

Jochen Hans Weishaupt
Dr. med.

Untersuchung der neuronalen Glutamatrezeptorexpression im Rattenhirn während der physiologischen Entwicklung und nach Sauerstoff-Glukose-Deprivation

Geboren am 31.12.1971

Reifeprüfung am 24.6.1991

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1992 bis WS 1998/99

Physikum am 25.3.1994 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in Tübingen

Staatsexamen am 19.5.1999 an der Universität Tübingen

Promotionsfach: Biochemie

Doktormutter: Frau Prof. Dr. med. Hannah Monyer

Glutamatrezeptoren wirken als Bindungsstellen für den häufigsten erregenden Transmitter im zentralen Nervensystem und spielen vermutlich für neuronale Plastizität unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen eine wichtige Rolle. Innerhalb der letzten Jahre konnten die Gene dieser Moleküle kloniert werden. Dabei stellte sich heraus, daß Glutamatrezeptoren aus mehreren Untereinheiten zusammengebaute Komplexe sind.

In dieser Arbeit wurden die Expression und Funktion von NMDAR-beziehungsweise AMPAR-Untereinheiten untersucht. Dabei wurde deren Rolle bei der Ausbildung synaptischer Plastizität unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen auf der Ebene einzelner Zellen untersucht.

Für diese Untersuchungen wurde eine NMDAR-Einzelzell-PCR entwickelt, die im Gegensatz zu den bisherigen NMDAR-Einzelzell-Techniken eine genaue Quantifizierung der Anteile verschiedener NR2-Untereinheiten am Aufbau der Rezeptoren ermöglicht. Diese Methode ist wenig störanfällig und benötigt im Vergleich zu anderen, zum Beispiel für die Analyse der AMPAR-Expression bisher verwendeten quantitativen Einzelzell-Methoden, einen wesentlich geringeren Aufwand an Zeit und Personal. Sie wurde deshalb schließlich auch für die Messung der AMPAR-Expression verwendet und ermöglichte erst die große Zahl der Neurone, die für diese Arbeit untersucht wurden.

Mit dieser quantitativen Einzelzell-PCR konnte nachgewiesen werden, daß sich erregende Neurone im Hippocampus durch eine fehlende NR2D-Expression von

hemmenden Interneuronen unterscheiden. Eine Korrelation mit der NMDAR-Funktion gelang zunächst nicht, vermutlich da die NR2A-Untereinheit in fast jedem untersuchten Neuron gefunden wurde und, wie sich im Verlauf dieser Arbeit zeigte, einen dominanten Einfluß auf die Kinetik der NMDAR-Komplexe hat.

Im somatosensorischen Kortex zeigte sich eine deutliche Entwicklungsabhängigkeit der NMDAR-Expression, insbesondere ein Anstieg des NR2A-Gehaltes, der stark mit einer Verkürzung des NMDA-EPSC, und damit auch mit einer verminderten Fähigkeit des NMDAR als Koinzidenzdetektor zu wirken, korreliert war. Bei Einzelzellanalyse ergab sich, daß die Expression der NR2A-Untereinheit für diese Veränderung der NMDAR-Kinetik verantwortlich war, was in Übereinstimmung steht mit Ergebnissen, die durch rekombinante Expression von NMDAR gewonnen worden waren. Nur durch die Quantifizierbarkeit der NMDAR-Einzelzell-PCR konnte nachgewiesen werden, daß NR2A im somatosensorischen Kortex in nichtlinearer Weise auf die Rezeptorfunktion wirkt und bereits eine geringe Expression für einen maximalen Effekt ausreichend ist.

Im visuellen Kortex wurde ebenfalls eine entwicklungskorrelierte Expression von NMDAR nachgewiesen, die sich von derjenigen im somatosensorischen Kortex lediglich durch die vorübergehende Expression von NR2C unterschied. Diese molekularen Daten erklären sehr gut die bekannten Veränderungen der NMDAR-Kinetik im visuellen Kortex und in anderen Hirnteilen während der Entwicklung. Zusätzlich konnte durch Dunkelaufzucht der Ratten eine starke Umweltabhängigkeit der NMDAR-Expression nachgewiesen werden, welche wiederum stark mit der Aktivitätsabhängigkeit des NMDAR-EPSC im visuellen Kortex zusammenfällt. NR2A war im visuellen Kortex stärker und in einer größeren Bandbreite exprimiert als im somatosensorischen Kortex. Zusammen mit der Beobachtung einer mehr graduellen Veränderung der Rezeptorkinetik in jenem Hirnteil spricht dies dafür, daß NR2A dort mehr quantitativ wirkt. Neben verschiedenen anderen Mechanismen, die eine solche Veränderung der NR2A-Wirkung in verschiedenen Hirnteilen auslösen könnten, kommt ein verändertes Spleißen der NR1-Untereinheit in Betracht.

Die gemessenen Veränderungen der NMDAR-Expression und -Funktion sowie deren Aktivitätsabhängigkeit korrelieren zeitlich genau mit anderen Formen neuronaler Plastizität wie LTP oder der Ausbildung okularer Dominanz im visuellen Kortex. Die Art der molekularen und funktionellen NMDAR-Veränderungen durch die Entwicklung hindurch zusammen mit den spezifischen Eigenschaften dieser Rezeptoren können den beobachteten Rückgang der Formbarkeit neuronaler Funktion gut erklären und sind ein weiterer Beleg für die Wichtigkeit von NMDAR für synaptische Plastizität.

Eine weitere Untersuchung beschäftigte sich mit der Rolle von Glutamaterezeptoren unter pathophysiologischen Bedingungen, besonders mit der Frage, ob früher postulierte Veränderungen der Expression einzelner AMPAR-

Untereinheiten durch einen verstärkt wirkenden erregungstoxischen Mechanismus für den neuronalen Zelltod nach Ischämie verantwortlich sind. Nach Sauerstoff-Glukose-Deprivation von hippocampalen Primärzellkulturen, einem In-Vitro-Ischämie-Modell, zeigte sich ein starker Anstieg der GluRD-Expression in Neuronen. Gleichzeitig ergab sich eine verminderte GluRB-Expression in denjenigen Nervenzellen, welche GluRD enthielten. Beide Veränderungen, zusammen mit dem ebenfalls gemessenen Unterschied der Spleißaktivität, könnten mit dafür verantwortlich sein, daß unter dieser Bedingung ein vermehrter AMPA- und kainataktivierter Kalziumeinstrom festgestellt wurde. Dieser wiederum dürfte zumindest teilweise für den ebenfalls beobachteten vermehrten Zelluntergang nach Kainatexposition verantwortlich sein. Gleichzeitig bestätigte sich, daß Kainat/AMPA- und NMDA-Toxizität teilweise unterschiedliche Mechanismen darstellen, da letztere im gleichen Fall vermindert war.