

Neurobiologie

Hochauflösende Mikroskopie im Gehirn

Denk, Winfried; Euler, Thomas; Friedrich, Rainer

Max-Planck-Institut für medizinische Forschung, Heidelberg

Abteilung - Biomedizinische Optik

Korrespondierender Autor: Denk, Winfried

E-Mail: Winfried.Denk@mpimf-heidelberg.mpg.de

Zusammenfassung

Ziel der Abteilung "Biomedizinische Optik" im MPI für medizinische Forschung ist es, neue Methoden zu entwickeln, um die Rechengänge im Gehirn besser zu verstehen. Dabei ergeben sich zwei wichtige Stoßrichtungen: die Messung der Aktivität und die Rekonstruktion der *Schaltkreise*. Der schnelle Informationsfluss im Gehirn erfolgt im Wesentlichen über die Nervenaufläufer, Axone genannt, in denen sich eine elektrochemische Erregung aktiv fortpflanzen kann. Entlang dieser Axone befinden sich in mehr oder weniger regelmäßigen Abständen spezielle zellbiologische Strukturen, die in der Lage sind, auf chemischem oder elektrischem Weg Verbindungen zu benachbarten Auswüchsen (Dendriten) von anderen Nervenzellen herzustellen und damit Information auf diese Zellen zu übertragen. Diese als "Synapsen" bezeichneten Verbindungen zwischen den Zellen sind höchstwahrscheinlich einer der Orte, wo Information dauerhaft gespeichert wird (das Langzeitgedächtnis). Um jedoch zu verstehen, was sich zum Beispiel bei der Erkennung eines Gesichts oder eines Geruchs oder auch nur bei der Wahrnehmung einer Bewegung wirklich abspielt, ist es nötig zu wissen, wie zum einen die elektrische und chemische Aktivität bis hinein in die feinsten Verästelungen verteilt ist und wie zum anderen das Netzwerk der Verbindungen geknüpft ist, durch das sich diese Aktivitäten wiederum gegenseitig bedingen.

Abstract

The goal of the Department for "Biomedical Optics" is the development of novel methods to better understand computation in the brain. There are two main lines of attack: measuring activity and reconstructing circuits. Fast information transmission in the brain is mediated mainly by neuronal processes, called axons, only which electrochemical excitation actively propagates. Along those axons we find in a more or less regular pattern special cellular organelles, which are able to connect, by chemical or electrical means, to neighboring neuronal processes (dendrites) and thus allow the transmission of information to those cells. Those connections, called synapses, are most likely where information is permanently stored (long-term memory). To understand, however, what actually happens when a face or a smell is recognized, it is necessary to know, on one hand, what is the spatial distribution of chemical and electrical activity down to the finest branches. On the other hand, we need to know how the network of connections, which makes activities in different areas dependent on each other, is arranged.

-
-
-

Methoden zur hochauflösenden Aktivitätsmessung im lebenden Gehirn

Bei der Aktivitätsmessung im lebenden Gehirn müssen zum einen Aktivitätssensoren in das Gehirn eingebracht werden, zum anderen muss Bildinformation aus der Tiefe des Gewebes gewonnen werden. Traditionell wurden Aktivitätssensoren in Form von fluoreszierenden Kalziumsensoren eingebracht, wobei das intrazelluläre elektrische Potenzial oft mithilfe der Patch-clamp-Technik abgeleitet wurde. Da dies nur das Füllen einzelner Neuronen mit Farbstoff erlaubt, haben Mazahir Hasan und Winfried Denk in Zusammenarbeit mit weiteren Wissenschaftlern innerhalb und außerhalb des Instituts mit molekulargenetischen Methoden transgene Mäuse erzeugt, die durch ein Genkontrollsystem die Produktion des Indikators auf bestimmte Klassen von Neuronen beschränkt [1]. Weiter erproben die Wissenschaftler den Einsatz von am MPI für Biochemie neu entwickelten Membranfarbstoffen zur Messung der zellulären Spannung (*Bernd Kuhn, Winfried Denk*).

Die Wissenschaftler verwenden dabei die so genannte Multiquanten-Mikroskopie, die in streuendem Gewebe noch eine hochauflösende Abbildung ermöglicht. Der Einsatz spezieller Laser schafft dabei Eindringtiefen bis zu einem Millimeter, was der gesamten Dicke der Großhirnrinde in der Maus entspricht (*Patrick Theer, Winfried Denk, Abb. 1*), [2]. Dabei sollen auch optische Korrekturverfahren (adaptive Optik) benutzt werden, um Verzerrungen der Abbildung durch das Gewebe auszugleichen, ähnlich wie in der Astronomie Störungen durch die Atmosphäre ausgeglichen werden (*Marcus Feuerabend, Markus Rückel, Winfried Denk*).

Entschlüsselung neuronaler Schaltkreise

Im Gehirn, wie in einem Computer, ist das Verbindungsmuster der Schaltelemente funktionsbestimmend. Da die dünnsten "Drähte", zum Beispiel neuronale Fortsätze, weniger als 100 Nanometer im Durchmesser sind, verwenden die Forscher die Elektronenmikroskopie. Weil jedes einzelne Bild nur ein zweidimensionaler Querschnitt ist, die neuronalen Verbindungen aber ein dreidimensionales Geflecht bilden, haben sie eine automatisierte Serienschnitt-Technik entwickelt. Damit können Fragen der Netzwerkstruktur untersucht werden, beispielsweise wie die Verdrahtung in der Netzhaut (Retina) zum Bewegungsehen beiträgt oder wie die Verschaltungen in der Gehirnrinde aufgebaut sind.

Signalverarbeitung in der Netzhaut

Das Wahrnehmen von Bewegung und Bewegungsrichtung ist von zentraler Bedeutung für die Überlebensfähigkeit von Tieren [3]. Dieser Prozess ist in vielen, vielleicht allen Wirbeltieren in der Netzhaut angeordnet. Allerdings ist der neuronale Mechanismus immer noch nicht vollständig verstanden. Dies liegt unter anderem daran, dass die Messung von neuronaler Aktivität gerade in der Netzhaut sehr schwierig ist, da manche der bewährten elektrischen und optischen Verfahren nicht anwendbar sind. Auf der anderen Seite sind aber in der Netzhaut, wie sich gezeigt hat, die einzelnen zellulären Fortsätze unabhängige "Prozessoren" von Information und müssen daher einzeln untersucht werden [4]. Durch die Kleinheit dieser Fortsätze (Dendriten) scheiden elektro-physiologische Methoden zur Messung der Aktivität aus. Auch traditionelle optische Verfahren können nicht eingesetzt werden, da die Retina mit Lichtreizen stimuliert werden muss, um die Bewegungswahrnehmung zu untersuchen. Die Heidelberger Gruppe um Winfried Denk verwendet deshalb die mit infrarotem (Wellenlänge 920 nm) und daher unsichtbarem Licht betriebene Doppelquanten-Mikroskopie und misst mithilfe von Fluoreszenzindikatoren die Kalziumsignale, die von verschiedenen Lichtreizen in den Dendriten ausgelöst werden. Dies erlaubt es nun, das volle Potenzial der Netzhaut als Modellsystem für die neuronale Verarbeitung auszunutzen. Messungen in den Dendriten einer Zwischenverarbeitungszelle,

die eine besonders charakteristische Form aufweist (**Abb. 2**), haben gezeigt: Das Kalziumsignal ist in der Tat abhängig von der Bewegungsrichtung des auf die Netzhaut projizierten Lichtmusters, obwohl das vom Zellkörper aufgezeichnete elektrische Signal diese Information nicht enthält [5]. Weitere Messungen, die optische, elektrische und pharmakologische Methoden kombinieren, sind nötig, um den zugrunde liegenden molekularen Mechanismus zu enträtseln (*Susanne Hausselt, Winfried Denk, Thomas Euler, in Kooperation mit Peter Detwiler, Univ. Washington*). Der Fluss der Bewegungsinformation zu den Ganglienzellen, deren Axone den optischen Nerv bilden, erfordert ein ganz spezifisches Verdrahtungsmuster, das die Wissenschaftler mit der automatisierten Serienschichtrekonstruktion untersuchen werden.

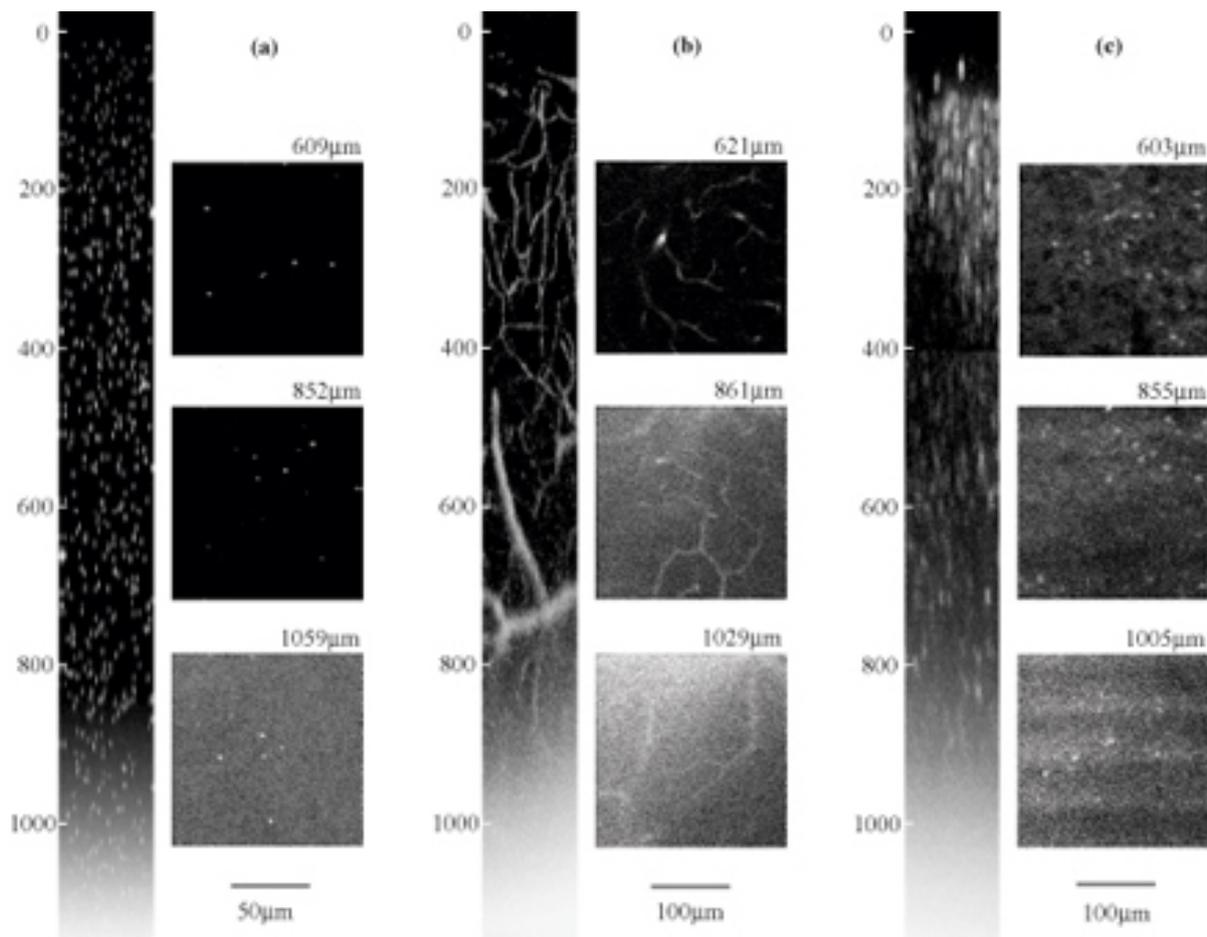


Abb. 1 : Gezeigt ist die Eindringtiefe eines mit einem regenerativen Laserverstärker betriebenen Doppelquanten-Mikroskops. Testproben mit gehirnnähnlichen Streueigenschaften (a), in Mäusegehirnen mit gefärbtem Blutplasma (b) und mit Zellen, die ein fluoreszierendes Protein herstellen (c). Man sieht, dass diese neue Technik es erlaubt, noch wesentlich weiter ins Gehirn einzudringen.

Bild : Bild aus *Optics Letters*, siehe [2]

Ein weiteres ungelöstes Problem retinaler Informationsverarbeitung ist die Vorzeichenumkehr (das heißt ein erregendes wird in ein hemmendes Signal verwandelt und umgekehrt) der so genannten lateralen Hemmung, mit deren Hilfe die Netzhaut in der Lage ist, auch schwache Helligkeitsunterschiede benachbarter Bildbereiche noch zuverlässig zu signalisieren. Auch hier erweist sich das Zwei-Photonenmikroskop als wichtiges Hilfsmittel, in diesem Fall in Verbindung mit molekularen Sensoren für die Chloridionen-Konzentration. Diese Sensoren, welche durch molekulare Genetik in spezielle

Zelltypen eines Mäusestamms eingeschleust wurden, beruhen auf einer Modifikation eines ursprünglich aus der Qualle isolierten grün fluoreszierenden Eiweißmoleküls. Die Konzentration der Chloridionen ist deshalb so interessant, weil sie das Vorzeichen der den Botenstoff GABA (Gamma-Amino-Buttersäure) oder Glyzin benutzenden Synapsen bestimmt. Dabei kann es sogar vorkommen, dass der gleiche Synapsentyp an einer Stelle der Zelle erregend und an einer anderen hemmend wirkt. Es ist daher sehr wichtig, Ionengradienten mit hoher räumlicher Auflösung zu messen [6] (*Jens Dübel, Thomas Euler, Thomas Kuner*).

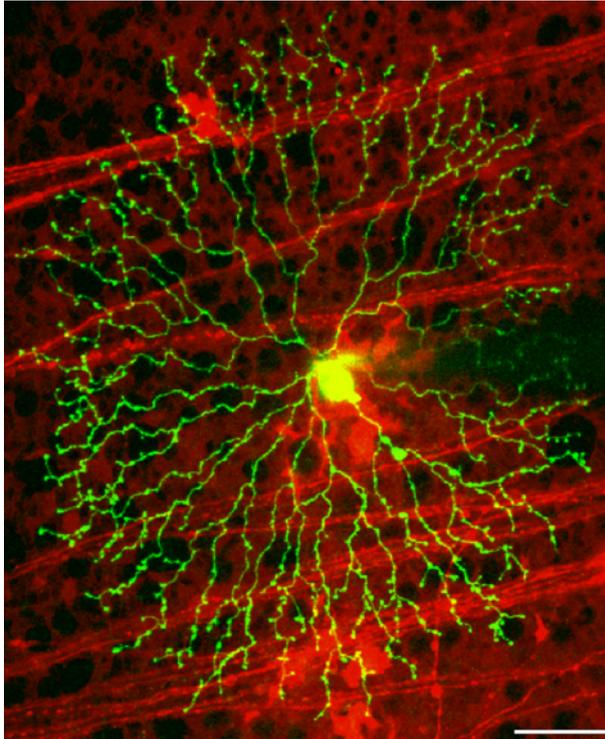


Abb. 2 : Zwei-Photonen-Fluoreszenzbild einer mit dem Kalziumindikator Oregon-Green-Bapta-1 (grün) gefüllten Starburst-Amakrinzelle, aufgenommen in einer intakten Netzhaut. Rot dargestellt ist das Sulforhodamin, ein zur Darstellung der Netzhautstruktur eingesetzter künstlicher Farbstoff.

Bild : Max-Planck-Institut für medizinische Forschung/Hausselt

Funktion und Entwicklung neuronaler Schaltkreise im Riechhirn

Das Gehirn von Wirbeltieren besteht aus einer Vielzahl von Nervenzellen (circa 10^{10} beim Menschen), die untereinander durch synaptische Verbindungen zu Schaltkreisen verknüpft sind. Jedes dieser Neurone hat komplexe biophysikalische Eigenschaften, die verschiedenen Neuronentypen spezifische Rechenleistungen verleihen. Auf der Ebene des Schaltkreises entstehen durch Vernetzung von Neuronen weitere Rechenleistungen, die für die Funktion des Gehirns von entscheidender Bedeutung sein dürften, zur Zeit aber noch weitgehend unverstanden sind. Bereits Systeme mit sehr wenigen Neuronen besitzen eine riesige Zahl von Freiheitsgraden, sodass Eigenschaften neuronaler Schaltkreise kaum aus den Eigenschaften einzelner Neurone abgeleitet werden können. Die Arbeitsgruppe von Rainer Friedrich untersucht daher die Funktion von intakten neuronalen Schaltkreisen direkt und unter möglichst natürlichen Bedingungen.

Um die Funktion neuronaler Schaltkreise zu untersuchen, müssen experimentelle Ansätze auf mehreren Ebenen, vom Molekül bis zum Verhalten, integriert werden. Eine entscheidende technische Schwierigkeit besteht darin, die elektrische und biochemische Aktivität vieler einzelner Neurone gleichzeitig zu messen. Zu diesem Zweck werden elektrophysiologische, optische und molekulargenetische Methoden kombiniert. Mithilfe der Multiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie werden beispielsweise Aktivitätsmuster von hunderten von Neuronen gleichzeitig aufgezeichnet.

Die Wissenschaftler untersuchen neuronale Schaltkreise im Riechhirn (*Bulbus olfactorius*) von zwei Modellorganismen der biomedizinischen Forschung, dem Zebrafisch und der Maus. Der Zebrafisch bietet den Vorteil, dass die Zahl der Neuronen wesentlich geringer ist, sodass ein größerer Teil der Neuronen eines Schaltkreises untersucht werden kann als bei der Maus. In beiden Organismen ist das Riechhirn jedoch ähnlich aufgebaut und erhält sensorische Information von Rezeptorneuronen aus der Nase, deren Axone in diskreten Strukturen (olfaktorische Glomeruli) enden. Die Zahl der Glomeruli beträgt etwa 200 im Zebrafisch und 2000 in der Maus. Obwohl jeder Glomerulus Signale von bis zu 10000 Rezeptorneuronen erhält, können die sensorischen Eingänge eines Glomerulus als funktionelle Einheit betrachtet werden: Alle Zellen benutzen den gleichen Geruchsrezeptor und reagieren einheitlich auf Geruchsreize [7]. Jeder Geruchsreiz aktiviert mehrere Typen von Rezeptorneuronen, sodass ein Geruch durch ein Muster glomerulärer Aktivität repräsentiert ist.

In den Glomeruli gehen Rezeptorneurone synaptische Verbindungen mit "Mitralzellen" ein, die nicht nur Information an höhere Gehirnareale weitergeben, sondern auch zusammen mit inhibitorischen Interneuronen ein komplexes Netzwerk bilden. In den letzten Jahren haben wir untersucht, wie geruchsspezifische Muster glomerulärer Eingangsaktivität von diesen Schaltkreisen verarbeitet werden. Mitralzellaktivität zeichnet sich durch Dynamik auf verschiedenen Zeitskalen aus (**Abb. 3A**), die durch Interaktionen mit inhibitorischen Interneuronen entstehen. Über einige hundert Millisekunden nach Beginn eines Geruchsstimulus ändert sich das Mitralzellaktivitätsmuster drastisch. Während dieser Phase werden Aktivitätsmuster ähnlicher Geruchsstoffe, die anfangs stark überlappen, zunehmend unähnlicher (Dekorrelation). Schaltkreise im Riechhirn verstärken daher kleine Unterschiede in den glomerulären Aktivitätsmustern ähnlicher Geruchsstoffe und erhöhen die Unterscheidbarkeit von Geruchsrepräsentationen [8].

Durch Netzwerkinteraktionen im Riechhirn werden Aktionspotenziale eines geruchsstoffspezifischen Teils der Mitralzellen rhythmisch synchronisiert. Die Funktion dieser Synchronisation ist noch unklar, obwohl ähnliche oszillatorische Aktivität in vielen Hirnregionen seit langem bekannt ist. Im Zebrafisch haben Christopher Habermann, Rico Tabor, Emre Yaksi und Rainer Friedrich herausgefunden, dass synchronisierte und nicht-synchronisierte Aktionspotenziale Information über komplementäre Eigenschaften von Geruchsstimuli tragen. Die oszillatorische Struktur in Mitralzellaktivitätsmustern ermöglicht damit die gleichzeitige Codierung ("Multiplexing") verschiedenartiger Information [9]. Neurone in höheren Gehirnregionen könnten durch Analyse mit unterschiedlicher Zeitauflösung aus diesen Aktivitätsmustern Information über verschiedene Geruchseigenschaften extrahieren.

Derzeit untersuchen Martin Wiechert und Rainer Friedrich die biophysikalischen Grundlagen der dynamischen Verrechnungen in olfaktorischen Schaltkreisen und entwickeln ein Computermodell, anhand dessen Netzwerkeigenschaften systematisch analysiert werden können. Weiterhin untersuchen sie am Zebrafisch, wie die Funktion olfaktorischer Schaltkreise während der Entwicklung eines Organismus entsteht. Da Zebrafische anfangs beinahe durchsichtig sind, kann neuronale Aktivität mit optischen Methoden im intakten Tier gemessen und über mehrere Tage verfolgt werden, während

das Geruchssystem entsteht. Wichtige Hilfsmittel bei diesen Versuchen sind fluoreszierende Proteine, die mit molekulargenetischen Methoden in bestimmte Neuronen eingeschleust werden und ihre Fluoreszenz aktivitätsabhängig ändern. Mit diesen und anderen Methoden haben Jun Li, Julia Mack und Rainer Friedrich herausgefunden, dass wichtige Charakteristika geruchsinduzierter Aktivitätsmuster, wie die räumliche Kartierung bestimmter chemischer Eigenschaften, bereits etabliert sind, wenn das System erstmals auf Geruchsstoffe reagiert. Andere Funktionen, die insbesondere die weitere Verarbeitung von Aktivitätsmustern betreffen, entstehen jedoch erst später. Die Prinzipien der Geruchsverarbeitung scheinen sich daher während der Entwicklung der Schaltkreise im Riechhirn dramatisch zu verändern. In Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Teresa Nicolson wurden außerdem molekulare Grundlagen der Signalübertragung in Haarsinneszellen des Zebrafisches erforscht [10].

Durch eine Kombination verschiedener Methoden haben Rainer Friedrich und seine Mitarbeiter in den letzten Jahren Einblicke in die Funktion und Entwicklung neuronaler Schaltkreise im Riechhirn erhalten. Diese Ergebnisse sind auch für andere Systeme von Bedeutung und zeigen zudem Wege zur Analyse von neuronalen Schaltkreisen auf.

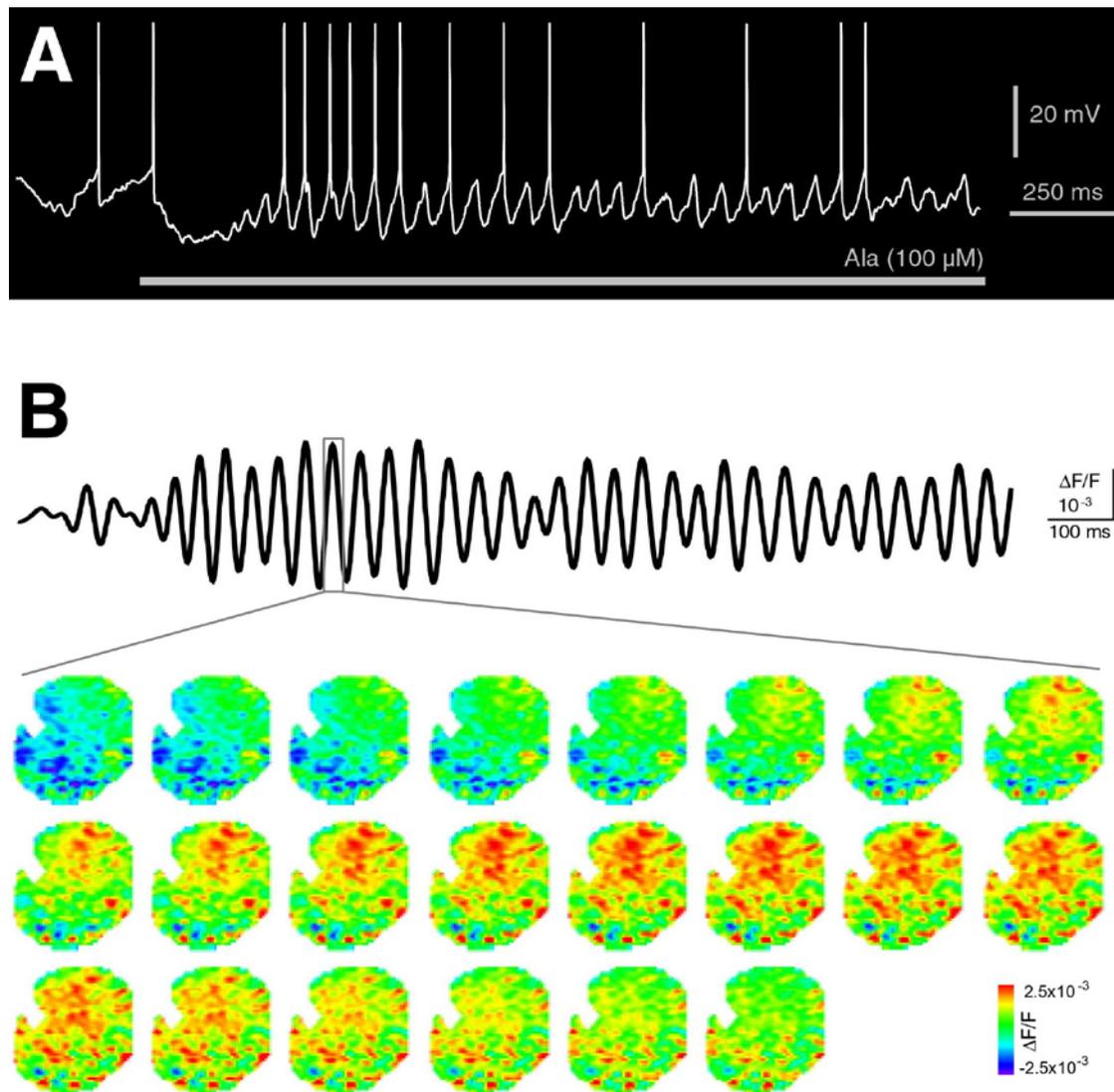


Abb. 3 : Zeitliche Aktivitätsmuster im Riechhirn des Zebrafärblings.

A: Intrazelluläre Ableitung des Membranpotenzials einer Mitralzelle während Geruchsstoffstimulation (grauer Balken). Die Geruchsantwort ist anfangs hemmend und später erregend. Während der Erregung ist eine Oszillation des Membranpotenzials erkennbar. *B:* Optische Messung oszillatorischer Populationsaktivität mit einem spannungsabhängigen Farbstoff. Die schwarze Kurve zeigt die relative Fluoreszenzänderung, gemittelt über einen großen Bereich des Bulbus olfactorius (zeitlich gefiltert 10-50 Hz). Die Farbbilder zeigen die räumliche Verteilung der Fluoreszenzänderung in derselben Region in aufeinanderfolgenden Zeitfenstern von 1 Millisekunde. Eine wellenförmige Ausbreitung der Aktivität ist erkennbar.

Bild : Max-Planck-Institut für medizinische Forschung/Friedrich

Referenzen und weiterführende Links

[1] Hasan, M.T. et al.: Functional Fluorescent Ca²⁺ Indicator Proteins in Transgenic Mice under TET Control. *Public Library of Science Biology* **2**, 763-775, Epub Jun 15 (2004).

- [2] Theer, P., M.T. Hasan and W. Denk: Two-photon imaging to a depth of 1000 microm in living brains by use of a Ti:A1203 regenerative amplifier, *Optics Letters* **28**, 1022-1024 (2003).
- [3] Euler, T.: Richtungsmelder im Auge, Gehirn und Geist (Verlag Spektrum der Wissenschaft) **4**, 64-67(2003)
- [4] Euler, T., and W. Denk: Dendritic Processing, *Current Opinion in Neurobiol.* **11**:415-422 (2001).
- [5] Euler, T., P. B. Detwiler and W. Denk: Directionally selective calcium signals in dendrites of starburst amacrine cells, *Nature* **418**, 845-852 (2002).
- [6] Dübel, J., S. Haverkamp, T. Kuner, and T. Euler: Chloride imaging in ON-type bipolar cells of a Clomeleon indicator mouse line. *Association for Research in Vision and Ophthalmology* **1324/B135** (2004).
- [7] Wachowiak, M., W. Denk and R. W. Friedrich: Functional organization of sensory input to the olfactory bulb glomerulus analyzed by two-photon calcium imaging, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **101**, 9097-9102 (2004).
- [8] Friedrich, R.W. and G. Laurent: Dynamic optimization of odor representations in the olfactory bulb by slow temporal patterning of mitral cell activity, *Science* **291**, 889-894 (2001).
- [9] Friedrich, R. W., C. J. Habermann and G. Laurent: Multiplexing using synchrony in the zebrafish olfactory bulb. *Nature of Neuroscience*, in press (2004).
- [10] Sidi, S., R. W. Friedrich and T. Nicolson: NompC TRP channel required for vertebrate sensory hair cell mechanotransduction. *Science* **301**, 96-99 (2003).