

Volkmar Leßmann, Heiko J. Luhmann, Silke Patz, Petra Wahle

Otto-von-Guericke-Universität, Magdeburg;

Johannes Gutenberg-Universität; Mainz;

Ruhr-Universität Bochum

**Regulation der molekularen, strukturellen und physiologischen
Differenzierung durch physiologische, elektrische Aktivitätsmuster im
neonatalen Säugercortex**



Fördernummer: T287/16255/2006 und T255/16914/2006

Fördernummern: 472 240/990 014 (Magdeburg) / 6101 28286 (Mainz) / 91000/28211/7114607 (Bochum)

Angaben zu den Autoren, falls notwendig

Name, Vorname, akad. Grad:
Dienststellung:
Geburtsdatum:
Dienstadresse:

Luhmann, Heiko J., Prof. Dr. rer. nat.
W3-Universitätsprofessor für Physiologie
13.04.1958
Johannes Gutenberg-Universität
Institut für Physiologie und Pathophysiologie
Duesbergweg 6, 55128 Mainz
(06131) 39-26070 oder -25944
(06131) 39-26071
<mailto:luhmann@uni-mainz.de>
<http://physiologie.uni-mainz.de/physio/luhmann/index.htm>

Telefon:
Fax:
email:
website:

Name, Vorname, akad. Grad:
Dienststellung:
Geburtsdatum:
Dienstadresse:

Leßmann, Volkmar, Prof. Dr. rer. nat.
W3-Universitätsprofessor für Physiologie
28.04.1964
Otto-von-Guericke-Universität
Institut für Physiologie
Leipziger Str. 44
39120 Magdeburg
(0391) 67-14282
(0391) 67-15819
lessmann@med.ovgu.de
<http://www.med.uni-magdeburg.de/fme/institute/iphy>

Tel:
Fax:
email:
website:

Name, Vorname, akad. Grad:
Dienststellung:
Geburtsdatum:
Dienstadresse:

Wahle, Petra, Prof. Dr. rer.nat.
C3-Universitätsprofessorin für Entwicklungsneurobiologie
21.03.1958
Ruhr-Universität Bochum, ND 6/72
Allgemeine Zoologie und Neurobiologie
44780 Bochum
(0234) 32-24367
(0234) 32-14186
<mailto:wahle@neurobiologie.ruhr-uni-bochum.de>
http://www.ruhr-unibochum.de/neurobiol/mitarbei/petra_wahle/e_pwahle.htm

Telefon:
Fax:
email:
website:

Name, Vorname, akad. Grad:
Dienststellung:
Geburtsdatum:
Dienstadresse:

Patz, Silke, Dr. rer.nat.
Wissenschaftliche Mitarbeiterin
14.10.1971
Ruhr-Universität Bochum, ND 6/72
Allgemeine Zoologie und Neurobiologie
44780 Bochum, Germany
(0234) 32-24344
(0234) 32-14186
<mailto:silke.patz@ruhr-uni-bochum.de>
<http://www.ruhr-uni-bochum.de/neuro-gk/patz.htm>

Telefon:
Fax:
email:
website:

Regulation der molekularen, strukturellen und physiologischen Differenzierung durch physiologische, elektrische Aktivitätsmuster im neonatalen Säugercortex

Heiko J. Luhmann, Volkmar Leßmann, Silke Patz, Petra Wahle

Zusammenfassung

Neuronale Netzwerke weisen während früher Entwicklungsphasen spontane elektrische Aktivitätsmuster auf, die lokale Ensembles synchronisieren und funktionell koppeln. Für den cerebralen Cortex von neugeborenen Kleinnagern konnten wir unter in vivo und in vitro Bedingungen die Eigenschaften und zugrundeliegenden Mechanismen dieser frühen Netzwerksynchronisationen beschreiben. Unklar war bisher die Funktion dieser Aktivitätsmuster in sich entwickelnden Hirnstrukturen. Unsere Experimente zeigen, dass Nervenwachstumsfaktoren (Neurotrophine), insbesondere *brain-derived neurotrophic factors* (BDNF), durch diese Netzwerkoszillationen freigesetzt werden. BDNF fördert nicht nur die Kopplung synaptischer Netzwerke, sondern hemmt auch den programmierten Zelltod. Weiterhin fördert BDNF auch direkt die Differenzierung von unreifen corticalen Nervenzellen.

Unsere Befunde lassen vermuten, dass frühe, beim Menschen pränatale Störungen dieser synchronen Aktivitätsmuster, einen erheblichen Einfluss auf die Entstehung unreifer neuronaler Netzwerke ausüben. Zukünftig möchten wir die Konsequenzen dieser pathophysiologischen Störfaktoren, wie Sauerstoffmangel, mütterlicher Drogenkonsum etc., auf die vorgeburtliche Entwicklung des Gehirns untersuchen.

Einleitung

Bereits während der Embryonalphase und kurz nach der Geburt weisen viele Regionen im Gehirn der Säugetiere spontane und synchrone elektrische Aktivitätsmuster auf. Sie wurden bei allen untersuchten Säugetieren inklusive des Menschen sowohl im Rückenmark als auch in der Hirnrinde und im Hippocampus gefunden. Sie werden als „frühe Netzwerkoszillationen“, als „Calcium-Wellen“, in der Netzhaut des Auges als „retinale Wellen“, oder als „große depolarisierende Potentiale“ bezeichnet. Diese Wellen von Erregung breiten sich in regelmäßigen zeitlichen Abständen durch die Hirnregionen aus und wandern sogar über die gerade erst gebildeten axonalen Projektionsbahnen zwischen unterschiedlichen Hirnregionen. Die Erregung bezieht sowohl die Nervenzellen als auch die ersten bereits vorhandenen

Gliazellen ein. Die Erregungswellen werden über GABAerge und glutamaterge Rezeptoren des Typs AMPA/Kainat und NMDA vermittelt. Daneben sind elektrische Kontaktstellen an ihrer Entstehung und Ausbreitung beteiligt (Luhmann und Mitarbeiter, Mainz). Wir wissen außerdem, dass Calcium-Ionenströme besonders wichtig für die Ausbreitung der Aktivitätsmuster sind. Die hirntypischen unterschiedlichen pharmakologischen Grundlagen und die zellphysiologischen Eigenschaften dieser Erregungswellen wurden in den vergangenen Jahren recht gut aufgeklärt.

Wozu sind diese Aktivitätsmuster gut?

Diese Frage war unzureichend beantwortet und hier setzt unsere gemeinsame Forschung im Rahmen der Förderung durch die Schram-Stiftung an. Es wird vermutet, dass die Erregungswellen zur Selbstorganisation neuronaler *Ensembles* beitragen, welche dann später postnatal während sogenannter kritischer Perioden für sensorische Plastizität erfahrungsabhängig modifiziert werden. Die Erregungswellen sind also einem Dirigenten vergleichbar, der einem Chor junger unerfahrener Nervenzellen in rhythmische Aktivität integriert und so ein Konzert ermöglicht. Dieses neuronale Konzert wird zur Ausreifung der Nervenzellen und ihrer Verbindungen benötigt. Sobald die Nervenzellen in einem unreifen Netzwerk miteinander verknüpft sind, beginnen sie verstärkt auf die sensorischen Einflüsse (sehen, fühlen, hören) zu reagieren und erproben ihre Kompetenz zur Verarbeitung dieser Signale aus den Sinnesorganen. Eine Leberzelle weiß von Anfang an, welche ihre Aufgaben im Stoffwechsel sind und jede einzelne Zelle kann diese Aufgabe allein vollbringen. Gehirnzellen funktionieren sinnvoll nur in korrekt verschalteten Netzwerken. Deshalb sind Gehirne gebrauchsbabhängig optimierte, lernfähige Organe. Die jungen Nervenzellnetzwerke müssen die Befähigung zum Lernen jedoch erst erwerben. Wir vermuten, dass die frühen Aktivitätsmuster bei diesem Prozess eine wichtige Rolle spielen.

Junge Nervenzellen wollen leben, wachsen und neue Kontakte knüpfen

Wie können die Erregungswellen als Dirigenten dienen und welche Leistungen der Nervenzellen können sie fördern? Neue Befunde deuten darauf hin, dass sie bei Nagetieren embryonal und in den ersten zwei Wochen nach der Geburt zunächst einmal erfahrungsunabhängige Änderungen in der Expression von Genen und somit der Produktion von Eiweißstoffen hervorrufen. Man weiß, dass die Stärke und die Häufigkeit der elektrischen Signale ganz direkt die Qualität der Genexpression beeinflusst.

Wir konnten in einem neuartigen, intakten ex-vivo Präparat des cerebralen Cortex von neugeborenen Mäusen synchronisierte Oszillationen nachweisen (Luhmann und Mitarbeiter,

Mainz) (Dupont et al., 2006). Diese Oszillationen liegen im Frequenzbereich von 5 bis 20 Hertz mit einer Dauer von wenigen Sekunden. Dieses Muster ist recht stereotyp und wurde im unreifen Gehirn vieler Tierarten gefunden und tritt beim Menschen vermutlich ebenfalls vor der Geburt auf. Daraus lässt sich schliessen, dass dieses Erregungsmuster stammesgeschichtlich sehr alt ist, und dass es sich bereits früh in der Evolution der Wirbeltiere als nützlich und wirksam herausgebildet hat. Interessanterweise konnte Luhmann und Mitarbeiter die Oszillationen synchron in sogenannten "Prä-Kolumnen" nachweisen. Diese gelten als juvenile Form der späteren säulenförmig-modular in der Hirnrinde angeordneten Verarbeitungseinheiten. Neuronen in diesen Kolumnen haben gelernt, sich bevorzugt untereinander zu verschalten, um bestimmte Informationseinheiten (zum Beispiel die Form oder die Farbe eines Objekts) aus den Sinnesorganen gemeinsam verarbeiten können. Man weiß, dass die Entstehung der Verschaltungspunkte zwischen Nervenzellen, die Synapsen, durch bestimmte Nervenwachstumsfaktoren (Neurotrophine) gefördert werden. Tatsächlich konnten wir (Luhmann und Wahle und Mitarbeiter, Mainz und Bochum) kürzlich beobachten, dass dieses Aktivitätsmuster selektiv die Produktion des *brain-derived neurotrophic factors*, BDNF, induziert, nicht jedoch die Produktion der anderen drei Neurotrophine fördert. BDNF dient als wachstumsfördernder Signalstoff zwischen den Nervenzellen. BDNF ist von großer Bedeutung und hat eine Vielzahl von akuten und längerfristigen Wirkungen.

Weiterhin konnten wir (Luhmann und Leßmann und Mitarbeiter, Mainz und Magdeburg) in einer Veröffentlichung zeigen (Heck et al., 2008), dass die elektrische Aktivität in der reifenden Hirnrinde das Ausmaß des programmierten Zelltods (sog. Apoptose) kontrolliert. Abbildung 1 zeigt, dass die Aktivität zum Überleben der Zellen beiträgt. Sterbende Zellen wurden hier grün markiert und erwartungsgemäß befindet sich ein gewisser Anteil der Nervenzellen im Prozess des programmierten Zelltods. Blockiert man die elektrische Aktivität mit Tetrodotoxin, dem Gift des Kugelfisches, dann verdoppelt sich die Zahl der sterbenden Zellen. Die Erregungswellen tragen somit dazu bei, dass vermutlich über die Freisetzung von Nervenwachstumsfaktoren wie BDNF das Überleben gefördert wird.

Ein solcher Zusammenhang zwischen elektrischer Aktivität und Ausschüttung von BDNF wurde durch unsere Veröffentlichung (Leßmann und Mitarbeiter, Magdeburg) (Kuczewski et al., 2008) gezeigt: spontan auftretende erregende Ereignisse können tatsächlich die Freisetzung von BDNF aus Nervenzellen bewirken (Abb. 2). Besonders wirkungsvoll sind wiederholte Folgen von etwa 5 Aktionspotentialen im Bereich der sog. Theta-Frequenz. Dieser Frequenzbereich ist für Neuronen des Hippocampus und des Neocortex physiologisch höchst bedeutsam. Dazu wurde grün leuchtendes BDNF in jungen Neuronen zur Expression gebracht. Nach der Gabe von Reizen im Theta-Frequenzbereich können wir die Abnahme der grünen Leuchtstärke

messen: dies geschieht immer dann, wenn die Nervenzellen den markierten Signalstoff in den extrazellulären Raum ausschütten. In folgenden Arbeiten gilt es nun, den Kausalzusammenhang zwischen dem ausgeschütteten BDNF und dem neuronalen Überleben zu untersuchen.

Kompliziert wird die Angelegenheit durch unsere Befunde (Luhmann und Mitarbeiter, Mainz), dass in der Hirnrinde der neugeborenen Maus nicht nur eine Art von Erregungswelle auftritt, sondern in vitro und in vivo spezifische Typen physiologischer Aktivitätsmuster zu beobachten sind. So sind in den ersten Tagen nach der Geburt Erregungswellen durch Carbachol auslösbar. Die Substanz aktiviert eine bestimmte Sorte von Rezeptoren für den Transmitter Acetylcholin, dessen Fehlen im Zusammenhang mit der unheilbaren Alzheimer'schen Demenzerkrankung diskutiert wird. Wir können zeigen (Wahle und Patz, Bochum), dass eine akute Carbachol-Stimulation die BDNF-Produktion anregt. Wir nutzen dazu als Modellsystem langlebige organotypische Hirnschnittkulturen, die ebenfalls spontane Erregungsmuster entwickeln. Tage nach der Stimulation wurden die Nervenzellen durch das Einschleusen des grün-fluoreszierenden Proteins mit Hilfe einer Gen-Kanone sichtbar gemacht. Dies erlaubt, die Ausläufer der Neuronen zu rekonstruieren. Abbildung 3 zeigt zwei Pyramidalneuronen der Hirnrinde: nach der Carbachol-Stimulation bilden die Zellen mehr Verzweigungen.

Wenn Nervenzellen nach Carbachol-Applikation besser überleben und sich besser mit wichtigen Wachstumsfaktoren versorgen können und daher schneller wachsen, dann ist zu vermuten, dass sie auch schneller synaptische Kontakte knüpfen. Wir untersuchen zur Zeit weitere Botenstoffe, die durch die Carbachol-Stimulation vermehrt produziert werden, und von denen man weiß, dass sie fördernd auf die Bildung von Synapsen wirken können. Wir haben bereits eine Reihe von molekularen Bausteinen für Synapsen zu verschiedenen Zeitpunkten und bis zu 3 Wochen nach einer frühen Carbachol-Stimulation untersucht. Entgegen unserer Annahme waren diese Moleküle jedoch völlig unverändert exprimiert (Wahle und Mitarbeiter, Bochum). Möglicherweise sorgen die Erregungswellen weniger für die Bildung von Synapsen als vielmehr dafür, dass bereits gebildete Synapsen auch aktiv werden

Carbachol löst kurz nach der Geburt Erregungswellen aus. Sechs bis acht Tage nach der Geburt kann der Transmitter Serotonin ebenfalls eine massive Netzwerkaktivität auslösen. Wir (Wahle und Patz, Bochum) in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Kurt Gottmann, Universität Düsseldorf, zeigen, dass Serotonin die Häufigkeit des Auftretens erregender GABAerger Signale nur während dieser Zeit 10-fach erhöht. Die Serotonin-vermittelte Aktivität dient als Instruktor für die GABAergen Interneuronen der Hirnrinde. In der isolierten organotypischen Hirnschnittkultur fehlt Serotonin. Die Expression der GABA-synthetisierenden

Glutamat Decarboxylasen, GADs, ist dahingehend verändert, dass die GAD-65 Transkription doppelt so hoch ist wie in vivo, der GAD-67 Proteingehalt aber nur halb so hoch und die Expression beider Gene und Proteine wird in kurzer Zeit unabhängig von der elektrischen Aktivität. Eine durch Serotonin von Tag 5-9 ausgelöste Netzwerkaktivität erzeugt an Tag 20 eine organ-identische GAD-65 Transkriptionsrate und die Expression beider Enzyme bleibt aktivitätsabhängig. Letzteres gilt als eine Grundvoraussetzung für Plastizitätsprozesse der jungen Hirnrinde und für verletzungsbedingte Reorganisationsprozesse in der adulten Hirnrinde.

Ausblick

Die seit Jahrzehnten in der Entwicklungsneurobiologie geführte "*Nature versus Nurture*" Debatte kann in Anbetracht der neuen molekularbiologischen und elektrophysiologischen Befunde zur frühen Hirnentwicklung als ein "*Nature and Nurture*"-Prozess mit gegenseitiger Wechselwirkung verstanden werden. Es wird spannend sein herauszufinden, welcher Einfluß zu welchen Entwicklungszeitpunkten welche Funktion erfüllt. Vielleicht lassen sich Einflußmöglichkeiten charakterisieren, die es erlauben, das junge Gehirn bei der Reifung zu unterstützen, um Beeinträchtigungen der Hirnentwicklung bei Frühgeborenen oder Kindern mit genetisch bedingten oder früh erworbenen Defiziten der Hirnreifungsprozesse zu kompensieren.

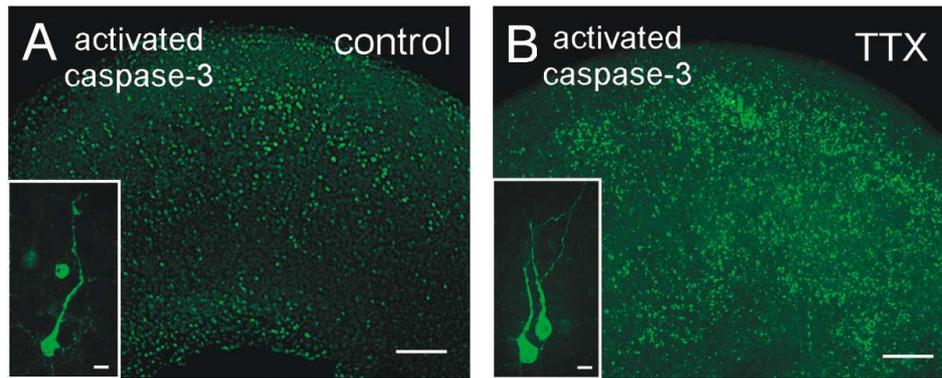


Abb. 1. Eine Blockade der elektrischen Aktivität führt zu Zunahme des programmierten Zelltods in der frühen Entwicklung des zerebralen Cortex. (A) Photographie einer 5 Tage alten organotypischen Hirnschnittkultur aus dem zerebralen Cortex einer neugeborenen Maus. Der Schnitt wurde immunocytochemisch mit einem Antikörper gegen aktivierte Caspase-3 gefärbt. Mit dieser Technik erhält man eine Momentaufnahme der akut sterbenden Nervenzellen (s. Ausschnittsvergrößerung). Jeder grüne Punkt markiert eine absterbende Nervenzelle. (B) Identische Bedingungen wie in (A), jedoch wurde die Kultur mit dem Gift Tetrodotoxin (TTX) behandelt, um die spontane elektrische Aktivität im neuronalen Netzwerk komplett zu blockieren. Die Anzahl absterbender Nervenzellen ist unter diesen Bedingungen deutlich erhöht. Weisse Skalierungsbalken in (A) und (B) entsprechen 200 μm , in den Ausschnittsvergrößerungen 10 μm . Aus: (Heck et al., 2008)

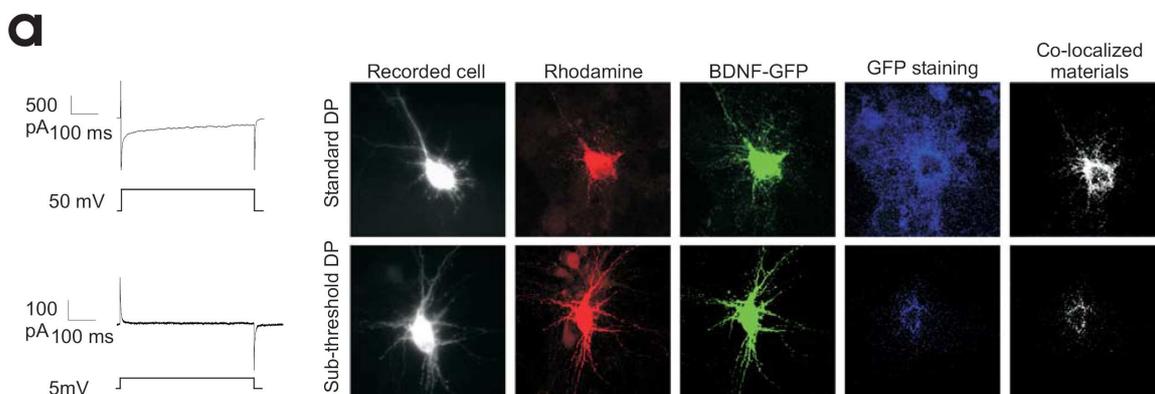
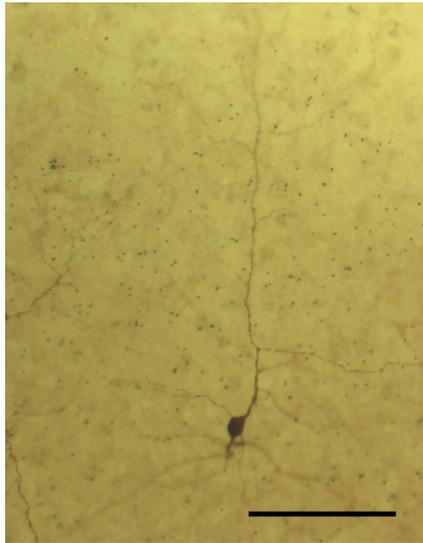


Abb 2. Pyramidalneurone 10 Tage nach der Geburt in Zellkultur. Die Zellen wurden über eine Pipette mit rotem Farbstoff (Rhodamine) gefüllt und elektrophysiologisch abgeleitet, um Ströme zu messen (links), die eine Sekretion von grün markiertem BDNF (BDNF-GFP) herbeiführen. Extrazelluläres BDNF wurde mit einem Antikörper (blau) sichtbar gemacht. Die Bilder auf der rechten Seite zeigen das freigesetzte BDNF auf der Zelloberfläche. Aus: (Kuczewski et al., 2008)

A Kontrolle



B CCH

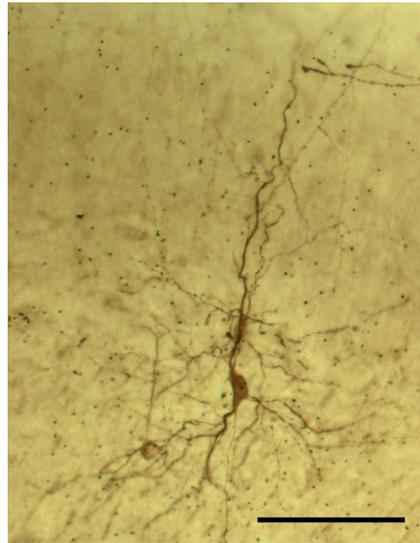


Abb. 3. Pyramidalneurone 10 Tage nach der Geburt in der Hirnschnittkultur. Der Skalierungsbalken in (A) und (B) entspricht 100 μm . Die in B gezeigte Kultur wurde von Tag 1-5 mit Carbachol stimuliert.

Referenzen

Dupont E, Hanganu IL, Kilb W, Hirsch S, Luhmann HJ (2006) Rapid developmental switch in the mechanisms driving early cortical columnar networks. *Nature* 439:79-83.

Heck N, Golbs A, Riedemann T, Sun JJ, Lessmann V, Luhmann HJ (2008) Activity-dependent regulation of neuronal apoptosis in neonatal mouse cerebral cortex. *Cereb Cortex* 18:1335-1349.

Kuczewski N, Porcher C, Ferrand N, Fiorentino H, Pellegrino C, Kolarow R, Lessmann V, Medina I, Gaiarsa JL (2008) Backpropagating action potentials trigger dendritic release of BDNF during spontaneous network activity. *J Neurosci* 28:7013-7023.