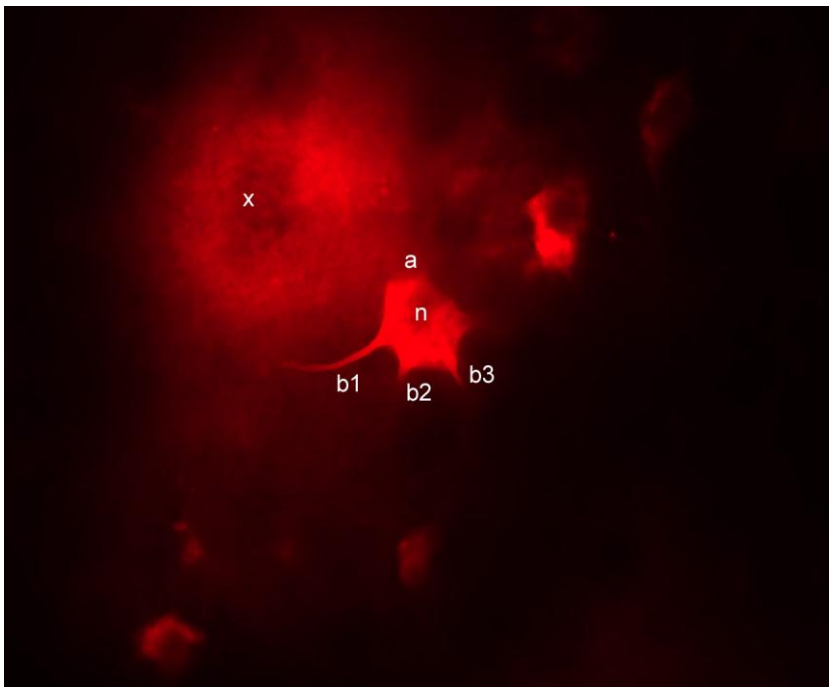


Abbildung 10 Multipolares Pyramidenneuron

Verwendete Substanz: QDs, Biotin 655 nm, 28.01.2004

n: Pyramidenneuron

a: apikale Dendriten

b: basale Dendriten (b1-b3)

x: Überreste der lysierten Zelle

Abbildung Nr. 11 zeigt ein isoliert, dargestelltes Pyramidenneuron vom triangulären Typ in Lamina V aus dem Kortex einer jungen Ratte. Klar ersichtlich sind bei dieser Aufnahme zwei basale Dendriten, die der Länge des Neurons entsprechen bzw. sich scharf begrenzt erst nach über 40 μm in der Peripherie verlieren. Der apikale Hauptdendrit in diesem Fall ist nur zu erahnen und wurde beim Patchvorgang nicht angefärbt. Das Signal der Färbesubstanz ist kräftig und leuchtend. Trotz des ebenso relativ starken Signals perineuronal ist die Form und Kontur des Somas gut erkennbar. Der Ausschnitt der Blende ist relativ klein gewählt, um eine zu starke Ausleuchtung des umliegenden Bereichs und damit eine zu starke Herabsetzung des Signals zu verhindern. Beide Dendriten weisen zur Peripherie hin eine deutliche Verjüngung auf. Auch das Signal wird geringfügig schwächer. Bei dieser Aufnahme wurde die Patchclamptechnik verwendet, wobei ein leicht positiver Druck (bis 15 mm H_2O) initial gewählt wurde und nach dem „Attached Modus“ die QDs mit einem stärkeren Druck (ca. 15-20 cm H_2O) durch die Pipette in das Soma appliziert wurden.

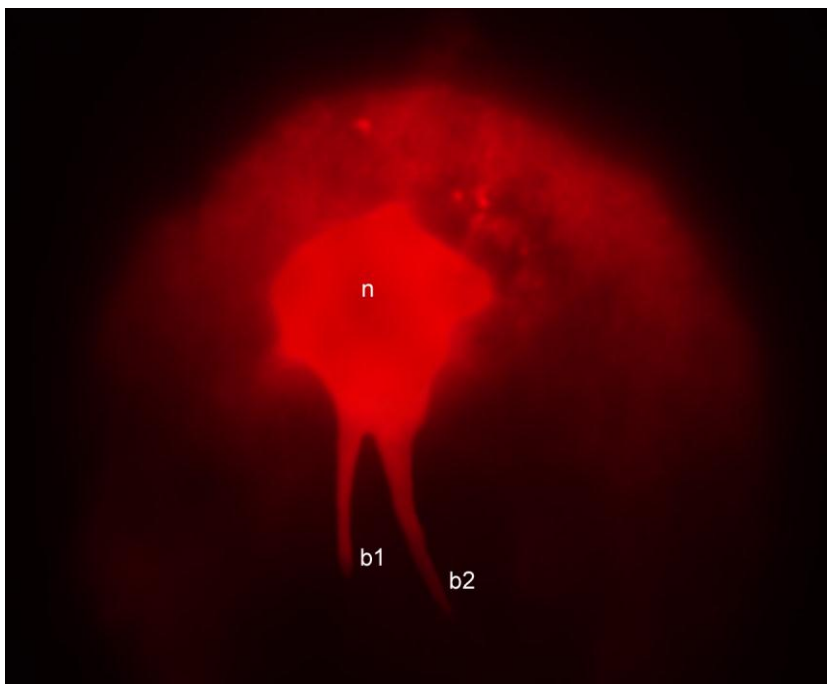


Abbildung 11 Pyramidenneuron triangulär

Verwendete Substanz: QDs, Biotin 655 nm, 28.01.2004

n: Pyramidenneuron

b: basale Dendriten (b1-b2)

Abbildung Nr.12 zeigt ein isoliert, zentral angeordnetes Pyramidenneuron vom monopolaren Typ in Lamina V aus dem Kortex einer jungen Ratte. Das Signal der Färbesubstanz ist kräftig und leuchtend, beinah zu leuchtend, so dass die normale und plastische Oberflächengestalt des Neurons verloren geht und sich hier nur eine sehr homogene Zelloberfläche zeigt. Das Soma weist die typische Pyramidenform auf. Basal ist hier der kräftig verlaufende Dendrit zu verfolgen, der sich zur Peripherie hin verjüngt und das Signal deutlich herabsetzt. Besonders interessant an dieser Aufnahme ist aber, die sichtbare Stelle, an der die Spuren der mit Q-tracks angefüllten Patchpipette, durch das Ein- und Ausbringen der Pipette in das Gewebe, eine horizontale Linie auf dem rechten Bildrand, auszumachen sind. Bei dieser Aufnahme wurde die Patchclamptechnik angewendet, wobei ein leicht positiver Druck (10 cm H₂O) auf der Pipette initial gewählt wurde und nach dem „Attached-Modus“ die QDs durch passive Diffusion in das Zellsoma appliziert wurden.

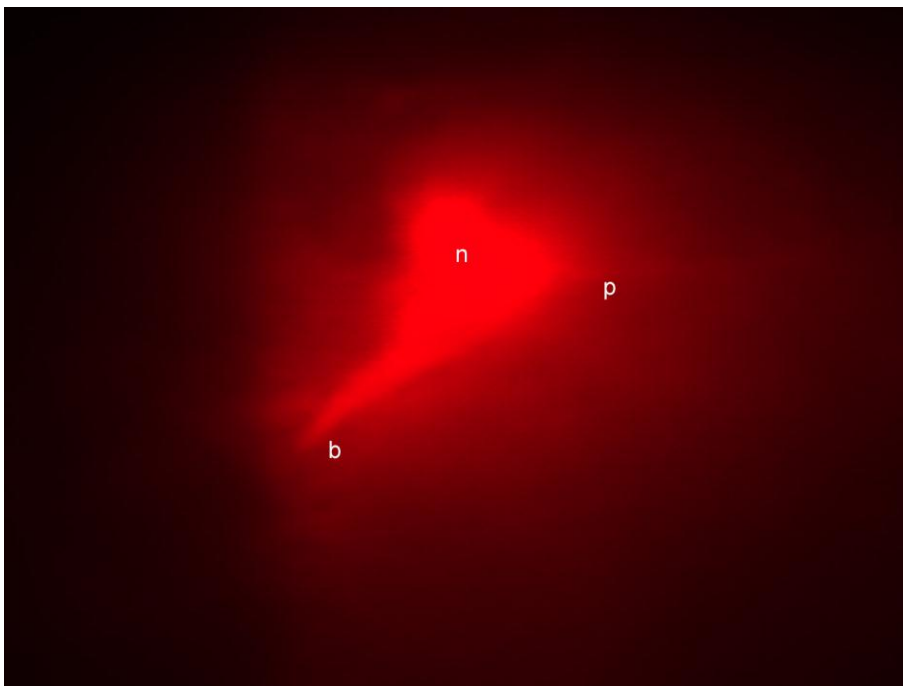


Abbildung 12 Pyramidenneuron monopolar

Verwendete Substanz: Q-tracks 705 nm, 30.01.2004

n: Pyramidenneuron

b: basaler Dendrit

p: Pipettengang

Abbildung Nr. 13 zeigt ein isoliert, zentral angeordnetes Pyramidenneuron vom bipolaren Typ in Lamina V aus dem Kortex einer jungen Ratte. Das Signal der Färbesubstanz ist kräftig und leuchtend. Trotz des ebenso relativ starken Signals perineuronal, ist die Form und Kontur des Neurons gut erkennbar. Der Hof ist auf der linken Seite stärker ausgeprägt als auf der rechten Seite. Das Soma der Zelle wirkt plastischer und nicht so zweidimensional wie bei Aufnahme Nr. 12. Das im Zentrum liegende Soma zeigt die typische Form eines Neurons mit angedeutetem basalen Hof, apikalen und basalen Dendriten, die der Länge des Neurons entsprechen. Beide Dendriten (apikal und basal) weisen zur Peripherie hin eine deutliche Verjüngung auf und auch das Signal wird geringfügig schwächer. Bei dieser entstandenen Aufnahme wurde die Patchclamptechnik angewendet, wobei ein leicht positiver Druck (12 cm H₂O) auf der Pipette initial gewählt wurde und nach dem „Attached-Modus“ die QDs durch passive Diffusion in das Zellsoma appliziert wurden.

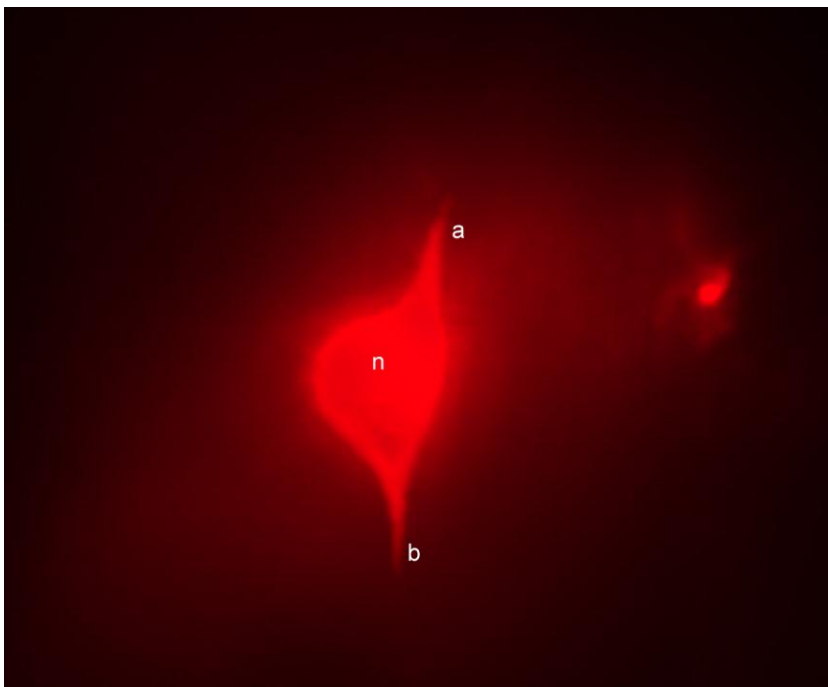


Abbildung 13 Pyramidenneuron bipolar

Verwendete Substanz: QDs, Streptavidin 655 nm, 02.02.2004

n: Pyramidenneuron

a: apikaler Dendrit

b: basaler Dendrit

Abbildung Nr. 14 zeigt ein isoliert, tropfenförmiges Pyramidenneuron vom monopolaren Typ in Lamina V aus dem Kortex einer jungen Ratte. Bei diesem Patchvorgang gelang es offensichtlich möglichst wenig QDs im peripheren Nervengewebe zu verteilen, so dass sich das Signal nahezu ausschließlich auf das Neuron begrenzt (siehe Tippfilling Material und Methoden). Nach apikal zeigt sich ein Hof, die Oberfläche des Somas hat eine plastische inhomogene Oberfläche und es lässt sich im oberen Bereich die Zellwand deutlich als Barriere zum Extrazellulärraum abgrenzen. Basal ist hier der kräftig verlaufende Dendrit zu verfolgen, der sich zur Peripherie hin verjüngt und das Signal deutlich herabsetzt. Bei dieser Aufnahme wurde die Patchclamptechnik und Elektroporation angewendet. Dabei wurde eine Amplitude von 15 V, 10 Hz und eine Frequenz von 0,5 sec. gewählt. Auch hier wurde ein leicht positiver Druck auf der Pipette von $> 10 \text{ cm H}_2\text{O}$ initial angelegt, um die QDs mittels Elektroporation, nach erfolgtem „Attached-Modus“, in die Zelle applizieren zu können.

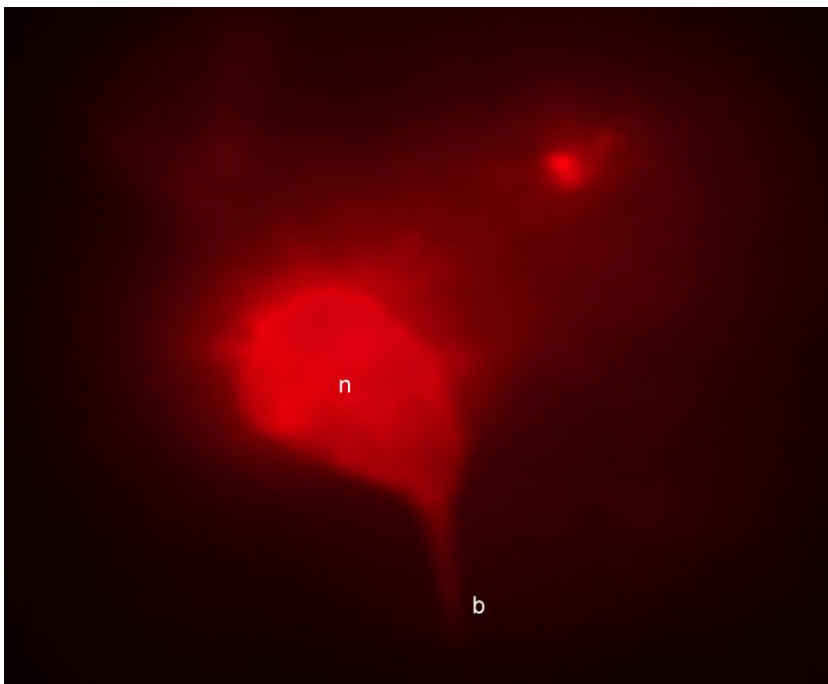


Abbildung 14 Pyramidenneuron monopolar

Verwendete Substanz: QDs, Streptavidin 655 nm, 22.03.2004

n: Pyramidenneuron

b: basaler Dendrit

Abbildung Nr. 15 zeigt ein isoliert dargestelltes Pyramidenneuron vom bipolaren Zelltyp in Lamina V aus dem Kortex einer jungen Ratte. Nach apikal ist deutlich ein Hof zu erkennen, der durch das Einbringen und Ausbringen der Pipette in das neuronale Gewebe zu Stande kam. Auch die im Hof befindlichen Agglomerate, bestehend aus QDs, sind auf das Patchen zurückzuführen. Apikal sind zwei Dendriten sichtbar, die sich aber nur kurz in die Peripherie erstrecken. Der basale Dendrit ließ sich aber in diesem Patchvorgang besonders gut darstellen, so dass er über 50 µm weit, sich in die Peripherie verjüngend verliert. Im Zentrum des Somas fällt ein ovaler, dunkler Fleck auf, der auf eine momentan ablaufende Zellkernlyse hinweist. Bei dieser Aufnahme wurde die Patchclamptechnik und Elektroporation angewendet. Auch hier wurde ein leicht positiver Druck auf der Pipette von > 10 cm H₂O initial angelegt, um die QDs mittels Elektroporation, nach erfolgtem „Attached-Modus“, in die Zelle applizieren zu können.

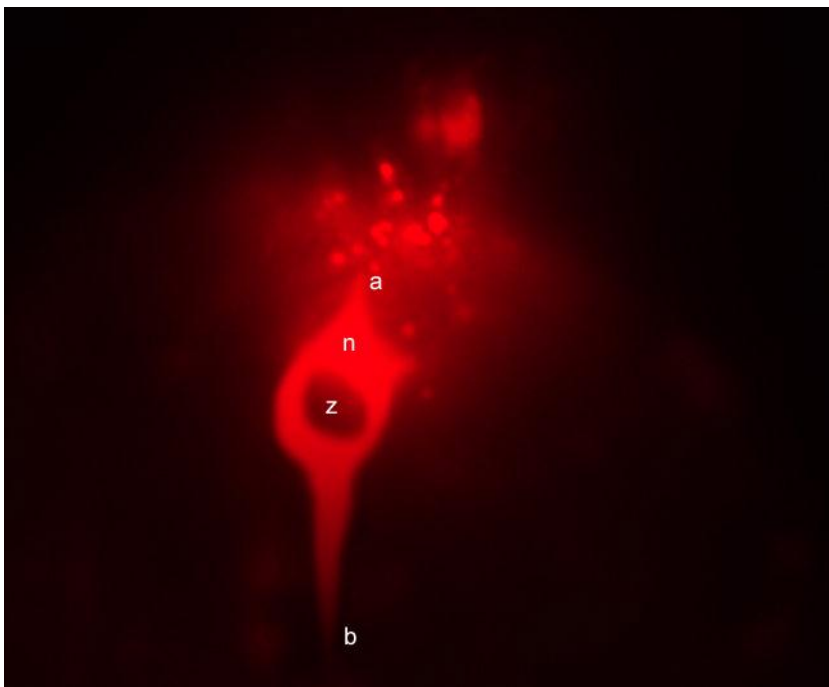


Abbildung 15 Pyramidenneuron bipolar

Verwendete Substanz: QDs, Biotin 655 nm, 11.02.2004

n: Pyramidenneuron

a: apikale Dendriten

b: basaler Dendrit

z: Zellkernlyse

Abbildung Nr. 16 zeigt ein isoliert gelegenes Pyramidenneuron vom monopolaren Zelltyp in Lamina V aus dem Kortex einer jungen Ratte. Trotz des ebenso relativ starken Signals perineuronal, ist die Form und Kontur des Neurons gut erkennbar und macht einen plastischen, ja sogar fast drei-dimensionalen Eindruck. Der Ausschnitt der Blende ist relativ klein gewählt, um eine zu starke Ausleuchtung des umliegenden Bereichs und damit eine zu große Herabsetzung des Signals innerhalb des Neurons, zu verhindern. Das Soma hat eine tropfenartige Form und grenzt sich dem Verlauf nach apikal, klar von seiner Umgebung ab. Im weiteren Verlauf verjüngt sich das Soma zu einem kräftigen Dendriten, der sich über 10 μm in die Peripherie fortsetzt und verliert. Bei dieser Aufnahme wurde die Patchclamptechnik und Elektroporation angewendet. Auch hier wurde ein leicht positiver Druck auf der Pipette von $> 10 \text{ cm H}_2\text{O}$ initial angelegt, um die QDs mittels Elektroporation, nach erfolgtem „Attached-Modus“, in die Zelle applizieren zu können.

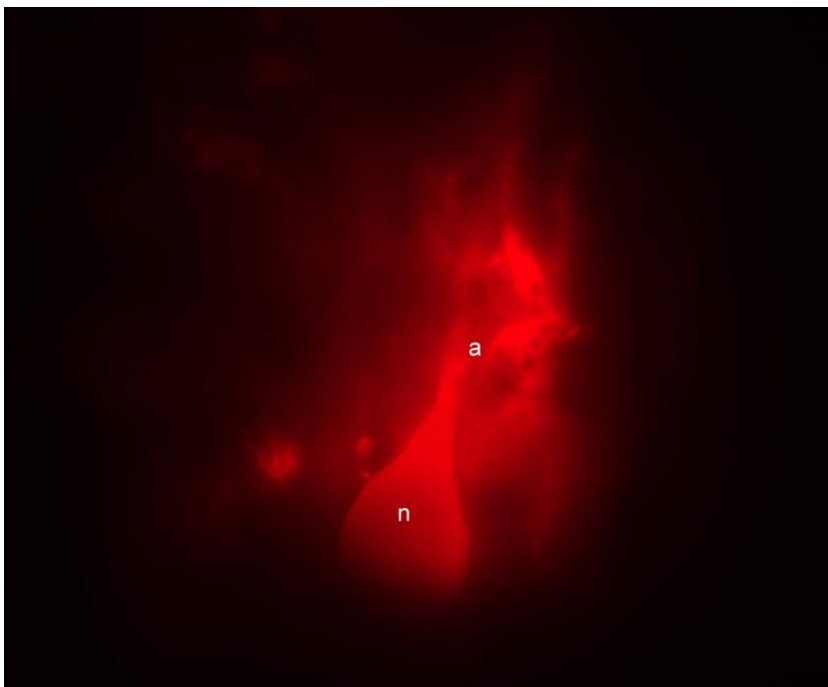


Abbildung 16 Pyramidenneuron monopolar

Verwendete Substanz: QDs, Biotin 655 nm, 11.02.2004

n: Pyramidenneuron

a: apikaler Dendrit

Abbildung Nr. 17 zeigt ein zentral gelegenes Pyramidenneuron vom monopolaren Zelltyp in Lamina V aus dem Kortex einer jungen Ratte. Bei dieser Aufnahme ist die Blende nicht wie bei den vorigen Aufnahmen eng gestellt, sodass hier das perineuronale Gewebe in einem sehr starken Signal leuchtet und somit Hofbildung zu Stande kommt. Linksseitig ist hier der basal abgehende Dendrit klar nachvollziehbar, bis er, zur Peripherie hin, ausläuft. Bei dieser entstandenen Aufnahme wurde die Patchclamptechnik mit Unterstützung der Elektroporation angewendet. Dabei wurde eine Amplitude von 10 V, 200 Hz (5 ms) gewählt. Auch hier wurde ein leicht positiver Druck auf der Pipette von $> 10 \text{ cm H}_2\text{O}$ initial angelegt, um die QDs mittels Elektroporation, nach erfolgtem „Attached-Modus“, in die Zelle applizieren zu können.

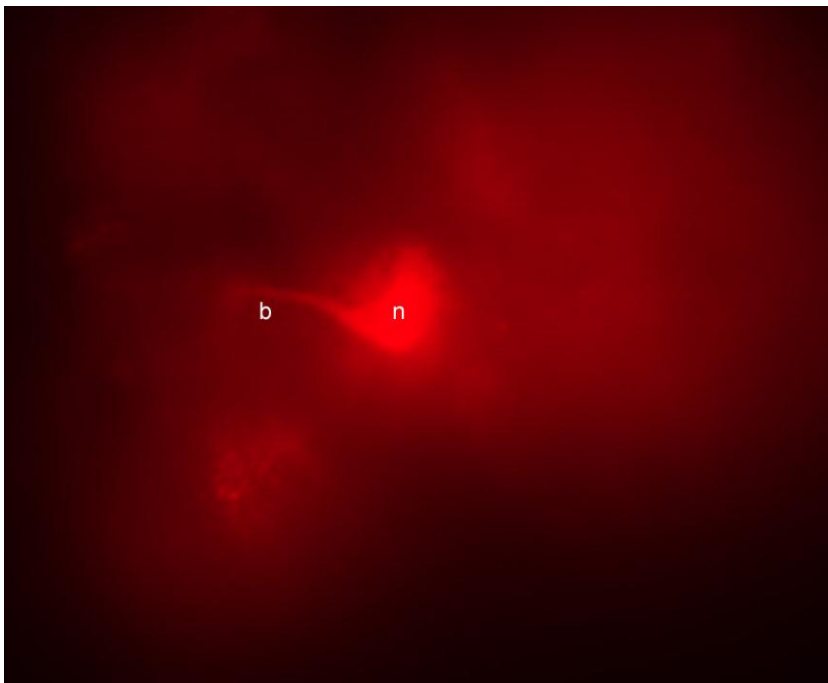


Abbildung 17 Pyramidenneuron monopolar

Verwendete Substanz: QDs, Streptavidin 655 nm, 12.02.2004

n: Pyramidenneuron

b: basaler Dendrit

3.5.1 Klassifikation der Pyramidenneurone nach Qualität

Mit dieser Graphik soll eine Aussage darüber gemacht werden, welchen Grad an Qualität die erzielten Abbildungen der Pyramidenneurone aufweisen. In der Graphik sind auf der Ordinate die Anzahl der Neuronen gegen den Klassifikationsgrad 1-3 auf der Abszisse aufgetragen. Das Kriterium der Qualität wird dabei in drei Klassen eingeteilt, wobei der Qualitätsgrad mit aufsteigender Anzahl der Pyramidenneuronen bei Abnahme der Dendritenanzahl, fällt. Somit wird ersichtlich, dass in den gesamten Aufnahmen sechs Neurone mit einem Dendrit, vier Neurone mit zwei Dendriten und zwei Neurone mit drei oder mehr Dendriten vorzuweisen sind.

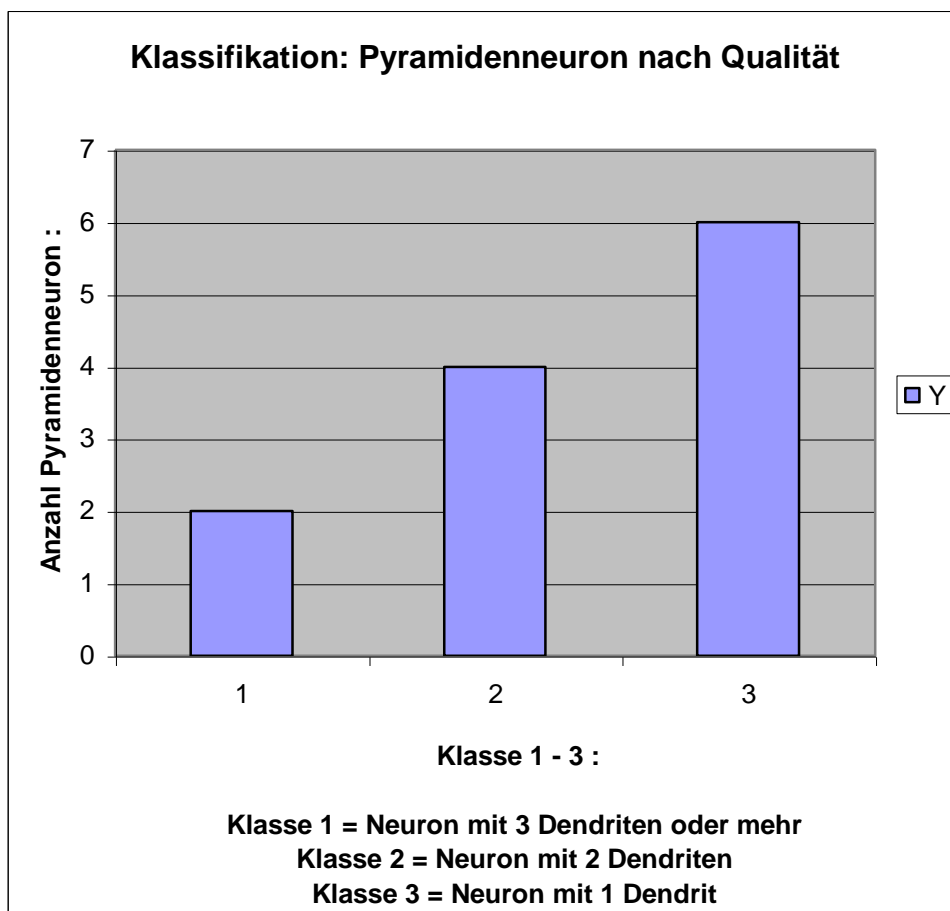


Abbildung 18 Klassifikation der Pyramidenneurone nach Qualität

3.5.2 Vergleich der QD-Klassen

Diese Graphik soll verdeutlichen, welche der drei unterschiedlichen QD Substanzen die besten Ergebnisse in Bezug auf Patchbarkeit, Darstellbarkeit und Detektierbarkeit, erzielen konnten. Dabei wurde als Basis zur Beurteilung der unterschiedlichen Substanzen, die gleiche Anzahl von gepatchten Zellen verwendet und jedes Mal nach dem selben Prozedere vorgegangen. Dabei ist hier die Erfolgsrate in Prozent der darstellbaren Pyramidenneuronen auf der Ordinate gegen die QD-Klasse auf der Abszisse aufgetragen. Somit wird ersichtlich, dass die QD Biotin von 100 gepatchten Pyramidenneuronen 37,5, die Q-dots Streptavidin von 100 gepatchten Neuronen 27 und die QD-Q-tracks von 100 gepatchten Neuronen 30 zu einem erfolgreichem Ergebnis führten.

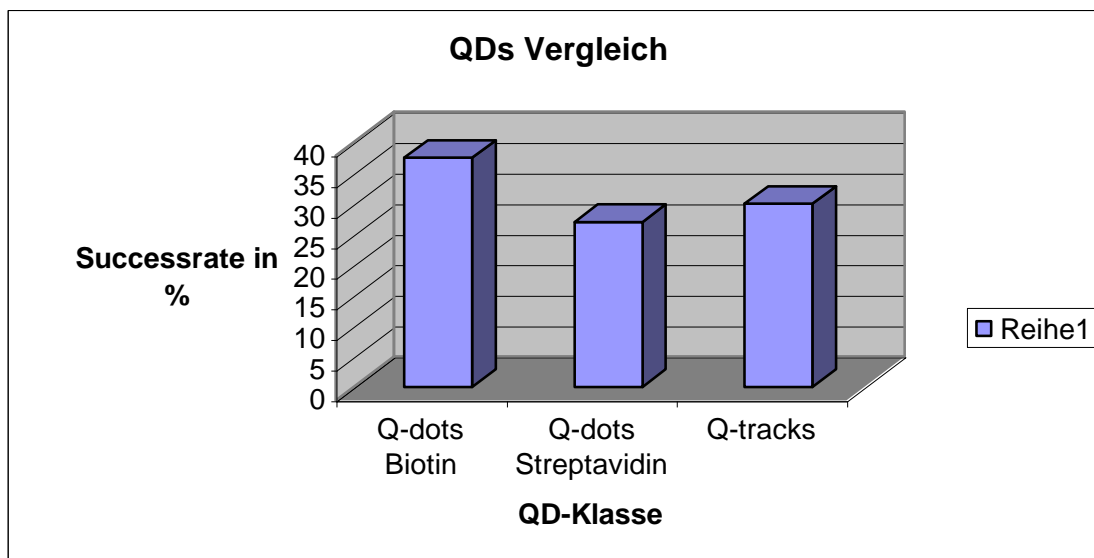


Abbildung 19 Vergleich der QD-Klassen

3.5.3 Methodenvergleich

Mit dieser Graphik soll eine Aussage darüber gemacht werden, welche der beiden Methoden - Patchtechnik oder Elektroporation - zu einer höheren Erfolgsrate führt.

Dabei ist hier die Erfolgsrate in Prozent auf der Ordinate, gegen die beiden zu vergleichenden Methoden, auf der Abszisse aufgetragen. Daraus ist zu entnehmen, dass bei 100 Patchversuchen > 37% und bei 100 Elektroporationversuchen > 34% ein verwertbares Ergebnis entstand.

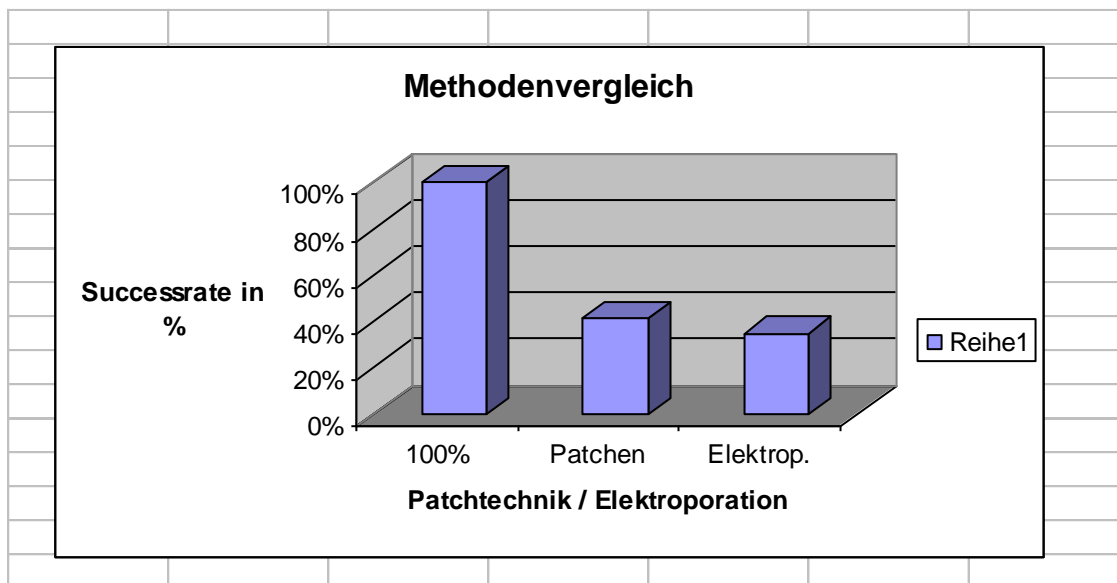


Abbildung 20 Methodenvergleich

4 Diskussion

Geeignete Färbetechniken von Neuronen waren und sind immer noch von entscheidender Bedeutung, um neuroanatomische Fragen mit Hilfe von histologischen Methoden, kombiniert mit modernen und aktivitätsabhängigen Färbesubstanzen, aufzuklären. So erzielte z.B. Camillo Golgi Ende des 19. Jahrhunderts den erfolgreichsten Einblick in die Organisation des Nervensystems, der hauptsächlich auf der Entwicklung der Silberchromatin Färbetechnik basierte (Nevian & Helmchen, 2007). In den 80ern stieg das wissenschaftliche Interesse für eine ausgereifte Technik zur Darstellung von Zellen, Nervenzellen und ganzen Zellverbänden an. Konventionelle Farbstoffe wie Luzifer Yellow und Lissamine Rhodamine B. waren nicht mehr in der Lage, hellere Signale und eine höhere Photostabilität in den Präparaten zu sichern. Auch die organischen Farbstoffe der 90iger, wie Biocytin, Neurobiotin, endogene Proteine wie GFP (Green Fluorescent Protein), Alexa Fluor 568/488 und Streptavidin Conjugate haben zwar generell ein breites Absorptionsspektrum und ein hohes Emissionsprofil, doch waren ihre Fähigkeiten im Hinblick auf Langzeitdarstellung von Molekülen und Paralleldarstellung multipler Signale beschränkt, die wiederum komplexe Instrumente und Datenverarbeitung notwendig machten. Bis es nach der Entdeckung der Quantum Dots (QDs), Ende der 90er Dr. Pauli Alivisatos und Dr. Mounji Bawendi gelang, QDs in einen wasserlöslichen Zustand zu versetzen. Bald erzielten weitere Wissenschaftler über eine vierjährige Entwicklungsphase, bei den Eigenschaften der QDs wie Qualität, Reproduktivität, Wellenlängenspektrum, Signalintensität und Photostabilität eine Verbesserung (Chan & Nie, 1998; Gao, Chan et al., 2002; Goldman, Mattoussi et al., 2005). In zeitgleichen Veröffentlichungen wurde die erstmalige biologische Verwendung von QDs beschrieben und es kündigte sich mit den einzigartigen Eigenschaften der QDs eine viel versprechende Bewältigung der bisherigen Probleme und Fragestellungen an. Verglichen mit molekularen oder organischen Färbesubstanzen haben QDs zwei wesentliche Vorteile: Die Fähigkeit, anhand der variierbaren Kerngröße der QDs gleichzeitig deren farbliche Emission zu bestimmen und das breite Exzitationsspektrum macht die Darstellung verschiedener QD-Gruppen mit Hilfe von nur einer Wellenlänge möglich (Medintz, Uyeda et al., 2005; Michalet, Pinaud et al., 2005).

4.1 Ziel, Intention und Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden alt bekannte Methoden, wie Mikroinjektion unter zu Hilfenahme von Patchclamptechnik (Pappas, Wickramanyake et al., 2007), Elektroporation (Dorvee, Derfus et al., 2004) als auch Tiffpfilling mit einer neu entwickelten Substanz, den QDs, mit ihren positiv optischen, physiologischen und chemischen Eigenschaften, kombiniert. So zielte diese Arbeit maßgeblich darauf ab, die vielversprechenden QDs mit einer optimierten Technik, die hier entwickelt werden sollte, in Pyramidenneuronen zu injizieren, um auf dem Sektor der Nervenzell Darstellung neue Wege zu gehen und möglicherweise sogar einen Durchbruch für die medizinische Diagnostik zu erlangen. Die Quantum Dot - Corporation hat mittlerweile ein ganzes Portfolio (Streptavidin, Biotin, Streptavidin-Arg-QDs und Q-tracks) an verschiedenen Signalstoffträgern im Angebot, worauf anhand von Versuchen die am besten verwendbare Färbesubstanz ermittelt werden sollte.

Zunächst sollte am Setup versucht werden, geeignete Pyramidenneurone optisch zu isolieren, in Brücken- und „Current-Clamp“-Modus, den Widerstand und die Kapazität der Elektrode abzugleichen, die „Cell-Attached“-Konfiguration herzustellen und anschließend den Membranbereich unter der Pipettenspitze zu durchbrechen. Nun sollte anhand des Patchvorgangs versucht werden, einzelne Neurone mit den QDs zu füllen. Verließ dies erfolgreich, sollte versucht werden, einzelne Axone oder basale und apikale Dendriten eines Neurons zu patchen und mit QDs zu füllen, um noch feinere Strukturen sichtbar machen zu können. Diese Prozedere sollte bis hin zur eventuellen Darstellung von Spines gesteigert werden, mit dem Ziel, neuartige Strukturen zu entdecken. Als letzter Schritt und Zielsetzung sollte versucht werden, die Patchtechnik soweit weiter zu entwickeln, dass es möglich würde, die QDs via Axone und Dendriten über mehrere Neurone ja sogar über einige Laminae des Kortex hinweg, anzureichern und sichtbar zu machen.

Anhand der Mikroinjektion mit Hilfe von Patchclamptechnik und der Elektroporation konnten in dieser Arbeit insgesamt zehn verschiedene Abbildungen von Neuronen aus der Lamina V des Kortex von 14-21 Tage alten Ratten gewonnen werden. Bei acht der zehn Bilder handelt es sich um isoliert dargestellte Neurone, bei zwei Bildern sind bis zu drei verschiedene Pyramidenneurone abgebildet. Die Gestalt der Pyramidenneurone von Lamina V reicht von einer trapezförmigen bis hin zur typisch dreieckigen Form. Die Somata der Neurone weisen in den meisten Fällen ein kräftiges und kontrastiertes Bild auf, wobei manche Somata durch

einen Hof bedingt, lokal an Plastizität und Farbintensität einbüßen. Der überwiegende Anteil von den apikalen und basalen Dendriten, lässt sich über einige zehn μm verfolgen, bis eine Abschwächung in der Signalintensität die Verjüngung des Dendriten ankündigt und dieser abrupt endet.

Sakmann und Kollegen (Oberlaender et al., 2011) gelang es kürzlich in dem bekannten sechschichtigen Kortex neun unterschiedliche excitatorische und dendritische Zelltypen zu definieren. Anhand unterschiedlicher Verhaltensmuster und Zellaktivität konnten sie eine 3-D-Rekonstruktion der kortikalen Interneurone und Pyramidenneurone in Layer 2-6 hinsichtlich Somalage, Soma,- und Dendritenmorphologie erstellen. Weitere Untersuchungen erlaubten eine ungefähre Einschätzung einer zelltypischen und ortsabhängigen strukturellen Überlappung einzelner Axone und Dendriten innerhalb der Layer 2-6 in Form von synaptischer Vernetzung. Bei der Frage in welchem Maß die zellulären Eigenschaften der Pyramidenneurone von der kortikalen Lage abhängig sind, scheinen die Eigenschaften eher zellspezifischer Natur als lageabhängig zu sein (Groh et al., 2009). Sakmann und Mitarbeiter (Oberlaender et al., 2011) fanden bei Untersuchung von Layer 5 zwei grundsätzlich verschiedene Zelltypen, „schlankbüschelige“ und „dickbüschelige“ Pyramidenneurone mit gegensätzlichen, sensorischen Qualitäten.

Für die Einteilung in Subpopulationen bzw. Typen von Interneuronen und Pyramidenneurone, wurde hier aber eine Einteilung nach Cobas, Welker et al. (1987) und Bayraktar, Welker et al. (2000) herangezogen. So bestehen fünf der abgebildeten Zellen aus Pyramidenneuronen vom monopolen Zelltyp, gefolgt vom bipolaren Typ mit vier Zellen, dem multipolaren Typ mit zwei Zellen, abschließend mit dem triangulären Typ mit einer Zelle. Anhand einer eigens entworfenen Klassifikation der Neurone nach Qualität, die die Anzahl an vorhandenen Dendriten am Soma beurteilt, lassen sich die Neurone in Klasse 1-3 einteilen (siehe Abb. 19, Ergebnisse). Desweiteren wurde in dieser Arbeit ein Vergleich der eingesetzten drei QD-Klassen, QDs-Biotin, QDs-Streptavidin und Q-tracks hinsichtlich ihrer am besten verwendbaren Eigenschaften, mittels eines Graphen veranschaulicht, wobei die QD-Biotin-Labels die signifikant besten Ergebnisse liefern (siehe Abb. 20, Ergebnisse). Abschließend sollte auf die graphische Darstellung hingewiesen werden, in der ein Vergleich der beiden angewandten Methoden, Mikroinjektion mit Hilfe von Patchclamptechnik und Elektroporation, veranschaulicht wird (siehe Abb. 21, Ergebnisse). Im Methodenvergleich geht die Mikroinjektion mit Hilfe von Patchclamptechnik als die besser anwendbarere Methode hervor.

4.2 Diskussionen der Ergebnisse

Bei der Betrachtung der Bilder ist bei einer Zelle im Zentrum ein kreisrunder, dunkler Fleck zu erkennen, der sich konzentrisch aufhellt und in die homogene Morphologie des Zellsoma übergeht. Mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit handelt es sich hier um eine eingeleitete Zellkernlyse in einem späteren Stadium (Abb. Nr. 9). Der Prozess der Zellkernlyse läuft in einem Zeitraum von Sekunden ab (10-15 sec.) und wurde von mir bei den Patchvorgängen des öfteren beobachtet. In den meisten der Fälle kündigt eine Zellkernlyse ebenso eine komplette Zellkörperlyse an; auch dieser Vorgang wurde von mir in einem Zeitraum von weniger als einer Minute beobachtet. In einer weiteren Abbildung ist ebenso ein kreisrunder aber heller, vakuolenartiger Fleck zu erkennen. Auch dies kündigt eine von mir beobachtete Zellkernlyse, dieses Mal aber zu einem frühen Stadium, an (Abb. Nr. 15). Wie eine stattgehabte Zellkörperlyse aussehen kann, zeigt sich in der Abbildung Nr. 10. Durch den Patchvorgang mit anschließender Zellwandruptur treten dabei sämtliche Zellbestandteile und die von der Pipette applizierten QDs in das perineuronale Nervengewebe über. Bei der Hälfte aller Abbildungen (Abb. Nr. 8, 11, 13, 16 und 17) ist ein deutliches Hintergrundsignal zu erkennen. Dies hat einen - von mir beobachteten - Grund: Beim Patchvorgang wurde die mit QDs angefüllte Pipette mit einem leicht positiven Druck (bis 10 mm H₂O, siehe Material und Methoden) der Zelle angenähert. Bis zur Herstellung der „Cell-Attached“-Konfiguration gingen dabei größere Mengen an QDs an die Astroglia „verloren“. Mit der Tippfilling-Technik (siehe Diskussion der Methodik) kann das Hintergrundsignal im Idealfall vollständig verhindert werden. Bei drei der Abbildungen (Abb. Nr. 13, 14 und 15) könnte man aber den Eindruck gewinnen, sie wären mit der Technik des Tippfillings gewonnen worden. Beim Patchvorgang gelang es mir offensichtlich eine verschwindend kleine Menge von QDs vor der „Cell-Attached“-Konfiguration, durch einen minimal kleinen, positiven Druck auf der Pipette, frei zu setzen. Der angefärbte Hof um die Zelle ist in diesen Fällen wünschenswert klein. Durch die enge Einstellung der Mikroskopblende bei der Aufnahme der Bilder ist es ebenso möglich, die Größe des Hofes und damit das Hintergrundsignal klein zu halten (Abb. Nr. 8, 9, 11 und 16). Das Engstellen der Blende hat aber auf der anderen Seite den Nachteil, dass die Dendriten (Abb. Nr. 8 und 11) nur über eine kürzere Distanz zu verfolgen sind. Bei drei der Abbildungen (Abb. Nr. 10, 12 und 17) ist die Blende weit gestellt, um einen größeren Ausschnitt der Zelle betrachten zu können. Dies brachte leider die Ausbildung eines größeren Hofes und damit ein Verlust in der Kontraststärke mit sich.

Bei der weiteren Betrachtung der Bilder stellte sich hier die Frage, ob eine Möglichkeit besteht, dass sich die QDs auf dem Wege der rezeptorvermittelten Endozytose in den Neuronen angereichert haben könnten? Verschiedene Studien belegen die Impermeabilität der Neuronenmembran für unkonjugierte QDs (Jaiswal & Simon, 2004; Howarth, Takao et al., 2005).

Aber welche Gründe könnten dazu geführt haben, dass sich die QDs nach ihrer Applikation im Neuron nicht besser verteilt haben und die Dendriten nicht über eine längere Distanz angefärbt wurden? Organische Farbstoffe wie Alexa Fluor 488, 568 oder endogene Proteine wie GFP (Green Fluorescent Protein) haben gegenüber den QDs einige Nachteile, wie niedrige Intensität des Signals, kurze Lebensdauer (Jaiswal & Simon, 2004) und Schwierigkeiten bei der Differenzierung einzelner Moleküle wie z.B. bei Rezeptoren und „Single-molecule-imaging“ (Dahan, Levi et al., 2003; Triller & Choquet, 2005). Ein Vorteil ist aber ihre wesentlich kleinere Größe von ca. 5 nm gegenüber von ca. 15-100 nm der QDs (Lin, Xie et al., 2007). So beschreiben Cognet, Groc et al. (2006) die Möglichkeit einer Behinderung von Diffusion und Penetration innerhalb des Neurons auf Grund der zu großen Partikelgröße von QDs. Dem gegenüber stehen die Ergebnisse von Larson et al. (2003), die mit Hilfe von QDs detailliert morphologische Einzelbestandteile von Zellen beschreiben konnten. Auch Jaiswal & Simon, (2004) beschreiben in ihrer Publikation die Tendenz der QDs, sich nach Applikation intrazellulär an verschiedene Moleküle und Proteine zu binden, was deren schlechte Verteilungsrate erklären würde. Ein weiterer Grund für die schlechte Diffusion der QDs könnte sein, dass die von mir in das Neuron applizierten QDs ungebunden sind, das heißt ohne Transportmolekül. Folglich müsste eine Diffusion bis in die Dendriten erschwert ablaufen. So beschreibt Courty, Luccardini et al. (2006) den Brownian-Diffusionskoeffizient von $D = 0.035 \pm 0,005 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($n = 45$) der ungebundenen, applizierten QDs innerhalb von Zellen. Dem gegenüber erzielt er durch die Kopplung von QDs an Kinesinmoleküle eine Fortbewegungsgeschwindigkeit von $v = 0,57 \pm 0,002 \mu\text{m}/\text{s}$. Seitz, Kojima et al. (2002) beschreibt intrazelluläre Hindernisse, bestehend aus Molekülen oder Zytoskelettanteilen, die mobil oder im lokal unbeweglichen Zustand die Bewegung und damit die Verteilung der QDs innerhalb der Zelle behindern.

Um eine geeignete Patch-Konzentration der QDs finden zu können, müssen die in konzentrierter Form vorliegenden QDs in Lösung gebracht werden. Da es in der Literatur Hinweise auf die Eigenschaft der QDs gibt, innerhalb des Neurons Aggregate zu bilden, kann die Patch-Konzentration nicht beliebig hoch sein. Andererseits muss eine Mindestanzahl von

QDs in Lösung gebracht werden, um ein ausreichend starkes Signal zu erhalten. Beide, Jaiswal & Simon, (2004) und Rieger, Kulkarni et al. (2005) weisen in ihrer Publikation darauf hin, dass QDs eine starke Tendenz aufweisen, innerhalb des Zytosols von Neuronen und in Zebrafischembryonen zu aggregieren. Eine Möglichkeit, die QDs daran zu hindern intrazellulär Aggregate zu bilden, ist die Verpackung von QDs in Transportmoleküle wie Vesikel. So gelingt es Fan, Leve et al. (2005) QDs mittels Inkubation in Lipidmizellen anzureichern, die sich nach der Aufnahme in hippocampale Neurone ohne eine Tendenz zur Aggregation besonders perinucleulär anordnen. Auch Rajan, Yang et al. (2006) koppelt QDs selektiv an NGF-TrkA-Rezeptoren (Nerv Growth Factor) und beschreibt nach deren rezeptorvermittelten Endozytose einen bidirektionalen Transport der Vesikel gänzlich ohne Behinderung und sogar ein sichtbares Aussprießen an den Nervenknospen in den PC 12-Neuronen.

Des Weiteren stellt sich hier die Frage nach einer möglicherweise toxischen Wirkung auf die Neurone, auf Grund der anorganischen Beschaffenheit der QDs. Die Beantwortung dieser Frage ist nicht einfach. Es gibt sowohl auf der einen Seite der Forschung zahlreiche Publikationen, die eine nicht toxische Wirkung der QDs in ihren Experimenten belegen können; auf der anderen Seite existieren ebenso verschiedene Berichte, die eindeutig eine toxische Potenz der QDs beschreiben. Dies mag daran liegen, dass bei der Beantwortung dieser Fragen nach unterschiedlichen Kriterien und Zielsetzungen argumentiert wird. Eine nicht toxische Wirkung der QDs in Zellkulturen wird von Jaiswal, Mattoussi et al. (2003), in PC12-Zellkulturen von Vu, Maddipati et al. (2005) innerhalb des Gefäßsystems einer Maus von Larson, Zipfel et al. (2003), in *Xenopus* Embryos von Dubertret, Skourides et al. (2002), und in Tumorzellen, injiziert in Mäuseembryos von Voura, Jaiswal et al. (2004), beschrieben. Andere Fragestellungen beschäftigten sich mit dem Einfluss von QDs auf Neurone über einen längeren Zeitraum (Dubertret, Skourides et al., 2002; Wu, Liu et al., 2003; Jaiswal, Mattoussi et al., 2003; Voura, Jaiswal et al., 2004) und (Dorvee, Derfus et al., 2004). Doch wirkliche Langzeitstudien über die QDs und deren potentiellen toxischen Wirkung an Tiermodellen existieren nicht. Die vorherrschende Hypothese für den Grund der Toxizität der QDs basiert darauf, dass sich freie Cd^{2+} -Moleküle, durch ihre oxidative Umgebung, wie Luft oder Lichtoxidation durch UV-Licht, von den QDs durch einen strukturellen Defekt abspalten und auf diese Weise ihre toxische Wirkung auf das Neuron entfalten (Dorvee, Derfus et al., 2004; Tsay & Michalet, 2005; Kaji, Tokeshi et al., 2007). Ein weiterer Grund für die toxische Wirkung der QDs, scheint die Größe und die damit verbundenen Eigenschaften der

Oberflächenbeschaffenheit zu sein. Bei abnehmender Größe der QDs, nimmt deren Oberfläche und das Verhältnis an wirksamen Atomen oder Molekülen die der Oberfläche ausgesetzt sind, zu (Oberdorster, Oberdorster et al., 2005). Daraus folgt: Die Zunahme an Oberfläche bestimmt wiederum die potenzielle Anzahl von reaktiven Bestandteilen auf der Partikeloberfläche. Um diesen Sachverhalt zu beweisen, stellt Seleverstov, Zahirnyk et al. (2006) einen simplen Vergleich an. Er ermittelt mittels Inkubation die zelluläre Aufnahme humaner, mesenchymaler Stammzellen, zweier chemisch identisch aber in ihrer Größe differierender Peptid-konjugierter QDs (QD 525 nm und QD 605 nm) und kommt zu folgendem Ergebnis: Die QDs 525 nm werden signifikant mehr durch Autophagosomen, Vesikel und Aggregation eliminiert als die etwas größeren QDs mit 605 nm, womit die Größenabhängigkeit und die damit in Verbindung stehende Toxizität auf Neuronen verdeutlicht wird. Lovric, Bazzi et al. (2005) kommt bei dieser Fragestellung zu dem gleichen Ergebnis, indem er eine größenabhängige Aufnahme der QDs registriert. Kleine CdTe QDs ohne Hülle mit einem Durchmesser von 2,2 nm sind deutlich toxischer in PC12 und N9 Zellkulturen als QDs mit einem Durchmesser von 5,2 nm. Interessanterweise kann er auch belegen, dass BSA (bovine serum albumin) signifikant die Zelltoxizität herabsetzt. Da in meiner Fragestellung ausschließlich gecoatete also QDs mit Hülle verwendet wurden, spielt die Toxizität der QDs hierbei nur eine untergeordnete Rolle. Bei der Herstellung von QDs steht eine Vielzahl von verschiedenen Hüllen zur Auswahl, die die Eigenschaften von QDs und deren Toxizität maßgeblich beeinflussen (Jaiswal & Simon, 2004). In einer anderen Arbeit von Chang, Thekkek et al. (2006) wird daran geforscht, ob Zelltoxizität eher durch Austausch von Oberflächenmolekülen der QDs mit der Zellmembran oder auf Grund von intrazellulärer Aufnahme endozytierter QDs resultiert. Sein Fazit dazu ist: Die höchste Biokompatibilität kann durch eine kontrolliert, minimale und intrazelluläre Aufnahme der QDs durch Endozytose erzielt werden. Doch muss hierbei auch beachtet werden, dass hohe intrazelluläre Konzentrationen an QDs eine signifikant höhere Zytotoxizität nach sich ziehen; wahrscheinlich wegen dem zu Grunde gehen endozytierter QDs. Doch inwieweit ist eine toxische Wirkung der QDs auf die Zellen von der Konzentration abhängig? Mit dieser Frage beschäftigt sich Hardman (2006) indem er embryonale Stammzellen einer steigenden Konzentration von QDs aussetzt und eine deutliche Beeinträchtigung der Zellen im Hinblick auf Morphologie, Funktion und Entwicklung feststellt. Auch Jaiswal, Mattoussi et al. (2003) beschreibt die toxische Wirkung auf Nervenzellen mit zunehmender Konzentration. Dubertret, Skourides et al. (2002) testet in seinen Studien die toxische Wirkung der QDs bei

steigender Konzentration auf Xenopus-Blastomeren und erhält als Ergebnis eine signifikante Erhöhung an Missbildungen bei Embryos. Inwieweit diese Ergebnisse auf Neurone übertragen werden können, ist nicht vollständig zu beantworten.

Ein ebenso aus der Literatur bekanntes Phänomen, das so genannte „Blinking“ bei dem einzelne QDs unvermittelt in einen signallosen Zustand verfallen, ist als eine der Eigenschaften nur teilweise verstanden. Efros, Rosen et al. (1996) beschreiben diesen Sachverhalt als die so genannte „Auger Ionisation“. Dieses Phänomen zeigt sich nicht in allen Lokalisationen neuronalen Gewebes mit der gleichen Intensität. In meiner Versuchsreihe wurde stets eine größere Anzahl von QDs verwendet; somit dürfte das „Blinking“ hierbei keine größere Rolle gespielt haben. So beschreibt Rajan, Yang et al. (2006) ein stärkeres „Blinking“ extrazellulär im Vergleich zum intrazellulären Raum und führt diese Auffälligkeit auf normale physiologische Gesetzmäßigkeiten zurück. Dem sogenannten „Blinking“ kann in meiner Arbeit nicht all zu viel Bedeutung beigemessen werden, da das Interesse den intrazellulären Strukturen galt. Einige Arbeiten verwenden diese zunächst als negativ eingeschätzte Eigenschaft, um bei der SPT-Technik (single particle tracking) einzelne, mit QDs markierte Rezeptoren von QD-Rezeptor-Aggregaten optisch zu unterscheiden (Dahan, Levi et al., 2003; Lidke, Nagy et al., 2004). Ebenso beschreiben Rajan, Yang et al. (2006) eine Möglichkeit mit dieser Technik einzelne QD-Trka-Rezeptorkomplexe von Rezeptorkomplexaggregaten zu unterscheiden. Auch Courty, Luccardini et al. (2006) machen sich die von Unterbrechungen charakterisierte Fluoreszenz der QDs zu Nutze (Shimizu, Woo et al., 2002), indem sie nur „blinkende“ Moleküle als Basis ihrer Auswertung (Bonneau, Maman et al. 2004) und damit an QDs konjugierte Kinesinmoleküle in Hela-Zellen charakterisieren.

4.3 Diskussion der Methodik

Zur detaillierten Darstellung von Pyramidenzellen wurden bereits verschiedenste Methoden wie Inkubation mit Hilfe von unspezifischer Endozytose (Mattheakis, Dias et al., 2004), spezifischer Endozytose, rezeptorvermittelt, peptidgestützt, vesikulär und liposomal, (Voura, Jaiswal et al., 2004), photoelektrische Stimulation, Direktstimulation von Zellen mit Licht, DBT-I (Deep Brain Tissue Imaging mit GRIN-Linse), Elektroporation (Jaiswal, Mattoussi et al., 2003) und Mikroinjektion (Dubertret, Skourides et al., 2002) entwickelt. Dabei sollte klar unterschieden werden, ob es sich um die Anfärbung von lebenden oder fixierten Zellen

handelt. Während fixierten Zellen bei der chemischen Anfärbung mehr zugemutet werden kann, muss beim Anfärben von lebenden Zellen äußerst behutsam vorgegangen werden. Die größte Herausforderung besteht darin, die relativ großen QDs (10-100 nm) durch die Doppellipidmembran zu befördern, ohne die Zelle zu sehr zu schädigen. Im Folgenden werden meine angewandten und andere Methoden, die sich mit der Darstellung von Pyramidenneuronen und deren Bestandteile befassen, vorgestellt und deren Vor- und Nachteile diskutiert. Von mir wurden zwei dieser Methoden, die Mikroinjektion mit Hilfe von Patchclamptechnik in zweierlei Ausführungen und die Elektroporation, erfolgreich eingesetzt. Bei der Methode der Mikroinjektion mit Hilfe von Patchclamptechnik konnten individuelle Zellen mit Hilfe von Patchpipetten gefüllt werden (Augustine, 1994; Eilers & Wilmes, 2000; Garaschuk, Linn et al., 2000; Kovalchuk, Eilers et al., 2000). Mikroinjektion mit Hilfe von Patchclamptechnik hat die positive Eigenschaft der hochspezifischen Anfärbung mit niedrigem Hintergrundsignal, was sich besonders gut bei der Darstellung von Dendriten, Spines oder untergeordneten Zellstrukturen anwenden lässt. Gleichzeitig lässt sich bei der Mikroinjektion mit Hilfe von Patchclamp-Technik (Whole-cell-recordings) eine Ableitung der anzufüllenden Zelle aufzeichnen, um damit die intrazelluläre Färbesubstanzkonzentration einschätzen zu können. Jedoch ist diese Methode aufwendig und wird nicht oft für die Anfärbung von mehr als zwei Zellen verwendet (Barth, Koster et al., 2005; Heitland & Koster, 2006). Bei Abbildung Nr. 8, 12 und 13 kam die zuerst eingesetzte Methode, die Mikroinjektion mittels Diffusion (Verteilung der Färbesubstanz entlang des Konzentrationsgradienten) zum Einsatz (siehe 2.3.5). Um die Qualität der Abbildungen zu verbessern und eine weitläufigere Verteilung der QDs zu erzielen, wurde die erste Methode etwas abgewandelt. Die QDs wurden nicht mittels Diffusion in der Zelle angereichert, sondern mit einem leicht positiv gehaltenen Druck von 10-15 cm H₂O aktiv in die Nervenzelle injiziert (siehe 2.3.5). Hierzu siehe Abbildung Nr. 9, 10 und 11. Da sich auch mit dieser Methode in diesen Abbildungen, die QDs nicht signifikant über eine weitere Distanz (Dendrit und Axon) innerhalb der Zelle anreichern ließen, kam eine weitere Methode zum Einsatz.

Die Methode der Elektroporation (siehe 2.3.5) ist einfach und schnell anzuwenden, erlaubt das Anfüllen von mehreren Zellen mit ein und derselben Pipette und macht zur Umsetzung deutlich weniger Equipment notwendig im Vergleich zur Methode der Mikroinjektion mit Hilfe von Patchclamptechnik. Um die Übertragungsrate der QDs zu steigern, wurden in dieser Arbeit auch Zellen mit mehrmaligen (2-5) Stromimpulsen stimuliert, doch ohne signifikanten

Unterschied zur Einzelimpulstechnik. So berichten Sukharev, Klenchin et al. (1992), und Huang, Lin et al. (2007) von einer so genannten Zweipulstechnik, bei der der erste Puls die Funktion der Porenöffnung hat und die Übertragungsrate der Färbesubstanz niedrig ist; der zweite Puls weniger die Funktion der Porenöffnung hat, sondern maßgeblich an der Übertragungsrate der Färbesubstanz beteiligt ist. Mittels dieser Methode gelang es mir die Abbildungen Nr. 14, 15, 16 und 17 zu erzielen. Eine erfolgreiche Anreicherung der Zelle ist dabei besonders vom Abstand der Pipettenspitze vom Zellsoma abhängig. Zu beobachten war, dass bei einem Abstand von $< 3 \mu\text{m}$ die QD in die Zelle appliziert werden konnten, während größere Abstände eher den Extrazellulärraum und nicht das Soma anfärbten. Dieser abstandsabhängige Faktor wird durch den schnellen Abfall der elektrischen Feldstärke mit zunehmendem Abstand bestimmt (Nolkrantz, Farre et al., 2001). Es gibt Hinweise in der Literatur, dass die Elektroporation eine schädigende Wirkung auf die Zellmembran haben könnte. Der kurzzeitige Zusammenbruch des Membranpotentials der Doppellipidmembran könnte irreversibel die normale Zellfunktion beeinträchtigen. So beschreibt Huang, Lin et al. (2007) dass eine große Anzahl von Zellen durch das hohe elektrische Feld oder durch die Anhebung der Temperatur beschädigt oder lysiert würden. Auch bei meinen Versuchen konnte ich eine frühzeitige Lyse der Zellen, verursacht durch die Belastung der Stromimpulse, bestätigen. Einige Parameter der Elektroporation wie Pulsrate, Amplitude, Dauer und Anzahl können angepasst werden, (Canatella, Karr et al., 2001; Haas, Sin et al., 2001; Rae & Levis, 2002) um eine hohe Übertragungsrate der QDs und geringe Zellschädigung zu erzielen (Gehl & Mir, 1999). Ein weiteres Problem der Elektroporation, das bei meiner Verwendung der QDs und deren Applikation in die Zelle beobachtet wurde, ist die Aggregation der QDs. Dies ließ sich von mir nur insofern beeinflussen, indem die Konzentration der in Lösung gebrachten QDs vermindert wurde, was sich aber zu Lasten der Signalintensität auswirkte. Dieses Problem beschreibt Dubertret (2004) ebenso in seiner Arbeit mit QDs. Bei allen genannten Methoden, stellt es kein Problem dar, die QDs in einer passenden Konzentration in Lösung zu bringen, doch die zu applizierende Menge der in Lösung gebrachten QDs lässt sich bei der Mikroinjektion mit Hilfe von Patchclamptechnik schwer steuern. Darüber hinaus stellt sich hier auch wieder die Frage nach einer möglichen toxischen Wirkung der QDs auf die Neurone, wenn mit der schwer steuerbaren Menge die zu tolerierende Konzentration intrazellulär überschritten wird. Dazu werden in der Literatur viele Diskussionen geführt. (Dubertret, Skourides et al., 2002; Hoshino, Hanaki et al., 2004; Slotkin, Chakrabarti et al., 2007) weisen in ihren Arbeiten eindeutig auf eine konzentrationsabhängige toxische Wirkung

der QDs auf verschiedene Zellgruppen hin. Meine Arbeit konnte diese Beobachtung nicht direkt bestätigen, nur das in dem Maß in dem die Dauer der Mikroinjektion oder Elektroporation zunahm (> 15 min) auch die Zellyserate anwuchs.

Bei den bisher erläuterten Methoden wird das Hintergrundsignal im Vergleich zur Methode der Inkubation schon sehr klein gehalten. Durch den Initial gewählten, positiven Druck (ca. 10 cm H₂O siehe Material und Methoden 2.3.4.) auf der Pipette, um ein Verstopfen bei dem Manövrieren der Pipette im Gehirnschnitt zu verhindern, verbleibt bei jedem Vorgang der Mikroinjektion mit Hilfe von Patchclamptechnik und Elektroporation ein kleiner Anteil der QDs im Extrazellulärraum und führt zu dem störenden Hintergrundsignal. Ziel des Tippfilling ist es, mit der in der Pipette vorgeschalteten Intrazellulärlösung, ein angefärbtes Pyramidenneuron ohne den obligaten Hof als Hintergrundsignal zu erzielen. Das Hauptproblem dieser Methode ist aber die Aggregation der QDs innerhalb und später außerhalb der Pipette. Verschiedene Parameter wie Pipettengröße, Durchmesser der Pipettenöffnung, Widerstand der Pipette, Menge und Konzentration der QDs, Menge der in der Pipette vorgeschalteten Ringerlösung und Filter (0,5 µm) zur Abfilterung von Aggregaten wurden auf einander abgestimmt, um das Problem der Aggregation zu lösen. Doch ohne Erfolg. Auch verschiedene Auffülltechniken der Pipetten, Anfüllen der Pipette mit Hilfe von Kapillarkraft über die Pipettenspitze und Anfüllen der Pipette durch Injektion mittels Spritze am hinteren Ende der Pipette, brachten keinen Erfolg. Weiterhin wurde der Versuch unternommen, die Pipetten vor der Anfüllung mit den QDs mit Albuminlösung (BSA) zu spülen, um eine Aggregation zu verhindern. Zuletzt wurde der Versuch unternommen, die QDs an Stelle der Ringerlösung in einer PBS-Lösung in Lösung zu bringen, jedoch ohne verwendbare Ergebnisse erzielen zu können. Bis zu diesem Zeitpunkt sind mir die Gründe für die Aggregation der QDs bei dieser Methode unbekannt. Da in der Literatur keine weiteren Anregungen zum Thema Tippfilling zu finden waren, und von mir sämtliche Parameter der Versuchsdurchführung geprüft wurden, können von mir keine weiteren Theorien für die Gründe der Aggregation genannt werden. Keiner der von mir eingesetzten Methoden gelang es, einen maßgeblichen Fortschritt in der Darstellung von Pyramidenneuronen mit Hilfe der QD-Nanotechnik zu erlangen.

Eine elegante und meist angewandte Methode ist die der Inkubation. Dabei muss man zwischen unspezifischer und spezifischer Endozytose unterscheiden. Bei der spezifischen Endozytose werden QDs mittels rezeptorvermittelter Endozytose durch aktiven Transport in

das Neuron aufgenommen. Diese Methode ist einfach umzusetzen, benötigt kein Setup, und scheint weniger Probleme mit Toxizität zu haben (Vu, Maddipati et al., 2005) basierend auf der Annahme, dass die Zelle bei Inkubation, die durch spezifische Endozytose aufgenommene QD-Menge, eigens reguliert. So gelingt es z.B. Echarte, Bruno et al. (2007) Streptavidin-QDs an einen Monobiotin-NGF-Rezeptorkomplex zu binden, diesen Komplex mittels Clathrin-vermittelter Endozytose in das Neuron aufzunehmen und darauf hin bidirektionalen Transport als auch Interaktion mit Zytoskelettkomponenten innerhalb des Neurons über längere Zeiträume sichtbar zu machen. Die Mikroinjektion als auch die Elektroporation haben gegenüber anderer Methoden wie Inkubation mit Hilfe von spezifischer und unspezifischer Endozytose den Vorteil, dass es möglich ist eine individuell ausgewählte Zelle spezifisch mit der Färbesubstanz wie QDs anzufüllen, und damit eine qualitative Aussage machen zu können. Auf der anderen Seite sind mit diesen zwei Methoden die Anzahl der zu markierenden Zellen begrenzt und die Mikroinjektion einer jeden einzelnen Zelle sehr aufwendig (Medintz, Uyeda et al., 2005). Die Endozytose erlaubt nur die Anreicherung ganzer Zellpopulationen oder Untergruppen. Folglich sind eher quantitative Aussagen gut zu treffen. Ein Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass die Anfärbung ganzer Zellpopulationen relativ unspezifisch ist, zelluläre Untereinheiten schlechter dargestellt werden können und ein stärkeres Hintergrundsignal als störend empfunden wird (Nimmerjahn, Kirchhoff et al., 2004; Kerr, Greenberg et al., 2005). Im Hinblick auf Aggregation gibt es auf der einen Seite Veröffentlichungen, die ohne Probleme QDs verpackt in Lipidmizellen mittels spezifischer Endozytose in Zellen anreichern (Fan, Leve et al., 2005; Lagerholm, 2007). Auf der anderen Seite existieren Berichte wie von Dubertret (2004), in dem ein hohes Maß an Aggregation bei der liposomenvermittelten Endozytose beschrieben wird. Ein Nachteil der spezifischen Endozytose ist aber, dass die QDs angereichert in Transportmolekülen wie Vesikel, Liposomen oder Peptidmolekülen in ihrem Größenumfang zunehmen (> 100 nm) und daher ihr schneller Transport behindert wird. Die Forschungsgruppe von Bouzigues & Dahan, (2007) macht sich die Methodik der Inkubation zu Nutze, indem sie Bewegungseigenschaften und Geschwindigkeiten von an GABA-Rezeptoren gekoppelte QDs Einzelmoleküle charakterisieren und das damit verbundene Aussprießen von Nervenknospen an Nervenendigungen illustrieren. Ebenso inkubiert und konjugiert Sundara Rajan & Vu, (2006) QDs selektiv an Trka-Rezeptoren, bringt die Vesikel via Endozytose in PC12-Zellkulturen und kann mit dem QD-Trka-Rezeptorkomplex gekoppelt an NGF ebenso einen bidirektionalen Transport und sogar ein Wachstum an den Nerverknospen innerhalb des

Neurons darstellen. So reichert Fan, Leve et al. (2005) Lipidmizellen mit QDs an, inkubiert und depolarisiert die Nervenzellen, um Endozytose zu erzielen und kann darauf den Transport der QDs in Lysosomen innerhalb des Neurons als auch eine Anreicherung der QDs in Nuklei sichtbar machen. Morris, Depollier et al. (2001) und Jaiswal, Goldman et al. (2004) verwenden dieselbe Technik, nur dass sie die QD in das Peptidmolekül Pep 1 anreichern und damit ebenso in vivo Darstellungen der Neurone präsentieren können. Beim Vergleich der Methoden im Hinblick auf die eingesetzte Temperatur während des Versuchs gibt es grosse Unterschiede. Bei der Mikroinjektion wird eine niedrige Temperatur der ACSF-Lösung von 24 °C in der Ableitkammer angestrebt, um den Stoffwechsel der Zellen möglichst niedrig zu halten, was wiederum eine längere Versuchsdauer ermöglicht. Die Inkubation wird durch eine künstlich angehobene und physiologisch angepasste Temperatur des Zellmediums von 37 °C optimiert, somit steigt der Stoffwechsel der Zellen deutlich an und die endozytotische Anreicherung der Zelle mit der Färbesubstanz wird maximal beschleunigt (Jaiswal & Simon, 2004). Zum Nachteil dieser Versuchsanordnung ist aber, auf Grund des gesteigerten Stoffwechsels eine verkürzte Lebensdauer der Zellen zu nennen. Dass bei einer Temperatur von 24 °C Endozytose problematisch wird, zeigt Hoshino, Hanaki et al. (2004) in seiner Publikation, indem er versucht Lymphozytenkulturen mit QDs bei deutlich herabgesetzter Temperatur anzureichern. Die Methode der unspezifischen Endozytose hat gegenüber der spezifischen Endozytose folgenden Nachteil: Unkonjugierte, freie und nicht in Transportmolekülen (Vesikel, Liposomen, Peptidmolekülen) angereicherte QDs sind zwar ihrer Größe nach wesentlich kleiner, gehen aber beim Vorgang der Endozytose verloren oder verfehlen ihr Ziel sich intrazellulär auszubreiten (Jaiswal, Mattoussi et al., 2003).

Eine weitere Methode ist die der photoelektrischen Stimulation mit Lasertechnik. Hier gelingt es Pappas, Wickramanyake et al. (2007), Neurone, die auf einem Nanopartikelfilm gewachsen sind, mit Laser zu stimulieren und deren Depolarisation mit Voltage und Current Clamp Technik abzuleiten. Die Aufnahmen zeigen differenzierte Neurone, deren Wachstum als Prozess, als auch elektronenmikroskopische Aufnahmen von Dendriten/Spines und deren Interaktionsstellen mit dem Nanopartikelfilm. So beschreiben andere Arbeitsgruppen, wie Callaway & Yuste, (2002), Hirase, Nikolenko et al. (2002), Wells, Kao et al. (2005) eine alternative Technik durch direkte Lichtstimulation der Neuronen. Doch ist der genaue Mechanismus und seine möglichen Temperatur oder lichtbedingten Schäden noch nicht bekannt.

Als eine sehr invasive Methode gilt die multiphotonen-mikroskopische Darstellung von Layer V Neuronen in der oberflächlichen Zone des Kortex mit Hilfe von GRIN-Linsen (Gradient Index). Der Forschungsgruppe von Levene, Dombeck et al. (2004) gelingt es in Vollnarkose befindliche Mäuse, zu craniotomieren, QDs in die Schwanzvene zu injizieren und mit dem Multiphotonenmikroskop gekoppelt an die GRIN-Linse, Neurone in einer Tiefe von ca. 700-800 μm in ihrer Komplexität darzustellen.

5 Zusammenfassung

Durch die Verwendung der Mikroinjektion- und der Elektroporation-Technik kann eine Vielzahl von verschiedenen Makromolekülen, wie die QDs, in jeden Zelltyp injiziert werden, solange sie für die Patchpipette oder Elektroporationpipette zugänglich ist. Verschiedene Arten der QDs können simultan in die Zelle injiziert werden und ermöglichen morphologische Beobachtungen. Die Zellen werden durch die QDs erfolgreich angefärbt und weisen ein lang anhaltendes fluoreszierendes Signal auf. Eine bis vier Zellen können mit Elektroporation zügig, mit hoher Konzentration der QDs und mit niedrigem Hintergrundsignal, gefüllt werden. Mikroinjektion mit Hilfe der Patchclamp-Technik ermöglicht zwar nur die Füllung von maximal zwei Zellen, macht aber dafür eine hohe intrazelluläre Konzentration der QDs, ein niedriges Hintergrundsignal und die Beobachtung elektrophysiologischer Eigenschaften des Neurons möglich. Darüber hinaus gelang es mir eine Klassifikation der Neurone nach ihrer Qualität der Darstellung, einen Vergleich der QD-Klassen und einen Methodenvergleich der Mikroinjektion mit Elektroporation zu erstellen. Daneben traten bei der Verwendung von QDs für die Anfärbung von Zellen auch nachteilige Eigenschaften auf: die Molekülgröße, toxische Wirkung, Blinking und Aggregation. Folglich müssen diese Kriterien bei der Arbeit mit QDs beachtet werden. Weiterhin konnte ich einen Vergleich der aktuellen und meist verwendeten Methoden zur Anfärbung von Zellen mit QDs, wie spezifische und unspezifische Endozytose, Elektroporation, und Mikroinjektion mit Hilfe von Patchclamp-Technik darstellen. So konnte ich auf der einen Seite zeigen, dass Mikroinjektion als auch Elektroporation besonders praktische und zuverlässige Methoden sind, um Pyramidenzellen mit den QDs anzufüllen und darzustellen. Auf der anderen Seite kam ich zu dem Ergebnis, dass QDs auf Grund ihrer Eigenschaften weniger dafür geeignet sind, Zellen und Pyramidenneurone darzustellen. Dagegen liegt Ihre Stärke in der Markierung und Detektion von zellulären Bestandteilen und Abläufen wie Molekülen, Rezeptoren, Proteinen, Vesikeln und Signaltransduktion. Verglichen zur eleganten und zellschonenden Methode der Endozytose mittels Inkubation, bedeuten die Methoden der Elektroporation und Mikroinjektion eine wesentlich größere Belastung der Zellen. Obwohl Mikroinjektion und Elektroporation auf einer anderen Technik basieren, stellen sie einen Vorteil gegenüber anderer existierender Färbemethoden dar und weiten die Verwendungsmöglichkeiten von Färbesubstanzen zur Darstellung von Zellen und neuronalen Netzwerken aus.

6 Ausblick

Die Einführung von QDs in die biomedizinischen Anwendung eröffnet zahlreiche Möglichkeiten im Hinblick auf optische Langzeitbeobachtungen von Zellen und deren Prozesse, Simultandarstellung von verschiedenen untergeordneten Zellbestandteilen (Proteine), Einblicke in die Technik der Einzelmoleküldarstellung (Single-molecule-detection) und möglicherweise auch bald in der angewandten Diagnostik. Ihre signalkräftigen und lichtresistenten Eigenschaften ermöglichen es, Zellen und deren molekulare Abläufe zu beobachten und aufzuzeichnen. Eine zentrale Frage dabei ist: Werden QDs mit ihren revolutionären Eigenschaften die fluoreszierenden Farbstoffe aus ihrem Anwendungsgebiet verdrängen? Nein, denn sie werden eher die Mängel der fluoreszierenden Farbstoffe besonders in der *in vivo* Anwendung ausgleichen und ergänzen. Doch unsere Erfahrung im Umgang mit den QDs in verschiedensten Bereichen innerhalb der letzten 20 Jahre hat gezeigt, dass einige nachhaltige Eigenschaften der QDs ihre Verwendung weiterhin einschränken. So gibt es bereits zahlreiche Ansätze einzelne Parameter der QDs zu verändern oder zu verbessern. Eine Reduktion ihrer Toxizität z.B. könnte erlangt werden, indem die Kernzusammensetzung und die instabilen Eigenschaften der QDs optimiert würden (Su, Zhang et al., 2008). Durch eine Überarbeitung im strukturellen Aufbau der Hülle könnte das Größenproblem gelöst werden um damit eine schnellere, intrazelluläre Anreicherung der QDs erzielen zu können (Bailey & Nie, 2003). So berichtet Jin, Fujii et al. (2005) über eine neu entworfene Hülle aus Calixarene, die den QDs ein geringere Größe, eine hohe Emissionseffizienz und eine höhere Langzeitstabilität verleihen. Bei der Herstellung neuartiger QDs sollten Parameter wie Sensibilität auf magnetische und elektrische Felder (Shim & Guyot-Sionnest, 2000), engere Fluoreszenzmission, längere Lebenszeit, Verbesserung der Signalstärke und Unterdrückung des „Blinkings“ einer Eigenschaft der QDs (Hohng & Ha, 2004) beachtet werden. Ein ganz besonderes Augenmerk sollte der Oberflächentechnik der Hülle gewidmet werden (Hoshino, Hanaki et al., 2004). Es hat sich gezeigt, dass eine Optimierung der Oberfläche noch fern liegende Möglichkeiten wie die Verwendung der QDs als Transportmolekül, als Medikamentenapplikator oder in der Medikamentenspiegelkontrolle eingesetzt werden könnten. Ungeachtet ihrer Anwendung in der Biotechnologie und in der Darstellung von Zellen und gesetzt den Fall, dass das Problem der Zelltoxizität gelöst werden kann, könnten QDs zur intravenösen Injektion verwendet

werden, um zelluläre Marker erkrankter Gewebe oder Organe des menschlichen Körpers zu markieren. QDs könnten damit als Kontrastmittel für die funktionale Darstellung von Organen unter zu Hilfe Name von MRT, CT und PET eingesetzt werden. Weiterhin könnten Enzyme an die Oberfläche der QDs konjugiert werden, um diese durch Lichtaktivierung an dem Ort ihrer Bestimmung freizusetzen und damit bösartige Erkrankungen therapieren zu können (Michalet, Pinaud et al., 2005). Doch erst wenn die Kosten vergleichbar niedrig zu organischen Farbstoffen werden, eine Auswahl von zellspezifischen Markern im Handel erhältlich ist und das Gefahrenpotential für ihre Verwendung eingegrenzt ist, könnte die QDs-gestützte Bildgebung die bevorzugte Standardtechnik im biomedizinischen Anwendungsgebiet werden.

7 Anhang

7.1 Literaturverzeichnis

Alger, B. E. (1984). "Characteristics of a slow hyperpolarizing synaptic potential in rat hippocampal pyramidal cells in vitro." J Neurophysiol 52(5): 892-910.

Alivisatos, A. P., Gu, W., Larabell, C. (2005). "Quantum dots as cellular probes." Annu Rev Biomed Eng 7: 55-76.

Alivisatos, P. (2004). "The use of nanocrystals in biological detection." Nat Biotechnol 22(1): 47-52.

Andreasen, M. and J. J. Hablitz (1994). "Paired-pulse facilitation in the dentate gyrus: a patch-clamp study in rat hippocampus in vitro." J Neurophysiol 72(1): 326-36.

Arya, H., Kaul, Z., Wadhava, R., Taira, K., Hirano, T., Kaul, S. C. (2005). "Quantum dots in bio-imaging: Revolution by the small." Biochem Biophys Res Commun 329(4): 1173-7.

Augustine, G. J. (1994). "Combining patch-clamp and optical methods in brain slices." J Neurosci Methods 54(2): 163-9.

Bailey, R. E. and S. Nie (2003). "Alloyed semiconductor quantum dots: tuning the optical properties without changing the particle size." J Am Chem Soc 125(23): 7100-6.

Ballou, B., Lagerholm, B. C., Ernst, L. A., Bruchez, M. P., Waggoner, A. S. (2004). "Noninvasive imaging of quantum dots in mice." Bioconjug Chem 15(1): 79-86.

Barth, P. J., Koster, H., Moosdorf, R., (2005). "CD34+ fibrocytes in normal mitral valves and myxomatous mitral valve degeneration." Pathol Res Pract 201(4): 301-4.

Bayraktar, T., Welker, E., Freund, T. F., Zilles, K., Staiger, J. F., (2000). "Neurons immunoreactive for vasoactive intestinal polypeptide in the rat primary somatosensory

cortex: morphology and spatial relationship to barrel-related columns." J Comp Neurol 420(3): 291-304.

Benardo, L. S. (1995). "N-methyl-D-aspartate transmission modulates GABAB-mediated inhibition of rat hippocampal pyramidal neurons in vitro." Neuroscience 68(3): 637-43.

Blanton, M. G., Lo Turco, J. J., Kriegstein, A. R., (1989). "Whole cell recording from neurons in slices of reptilian and mammalian cerebral cortex." J Neurosci Methods 30(3): 203-10.

Bonneau, S., Maman, N. Brault, D. (2004). "Dynamics of pH-dependent self-association and membrane binding of a dicarboxylic porphyrin: a study with small unilamellar vesicles." Biochim Biophys Acta 1661(1): 87-96.

Bouzigues, C. and M. Dahan (2007). "Transient directed motions of GABA(A) receptors in growth cones detected by a speed correlation index." Biophys J 92(2): 654-60.

Brodman K. (1909) Vergleichende Lokalisationslehre der Großhirnrinde. Leipzig: Barth.

Bruchez, M., Jr., Moronne, M., Gin, P., Weiss, S., Alivisatos, A. P. (1998). "Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels." Science 281(5385): 2013-6.

Burgard, E. C. and J. J. Hablitz (1993). "NMDA receptor-mediated components of miniature excitatory synaptic currents in developing rat neocortex." J Neurophysiol 70(5): 1841-52.

Callaway, E. M. and R. Yuste (2002). "Stimulating neurons with light." Curr Opin Neurobiol 12(5): 587-92.

Canatella, P. J., Karr, J. F., Petros, J. A., Prausnitz, M. R. (2001). "Quantitative study of electroporation-mediated molecular uptake and cell viability." Biophys J 80(2): 755-64.

Carneiro, Kelley, Junqueira, (2002) 5. Auflage Histologie. 1-3, Springer Verlag.

Chan, W. C., Maxwell, D. J., Gao, X., Bailey, R. E., Han, M., Nie, S. (2002).

"Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging." Curr Opin Biotechnol 13(1): 40-6.

Chan, W. C. and S. Nie (1998). "Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection." Science 281(5385): 2016-8.

Chang, E., N. Thekkekk, N., Yu, W. W., Colvin, V. L., Drezek, R. (2006). "Evaluation of quantum dot cytotoxicity based on intracellular uptake." Small 2(12): 1412-7.

Cobas, A., Welker, E., Fairen, A., Kraftsik, R., Van der Loos, H. (1987). "GABAergic neurons in the barrel cortex of the mouse: an analysis using neuronal archetypes." J Neurocytol 16(6): 843-70.

Cognet, L., Groc, L., Lounis, B., Choquet, D. (2006). "Multiple routes for glutamate receptor trafficking: surface diffusion and membrane traffic cooperate to bring receptors to synapses." Sci STKE 2006(327): pe13.

Conti, P., Reale, M., Barbacane, R. C., Stuard, S., Placido, F. (1994). "Effect of the antirheumatic agent Tenidap on CD3, CD4, and CD8 expression and interleukin-1 and leukotriene B4 secretion in human peripheral blood mononuclear cells." Biochem Cell Biol 72(9-10): 397-402.

Courty, S., Luccardini, C., Bellaiche, Y., Capello, G., Dahan, M. (2006). "Tracking individual kinesin motors in living cells using single quantum-dot imaging." Nano Lett 6(7): 1491-5.

Dahan, M., Levi, S., Luccardini, C., Rostainq, P., Riveau, B., Triller, A. (2003).

"Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single-quantum dot tracking." Science 302(5644): 442-5.

DeBruin, K. A. and W. Krassowska (1999). "Modeling electroporation in a single cell. I. Effects Of field strength and rest potential." Biophys J 77(3): 1213-24.

Dodt, H., Eder, M., Frick, A., Zieglgänsberger, W. (1999). "Precisely localized LTD in the neocortex revealed by infrared-guided laser stimulation." Science 286(5437): 110-3.

Dodt, H. U. and W. Zieglansberger (1990). "Visualizing unstained neurons in living brain slices by infrared DIC-videomicroscopy." Brain Res 537(1-2): 333-6.

Dodt, H. U. and W. Zieglansberger (1994). "Infrared videomicroscopy: a new look at neuronal structure and function." Trends Neurosci 17(11): 453-8.

Dorvee, J. R., Derfus, A. M., Bhatia, S. N., Sailor, M. J., (2004). "Manipulation of liquid droplets using amphiphilic, magnetic one-dimensional photonic crystal chaperones." Nat Mater 3(12): 896-9.

Douglas, R. J. and K. A. Martin (1991). "A functional microcircuit for cat visual cortex." J Physiol 440: 735-69.

Dubertret, B. (2004). "[Quantum dots in biology: recent progress]." Med Sci (Paris) 20(8-9): 737-40.

Dubertret, B., Skourides, P., Norris, D. J., Noireaux, V., Brivanlou, A. H., Libchaber, A. (2002). "In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles." Science 298(5599): 1759-62.

Echarte, M. M., Bruno, L., Arndt-Jovin, D. J., Jovin, T. M., Pietrasanta, L. I., (2007). "Quantitative single particle tracking of NGF-receptor complexes: transport is bidirectional but biased by longer retrograde run lengths." FEBS Lett 581(16): 2905-13.

Eder, M. G. (2000). "Elektrophysiologische Untersuchungen zur glutamatergen und GABAergen Informationsübertragung an neocorticalen Pyramidenneuronen mit Hilfe Infrarot-gelenkter Photostimulation". 11-13, Dissertation.

Edwards, F. A., Konnerth, A., Sakmann, B., Takahashi, T. (1989). "A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurones of the mammalian central nervous system." Pflugers Arch 414(5): 600-12.

Efros, A. L., Rosen, M., Kuno, M., Nirmal, M., Norris, D. J., Bawendi, M. (1996). "Band-edge exciton in quantum dots of semiconductors with a degenerate valence band: Dark and bright exciton states." Phys Rev B Condens Matter 54(7): 4843-4856.

Eilers, J. and C. Wilmes (2000). "[Organization of work: a concept in everyday nursing care: the patient as participant]." Pflege Z 53(6): 399-402.

Fan, H., Leve, E. W., Scullin, C., Gabaldon, J., Tallant, D., Bunge, S., Boyle, T., Wilson, M. C., Brinker, C. J. (2005). "Surfactant-assisted synthesis of water-soluble and biocompatible semiconductor quantum dot micelles." Nano Lett 5(4): 645-8.

Feldman, M. L. and A. Peters (1978). "The forms of non-pyramidal neurons in the visual cortex of the rat." J Comp Neurol 179(4): 761-93.

Gao, X., Chan, W. C., Nie, S. (2002). "Quantum-dot nanocrystals for ultrasensitive biological labeling and multicolor optical encoding." J Biomed Opt 7(4): 532-7.

Garaschuk, O., Linn, J., Eilers, J., Konnerth, A. (2000). "Large-scale oscillatory calcium waves in the immature cortex." Nat Neurosci 3(5): 452-9.

Gehl, J. and L. M. Mir (1999). "Determination of optimal parameters for in vivo gene transfer by electroporation, using a rapid in vivo test for cell permeabilization." Biochem Biophys Res Commun 261(2): 377-80.

Giepmans, B. N., Deerinck, T. J., Smarr, B. L., Jones, Y. Z., Ellisman, M. H. (2005). "Correlated light and electron microscopic imaging of multiple endogenous proteins using Quantum dots." Nat Methods 2(10): 743-9.

Goldman, E. R., Anderson, G. P., Tran, P. T., Mattoussi, H., Charles, P. T., Mauro, J. M. (2002). "Conjugation of luminescent quantum dots with antibodies using an engineered adaptor protein to provide new reagents for fluoroimmunoassays." Anal Chem 74(4): 841-7.

Goldman, E. R., H. Mattoussi, et al. (2005). "Fluoroimmunoassays using antibody-conjugated quantum dots." Methods Mol Biol 303: 19-34.

Golzio, M., Teissie, J., Rols, M. P. (2002). "Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery." Proc Natl Acad Sci U S A 99(3): 1292-7.

Gottlieb, J. P. and A. Keller (1997). "Intrinsic circuitry and physiological properties of pyramidal neurons in rat barrel cortex." Exp Brain Res 115(1): 47-60.

Groh A., Mayer H.S., Schmidt E.F., Heintz N., Sakmann B., Krieger P. 2010. "Cell-type specific properties of pyramidal neurons in neocortex underlying a layout that is modifiable depending on the cortical area". *Cerebral Cortex*. 20:826-836.

Haas, K., Sin, W. C., Javaherian, A., Li, Z., Cline, H. T. (2001). "Single-cell electroporation for gene transfer in vivo." *Neuron* 29(3): 583-91.

Hardman, R. (2006). "A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors." *Environ Health Perspect* 114(2): 165-72.

Heitland, P. and H. D. Koster (2006). "Biomonitoring of 30 trace elements in urine of children and adults by ICP-MS." *Clin Chim Acta* 365(1-2): 310-8.

Helmchen, F. and T. Nevian (2007). "Little strokes fill big oaks: a simple in vivo stain of brain cells." *Neuron* 53(6): 771-3.

Hirase, H., Nikolenko, V., Yuste, R. (2002). "Multiphoton stimulation of neurons." *J Neurobiol* 51(3): 237-47.

Hohng, S. and T. Ha (2004). "Near-complete suppression of quantum dot blinking in ambient conditions." *J Am Chem Soc* 126(5): 1324-5.

Hoshino, A., Hanaki, K., Suzuki, K., Yamamoto, K. (2004). "Applications of T-lymphoma labeled with fluorescent quantum dots to cell tracing markers in mouse body." *Biochem Biophys Res Commun* 314(1): 46-53.

Howarth, M., Takao, K., Hayashi, Y., Ting, A.Y. (2005). "Targeting quantum dots to surface proteins in living cells with biotin ligase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(21): 7583-8.

Hsu, Y. J. and S. Y. Lu (2004). "Photoluminescence resulting from semiconductor-metal solid solution observed in one-dimensional semiconductor nanostructures." *Langmuir* 20(1): 23-6.

Huang, K. S., Lin, Y. C., Su, K. C., Chen, H. Y. (2007). "An electroporation microchip system for the transfection of zebrafish embryos using quantum dots and GFP genes for evaluation." *Biomed Microdevices* 9(5): 761-8.

Inoue, T. and R. Krumlauf (2001). "An impulse to the brain--using in vivo electroporation." Nat Neurosci 4 Suppl: 1156-8.

Jaiswal, J. K., Goldman, E. R., Mattoussi, H., Simon, S. M. (2004). "Use of quantum dots for live cell imaging." Nat Methods 1(1): 73-8.

Jaiswal, J. K., Mattoussi, H., Mauro, J. M., Simon, S. M. (2003). "Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates." Nat Biotechnol 21(1): 47-51.

Jaiswal, J. K. and S. M. Simon (2004). "Potentials and pitfalls of fluorescent quantum dots for biological imaging." Trends Cell Biol 14(9): 497-504.

Jin, T., Fujii, F., Sakata, H., Tamura, M., Kinjo, M. (2005). "Calixarene-coated water-soluble CdSe-ZnS semiconductor quantum dots that are highly fluorescent and stable in aqueous solution." Chem Commun (Camb)(22): 2829-31.

Jin, X., Mathers, P. H., Szabo, G., Katarova, Z., Aqmon, A. (2001). "Vertical bias in dendritic trees of non-pyramidal neocortical neurons expressing GAD67-GFP in vitro." Cereb Cortex 11(7): 666-78.

Kaji, N., Tokeshi, M., Baba, Y. (2007). "Single-molecule measurements with a single quantum dot." Chem Rec 7(5): 295-304.

Kerr, J. N., Greenberg, D., Helmchen, F. (2005). "Imaging input and output of neocortical networks in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A 102(39): 14063-8.

Kovalchuk, Y., Eilers, J., Lisman, J., Konnerth, A. (2000). "NMDA receptor-mediated subthreshold Ca(2+) signals in spines of hippocampal neurons." J Neurosci 20(5): 1791-9.

Krassowska, W. and P. D. Filev (2007). "Modeling electroporation in a single cell." Biophys J 92(2): 404-17.

Lacoste, T. D., Michalet, X., Pinaud, F., Chemla, D. S., Alivisatos, A. P., Weiss, S. (2000). "Ultrahigh-resolution multicolor colocalization of single fluorescent probes." Proc Natl Acad Sci U S A 97(17): 9461-6.

Lagerholm, B. C. (2007). "Peptide-mediated intracellular delivery of quantum dots." Methods Mol Biol 374: 105-12.

Larson, D. R., Zipfel, W. R., Williams, R. M., Clark, S. W., Bruchez, M. P., Wise, F. W., Webb, W. W. (2003). "Water-soluble quantum dots for multiphoton fluorescence imaging in vivo." Science 300(5624): 1434-6.

Levene, M. J., Dombek, D. A., Kasischke, K. A., Molloy, R. P., Webb, W. W. (2004). "In vivo multiphoton microscopy of deep brain tissue." J Neurophysiol 91(4): 1908-12.

Lidke, D. S., Nagy, P., Heintzmann, R., Arntd-Jovin, D. J., Post, J. N., Grecco, H. E., Jares-Erijman, E. A., Jovin, T. M. (2004). "Quantum dot ligands provide new insights into erbB/HER receptor-mediated signal transduction." Nat Biotechnol 22(2): 198-203.

Lin, S., Xie, X., Patel, M. R., Yang, Y. H., Li, Z., Cao, F., Ghysens, O., Zhang, Y., Gambhir, S.S. (2007). "Quantum dot imaging for embryonic stem cells." BMC Biotechnol 7: 67.

Lovric, J., Bazzi, H. S., Cuie, Y., Fortin, G. R., Winnik, F. M., Maysinger, D. (2005). "Differences in subcellular distribution and toxicity of green and red emitting CdTe quantum dots." J Mol Med 83(5): 377-85.

Lorente de No` (1938) Architectonics and structure of the cerebral cortex. In: Physiology in the nervous system (Fulton J F, ed), pp 291-327. London: Oxford University Press.

MacVicar, B. A. (1984). "Voltage-dependent calcium channels in glial cells." Science 226(4680): 1345-7.

Marin-Padilla, M. (1967). "Number and distribution of the apical dendritic spines of the layer V pyramidal cells in man." J Comp Neurol 131(4): 475-90.

Mattheakis, L. C., Dias, J. M., Choi, Y. J., Gong, J., Bruchez, M. P., Liu, J., Wang, E. (2004). "Optical coding of mammalian cells using semiconductor quantum dots." Anal Biochem 327(2): 200-8.

Medintz, I. L., Clapp, A. R., Mattoussi, H., Goldman, E. R., Fisher, B., Mauro, J. M. (2003). "Self-assembled nanoscale biosensors based on quantum dot FRET donors." Nat Mater 2(9): 630-8.

Medintz, I. L., Uyeda, H. T., Goldman, E. R., Mattoussi, H. (2005). "Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing." Nat Mater 4(6): 435-46.

Michalet, X., Pinaud, F. F., Bentolila, L. A., Tsay, J. M., Doose, S., Li, J. J., Sundaresan, G., Wu, A. M., Gambhir, S. S., Weiss, S. (2005). "Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics." Science 307(5709): 538-44.

Morris, M. C., Depollier, J., Mery, J., Heitz, F., Divita, G. (2001). "A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells." Nat Biotechnol 19(12): 1173-6.

Mountcastle, V. B. (1957). "Modality and topographic properties of single neurons of cat's somatic sensory cortex." J Neurophysiol 20(4): 408-34.

Mountcastle, V. B. (1978). "Brain mechanisms for directed attention." J R Soc Med 71(1): 14-28.

Neher, E., Sakmann, B., Steinbach, J. H. (1978). "The extracellular patch clamp: a method for resolving currents through individual open channels in biological membranes." Pflugers Arch 375(2): 219-28.

Neumann, E., Toensing, K., Kakorin, S., Budde, P., Frey, J. (1998). "Mechanism of electroporative dye uptake by mouse B cells." Biophys J 74(1): 98-108.

Nevian, T. and F. Helmchen (2007). "Calcium indicator loading of neurons using single-cell electroporation." Pflugers Arch 454(4): 675-88.

Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., Kerr, J. N., Helmchen, F. (2004). "Sulforhodamine 101 as a specific marker of astroglia in the neocortex in vivo." Nat Methods 1(1): 31-7.

Nolkrantz, K., Farre, C., Brederlau, A., Karlsson, R. I., Brennan, C., Eriksson, P. S., Weber, S. G., Sandberg, M., Orwar, O. (2001). "Electroporation of single cells and tissues with an electrolyte-filled capillary." Anal Chem 73(18): 4469-77.

Oberdörster, G., Oberdörster, E., Oberdörster, J. (2005). "Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles." Environ Health Perspect 113(7): 823-39.

Oberlaender M., Boudewijns Z. S., Kleele T., Mansvelter H. D., Sakmann B., de Kock C. P. (2011). "Three-dimensional axon morphologies of individual layer 5 neurons indicate cell type-specific intracortical pathways for whisker motion and touch". Proceedings of the National Academy of Sciences USA.108:4188-4193.

Oberlaender M., de Kock C. P. J., Bruno R. M., Ramirez A., Meyer H. S., Dercksen V. J., Helmstaedter M., Sakmann B. (Nov. 2011). "Cell type-specific three-dimensional structure of thalamocortical circuits in a column of rat vibrissal cortex". Cerebral Cortex. 10.1093

Pappas, T. C., Wickramanyake, W. M., Jan, E., Motamedi, M., Kotov, N. A. (2007). "Nanoscale engineering of a cellular interface with semiconductor nanoparticle films for photoelectric stimulation of neurons." Nano Lett 7(2): 513-9.

Pathak, S., Cao, E., Davidson, M. C., Jin, S., Silva, G. A. (2006). "Quantum dot applications to neuroscience: new tools for probing neurons and glia." J Neurosci 26(7): 1893-5.

Peters, A. and L. M. Kimerer (1981). "Bipolar neurons in rat visual cortex: a combined Golgi-electron microscope study." J Neurocytol 10(6): 921-46.

Peters, A., Moss, M. B., Sethares, C. (2000). "Effects of aging on myelinated nerve fibers in monkey primary visual cortex." J Comp Neurol 419(3): 364-76.

Portney, N. G. and M. Ozkan (2006). "Nano-oncology: drug delivery, imaging, and sensing." Anal Bioanal Chem 384(3): 620-30.

Rae, J. L. and R. A. Levis (2002). "Single-cell electroporation." Pflugers Arch 443(4): 664-70.

Rajan, S. S., Yang, X., Shuvalova, L., Collart, F., Anderson, W. F. (2006). "Crystal structure of YfiR, an unusual TetR/CamR-type putative transcriptional regulator from *Bacillus subtilis*." Proteins 65(1): 255-7.

Rathenberg, J., Nevian, T., Witzemann, V. (2003). "High-efficiency transfection of individual neurons using modified electrophysiology techniques." J Neurosci Methods 126(1): 91-8.

Rieger, S., Kulkarni, R. P., Darcy, D., Fraser, S. E., Köster, R. W. (2005). "Quantum dots are powerful multipurpose vital labeling agents in zebrafish embryos." Dev Dyn 234(3): 670-81.

Ross, M. T., Grafham, D. V., Coffey AJ, Scherer S, McLay K, Muzny D, Platzer M, Howell GR, Burrows C, Bird CP, Frankish A, Lovell FL, Howe KL, Ashurst JL, Fulton RS, Sudbrak R, Wen G, Jones MC, Hurles ME, Andrews TD, Scott CE, Searle S, Ramser J, Whittaker A, Deadman R, Carter NP, Hunt SE, Chen R, Cree A, Gunaratne P, Havlak P, Hodgson A, Metzker ML, Richards S, Scott G, Steffen D, Sodergren E, Wheeler DA, Worley KC, Ainscough R, Ambrose KD, Ansari-Lari MA, Aradhya S, Ashwell RI, Babbage AK, Bagguley CL, Ballabio A, Banerjee R, Barker GE, Barlow KF, Barrett IP, Bates KN, Beare DM, Beasley H, Beasley O, Beck A, Bethel G, Blechschmidt K, Brady N, Bray-Allen S, Bridgeman AM, Brown AJ, Brown MJ, Bonnini D, Bruford EA, Buhay C, Burch P, Burford D, Burgess J, Burrill W, Burton J, Bye JM, Carder C, Carrel L, Chako J, Chapman JC, Chavez D, Chen E, Chen G, Chen Y, Chen Z, Chinault C, Ciccodicola A, Clark SY, Clarke G, Clee CM, Clegg S, Clerc-Blankenburg K, Clifford K, Cobley V, Cole CG, Conquer JS, Corby N, Connor RE, David R, Davies J, Davis C, Davis J, Delgado O, Deshazo D, Dhami P, Ding Y, Dinh H, Dodsworth S, Draper H, Dugan-Rocha S, Dunham A, Dunn M, Durbin KJ, Dutta I, Eades T, Ellwood M, Emery-Cohen A, Errington H, Evans KL, Faulkner L, Francis F, Frankland J, Fraser AE, Galgoczy P, Gilbert J, Gill R, Glöckner G, Gregory SG, Gribble S, Griffiths C, Grocock R, Gu Y, Gwilliam R, Hamilton C, Hart EA, Hawes A, Heath PD, Heitmann K, Hennig S, Hernandez J, Hinzmann B, Ho S, Hoffs M, Howden PJ, Huckle EJ, Hume J, Hunt PJ, Hunt AR, Isherwood J, Jacob L, Johnson D, Jones S, de Jong PJ, Joseph SS, Keenan S, Kelly S, Kershaw JK, Khan Z, Kioschis P, Klages S, Knights AJ, Kosiura A, Kovar-Smith C, Laird GK, Langford C, Lawlor S, Leversha M, Lewis L, Liu W, Lloyd C, Lloyd DM, Loulseged H, Loveland JE, Lovell JD, Lozado R, Lu J, Lyne R, Ma J, Maheshwari M, Matthews LH, McDowall J, McLaren S, McMurray A, Meidl P, Meitinger T, Milne S, Miner G, Mistry SL, Morgan M, Morris S, Müller I, Mullikin JC, Nguyen N, Nordsiek G, Nyakatura G, O'Dell CN, Okwuonu G,

Palmer S, Pandian R, Parker D, Parrish J, Pasternak S, Patel D, Pearce AV, Pearson DM, Pelan SE, Perez L, Porter KM, Ramsey Y, Reichwald K, Rhodes S, Ridler KA, Schlessinger D, Schueler MG, Sehra HK, Shaw-Smith C, Shen H, Sheridan EM, Shownkeen R, Skuce CD, Smith ML, Sotheran EC, Steingruber HE, Steward CA, Storey R, Swann RM, Swarbreck D, Tabor PE, Taudien S, Taylor T, Teague B, Thomas K, Thorpe A, Timms K, Tracey A, Trevanion S, Tromans AC, d'Urso M, Verduzco D, Villasana D, Waldron L, Wall M, Wang Q, Warren J, Warry GL, Wei X, West A, Whitehead SL, Whiteley MN, Wilkinson JE, Willey DL, Williams G, Williams L, Williamson A, Williamson H, Wilming L, Woodmansey RL, Wray PW, Yen J, Zhang J, Zhou J, Zoghbi H, Zorilla S, Buck D, Reinhardt R, Poustka A, Rosenthal A, Lehrach H, Meindl A, Minx PJ, Hillier LW, Willard HF, Wilson RK, Waterston RH, Rice CM, Vaudin M, Coulson A, Nelson DL, Weinstock G, Sulston JE, Durbin R, Hubbard T, Gibbs RA, Beck S, Rogers J, Bentley DR. (2005). "The DNA sequence of the human X chromosome." Nature 434(7031): 325-37.

Ryttsen, F., Farre, C., Brennan, C., Weber, S. G., Nolkrantz, K., Jardemark, K., Chiu, D. T., Orwar, O. (2000). "Characterization of single-cell electroporation by using patch-clamp and fluorescence microscopy." Biophys J 79(4): 1993-2001.

Schierloh, A. "Neurolnale Netzwerke und deren Plastizität im Barrel-Kortex der Ratte". 10, Dissertation.

Seitz, A., Kojima, H., Oiwa, K., Mandelkow, E. M., Song, Y. H., Mandelkow, E. (2002). "Single-molecule investigation of the interference between kinesin, tau and MAP2c." Embo J 21(18): 4896-905.

Seleverstov, O., Zabirnyk, O., Zscharnack, M., Bulavina, L., Nowicki, M., Heinrich, J. M. (2006). "Quantum dots for human mesenchymal stem cells labeling. A size-dependent autophagy activation." Nano Lett 6(12): 2826-32.

Shepert GM (1990) The Synaptic Organization of the Brain. New York: Oxford University Press.

Shim, M. and P. Guyot-Sionnest (2000). "n-type colloidal semiconductor nanocrystals." Nature 407(6807): 981-3.

Shimizu, K. T., Woo, W. K., Fischer, B. R., Eisler, H. J., Bawendi, M. J. (2002).

"Surface-enhanced emission from single semiconductor nanocrystals." Phys Rev Lett 89(11): 117401.

Slotkin, J. R., Chakrabarti, L., Dai, H. N., Carney, R. S., Hirata, T., Bregman, B. S., Gallicano, G. I., Corbin, J. G., Haydar, T. F. (2007). "In vivo quantum dot labeling of mammalian stem and progenitor cells." Dev Dyn 236(12): 3393-401.

Stuart, G. J., Dodt, H. U., Sakmann, B. (1993). "Patch-clamp recordings from the soma and dendrites of neurons in brain slices using infrared video microscopy." Pflugers Arch 423(5-6): 511-8.

Su, J., Zhang, J., Liu, L., Huang, Y., Mason, R. P. (2008). "Exploring feasibility of multicolored CdTe quantum dots for in vitro and in vivo fluorescent imaging." J Nanosci Nanotechnol 8(3): 1174-7.

Sukharev, S. I., Klenchin, V. A., Serov, S. M., Chernomordik, L. V., Chizmadzhev, Y. u. A. (1992). "Electroporation and electrophoretic DNA transfer into cells. The effect of DNA interaction with electropores." Biophys J 63(5): 1320-7.

Sundara Rajan, S. and T. Q. Vu (2006). "Quantum dots monitor TrkA receptor dynamics in the interior of neural PC12 cells." Nano Lett 6(9): 2049-59.

Sutor, B. and H. J. Luhmann (1995). "Development of excitatory and inhibitory postsynaptic potentials in the rat neocortex." Perspect Dev Neurobiol 2(4): 409-19.

Szentagothai, J. (1978). "The Ferrier Lecture, 1977. The neuron network of the cerebral cortex: a functional interpretation." Proc R Soc Lond B Biol Sci 201(1144): 219-48.

Teruel, M. N., Blanpied, T. A., Shen, K., Augustine, G. J., Meyer, T. (1999). "A versatile microporation technique for the transfection of cultured CNS neurons." J Neurosci Methods 93(1): 37-48.

Teruel, M. N. and T. Meyer (1997). "Electroporation-induced formation of individual calcium entry sites in the cell body and processes of adherent cells." Biophys J 73(4): 1785-96.

Triller, A. and D. Choquet (2005). "Surface trafficking of receptors between synaptic and extrasynaptic membranes: and yet they do move!" Trends Neurosci 28(3): 133-9.

Tryfona, T. and M. T. Bustard (2006). "Enhancement of biomolecule transport by electroporation: a review of theory and practical application to transformation of *Corynebacterium glutamicum*." Biotechnol Bioeng 93(3): 413-23.

Tsay, J. M. and X. Michalet (2005). "New light on quantum dot cytotoxicity." Chem Biol 12(11): 1159-61.

Vanmaekelbergh, D. and P. Liljeroth (2005). "Electron-conducting quantum dot solids: novel materials based on colloidal semiconductor nanocrystals." Chem Soc Rev 34(4): 299-312.

Voura, E. B., Jaiswal, J. K., Mattoussi, H., Simon, S. M. (2004). "Tracking metastatic tumor cell extravasation with quantum dot nanocrystals and fluorescence emission-scanning microscopy." Nat Med 10(9): 993-8.

Vu, T. Q., Maddipati, R., Blute, T. A., Nehilla, B. J., Nusblat, L., Desai, T. A. (2005). "Peptide-conjugated quantum dots activate neuronal receptors and initiate downstream signaling of neurite growth." Nano Lett 5(4): 603-7.

Watson, A., Wu, X., Bruchez, M. (2003). "Lighting up cells with quantum dots." Biotechniques 34(2): 296-300, 302-3.

Wells, J., Kao, C., Janson, E. D., Konrad, P., Mahadevan-Jansen, A. (2005). "Application of infrared light for in vivo neural stimulation." J Biomed Opt 10(6): 064003.

Wise, S. P. and E. G. Jones (1978). "Developmental studies of thalamocortical and commissural connections in the rat somatic sensory cortex." J Comp Neurol 178(2): 187-208.

Wong, B. J. and R. L. Crumley (1995). "Nerve wound healing. An overview." Otolaryngol Clin North Am 28(5): 881-95.

Wu, X., Liu, H., Liu, J., Haley, K. N., Treadway, J. A., Larson, J. P., Ge, N., Peale, F., Bruchez, M. P. (2003). "Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots." Nat Biotechnol 21(1): 41-6.

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schichtung des Neokortex höherer Säugetiere. Links: Golgi-Imprägnation. Rechts: Nisselfärbung. Verändert nach Creutzfeld (1983).	3
Abbildung 2 Schichtung des Neokortex 1-6. Exemplarisch ein Pyramidenneuron der Lamina 5 und ein nicht-pyramidales Neuron der Lamina 4. Verändert nach Kelley und Dodd (1991). 7	
Abbildung 3 Schematische Zeichnung des Quantum Dot-Moleküls. Evident Technologies, USA (2004).	8
Abbildung 4 3-D-Modell eines Quantum Dot. Evident Technologies, USA (2004).	9
Abbildung 5 Absorptionsspektrum von QDs. Evident Technologies, USA (2004).	9
Abbildung 6 „Whole-Cell“-Ableitung in neokortikalen Hirnschnitten der Ratte. Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Verändert nach Eder (2000).	19
Abbildung 7 Ersatzschaltbild der Ganzzelleableitung	22
Abbildung 8 Pyramidenneuron bipolar	32
Abbildung 9 Pyramidenneurone monopolar und bipolar	33
Abbildung 10 Multipolares Pyramidenneuron	34
Abbildung 11 Pyramidenneuron triangulär	35
Abbildung 12 Pyramidenneuron monopolar	36
Abbildung 13 Pyramidenneuron bipolar	37
Abbildung 14 Pyramidenneuron monopolar	38
Abbildung 15 Pyramidenneuron bipolar	39
Abbildung 16 Pyramidenneuron monopolar	40
Abbildung 17 Pyramidenneuron monopolar	41
Abbildung 18 Klassifikation der Pyramidenneurone nach Qualität	42
Abbildung 19 Vergleich der QD-Klassen	43
Abbildung 20 Methodenvergleich	44

7.3 Abkürzungsverzeichnis

ACSF	Künstliche Cerebrospinalflüssigkeit (artificial cerebrospinal fluid)
AMPAr	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure (“propionic acid”)
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovine serum albumin
Cd	Kadmium
CdTe	Kadmium Tellurid
CdSe	Kadmium Selenid
Cm	Membrankapazität
CT	Computertomographie
DBT-I	Deep brain tissue imaging
DIC	Differenzial Interferenzkontrast
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGFr	Epidermal growth factor receptor
EGTA	Bis-(Aminoethyl)-glycoether-N,N,N',N'-tetraacetat
G	Giga
GABA	Gamma-aminobuttersäure
GC	Gradienten Kontrast
GFP	Green fluorescent protein
GRIN	Linsen-Gradient-Index
Hela-Zellen	Menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms
HEPES	2-4-2-Hydroxyethyl-1-piperazinyl-ethansulfonsäure
Hz	Hertz
IR	Infrarot
M	Mega, Meter
MRI	Magnetic Resonance Imaging
NGF	Nerve growth factor

PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PC-12-Zellkultur	Phäochromozytom-Zelllinie der Ratte
QD	Quantum Dots
Q-Tracks	Quantum-Tracks
RM	Membranwiderstand
RNA	Ribonukleinsäure
RS	Serienwiderstand
SPT	Single Particle Tracking
Streptavidin-Arg-QD	Streptavidin-Arginin-Quantum Dots
TrKa	Tropomyosin-Rezeptor-Kinase Typ A
V	Volt
Z.b.	Zum Beispiel
ZNS	Zinksulfatschale
3-D-Modell	Drei-Dimensionen-Modell

7.4 Verwendete Substanzen

Alkohol, 40%-100%	ml	Merck
CaCl ₂	2 mM	Merck
Depex	ml	Merck
EGTA	0,5 mM	Merck
Ethellan	ml	Merck
Formalin	4%	Merck
Glukose	5-25 mM	Merck
HEPES	10 mM	Biomol
Isofluran	ml	Merck
K ⁺ -Gluconat	130 mM	Fluka

KCL	2,5-5 mM	Merck
KOH	1 mM	Merck
Methylsalicylat	ml	Merck
MG-ATP	2 mM	Sigma
MgCl ₂	1-4 mM	Merck
NaCl	125 mM	Merck
NaHCO ₃	25 mM	Merck
NaH ₂ PO ₄	1,25 mM	Merck
Neurobiotin	mM	Merck
QD-Biotin 655 nm	mM	Quantum Dot Corporation
QD-Streptavidin 655 nm	mM	Quantum Dot Corporation
QD Tracks 705 nm	mM	Quantum Doz Corporation
Streptavidin-Arg 9	mM	Quantum Dot Corporation
Sulforhodamin	mM	Merck
Xylol	ml	Merck

7.5 Danksagung

An erster Stelle möchte ich herzlich Herrn Prof. Dr. W. Zieglgänsberger danken, der mir mit seiner Unterstützung die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht hat.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. F. Holsboer bedanke ich mich für die Erlaubnis zur Nutzung sämtlicher Einrichtungen seines Hauses.

Herrn Prof. Dr. H.-U. Dodt danke ich für die Vergabe des Themas und die gute Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H. Adelsberger möchte ich herzlich für die externe Betreuung, seine Anregungen, sein Interesse und seine Hilfsbereitschaft danken.

Bei Frau C. Hilf und Frau C. Hetzel bedanke ich mich für die technische Unterstützung.

Allen Mitarbeitern der Abteilung Klinische Neuropharmakologie danke ich für die stete Hilfsbereitschaft und menschliche Atmosphäre. Für zahlreiche wissenschaftliche sowie persönliche Gespräche möchte ich mich insbesondere bei Mathias, Anja, Klaus und Diana bedanken.

7.6 Lebenslauf

Ruben Bullinger

Geboren 19. 03. 1976 in Wiesbaden

verlobt, zwei Kinder

ELTERN

Volker Bullinger, Oberstudienrat

Sonnhild Bullinger, Sozialpädagogin

SCHULBILDUNG

1982–1995

Freie Waldorfschule Wangen

1995–1997

Abitur an der Freien Waldorfschule Überlingen

ZIVILERSATZDIENST

1997-1998

Klinikum Rechts der Isar, Abteilung für Sportorthopädie,
OP, Prof. Dr. A. B. Imhoff

BERUFLICHE TÄTIGKEIT

1998-2000

Beschäftigung als Flugbegleiter
Lufthansa AG

2001

Ausbildung zum Rettungssanitäter
MKT München

STUDIUM

seit Mai 2000

Studium der Humanmedizin,
Ludwig-Maximilians-Universität München

November 2008

Staatsexamen

Januar 2009

Approbation als Arzt

BERUFLICHE TÄTIGKEIT

Seit Juli 2009

Anstellung als Assistenzarzt in der Abteilung für diagnostische und interventionelle Radiologie am Klinikum Traunstein.

PROMOTION

Seit Oktober 2003

zum Doktor der Medizin bei Prof. Dr. W. Zieglgänsberger am Max-Planck Institut für Psychiatrie, Abteilung Klinische Neuropharmakologie, München.

7.7 Erlahrung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbststandig verfaßt und keine anderen Hilfsmittel und Quellen als die angegebenen benutzt zu haben.

.....

Ruben Bullinger

Fridolfing, Februar 2012