

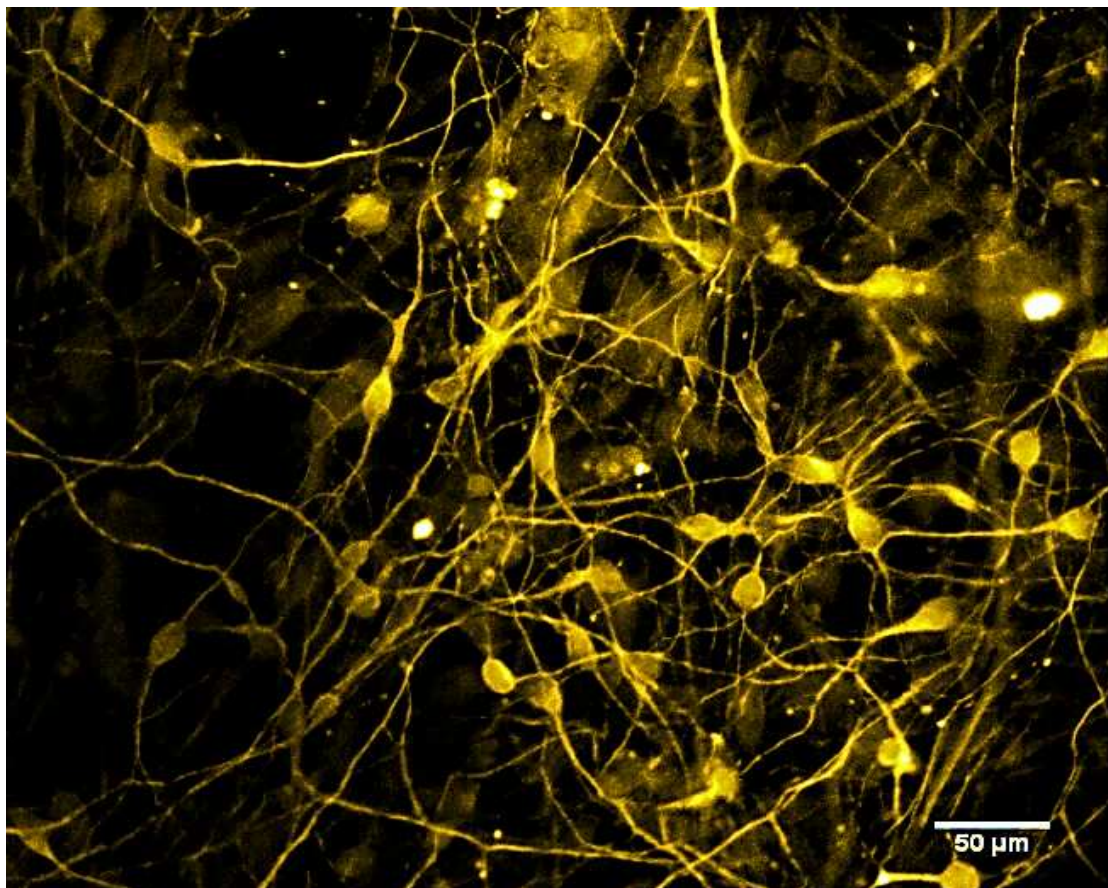


Zentralinstitut für
Seelische Gesundheit
Landesstiftung
des öffentlichen Rechts



HECTOR SEMINAR

Neurone - Vom Gehirn in die Kulturschale und zurück



Kooperationsprojekt am ZI Mannheim

Abschlussbericht der Kooperationsphase 2016/2017

Betreuer: Dr. rer. nat. Thorsten Lau

Louisa Lalla, Wiona Glänzer, Leonard Gerstner

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	2
Abstract.....	3
Abkürzungsverzeichnis.....	4
1. Einleitung.....	5
2. Zentralinstitut für Seelische Gesundheit.....	6
2.1 Vorstellung des Instituts.....	6
2.2 Konzept Bench to Bedside.....	6
3. Das menschliche Nervensystem.....	7
3.1 Konzept der Reizweiterleitung durch Neurone.....	7
3.2 Funktionsweise von Neuronen.....	8
3.3 Neurotransmitter.....	16
4. Methodik.....	19
4.1 Aufbewahrung, Züchtung und Arbeit mit Zellen.....	19
4.2 Mäuseneurone und humane Neurone.....	20
4.3 Färbung von Zellen.....	20
4.4 Lasermikroskopie.....	21
4.5 Bildbearbeitung und Auswertung.....	23
5. Hintergrund.....	25
5.1 Probleme im Serotoninkreislauf führen zu Erkrankungen.....	25
5.2 Teufelskreislauf der Neurone.....	25
5.3 Antidepressiva zur Behandlung.....	27
5.4 Untersuchung von Patienten mit Neuroimaging-Techniken.....	29
6. Forschungsfrage: Wie verändern sich Aufbau und Funktionsweise von Neuronen durch das Antidepressivum Escitalopram?.....	33
6.1 AIS Längenveränderung.....	33
6.2 AIS Verschiebung.....	35
6.3 Veränderung der Synaptische Aktivität.....	36
6.4 Diskussion.....	37
7. Danksagung.....	39
8. Quellenverzeichnis.....	40

Abstract

Im Zentralen Nervensystem regulieren serotonerge Neurone viele wichtige Körperfunktionen, beispielsweise Emotionen und Schlaf. Dabei leiten sie Reize elektrochemisch weiter. An den Synapse wird mit dem Neurotransmitter Serotonin von einem Neuron zum anderen kommuniziert. Das Axon leitet elektrische Impulse vom Zellsoma zu den präsynaptischen Endungen weiter. Das hierfür notwendige Aktionspotenzial entsteht am Axonhügel. Veränderungen am Neuron oder Störungen im Serotoninkreislauf können psychische Erkrankungen, wie zum Beispiel Depressionen auslösen. Zur Behandlung werden dann häufig Antidepressiva eingesetzt. Die Auswirkungen des Serotonin-Wiederaufnahmehemmers Escitalopram auf die Neurone wurden getestet. Mit Antikörperfärbung und Lasermikroskopie wurden die Strukturen der Neurone sichtbar gemacht. Es wurde eine Verlängerung des AIS und eine geringere Anzahl aktiver Präsynapsen pro Neuron festgestellt.

Abkürzungsverzeichnis

5-HT	Serotonin, 5-Hydroxytryptamin
AIS	axon initial segment, Axonhügel
Aktin	häufigstes Strukturprotein
ALS	amyotrophe Lateralsklerose, degenerative Krankheit des motorischen Nervensystemes
AP	Aktionspotential
ASP+	4-(4-(dimethylamino)styryl)-N-methylpyridinium, Farbstoff
Basson	spezifisches Protein der CAZ
CAZ	Cytomatrix an der aktiven Zone
Endozytose	Aufnahme von Substanzen in die Zelle
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potential, erregendes Signal
Escit	Escitalopram, ein Antidepressivum
Exozytose	Abgabe von Substanzen aus der Zelle
SERT	Serotoninrücktransporter
IPSP	inhibitorisches postsynaptisches Potential, hemmendes Signal
NT	Neurotransmitter
Piccolo	spezifisches Protein der CAZ
PNS	Peripheres Nervensystem, alle Neurone außerhalb des ZNS
PSD	Postsynaptische Dichte
SNARE-Komplex	Proteinkomplex an der CAZ
ZNS	Zentrales Nervensystem, bestehend aus Gehirn und Rückenmark
SSRI	Selektiver Serotoninrücktransportinhibitor
SNRI	Serotonin- und Noradrenalinrücktransportinhibitor
vMAT	Vesikulärer Monoamintransporter
in vitro	Vorgänge die nicht in einem lebenden Organismus stattfinden, sondern unter künstlich geschaffenen Bedingungen untersucht werden

1. Einleitung

Das Zentralnervensystem, bestehend aus dem Gehirn und Rückenmark, ist das komplexeste menschliche Organ. Trotz zahlreicher bahnbrechender Erkenntnisse auf dem Gebiet der Neurowissenschaften in den letzten Jahren, ist noch immer nicht ganz klar, wie sämtliche Vorgänge im menschlichen Gehirn ablaufen. Egal ob wir tiefgründigen Gedanken nachhängen, unsere Arme bewegen oder schlafen, unser Gehirn ist involviert. Durch zahlreiche Krankheiten kann die Funktionsweise des Gehirns beeinträchtigt werden, was die Lebensqualität des betroffenen Menschen stark einschränken kann.

Depressionen können zum Beispiel durch funktionale und anatomische Veränderungen von serotonergen Neuronen hervorgerufen werden. Serotonerge Neuronen, die nach dem Neurotransmitter Serotonin benannt sind, spielen generell im Hinblick auf Emotionen, Hunger, Schlaf und Schmerzen eine entscheidende Rolle. Im folgenden Abschlussbericht der Kooperationsphase am Zentralinstitut für seelische Gesundheit wird ihre Funktionsweise im Detail beschrieben und anhand von Forschungsergebnissen erklärt, wie sich die Behandlung mit Antidepressiva auf sie auswirkt.

2. Zentralinstitut für Seelische Gesundheit

2.1 Vorstellung des Instituts

Das Kooperationsprojekt wurde am Zentralinstitut für seelische Gesundheit in Mannheim (ZI) durchgeführt. Zum ZI gehören psychiatrische Kliniken die stationäre und ambulante Behandlung von Krankheiten bieten. Außerdem wird Forschung zum Verlauf, der Entstehung und Behandlung seelischer Erkrankungen betrieben.¹

2.2 Konzept Bench to Bedside

Die Forschung am ZI reicht von an Probanden durchgeführten Studien über genetische Forschung bis hin zu Versuchen an aus Stammzellen gezüchtete Neuronen, die im Rahmen des Kooperationsprojektes durchgeführt wurden. Dieses breite Spektrum an Forschungsgebieten und Methoden in Kombination mit Patientenbehandlung an einem Standort wird auch mit dem Begriff „Bench to Bedside“ beschrieben. Grundlagenforschungsergebnisse von der Laborbank können so schnell den Patienten helfen. Es findet ein stetiger Wissensaustausch zwischen den Forschern und Ärzten statt.

¹ <https://www.zi-mannheim.de>

3. Das menschliche Nervensystem

3.1 Konzept der Reizweiterleitung durch Neurone

Sämtlichen Vorgängen im Zentralnervensystem liegt ein Prinzip zu Grunde. Reize aus der Umwelt werden durch Sinneszellen aufgenommen, verarbeitet, weitergeleitet und eine Reaktion, wie zum Beispiel eine Bewegung, folgt. Bei Reflexen ist diese Kopplung einfach und die Reaktion erfolgt ohne viele Zwischenschritte. Ein sensorisches Neuron ist also direkt oder über nur wenige Interneurone mit einem motorischen Neuron verbunden. Es gibt aber auch kompliziertere neuronale Schaltkreise, bei denen auf einen Reiz entsprechend verschiedener Bedingungen eine bestimmte Reaktion folgt.² In beiden Fällen sind Neurone für die Reizweiterleitung zuständig. Abbildung 1 zeigt den Aufbau dieser hochspezialisierten Zellen.

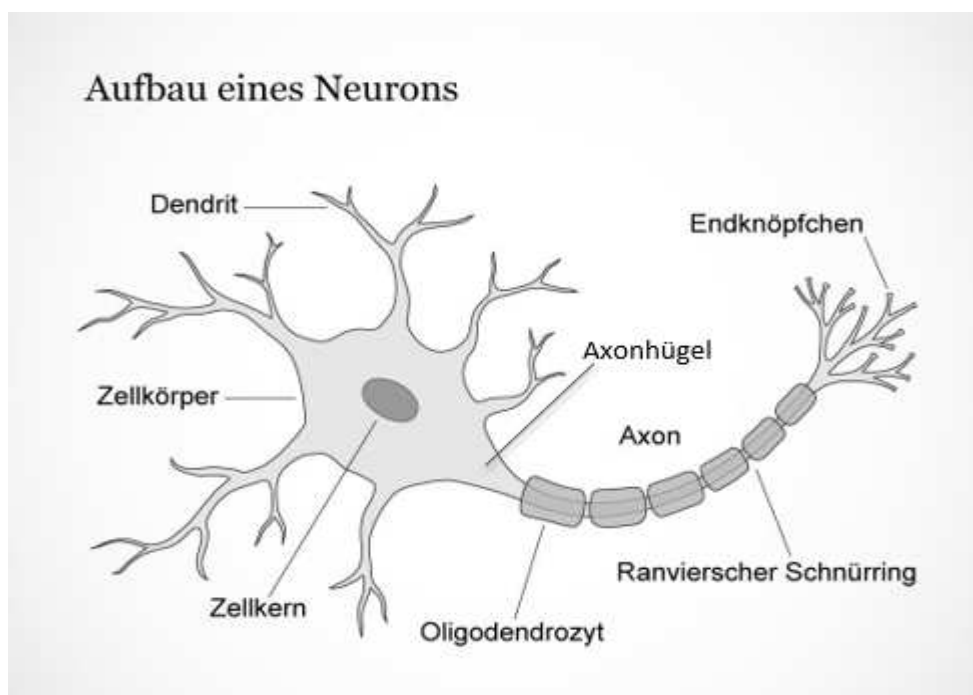


Abb. A Aufbau eines Neurons <https://www.dasgehirn.info/entdecken/kommunikation-der-zellen/aufbau-eines-neurons-2907> (bearbeitet)

Neuronen lassen sich grob in drei Teile unterteilen: Zellkörper, Axon und Dendriten. Im Zellkörper befinden sich die meisten Zellorganellen, inklusive Zellkern. Die verzweigten

² vgl. Weber, U. (Hg), 2010, 433.

Dendriten empfangen Signale von anderen Nervenzellen. Das Axon leitet Signale weiter.³

Im Zentralnervensystem werden Axone von Oligodendrozyten (Gliazellen) elektrisch isoliert.⁴ Zwischen diesen liegen die Ranvier'schen Schnürringe. Am Ende des Axons befinden sich Endknöpfchen. Die Verbindungsstellen zwischen den Axonenden eines Neurons und den Dendriten eines anderen Neurons wird Synapse genannt. Am Axonhügel (AIS, axon initial segment), der an der Verbindungsstelle zwischen Zellkörper und Axon liegt, entsteht das Aktionspotenzial, welches vom Axon weitergeleitet wird.

3.2 Funktionsweise von Neuronen

Die Weiterleitung eines Reizes in einer Nervenzelle findet auf elektrochemischer Ebene statt. Sie lässt sich in drei Abschnitte unterteilen: die Signalübertragung im Soma, die Reizweiterleitung im Axon und die Informationsübermittlung an der Synapse. Ein Reiz ist eine Einwirkung auf eine Sinneszelle (z.B. im Auge), die zu einer Veränderung des Membranpotentials führt. Überschreitet diese Veränderung des Membranpotentials einen bestimmten Schwellenwert, so wird in der nachfolgenden Nervenzelle ein Aktionspotenzial (AP) ausgelöst. Dies wandert entlang des Axons zu den Synapsen, wo in der nächsten Nervenzelle ein AP ausgelöst wird. Diese Weiterleitung findet bei afferenten/sensorischen Nerven bis zum Gehirn, bei efferenten/motorischen Nerven bis zum ausführenden Organ, z.B. dem Beinstrecker, statt.⁵

Signalübertragung im Soma

Damit ein Aktionspotenzial ausgelöst werden kann, muss das Ruhepotential vorliegen. Das Ruhepotential ist das Membranpotential des unerregten Axons. Ein Membranpotential ist die elektrische Spannung zwischen zwei Elektrolytlösungen, die durch eine meist semipermeable Membran voneinander abgegrenzt sind. Das Ruhepotential entsteht aufgrund des speziellen Aufbaus der Membran, wie er in Abbildung B zu sehen ist.⁶

³ vgl. Campbell Biology, 2011, 1092.

⁴ vgl. Spektrum Verlag, 6.06.2017, <http://www.spektrum.de/lexikon/neurowissenschaft/gliazellen/4781>

⁵ Vgl. Bühlmann et al., 1989, 462 f.

⁶ Vgl. Löffler et al., 2003, 1062 f.

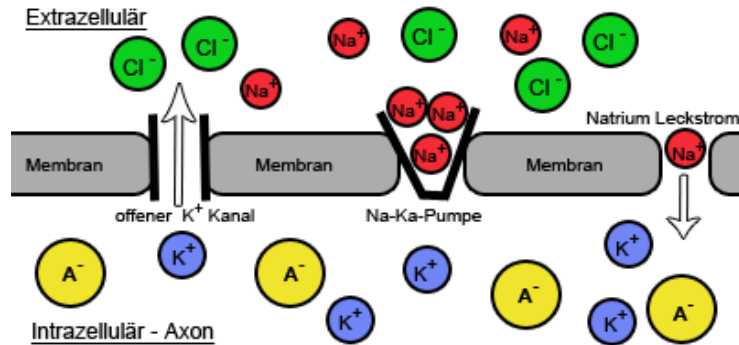


Abb. B Aufbau einer Zellmembran <http://www.biologie-schule.de/ruhepotential.php>

Zu Beginn finden sich außerhalb der Nervenzelle viele Natrium- und Chlorid-Ionen. Innerhalb des Axons befinden sich viele Kalium-Ionen und große Proteinanionen. Die Membran besteht aus einer lipophilen Phospholipid-Doppelschicht. In dieser befinden sich verschiedene Transmembranproteine: immer geöffnete K⁺-Kanäle, spannungsabhängige Na⁺- und K⁺-Kanäle und 3Na⁺-2K⁺-Ionenpumpen. Mit dem Konzentrationsgefälle strömt K⁺ durch die immer offenen K⁺-Kanäle nach außen. Dadurch entsteht ein Ladungsgefälle, wobei das Innere gegenüber dem Äußeren negativ geladen ist. Es können nur so viele K⁺-Ionen ausströmen, bis das Ladungsgefälle so groß ist, dass das weitere Ausströmen von K⁺ verhindert wird (Ladungsgefälle ≥ Konzentrationsgefälle). Dadurch pendelt sich das Ruhepotential bei ~ - 70 mV ein, wobei diese Werte in der Literatur sehr stark schwanken. Allerdings ist die semipermeable Membran zu einem gewissen Grad für Na⁺-Ionen durchlässig, dies nennt man Leckströme. Mit dem Konzentrations- und Ladungsgefälle strömt Na⁺ in die Zelle, das Zellinnere wird wieder positiver und es würde langfristig zu einem Verlust des Membranpotentials (Membranpotential = 0 mV) kommen. Durch die Na⁺-K⁺-Pumpe werden aktiv, daher unter Verbrauch von ATP, gleichzeitig 3 Na⁺-Ionen raus und 2 K⁺-Ionen rein transportiert. Dadurch wird das Zelläußere wieder positiver und das Ruhepotential bleibt erhalten.⁷

Reizweiterleitung im Axon – Das Aktionspotential

Auf dem Ruhepotential aufbauend kann ein Aktionspotential entstehen. Für diesen Vorgang sind die spannungsgesteuerten Na⁺- und K⁺-Kanäle relevant. Verantwortlich für

⁷ Vgl. Silbernagel et al., 1988, 24 ff.

die Spannungsabhängigkeit ist die Ladung dieser Kanäle. Die Ionenkanäle bestehen aus mehreren Untereinheiten, die nach innen positiv geladen sind. Daher werden diese bei -70 mV angezogen und verschließen den Kanal. Nimmt diese Anziehung ab, „gleiten“ die Untereinheiten in die Membran und die Kanäle öffnen sich. ⁸

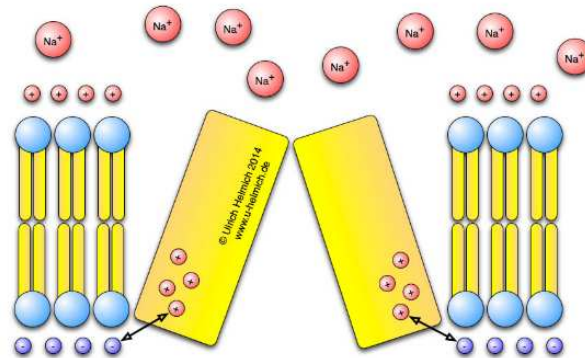


Abb. C Aufbau der (geschlossenen) spannungsabhängigen Ionenkanäle <http://www.u-helmich.de/bio/neu/1/12/121/1218-Ionenkanaele.html>

Ein Aktionspotential hat 4 Phasen Depolarisation, Overshoot, Repolarisation und Hyperpolarisation. Die Veränderung des Membranpotentials ist in Abbildung D zu sehen.

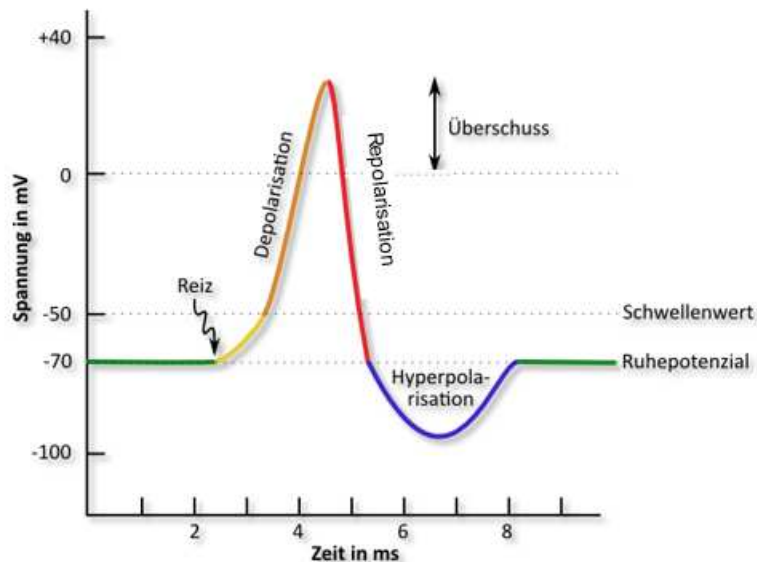


Abb. D Ablauf eines Aktionspotentials <http://www.medizin-kompakt.de/aktionspotenzial>

⁸ Vgl. <http://www.u-helmich.de/bio/neu/1/12/121/1218-Ionenkanaele.html> (01.07.2017)

Ein Reiz öffnet einige spannungsgesteuerten Na⁺-Kanäle. Sobald der Na⁺-Einstrom den Schwellenwert von ca. – 40 mV erreicht hat, öffnen sich schlagartig viele Na⁺-Kanäle, sodass ein Aktionspotential ausgelöst wird (Depolarisation). Immer mehr Na⁺ strömt in die Zelle und das Zellinnere wird bis zu einem Maximum von ~ + 30 mV (Overshoot) positiver. Da im Axon das Alles-oder-Nichts-Gesetz herrscht, erreicht die Depolarisation immer die gleiche Höhe. Die Stärke des Reizes wird durch die Frequenz der AP codiert (Frequenzcodierung). Die spannungsgesteuerten Kaliumionenkanäle zeichnen sich durch ihre Trägheit aus. Daher öffnen sich diese erst nach ~ 1 ms; zu diesem Zeitpunkt werden die spannungsgesteuerten Natriumkanäle schon wieder von den Inaktivierungstoren geschlossen. Inaktivierungstore treten nur bei Na⁺-Kanälen auf und verursachen die Refraktärzeit. In der Refraktärzeit (1 – 2 ms) können die Na⁺-Kanäle nicht geöffnet werden – egal wie stark der Reiz ist. Dadurch werden die Frequenz und die Stärke des Reizes nach oben limitiert. Nun kann kein Na⁺ einströmen, aber K⁺ strömt aus und der Verlust der positiven Ladung macht das Zellinnere wieder negativer als die Außenseite (Repolarisation). Trotz vollständiger Repolarisation bleiben die spannungsgesteuerten K⁺-Kanäle noch für eine kurze Weile geöffnet (träges Verhalten), weshalb es zu einer Hyperpolarisation (auch: Nachpolarisation) kommt. Anschließend stellt die Na⁺-K⁺-Pumpe den Ruhezustand wieder her und es kann ein neues AP ausgelöst werden.⁹ Die oben beschriebene Auslösung des Aktionspotentials bezieht sich auf eine Stelle im Axon. Im folgenden Abschnitt wird nun die Weiterleitung des Aktionspotentials erläutert.

Bei der Reizweiterleitung wird zwischen der Reizweiterleitung im marklosen Neuron (kontinuierliche Reizweiterleitung) und der Erregungweiterleitung im markhaltigen Neuron (saltatorische Reizweiterleitung) unterschieden.

⁹ Vgl. Silbermagel et. al., 1988, 26 f.

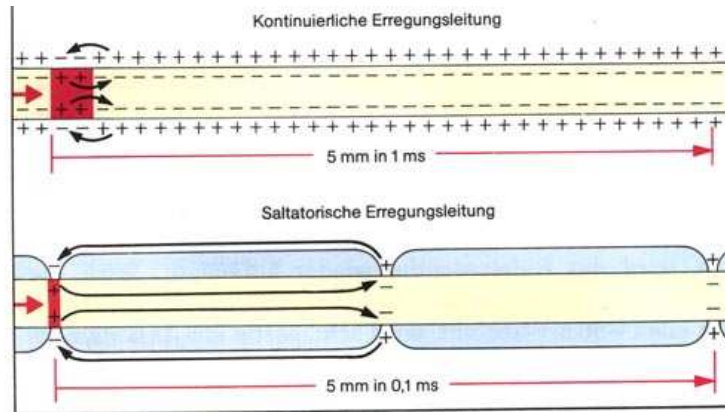


Abb. E Arten der Reizweiterleitung <http://www.bioboard.de/topic,4748,-saltatorische-und-kontinuierliche-erregungsleitung.html>

Das Prinzip ist in beiden Fällen identisch, jedoch ist die saltatorische Reizweiterleitung mit ~ 100 m/s deutlich schneller als die kontinuierliche Reizweiterleitung (1 m/s). Kommt es an einer Stelle im Axon zu einer Depolarisation, so drehen sich hier plus und minus um. Da die Nachbarstellen nicht durch eine Membran abgetrennt sind, verschieben sich die beweglichen Ionen. Im extrazellulären wandern Na^+ -Ionen von den Nachbarstellen in die negativ geladene, depolarisierte Stellen; im Zellinneren strömen K^+ -Ionen in die Nachbarstellen. Hierdurch werden die Nachbarstellen depolarisiert und diese erreicht im Optimalfall den Schwellenwert. Dadurch wird dort ein AP ausgelöst und der oben beschriebene Vorgang läuft erneut ab. Die vorherige Stelle erreicht wieder ihr Ruhepotential und kann erneut angeregt werden. Obwohl beide Seiten der depolarisierten Stelle angeregt werden, wird nur Richtung Synapse ein AP ausgelöst. Dies liegt an der Refraktärzeit der spannungsgesteuerten Na^+ -Kanäle. Da für 1 – 2 ms kein AP ausgelöst werden kann (Na^+ kann nicht einströmen), wird somit ein AP nur in Richtungen der Synapse entsandt. Die Erregungsweiterleitung im Axon mit Myelinscheide funktioniert im Prinzip genauso wie ohne Myelinscheide. Der einzige Unterschied ist, dass AP nur bei den Ranvierschen Schnürringen entstehen können. Dadurch wird das AP schneller weitergeleitet.¹⁰

Von Neuron zu Neuron – Die Synapse

In den Neurowissenschaften ist das neuronale Netzwerk, ein abgegrenzter Teil des Nervensystems, von großer Bedeutung. Zwischen den einzelnen Nervenzellen gibt es

¹⁰ Silbernagel et al., 1988, 28 f.

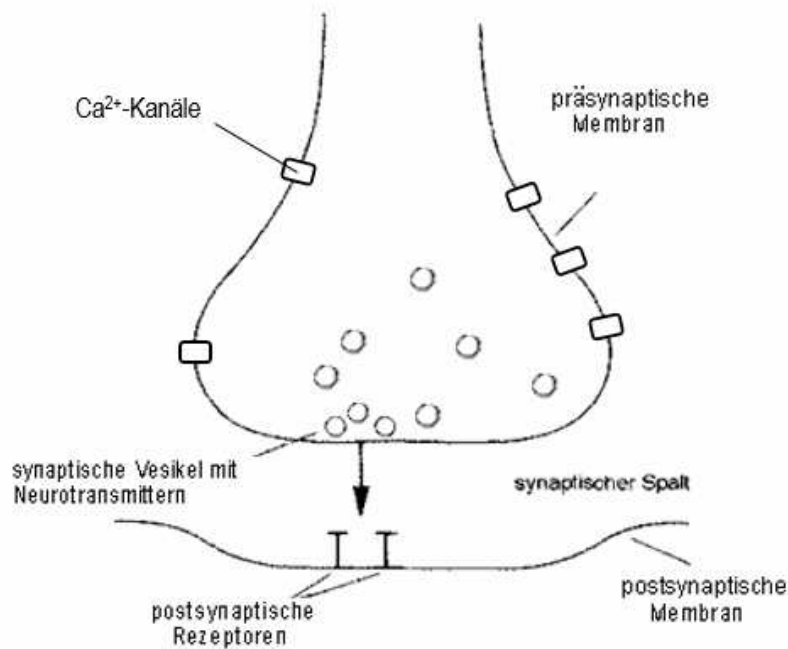


Abb. F Aufbau einer Synapse http://dsmorus.cl/Der_GIBerater/einheit10.htm (bearbeitet)

Verbindungsstellen. Hier wird das Signal von den Enden des Axons des vorherigen Neurons auf die Dendriten oder das Soma des Nächsten übertragen. Das elektrische Signal gelangt an die Verbindungsstelle, wird chemisch übertragen und anschließend wieder elektrisch weitergeleitet. Diese Verknüpfungsstelle nennt man Synapse. ¹¹

Eine Synapse besteht aus der Präsynapse, der Postsynapse und dem synaptischen Spalt.

Gelangt ein Aktionspotential vom Axon ausgehend an das synaptische Endbläschen, wird diese Region des Neurons depolarisiert. Die Depolarisation führt zu einer Öffnung der spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanäle. Calcium-Ionen strömen mit dem Konzentrationsgefälle in die Zelle und lösen die Exocytose der Vesikel an der aktiven Zone der präsynaptischen Membran aus. Neurotransmitter werden in den synaptischen Spalt freigegeben. Damit die Exocytose zur richtigen Zeit am richtigen Ort stattfinden kann, gibt es die s.g. Cytomatrix der aktiven Zone (CAZ). Diese besteht aus verschiedenen Proteinen, wie beispielsweise Aktin, Basson und Piccolo, die in größeren Mengen nur in der Synapse vorkommen. Dies kann man sich beispielsweise beim Färben von Neuronen zu Nutze machen. Des Weiteren besteht die CAZ aus dem SNARE-Komplex, wel-

¹¹ Vgl. Bühlmann et al., 1989, 467 f.

cher im Wesentlichen aus drei verschiedenen Proteinen besteht. Ist dieser nicht mehr funktionsfähig, weil die Proteine z.B. durch Botulinumtoxin denaturiert wurden, können die Neurotransmitter nicht in den synaptischen Spalt freigesetzt werden. Wird an den Synapsen der efferenten Neurone zu wenig, so kommt es zu Lähmungserscheinungen; wird zu viel übertragen, kommt es zu Krämpfen.¹²

Nachdem die NT durch den etwa 15 nm breiten synaptischen Spalt diffundiert sind, gelangen sie an die postsynaptische Dichte (PSD). Die Menge an Neurotransmitter entscheidet über die Stärke des Reizes, man spricht von einer Amplitudencodierung. An der PSD setzen sich die Neurotransmitter an die ligandengesteuerten Ionen-Kanäle der postsynaptischen Membran. Diese öffnen sich dadurch und die entsprechenden Ionen strömen in die postsynaptische Zelle. Dabei handelt es sich entweder um Na⁺ und K⁺ oder um Cl⁻, die in der Postsynapse eine Depolarisation (exzitatorisches postsynaptisches Potential, EPSP) bzw. eine Hyperpolarisation (inhibitorisches postsynaptisches Potential, IPSP) auslösen. Anschließend lösen sich die Neurotransmitter von den Ionen-Kanälen und werden in die Präsynapse mittels Endocytose aufgenommen.¹³

Durchs Soma zur Steuerung und weiter geht's – das AIS

Die Synapsen der vorherigen Neurone lösen in der Membran (am Dendrit oder Soma) der folgenden Nervenzelle eine Depolarisation (EPSP) oder eine Hyperpolarisation (IPSP) aus. Von der Entstehungsstelle ausgehend wandern die postsynaptischen Potentiale in alle Richtungen, unter anderem auch zum Axonhügel (AIS).¹⁴

¹² Vgl. Löffler et al., 2003, 1065 ff.

¹³ Vgl. Bühlmann et al., 1989, 467 f.

¹⁴ Ders., 468 f.

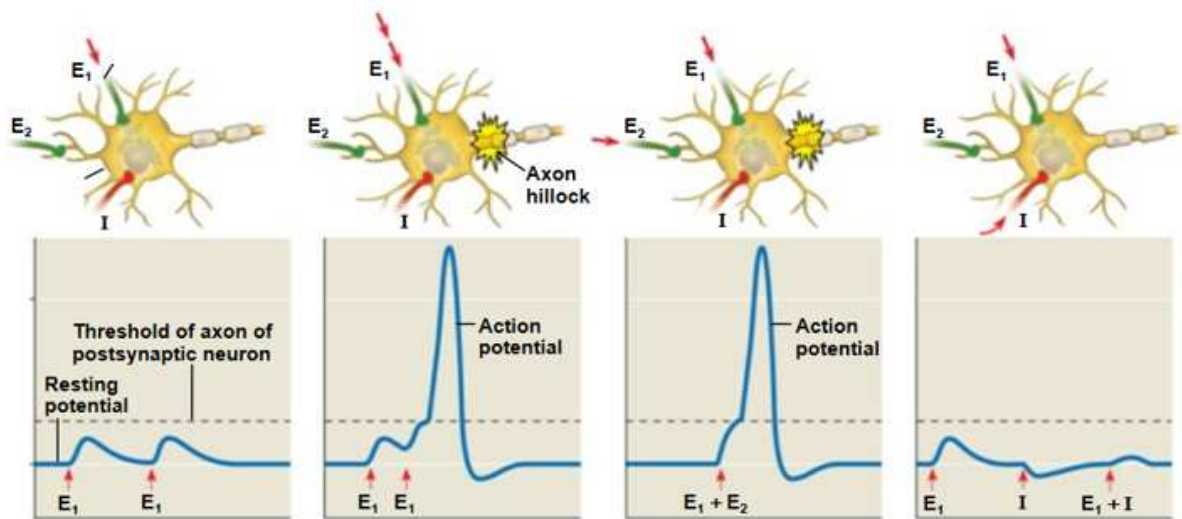


Abb. G Summation von Signalen am Axonhügel <http://slideplayer.com/slide/4879074/> (bearbeitet)
 Dieser Abschnitt der Reizweiterleitung ist amplitudencodiert, wobei die Amplitude immer weiter abschwächt. Der Axonhügel wandelt die Amplitudencodierung in eine Frequenzcodierung um, daher ist dort auch eine erhöhte Dichte an Na⁺-Ionenkanälen feststellbar. Daher haben Synapsen, die näher am folgenden Axonhügel liegen, höheres Gewicht, als Synapsen, die an den Enden der Dendriten lokalisiert sind. Am AIS werden die einlaufenden Potentiale verrechnet (Summation). Erst wenn der Axonhügel von mehreren Signalen depolarisiert wird, überschreitet diese den Schwellenwert (ca. – 40 mV) und ein AP wird ausgelöst.¹⁵

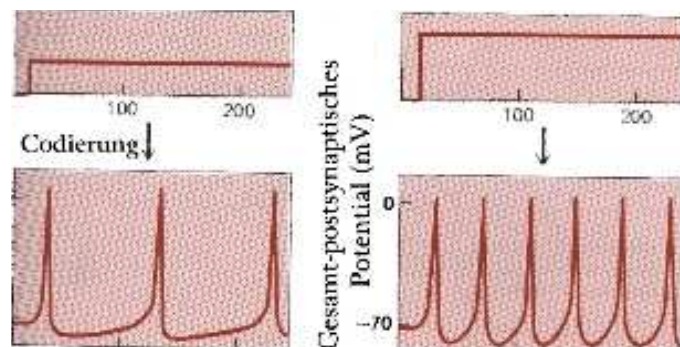


Abb. H Umwandlung von Amplituden- in Frequenzcodierung am Axonhügel <http://bio1152.nicerweb.com/Locked/media/ch48/summation.html>

Man unterscheidet bei der Summation zwischen zeitlicher und räumlicher Summation. Bei ersterer werden viele kurz hintereinander ankommende (starke) AP von einer Syn-

¹⁵ Vgl. Silbernagel et al., 1988, 30.

apse addiert, bei letzterer werden die gleichzeitig ankommenden Aktionspotentiale an verschiedenen Synapsen verrechnet. Die Synapsen sind entweder erregend (Depolarisation) oder hemmend (Hyperpolarisation). In einer realen Zelle werden erregende und hemmende Synapsen gleichzeitig räumlich und zeitlich summiert. Erreicht die Depolarisation den Schwellenwert, wird im folgenden Axon ein Aktionspotential ausgelöst. Unterschiedliche Stärken von Reizen werden durch die relative Refraktärzeit ermöglicht. Der Schwellenwert hat zu Beginn einen festen Wert. Nachdem ein AP durch eine Depolarisation der Zelle ausgelöst wurde, befinden sich die Na⁺-Kanäle in der absoluten Refraktärzeit. Anschließend ist der Schwellenwert sehr hoch und sinkt langsam wieder ab (relative Refraktärzeit). Ist der Schwellenwert gleich der Depolarisation wird ein neues Aktionspotential ausgelöst. Ist die Depolarisation hoch (starker Reiz), erreicht der Schwellenwert die Depolarisation schneller, es wird früher ein AP ausgelöst, die Frequenz ist höher und damit der Reiz stärker. ¹⁶

3.3 Neurotransmitter

Die bereits genannten Neurotransmitter (NT) sind Botenstoffe, die ein Signal von einem Neuron auf ein anderes übertragen. Ein Neurotransmitter muss folgende Kriterien erfüllen: Er muss in der Präsynapse synthetisiert werden, dort (genauer: im Axon) nachweisbar sein und aus dieser freigesetzt werden können. Zudem müssen sich Rezeptoren für dieses Molekül an der Prä- und Postsynapse befinden. Ein Neurotransmitter muss einen Reiz auslösen (auch bei direkter Applikation) und gehemmt / inaktiviert werden können. ¹⁷

Nahezu alle NT werden in ihrer Gesamtheit in die präsynaptische Zelle aufgenommen. Lediglich Acetylcholin wird in das Acetat und das Cholin aufgespalten und getrennt aufgenommen. In der folgenden Tabelle sind die wichtigsten Neurotransmitter, ihr Wirkungsort und ihre Wirkung aufgeführt.

¹⁶ Vgl. Bühlmann et al., 1989, 468 ff.

¹⁷ Löffler et. al., 2003, 1065 ff.

Tab. 1 Übersicht von wichtigen Neurotransmittern ¹⁸

Neurotransmitter	Vorkommen	Wirkung auf die Postsynapse
Acetylcholin	ZNS und PNS	meist erregend
Dopamin	ZNS	meist hemmend
(Nor)adrenalin	ZNS	erregend und hemmend
Serotonin	ZNS (und PNS)	erregend und hemmend
γ -Aminobuttersäure (GABA)	ZNS	hemmend

Serotonin

Der Schwerpunkt des Praktikums lag auf serotonergen Nervenzellen im zentralen Nervensystem. Serotonerge Neurone verwenden als Neurotransmitter das biogene Amin Serotonin mit der Summenformel $C_{10}H_{12}N_2O$. ¹⁹

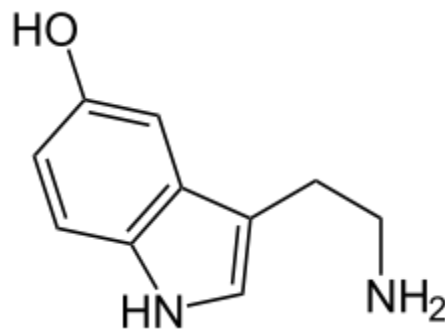


Abb. 1 Strukturformel Serotonin [https://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Serotonin_\(5-HT\).svg](https://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Serotonin_(5-HT).svg)

Serotonin, auch 5-HT (5-Hydroxytryptamin) genannt, wird aus der Aminosäure Tryptophan in den enterochromaffinen Zellen der Darmmukosa und im Gehirn gebildet, da es die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren kann. Serotonin beeinflusst im Gehirn die Schmerzempfindung, die Thermoregulation, die Gedächtnisleistung, Aggression und Angst, das Schlaf-, Ess- und Sexualverhalten und viele weitere emotionale Prozesse. Serotonin wirkt entweder als Hormon oder Neurotransmitter. Grundsätzlich funktioniert

¹⁸ Vgl. <http://www.gehirnlernen.de/gehirn/neurotransmitter-und-ihre-bahnen/> (01.07.2017)

¹⁹ Vgl. Löffler et. al., 2003, 1071 f.

es wie andere Neurotransmitter auch, jedoch wird der Serotoninkreislauf durch einige spezielle Eigenschaften charakterisiert.²⁰

Gelangt ein Aktionspotential an das synaptische Endbläschen, führt dies zur Exocytose der Vesikel. Das AP lässt sich im Labor durch einen s.g. Agonisten simulieren, der an einen 5-HT-Rezeptor dockt. Dieser sendet ein Signal aus und aktiviert so die Neurotransmission. Serotonin wird in den synaptischen Spalt freigegeben. Serotonin setzt sich nun an die Ionenkanäle der PSD und wird anschließend zurück transportiert. Dieser Rücktransport geschieht mittels Serotoninrücktransportern (SERT). Diese senden nach einer gewissen Zeit ein „Feierabendsignal“ an die Präsynapse, sodass die Neurotransmission beendet wird.

²⁰ Vgl. Löffler et. al., 2003, 1071 f.

4. Methodik

Im folgenden Teil werden die Arbeitstechniken, die für die Versuche im Praktikum notwendig waren, kurz beschrieben. Wichtig ist hierbei – wie bei nahezu allen Laborarbeiten – sauberes und sicheres Arbeiten und eine gute Dokumentation.

4.1 Aufbewahrung, Züchtung und Arbeit mit Zellen

Nachdem die pluripotenten Stammzellen durch Zugabe von verschiedenen chemischen Substanzen zur Differenzierung und zum Wachstum angeregt worden sind, wachsen diese im Zellmedium. Dieser Vorgang findet im Inkubator, bei etwa 38°C, statt und dauert ungefähr 3 Wochen. In dieser Zeit bildet sich ein mehr oder weniger komplexes Netzwerk aus, das einem in vivo entstandenen Netzwerk entspricht. Die Anzahl der Zellen pro Milliliter ist unabhängig von der ausgebildeten Netzwerkstruktur und beträgt durchschnittlich etwa 2 000 000 Zellen. Anschließend können die Zellen im Eisschrank theoretisch fast unendlich überleben, bis sie für Versuche benötigt werden. Diese Aufbewahrung findet bei – 84°C in einem Labor der Sicherheitsstufe 2 statt.



Abb. J Aufbewahrung der Zellen

Bei der Arbeit mit Zellkulturen ist auf stetiges saubere und steriles Arbeiten großen Wert zu legen. Da unsterile Zellen meist bald absterben, findet das Anlegen der Zellkultur unter einer Glasscheibe und mit Handschuhen und Kittel statt. Die meisten von uns verwendeten Substanzen sind für den Menschen als eher ungefährlich einzustufen, jedoch wurde für das Fixieren der Zellen der kanzerogene Stoff Paraformaldehyd verwendet.

Um die Zellen nicht weiter zu schädigen und bei Färbungen Farbüberreste zu entfernen, sind jene nach der Färbung oder Fixation mit Paraformaldehyd abzuwaschen. Dies geschieht mit einem Phosphatpuffer (PBS).

4.2 Mäuseneurone und humane Neurone

Für mikroskopische Versuche im neurowissenschaftlichen Bereich verwendet man entweder Mäuseneurone oder humane Neurone. Mäuseneurone sind anatomisch und physiologisch ähnlich zu den Neuronen des Menschen, jedoch deutlich günstiger und einfacher in größeren Mengen herzustellen. Sie werden aus Stammzellen differenziert und anschließend weiter reifen gelassen (z.B. Ausbildung des Axons und Verkürzung des Axonhügels). Diese eignen sich gut für Vor- und grundlegende Versuche, die der ersten Ergebnissicherung dienen. Für den endgültigen Nachweis und sehr spezialisierte Versuche werden jedoch humane Neurone benötigt. Zur Herstellung humaner Nervenzellen verwendet man verständlicherweise weder die Stammzellen aus bspw. Nabelschnurblut noch Nervenzellen von Probanden, sondern lässt Haut- oder Blutzellen der Probanden redifferenzieren und verfährt anschließend wie mit Mäuseneuronen. Das Verfahren der Redifferenzierung lässt sich jedoch nicht im klinischen Rahmen umsetzen, da die hierfür benötigten Stoffe kanzerogen sind.

4.3 Färbung von Zellen

Um Zellen und ihre Bestandteile unter dem Mikroskop sichtbar zu machen, werden verschiedene Färbemethoden angewandt. Farbstoffe können genutzt werden, um Vesikel oder bestimmte Proteine zu färben.

Farbstoffe, die durch Endozytose in die Zelle aufgenommen werden, können dazu genutzt werden, die Aufnahme und Abgabe von Serotonin zu untersuchen. Hierfür kann beispielsweise das fluoreszierende Molekül ASP⁺ verwendet werden. Es wird durch SERT in die Zelle aufgenommen und ist daher besonders gut für die Untersuchung der Funktionsweise von SERT geeignet. Um die Freisetzung von Neurotransmitter zu untersuchen ist FFN511, ein Fluorescent False Neurotransmitter der mit Hilfe des Membranproteins vMAT2 in Vesikeln aufgenommen wird, besser geeignet.²¹

²¹ Journal of Neuroscience Methods: „Visualization of neurotransmitter uptake and release in serotonergic neurons“ von Thorsten Lau, Verena Proissl, Janina Ziegler, Patrick Schloss

Zur Bearbeitung der Forschungsfrage wurde hauptsächlich die indirekte Antikörperfärbung von Proteinen eingesetzt. Hierbei bindet ein primärer Antikörper an ein Protein. Ein sekundärer Antikörper, der mit einem Farbstoff verbunden ist bindet dann an den primären Antikörper.

Zur Betrachtung der gesamten Zellstruktur und von neuronalen Netzwerken wurde eine TuJ1 Färbung durchgeführt. Dieser von Mäusen gewonnene Antikörper bindet beta-tubulin, welches Teil des Cytoskelettes der Neurone ist.²²

Um einzelne Zellteile zu färben, werden Antikörper genutzt, die spezifisch für ein Protein sind, das vermehrt in dem jeweiligen Teil der Zelle vorkommt. Um beispielsweise die Position und Länge des AIS sichtbar zu machen, werden Antikörper verwendet, die sich an das dort vorkommende ankyrin-G binden.

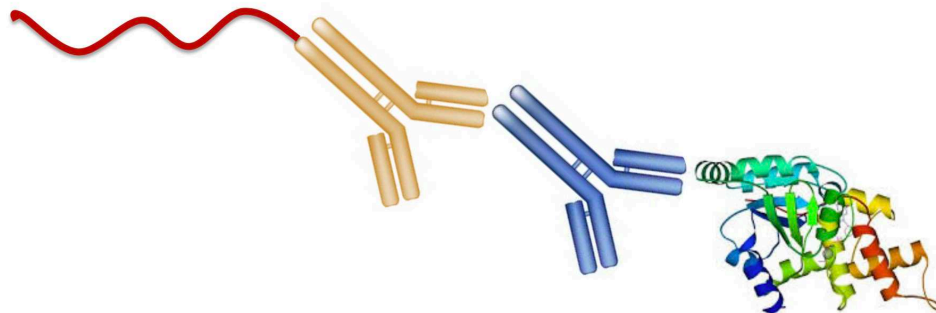


Abb. K Veranschaulichung der indirekten Antikörperfärbung

<https://www.bioinf.uni-leipzig.de/Leere/PRAKTIKUM/Protokolle/SS04/1/einfuehrung.html>

4.4 Lasermikroskopie

Für die Aufnahmen der Zellen wird standartmäßig ein confocales Lasermikroskop (beispielsweise das Leica TCS SP5 II) verwendet, um die fluoreszenzgefärbten Zellen zu betrachten. Hierbei rastert ein Laser die Probe ab und erstellt hierdurch ein genaues Bild des ausgewählten Bereiches.

²² <http://www.neuromics.com/ittrium/visit/A1x66x1y1x85b1x1x9-cy1x6217x1x96y1x581x1x82y1x5d1x1x7f>

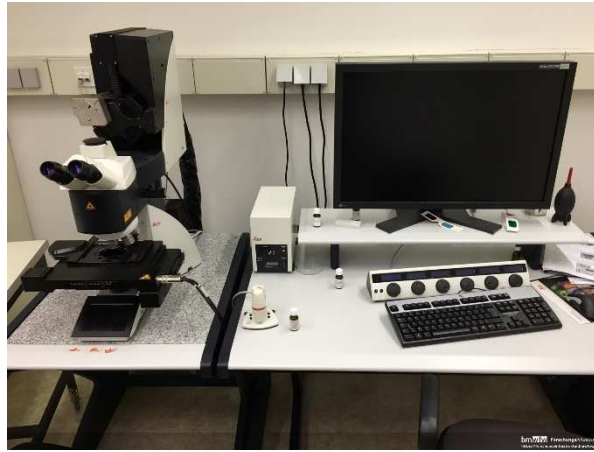


Abb. L Das Leica TCS SP5 II)

https://forschungsinfrastruktur.bmwf.gv.at/de/fi/konfokalsystem-leica-tcs-sp5-ii-leica_1931

Um eine bessere Bildqualität zu erreichen und Totalreflexion durch den unterschiedlichen Brechungsindex von Luft und Glas zu vermeiden, wird vor der Messung auf die Probe ein s.g. Immersionsöl aufgetragen. Die Aufnahme erfolgt häufig in 63-facher Vergrößerung und auf 3 Kanälen gleichzeitig. Dies bedeutet, dass 3 verschiedene Laser mit je einer verschiedenen Wellenlänge die Probe scannen, die Fluoreszenzfarbstoffe anregen und diese fluoreszieren. Die Aufnahme auf 3 Kanälen gleichzeitig ermöglicht, dass verschiedene Strukturen abgebildet werden können. Ein klassisches Beispiel hierfür wird in dem folgenden Absatz beschrieben. Auch wenn die Neurone auf flachen Zellträgern aufgebracht sind, handelt es sich um 3-dimensionale Strukturen. Würde man mit dem Mikroskop immer genau eine Ebene aufnehmen, so würden viele Informationen verloren gehen und ein Überblick über ein Netzwerk oder sogar eine einzelne Zelle wäre nicht gegeben. Neben der Steuerung in x- und y-Richtung zur Auswahl des richtigen Bildausschnittes, kann man daher auch die z-Ebene einstellen. Nach Festlegung eines oberen und unteren Grenzwertes (jeweils bis kaum noch etwas zu erkennen ist) und der Anzahl der Schichten (meist ungefähr 25), nimmt das Mikroskop nun die Probe Schicht für Schicht auf und fügt diese zu einem Film zusammen. Allerdings kann man nicht beliebig viele Aufnahmen von der gleichen Zellkultur machen. Das Licht bleicht die Farbstoffe aus und vor allem bei sehr stark vergrößerten Aufnahmen ist die Färbung teils schon nach 1-2 Aufnahmen nicht mehr verwendbar.

4.5 Bildbearbeitung und Auswertung

Nachdem die Aufnahmen gemacht wurden, müssen diese am PC nachbearbeitet werden. Dazu verwendeten wir das Programm ImageJ. Zunächst werden die im Film dargestellte Schichten (Aufnahmen 1-9) übereinander projiziert und als Stapel (Aufnahme 10) dargestellt.

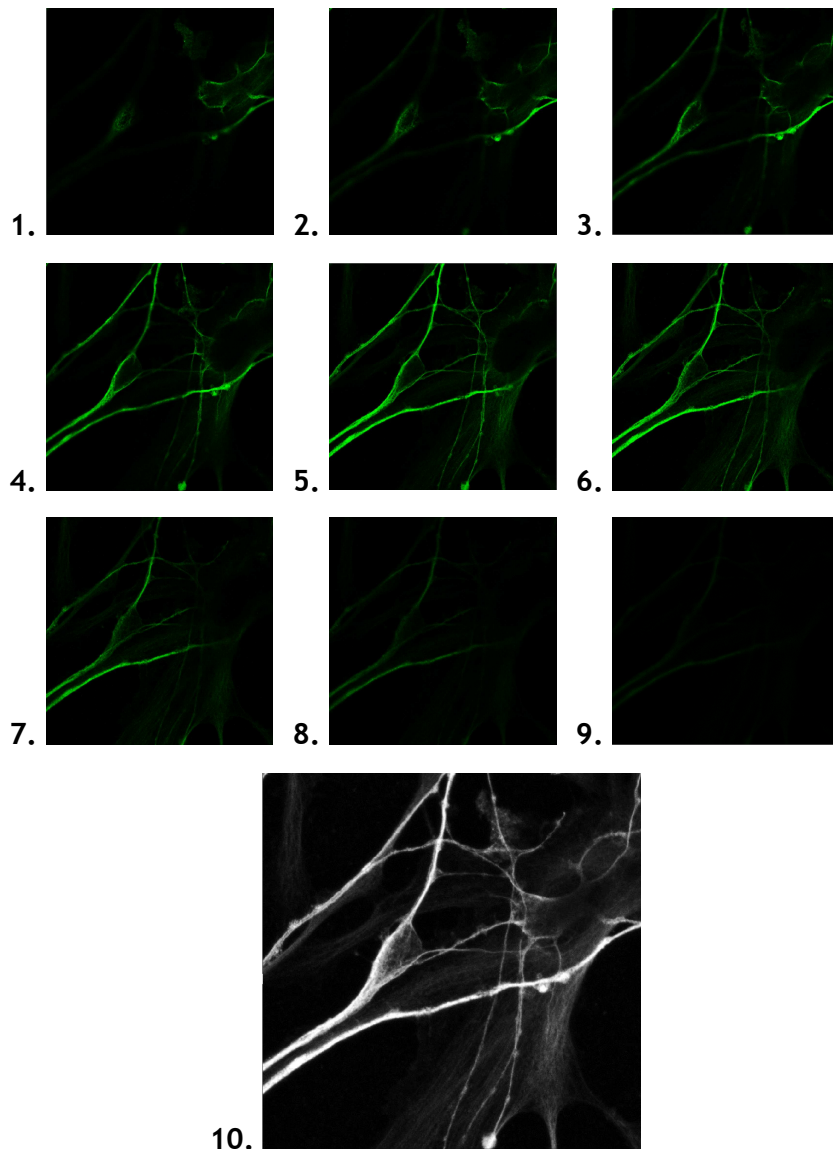


Abb. M Bilder einzelner Schichten und des gesamten Stapels

Es entsteht ein scheinbar 3-dimensionales Bild, das die Struktur des jeweiligen Bildausschnittes widerspiegelt. Anschließend wird, wenn nötig, die Helligkeit und der Kontrast eingestellt. Bei der Färbung kommt der gesamte Zellträger in Kontakt mit dem Färbemittel, sodass trotz anschließendem Abwaschen der Probe ein wenig Färbung vorhanden bleibt. Diese zeigt sich in der Aufnahme als Hintergrundrauschen in Form von kleinen Punkten. Dies kann mit der Funktion „Substract background“ behoben werden.

Nach der anschließenden fakultativen Neufärbung der einzelnen Kanäle ist die Aufnahme fertig. Nun kann, je nach Verwendungszweck, eine Skala (meist) eingefügt werden, die Vesikel gezählt werden (vgl. Kapitel 6.3) oder verschiedene Längen (z.B. Länge des AIS oder der Abstand vom Soma zum AIS), mithilfe vom ImageJ gemessen werden.

5. Hintergrund

5.1 Probleme im Serotoninkreislauf führen zu Erkrankungen

Aus verschiedenen Gründen kann es passieren, dass zu wenig Neurotransmitter im synaptischen Spalt ist. Ursachen könnten beispielsweise ein zu geringe Ausschüttung oder eine zu schnelle Wiederaufnahme sein. Durch eine zu geringe Konzentration an NT im synaptischen Spalt, kommt es zu einer verringerten Reizweiterleitung und der Neurotransmitterkreislauf wird gestört. Passiert dies bei serotonergen Neuronen, d.h. es ist zu wenig Serotonin im synaptischen Spalt, können Depressionen ausgelöst werden. Wie man die Synapse „heilt“ wird in Abschnitt 5.3 beschrieben.

5.2 Teufelskreislauf der Neurone

In der Neurobiologie und Psychiatrie stellt man sich das neuronale Netzwerk häufig vereinfacht als Kreislauf von zwei Neuronen vor. Hierbei läuft der Reiz in einem Kreislauf immer wieder durch die beiden Neurone. Selbstverständlich kann dieses System beliebig ausgeweitet werden und dient lediglich als absolute Vereinfachung eines neuronalen Netzwerkes.

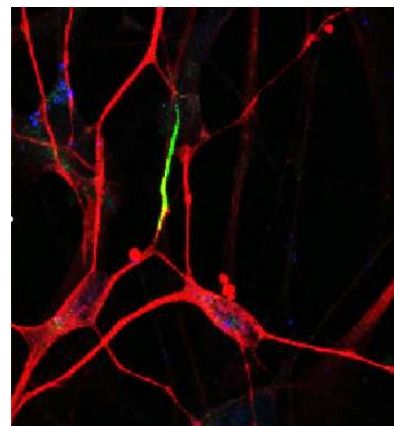
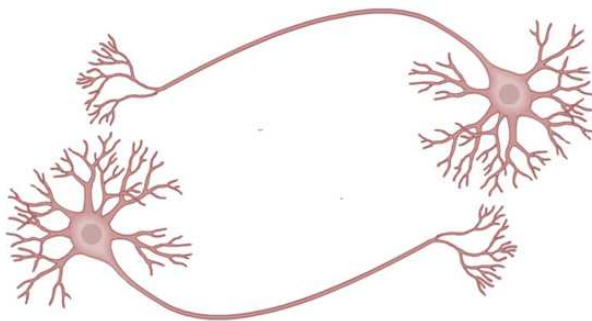


Abb. N Kreislauf aus Neuronen https://online.science.psu.edu/bisc004_activewd001/node/1907 (bearbeitet)

Abb. O schwach ausgebildetes neuronales Netzwerk eigene Aufnahme

In den letzten Jahren wurde herausgefunden, dass Neurone die Stärke des AP, welches sie aussenden, selbst regulieren können. Dies nennt sich „synaptic scaling“ oder auch „synaptische Plastizität“. Regulieren Neurone nun aktiv die Stärke des Aktionspotentials, so wird die nachfolgende Nervenzelle stärker/schwächer angeregt. Diese kann den Reiz ebenfalls verstärken/schwächen. Die Anpassung findet in erster Linie am AIS statt. Wie oben beschrieben schwächt ein langer Weg im Axon die Amplitudenhöhe und damit die Höhe des Reizes ab. Ist der ankommende Reiz sehr stark, dann verschiebt sich das AIS in Richtung Synapse, der Weg wird länger und das Signal abgeschwächt. Ist der ankommende Reiz nur sehr schwach und es würde kein AP ausgelöst werden, so verschiebt sich das AIS in Richtung Soma, der Weg wird kürzer und der am Axonhügel ankommende Reiz stärker. Diese Verschiebung ist mittelfristig und reversibel und führt daher nicht zu einer spontanen Anpassung, die eine Unterscheidung der Reizstärke unmöglich machen würde, sondern lediglich zu einer Anpassung bei längerfristigen starken/schwachen Reizen. Im Normalfall befindet sich das AIS 20-30 μm vom Soma entfernt. Diese Messergebnisse können stark voneinander abweichen, da der Beginn des Somas nicht eindeutig definierbar ist. Daher gibt es mittlerweile die Theorie, dass bei zu wenig Input sich das AIS dem Soma annähert und bei starkem Input vom Soma entfernt. Hierbei handelt es sich jedoch nur um eine Theorie, die bis dato nicht bewiesen wurde. Bei anderen Neuronen wird sichtbar, dass sich das AIS bei höheren Serotoninkonzentrationen bis auf 10 μm dem Soma annähert, und bei fehlendem Serotonin bis auf 50 μm entfernt. Dieses Prinzip wirkt auch auf die beiden Nervenzellen des oben beschriebenen Kreislaufes aus. Erhält eines dieser beiden Neurone einen starken Reiz, verschiebt sich das AIS nach hinten und der Output an der Synapse zum zweiten Neuron wird geringer. Bei dieser Simulation wird davon ausgegangen, dass lediglich ein Neuron seinen Axonhügel verschiebt. Da der Input beim zweiten Neuron nun geringer ist, ist auch der Output geringer. Dadurch ist die Stärke des Reizes bei dem ursprünglichen deutlich vermindert und das AIS verschiebt sich wieder in Richtung Soma. Nun beginnt dieser Kreislauf mit einem zu schwachen Reiz, läuft aber ebenfalls durch das Axon zur Synapse, durch das Soma des zweiten Neurons, durch dessen AIS und Axon und durch die Synapse wieder ins Soma der ersten Nervenzelle.

Die gleiche Wirkung zeigt sich bei der Längenveränderung des AIS. Ist das AIS kürzer, ist es schwerer ein AP auszulösen, als bei einem langen AIS. Diese Interaktion findet auch im menschlichen Gehirn statt und ist für die Impulskontrolle mitverantwortlich. Wenn es hierbei zu Störungen oder Fehlern kommt, ist eine Entstehung von psychiatri-

schen Krankheitsbildern, wie bspw. Schizophrenie, wahrscheinlicher. Diese Krankheit ist wie die später noch betrachteten Krankheiten, nicht mit ALS oder Alzheimer gleichzusetzen. Ursache bei ersteren Krankheiten sind Funktionsstörungen und anatomische Veränderungen, wohingegen ALS durch eine Degeneration von motorischen Neuronen ausgelöst wird.

Auch Störungen in der Synapse können einen Menschen krankmachen. Neben Störungen der motorischen Neurone, die zu Lähmungen oder Krämpfen führt, führt eine fehlerhafte Übertragung bei serotonergen Neuronen im Gehirn zu psychischen Krankheiten, wie Depression, Angststörungen oder auch Zwangserkrankungen. Serotonerge Nervenzellen beeinflussen unter anderem die Stimmung, daher führt zu wenig Serotonin zu Depressionen und zu viel Serotonin zu Halluzinationen, Desorientiertheit, Ruhelosigkeit und Verwirrtheit. Letzteres wird mit dem Begriff „Serotonin-Syndrom“ zusammengefasst. Durch zu wenig Serotonin im synaptischen Spalt, wird die nachfolgende Zelle nur vermindert angeregt.²³

Eine Depression ist eine psychische Störung, die sich primär durch gedrückte Stimmung auszeichnet, und gehört der Gruppe der affektiven Erkrankungen an. Sie wird durch den Schlüssel F32 gemäß ICD-10 codiert.²⁴ Bei einer typischen Episode leidet der Betroffene unter verminderter Ausprägung von Antrieb, Aktivität, Konzentration, Freude, Appetit und Interesse. Weitere charakteristische Merkmale einer Depression sind stark vermindertes Selbstwertgefühl und -vertrauen und Schuldgefühle oder Wertlosigkeitsgedanken. Dies resultiert in schweren Fällen in Selbstverletzung, Suizidversuchen oder Suiziden.²⁵

5.3 Antidepressiva zur Behandlung

Neben Psychotherapie und weiteren Methoden (z.B. Wach- und Lichttherapie), muss in schwerwiegenderen Fällen eine medikamentöse Behandlung erfolgen. Um die Ursache zu beheben, muss das Medikament, das Antidepressivum, in den oben beschriebenen

²³ Vgl. <http://drugscouts.de/> (29.06.2017)

²⁴ Vgl. <http://www.icd-code.de/icd/code/F32.2.html>, 29.06.2017

²⁵ Vgl. Neundörfer et al., 1996, 318 ff.

Serotoninkreislauf eingreifen. Die einfachste Methode hierzu ist es, die Wiederaufnahme in die Präsynapse zu verlangsamen. Hierzu muss das Medikament die Serotoninrücktransporter blockieren. Dadurch verbleibt 5-HT im synaptischen Spalt, auch wenn die Neurotransmission bereits beendet ist. Dies führt zu einer verstärkten Reizweiterleitung und eine Aufbesserung der Stimmung und eine Linderung der Symptome ist zu erwarten. Diese Untergruppe der Antidepressiva nennt man selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer oder selektive Serotonin-Rücktransportinhibitoren (SSRI). Diese hemmen nur die SERTs einer Zelle und erhöhen hierdurch die 5-HAT-Konzentration in der Gewebsflüssigkeit des Gehirns. Ähnliche Wirkung haben einige Drogen, wie bspw. Lysergsäurediethylamid (LSD) und 3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA / Ecstasy), sodass diese zu dem oben erwähnten Serotonin-Syndrom führen, welches lebensbedrohlich sein kann. In der neuen Medizin wird LSD teilweise zur Akutbehandlung von schwergradigen Depressionen verwendet, da es sich durch seine kurzfristige Wirkung auszeichnet. Ältere Antidepressiva wie Citalopram benötigen bis zum Wirkeintritt 4-5 Wochen; neuere Medikamente, wie Escitalopram lediglich ungefähr zwei Wochen. Dennoch ist auch nach 3 Wochen keine Wirkung sichergestellt. In der Praxis bedeutet dies für einige Patienten monatelanges Suchen nach einem wirksamen Medikament. ²⁶

Personalisierte Medizin

In der Forschung versucht man aktuell eine Testplatte für Antidepressiva zu entwickeln. Auf dieser werden Neurone des Menschen, die aus dessen Haut oder Blut gewonnen werden, mit den verschiedenen Antidepressiva versetzt und anschließend mikroskopisch untersucht, sodass das optimale Antidepressivum für den Betroffenen schneller gefunden wird. Diese Entwicklung nennt man personalisierte Medizin und sie ist in nahezu allen Teilbereichen der Medizin zu finden.

Escitalopram

Escitalopram, gemäß IUPAC (S)-1-(3-Dimethylaminopropyl) -1-(4-fluorphenyl)-1,3-dihydro-2-benzofuran-5-carbonitril, ist ein Medikament der Wirkstoffklasse Antidepressivum und wirkt als SSRI. ²⁷

²⁶ Vgl. <http://drugscouts.de/> (29.06.2017)

²⁷ Vgl. <https://www.fachinfo.de/pdf/005936> (29.06.2017)

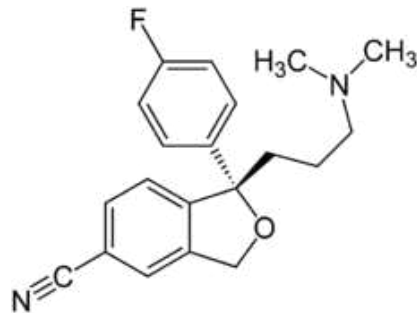


Abb. P Strukturformel von Escitalopram <https://de.wikipedia.org/wiki/Escitalopram>

Escitalopram wird u.a. zur Behandlung von Depressionen, Panik- und Zwangsstörungen und generalisierten Angststörungen verwendet. Escitalopram ist das linksdrehende Enantiomer des Racemates Citalopram. Citalopram zeichnet sich durch seine bessere und schnellere Wirkung gegenüber anderen SSRIs und SNRIs aus, jedoch treten wie bei anderen (günstigeren) Medikamenten häufige und starke Nebenwirkungen, wie Übelkeit und Schwindel, auf. ²⁸

5.4 Untersuchung von Patienten mit Neuroimaging-Techniken

Mit in vitro produzierten Neuronen und den zuvor beschriebenen Techniken ist eine sehr genaue Analyse der Vorgänge in den Zellen und der Reaktion auf Behandlungen möglich. So genau lassen sich die Reizweiterleitungsvorgänge in Patienten nicht untersuchen. Mit Hilfe von Neuroimaging lassen sich aber dennoch Erkenntnisse über die Gehirnaktivität und den Gesundheitszustand von Patienten oder Probanden bei Studien gewinnen.

Besonders geeignet ist hierfür die Magnetresonanztomographie. Das wichtigste Bauteil von Magnetresonanztomographen ist ein kreisförmiger Elektromagnet, in welchem sich während der Messung das zu untersuchende Körperteil des Patienten befindet. Das MRT basiert auf dem Prinzip des Kernspinresonanzverhaltens von Wasserstoff. Unter Einfluss des erzeugten Magnetfeldes richten sich die Protonen des Wasserstoffes aus. Durch Hochfrequenzimpulse werden sie wieder aus dieser Ausrichtung ausgelenkt. Anhand der Signale, die nach der Auslenkung ausgesendet werden, lassen sich dann

²⁸ Vgl. <https://www.fachinfo.de/pdf/005936> (29.06.2017)

Rückschlüsse auf die Umgebung der Protonen ziehen.²⁹ Der Computer setzt aus den Messwerten ein Bild zusammen, auf dem die Struktur des Gehirns gut zu erkennen ist. Es lassen sich auch Gehirnaktivitäten verbildlichen. Somit ist es Ärzten und Wissenschaftlern möglich zu untersuchen, welche Gehirnareale bei bestimmten Tätigkeiten besonders aktiv sind.

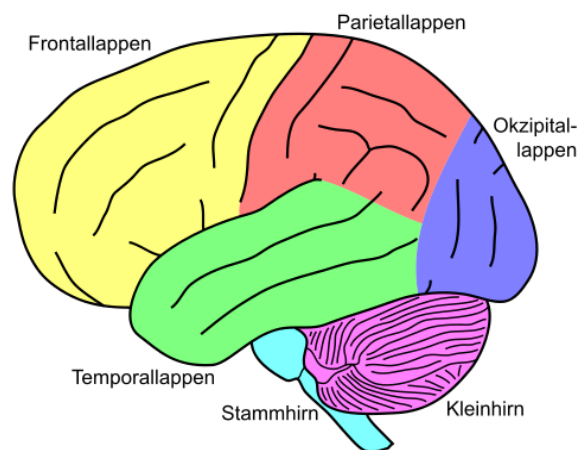


Abb. Q MRT-Bild eines menschlichen Gehirns (https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/36/MRI_head_side.jpg);

Abb. R Aufbau des Gehirns (<http://www.lernpsychologie.net/gehirn/aufbau-des-gehirns>)

Man unterteilt das Gehirn in 3 Bereiche: Großhirn, Kleinhirn, Hirnstamm und Zwischenhirn. Das Großhirn (Cerebrum) ist der größte Abschnitt. Es besteht wiederum aus zwei Hälften, die über den aus etwa 200 Millionen Axonen aufgebauten Corpus Callosum verbunden sind.³⁰ Auf beiden Seiten werden zusätzlich noch verschiedene Lappen voneinander unterschieden. Im Frontallappen befinden sich Zentren für Entscheidungsfindung, Planung und Kontrolle der Skelettmuskeln. Der Parietallappen ist für den Tastsinn von großer Bedeutung und der Okzipitallappen verarbeitet und kombiniert Bilder, um beispielsweise Objekte zu erkennen. Im Temporallappen befindet sich der auditive Cortex.

²⁹ <http://www.spektrum.de/lexikon/neurowissenschaft/kernspinresonanztomographie/6450> 24.06.2017

³⁰ <http://www.spektrum.de/lexikon/biologie/balken/6967>

Das Kleinhirn (Cerebellum) koordiniert Bewegungen und Gleichgewicht. Es wertet Informationen über die Position von Gelenken, Länge von Muskeln, auditive und visuelle Reize aus und ist so zum Beispiel für Hand-Auge Koordination zuständig.³¹

Nerven vom Rückenmark in das Gehirn führen durch den Hirnstamm. Lebenswichtige Körperfunktionen, wie zum Beispiel Atmung und Herzschlag, werden hier ebenfalls gesteuert.

Das Zwischenhirn ist die zentrale Sammelstelle für Sinnesinformationen, steuert ebenfalls Körperfunktionen und ist mit dem Hormonsystem verknüpft.³²

Am ZI wird Neuroimaging sowohl im angeschlossenen Klinikum, als auch von Forschungsgruppen genutzt. In der PEZ-Studie des psychoepidemiologischen Zentrums wird untersucht, welche Faktoren besonders entscheidend für die psychologische Gesundheit von Menschen sind. Hierzu werden die Umgebungsbedingungen, genetische und epigenetische Faktoren, Persönlichkeit der Probanden und Stressoren im Alltag betrachtet. Zufällig angeschriebene 7- bis 27-Jährige aus der Rhein-Neckar Region werden um ihre Teilnahme an der Studie gebeten.³³ Bevor sie zum MRT am ZI kommen, werden bereits viele Informationen über sie gesammelt. In einer App tragen die Probanden in der Woche vor der Messung ihre Stimmung ein. Psychologen führen einen Persönlichkeits- und einen Intelligenztest durch. Daten über Drogenkonsum, Wohnort auf dem Land oder in der Stadt, soziale Kontakte, Sportaktivitäten und besondere Lebensereignisse werden ebenfalls gesammelt. Es wird auch Blut abgenommen und mit einer Haarprobe können die Gene untersucht werden.

Während des MRT werden den Probanden dann verschiedene Aufgaben gestellt. Damit die Messungsergebnisse vergleichbar sind, werden sämtliche Durchsagen über die Lautsprecher einem Skript entsprechend vorgelesen. Es gibt zum Beispiel Gedächtnisaufgaben, bei denen Zahlen angezeigt werden und immer die vorherige Zahl eingetippt werden muss oder es werden Videos angezeigt und der Proband muss die Beziehung zwischen zwei Dreiecken analysieren.

Ausgewertet werden zu jedem Probanden 300 Variablen und seit 2014 haben schon über 300 Probanden an der Studie teilgenommen. Erste Ergebnisse liegen auch schon

³¹ Campbell Biology, S. 1114 - 1119

³² Biologie Oberstufe, Cornelsen, 2010, S. 434

³³ <https://www.zi-mannheim.de/forschung/forschungsverbuende/pez/studie0.html> 24.06.2017

vor. Menschen, die in der Stadt leben, leiden zum Beispiel häufiger an Angsterkrankungen und Depressionen.³⁴ Die Grundlagenforschung an Studienteilnehmern ist genauso Teil des Bench to Bedside Konzepts am ZI, wie die Untersuchung von in vitro hergestellten Neuronen.

³⁴ <https://www.swr.de/odyosso/stadt-oder-land-was-ist-gesuender-teil1/-/id=1046894/did=15920752/nid=1046894/bq3sio/index.html>

6. Forschungsfrage: Wie verändern sich Aufbau und Funktionsweise von Neuronen durch das Antidepressivum Escitalopram?

Um diese Frage zu beantworten wurden Neurone einmalig mit dem Antidepressivum Escitalopram behandelt und eine Woche später Aufnahmen von den Zellen gemacht. Zur gleichen Zeit wurden auch als Kontrollgruppe nicht behandelte Neuronen untersucht.

6.1 AIS Längenveränderung

Neben der synaptischen Veränderung durch homeostatic scaling (synaptische Plastizität), ist die Verschiebung des AIS auffällig. Wie in Abschnitt 5.2 beschrieben, kann sich die Länge eines Axonhügels verändern.³⁵ Das AIS ist durch eine sehr hohe Dichte von Na⁺-Kanälen charakterisiert und ist dadurch in der Lage ein AP auszulösen. Je länger der Axonhügel ist, desto mehr Na⁺-Kanäle sind vorhanden; je kürzer das AIS ist, desto weniger Na⁺-Kanäle. Das AIS, an welchem das Protein AnkyrinG vermehrt auftritt, ist in der untenstehenden Abbildung grün gefärbt. Es ist erkenntlich, dass das AIS sich durch eine Behandlung mit Escitalopram verlängert.

Wie auf dem Schaubild zu erkennen ist, sind die Axonhügel der behandelten Neurone deutlich länger. In der Kontrollgruppe reicht die gemessene Länge der AIS von circa 10 bis 40 μm . In der Escitalopramgruppe von etwa 15 bis 100 μm . Der Durchschnitt der jeweils 20 Messwerte beträgt bei der Kontrollgruppe etwa 25 μm , bei den behandelten Zellen ist das AIS durchschnittlich 35 μm lang. Jedoch ist auffällig, dass nur vereinzelt die AIS signifikant länger sind. Auf die Aussagekraft der Ergebnisse wird vermehrt im Abschnitt 6.4 eingegangen.

Es ist davon auszugehen, dass die Verlängerung des AIS durch eine erhöhte Neurotransmitterkonzentration im synaptischen Spalt ausgelöst wird. Escitalopram, ein SSRI, hemmt den Rücktransport von 5-HT in die präsynaptische Zelle. Resultierend ist eine verstärkte Aktivierung der ligandengesteuerten Ionenkanäle und damit eine erhöhte Reizweiterleitung. Wie genau die Längenveränderung mit der erhöhten NT-Konzentration

³⁵ Ders.

on zusammenhängen, ist noch nicht abschließend geklärt. In jedem Fall, wäre ein verlängertes AIS positiv zu Behandlung depressiver Menschen. Eine Depression wird durch eine zu geringe Reizweiterleitung der serotonergen Nervenzellen ausgelöst und das Ziel eines Antidepressivums ist es, diese Reizweiterleitung zu verstärken. Unseren Messergebnissen zufolge, verlängert ein Antidepressivum das AIS und führt somit zu einer verstärkten Reizweiterleitung; daher sind die im Schaubild 1 abgebildeten Messergebnisse positiv in Bezug auf die Wirkung von Escitalopram zu bewerten.

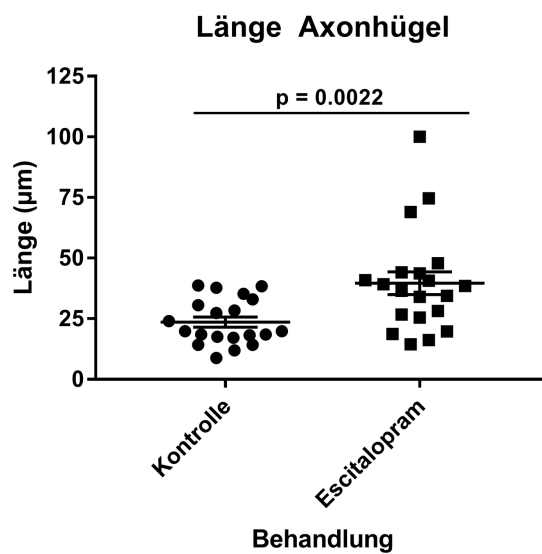


Schaubild 1
Abb. S Graph der Axonhügelänge

6.2 AIS Verschiebung

Im Rahmen der neuronalen Plastizität kann sich das AIS auch relativ zum Zellkörper verschieben. Die Verschiebung des AIS beeinflusst wie eine Verlängerung auch die Entstehung des Aktionspotenzials. Bei normalem Input ist das AIS am Axon etwa 10 - 30 μm vom Zellkörper entfernt. Gemessen wird der Abstand vom Ende des Somas bis zum Beginn des AIS. Während letzteres relativ genau zu bestimmen ist, ist der Übergang vom Soma zu Axon sehr fließend. Für diese Messung muss man den zwischen dem Einfluss auf serotonerge und nicht serotonerge Nerven unterteilen. Eine durch SSRIs ausgelöste erhöhte Konzentration von Serotonin im extrazellulären Raum, hat je nach Zelltyp unterschiedliche Auswirkungen.

Die theoretische Grundlage ist jedoch in beiden Fällen die gleiche: Das AIS verschiebt sich je nach Stärke des Reizes. Ist also die ankommende Depolarisation (von den Synapsen) sehr stark, wandert das AIS vom Soma weg. Ist der ankommende Reiz eher schwach, nähert sich der Axonhügel dem Soma an. Im Soma ist die Stärke des Reizes amplitudencodiert und die Amplitude nimmt im Laufe des Weges zum AIS stetig ab. Ist das AIS daher z.B. nach hinten gewandert, wird das eigentlich sehr starke Signal immer weiter abgeschwächt und kommt schwächer am AIS an.

Bei nicht serotonergen Neuronen, die z.B. Glutamat als Neurotransmitter verwenden, führt eine Behandlung mit Escitalopram zu einer Annäherung des AIS an das Soma von ca. 20 μm auf etwa 15 μm . Die Ursache dafür ist bis dato unbekannt; es könnte beispielsweise sein, dass Serotonin nicht serotonergen Nervenzellen hilft ein AP aufzubauen.

Bei serotonergen Neuronen besteht die bisher nicht nachgewiesene Theorie, dass eine Behandlung mit Antidepressiva zu einer Entfernung des AIS vom Soma führt. Durch ein SSRI wird die Konzentration an NT im synaptischen Spalt, und damit der Output, erhöht. Wie oben beschrieben, führt ein erhöhter Input zu einer Entfernung des AIS vom Soma. Dies stellt eine Gegenreaktion auf die medikamentöse Behandlung von Depres-

sionen mit SSRIs da. Im Grundsatz findet hier der in Kapitel 5.2 beschriebene Kreislauf statt, nur die Konzentration an NT wird immer wieder erhöht, sodass die Reizweiterleitung nicht allzu stark abfallen kann. ³⁶

6.3 Veränderung der Synaptische Aktivität

Neben dem Schwerpunktthema Axonhügel wurden auch Messungen zur Aktivität der Präsynapse durchgeführt. Die synaptische Aktivität beschreibt die Menge an Neurotransmission an einer Synapse. Für die Messung der synaptischen Aktivität werden die Vesikel durch Endozytose befüllt. Dort, wo sich eine aktive Synapse befindet, ist eine starke Färbung zu sehen, da sich hier viele mit Vesikelfarbstoff befüllte Vesikel befinden. Eine Struktur der Synapse lässt sich jedoch trotz Färbung der CAZ und PSD nicht erkennen, da die Auflösung des Lasermikroskops zu gering ist.

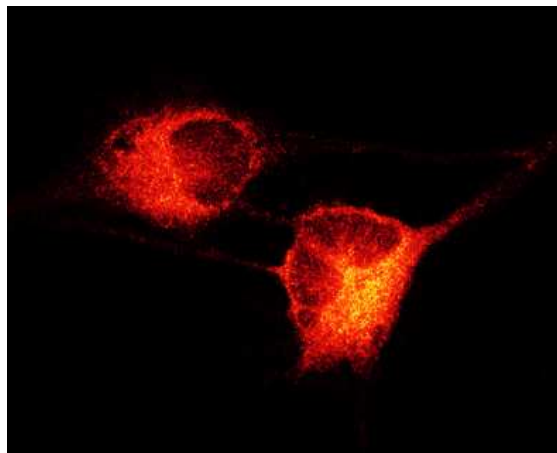


Abb. T Präsynapsenfärbung von zwei Neuronen eigene Aufnahme

Je nach Wellenlänge, die von dem Farbstoff abhängig ist, beträgt der minimale Abstand von zwei Punkten, die unterschieden werden können, $250\ \mu\text{m}$ bis $350\ \mu\text{m}$. Der synaptische Spalt ist jedoch nur $10\ \mu\text{m}$ breit, sodass Prä- und Postsynapse als ein Punkt erscheinen. Mittels ImageJ ³⁷, einem Bildauswertungsprogramm, lassen sich nun die Synapsen aus einer Zelle zählen und die Messwerte von normalen Zellen und Zellen, die mit Escitalopram behandelt wurden, vergleichen. Bei der automatischen Zählung von Synapsen müssen zuvor einige Werte eingestellt werden. Da dies nicht absolut

³⁶ Grubb et al. [file:///C:/Users/mm/AppData/Local/Temp/NIHMS36773-supplement-Suppl_Figs___Tables.pdf, 02.07.2016]

³⁷ ImageJ finden Sie unter diesem Link: <https://fiji.sc/>

eindeutig ist, haben 2 verschiedene Personen die Ergebnisse ausgewertet (Auswertung 1+2). Bei beiden Auswertungen wird sichtbar, dass es bei unbehandelten Nervenzellen

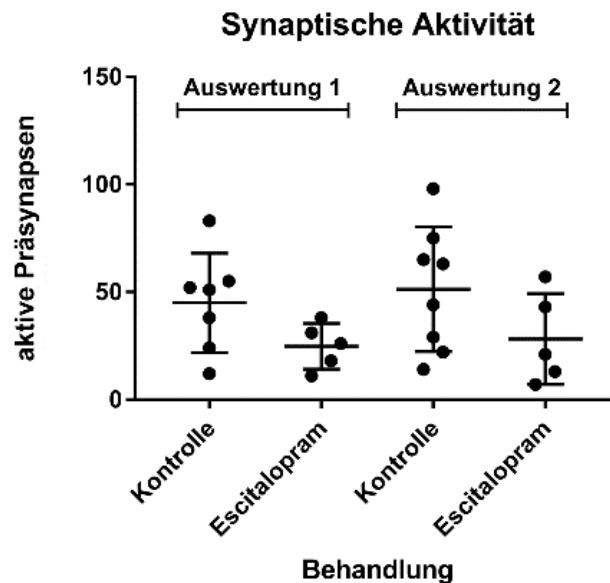


Abb. U Synaptische Aktivität

deutlich mehr aktive Präsynapsen gibt, als bei behandelten Proben. Hier lassen sich ca. 45 aktive präsynaptische Strukturen auf einer Zelle nachweisen, wohingegen die behandelten Zellen nur etwa 20 aktive Synapsen aufweisen. Ursache dafür ist, dass das Serotonin in der Präsynapse verbleibt, sodass die präsynaptische Zelle durch 5-HAT-Rezeptoren „stummgeschaltet“ wird und die Präsynapse nicht weiterarbeitet. Dennoch ist die Postsynapse aktiv, da die ligandengesteuerten Ionenkanäle aufgrund der hohen Neurotransmitterkonzentration weiter aktiviert bleiben.

6.4 Diskussion

Beurteilung

Zur Untersuchung der Auswirkung von Escitalopram wurde nur einmal eine Gruppe von Neuronen behandelt. Auf Grund der geringen Anzahl an untersuchten Neuronen ist das Ergebnis also nur wenig aussagekräftig. Um die Aussagekraft der AIS Längenmessung zu überprüfen, wurde der sogenannte P-Wert berechnet. Er gibt in diesem Fall an, wie wahrscheinlich das erhaltene Ergebnis wäre, wenn Escitalopram keine Auswirkung auf

die Neurone hätte.³⁸ Diese Wahrscheinlichkeit beträgt 0,22 %. Somit ist das Ergebnis statistisch signifikant. Im P-Wert ist allerdings nicht die Möglichkeit von Messfehlern einberechnet, durch die die Ergebnisse zusätzlich beeinflusst sein könnten. In Bezug auf die synaptische Aktivität wurde durch die zweimalige Auswertung der Bilddaten zumindest eine Reproduzierbarkeit der Auswertung sichergestellt.

Da aber selbst ein weniger deutlich ausfallendes Ergebnis, wenn es in weiteren Experimenten bestätigt werden könnte, durchaus interessant wäre, lohnt sich eine weitere Betrachtung der Fragestellung.

Ausblick

Die Forschungsgruppe rund um Thorsten Lau wird sich daher in Zukunft noch weiter mit diesem Thema auseinandersetzen. Sie planen die Veröffentlichung weiterer Ergebnisse Ende dieses Jahres.

³⁸ vgl. <https://en.wikipedia.org/wiki/P-value> (01.07.2017)

7. Danksagung

Das Kooperationsprojekt war für uns alle eine sehr spannende Erfahrung und wir haben in den letzten Monaten viel über wissenschaftliche Arbeitsweisen und über unser Forschungsgebiet gelernt. Hierfür möchten wir Thorsten Lau vom ZI danken. Auch Gabriela Gan danken wir für den interessanten Einblick, den wir in ihre Forschungsarbeit erhalten konnten. Für die jahrelange Unterstützung durch das Ehepaar Hector, die Hectorstiftung und unsere engagierten Kursleiter Herrn Raqué und Herrn Gölz möchten wir uns ebenfalls herzlich bedanken.

8. Quellenverzeichnis

1. www.zi-mannheim.de (21.09.2017)
2. Campbell Biology International Edition, 2011: 1092.
3. Spektrum Verlag, 6.06.2017, <http://www.spektrum.de/lexikon/neurowissenschaft/gliazellen/4781>
4. Silbernagel S, Despopoulos A. dtv-Atlas der Physiologie: Tafeln und Texte zu den Funktionen des menschlichen Körpers. Dritte Aufl. New York: Deutscher Taschenbuch Verlag; 1988: 22 – 58
5. Kühnel W. Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie. Zehnte Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 1999: 176 – 195
6. Bühlmann A, Froesch E. Pathophysiologie. Fünfte Auflage. Zürich: Springer Verlag; 1989: 462 – 492
7. Löffler G, Petrides P. Biochemie & Pathobiochemie. Siebte Aufl. Heidelberg: Springer Medizin Verlag; 2003: 1054 – 1076
8. Curran R. Colour Atlas of Histopathology. Dritte Aufl. Oxford: Oxford University Press; 1985: 152 – 167
9. Neundörfer B, Schneider E, Dittmann V, Pödingner W. Atlas der Nervenheilkunde: Neurologie und Psychiatrie in Bild und Wort. Erste Aufl. Karlsruhe: G. Braun Fachverlage; 1996: 318 – 321
10. Zeek A, Grond S, Papastravrou I, Zeeck S. Chemie für Mediziner. Siebte Aufl. München: Urban & Fischer; 2010: 70, 298
11. Ackermann F, Waites C, Garner C. Presynaptic active zones in invertebrates and vertebrates. EMBO Rep. 2015 Aug;16(8): 923-38. doi: 10.15252/embr.201540434. Epub 2015 Jul 9. Review. PubMed PMID: 26160654; PubMed Central PMCID: PMC4552486.
12. Lau T, Proissl V, Ziegler J, Schloss P. Visualization of neurotransmitter uptake and release in serotonergic neurons. J Neurosci Methods. 2015 Feb 15;241:10-7. doi: 10.1016/j.jneumeth.2014.12.009. Epub 2014 Dec 18. PubMed PMID: 25528111.
13. Seidenbecher, Constanze (2014): Neurochemie & Molekularbiologie, Chemische Synapsen (AG Gundelfinger). [http://www.ifn-magdeburg.de/de/abteilungen/neurochemie_molekularbiologie/ag_gundelfinger/index.jsp, 29.06.2017]
14. Unbekannt (2005): Serotonin. [<http://flexikon.doccheck.com/de/Serotonin>, 29.06.2017]
15. Unbekannt (2016): Fachinformation [<https://www.fachinfo.de/pdf/005936>, 29.06.2017]
16. Unbekannt (k.A.): Lexikon der Neurowissenschaften, Neurotransmitter [<http://www.spektrum.de/lexikon/neurowissenschaft/neurotransmitter/8752>, 29.06.2017]
17. Campbell Biology International Edition (2016): S. 1114 - 1119
18. Biologie Oberstufe, Cornelsen, 2010, S. 434
19. Krollner, Björn (k.A.): F30-F39 Affektive Störungen. [<http://www.icd-code.de/icd/code/F32.2.html>, 29.06.2017]

20. Welk, Patricia (k.A.): Forschungsbereiche der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie. [<https://psychiatrie-psychotherapie.charite.de/forschung/>, 29.06.2017]
21. Unbekannt (k.A.): Drugscout. [<http://drugscouts.de/>, 29.06.2017]
22. Unbekannt (2013): Escitalopram. [<http://www.onmeda.de/Wirkstoffe/Escitalopram.html>, 29.06.2017]
23. Koole, Maarten (2008): Action potential generation requires a high sodium channel density in the axon initial segment: [<http://www.nature.com/neuro/journal/v11/n2/abs/nn2040.html>, 29.06.2017]
24. Thase, Michael (2001): Remission rates during treatment with venlafaxine or selective serotonin reuptake inhibitors. [<http://bjp.rcpsych.org/content/178/3/234.full>, 29.06.2017]
25. Burrone, Juan (2010): Activity-dependent relocation of the axon initial segment fine-tunes neuronal excitability. [<http://www.nature.com/nature/journal/v465/n7301/abs/nature09160.html>, 29.06.2017]
26. Bähr, Mattias (2015): Neuroforum 3.08. [<http://docplayer.org/37618717-Cytomatix-der-praesynaptischen-aktiven-zone-molekulare-organisation-und-funktion.html>, 29.07.2017]
27. Grubb, Burrone (2011): Activity-dependent relocation of the axon initial segment fine-tunes neuronal excitability [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3196626/>, 02.07.2017]
28. Grubb, Burrone (2011): Supplementary Figures [file:///C:/Users/mm/AppData/Local/Temp/NIHM-S36773-supplement-Suppl_Figs___Tables.pdf, 02.07.2016]
29. Unbekannt (01.07.2017): Wikipedia:<https://en.wikipedia.org/wiki/P-value>
- 30.

Bildquellen

- Logo ZI Mannheim: <https://www.zi-mannheim.de/fileadmin/templates/zi/images/zi-logo.png> (24.06.17)
- Abb. A: <https://www.dasgehirn.info/entdecken/kommunikation-der-zellen/aufbau-eines-neurons-2907> (14.06.2017)
- Abb. B: <http://www.biologie-schule.de/ruhepotential.php>
- Abb. C: <http://www.u-helmich.de/bio/neu/1/12/121/1218-lonenkanaele.html>:
- Abb. D: <http://www.medizin-kompakt.de/aktionspotenzial>
- Abb. E: <http://www.bioboard.de/topic,4748,-saltatorische-und-kontinuierliche-erregungsleitung.html>
- Abb. F: http://dsmorus.cl/Der_GIBerater/einheit10.htm
- Abb. G: <http://slideplayer.com/slide/4879074/>
- Abb. H: <http://bio1152.nicerweb.com/Locked/media/ch48/summation.html>
- Abb. I: [https://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Serotonin_\(5-HT\).svg](https://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Serotonin_(5-HT).svg)
- Abb. K: https://online.science.psu.edu/bisc004_activewd001/node/1907
- Abb. L: <https://www.bioinf.uni-leipzig.de/Leere/PRAKTIKUM/Protokolle/SS04/1/einfuehrung.html>
- Abb. N: https://forschungsinfrastruktur.bmfw.gv.at/de/fi/konfokalsystem-leica-tcs-sp5-ii-leica_1931

Abb. P: <https://de.wikipedia.org/wiki/Escitalopram>

Abb. Q: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/36/MRI_head_side.jpg

Abb. R: <http://www.lernpsychologie.net/gehirn/aufbau-des-gehirns>

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichern wir, dass wir diese Arbeit unter der Beratung durch Herrn Lau und Herrn Raqué selbstständig verfasst haben und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt wurden, sowie Zitate kenntlich gemacht wurden.

20.09.2017

Wiona Glänzer *Louisa Lalla* *L. Gedrus*