

Fortbildungsveranstaltung

*im Rahmen des Programms
„Neurowissenschaften in der gymnasialen Oberstufe“*

der Neurowissenschaftlichen Gesellschaft e.V.

zum Thema

Einblicke ins Hirn – Bildgebende Verfahren in Forschung und Medizin

31. März 2009

am Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung
Medizinische Fakultät der Universität Leipzig,
Jahnallee 59 , 04109 Leipzig

Organisator: Professor Dr. Reinhard Schliebs

Kurzreferate ausgewählter Vorträge

Vortrag 1:

Neuronale Kommunikation: Anwendung der Fluoreszenzmikroskopie zur Untersuchung synaptischer Transmission an lebenden Hirnschnitten

Dr. Ivan Milenkovic

Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie, Institut für Biologie II, Universität Leipzig

Die strukturelle Einheit des Nervensystems ist das Neuron. Die Funktion eines Neurons, d.h. die Übertragung elektrischer Signale auf andere Zellen erfolgt durch Synapsen. Diese kommunizieren im Fall elektrischer Synapsen direkt über Gap junctions oder wie bei den chemischen Synapsen über Neurotransmitter. Die Vielfalt der Neurotransmitter und deren Rezeptoren ermöglicht unterschiedlichste physiologische Effekte an postsynaptischen Neuronen. Selbst wenn der gleiche Neurotransmitter von der Präsynapse freigesetzt wird, können z.B. entwicklungsbedingte Änderungen postsynaptischer Rezeptoren oder intrazellulärer Ionenkonzentrationen die physiologische Antwort vollkommen ändern. Aus diesem Grund ist es wichtig die Eigenschaften synaptischer Transmission zu erfassen und dadurch die physiologische Rolle bestimmter Neuronentypen zu verstehen. Im auditorischen System der Säuger z.B. werden Zeitunterschiede zwischen einkommenden binauralen Signalen mit einer Genauigkeit im Mikrosekundenbereich verrechnet, um eine genaue Position des akustischen Objektes zu bestimmen. Dank einer Reihe morphologischer Anpassungen auditorischer Synapsen wird diese schnelle und zeitlich sehr präzise Weiterleitung der elektrischen Signale über mehrere Stationen gewährleistet. Um die Mechanismen der Transmission an diesen Synapsen zu analysieren ist die Fluoreszenzmikroskopie eine Methode der Wahl, da mittels dieser, unter Einsatz fluoreszenter Farbstoffe, synaptische Transmission an lebenden Hirnschnitten (in vitro) erfasst werden kann. Dabei ist es möglich, die Konzentration wichtiger intrazellulärer Ionen oder sekundärer Botenstoffe (wie z.B. Cl^- oder Ca^{2+} -Ionen) zu messen. Da sich deren intrazelluläre Konzentration mit neuronaler Aktivität ändert, lassen sich die Fluoreszenzänderungen calciumsensitiver bzw. chloridsensitiver Fluorophoren als indirektes Maß neuronaler Aktivität bildlich darstellen.

(I) Calcium ist ein essentieller Botenstoff zwischen den eintreffenden elektrischen Signalen an der Zellmembran und dem Zytoplasma. Selbst kleinste Konzentrationsänderungen des intrazellulären Calciums ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) können physiologische Reaktionen, wie die Aktivierung von Ionenkanälen, Enzymen und Transkriptionsfaktoren hervorrufen. Viele Rezeptoren

weisen eine Durchlässigkeit für Ca^{2+} - Ionen auf, oder deren Aktivierung löst Signalkaskaden aus, welche Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern freisetzen. Die Methode des Ca^{2+} - Imagings nutzt diese Eigenschaften, um durch die Änderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Rückschlüsse auf die Rezeptorexpression an der Zellmembran zu ziehen. Weiterhin ist es möglich Signalmoleküle zu entschlüsseln welche an der Weiterleitung (Signaltransduktion) des Signals vom Rezeptor bis zum Effektor (Enzyme, Ionenkanäle, Transkriptionfaktoren) beteiligt sind.

(II) Die intrazelluläre Chloridionenkonzentration ($[\text{Cl}^-]_i$), auf der anderen Seite, definiert die Wirkung der Neurotransmitter GABA und Glycin. In vielen Neuronentypen des ZNS wirken GABA und Glycin in der frühen postnatalen Entwicklung exzitatorisch, weil eine erhöhte $[\text{Cl}^-]_i$ vorhanden ist. Entwicklungsbedingte Veränderungen der Chlorid-Homöostase verringern die $[\text{Cl}^-]_i$ und ändern damit die exzitatorische GABAerge bzw. glycinerge Wirkung in eine klassische Hyperpolarisation. Die Bestimmung der $[\text{Cl}^-]_i$ ist keine einfache Aufgabe, da diese durch experimentelle Vorgänge nicht beeinflusst werden darf. Ein nicht-invasives, bildgebendes Verfahren, das sogenannte Cl^- - Imaging, eignet sich daher gut zur Messung der $[\text{Cl}^-]_i$ während der postnatalen Entwicklung der Neuronen. Zur Detektion freier Chloridionen im Zytosol wird häufig der chloridsensitive Fluoreszenzfarbstoff MEQ verwendet. Der Mechanismus der Messung beruht auf einer kurzzeitigen Interaktion zwischen dem erregbaren Zustand des Farbstoffes und dem Chloridion. Hierdurch wird die Fluoreszenz ausgelöscht (Quenching), d.h. die Fluoreszenzintensität verhält sich umgekehrt proportional zur Chloridionenkonzentration. Mit Hilfe dieser Experimente kann man einen Einblick in die Entwicklung inhibitorischer Neurotransmission in Neuronen des auditorischen Systems bekommen.

Im Rahmen des Vortrages werden beide Methoden vorgestellt und deren Vor- und Nachteile gegenüber alternativen experimentellen Verfahren diskutiert. Weiterhin werden konkrete Fragestellungen präsentiert, welche in der AG Neurobiologie der Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie der Universität Leipzig, mit Ca^{2+} und Cl^- Imaging untersucht werden.

Vortrag 2:

Einblicke ins Hirn bei transgenen Mäusen mit Expression fluoreszierender Proteine

Dr. Johannes Hirrlinger

Interdisziplinäres Zentrum für Klinische Forschung (IZKF), Medizinische Fakultät der Universität Leipzig

Das Gehirn ist das komplexeste Organ des Menschen und der Säugetiere. Nervenzellen (Neurone) sind zu neuronalen Schaltkreisen verknüpft und übernehmen die Signalverarbeitung und Signalweiterleitung. Neben Neuronen gibt es sogenannte Gliazellen im Gehirn (Abb. 1; beim Menschen sind nur ca. 10% der Zellen Neurone, der Rest verschiedene Arten von Gliazellen). Man unterscheidet Oligodendrozyten (myelinisieren die Axone), Mikrogliazellen (Immunzellen des Gehirns), Ependymzellen (kleiden die Hirnventrikel aus) sowie Astrozyten (besitzen vielfältige Funktionen). Neue Forschungsergebnisse haben gezeigt, dass neben Neuronen auch Astrozyten eine wichtige Funktion in der Signalverarbeitung des Gehirns haben.

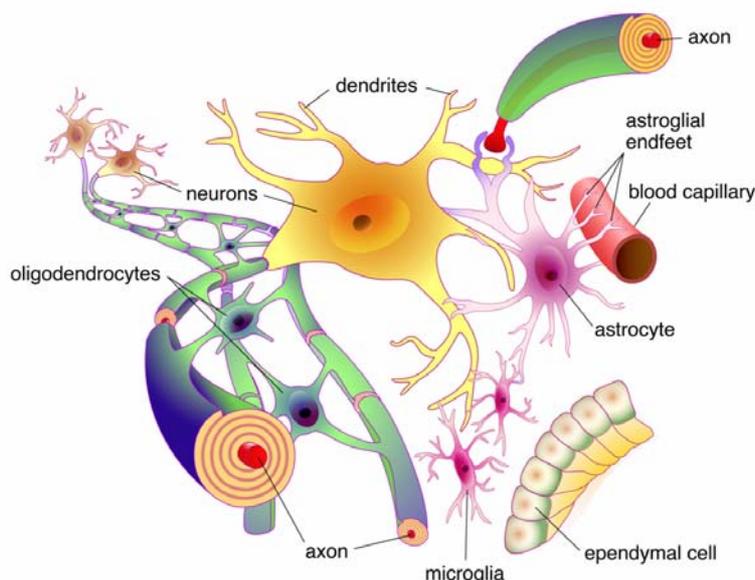


Abb. 1: Schematische Darstellung der verschiedenen Typen von Gehirnzellen und Ihrer Hauptfunktionen

Die Analyse der verschiedenen Typen von Zellen wird durch die hoch komplexe Morphologie stark erschwert. Alle Zelltypen des Gehirns bilden feine Fortsätze aus, die strukturell miteinander interagieren (Abb. 2, 3). Eine genaue Zuordnung eines Zellfortsatzes zu einer bestimmten Zelle ist daher nur schwer möglich. Es wurden viele verschiedene Verfahren entwickelt, um Zellen eindeutig zu identifizieren. Diese beruhen meist auf der Markierung eines für diese Zelle typischen Proteins mit Hilfe eines Antikörpers (immunhistochemische Anfärbung). Die Anwendung dieser Methode ist jedoch meist auf fixiertes Gewebe beschränkt, kann also nicht im lebenden Tier oder im lebenden Gehirnschnitt eingesetzt werden. Zur Untersuchung dynamischer Prozesse ist jedoch eine Markierung im lebenden Gewebe notwendig.

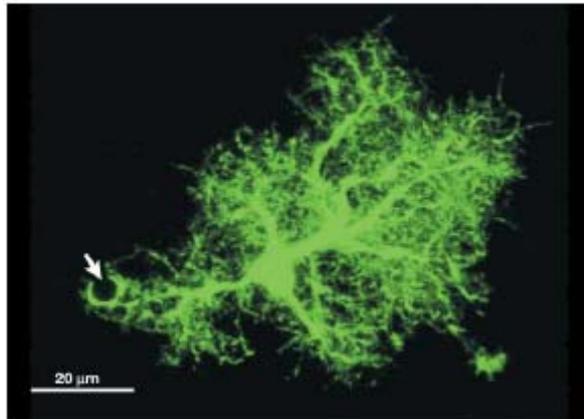


Abb. 2: Astrozyt aus der Großhirnrinde einer Maus. Man beachte die vielen sehr feinen Fortsätze. Der Pfeil markiert einen „Endfuß“, an dem Astrozyten Kontakt mit Blutkapillaren aufnehmen. Aus: “Research Highlights” (2004) *Nat. Rev. Neurosci.* **5**, 828-829.

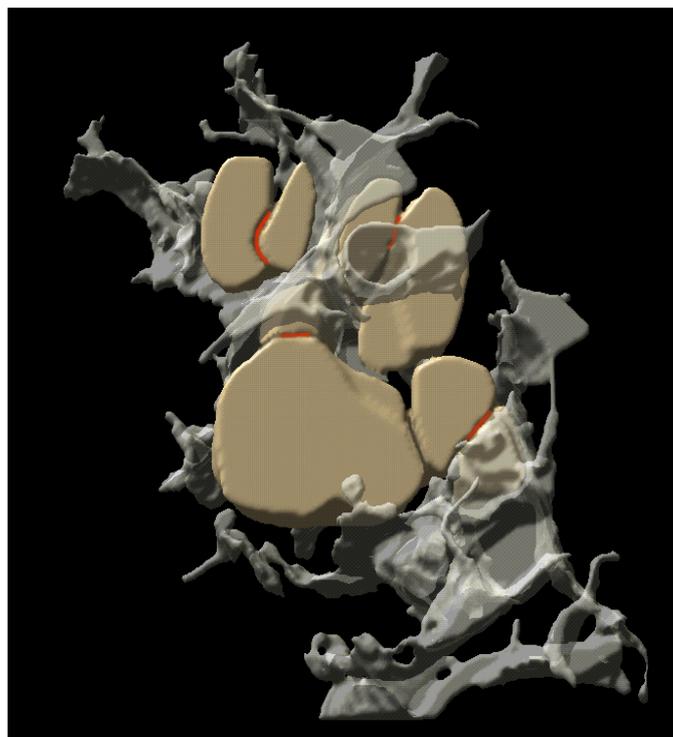


Abb. 3: Strukturelle Interaktion zwischen Gliazellen (hier: Bergmann glia; in grau dargestellt) mit Synapsen von Neuronen (braun, der synaptische Spalt ist rot markiert). Die Fortsätze der Gliazelle umhüllen neuronale Strukturen. Aus: Grosche et al. (1999) *Nat. Neurosci.* **2**, 139-143

Mit Hilfe transgener Maustechnologien können Proteine gezielt in einzelnen Zellen zur Expression gebracht werden. Dazu wird ein Promotor (regulatorische DNA-Sequenz) eingesetzt, der nur im gewünschten Zelltyp aktiv ist. Unter der Kontrolle dieses Promotors wird dann diejenige DNA-Sequenz gesetzt, die die codierende Information für das gewünschte Protein enthält. Dies führt zu einer Expression des Proteins ausschließlich in diesen Zellen. Um jedoch die gewünschten Zellen auch im lebenden Gewebe identifizieren zu können, muss das exprimierte Protein leicht nachweisbar sein. Hier hat die Entdeckung des „Grün-fluoreszierenden Proteins“ (GFP) die biologische Forschung revolutioniert. Diese Proteine bilden nach ihrer Synthese in der Zelle „von alleine“ einen Fluoreszenzfarbstoff, der mit einem Standard-Fluoreszenzmikroskop leicht nachgewiesen werden kann. (Für die

Entdeckung und Weiterentwicklung von GFP wurde 2008 der Nobelpreis für Chemie verliehen). Unter Verwendung eines Promotors, der spezifisch für Astrozyten ist und die Expression von GFP in diesen Zellen verursacht, konnten wir diese Zelle hochaufgelöst im lebenden Gewebe darstellen (Abb. 2). Diese Technologie erlaubt nun auch die Analyse der dynamischen Veränderungen der Zellstrukturen; ein Prozess, der auch bei plastischen Veränderungen des Gehirns wie z.B. beim Lernen eine Rolle spielt.

Eine faszinierende Fortentwicklung dieses Ansatzes stellt die „Brainbow“-Technologie dar (Livet et al. (2007). Nature **450**, 56-63). Während bei den bisher beschriebenen Methoden alle Zellen eines Zelltyps gleich markiert wurden, nutzt diese Technologie eine elegante Kombination modernster Mausgenetik mit verschieden-farbigen fluoreszenten Proteinen, um verschiedene Zellen des gleichen Zelltyps (hier Neuronen) verschieden anzufärben (Abb. 4, 5). Dies ermöglicht die Verfolgung der Fortsätze eines einzelnen Neurons über weite Strecken im Gewebe, sowie die genauere Analyse der Verknüpfung verschiedener Neurone.

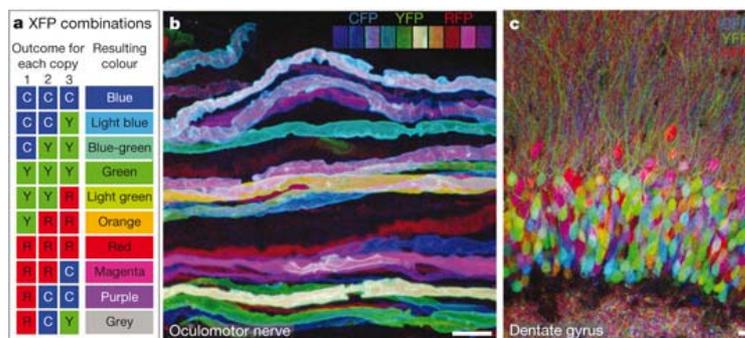


Abb. 4: Die „Brainbow“-Technologie. a) Die Kombination verschieden-farbiger fluoreszenter Proteine (XFP) ermöglicht die Markierung von Zellen in vielen verschiedenen Farben. b) Axone im Okulo-motorischen Nerv zeigen das ganze Spektrum verschiedener Farben. c) Neurone im Gyrus dentatus leuchten in vielen verschiedenen Farben. Ihre Axone und Dendriten können aufgrund der unterschiedlichen Farben identifiziert und verfolgt werden. Maßbalken: 10 µm. Aus: Livet et al. (2007). Nature **450**, 56-63.

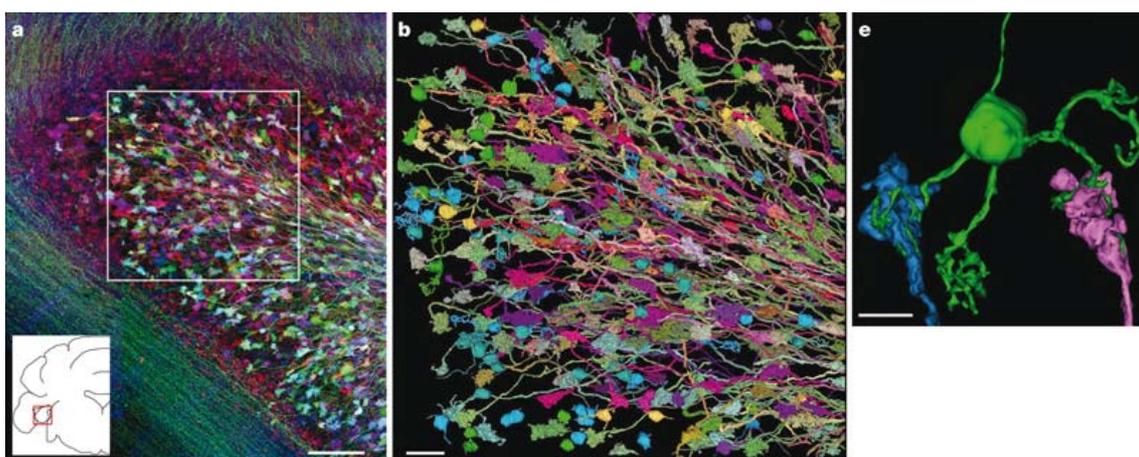


Abb. 5: Analyse einzelner Neurone im Kleinhirn mit Hilfe der „Brainbow“-Technologie. a) Neurone und ihre Fortsätze sind in verschiedenen Farben gefärbt. b) Dreidimensionale Rekonstruktion dieser Nervenzellen und ihrer Ausläufer. e) Eine Nervenzelle des Kleinhirns (Körnerneuron; grün) wird von 2 verschieden gefärbten Axonen kontaktiert (blau, pink). Zwei weitere Kontaktstellen sind sichtbar, werden jedoch von nicht gefärbten Axonen kontaktiert (Pfeile). Maßbalken: 50 µm (a); 15 µm (b); 5 µm (e). Aus: Livet et al. (2007). Nature **450**, 56-63.

Vortrag 3:

Positronen-Emissions-Tomographie (PET) bei neuropsychiatrischen Erkrankungen

Dr. med. Swen Hesse

Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin, Universität Leipzig

Neuropsychiatrische Störungen wie Depression oder Angsterkrankungen besitzen eine hohe sozio-ökonomische Relevanz, deren biologischen Ursachen auch heute nicht geklärt sind. Häufig werden diese Störungen nicht richtig erkannt und inadäquat behandelt. Die bildgebenden Verfahren SPECT (Single-Photon-Emissions-Computer-Tomographie) und PET (Positronen-Emissions-Tomographie) erlauben die Darstellung von Veränderungen auf biochemischer Ebene und geben so einen Einblick in pathophysiologische Zusammenhänge von neuropsychiatrischen Störungen. Sie sind ein wichtiges Instrumentarium in der Grundlagen- und klinischen Forschung und tragen dazu bei, Subgruppen dieser Störungen zu identifizieren und entsprechende individualisierte Behandlungsstrategien zu ermöglichen.

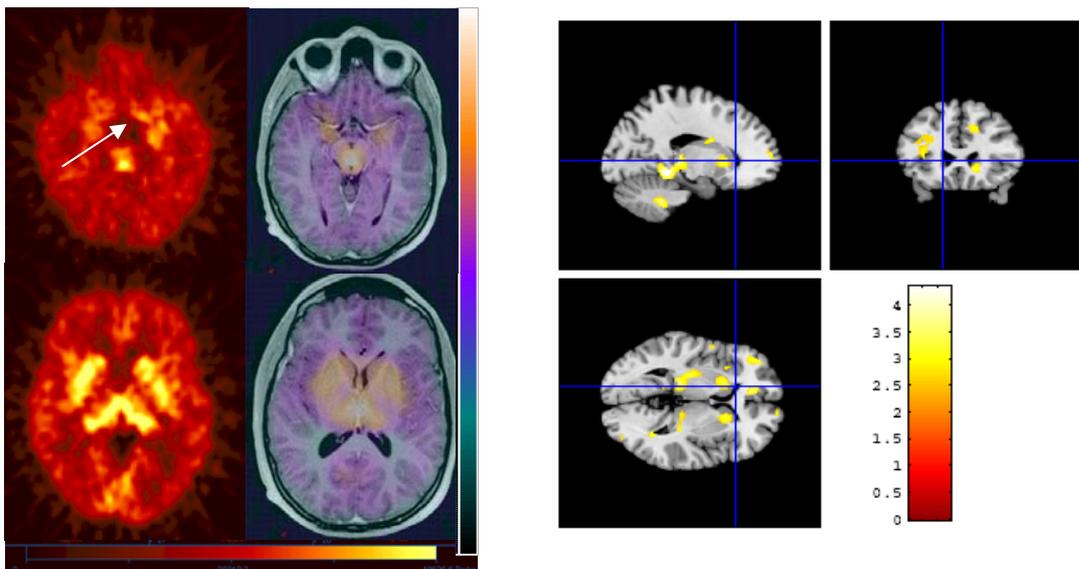


Abb. 1: Summierte PET-Schnittbilder (linke Seite) der Serotonin-Transporter-Verteilung in Höhe des Mittelhirns (oben) und der Streifenkörper des Thalamus.

Die Serotonin-Transporter sind die Zielstrukturen der heute am meisten eingesetzten, wirksamen Antidepressiva. Der Pfeil weist auf den für die Verarbeitung von Emotionen wichtigen Mandelkern hin. Die Bilder auf der rechten Seite zeigen regionale Unterschiede (gelb dargestellt) in der Verfügbarkeit dieser Transporter zwischen Gesunden und Patienten mit einer Depression.