

Das Umfeld macht es: wie Interneurone fürs Leben lernen!

Marcus J. Wirth, Silke Patz, Jochen Grabert und Petra Wahle

Zusammenfassung

Die GABAergen inhibitorischen Interneurone der Hirnrinde bilden eine morphologisch, neurochemisch und elektrophysiologisch heterogene Klasse von Neuronen. Die Diversität ist nicht allein genetisch determiniert, sondern wird während der postnatalen Entwicklung durch Umgebungsfaktoren beeinflusst: bioelektrische Aktivität, Neurotrophine, Afferenzen und sensorische Erfahrung steuern die Entwicklung der neurochemischen Phänotypen. Wir haben im Modell der organotypischen Kultur zentraler visueller Strukturen die ontogenetische Expression von Glutamatdecarboxylasen-65/67 (GAD-65/67), Parvalbumin (PARV) und Neuropeptid Y (NPY) analysiert. Die Expression dieser drei Funktionsmarker ist von Aktivität und Neurotrophinen abhängig. Die PARV- und die NPY-Expression werden zudem durch thalamische Afferenzen moduliert. Die NPY-Expression muss von jungen Neuronen regelrecht „erlernt“ werden, um im adulten Kortex bedarfsabhängig aktiviert werden zu können. Wir postulieren die Existenz kritischer Perioden molekularer Plastizität in denen junge Interneurone in Abhängigkeit von Umgebungsfaktoren Phänotypentscheidungen treffen.

Abstract

GABAergic inhibitory cortical interneurons constitute a morphologically, neurochemically and electrophysiologically heterogeneous class of neurons. The diversity is not solely determined by genetics or lineage, but is influenced during early postnatal development by environmental factors as are bioelectrical activity, neurotrophic factors, afferent systems and sensory experience. Using organotypic slice cultures of central visual structures as a model system we have analyzed the ontogenetic expression of GAD-65/67, PARV and NPY. The expression of these three functional markers depends on electrical activity and neurotrophins. The PARV and NPY expression is further regulated by thalamic afferents. The NPY expression needs to be “learned” by young interneurons to implement the ability for a use-dependent regulation of expression later in life. We postulate the existence of critical periods of molecular plasticity during which phenotype decisions of young interneurons are controlled by environmental factors.

Key words: neocortical interneurons; postnatal development; activity; neurotrophic factors; neuropeptides; calcium-binding proteins

Einleitung

Neokortikale Interneurone sind durch kortexintrinsic axonale Verbindungen definiert und besitzen einen GABAergen Phänotyp und eine inhibitorische Funktion. Einzige Ausnahme sind die dorntragenden Sternzellen der Schicht IV, die ebenfalls intrinsic Verbindungen, aber einen glutamatergen Phänotyp besitzen. Die morphologische Klassifizierung der GABAergen Interneurone erfolgt anhand der axonalen Projektionen in die Schichten der Hirnrinde und der synaptischen Verschaltung mit exzitatorischen Neuronen und anderen inhibitorischen Interneuronen (Abbildung 1: Exkurs). Korbzellen bilden axosomatische und Kandelaberzellen axoaxonische Synapsen – die beiden Zelltypen

liefern eine starke Inhibition. Martinotti-Neurone, Bitufted und Double-Bouquet Zellen liefern die axodendritische Inhibition, welche die erregenden Eingänge moduliert. Viele Interneuronentypen kommunizieren zusätzlich über *gap junctions* (siehe Exkurs; Connors und Long 2004). Betrachtet man neben den morphologischen Merkmalen die neurochemischen und elektrophysiologischen Eigenschaften, insbesondere die Expression von kalziumbindenden Proteinen, Neuropeptiden, ionalen Leitfähigkeiten, Aktionspotentialmustern und Rezeptoren für Transmitter und trophe Faktoren, dann entsteht das Bild einer sehr heterogenen Klasse von Nervenzellen (Gonchar und Burkhalter 1997; Monyer und Markram 2004). Diese Diversität gilt für viele Strukturen des Gehirns. Allein in der

Retina werden 60 verschiedene Neuronentypen diskutiert (Masland 2004). Im Hippocampus wurden 20 verschiedene Interneuronentypen beschrieben (Parra et al. 1998) und für die Hirnrinde werden bis zu 100 Zelltypen vermutet (Stevens 1998). Man kann davon ausgehen, dass die Expression von Funktionsmolekülen nicht allein zellautonom gesteuert wird. So sind die Interneuronentypen nicht über einen gemeinsamen Progenitor determiniert, vielmehr werden sie durch lokale Einflüsse wie Nachbarschaftsbeziehungen und Umgebungsfaktoren bestimmt (Xu et al. 2003; Mione et al. 1994; Götz und Bolz 1994; Götz et al. 1995). Bei Nagetieren wandern 95% der Interneurone von einem basaltelencephalen Geburtsort her tangential in die Großhirnrinde ein. Um so verblüffender erscheint die vergleichsweise stereotype Ausstattung der Rindenareale und der Schichten mit Interneuronen aller Typen. Man spricht nachgerade von kanonischen Mikroverschaltungen (Abbildung 1), weil genügend Neurone aller Typen pro Funktionseinheit Kortex vorhanden sind.

Zum einen findet in der frühen Entwicklung eine Überschussproduktion an Interneuronen statt, die später arealspezifisch selektiert werden. Zu den überzähligen Zellen gehören Neuronentypen der Subplate und Marginalzone, die nur transitorische Funktionen haben und später komplett eliminiert werden. Auch viele Neurone persistenter Typen werden aus den kortikalen Schichten eliminiert (Wahle und Meyer 1987; Allendörfer und Shatz 1994; Super et al. 1998).

Zum anderen durchlaufen reifende Interneurone eine Differenzierungsperiode, in der sie zunächst eine Vielzahl neuropeptiderger Transmitter und kalziumbindender Proteine exprimieren. Diese transitorische Expression einiger Funktionsmarker findet bei der Ratte im Verlauf der ersten bis dritten postnatalen Woche statt. So sind in FS Korbzellen während dieser Zeit Neuropeptide und CB nachweisbar, die in Korbzellen des adulten Kortex nicht mehr zu finden sind (Alcantara et al. 1996; Cauli et al. 1997; Gonchar und Burkhalter 1997). Die Wahl des adulten neurochemischen Phänotyps eines Interneurons findet in einer früh postnatalen Periode aus einem Repertoire molekularer Marker statt.

Doch warum durchlaufen reifende Neurone solche Phasen in denen sie Marker exprimieren, die sie im Adulten nicht brauchen? Wodurch wird die Festlegung des Interneurons auf einen bestimmten Phänotyp determiniert? Welche Mechanismen befähigen die Neurone, ihre Funktionsmoleküle dynamisch zu regulieren und im Verlauf des Lebens bedarfsabhängig zu exprimieren?

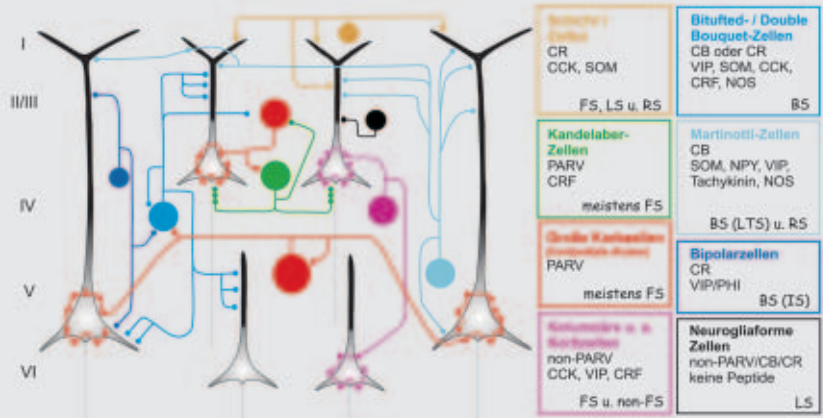
Exkurs

Die Abb. 1 zeigt nicht etwa das U-Bahn Netz einer Großstadt, sondern die Typen der Interneurone und ihre axonalen Projektionen in einer idealisierten kortikalen Kolumne. Die Kolumnen der Schichten II–VI sind die Module der kortikalen Informationsverarbeitung. Ihre exzitatorischen, glutamatergen Pyramidal- und Sternzellen sind Eingangsneurone für die Afferenzen und Ausgangsneurone für die Weiterverarbeitung der Information über axonale Projektionen innerhalb der Kolumnen, zwischen benachbarten Kolumnen eines funktionellen Areals und für die Projektionen zu anderen kortikalen und subkortikalen Zielgebieten. In jeder Kolumne sorgen GABAerge Interneurone für die Hemmung. Sie verhindern nicht etwa nur eine Übererregung. Vielmehr sind die synchron agierenden Interneuronennetzwerke entscheidende Taktgeber für die Informationsverarbeitung in den Pyramidalzellnetzwerken. Das Verhältnis von Pyramidalzellen zu Interneuronen beträgt etwa 4 zu 1. Interneurone werden nach morphologischen, physiologischen, neurochemischen Kriterien eingeteilt (Abb. 1). Allerdings lassen die hohe Diversität der Interneurone sowie die Areal- und Speziesunterschiede bis heute keine eindeutige Klassifizierung zu. Das entscheidende, areal- und speziesinvariante morphologische Kriterium ist das Muster der axonalen Projektionen und die Zielspezifität der synaptischen Verschaltung entweder als axo-somatische, axo-axonische oder axo-dendritische Termination.

- **Korbzellen** (*basket cells*): Die Axone bilden Synapsen auf Somata und proximale Dendriten der Pyramidalzellen und sind besonders prominent in der Schicht V. Große Korbzellen sind durch weitreichende horizontale Verbindungen in den Schichten V und III gekennzeichnet. Kleinere Korbzellen bilden lokale Verbindungen in Schichten II/III, V und VI einschließlich vertikal-kolumnärer Verbindungen. Nest-Korbzellen besitzen sehr lokale intralaminäre Verbindungen in den mittleren Schichten.

- **Kandelaberzellen** (*chandelier cells*): Die Axone bilden lokalere Plexus und die Synapsen kontaktieren nur die Axoninitialsegmente von Pyramidalzellen verschiedener Schichten in der Kolumne.

- **Bipolarzellen**: Die Axone sind sehr lokal intrakolumnär. Axodendritische



und axosomatische Synapsen kontaktieren neben Pyramidalzellen bevorzugt andere Interneurone. Bipolarzellen werden als Regulator für lokalen Blutfluss und Metabolismus diskutiert (Magistretti et al. 1998).

- **Bitufted- bzw. „Double-bouquet“-Zellen**: Die Axone bilden auf- und absteigende intrakolumnäre Verzweigungen, die Apikal- und Basaldendriten von Pyramidalzellen aller Schichten kontaktieren.

- **Martinotti-Zellen**: Die Axone verzweigen in vertikal aufsteigende Bündel von Kollateralen, die *en passant* Synapsen mit Pyramidalzellendriten in oberen Schichten bilden. In der Schicht I bilden sie weitreichende horizontale Verbindungen auf distale Apikaldendriten. Lokalere horizontale Kollateralen kontaktieren Dendriten in infragranulären Schichten.

- **Interneurone der Schicht I**: Die Axone verzweigen intralaminär und kontaktieren distale Apikaldendriten. Kollateralen deszendieren in supragranuläre Schichten. Die Schicht I Neurone sind ebenfalls vom FS-Typ. Sie exprimieren Calretinin und die Neuropeptide SOM und CCK. Offensichtlich können FS-Eigenschaften also auch ohne Parvalbumin auftreten.

- **Neurogliaforme Zellen**: Sehr lokale Axone kontaktieren bevorzugt Dendriten. Die Verschaltung der Interneurone untereinander ist noch nicht vollständig geklärt. Korbzellen bilden Autapsen und inhibieren über chemische Synapsen andere FS-Neurone und Bitufted-Zellen. Auch Bitufted-Zellen bilden Autapsen und inhibieren Korbzellen. Bipolarzellen inhibieren bevorzugt non-FS Interneurone; die gezielte Hemmung GABAerger Neurone erzeugt eine kolumnäre Disinhibition. FS-Neurone sind untereinander durch elektrische Synapsen gekoppelt, ein zweites elektrisch gekoppeltes Netzwerk sind die Somatostatin-haltigen LTS-Neurone (Gibson et

al. 1999). Ein drittes Netzwerk sind die sog. *multipolar-bursting* Neurone supragranulärer Schichten (Blatow et al. 2003).

Die verschiedenen Aktionspotentialmuster werden primär durch die Ausstattung mit bestimmten Ionenkanälen bedingt; ob diese invariant oder individuell gebrauchungsabhängig-dynamisch reguliert werden, ist unbekannt. Genexpressionsprofile argumentieren für drei Interneuronen-Großgruppen, die durch die Kalzium-bindenden Proteine PARV, CB und CR definiert werden. Die Kalzium-Pufferdynamik trägt entscheidend zum Feuerverhalten der Neurone bei. Neuropeptide erfüllen eine modulatorische Funktion bei der synaptischen Übertragung; eine gebrauchungsabhängige Neuropeptidexpression kann somit die Erregbarkeit des Netzwerkes dynamisch regulieren. SOM und NPY hemmen den präsynaptischen Kalziumeinstrom und die exzitatorische Transmission. Tachykinine, VIP und CCK scheinen dagegen die exzitatorische Transmission noch zu steigern bzw. die Inhibition abzuschwächen. Die Freisetzung von Neuropeptiden aus *dense-core* Vesikeln benötigt mehr Kalzium als die Freisetzung klassischer Transmitter; sie findet meist nur nach repetitiver Erregung statt und die Wirkung ist längeranhaltend. Das erlaubt eine Modulation der synaptischen Übertragung auf einer anderen Zeitskala. Die Klassifizierung der morphologischen Interneuronentypen nach elektrophysiologischen und neurochemisch-molekularen Kriterien ist im Detail umstritten. Ein Teil dieses Problems ist hausgemacht. Wegen der besseren Resultate werden zellphysiologisch bevorzugt junge Neurone der zweiten bis dritten Postnatalwoche untersucht. Die Neurone sind jedoch in dieser Periode neurochemisch noch nicht vollständig ausdifferenziert, zeigen Kolokalisationsmuster, die im adulten Kortex so nicht



mehr zu finden sind, und einige molekulare Marker sind noch nicht auf dem adulten Expressionsniveau.

Korb- und Kandelaberzellen und die kurzaxonigen Neurone der Schicht I sind meistens FS-Neurone. Die Mehrzahl der FS Neurone der Schichten II-VI exprimiert Parvalbumin, jedoch im adulten Kortex keine Neuropeptide. Parvalbumin-negative Schicht I Neurone exprimieren die Neuropeptide CCK und SOM. In dieser Gruppe finden sich auch CR-positive Neurone, die im jungen Kortex oft als Cajal-Retzius Neurone angesprochen werden. Neurogliaform Zellen der Schichten II/III und IV sind LS; sie exprimieren keines der drei Kalzium-bindenden Proteine und keine Neuropeptide. Die anderen Typen werden als non-FS-Neurone zusammengefasst und als RS- oder BS-Neurone charakterisiert. Viele Martinotti-Zellen, Bituftet und Double-bouquet Zellen exprimieren in der Mehrzahl Calbindin und verschiedene Neuropeptide und zeigen kein einheitliches Feuerverhalten. Bipolarzellen exprimieren Calretinin, VIP und PHI; in der Ratte sind einige zudem cholinerg. Sie bilden als IS-Neurone einen Subset der BS-Neuronen. Die Zuweisung der Aktionspotentialmuster muss als vorläufig gelten und wir folgen dem Vorschlag von Kawaguchi und Kondo (2002). Neuere Arbeiten unterscheiden noch mehr Untergruppen und versuchen, sie mit der Diversität der Ionkanalexpression zu korrelieren (Gupta et al. 2000; Toledo-Rodriguez et al. 2004).

Abkürzungen: BS, burst-spiking; CB, Calbindin; CCK, Cholecystokinin; CR, Calretinin; CRF, Corticotropin releasing factor; FS, fast-spiking; IS, irregular-spiking; LTS, low-threshold-spiking; LS, late-spiking; NOS, Stickoxydsynthase; NPY, Neuropeptid Y; PARV, Parvalbumin; PHI, Peptid Histidin Isoleucin; RS, regular-spiking; SOM, Somatostatin; VIP, vasoaktives intestinales Polypeptid.

Die organotypische Kortextkultur als Modellsystem

Wir haben die Regulation der Expression repräsentativer Funktionsmarker untersucht, um zu verstehen, wie die Diversität der Interneurone und ihre phänotypische Kompetenz im Verlauf der Ontogenese entsteht. Dazu bedarf es eines geeigneten Modellsystems: die organotypische Hirnschnittkultur zentraler visueller Strukturen. Die Kulturen werden aus dem visuellen Kortex der neugeborenen Ratte angelegt. Im Gegensatz zu einer dissoziierten Kultur behält und entwickelt das explantierte Gewebe eine organotypische kortikale Organisation (Gähwiler et al. 1997). Durch fortschreitende Migration findet die Schichtenbildung statt, und die Zelltypen behalten ihre korrekten Lagebeziehungen (Bolz et al. 1993; Obst und Wahle 1997). Während der ersten drei Wochen entwickelt sich ein funktionell hochdifferenzierendes, spontanaktives Netzwerk aus exzitatorischen Pyramidalzellen und inhibitorischen Interneuronen (Plenz und Aertsen 1996; Klostermann und Wahle 1999). Kortextschnitte können mit Explantaten vom Thalamus und Colliculus superior kokultiviert werden. Dann regenerieren in den ersten zwei Wochen *in vitro* die typischen axonalen Projektionsbahnen (Bolz et al. 1993; Cardoso de Oliveira und Hoffmann, 1995). So kann der Einfluss von afferenten Innervationen oder Zielgebieten getestet werden. Auch die molekular-neurochemische Differenzierung erfolgt, und hier fanden wir deutliche Hinweise, dass ein organotypisches kein organidentisches Kultursystem ist. Doch gerade die Unterschiede erlaubten die Aufklärung der Mechanismen der phänotypischen Entwicklung. Offenbar besitzt der isolierte Kortex nicht alle notwendigen Determinanten, die den Inter-

1984-2004

npi
Electronic Instruments
for the Life Sciences

20 years!!

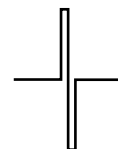
Single Electrode High Speed Voltage/Patch Clamp Amplifiers



Further improvements of the famous SEC amplifier

- ⇒ **VCcCC** option:
Voltage **C**lamp controlled **C**urrent **C**lamp
Ref.: Sutor et al. (2003), Pflügers Arch. 446:133-141
- ⇒ **DHC** option:
Dynamic **H**ybrid **C**lamp
Ref.: Dietrich et al. (2002), J.Neurosci.Meth. 116:55-63
- ⇒ **MODULAR** option (**SEC-03M**):
Versatility of Single Electrode Clamping in modular design for maximum flexibility
- ⇒ **LINEAR VC** option:
Highly reduced noise for measurements in the low pA range with sharp and patch electrodes

Stimulus Isolators without batteries and bipolar stimulus generation



Extracellular LoosePatch Clamp Amplifier with Differential Input



Other npi electronic instruments

- Two Electrode voltage clamp amplifiers
- Temperature control systems
- Bridge-/Intracellular amplifiers
- Extracellular amplifiers
- Modular system
- Low pass Bessel filters
- Fast iontophoretic drug application systems
- Fast pneumatic drug application systems
- Automatic chlorider
- ALA Scientific perfusion systems and accessories
- EXFO Burleigh micropositioners
- Scientifica Slice-/Fiber Master

npi electronic GmbH

Hauptstrasse 96, D-71732 Tamm, Germany
Phone +49 (0)7141-601534; Fax: +49 (0)7141-601266
support@npielectronic.com; <http://www.npielectronic.com>

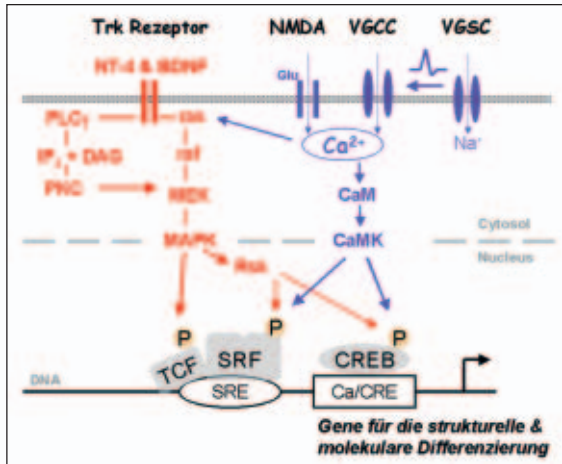


Abb. 2: Signalwege. Neurotrophine (roter Signalweg) und elektrische Aktivität (blauer Signalweg) regulieren die Expression von Genen für die strukturelle und molekulare Differenzierung. NT-4 agiert aktivitätsunabhängig, während BDNF die Aktivität als Kofaktor benötigt.

neuronen eine orts- und zeitgemäß korrekte neurochemische Entwicklung erlauben. Ein weiterer Vorteil liegt in der Langlebigkeit der Kulturen. Manipulationen in verschiedenen Entwicklungszeitfenstern können in ihren Langzeitkonsequenzen studiert werden. Solche Manipulationen können pharmakologischer Natur sein, z.B. um die bioelektrische Aktivität zu hemmen. Wachstumsfaktoren können exogen einzeln oder in Kombination zugeführt oder durch biologische Transfektion zur Überexpression gebracht werden, und endogene Wachstumsfaktoren können neutralisiert werden.

Bioelektrische Aktivität und Wachstumsfaktoren

Umgebungsfaktoren (*environmental / epigenetic factors*) sind von außen kommende Einflüsse, die die Genexpression und so den Phänotyp von Zellen beeinflussen. Für ein Neuron ist es die Nachbarschaft mit anderen neuronalen Zellen, der Kontext des Netzwerkes und insbesondere die elektrische Aktivität, die Existenz von Eingangs- und Zielstrukturen und die Kombination verfügbarer Nervenwachstumsfaktoren. Die Aktivität wirkt dabei über Ionenkanäle, und insbesondere die Art der Kalziumsignalgebung steuert beispielsweise in embryonalen Rückenmarksnervenzellen die Transmitterwahl (Spitzer et al. 2004). Die Neurotrophine *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) und Neurotrophin 4 (NT-4) werden in zum Teil aktivitätsabhängiger Weise von Neuronen und Gliazellen produziert und freigesetzt (Lessmann et al. 2003). Die Neurotrophin-Hypothese postuliert, dass reifende Neurone um trophische Faktoren konkurrieren, um zu überleben. Neurone, denen die Etablierung ihrer Verknüpfungen in einem bestimmten Zeitfenster nicht gelingt, werden durch Zelltod eliminiert. Auch Afferenzen konkurrieren

um zielgebietsabhängig ausgeschüttete Neurotrophine. Neurotrophine sind an der korrekten morphologischen, physiologischen und neurochemischen Differenzierung der Neurone beteiligt. Ferner sind sie an plastischen Vorgängen beteiligt, da sie Stabilität und Effizienz synaptischer Verbindungen beeinflussen (Vicario-Abejon et al. 2002). Neurotrophine agieren über spezifische Tyrosinrezeptorkinasen (Trk). Die Ligandierung löst eine Phosphorylierungskaskade intrazellulärer Signalmoleküle aus (Abbildung 2). Die Zytokinsignalgebung und die Kalziumsignalgebung über NMDA-Rezeptoren und spannungsabhängige Kalziumkanäle interagieren und konvergieren letztlich im Zellkern auf die Steuerung der Genexpression (West et al. 2002).

Wie wird der NPY Phänotyp festgelegt?

Neuropeptid Y (NPY) ist einer der peptidergen Ko-Transmitter kortikaler Neurone. Die NPY-Expression ist im adulten Kortex auf non-FS Interneurone beschränkt; insgesamt sind <1% der kortikalen Neurone NPY-positiv. Im früh postnatalen Kortex *in vivo* finden sich jedoch vorübergehend bis zu 3% NPY-Neurone, dann sinkt die Zahl im zweiten postnatalen Monat auf 0.5-1%. Die Neurone sterben nicht, sie stoppen nur die NPY-Produktion, und dies korreliert zeitlich mit der Endphase der kritischen Periode visueller Plastizität. In Monokulturen der Sehrinde finden wir auch nach drei Monaten noch 6-8% NPY-Neurone (Abbildung 3) (Obst und Wahle 1997). Hingegen sinkt die Zahl in thalamokortikalen Kokulturen während des zweiten Monats *in vitro* auf immerhin 2-3%, und noch geringere Zahlen waren in Kortex-Kortex-Thalamus-Kulturen zu finden. Die physikalische Präsenz glutamaterger Afferenzen aus kokultivierten Explanta-

ten erzeugt die Phänotypänderung: viele Interneurone stoppen in der Folge die transiente NPY-Expression. Dieser Prozess wurde Phänotyprestriktion genannt. Die Afferenzen reduzieren früh postnatal die Expression des Zytokins *leukemia inhibitory factor* (LIF). Insbesondere die parvalbuminergen Korb- und Kandelaberzellen mit ihrem ausgeprägten FS-Antwortverhalten stellen daraufhin die NPY-Expression ein (Wahle et al. 2000). Durch eine LIF-Überexpression in thalamokortikalen Kokulturen kann die Phänotyprestriktion verhindert werden, und durch Neutralisation von endogenem LIF wird sie in Monokulturen erzeugt. Die Manipulationen mussten allerdings in den ersten zwei postnatalen Wochen erfolgen. In dieser Zeitspanne wird die Phänotypentscheidung getroffen, die Exekutive erfolgt erst drei bis vier Wochen später. Dies lieferte den ersten Hinweis, dass in einer früh postnatalen Periode molekularer Plastizität interneuronale Phänotypentscheidungen durch Umgebungsfaktoren evoziert werden. Die NPY-Expression kann in alten Kokulturen sofort wieder auf 6-8% steigen, wenn die Neurotrophine BDNF oder NT-4 zugesetzt werden. Die Neurone behalten somit ihre Kompetenz, NPY bedarfsabhängig zu exprimieren.

Diese Kompetenz wird im Verlauf der ersten zehn Tage nach der Geburt implementiert. Das wissen wir aus einer weiteren Experimentserie. Die NPY mRNA wird aktivitätsabhängig exprimiert (Wirth et al. 1998). Während spontanaktive Monokulturen 6-8% NPY-Neurone zeigen, ist die Zahl in chronisch aktivitätsdeprivierten Kulturen bei 2% (Abbildung 3). Beendet man die Deprivation, so dass die Kulturen elektrisch aktiv werden, würde man ein sofortiges Ansteigen der Anzahl der NPY-Neurone erwarten. Die Erholung der Spontanaktivität geht mit einer transienten Übererregung einher (Gorba et al. 1999), welche normalerweise eine massive NPY-Expression zur Folge hat (Gall et al. 1990; Nagaki et al. 2000; Reibel et al. 2000). Entgegen der Erwartung versagte jedoch die Induktion der NPY-Expression. Die Neurone konnten ihre Kompetenz zur NPY-Expression offensichtlich nicht erwerben, als sie unter Aktivitätsdeprivation differenzierten.

Führt man das Experiment etwas anders aus, dann „erlernen“ die Zellen die Expression: zehn Tage Differenzierung mit Spontanaktivität (6-8% NPY Neuronen), danach eine mehrtägige Phase von Aktivitätsdeprivation (2% NPY Neuronen), gefolgt von einer Erholung der Spontanaktivität für wenige Tage, sie führt wieder zu einer NPY-Expression in 6-8% der Neurone, darunter auch viele PARV-Neurone. Die Kompetenz wird

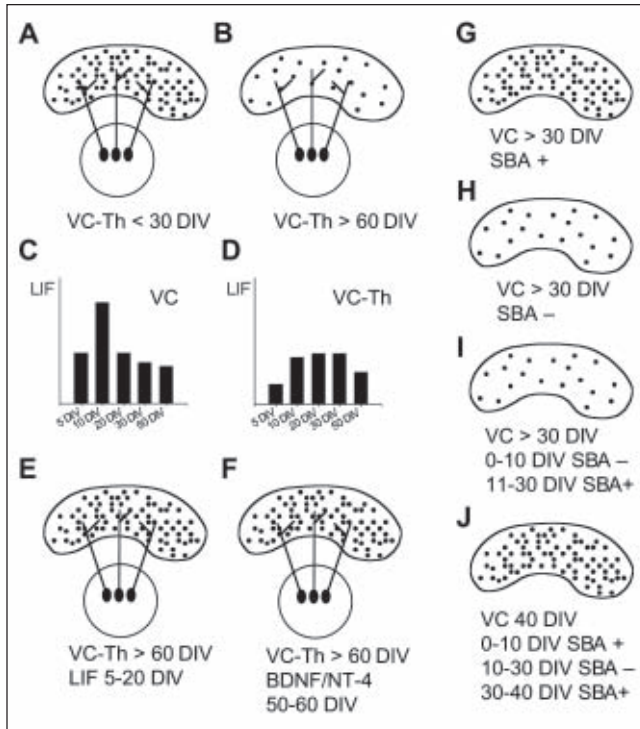


Abb. 3: Spezifizierung des NPY Phänotyps kortikaler Interneurone.
I. Die Rolle der Afferenzen und des Zytokins LIF. (A) Die Kortizes junger thalamokortikaler Kokulturen (VC-Th) zeigen 6-8% NPY Neurone. (B) Zum Ende des zweiten Monats ist die Zahl der NPY Neurone auf 2-3% gesunken. Diese Phänotyprestriktion wird durch die afferente Innervation aus dem Thalamus induziert. (C + D) In der VC-Th Kokultur reduzieren die Afferenzen früh postnatal die LIF-Expression, die in Monokulturen (VC) deutlich höher ist. (E) Die Phänotyprestriktion wird verhindert, wenn das Kulturmedium während einer früh postnatalen Periode mit exogenem LIF angereichert wird. Eine spät postnatale Behandlung der Kokulturen mit LIF aktiviert die NPY-Expression nicht mehr (nicht gezeigt). (F) Allerdings bleibt die NPY-Expression plastisch, denn sie kann in alten Kokulturen durch Stimulation mit BDNF oder NT4 jederzeit wieder aktiviert werden.
II. Die Rolle von synaptisch generierter bioelektrischer Aktivität (SBA).
 (G) Monokulturen ohne thalamischen Eingang zeigen keine Phänotyprestriktion. (H) Bei chronischer Aktivitätsdeprivation (SBA-) exprimieren nur 2% der Neurone NPY. (I) Eine Erholung der Aktivität (SBA+) nach einer Deprivation kann die NPY-Expression nicht mehr anregen. Die Zellen haben nicht „gelernt“, NPY zu exprimieren. (J) Erst eine früh postnatale Aktivitätsphase von null bis zehn Tagen *in vitro* (DIV) trainiert die Zellen so, dass sie die NPY Expression später aktivitätsabhängig regulieren können.

somit während der initialen Differenzierungsphase in den ersten zehn Tagen nach der Geburt erworben. Es ist eine Art „Prägung“, die es den Zellen gestattet, als Antwort auf veränderte Umgebungsbedingungen mit einem erneuten Abruf des ehemaligen Expressionsprogramms zu reagieren (Abbildung 3).

In Hirnrinde und Hippokampus gilt NPY als potentes, endogen produziertes Antiepileptikum (Woldbye et al. 1997). Mäuse ohne NPY sterben an sog. *kindling*-Epilepsien, weil die Hirnrinde trotz intaktem GABAergen System nicht in der Lage ist, die Übererregung zu terminieren (Baraban et al. 1997). Es will nicht einleuchten, warum eine fehlende NPY-Expression in 0.5-1% der Neurone

eine derart hohe Mortalität bewirkt. Die Mortalität liegt vielmehr an der fehlenden bedarfsabhängigen Hochregulation von NPY, wie man sie in Tiermodellen für Epilepsie und in menschlichem Biopsiematerial epileptischer Foci beobachten kann. NPY erhöht die Effizienz des GABAergen Systems durch eine langanhaltende Dämpfung der Erregung bei gleichzeitiger Verstärkung der Inhibition auf die Pyramidalzellen und Abschwächung der Inhibition zwischen GABAergen Interneuronen (Vezzani et al. 1999; Bacci et al. 2002). Eine dämpfende NPY-Wirkung kann früh postnatal wichtig sein, weil die hyperpolarisierende Inhibition langsamer reift als die Exzitation (Sutor und Luhmann 1995); daher sind viele NPY-Neurone früh postnatal vielleicht nützlich. Wenn die Sehrinde den Peak der kritischen Periode sensorischer Plastizität erreicht, wird NPY jedoch graduell runterreguliert und das trotz massiv steigender BDNF-Produktion. Durch die LIF-vermittelte Phänotypspezifizierung reagieren putative NPY-Neuronen weniger sensitiv auf die *steady state level* der endogenen Neurotrophine. Zuviel NPY in den Erregungskreisläufen wäre jetzt kontraproduktiv, weil es die synaptische Plastizität und die Effizienz der Informationsverarbeitung vielleicht erschweren würde. Daher sind im gesunden spät postnatalen und adulten Kortex nur wenige NPY-Neurone, aber viele fakultative *non-expresser* zu finden, die ihre Kompetenz zur NPY-Expression in einer frühen Periode molekularer Plastizität erworben haben. Die Fähigkeit, antiepileptische Neuropeptide zur Unterstützung der GABAergen Inhibition im Bedarfsfall hochzuregeln, ist sicherlich adaptiv.

FIND YOUR TOOLS AT...
WORLD PRECISION INSTRUMENTS

WWW.BLUEINSTRUMENTS.COM
WWW.WPI-EUROPE.COM



Wie werden die GAD-65/67 und PARV-Expression reguliert?

Die Glutamatdecarboxylasen (GAD) 65/67 definieren die hemmenden Interneurone; die beiden Enzyme leisten die GABA-Synthese. Die 65 kDa Isoform synthetisiert GABA bedarfsabhängig bei höherer Aktivität. Die 67 kDa Isoform gilt als verantwortlich für die tonische Inhibition. Eine Aktivitätsdeprivation verhindert den ontogenetischen Anstieg der GAD-67 mRNA Expression in etwa 50% der Interneurone (Abbildung 4). Erstaunlicherweise erfolgt die GAD-65 mRNA Expression altersgemäß. Allerdings sind beide GAD-Proteine deutlich geringer exprimiert und auch ihre Syntheseleistung ist aktivitätsabhängig, denn der GABA-Gehalt in deprivierten Kulturen ist um 90% vermindert. Transkription und Translation der beiden Isoformen sind also differentiell reguliert. Eine Erholung der Spontanaktivität – egal zu welchem Alter – führt zur sofortiger Normalisierung der GAD mRNA und Proteinexpression. Auch die GAD-Expression ist nur während der ersten zwei Wochen *in vitro* von Aktivität und BDNF und NT-4 abhängig. Trotzdem sind die Expressionsprofile der beiden mRNAs und Proteine *in vitro* anders als *in vivo*. Außerdem wird die GAD-Expression *in vitro* konstitutiv, während sie *in vivo* dynamisch regulierbar bleibt – eine Grundvoraussetzung für adulte Plastizität und Reorganisation (Eysel et al. 1999). Offenbar benötigen die jungen Interneurone den Einfluss von Umgebungsfaktoren, die der isolierte, deafferentierte Kortex nicht besitzt (Patz et al. 2003). Wir vermuten, dass die unspezifisch terminierenden aminergen oder cholinergen Transmittersysteme hier eine wichtige Rolle spielen.

Etwa die Hälfte aller Interneurone exprimiert das Kalzium-bindende Protein PARV. Es sind die FS Korb- und Kandelaberzellen, die die stärkste Inhibition vermitteln. Korbzellen sind essentiell für die Rhythmizität, sie geben der Hirnrinde den Arbeitstakt vor und sind für die Informationsverarbeitung unerlässlich. Kandelaberzellen verhindern Übererregung. Die FS-Eigenschaft wird über die spannungsabhängigen Kaliumkanäle Kv3.1/3.2 vermittelt. Beide Kanäle sind in Transkription und Translation differentiell durch Umgebungsfaktoren reguliert. Die Kalziumpuffer-eigenschaft gilt als wichtig für die Erzeugung hoher Aktionspotentialfrequenzen und beeinflusst die GABA-Freisetzung aus den Synapsen. Die PARV-Expression erfolgt nicht zellautonom. Während in der Sehrinde *in vivo* an Tag 20 alle PARV-Neurone vorhanden sind, ist die Etablierung dieses Phänotyps in Monokulturen extrem verzögert und erst zwi-

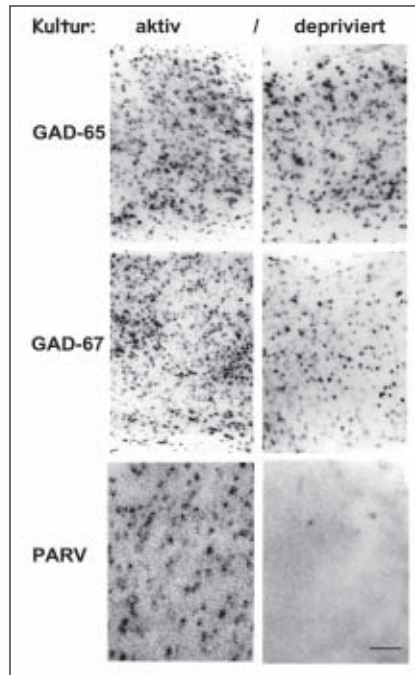


Abb. 4: Aktivitätsabhängigkeit der Expression von Glutamatdecarboxylasen und Parvalbumin. In situ Hybridisierungen zeigen, dass die GAD-65 mRNA Expression in chronisch aktivitätsdeprivierten Monokulturen kaum beeinträchtigt ist. Hingegen wird die GAD-67 mRNA nur partiell hochreguliert. Noch dramatischer wirkt die Aktivitätsdeprivation auf die Expression der PARV mRNA, die ohne Aktivität überhaupt nicht hochreguliert werden kann. Nach Rückführung der Kulturen in Normalmedium erholt sich die Spontanaktivität, und die GAD Expression steigt sofort an. Die PARV-Expression kann hingegen nicht mehr aktiviert werden.

schen 50-70 DIV beendet – weit nach dem Abschluss der morphologischen Differenzierung der Neurone. Thalamische Afferenzen in Kokulturen beschleunigen die PARV-Expression genauso wie BDNF und NT-4 während der ersten zehn Tage *in vitro*, allerdings nicht auf das altersgemäße Niveau. Essentiell ist die bioelektrische Aktivität (Abbildung 4). Eine Aktivitätsdeprivation für die ersten 14 Tage (noch bevor PARV hochreguliert wird) eliminiert die Kompetenz zur PARV-Expression irreversibel. Der Phänotyp wird gar nicht ausgeprägt, und auch exogene Neurotrophine können ihn nicht retten. Ist die Expression jedoch einmal etabliert, wird sie aktivitäts- und neurotrophinunabhängig (Patz et al. 2004).

Welche Rolle spielen Umgebungsfaktoren für die morphologische Reifung von Interneuronen?

Da die molekulare Differenzierung maßgeblich von Umgebungsfaktoren gesteuert wird,

lag die Vermutung nahe, dass auch die morphologische Differenzierung davon abhängt. Beispielsweise ist der Dendritenbaum eines Neurons als primäre Eingangsstruktur entscheidend an der Informationsverarbeitung beteiligt und da macht es Sinn, diese Struktur gebrauchtsabhängig zu modellieren. In kortikalen Pyramidalzellen kann eine frühe Phase der Dendritogenese auch zellautonom ablaufen (Banker and Cowan 1979). Allerdings ist bereits die Polarität in Apikaldendrit und absteigendes Axon *in vivo* von Umgebungsfaktoren (Gradientenmoleküle) abhängig. Später spielen Neurotrophine und elektrische Aktivität eine wichtige Rolle. So können Neurotrophine die Länge und die Komplexität der Dendriten steigern (Baker et al. 1998; McAllister 2000; Wirth et al. 2003). Insbesondere BDNF gilt als wichtig für das Wachstum von Dendriten und Dornfortsätzen, und elektrische Aktivität ist ein essentieller Kofaktor für die BDNF-Wirkung. Erstaunlicherweise wachsen Pyramidalzeldendriten genau so gut unter chronischer Aktivitätsblockade, obwohl aktivitätsdeprivierte Kulturen kaum BDNF exprimieren. Die morphologische Reifung kann also aktivitätsunabhängig voranschreiten und sie wird wahrscheinlich von den aktivitätsunabhängig produzierten Faktoren NT-4 und Neurotrophin-3 getrieben.

BDNF und NT-4 sind besonders für Interneurone wichtig. Sie produzieren diese Faktoren nicht selbst, sondern bekommen sie von Pyramidalzellen. Um den Einfluss der beiden Faktoren auf die interneuronale Morphogenese zu untersuchen, transfizierten wir kortikale Explantate nach fünf Tagen *in vitro* biolistisch mit Expressionsplasmiden für BDNF bzw. NT-4. Als Reporter wurden Expressionsplasmide für das „grün-fluoreszierende Protein“ mittransfiziert. An Tag 10 wurden die multipolaren Interneurone rekonstruiert. Die Länge der Dendriten wird durch die autokrine Überversorgung mit BDNF und NT-4 nur schwach signifikant verlängert; bei Pyramidalzellen wird das Längenwachstum viel deutlicher gefördert. Hingegen waren die mittlere Segmentanzahl pro Dendrit und der maximale Verzweigungsgrad interneuronaler Dendriten signifikant erhöht. Der Vergleich mit ausgewachsenen Interneuronen aus 30-60 Tage alten Kulturen zeigt, dass die Komplexität der Dendriten das adulte Niveau erreicht hat (Wirth et al. 2003). BDNF und NT-4 haben also einen starken Einfluss auf die Ausbildung dendritischer Verzweigungen multipolarer Interneurone.

Zusammenfassung und Ausblick

Die transitorische Expression von Funktionsmarkern während der früh postnatalen Dif-

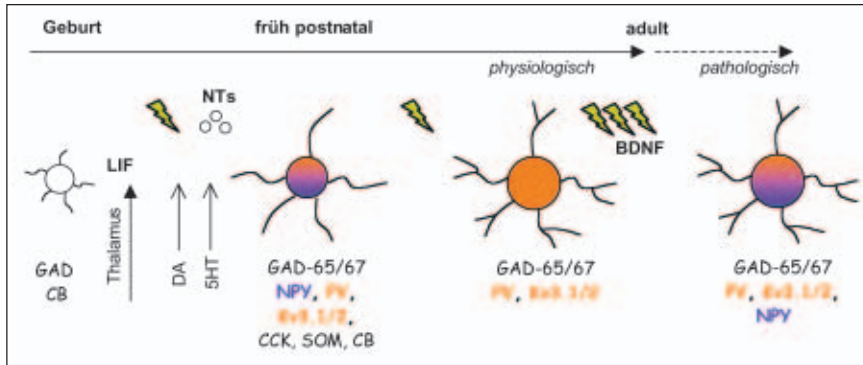


Abb. 5: Modell der phänotypischen Differenzierung eines parvalbuminergen Interneurons. Unreife Neurone (kleines weißes Neuron) beginnen mit der Expression der Funktionsmarker. Elektrische Aktivität (gelbe Blitze), Neurotrophine (NTs) und afferente Systeme (Dopamin für die Parvalbumin-Expression, 5-HT für die GAD Expression; eigene unpublizierte Daten) nehmen Einfluss auf die Expression von GAD-65/67, Neuropeptiden, Kalzium-bindenden Proteinen, Ionenkanälen und die morphologische Differenzierung (kleines rotblaues Neuron). Insbesondere thalamische Afferenzen erzeugen durch die Runterregulation von LIF die NPY Phänotyprestriktion und fördern gleichzeitig die PARV-Expression. Im physiologisch gesunden adulten Kortex exprimieren die parvalbuminergen Neurone kein NPY (großes rotes Neuron). Im Verlauf der transitorischen Expression während der früh postnatalen Differenzierungsphase haben die Neurone jedoch die NPY-Expression „gelernt“. Bei pathophysiologischer Aktivität und gesteigerter BDNF-Produktion können sie die NPY-Expression bedarfsabhängig reaktivieren, um epileptiforme Aktivität zu terminieren.

ferenzierungsphase ist kein Irrtum junger Interneurone (Abbildung 5), vielmehr erwerben sie dadurch die Fähigkeit, dieses Expressionsprogramm später bedarfsabhängig zu reaktivieren. Diese Kompetenz gehört zum Phänotyp eines Neurons, und sie wird in einer kritischen Periode für molekulare Plastizität erworben und durch die Erfahrung mit bestimmten Umweltfaktoren implementiert. Die NPY-Expression ist nicht beschränkt auf den Typ des „NPY Neurons“ – den gibt es nicht. Sie ist vielmehr eine erlernte adaptive Antwort verschiedener Neuronentypen (Martinotti-Neurone, Korb- und Kandelaberkzellen) auf Änderungen der Umgebung, i.e.S. pathologische Aktivität mit stark erhöhter BDNF-Expression. Früh postnatale Mechanismen sorgen für eine im Normaltier geringe NPY-Expression, weil der inhibitorische Einfluss dieses Peptids der Plastizität und der Informationsverarbeitung vermutlich entgegen arbeitet.

GAD-65, GAD-67, PARV, Kv3.1, Kv3.2 und bedarfsabhängig auch NPY sind im gleichen Zelltyp exprimiert, beispielsweise in den großen Korbzellen. Die PARV-Daten zeigen, dass die neurochemische und morphologische Differenzierung nicht notwendigerweise zeitgleich erfolgen muss. Tage bevor sie PARV erstmals exprimieren, müssen die jungen Neurone Aktivität erfahren haben. Man kann streiten, ob Metaplastizitätsprozesse auch bei der Entwicklung des korrekten molekularen Make-Up eines Neurons greifen. Tatsächlich werden alle sechs Funktions-

marker differentiell und nicht paketweise reguliert. Ihre Transkription und Translation werden durch Aktivität, Afferenzen, bestimmte Neurotrophine, modulatorische Transmittersysteme und sogar sensorische Erfahrung beeinflusst. Aktivität ist ein Meisterregulator, der sogar die Expression mancher Neurotrophine beeinflusst. Die wiederum kontrollieren sich wechselseitig und können ihre Expression in spezifischer Weise langanhaltend potenzieren (Patz und Wahle 2004).

Bislang haben wir hauptsächlich die früh postnatale Regulation der Expression untersucht. Wir vermuten, dass auch der Erhalt der Expression im Adulten nicht zellautonom erfolgt, und dass möglicherweise weitere Faktoren Einfluss auf die Expressionsteuerung gewinnen. Wir haben begonnen, die Rolle der modulatorischen Transmittersysteme zu charakterisieren. Eine Imbalanz dieser Transmitter gilt als eine mögliche Ursache für mentale Erkrankungen und könnte kausal die neurochemischen Defizite der Interneurone erklären. Beispielsweise ist die Expression von PARV und GAD-67 und die GABAerge Transmission der Kandelaberkzellen im Kortex von Patienten mit Schizophrenie und Depression verändert (Benes and Beretta 2001; Guidotti et al. 2000; Volk et al. 2002). Bereits subtile Defizite der Neurochemie der Interneurone haben negative Auswirkungen auf die Funktionalität des kortikalen Netzwerks und können zu den kognitiven Defiziten bei mentalen Erkrankungen beitragen.

Eine ausführliche Literaturliste kann bei den Autoren angefordert werden.

Danksagung

Wir danken Prof. Dr. K. Gottmann (Düsseldorf) und Prof. Dr. H. Luhmann (Mainz) für die kritische Diskussion des Manuskriptes. Die Forschung wurde von der DFG unterstützt (SFB 509, GRK 736, Einzelanträge).

Kurzbiographien

Marcus J. Wirth: 1990-1996 Studium der Biologie in Bochum. 1997-2001 Promotion an der Ruhr-Universität Bochum; Stipendiat im DFG-Graduiertenkolleg KOGNET. Seit 2001 wissenschaftlicher Assistent in der AG Entwicklungsneurobiologie.

Silke Patz: 1993-1999 Studium der Biologie in Bochum. 1999-2000 wissenschaftliche Mitarbeiterin in der AG Neuroanatomie der Uni-Klinik Essen. 2000-2003 Promotion an der Ruhr-Universität, Kollegiatin im DFG-Graduiertenkolleg 736. Seit 2003 wissenschaftliche Mitarbeiterin der AG Entwicklungsneurobiologie.

Jochen Grabert: 1995-2001 Studium der Biochemie in Bochum. Seit 2001 Promotion in der AG Entwicklungsneurobiologie, Kollegiat im DFG-Graduiertenkolleg 736.

Petra Wahle: 1978-1984 Studium der Biologie in Göttingen. 1987 Promotion am MPI für biophysikalische Chemie in Göttingen. 1988 PostDoc an der Rockefeller Universität in New York. 1994 Habilitation in Zoologie und Neurobiologie an der Ruhr-Universität Bochum. Seit 1996 Professur für Entwicklungsneurobiologie an der Ruhr-Universität. Seit 2001 Sprecherin des DFG-Graduiertenkollegs 736 „Development and Plasticity of the Nervous System“, stellvertretende Studiendekanin der International Graduate School for Neuroscience an der Ruhr-Universität.

Korrespondenzadressen

Prof. Dr. Petra Wahle, Dr. rer.nat. Marcus J. Wirth

AG Entwicklungsneurobiologie

Fakultät für Biologie, ND 6/72

Ruhr-Universität, D-44780 Bochum

Tel.: ++ 49 (0) 234 32 24344 (Wirth)

Tel.: ++ 49 (0) 234 32 24367 (Wahle)

Fax: ++ 49 (0) 234 32 14186

e-mail: marcus.wirth@rub.de

wahle@neurobiologie.rub.de