

# Thrombin-verwandte Proteasen als Signalmoleküle im Gehirn: Protease-aktivierte Rezeptoren bei neuronaler Schädigung und bei Neuroprotektion

Tanuja Rohatgi und Georg Reiser

## Zusammenfassung

Thrombin, eine Serinprotease mit zentraler Bedeutung für die Blutgerinnung, kann Rezeptoren auf der Plasmamembran von Zellen aktivieren. Diese Protease-aktivierten Rezeptoren (PARs) wurden kürzlich auch im Gehirn gefunden. Dort sind diese Rezeptoren insbesondere bei Neuroprotektion oder Schädigung im Zusammenhang mit pathologischen Zuständen von Bedeutung. Man unterscheidet 4 Subtypen, die als PAR-1 bis PAR-4 bezeichneten Rezeptoren, die alle in Mensch, Ratte und Maus exprimiert sind und große Homologie zwischen diesen Spezies aufweisen. PARs besitzen einen einzigartigen Aktivierungsmechanismus, weil sie durch die Spaltung des Rezeptorproteins irreversibel in den aktiven Zustand versetzt werden. Das durch die Proteolyse neu entstandene extrazelluläre N-terminale Ende des Rezeptor-Polypeptids wird als ein vorher verborgenes N-terminales Ende offen gelegt und wirkt nun als an das Protein gekoppelter, aktivierender Peptidligand.

PARs sind in vielen Bereichen im zentralen und im peripheren Nervensystem exprimiert. PARs scheinen bei der Pathologie neurodegenerativer Erkrankungen, wie Alzheimer oder HIV-Enzephalitis eine Rolle zu spielen. Thrombin löst im Gehirn über PARs die Proliferation von Astrozyten aus, was für die reaktive Astrogliose von Bedeutung ist. Andererseits wirkt Thrombin janus-ähnlich, da es bei hohen Konzentrationen Nervengewebe schädigt, dagegen in sehr niedrigen Konzentrationen, welche im leicht geschädigten Nervengewebe erreicht werden, eine protektive Rolle hat.

## Abstract

**Thrombin-type proteases as signaling molecules in the brain: the role of protease activated receptors in neuronal damage and in neuroprotection**

Thrombin, mainly known as a serine protease with central significance in blood coagulation, is able to activate receptors on the plasma membrane of cells. These protease-activated receptors (PARs) were recently found also in brain. There the receptors are significant for neuronal development, as well as for neuroprotection or damage during pathological situations. Molecular biology research has identified four subtypes of PARs, G protein-coupled receptors. All four subtypes, which are named PAR-1 to PAR-4 were found to be expressed in human, rat and mouse. PARs have a unique activation mechanism, because proteolytic cleavage leads to irreversible conversion of the protein into its active state. In this case, receptor activation after proteolysis results in a new extracellular N-terminal domain. This unmasks the tethered ligand, a sequence of about 6 amino acids, which binds specifically on an extracellular region of the receptor. This feature can be used experimentally for activating the receptor without proteolysis, by utilizing synthetic peptides of those 5-6 amino acid residues.

PARs are expressed in many regions of the central and peripheral nervous system. PARs seem to play a role in the pathology of neurodegenerative disorders, like Alzheimer's disease or HIV-encephalitis. Thrombin induces proliferation of brain astrocytes mediated by PARs, which is of significance for reactive astrogliosis. On the other side thrombin has a janus-like action: at high concentration it causes damage of nervous tissue, at very low concentrations which are reached in slightly damaged tissue it plays a specific protective role.

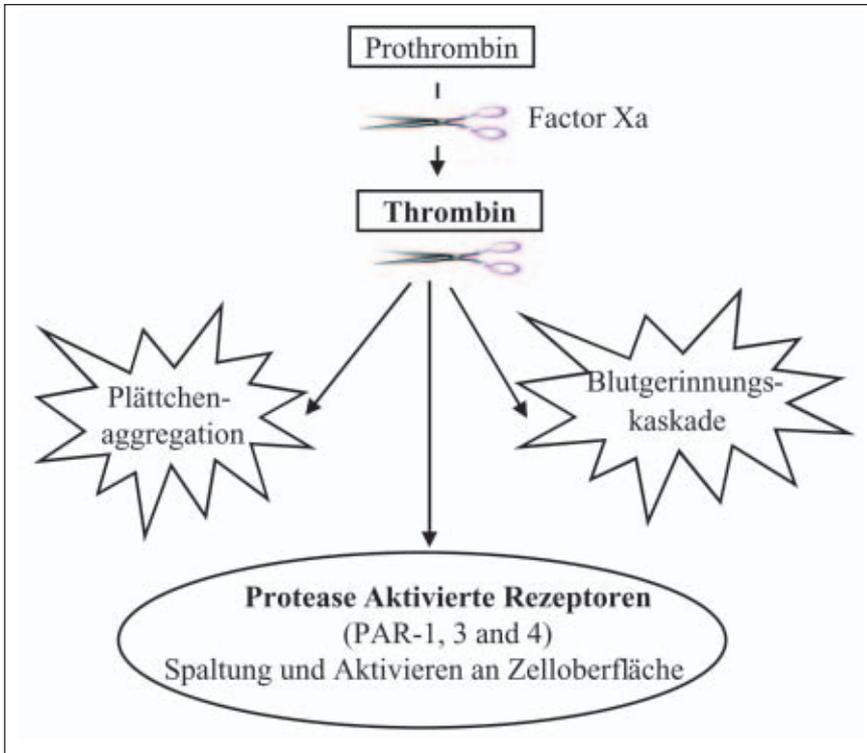
**Key words:** Protease-activated receptors; thrombin; neurodegeneration; neuroprotection

## Einleitung: Thrombin als eine Protease der Blutgerinnung - und Thrombin im Gehirn?

Übermäßiger Blutverlust als Folge von Wunden oder Gewebeerletzungen wird durch den Anstoß einer Blutgerinnungskaskade verhindert, die zur Bildung eines Blutpfropfens am Verletzungsort führt. Unser Blutkreislaufsystem besitzt zahlreiche Proteine, die in dieser Kettenreaktion mitwirken, darunter die Serinprotease Thrombin, deren proteolytische Aktivität Fibrin als eine unauflösliche Verklumpung bildet. Das 39 kDa-Protein Thrombin entsteht aus dem Vorläufer Prothrombin, einem 71.6 kDa-Protein. Dies geschieht als Folge einer proteolytischen Spaltaktivität durch den Faktor Xa, ein anderes an der Gerinnungskaskade beteiligtes Protein (Abbildung 1). Bis vor kurzem hatte man angenommen, dass Prothrombin und folglich Thrombin nur im Blut vorkommen und dort spezifisch die Aufgabe der Gerinnung erfüllen. Dann stellte sich heraus, dass Thrombin auch die Blutplättchenaggregation auslöst. Inzwischen ist klar, dass Thrombin verschiedene Zelltypen, wie Makrophagen, Neutrophile, Monozyten und Endothelzellen, aktiviert und darüber hinaus die Proliferation glatter Gefäßmuskulzellen anstoßen kann.

Man entdeckte dann, dass Thrombin sogar in primären neuronalen Zellkulturen morphologische Veränderungen herbeiführt. Thrombin bewirkt nämlich ein Einziehen von Neuriten, wohingegen die Zugabe der Thrombinantagonisten Protease-Nexin-1 (PN-1) und Hirudin diesen Thrombin-Effekt hemmt. Bei der Untersuchung menschlicher Fibroblasten wurde der spezifische Thrombinhemmer PN-1 identifiziert. Hirudin ist das Agens, mit dem der Blutegel beim Blutsaugen die Gerinnung hemmt. Ein völlig neues Konzept zur Thrombinwirkung ergab sich aus der Erkenntnis, dass Thrombin, wenn es an Zelloberflächenrezeptoren bindet, mit mehreren Übertragungswegen verknüpft ist. Allerdings wurden bis 1991 weder der Rezeptor noch die thrombinabhängigen Übertragungswege identifiziert.

Erst dann wurde der Thrombin-Rezeptor, der auch Protease-aktivierter Rezeptor-1 (PAR-1) genannt wurde, aus humanem Gewebe kloniert. Nachfolgend wurden noch drei weitere Mitglieder der PAR-Familie (PAR-2, PAR-3 und PAR-4) gefunden. Im Zusammenhang mit PAR-2 zeigte sich, dass nicht nur Thrombin, sondern auch andere Serinproteasen, wie Trypsin und Granzym A, PARs aktivieren können. Untersuchun-



**Abb. 1:** Erzeugen von Thrombin aus Prothrombin und die direkt durch proteolytische Effekte des Thrombin beeinflussten Wege. Proteolytische Spaltung von Prothrombin durch Faktor Xa erzeugt aktives und funktionelles Thrombin. Thrombin seinerseits wirkt proteolytisch und erleichtert dadurch die Aggregation der Blutplättchen, ermöglicht den endgültigen katalytisch aktivierenden Schritt der Blutgerinnungskaskade. Nach der Bindung von Thrombin an Rezeptoren auf Zelloberflächen aktiviert es diese durch Spaltung.

gen in unserem Labor konnten erstmals das Vorhandensein von funktionell aktivem PAR-1 und PAR-2 in primären Astrozyten-Kulturen aus Rattenhirn nachweisen. Großes Interesse auf diesem Gebiet fand die Entdeckung eines gehirnspezifischen Serinprotease-Hemmers, des Glia-Derived Nexin (GDN), das aus Gliazellen in Kultur gewonnen wurde. Später stellte sich heraus, dass GDN mit PN-1 identisch ist, weshalb man beide nunmehr als PN-1 bezeichnet. Prothrombin und PN-1 sind zugleich im Rattenhirn vorhanden. Darüber hinaus haben Expressionsstudien gezeigt, dass PAR-1 sowohl in embryonalen als auch in postnatalen und adulten Hirnen präsent ist. Wir konnten sogar alle vier PAR-Subtypen im adulten Rattenhirn nachweisen. Bei traumatischen Hirnverletzungen oder Schlaganfall kann ein Durchbrechen der Blut-Hirn-Schranke zusätzlich den exogenen Serinproteasen des Serums den Zugang vom Blut zum Hirn öffnen und damit Hirnschädigungen in Form von Vernarbungen und Ödemen verstärken. Diese Schädigungen können Gehirnkrämpfe oder Zelltod verursachen. Im Folgenden werden nach einer Einführung in das Gebiet der Proteasen zuerst die Beson-

derheiten der PARs und daraufhin die Bedeutung von PARs im Gehirn dargestellt.

**Proteasen als Enzyme und als Liganden der Protease-Aktivierten Rezeptoren (PARs)**

Proteasen stellen die größte Enzymgruppe dar. Sie wirken hochspezifisch, indem sie Peptidbindungen durch Hydrolyse irreversibel spalten. Unsere Sicht auf Proteasen wurde durch die Forschung der vergangenen Jahre dramatisch verändert. So spricht man von ihnen inzwischen auch als „Signal-scheren“. Die katalytische Aktivität der Proteasen kann eine Vielzahl verschiedener Zellfunktionen einleiten und regeln. Dazu gehören Proliferation, Differenzierung, Migration, Apoptose, Wundheilung und Angiogenese (Gefäßbildung). Ihrem katalytischen Wirkungsmechanismus folgend werden die Proteasen in Gruppen eingeteilt, die entsprechend jener Aminosäure benannt werden, die bei der katalytischen Wirkung wesentlich ist: Das sind als eine Gruppe die Serinproteasen, wie Thrombin, Trypsin und Chymotrypsin, welche im Brennpunkt dieses Übersichtsartikels stehen.

Die Proteasen werden meistens zunächst als harmlose inaktive Proenzyme gebildet und verharren so gewissermaßen in einem Stand-by-Modus, bis ihre Aktivität erforderlich ist. Proteasen spalten sehr spezifisch und begrenzt verschiedene Substratproteine. Es ist äußerst wichtig, die jeweiligen Substrate zu identifizieren, weil diese schließlich die potenziellen Angriffspunkte für eine therapeutische Behandlung pathologischer Zustände sind. Der vorliegende Artikel wird sich auf ein bestimmtes Substrat für die Serinproteasen, die Protease-aktivierten Rezeptoren (PARs), konzentrieren.

Für die Existenz, Versorgung und Aufrechterhaltung einer Homöostase insbesondere im Gehirn ist die Kommunikation zwischen den Zellen durch ein Netzwerk von Signalen unabdingbar. Auch die Serinproteasen Thrombin und Trypsin wirken als Signalgebende Moleküle, indem sie an Rezeptoren an der Zelloberfläche, nämlich die PARs, binden, diese aktivieren und so diverse Zellfunktionen regulieren. Abbildung 2 zeigt Struktur und Aktivierungsmechanismus der PARs. PARs sind an G-Proteine gekoppelte Rezeptoren und gehören zu einer großen Familie von Transmembranrezeptoren. PARs zeigen die dafür typischen sieben transmembranen Helices (TMD1 bis TMD7 in Abbildung 2): Bei diesen besteht eine Verbindung von drei extrazellulären und drei intrazellulären Schleifen mit einem extrazellulären N-terminalen und einem intrazellulären C-terminalen Bereich.

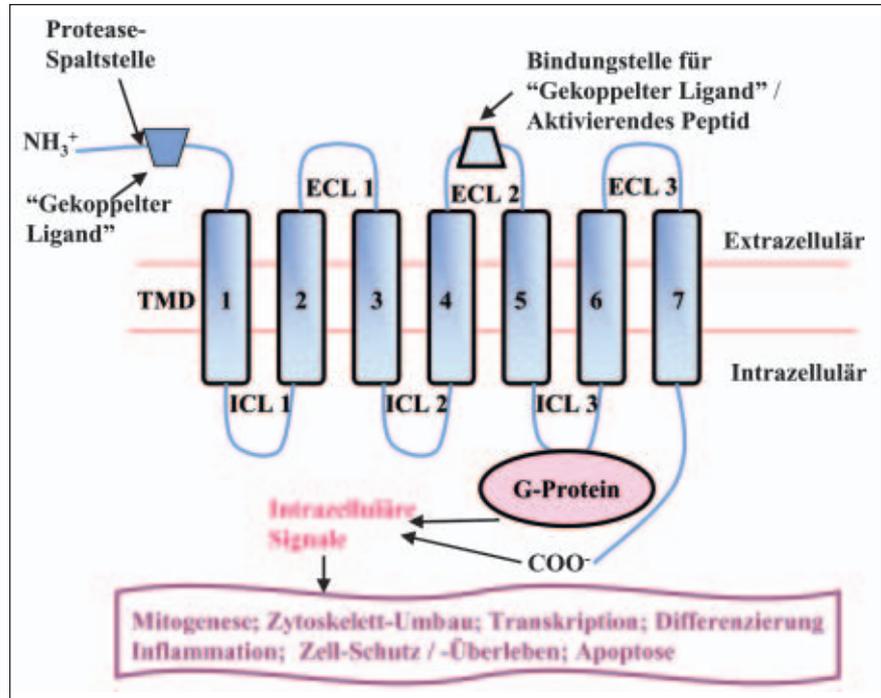
PARs bedienen sich eines einzigartigen Aktivierungsmechanismus, indem sie den extrazellulären proteolytischen Spaltungsvorgang in ein transmembranäres Signal umwandeln (Coughlin 2000). Um den Rezeptor zu aktivieren, bedarf es dieser Spaltung des Rezeptors an einer spezifischen Stelle im extrazellulären N-terminalen Bereich durch die wirksame Liganden-Protease. Die Spaltung lässt ein neues N-terminales Ende als Liganden aufscheinen, der jedoch an die Polypeptidkette des Rezeptors gekoppelt bleibt. Lediglich etwa sechs Aminosäure-Reste innerhalb dieses Bereichs interagieren als neu hervorgetretener, fest verkoppelter Ligand mit der extrazellulären Schleife 2 und den Transmembranbereichen des gespaltenen Rezeptors und lösen folglich transmembranäre Signale aus. So tragen die PARs ihren eigenen selbstaktivierenden Liganden, der jedoch den Rezeptor nur dann aktiviert und damit ein innerzelluläres Signal initiiert, wenn er zuvor der Proteaseaktivität ausgesetzt worden ist. Allerdings kann bei Abwesenheit der aktiven Protease der intakte Rezeptor auch durch die

Bindung des „gekoppelten Liganden“ als synthetisch hergestelltes Peptid aktiviert werden. Das Peptid kann so den Rezeptor ohne die Notwendigkeit einer proteolytischen Spaltung aktivieren. Es wurde gefunden, dass die für PAR-1 und -2 bekannten aktivierenden Peptide ähnliche physiologische Rezeptor-Reaktionen hervorrufen wie die Agonisten-Proteasen. Letztlich interagiert der aktivierte Rezeptor über die intrazellulären Schleifen 2 und 3 mit verschiedenen G-Proteintypen und übermittelt derart das Signal (Coughlin 2000).

### Die verschiedenen PAR-Gene und die pharmakologische Klassifizierung der PARs

Für die vier Subtypen der PAR, PAR-1 bis PAR-4, zeigt Tabelle 1 die Größe der Exons und Introns im Genom, die Aktivierungs- und Inaktivierungsproteasen, die bei Aktivierung entstandenen Spaltstellen des Proteins beim Menschen und die Peptidsequenzen der gekoppelten Liganden der einzelnen PARs bei Mensch, Maus und Ratte. Die vier Subtypen zeigen eine identische Genstruktur: zwei Exons (kodierende Region), die im Falle von PAR-1 bis PAR-3 durch ein einziges, sehr langes Intron (nicht-kodierende, unterbrechende Region) von 4000 bis 22000 Basen getrennt sind. PAR-4 unterscheidet sich insofern, als hier das Intron sehr kurz ist, nämlich nur 274 Basen. In allen vier Fällen enthält das erste kurze Exon die 5'-nicht-translatierte Sequenz, das Start-Codon und ein Signal-Peptid, wohingegen das zweite, lange Exon für das Rezeptorprotein und die 3'-nichttranslatierte Sequenz kodiert. Die Gene von PAR-1, PAR-2 und PAR-3 befinden sich auf demselben menschlichen Chromosom 5, nämlich auf der Bande Nr. 13 des langen Arms (q) (die Bezeichnung des Genortes ist also 5q13); dagegen ist PAR-4 auf der Bande 12 des kurzen Arms (p) von Chromosom 19 (19p12) lokalisiert. Alle vier Subtypen haben große Ähnlichkeit untereinander und sind quer durch die verschiedenen Spezies Mensch, Maus und Ratte in hohem Maße konserviert.

Die pharmakologische Klassifizierung der PARs erfolgt durch Zuordnung der aktivierenden Liganden-Proteasen. Der hauptsächliche Agonist von PAR-1, PAR-3 und PAR-4 ist die Serinprotease Thrombin, die sowohl im Blutplasma als auch im zentralen Nervensystem (ZNS) vorkommt. Eine weitere Protease, die als PAR-Agonist vor allem auf PAR-2, aber auch auf PAR-1 wirkt, ist Trypsin, ein Verdauungsenzym, das im gastrointestinalen Trakt als inaktives Zymogen ge-



**Abb. 2: Aktivierungsmechanismus der PARs.** Proteolytische Aktivierung durch Serinproteasen am N-Terminus ergibt einen „gekoppelten“ Liganden, dessen Sequenz durch das Trapez gezeigt ist, welches dann an die Stelle des blauen Trapezes, auf der extrazellulären Schleife 2 des Rezeptors bindet und ihn somit aktiviert. Synthetische aktivierende Peptide, welche der Sequenz des gekoppelten Liganden des Rezeptors entsprechen, können an dieselbe Aktivierungsstelle binden und so den Rezeptor ohne proteolytische Spaltung aktivieren. Die intrazellulären Signale werden sowohl C-terminal als auch durch die zweite intrazelluläre Schleife über das G-Protein weitergegeben. ECL extrazelluläre Schleife, nummeriert 1 bis 3; ICL intrazelluläre Schleife, nummeriert 1 bis 3; TMD Transmembrandomäne, nummeriert 1 bis 7.

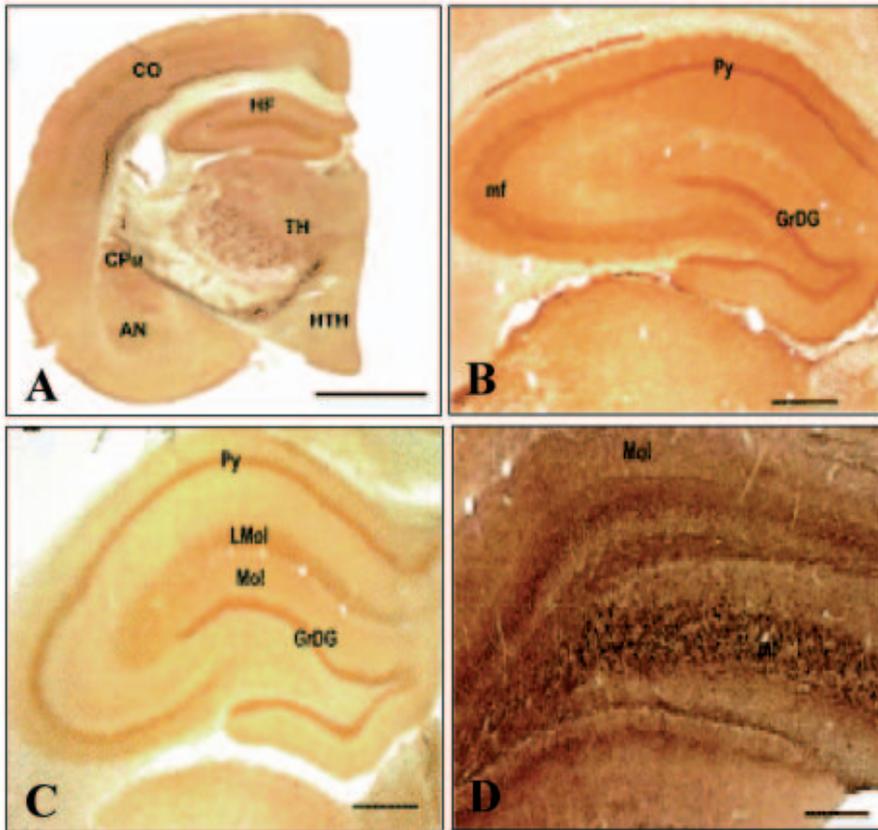
bildet wird. Da Trypsin nicht an Expressionsorten von PAR-2 wie im Hirn vorhanden ist, suchte man nach alternativen Agonisten für PAR-2 und fand dabei die Tryptase, eine tetramere Serinprotease, die nach einer allergischen Reaktion von Mastzellen freigesetzt wird und ihrerseits PAR-2 aktiviert. Interessanterweise setzen Rattenhirnschnitte eine trypsinartige Serinprotease (P22) frei, die in der Lage ist, extrazelluläre Matrix zu verdauen und PAR-2 zu stimulieren.

Neben Thrombin und Trypsin gibt es noch weitere Serinproteasen, die ebenfalls PARs aktivieren können. Granzym A gehört zu diesen. Es wird in zytotoxischen T-Lymphozyten gebildet und kann PAR-1 in Neuronen und Astrozyten aktivieren. Die proteolytische Wirkung von Granzym A hat sowohl die Retraktion von Neuriten als auch die Umkehrung der Astrozyten-Fortsatzbildung zur Folge. Allerdings können andere Serinproteasen, die in Tabelle 1 bei den jeweiligen PARs angegeben sind, PARs inaktivieren. Dazu gehören Cathepsin G, Elastase, Proteinase 3 und Plasmin. Der Inaktivierungsmechanismus beruht in allen Fällen auf

einer proteolytischen Spaltung mitten im gekoppelten Liganden, wodurch der Rezeptor unempfindlich für eine Aktivierungsprotease, wie Thrombin, wird.

### Verteilung der PARs im Gehirn

Studien in unserem Labor konnten das Vorhandensein aller vier PAR-Subtypen im Gehirn nachweisen. Abbildung 3A-D zeigt jeweils Beispiele für deren Verteilung in verschiedenen Arealen des Rattenhirns (Strigow et al. 2001). Eine detaillierte immunhistochemische Analyse ergab, dass das PAR-1-Protein im Hippocampus reichlich in der Pyramidenzellschicht vorhanden ist, verglichen mit einem eher niedrigen Expressionsniveau in den Neuronen im Kortex, Thalamus, Hypothalamus, Striatum und Amygdala. PAR-1-Expression, sowohl als mRNA als auch als Protein, wurde in embryonalem und postnatalem Hirngewebe festgestellt. PAR-2 und PAR-3-Proteine finden sich in hohem Maße in Hippocampus, Kortex, Amygdala, Thalamus, Hypothalamus und Striatum. PAR-2-Protein wird ferner wäh-



**Abb. 3: Immunocytochemischer Nachweis der PARs im Gehirn. Koronarschnitte vom adulten Rattenhirn mit verschiedenen Arealen nach Anfärbung mit spezifischen Antikörpern für PAR-1 bis -4. (A) PAR-1 Immunreaktivität in der rechten Hemisphäre des Gehirns; (B) PAR-2 Immunreaktivität in der Hippocampusformation. PAR-2 positive Zellen in der Pyramidal-schicht, Körnerzellen des Gyrus dentatus und Moosfasern. (C) PAR-3 Anfärbung im Hippocampus. PAR-3 Immunreaktivität in Pyramidenzellen, Körnerzellen des Gyrus dentatus and des Subiculum. (D) PAR-4 Immunreaktivität in der Moosfaserschicht der Hippocampusformation. Maßstab jeweils, 2 mm (A), 500  $\mu$ m (B und C) und 100  $\mu$ m (D). **Abkürzungen:** AN, amygdaloid nucleus; CO, cortex; CPu, caudate putamen; GrDG, granular cell layer of dentate gyrus; HF, hippocampal formation; HTH, hypothalamus; LMol, stratum lacunosum moleculare; mf, mossy fibres; Mol, stratum moleculare of the dentate gyrus; Py, pyramidal cell layer. (Ausschnitte übernommen von Striggow et al. 2001)**

rend der Embryogenese im ZNS exprimiert. Dagegen zeigt sich das PAR-4-Protein in neuronalen Somata, in den Axonen und Dendriten des Hippocampus sowie allen Schichten des Kortex, von Thalamus, Hypothalamus und Amygdala. Aus unserem Labor wurden des Weiteren auf mRNA- wie auf Protein-Ebene funktionelle Koexpressionen von PAR-1 bis -4 in Ratten-Astrozyten in Kultur berichtet (Wang et al. 2002a). Unter Einsatz von RT-PCR und Immunomarkierung konnten wir kürzlich die Expression von PAR-1 und PAR-3 in Ratten-Oligodendrozyten in Kultur sowie auch in einer Oligodendroglia-Zelllinie belegen. PAR-3 zeigt dort jedoch keine offenkundige funktionelle Aktivität.

Eine weitere Beobachtung weckt sicherlich unser Interesse. PARs sind auch in vielen anderen Regionen des Nervensystems in

hohem Maße exprimiert. Im Rückenmark zum Beispiel ist PAR-1 mRNA reichlich in Motoneuronen und in den Hinterwurzelganglien zu finden, ferner in den präganglionären Neuronen des autonomen Nervensystems. PAR-2-Expression auf Proteinebene lässt sich während der Embryogenese im peripheren Nervensystem (PNS) entdecken. PAR-2 wird ferner von primären Rückenmarksafferenzneuronen exprimiert. Vor kurzem wurde mit Hilfe der Immunocytochemie die Expression von PAR-4 in peripheren Nerven gefunden.

#### Mechanismen der Signalübertragung durch PARs

Die Spaltung des N-terminalen extrazellulären PAR-Abschnitts durch die Agonist-Protease ist von der Bindung des aufgedeck-

ten gekoppelten Liganden mit Aktivierung des Rezeptors gefolgt (Abbildung 2). Damit wird eine Veränderung der Rezeptorkonformation bewirkt, was in der Folge den Rezeptor mit heterotrimeren G-Proteinen interagieren lässt. Diese Proteine binden die Guaninnukleotide GDP und GTP und werden deshalb so genannt. Die PAR-Rezeptor-G-Protein-Interaktion stößt nun folgenden Prozess an: GDP wird auf der großen Untereinheit des G-Proteins durch GTP ersetzt und ergibt den dadurch aktivierten G-Protein-GTP-Komplex. Dieser kann verschiedene Enzyme oder Ionenkanäle als Effektoren aktivieren. Die Signalübertragung durch G-Proteine endet, wenn GTP zu GDP hydrolysiert ist und nachfolgend die G-Proteine dadurch wieder in ihren inaktiven Zustand zurückgeführt sind. PAR-1 ist innerhalb der PAR-Familie hinsichtlich seines Signal-Mechanismus bisher am besten verstanden. Eine Aktivierung von PAR-1 durch einen Agonisten resultiert meistens in einer Stimulierung der Phospholipase C (PLC) über das Gq-Protein. Aktivierte PLC hydrolysiert in der Plasmamembran ein Phospholipid zu Inositol(1,4,5)-trisphosphat ( $IP_3$ ) und Diacylglycerol (DAG). Die Bildung des  $IP_3$  führt zur Mobilisierung von intrazellulärem  $Ca^{2+}$ , DAG seinerseits hat an der Aktivierung von Proteinkinase C (PKC) Anteil. Eine weitere Enzymfamilie, die in der PAR-Signalübertragung involviert ist, sind die mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK). Sie spielen eine zentrale Rolle bei Wachstum, Proliferation, Entwicklung und Überleben aller eukaryotischen Organismen.

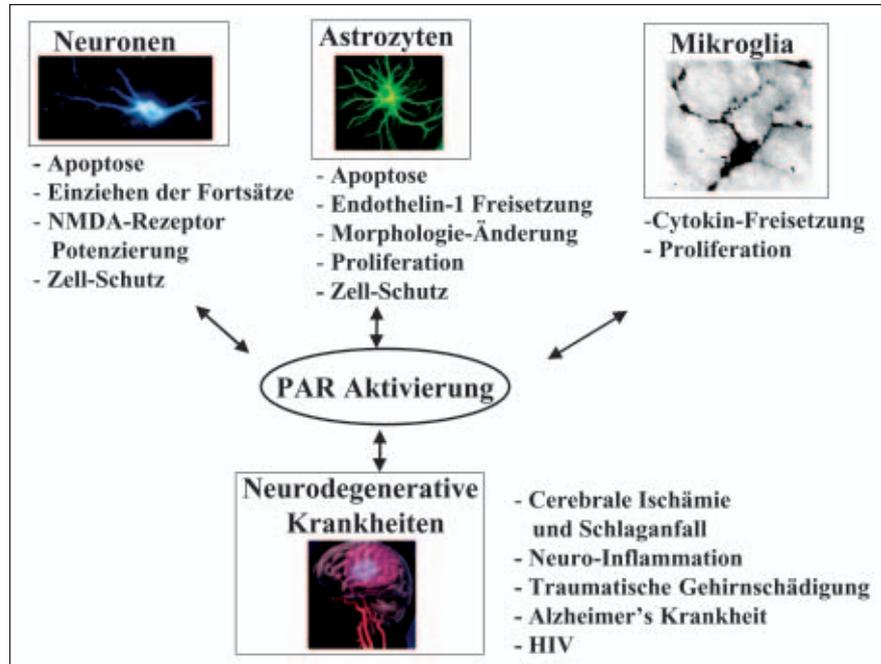
Die Signalübertragung von PARs in Astrozyten des Gehirns wurde intensiv untersucht. Astrozyten bilden eine Hauptgruppe der Gliazellen und sind äußerst wichtig im Gehirn, da sie auch die Neuronenaktivität beeinflussen, vielleicht sogar steuern. Nach Verletzungen proliferieren Astrozyten und können in der Folge zu Synapsen wandern, die durch die Verletzung nicht geschädigt wurden. Die Unterstützung funktioneller Synapsen und die Entstehung von Progenitor-Stammzellen für die Schaffung aller Typen reifer Hirnzellen, einschließlich Neuronen im adulten Hirn, gehören zu den Charakteristika, die im Zusammenhang mit Astrozyten diskutiert werden. Es ist deshalb entscheidend, den Mechanismus, welcher der Proliferation der Astrozyten im ZNS zugrunde liegt, zu verstehen. Studien in unserem Labor konnten nachweisen, dass Thrombin eine erhebliche Stimulation der Proliferation von Rattenastrozyten in Kultur auslöst (Wang et al. 2002a). Dieser Prozess wird auf dem MAPK-Signalweg ermög-

licht (Wang et al. 2002b). Der stimulierende Effekt von Thrombin oder PAR-1 aktivierendem Peptid wird durch die Aktivierung von PAR-1 angestoßen und läuft über zwei parallele intrazelluläre Schienen. Eine dieser beiden Reaktionen involviert die Aktivierung des Pertussis-Toxin-sensitiven Gi-Proteins. Pertussis-Toxin, welches für die Entstehung der Keuchhustenerkrankung verantwortlich ist, bewirkt auf molekularer Ebene eine Hemmung des Gi-Proteins. Vom Gi-Protein wandert das Signal zur Phosphatidylinositol-3-Kinase und bewirkt schließlich eine Phosphorylierung der die Genexpression steuernden Proteine ERK 1/2. Der zweite Transduktionsweg verbindet das Gq-Protein mit der PLC, deren Aktivierung zur Entstehung von  $IP_3$  und DAG führt und in der Konsequenz die Freisetzung von intrazellulärem Kalzium und die Aktivierung der PKC zur Folge hat. Die beiden Signalübertragungswege stehen unter einander in Verbindung (Wang et al. 2002b; Wang und Reiser 2003). Kürzlich konnten wir an einer Oligodendrozyten-Zelllinie darlegen, dass auch in diesen Zellen der durch PAR-1-Aktivierung induzierte intrazelluläre Kalziumanstieg vor allem das Ergebnis der  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern ist. Hinsichtlich der intrazellulären Signalmechanismen des PAR-2 ist bisher deutlich weniger bekannt.

#### Physiologische und pathophysiologische Funktionen von Thrombin und PARs im Gehirn

Die Vielzahl der in den letzten Jahren erschienenen Publikationen zum Thema PARs beleuchtet das wachsende Interesse an deren Bedeutung vor allem auch für zerebrale Vorgänge. Dennoch stehen wir trotz rascher Fortschritte immer noch am Anfang des Verständnisses der von ihnen kontrollierten zellulären Funktionen. Die jüngsten Studien haben gezeigt, dass diese Rezeptorfamilie an einer erheblichen Anzahl neurologischer Prozesse beteiligt ist, indem sie eine kritische Rolle in der Aufrechterhaltung der Balance zwischen Neuroprotektion und Neurodegeneration, bei Entzündung, Verletzung und verschiedenen Krankheitszuständen spielt. Abbildung 4 stellt einige der wesentlichen funktionellen Konsequenzen einer PAR-Aktivierung im Gehirn an den Zelltypen Neuronen, Astrozyten und Mikroglia und bezogen auf neurodegenerative Erkrankungen dar.

Thrombin kann im Nervensystem Wachstum, Aufrechterhalten der neuronalen Funktion und morphologische Veränderungen in-



**Abb. 4: Funktionelle Bedeutung der PAR Aktivierung im Gehirn. PAR Aktivierung durch Thrombin bewirkt diverse zelluläre und morphologische Veränderungen in den Hauptzelltypen des Gehirns, Neuronen, Astrozyten und Mikroglia. Deren Wechselwirkungen sind wesentlich für Entwicklung und Folgen bei einigen neurodegenerativen Erkrankungen.**

duzieren. Im Gehirn beeinflusst es alle drei Hauptzelltypen. Thrombin löst in Neuronen eine Veränderung der Zellmorphologie aus. Die proteolytische Aktivität von Thrombin resultiert über PAR-1 in einem Einziehen neuritischer Fortsätze, ein nach Entzug von Thrombin aus dem umgebenden Medium reversibler Vorgang. Auch auf Astrozyten wurde die Wirkung von Thrombin detailliert untersucht. In Kultur verursacht Thrombin eine Umkehr der sternförmigen Morphologie der Astrozyten und führt sie in eine flache epitheliale Form über. Der oben besprochene mitogene Effekt, welcher in einer Proliferation der Astrozyten resultiert, wird ausgelöst. Allerdings schließen sich die beiden Thrombin-Effekte an Astrozyten bezüglich der erforderlichen Konzentration von Thrombin gegenseitig aus. Bei der niedrigsten Konzentration von Thrombin wurde kein mitogener Effekt beobachtet, wohingegen die Umkehr der sternförmigen Morphologie ausgelöst wurde. Unsere Untersuchungen haben ergeben, dass die Zugabe von Thrombin und das Aktivieren von PAR-1 bis PAR-3 durch die entsprechenden Peptidliganden zur Astrozytenproliferation führt (Wang et al. 2002a). Weiterhin stimuliert Thrombin die Freisetzung des potenten vasokonstriktorischen Peptids Endothelin-1 aus Astrozyten. Thrombin induziert auch die Arachidonsäurebildung in Astrozyten, wobei die Arachidonsäure ih-

rerseits die Thrombin-induzierten Kalziumantworten in den Astrozyten unterdrückt. Nicht nur bei Astrozyten sondern auch bei der Mikroglia löst Thrombin Proliferation über Aktivierung des PAR-1 aus. Mikroglia sind residente Makrophagen im ZNS und spielen bei verschiedenen ZNS-Erkrankungen eine wesentliche Rolle, indem sie Entzündung und neuronalen Zelltod kontrollieren. PAR-1-Aktivierung reguliert CD40 hoch, welches ein transmembranes Glycoprotein ist, das in Immunzellen, wie B-Lymphozyten, aktivierten T-Zellen und Monozyten, exprimiert wird.

Aktivieren der PARs über Thrombin hat indirekt auch einen Effekt auf die Expression eines anderen Typs der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, nämlich des metabotropen Glutamaterezeptors, welcher bei synaptischer Plastizität mitwirkt. Nach PAR-1-Aktivierung durch Thrombin ist die Expression eines Typs des metabotropen Glutamaterezeptors, mGluR5, auf Astrozyten reduziert. Astroglia haben eine bedeutende Aufgabe bei der Aufrechterhaltung der Glutamatransmission. Kenntnis der Regulation der astrozytären Funktionen während pathologischer Zustände, welche durch erhöhte Thrombinspiegel charakterisiert sind, kann von großer Bedeutung für das Verständnis zellulärer Wechselwirkungen bei Krankheitszuständen im ZNS sein. Die Aktivierung von PAR-1 über Throm-



**Tab. 1: Charakteristika der PAR-Gene und der proteinspaltenden Aktivierungen der vier PAR-Subtypen, PAR-1 bis -4. Exons (Anzahl der kodierten Aminosäuren (AS)) und Introns (Anzahl Basen) der humanen PAR-Gene. PARs können meist durch mehrere Proteasen aktiviert bzw. inaktiviert werden, wie hier zusammengefasst. Die durch Agonist entstehende Spaltstelle am humanen PAR und die Sequenz des aktivierenden Peptids (gekoppelter Ligand) der PARs bei Mensch (h), Maus (m) und Ratte (r). TF, tissue factor; Faktoren VIIa und Xa, Faktoren der Gerinnungskaskade.**

	PAR-1	PAR-2	PAR-3	PAR-4
Exon 1 (human)	AS 1-29	AS 1-27	AS 1-22	AS 1-37
Exon 2 (human)	AS 30-425	AS 28-397	AS 23-374	AS 38-385
Intron (human)	22,000 Basen	14,000 Basen	4,000 Basen	274 Basen
Aktivierende Proteasen	Thrombin Trypsin Factor Xa Granzym A	Trypsin Tryptase Factor Xa TF/ Factor VIIa	Thrombin	Thrombin Trypsin Cathepsin G
Spaltstelle (human)	Arg 41-Ser 42	Arg 34-Ser 35	Lys 38-Thr 39	Arg 47-Gly 48
Gekoppelter Ligand (Peptidsequenz)	SFLLRN (h) SFLLRN (m, r)	SLIGKV (h) SLIGRL (m, r)	TFRGAP (h) SFNGCP (m)	GYPGQV (h) GYPGKF(m)
Inaktivierende Proteasen	Plasmin Cathepsin G Elastase Proteinase 3 Chymase	Chymase Elastase		Elastase

bin in hippocampalen Neuronen hemmt die durch NMDA-Rezeptoren vermittelte Schmerzübertragung auf einem Weg, welcher den Endothelin-A-Rezeptor betrifft. Letzterer ist ein weiterer G-Protein-gekoppelter Rezeptor. Endothelin-Rezeptoren, die wichtig bei der Regulation des kardiovaskulären Systems sind, wurden auch auf den Gliazellen im ZNS gefunden.

Ein Gebiet, auf dem die Erforschung der PARs besondere Aufmerksamkeit erregt hat, ist deren mögliche Mitwirkung bei der Kontrolle von Entzündung und bei Verletzungen. PAR-1 zum Beispiel wurde nach einer Gesichtsnervverletzung herunterreguliert. Eine jüngst durchgeführte Studie ergab, dass eine milde Quetschung des Sehnervs in der Ratte, welche ein Modell für ZNS-Trauma darstellt, zu einer vorübergehenden Hochregulation aller PARs führt (Rohatgi et al. 2003). Bei der Nervquetschung entsteht aus Prothrombin an der Stelle der Gewebeläsion durch eine verletzungsbedingte Aktivierung Thrombin, welches dann einen Sekundärschaden verursacht.

Thrombin kann in neuronalen Zellen über die Rezeptor-vermittelte proteolytische Aktivierung überraschenderweise gegensätzliche Wirkungen auslösen, entweder apoptotischen Zelltod oder aber Neuroprotektion. Wie ist das zu verstehen? Beides wurde in Kultur sowohl bei Astrozyten als auch bei Neuronen beobachtet. Diese an isolierten Zellen gewonnene Einsicht löste diverse Studien aus, die nach einer eventuell kon-

zentrationenabhängigen Wirkung des Thrombin *in vivo* forschten. Dies wurde insbesondere bei Gewebeverletzung und Wundheilung untersucht, wie im Fall verschiedener Gehirnverletzungsmodelle. Diese Modelle beinhalten Sauerstoff-Glukose-Entzug an hippocampalen Schnittkulturen (Striggow et al. 2001), Quetschung des Nervus opticus sowie hypoglykämische und oxidative Stressbedingungen. Eine Studie unseres Labors stellte fest, dass Thrombin bei einer niedrigen Konzentration (50 nM oder weniger) neuroprotektiv wirken kann, wohingegen bei höherer Konzentration ein neurodegenerativer Effekt ausgelöst wird (Striggow et al. 2000). Beides wurde an dem Modell der organotypischen hippocampalen Schnittkulturen *in vitro* untersucht. Die parallel durchgeführte *in vivo* Studie ergab, dass nach einer Hirnischämie der Ratte Thrombin eine konzentrationsabhängige Wirkung bezüglich Absterben oder Überleben der Neurone hat (Striggow et al. 2000). Eine andere Untersuchung zeigte, dass die Thrombin-vermittelte PAR-1-Aktivierung Neuronen und Astrozyten gegen Belastungen schützt, zu denen oxidativer Stress oder Hypoglykämie gehören, wohingegen hohe Konzentrationen von Thrombin sowohl für Neuronen als auch Astrozyten, die unter Normalbedingungen kultiviert wurden, toxisch waren. Dabei offenbarte sich ferner, dass all diese Effekte durch den endogenen Serinprotease-Inhibitor des Gehirns, PN-1, gehemmt werden. Dies belegt

die Notwendigkeit der proteolytischen Aktivität von Thrombin über PARs. Die meisten Wirkungen von Thrombin sind durch den Rezeptor PAR-1 vermittelt, wobei jüngst auch die Rolle des PAR-4 bei proinflammatorischen Prozessen herausgestrichen wurde. An Hirnmikroglia sind proinflammatorische Effekte des Thrombin nicht nur durch PAR-1, sondern auch durch PAR-4 vermittelt. PAR-2 Agonisten sind in neurogener Inflammation beteiligt und sind toxisch für hippocampale Neurone. Daraus folgt, dass PAR-2-Aktivierung zur Neurodegeneration beitragen kann.

Schlaganfall, nämlich Zerebralinfarkt, bewirkt ein plötzliches neurologisches Versagen, welches zum einen durch Verschluss eines zerebralen Blutgefäßes verursacht ist, wodurch ischämische Nekrose des Gehirns ausgelöst wird. Andererseits kann auch der Riss eines Blutgefäßes verantwortlich sein, wodurch im Gehirn oder im Subarachnoidalraum eine intracraniale Blutung entsteht. Unsere Studien zur PAR-Expression in verschiedenen Tiermodellen der zerebralen Ischämie haben gezeigt, dass PARs bei der Pathophysiologie der zerebralen Ischämie beteiligt sind: die mRNA-Expression der PARs wird nach Ischämie transient verändert. Hingegen offenbarte sich in Knock-out-Mäusen, welche den PAR-1 nicht mehr hatten, eine deutliche Reduktion des Infarkt volumens nach einer transienten zerebralen Ischämie (Junge et al. 2003). Dies weist auf eine neurodegenerative Rolle des PAR-1 während des Schlaganfalls und der Ischämie hin, sowie auf das Auslösen von Neuroprotektion in Folge eines Mangels an PAR-1. Das Fehlen auffälliger Unterschiede zwischen Wildtyp und PAR-1 Knock-out-Mäusen nach Durchlässigmachen der Bluthirnschranke bei Ischämie beweist, dass PAR-1-Signale mit neuronalem oder glialem Zellüberleben zusammenhängen. Ein weiterer Aspekt, welcher die Wirkung von Thrombin als einer möglichen neuroprotektiven Substanz unterstützt, ist seine Beteiligung beim ischämischen Präkonditionieren (Striggow et al. 2001; Xi et al. 2003). Beim Präkonditionieren entwickelt das Gehirn eine Toleranz gegenüber einem den Zelltod auslösenden Insult, wenn das Gehirn mit einem physiologisch stresshaften, jedoch weitaus weniger gravierenden Insult vorbehandelt wird. So bietet Präkonditionieren eine mögliche Therapie insbesondere für Schlaganfallgefährdung. Wir haben gezeigt, dass endogenes Thrombin beim ischämischen Präkonditionieren beteiligt ist, womit der Schaden nach einer folgenden schweren Ischämie vermindert wird und sich eine

Neuroprotektion einstellt (Striggow et al. 2000). Präkonditionieren durch Anwenden von Thrombin verringert auch die durch zerebrale Blutung ausgelöste Gehirnödembildung.

PARs werden ferner mit verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht. Auf dem Gebiet der Alzheimerschen Erkrankung ist es essenziell, die biologischen Wirkungen des  $\beta$ -Amyloid-Proteins, ein ursächliches Agens der Alzheimer-Erkrankung, zu erforschen. Thrombin schwächt die durch  $\beta$ -Amyloid-Protein ausgelöste neuronale Degeneration ab. Thrombin-induzierte Effekte können dabei durch das PAR-1 aktivierende Peptid vermittelt werden, was darauf hinweist, dass PAR-1 bei Alzheimer-Erkrankungen beteiligt ist. Eine Studie aus jüngster Zeit hat ergeben, dass bereits nanomolare Konzentrationen von Thrombin in der Lage sind, eine schnelle Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins in hippocampalen Neuronen der Maus durch PAR herbeizuführen, wodurch apoptotischer neuronaler Zelltod ausgelöst wird. Das Tau-Protein, welches eines der Mikrotubuli-assoziierten Proteine ist, kommt als axonales Phosphoprotein auch im normalen Gehirn vor; bei Alzheimer-Erkrankung ist Tau jedoch hyperphosphoryliert und ein wesentlicher Bestandteil der neurofibrillären Geflechte. Deren Anzahl scheint proportional zum Grad der Demenz bei Alzheimer-Patienten zu sein. Daher unterstreicht die Aktivität des Thrombin über PAR-1 und PAR-4 bei der Auslösung der Tau-Hyperphosphorylierung und nachfolgender Bildung der Geflechte die besondere Bedeutung von Thrombin und PARs bei der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung.

Eine weitere neurodegenerative Erkrankung, bei der Thrombin und PARs eine Rolle zu spielen scheinen, ist die Parkinsonkrankheit. Bei der Parkinsonkrankheit findet sich eine Abnahme der Anzahl der Neuronen, welche den Neurotransmitter Dopamin freisetzen, wodurch sich eine verminderte Koordination der Bewegung sowie eine Steifheit der Extremitäten ergibt. Mehrere Berichte haben gezeigt, dass Thrombin-vermittelte Aktivierung der Mikroglia bei neuropathologischen Prozessen des dopaminergen Zelltods in der *substantia nigra* der Ratte beteiligt ist. Auch bei Humanimmunodefizienz (HIV)-bedingter Neurodegeneration wurde ein Bezug zu Thrombin und PAR-1 gefunden. Die HIV-Encephalitis ist ein Hauptgrund der Infektion im Gehirn bei HIV-Patienten. Encephalitis ist eine Entzündung viralen oder mikrobiellen Ursprungs.

Aktivieren und Hochregulieren von PAR-1 scheinen bei Gehirnentzündung zum neuronalen Schaden der HIV-Infektion beizutragen.

### Abschließende Bemerkungen

Die Funktionen der PARs als Rezeptor-Familie und die des Thrombin und anderer proteolytischer Rezeptoraktivatoren sind wesentlich im normalen wie im kranken Zustand des Nervengewebes wirksam. Welche Chancen können sich dadurch eröffnen? Strategien, um die PAR-Aktivierung durch PAR-Agonisten oder PAR-Antagonisten zu beeinflussen, stellen ein neuartiges therapeutisches Potenzial dar. Dies kann helfen, Prozesse in Gang zu setzen, um Langzeitschäden bei neurodegenerativen Erkrankungen zu reduzieren (Ossovskaya und Bunnett 2004). Eine wichtige und offensichtliche Frage ist jedoch bis jetzt trotz intensiver Forschung auf diesem Gebiet noch nicht beantwortet, nämlich, welche Typen von Proteasen während normaler oder pathologischer Bedingungen im Gehirn die PAR-Aktivierung auslösen und ob auch Peptide als aktivierende Agenzien dies übernehmen können.

### Literatur

- Coughlin, S.R. (2000): Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* 407: 258-264.
- Junge, C.E., Sugawara, T., Mannaioni, G., Alagarsamy, S., Conn, P.J., Brat, D.J., Chan, P.H. und Traynelis, S.F. (2003): The contribution of protease-activated receptor 1 to neuronal damage caused by transient focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 13019-13024.
- Ossovskaya, V.S. und Bunnett, N.W. (2004): Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Rev* 84: 579-621.
- Rohatgi, T., Sedehizade, F., Sabel, B.A. und Reiser, G. (2003): Protease-activated receptor subtype expression in developing eye and adult retina of the rat after optic nerve crush. *J Neurosci Res* 73(2): 246-254.
- Striggow, F., Riek, M., Breder, J., Henrich-Noack, P., Reymann, K.G. und Reiser, G. (2000): The protease thrombin is an endogenous mediator of hippocampal neuroprotection against ischemia at low concentrations but causes degeneration at high concentrations. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 2264-2269.
- Striggow, F., Riek-Burchardt, M., Kiesel, A., Schmidt, W., Henrich-Noack, P., Breder, J., Krug, M., Reymann, K.G. und Reiser, G. (2001): Four different types of protease-activated receptors are widely expressed in the brain and are up-regulated in hippocampus by severe ischemia. *Eur J Neurosci* 14: 595-608.
- Wang, H. und Reiser, G. (2003): The role of the  $Ca^{2+}$ -sensitive tyrosine kinase Pyk2 and Src in thrombin signalling in rat astrocytes. *J Neurochem* 84: 1349-1357.
- Wang, H., Ubl, J.J. und Reiser, G. (2002a): Four subtypes of protease-activated receptors, co-expressed in rat astrocytes, evoke different physiological signaling. *Glia* 37: 53-63.
- Wang, H., Ubl, J.J., Stricker, R. und Reiser, G. (2002b): Thrombin (PAR-1)-induced proliferation in astrocytes via MAPK involves multiple signaling pathways. *Am J Physiol Cell Physiol* 283: C1351-1364.
- Xi, G., Reiser, G. und Keep, R.F. (2003): The role of thrombin and thrombin receptors in ischemic, hemorrhagic and traumatic brain injury: deleterious or protective? *J Neurochem* 84: 3-9.

Eine ausführliche Literaturliste kann von den Autoren angefordert werden.

### Danksagung

Die Untersuchungen wurden von der DFG und dem BMBF unterstützt. Wir danken Gisela Reiser, M.A. für die gründliche Durchsicht des Textes.

### Kurzbiographien

**Prof. Dr. Georg Reiser:** 1967-1973 Studium Physik und Chemie, Ludwig-Maximilians-Universität München und Universität Lausanne; Dissertation am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried und Promotion 1977; 1979-1982 Wissenschaftlicher Assistent, Physiologisch-chemisches Institut der Julius-Maximilians-Universität Würzburg; 1982-1984 Forschungsstipendium der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Honorary Research Assistant am University College, Dept. of Biophysics, London; 1984-1994 Wissenschaftlicher Angestellter und Akad. Rat, Physiologisch-chemisches Institut der Eberhard-Karls-Universität Tübingen; 1987 Habilitation für das Fach Physiologie an der Medizinischen Fakultät (Theoretische Medizin) der Universität Tübingen; ab 1991 Leiter einer eigenständigen Arbeitsgruppe: „Molekulare Neurophysiologie“; 1992 Habilitation für das Fach Physiologische Chemie und Biochemie an der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Tübingen; 1994 Professur für Biochemie / Neurobiochemie an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg und Direktor des Instituts für Neurobiochemie. Seit 1996 Sprecher des DFG-Graduiertenkollegs: „Biologische Grundlagen von Erkrankungen des Nervensystems“ an der Medizinischen Fakultät der Universität in Magdeburg. Forschungsarbeiten zu (i) molekularen Mechanismen der Neurotransmitter-vermittelten Signaltransduktion in Gliazellen, einschließlich physiologischer Funktionen von ATP



und Thrombin, sowie deren Rezeptoren, (ii)  $Ca^{2+}$ -Regulation und Energiestoffwechsel bei Neuroprotektion und Neurodegeneration bei Ischämie; (iii) Beteiligung der Mitochondrien bei Regulation astrocytärer Funktionen und Glia-Neuron-Wechselwirkung.

**Dr. Tanuja Rohatgi:** 1991-1996 Studium Zoologie und Molekular-Biologie, Universität Delhi, Indien. 1996-1999: Research fellow, Centre for Biochemical Technology, Delhi, Indien. 2000-2004: Promotionsstudium an der Otto-von-Guericke-Universität, Magdeburg. 2004 Promotion in Neurobiochemie, Universität Magdeburg.

#### Liste der Abkürzungen

<b>DAG</b>	<i>Diacylglycerol</i>
<b>ERK</b>	<i>Extracellular signal regulated kinase</i>
<b>GDP</b>	<i>Guanosin Diphosphat</i>
<b>GTP</b>	<i>Guanosin Triphosphat</i>
<b>HIV</b>	<i>Human Immunodefizienz Virus</i>
<b>IP<sub>3</sub></b>	<i>Inositol 1,4,5-trisphosphat</i>
<b>MAPK</b>	<i>Mitogen-aktivierte Proteinkinase</i>
<b>PNS</b>	<i>Peripheres Nervensystem</i>
<b>PARs</b>	<i>Protease Aktivierte Rezeptoren</i>
<b>PN-1</b>	<i>Protease Nexin 1</i>
<b>PLC</b>	<i>Phospholipase C</i>
<b>PKC</b>	<i>Proteinkinase C</i>
<b>ZNS</b>	<i>Zentrales Nervensystem</i>

#### Korrespondenzadresse

**Prof. Dr. G. Reiser**  
 Institut für Neurobiochemie  
 Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg  
 Medizinische Fakultät  
 Leipziger Straße 44  
 D-39120 Magdeburg  
 Tel.: ++ 49 (0) 391 671 3088  
 Fax: ++ 49 (0) 391 671 3097  
 e-mail: georg.reiser@medizin.uni-magdeburg.de

## ARTIKEL DES QUARTALS

Vorgestellt von Michael Frotscher

Institut für Anatomie und Zellbiologie der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Postfach 111, 79001 Freiburg

### Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus

Christoph Schmidt-Hieber, Peter Jonas, Josef Bischofberger

Erschienen in *Nature*, 13 May 2004; 429, 184-187 (2004).

Die meisten von uns haben während ihres Studiums noch gelernt, dass die Bildung von Nervenzellen etwa zum Zeitpunkt der Geburt abklingt. Später wurde diese Aussage dahingehend revidiert, dass in einzelnen Hirnregionen die Neurogenese noch anhalten kann, insbesondere wenn diese Hirnregionen spät gebildet werden. Hierzu gehört der *Gyrus dentatus* der Hippocampusformation. Wir wissen heute, dass in dieser Hirnregion lebenslang neue Nervenzellen gebildet werden. Es kam als eine ziemliche Überraschung, dass diese Neubildung von Neuronen durch physische Aktivität kontrolliert wird (van Praag et al. 1999). Mancher Läufer unter uns hat sich an dieser Stelle wohl ganz zufrieden zurückgelehnt.

Warum aber werden diese neuen Nervenzellen gebildet? Wir alle wissen, dass der Hippocampus eine wichtige Rolle bei Lern- und Gedächtnisprozessen spielt. Hat die lebenslange Neubildung von Nervenzellen etwas mit Lernen und Gedächtnis zu tun? Wir wissen, dass neugebildete Nervenzellen nicht am Ort ihrer Bildung verharren, sondern zu ihrem Be-

stimmungsort hinwandern. Wie muss man sich diesen Prozess im ausdifferenzierten Gehirn vorstellen? Wir wissen aus den Arbeiten von Pasko Rakic, dass neugebildete Nervenzellen entlang von Radialgliafasern migrieren. Ist denn ein solches Radialgliagerüst im adulten *Gyrus dentatus* vorhanden? Wir haben auch gelernt, dass Radialgliazellen Vorläuferzellen von Neuronen sind. Wie kann man sich Nervenzellneubildung und neuronale Migration im *Gyrus dentatus* des ausdifferenzierten Gehirns vorstellen? Vor allem aber wollen wir wissen, was denn die Funktion dieser neugebildeten Neurone ist und wie sie sich mit ihren auswachsenden Fortsätzen in das präexistente Netzwerk des Hippocampus integrieren.

Zu diesem Fragenkatalog haben Schmidt-Hieber et al. mit ihren Untersuchungen einen wesentlichen Beitrag geleistet. Die Autoren fanden, dass reife und junge Körnerzellen des *Gyrus dentatus* unterschiedliche funktionelle Eigenschaften aufweisen. Neugebildete unreife Körnerzellen sind viel leichter erregbar als die benachbarten ‚alten‘ Nervenzellen.



Christoph Schmidt-Hieber, Peter Jonas und Josef Bischofberger (von links) haben die Rolle von jungen Körnerzellen im adulten Hippocampus untersucht.

Mehr noch, auch die Induktion von assoziativer synaptischer Plastizität ist deutlich erleichtert. Während bei reifen Körnerzellen zur Induktion synaptischer Verstärkung (LTP) neben der Afferenzstimulation auch „Burst“-Entladungen der postsynaptischen Körnerzelle erforderlich waren, konnte bei unreifen Körnerzellen LTP bereits durch eine Kombination von afferenter Stimulation mit einzelnen postsynaptischen Spikes induziert werden. Damit ist die Schwelle für die LTP-Induktion bei den jungen Nervenzellen signifikant niedriger.

Bevor die Autoren jedoch diese Schlussfolgerung ziehen konnten, mussten sie die beiden unterschiedlichen Zellen, junge und alte Körnerzellen, eindeutig identifizieren. Dabei kam ihnen zunächst zu Hilfe, dass junge Körnerzellen immer am unteren Rand des Körnerzellbandes gelegen sind, im *Gyrus dentatus* also eine outside-in-Schichtung (im Gegensatz zur inside-out-Schichtung des Neokortex) vorliegt. Weiterhin haben sie die abgeleiteten Zellen mittels intrazellulärer Biocytinfüllung markiert und mit Antikörpern gegen PSA-NCAM angefärbt. Bekanntlich wird diese embryonale Form von NCAM im adulten Hippocampus nur noch in neugebildeten Körnerzellen exprimiert. Schließlich