

Die Rolle dendritischer im Vergleich zu somanaher synaptischer Kommunikation in der Generierung schneller Gehirnrhythmen

Förderprogramm 2011 der Schram-Stiftung

Projektnummer T287/21797/2011

Marlene Bartos, Prof. Dr.
29.09.1962
Institut für Physiologie I
Hermann-Herder Straße 7
D-79104 Freiburg i. Br.
Tel: +49 761 203 5150/5194
Fax: +49 761 203 5204
e-mail: marlene.bartos@physiologie.uni-freiburg.de

Das menschliche Gehirn besteht aus ~200 Billionen kleinster Prozessierungseinheiten, den Nervenzellen, die miteinander über Kommunikationspunkte in Kontakt stehen und damit komplexe neuronale Netzwerke bilden. Während der Prozessierung und Kodierung von Information treten in diesen Netzwerken rhythmische Aktivitäten auf. Vergleichbar mit einem tickenden Uhrwerk dienen Gehirnrhythmen der zeitlichen Repräsentation von Information und nehmen damit eine zentrale Rolle in der Kodierung und Speichern von Information ein. Das Gehirn setzt sich aus zahlreichen Typen von Nervenzellen zusammen. Welche Rolle die verschiedenen Neurontypen in der Entstehung dieser Oszillationen einnehmen, ist allerdings weitgehend unklar. Am Modellsystem Hippokampus werden wir daher unter Verwendung modernster molekularbiologischer Techniken die Funktion auserwählter Neurontypen in der Generierung von Gammaoszillationen untersuchen.

Rhythmische Netzwerkaktivitäten treten mit verschiedenen Frequenzen zwischen 0.5 und 600 Hz auf. In diesem breiten Spektrum haben insbesondere Gammaoszillationen (30-100 Hz) eine hohe Aufmerksamkeit auf sich gezogen, da sie das Substrat kognitiver Funktionen (Gedächtnisbildung, erhöhte Aufmerksamkeit, Lernen) zu sein scheinen. Gammaoszillationen treten insbesondere im Hippokampus mit hoher Reproduzierbarkeit in Zusammenhang mit diversen Verhaltensmustern auf (z.B. während räumlicher Orientierung). Folglich wird der Hippokampus gern als Modellsystem für die Untersuchung zu Grunde liegender Mechanismen herangezogen.

Nervenzellen können grundsätzlich in zwei Hauptgruppen gegliedert werden: Die exzitatorischen glutamatergen Prinzipalzellen und die hemmenden GABAergen Interneurone. Obwohl Interneurone nur ~10% der Nervenzellpopulation bilden, nehmen sie eine Schlüsselfunktion in der Generierung von Gamma rhythmischen ein. Hemmende Nervenzellen können anhand ihrer Morphologie, ihren physiologischen Eigenschaften und der Proteine, die sie exprimieren, in verschiedene Typen gegliedert werden. In dieser Studie planen wir die funktionelle Rolle zweier auserwählter Interneurontypen in der Auslösung von Gammaaktivitäten zu untersuchen.

1. Korbzellen bilden zahlreiche hemmende Kommunikationspunkte (Synapsen) in der Nähe des Zellkörpers ihrer Zielzellen aus. Dies ist eine strategisch perfekte Position, um die Aktivität der Zielzellen zu kontrollieren. Auf Grund ihrer dichten und weitreichenden axonalen Ausläufer (**Abb. 1**) innervieren Korbzellen tausende von Zielzellen. Damit können Sie Einfluss auf die Aktivität großer Neuronpopulationen nehmen. Korbzellen können weiterhin anhand des Kalzium-bindenden Proteins Parvalbumin (PV) eindeutig immunhistochemisch identifiziert werden.

2. Im Gegensatz dazu bilden Somatostatin (SOM; ein Neuropeptid) produzierende Interneurontypen hemmende Synapsen an den dendritischen Ausläufern ihrer Zielzellen aus (**Abb. 1d**). Diese Kontaktpunkte sind räumlich weit vom Zellkörper entfernt und haben somit lokale Effekte auf die Aktivität der Zielzellen. Welche Rolle dieser Zelltyp in Nervenzellverband einnimmt, insbesondere in der Generierung von Gammaoszillationen, ist völlig unklar.

In dem von der Schram-Stiftung geförderten Projekt möchten wir dieser Frage nachgehen, indem wir (1) die funktionellen und dynamischen Eigenschaften hemmender Synapsen SOM-exprimierender Nervenzellen identifizieren. In Schnittpräparaten des Hippokampus werden hierfür Ganzzelleableitungen von einer präsynaptischen SOM-Zelle und ihrer Zielzelle zeitgleich durchführt. Während der Ableitungen werden Zellen mit einem Farbstoff (Biocytin) gefüllt, um sie anschließend anhand ihrer Morphologie zu identifizieren (**Abb. 2**). (2) Für eine schnellere Identifizierung dieses Zelltypes während der Experimente ist es geplant, eine Mauslinie zu etablieren, in der das grün fluoreszierende Protein (GFP) selektiv SOM-Zellen markiert. (3) Wir werden den Einfluß der zellkörpernahen *versus* der zellkörperfernen dendritischen Hemmung auf die Aktivität der Zielzellen untersuchen. Hierfür möchten wir unsere neu entwickelte molekular-biologische Technik einsetzen, mit deren Hilfe wir die Kommunikation von SOM- bzw. PV-Zellen im Tier hemmen. Kürzlich haben wir einen adeno-assoziierten Virus (AAV) konstruiert, der die leichte Kette des Tetanustoxins (TeLC) kodiert. Die Injektion von AAVs in den Hippokampus von PV- oder SOM-Cre Mäusen hat zur Folge, dass TeLC nur in PV- oder nur in SOM-Zellen auftritt und damit die Kommunikation nur dieser Zelltypen mit ihren Zielzellen unterbricht. Unsere bisherigen Untersuchungen in PV-Cre Mäusen zeigen, dass diese Technik funktioniert. Nach der Injektion sollen *in vivo* Ganzzelleableitungen durchgeführt werden, um die Auswirkung des Verlustes des Neurontyps auf die Frequenz und Synchronie von Gammaoszillationen zu quantifizieren. Desweiteren wollen wir prüfen, wie sich die Aktivität der Zielzellen durch den Verlust der somanahen oder dendritischen Hemmung verändert.

Wir sind davon überzeugt, dass die hier genannten Untersuchungen zu einem besseren Verständnis von Neurontypen in der Generierung rhythmischer Netzwerkaktivität und der Prozessierung von Information beitragen werden.

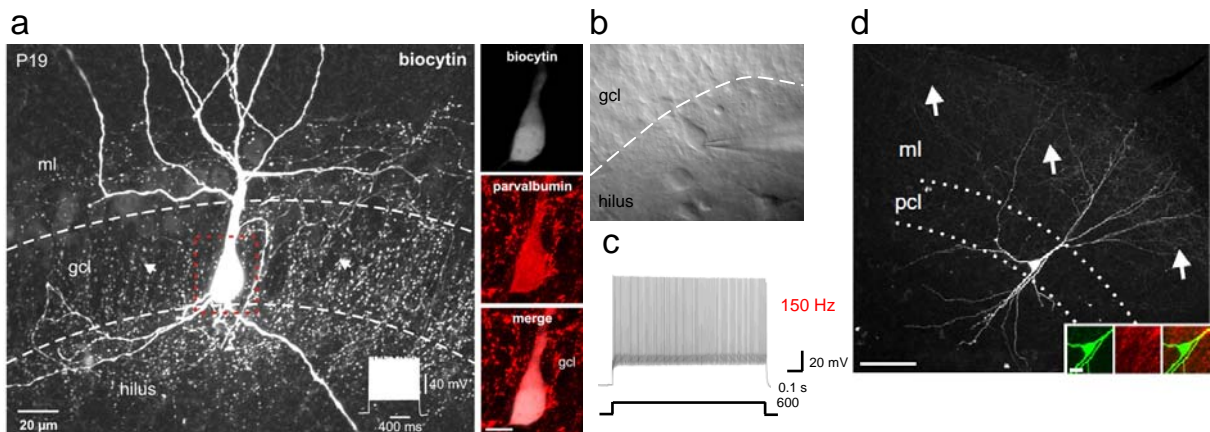


Abbildung 1: Morphologische und immunhistochemische Identifizierung von Korbzellen und dendriten-inhibierenden Interneuronen. (a) Links, Konvokales Bild einer Korbzelle im hippocampalen Gyrus Dentatus der Maus. Die Zelle wurde während einer Ganzzelleableitung im Schnittpräparat des Hippokampus mit Biocytin gefüllt und anschließend mit Avidin-Alexa 488 visualisiert. Sie sehen in der Mitte den Zellkörper mit den nach oben und unten dickeren dendritischen Ausläufern. Über diese Strukturen erhalten Korbzellen synaptische Eingänge. Bitte beachten sie die dichten axonalen Ausläufer (Pfeile), die an Ihren Enden punktförmige Strukturen bilden. Hierbei handelt es sich um putative synaptische Kontakte. Sie erlauben Korbzellen mit ihren Zielzellen zu kommunizieren. Auf Grund des dichten und weitläufigen Axons können Korbzellen mit Tausenden von Zielzellen in Kontakt treten. Rechts, Antikörpermarkierung (rot) gegen das Kalzium-bindende Protein Parvalbumin (PV) derselben Zelle. (b) Oben, Infrarot-Differenzial Kontrast (IR-DIC) mikroskopische Aufnahme einer Korbzelle im Schnittpräparat des Hippokampus. Rechts davon sehen sie die Ableitpipette. IR-DIC Mikroskopie wird eingesetzt, um unter visueller Kontrolle Ganzzelleableitungen von Nervenzellen durchführen zu können. (c) Injektionen positiver langanhaltender Ströme lösen in Korbzellen hochfrequente Aktionspotentiale aus. (d) Intrazelluläre Markierung einer dendriten-inhibierenden Zelle. Das Axon dieses Neurontyps befindet sich in der molekularen Schicht (ml) des Gyrus Dentatus und tritt somit mit den Dendriten ihrer Zielzellen in Kontakt. Dieser Zelltyp ist nicht PV-positiv (siehe Insets unten; grün, intrazelluläre Markierung; rot fehlende PV-Markierung; Skalierung 20 µm). Skalierung 200 µm. Abkürzungen: pcl, pyramidal cell layer; ml molecular layer; gcl, granule cell layer.

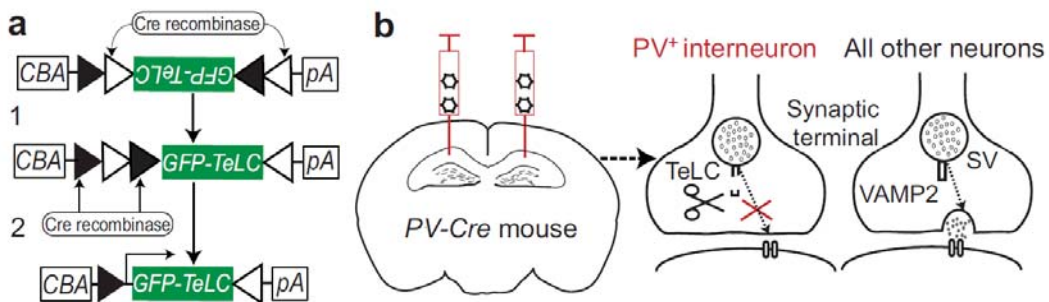


Abbildung 2: Selektive Expression des adeno-assoziierten Virus (AAV) in PV-positiven Korbzellen des Hippokampus. (a) Schematische Darstellung des AAV Konstrukts und Rekombinationssequenz der Cre-abhängigen Expression der leichten Kette des Tetanustoxins (TeLC). Die kodierte Region (grün) ist invertiert und zwischen zwei anti-parallel orientierten *loxP* Seiten eingelagert. Cre invertiert die Kodierungsregion (1) und setzt sie anschließend in der richtigen Orientierung ein (2). (b) Nach Injektion der AAVs in beide Hippokampi von PV-Cre Mäusen wird TeLC unter der Kontrolle von Cre-Rekombinase nur in PV-Cre-Zellen expremiert. TeLC zerstört VAMP2, ein Protein, das für die Freisetzung des chemischen Botenstoffes GABA essentiell ist. Damit ist die Kommunikation der PV-Korbzellen mit ihren Zielzellen unterbrochen. Andere Neurone sind unbeeinflusst.