



Mitarbeiterin am Institut für Anatomie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster; 1981 Promotion; 1985-1993 Hochschulassistentin am Institut für Anatomie der Freien Universität Berlin, 1988 Habilitation; 1993 Ruf auf eine C3-Professur an das Anatomische Institut der Universität Greifswald; 2001 Ruf (C4) an die Universität Hamburg und seitdem Direktorin des Instituts für Anatomie I: zelluläre Neurobiologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf

Lars Fester: 1996-2003 Studium der Humanbiologie an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald; Diplom 2003 „Funktionelle Bedeutung der Aromatase bei der lokalen Östrogensynthese im Hippokampus“. 2003- heute wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Anatomie I, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (Direktorin: Prof. Dr. Gabriele M. Rune); zur Promotion im Fachbereich Biologie angemeldet am 23.11.2007: „Die Rolle der hippokampalen Östrogensynthese bei östrogeninduzierter Synaptogenese im Hippokampus der Ratte (*Rattus norvegicus*)“.

Janine Prange-Kiel: 1988-1994 Studium der Biologie an der Universität Münster. 1995-1998 Dissertation an der Universität Tübingen bei Ludwig Kiesel zur Wirkung von RU 486 auf das menschliche Endometrium. 1998-2001 wissenschaftliche Mitarbeiterin bei Gabriele Rune an der Universität Greifswald: Beginn der Arbeiten über Östrogensynthese und -wirkung im Hippokampus. Seit 2001 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf: Studien zur para-/autokrinen Östrogenwirkung im Hippokampus und zur Regulation der Östrogensynthese durch GnRH. 2002-2003 DFG geförderter Forschungsaufenthalt an der Yale University, USA, im Labor von Csaba Leranth: Untersuchung von indirekten, über subkortikale Kerngebiete vermittelten Östrogeneffekten auf den Hippokampus.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Gabriele M. Rune
Zentrum für Experimentelle Medizin
Institut für Anatomie I:
Zelluläre Neurobiologie
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Martinistr. 52
20246 Hamburg
Tel: +49 (0) 40 42803 2575
Fax: +49 (0) 40 42803 4966
E-Mail: rune@uke.uni-hamburg.de

ARTIKEL DES QUARTALS

Vorgestellt von *Andreas Draguhn, Medizinische Fakultät Heidelberg, Institut für Physiologie und Pathophysiologie, Im Neuenheimer Feld 326, 69120 Heidelberg*

From synapse to behavior: rapid modulation of defined neuronal types with engineered GABA_A receptors

P. Wulff, T. Goetz, E. Leppä, A. M. Linden, M. Renzi, J. D. Swinny, O. Y. Vekovischeva, W. Sieghart, P. Somogyi, E. R. Korpi, M. Farrant und W. Wisden

Erschienen in Nature Neuroscience, 2007 July;10(7):923-9

Der Medizin-Nobelpreis 2007 für Capecchi, Evans und Smithies würdigt eine technische Entwicklung, die die gesamte biomedizinische Forschung revolutioniert hat. Gezielte genetische Veränderungen in lebenden Organismen stellen heute einen Großteil der Modelle zur Verfügung, mit denen der Beitrag einzelner Moleküle zu systemischen Funktionen untersucht wird. Allerdings haben sich die ersten (aus heutiger Sicht „simplen“) Ansätze für viele Fragestellungen als zu grob erwiesen - die Deletion codierender Sequenzen in klassi-

schen „knockout“-Tieren hat vielfach zu Kompensationen geführt, die einfache monokausale Rückschlüsse auf die Funktion des fehlenden Proteins unmöglich machen. Dieses früh erkannte Problem hat zur Entwicklung komplexerer Modelle geführt, bei denen Veränderungen zellspezifisch, entwicklungsabhängig oder induzierbar vorgenommen werden. Durch homologe Rekombination gelingt es zudem, Gene nicht einfach zu deletieren, sondern an ihrer Stelle gezielt veränderte Sequenzen einzuführen, die wesentlich subtilere und

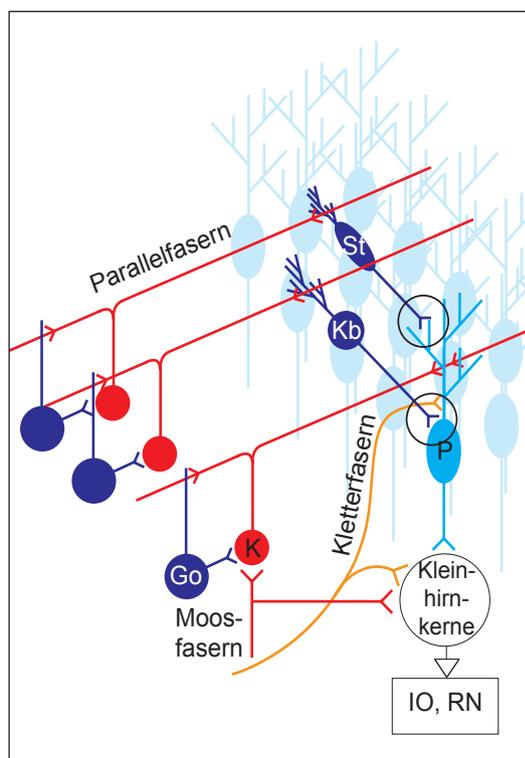


Abb. 1: Schematische Darstellung des zerebellären Schaltkreises. Körnerzellen (K) erhalten exzitatorische Eingänge aus diversen Hirnregionen über Moosfasern. Über die sogenannten Parallelfasern aktivieren die Körnerzellen eine Reihe inhibitorischer Zellen: Golgi-Zellen (Go), Purkinje-Zellen (P) sowie die Interneurone der Molekularschicht (Korb(Kb)- und Stern(St)-zellen). Da die Axone der Purkinje-Zellen den einzigen Ausgang des zerebellären Kortex bilden, muss die gesamte Rechenleistung des Kortex in der Aktivität der Purkinje-Zellen codiert werden. Diese Aktivität wird durch die inhibitorischen Interneurone der Molekularschicht kontrolliert. Um die Bedeutung der Interneuron-Purkinje-Zell-Synapse (schwarz umkreist) für Kleinhirn abhängiges Verhalten zu untersuchen, haben wir eine *in vivo*-Methode zur selektiven, schnellen und reversiblen Modulation GABA_Aerger Synapsen entwickelt. IO, Inferior Olive; RN, Red nucleus.

spezifischere Effekte zeigen. Solche Ansätze sind für die Neurowissenschaften ganz besonders wichtig, weil hier die Kluft zwischen Eigenschaften einzelner Moleküle und systemischen Funktionen wegen der Vielfalt der Zelltypen, der ausgeprägten Plastizität und der enormen Komplexität des Gehirns besonders tief ist.

Dennoch bleiben die meisten Ansätze subtraktiv und die genetischen Veränderungen sind langsam im Vergleich zu den sehr schnellen homöostatischen Gegenregulationen in neuronalen Netzwerken. Wünschenswert wäre es, in einem zunächst unveränderten System schnell die Funktion eines (Signal)-Moleküls in einer definierten Zellpopulation modulieren zu können, und zwar nicht nur durch Verminderung, sondern auch durch Erhöhung seines Beitrages. Peer Wulff, Bill Wisden und ihre Kollegen haben dies in eleganter Weise realisiert. Ihr Zielmolekül ist der GABA_A-Rezeptor, der zwei wesentliche Vorteile zum Studium neuronaler Netzwerke besitzt: Erstens sind hemmende Synapsen ein besonders wichtiges Prinzip der Steuerung neuronaler Netzwerkfunktionen, zweitens ist der GABA_A-Rezeptor durch zahlreiche Pharmaka schnell und in vorhersagbarer Weise modulierbar. Durch pharmakologische Änderung der Hemmung kann also prinzipiell die Funktion definierter Netzwerke gezielt beeinflusst und der Effekt auf Verhaltensniveau studiert werden.

Zur Herstellung ihres Modells konnten Wulff und Mitarbeiter auf wesentliche Vorarbeiten zur Molekularbiologie und -physiologie des GABA_A-Rezeptors zurückgreifen. Das Expressionsmuster und die funktionellen Domänen der zahlreichen Untereinheiten sind sehr gut untersucht. Besonders wichtig sind hier die Arbeiten von Erwin Sigel (Bern) und Paul Whiting (Merk Sharp and Dohme, Essex), die einzelne Aminosäuren identifiziert haben, die für die Bindung von Benzodiazepinen essenziell sind. Durch gezielte Mutagenese lassen sich also GABA_A-Rezeptoren herstellen, die prinzipiell normal funktionieren, aber nicht der positiven Modulation durch diese Substanzen unterliegen. In einer wichtigen Serie von Arbeiten haben Uwe Rudolph (Harvard) und Hanns Möhler (Zürich) in den letzten Jahren diesen Umstand zur Herstellung sehr subtiler Mausmutanten genutzt, indem sie einzelne Isoformen des GABA_A-Rezeptors unempfindlich gegenüber Benzodiazepinen machten. Das differenzielle Expressionsmuster der betroffenen α -Untereinheiten führte dann nach systemischer Gabe von Benzodiazepinen

zu entsprechend selektiven Effekten auf Verhaltensniveau (also zu einer getrennten Beeinflussung von Angstverhalten, Vigilanz, Sensomotorik und Gedächtnis). Mit diesem neuen Paradigma konnte die Heterogenität der GABA_A-Rezeptoren genutzt werden, um schnelle pharmakologische Effekte mit hoher Verhaltensspezifität zu dokumentieren. Allerdings ist das Expressionsmuster der verschiedenen α -Untereinheiten relativ breit, sodass der Bezug zu veränderten Funktionen in definierten neuronalen Netzwerken eher vage bleibt.

An dieser Stelle bedeutet die Arbeit von Wulff et al. eine wesentliche Weiterent-

wicklung. Erstmal wurden nun die GABA_A-Rezeptoren in einer genau definierten Population von Neuronen (cerebellären Purkinje-Zellen) so verändert, dass bei systemischer Gabe eines Pharmakons ausschließlich diese Zellen moduliert werden. Ausgangspunkt waren Tiere mit einer Substitution des Phenylalanin an Position 77 der fast ubiquitär verbreiteten $\gamma 2$ -Untereinheit. Durch die Veränderung dieser Untereinheit sind alle GABA_A-Rezeptoren im Tier für den Benzodiazepinrezeptor-Liganden Zolpidem unempfindlich. Mit Hilfe des Cre-LoxP-Systems und des purkinjellspezifischen L7 Promotors wurde nun die Zolpidem unempfindliche mutierte Untereinheit selektiv in Purkinje-Zellen durch

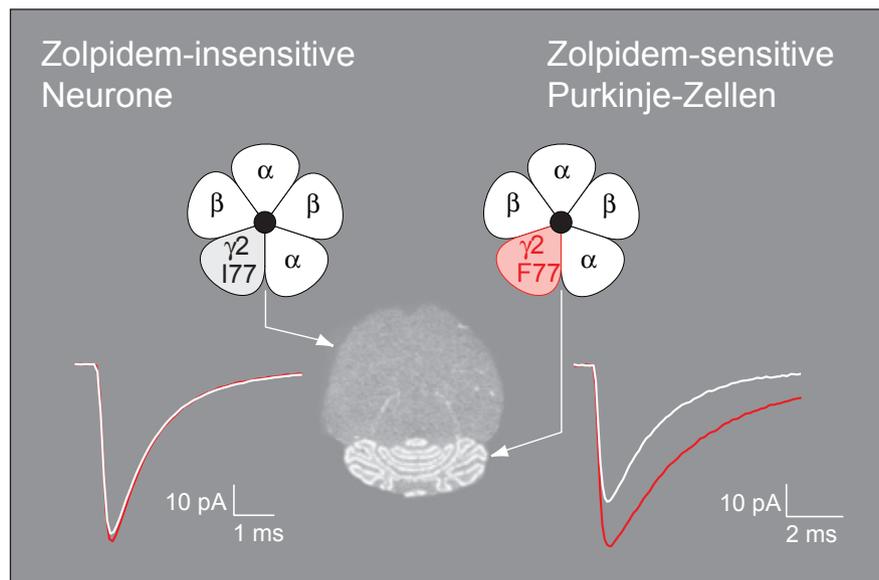


Abb. 2: Zusammenfassung der „Zolpidem-Methode“. Die Autoradiographie einer *in situ*-Hybridisierung zeigt die selektive Expression der Zolpidem sensitiven GABA_A-Rezeptor $\gamma 2F77$ Untereinheit in der Purkinje-Zell-Schicht des Zerebellums. Alle anderen Nervenzellen des ZNS exprimieren die Zolpidem insensitive $\gamma 2I77$ Untereinheit. Rechte Seite: In Purkinje-Zellen führt Zolpidem (rote Spur) zu einer Potenzierung des GABA_A-Rezeptor-vermittelten inhibitorischen post-synaptischen Stroms (weiße Spur). Linke Seite: In allen anderen Neuronen ist Zolpidem wirkungslos.

napse nach Zolpidemgabe führt innerhalb weniger Minuten zu motorischen Defiziten. Zuvor zeigen die Autoren mit Hilfe der GFP-Markierung das korrekte Expressionsmuster der Untereinheit und verifizieren elektrophysiologisch die erwartete Wiederherstellung der Zolpidem-Empfindlichkeit inhibitorischer Signale in Purkinje-Zellen. Prinzipiell lässt sich in dieser Mutante die Hemmung sogar bidirektional modulieren, da es für den Benzodiazepin-Rezeptor auch inverse Agonisten (DMCM) gibt.

Zum Vergleich haben die Autoren auch Mäuse getestet, die gar keine postsynaptischen GABA_A-Rezeptoren in Purkinje-Zellen exprimieren. Überraschenderweise hatten diese Tiere in den Tests



Das von der VolkswagenStiftung finanzierte „Zolpidem-Konsortium“ hat sich zu regelmäßigen Workshops getroffen, wie hier in Oxford 2005. Das Foto zeigt weitere Autoren des Artikels (M. Farrant, T. Goetz, E. Korpi, E. Leppä, A.-M. Linden, W. Sieghart, P. Somogyi, J. Swinny), Mitglieder des Somogyi-Labors und Gäste.

keine motorischen Defizite. Die Autoren interpretieren dieses Ergebnis so, dass die schnelle pharmakologische Intervention der konstitutiven Deletion überlegen ist, da kompensatorische Mechanismen vermieden werden. Gerade hierin zeigt sich die Überlegenheit schnell induzierbarer Veränderungen, wie sie eben in den Zolpidem sensitiven Mutanten besteht. Interessant wird hier der Vergleich mit dem Effekt von DMCM sein, das eine rasche negative Modulation der GABAergen Hemmung von Purkinje-Zellen induzieren sollte.

Diese Arbeit stellt sicher einen methodischen Durchbruch in der Herstellung intelligenter Mausmodelle dar. Trotzdem gibt es, wie bei allen Methoden, auch Limitierungen. So wurde zum Beispiel eines der eingeführten Gene offenbar X-chromosomal integriert, sodass in Weibchen ein Mosaik-Expressionsmuster auftrat und die systemischen Untersuchungen auf Männchen beschränkt werden mussten. Auch zeigen die Mäuse mit der wiederhergestellten Funktion der γ -Untereinheit bereits im ersten Durchgang ohne Zolpidem eine leichte Leistungsminderung im Rota-rod-Test - sie sind also in Abwesenheit von Zolpidem nicht hundertprozentig identisch mit dem Wildtyp. Allerdings sind diese Probleme für die meisten Fragestellungen gering und als typische Komplikationen jedem Konstrukteur von Mausmutanten bekannt. Zuletzt sollte nicht übersehen werden, welcher immense Aufwand hinter der Konstruktion und Charakterisierung eines solchen Mausmodells steht. Nach wie vor handelt es sich beim Aufbau solcher komplexer genetischer Mauslinien um ein „Hochrisiko“-Projekt, dessen Bearbeitung die Publikationsleistung von Doktoranden oder Nachwuchswissenschaftlern für lange

Zeit erheblich einschränkt. Wenn, wie im vorliegenden Fall, am Ende ein neues genetisches Werkzeug und spannende Daten zum „proof of principle“ stehen, hat sich der Aufwand natürlich gelohnt - aber eben nur dann...

Die Arbeit von Peer Wulff, Bill Wisden und ihren Kollegen eröffnet die Aussicht auf eine neue Generation von Mausmutanten, die systemphysiologische Fragestellungen in bisher unerreichter Präzision zugänglich macht. Sie ist im Ansatz verwandt zu weiteren neuen Techniken, wie z.B. dem stereotaktisch gesteuerten Einsatz viraler Vektoren und der Expression des lichtgesteuerten Ionenkanals Channelrhodopsin. Im Gegensatz zu lichtgesteuerten Methoden hat der pharmakologische Ansatz jedoch den Vorteil, auch auf verteilte und tiefliegende Nervenzellpopulationen anwendbar zu sein. Neue Werkzeuge dieser Art können dazu beitragen, einen lange ausgesprochenen aber kaum eingelösten Anspruch der modernen Neurowissenschaften zu realisieren - nämlich in ausgewählten Modellsystemen die Leistungen des Nervensystems vom Molekül über die Zelle und das Netzwerk bis hin zum Verhalten zu analysieren.

Kurzbiographien

Dr. Peer Wulff: 1993-2000 Medizinstudium am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf. 1997-2001 Doktorarbeit bei Prof. Dr. D. Kuhl und Aufbaustudium



Molekulare Neurobiologie am Zentrum für Molekulare Neurobiologie, Hamburg (ZMNH). 2001-2003 Forschungs-AIP und Assistenzarzt an der Neurologischen Universitätsklinik Heidelberg bei Prof. Dr. W. Hacke und in der Abteilung Klinische Neurobiologie bei Prof. Dr. H. Monyer.

2004-2006 Stipendium der Medizinischen Fakultät Heidelberg und Zusammenarbeit mit Prof. Dr. W. Wisden in der Abteilung Klinische Neurobiologie, Heidelberg. Seit 2006 Lecturer in Neuroscience an der Universität Aberdeen, UK.

Prof. Dr. William Wisden: 1983-1986 Biologie (Natural Sciences, Zoology) - Studium an der Universität Cambridge; 1986-1990 Doktorarbeit an der Medical Research Council Molecular Neurobiology Unit (Cambridge) bei Prof. Dr. S. P. Hunt; 1990-



1992 Postdoktorand (EMBO Long-Term Fellowship) am Zentrum für Molekulare Biologie, Heidelberg (ZMBH) bei Prof. Dr. P. H. Seeburg; 1993-2001 Gruppenleiter am Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology, Cambridge; 2001-2005 Gruppenleiter in der Abt. Klinische Neurobiologie, Universität Heidelberg; seit 2005 Professor of Neuroscience, an der Universität Aberdeen, UK.

Korrespondenzadresse

Dr. Peer Wulff
Institute of Medical Sciences
University of Aberdeen
Foresterhill
Aberdeen AB25 2ZD/ UK
 Tel.: + 44 1224 559149
 Fax: + 44 1224 555719
 E-Mail: p.wulff@abdn.ac.uk