

Fortbildungsveranstaltung

*im Rahmen des Programms
„Neurowissenschaften in der gymnasialen Oberstufe“*

der Neurowissenschaftlichen Gesellschaft e.V.

zum Thema

*Von der Zelle zum Organ –
wie entsteht unser Gehirn?*

8. April 2008

am Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung
Medizinische Fakultät der Universität Leipzig,
Jahnallee 59 , 04109 Leipzig

organisiert von Prof. Dr. Reinhard Schliebs

Kurzreferate ausgewählter Vorträge

Physiologische und anatomische Aspekte der Hirnentwicklung

PD Dr. Ulrich Gärtner, Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung, Universität Leipzig

Die zelluläre und funktionelle Organisation des Nervensystems während der Entwicklung hängt ab von der Herkunft der Nervenzellen, induktiven und trophischen Wechselwirkungen zwischen Zellen, vom Ziel stammenden und zielunabhängigen Navigationssignalen, spezifischer Zell-Zellerkennung und ständiger aktivitätsabhängiger Verfeinerung der Verbindungen. Bei Wirbeltieren (Vertebrata) beginnt die Bildung des Nervensystems mit einem induktiven Prozeß: Das dorsale Mesoderm (Chordamesoderm, Notochord, Chorda dorsalis) der Gastrula induziert in dem darüberliegenden Ektoderm die Bildung der Neuralplatte. Diese faltet sich und bildet das Neuralrohr (Zentralnervensystem) und die Neuralleiste (peripheres Nervensystem). Die Neuronen und Gliazellen des Zentralnervensystems werden durch Teilung von Stammzellen in der Ventrikulärzone des Neuralrohres generiert. Postmitotische Neuronen wandern aus (Migration) und bilden die graue Substanz des adulten Nervensystems.

Einige Eigenschaften der zukünftigen Neuronen werden ungefähr zu der Zeit determiniert, in der sie ihre letzte Zellteilung beenden. Andere Eigenschaften werden am Ort ihrer endgültigen Position durch Wechselwirkungen mit der Umgebung reguliert. Sowohl die Determination der Zellidentität als auch Prozesse der Organogenese des Zentralnervensystems (Hirnabschnitte, Areal spezifizierung) werden häufig durch sogenannte homöotische Gene bzw. Proteine (Mastergene, Transkriptionsfaktoren) reguliert.

Neurone senden ihre Axone mit Wachstumskegeln an der Spitze aus, deren Wuchsrichtung und spätere Kontaktaufnahme durch verschiedene lösliche und zellgebundene Signale reguliert werden (attraktive, repulsive). In manchen Fällen wird die Bahn des Axons zu seinem Ziel durch Zwischenstationen oder Wegweizerzellen markiert (Pionierneurone, Wegweizerzellen bei Insekten aber auch Vertebrata). Die axonale Projektion ist anfänglich häufig ausgedehnter als im adulten Zustand. Sie wird während der Entwicklung durch trophische und aktivitätsabhängige Mechanismen auf das adulte Muster reduziert. Auf diese Weise werden auch überflüssige Neuronen (Apoptose) und nicht benötigte synaptische Kontakte eliminiert. Im allgemeinen ergibt sich, daß nur wenige Verbindungen des Nervensystems fest vorgegeben sind (genetisch determiniert).

Ihre einzigartige Identität erhalten neuronale Strukturen durch das Zusammenwirken genetischer und epigenetischer Faktoren sowie unter dem Einfluß externer Stimuli. Das präzise Verbindungsmuster des adulten Nervensystems ist somit Resultat dialektischer Wechselwirkungen zwischen genetischen Vorgaben und Umwelteinflüssen.

REIFUNG SENSORISCHER SYSTEME AM BEISPIEL DES SEHSYSTEMS

Prof. Dr. Andreas Reichenbach, Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung, Univ. Leipzig

Das Sehen ist eine für die meisten Tiere so wichtige und unverzichtbare Fähigkeit, daß sich im Verlauf der Phylogenese außerordentlich komplexe und an die spezielle Lebensweise einer Tierart angepaßte Augen entwickelt haben (selbst Darwin wurde von Zweifeln darüber geplagt, wie die Evolution solche Organe hervorbringen konnte!). Gegenstand der Vorlesung ist die ontogenetische Entwicklung des Wirbeltierauges, besonders der Netzhaut und ihrer strukturellen und funktionellen Spezialisierungen.

Die Netzhaut ist ein in das Auge "vorgelagerter" Teil des Zentralnervensystems, der für die Aufnahme und Verarbeitung von Lichtreizen spezialisiert ist. Die Netzhaut enthält daher eine hohe Dichte von Lichtsinneszellen (Photorezeptoren); die von diesen durch Absorption von Lichtquanten aus der Abbildung der Umgebung extrahierte Information wird über Synapsen zuerst an Interneurone der Netzhaut weitergeleitet. "Querverschaltungen" erhöhen den Kontrast zwischen den Signalen von benachbarten Netzhautpunkten; es kommt zu einer weitgehenden Vorverarbeitung der Information bereits innerhalb der Netzhaut, bis die Signale die Ganglienzellen der Netzhaut erreichen. Schließlich werden die visuellen Informationen von diesen, in mehreren "Kanälen" (für Form / Bewegung / Farbe eines Objektes) kodiert, an das Gehirn weitergeleitet. Entsprechend dieser strukturellen und funktionellen Erfordernisse (und der gemeinsamen Herkunft aus der embryonalen Neuralplatte) zeigt die Entwicklung der Netzhaut viele Gemeinsamkeiten mit der des Gehirns, allerdings auch einige spezifische Besonderheiten.

Im Rahmen der Vorlesung werden vier Entwicklungsphasen besprochen:

- die Festlegung der für das Sehen verantwortlichen Abschnitte der Neuralplatte;
- die Generierung der verschiedenen Zelltypen der Netzhaut;
- die Reifung bzw. Differenzierung der verschiedenen Zelltypen der Netzhaut; und
- die Anpassung von Augengröße und Netzhautfläche an das Wachstum des Kindes.

Festlegung der für das Sehen verantwortlichen Abschnitte der Neuralplatte:

Durch die räumlich-zeitlich programmierte Expression von Organisationsgenen (z.B. Homeobox-Genen) wird in der frühen Neuralplatte ein Gebiet mit „visueller Potenz“ festgelegt (Abb. 1). Aus den Zellen in diesem Gebiet gehen später die Netzhaut der (Lateral-) Augen, das Pinealorgan und visuell spezialisierte Hirnabschnitte hervor. Bei Fischen, Amphibien und Reptilien entstehen Lichtsinneszellen außer in den Lateraläugen auch im Pineal- (und Parapineal-) Organ sowie in der Wand des dritten Hirnventrikels. Störungen dieser Prozesse führen z.B. zur Zyklopie.

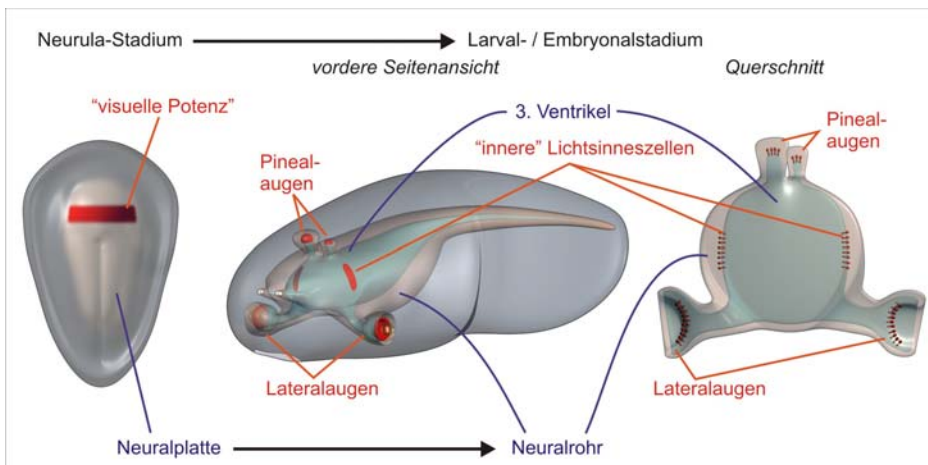


Abb. 1: Verteilung der „visuellen Potenz“ in der Neuralplatte und Entwicklung von Lichtsinneszellen im prototypischen Wirbeltier.

Generierung der verschiedenen Zelltypen der Netzhaut:

Sobald die Anlage der Netzhaut sich aus dem Neuralrohr ausgestülpt hat, wird durch eine kontrollierte Proliferation von identischen Vorläuferzellen diese Anlage vergrößert; die Dauer dieser Phase bestimmt die spätere Größe von Auge und Netzhaut (Maulwurf ↔ Kaninchen; →Mikrophthalmie). Danach werden in zwei weiteren Proliferationswellen mit unsymmetrischer letzter Zellteilung zunächst die für das Tagessehen verantwortlichen Nerven- und Sinneszellen (Zapfen), danach die Stäbchen, Bipolarzellen und Gliazellen gebildet (Abb. 2). Die Dauer dieser letzten Phase bestimmt den Grad der Anpassung an eine nächtliche Lebensweise (Erdhörnchen ↔ Dachs). In der zukünftigen Fovea centralis (der Stelle unseres schärfsten Sehens) wird diese letzte Proliferationsphase unterdrückt, so daß dort von Anfang an keine Stäbchen entstehen. Wenn dieser Mechanismus durch angeborene Enzymdefekte (z.B. bei Albinismus) gestört ist, entsteht keine Fovea centralis.

Reifung bzw. Differenzierung der verschiedenen Zelltypen der Netzhaut:

Nachdem die Netzhautzellen „geboren“ sind, setzt ein komplizierter Differenzierungsprozeß ein. Die Zellen müssen teilweise erst in die Netzhautschicht wandern, in der sie später liegen werden; die Zellfortsätze wachsen und bilden die synaptischen Kontakte zu den „passenden“ Partnerzellen (Abb. 3) und schließlich reifen die für die speziellen Funktionen notwendigen Moleküle (z.B. die Sehpigmente der Lichtsinneszellen). Besonders dieser letztere Prozeß ist bei zahlreichen vererbten Erkrankungen gestört („Retinitis pigmentosa“); das kann früher oder später zur Erblindung führen.

Anpassung von Augengröße und Netzhautfläche an das Wachstum des Kindes:

Beim Menschen sind die bisher erwähnten Prozesse spätestens kurz nach der Geburt abgeschlossen. Allerdings folgen weitere wichtige Entwicklungsschritte, die oft biomechanischen Charakter haben und in ihrer Mehrzahl vom Wachstum des Gesamtorganismus getrieben werden, das noch bis zum Ende des zweiten Lebensjahrzehnts fortschreitet. Das Wachstum des Auges führt zu einem sekundären, „passiven“ Wachstum der Netzhaut: Die Packungsdichte der (bereits existierenden) Zellen wird durch die Dehnung der Netzhaut vermindert, was zu einer Verringerung der räumlichen Auflösung führt. „Glücklicherweise“ findet diese Netzhautdehnung hauptsächlich in der Peripherie statt, wo wir auf eine hohe Sehschärfe verzichten können. Im Gegensatz dazu führen komplexe Mechanismen sogar zu einer wünschenswerten Erhöhung der Sehzell- (Zapfen-) Dichte im Bereich der zukünftigen Fovea centralis (Abb. 4).

Wichtig ist, daß das Ausmaß des Augenwachstums durch die Funktion der Netzhaut kontrolliert wird: Ein zu langer oder zu kurzer Augapfel führen zu einer unscharfen Abbildung auf der Ebene der Netzhaut. Es erfolgt daher eine ständige Anpassung des Augenlängenwachstums an die Sehschärfe („Emmetropisierung“). Bei einer Störung der dafür notwendigen Mechanismen wird der Augapfel entweder zu lang (→Kurzichtigkeit, Myopie) oder zu kurz (→Weitsichtigkeit, Hyperopie). In den Industrieländern und vor allem im asiatischen Raum nimmt die Häufigkeit der Myopie rasant zu (China: ca. 60-80% der jugendlichen Bevölkerung betroffen).

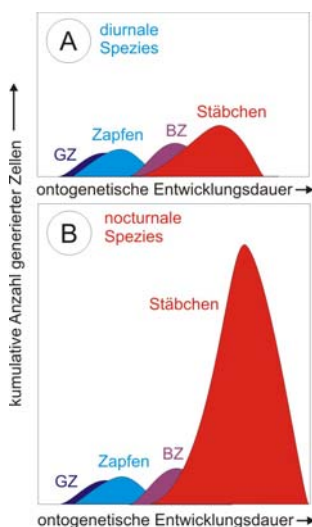


Abb. 2. Zwei Proliferationsphasen generieren eine vorbestimmte Anzahl von spezifischen Netzhautzellen.

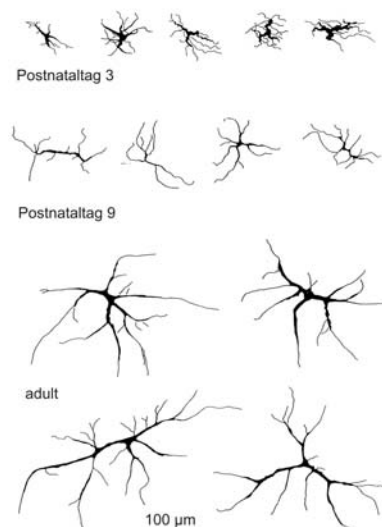


Abb. 3. Postnatale Entwicklung der Horizontalzellen in der Kaninchenetzhaut (Golgi-Imprägnation).

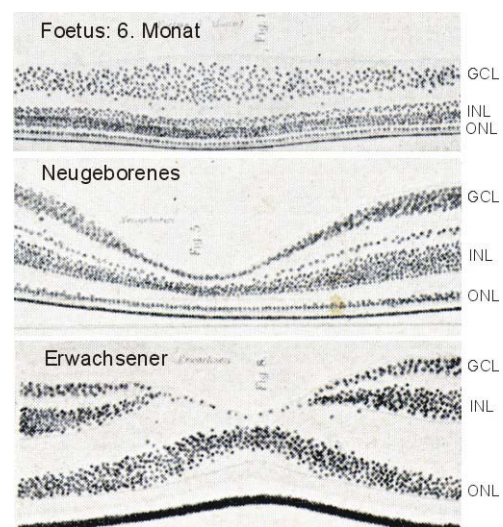


Abb. 4. Entwicklungsstadien der Fovea centralis in der menschlichen Netzhaut. Die Dichte der Zapfen (ONL) nimmt zu, die inneren Zellen werden seitlich verschoben.

Neurotrophine und Hirnentwicklung

PD Dr. Max Holzer, Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung, Universität Leipzig

Neurotrophe Faktoren (kurz Neurotrophine) sind lösliche Proteine, die das Überleben, das Wachstum, die morphologische Plastizität und die Genexpression in differenzierten Neuronen regulieren. Sie stimulieren die Differenzierung und Wachstum bestimmter Zellen, das Auswachsen von Neuriten und deren Führung in die Zielregion des Hirns sowie die dortige Bildung/Stabilisierung von Synapsen. Definierte Neurotrophine wirken auf die Expression neuronaler Markerenzyme in bestimmten Neuronenpopulationen. So wirkt der Nerven-wachstumsfaktor (*nerve growth factor*; **NGF**) speziell auf cholinerge Neuronen, die Acetylcholin als Botenstoff ausschütten, während *brain-derived neurotrophic factor* (**BDNF**) das Überleben und die Funktionen dopaminerger Neuronen unterstützt. Während der Ontogenese kann eine sequenzielle Expression der Neurotrophine beobachtet werden. Embryonal werden vor allem Neurotrophin-3 (**NT-3**) und Neurotrophin-4/5 (**NT-4/5**) exprimiert, in der frühen Postnatalphase dominiert BDNF und im adulten Hirn wird vor allem NGF nachgewiesen. Unter krankheitsrelevanten Bedingungen können Neurotrophine neuronalen Zelltod verhindern.

Für alle Neurotrophine gilt, dass sie als *target-derived neurotrophic factors* wirken; d.h. die Neurotrophine werden in den Hirnregionen gebildet, in die bestimmte Nervenfasern auswachsen sollen (Zielregionen). Ist das Wachstum der Nervenfasern abgeschlossen, sind die jeweiligen Neurotrophine an der Stabilisierung der Kontaktstellen zwischen den Neuronen, den Synapsen, beteiligt.

Die verschiedenen Neurotrophine vermitteln ihre biologischen Wirkungen auf definierte Neuronen über spezifische Neurotrophin-Rezeptoren. Alle bekannten Neurotrophine binden an den p75-Neurotrophin-Rezeptor (**p75 NTR**), der seinen Namen dem Molekulargewicht (75 kDa) verdankt. Dieser Rezeptor allein, kann demnach nicht spezifische Wirkungen verschiedener Neurotrophine vermitteln. Die Wirkungs-Spezifität der Neurotrophine wird über Tyrosinkinase-gekoppelte Rezeptoren (Trk) realisiert. Dabei bindet NGF an den **TrkA**-Rezeptor, BDNF und NT-4/5 an **TrkB** und NT-3 an **TrkC** (s. Abb. 1). Sowohl der p75 NTR als auch die Trk-Rezeptoren aktivieren nach Bindung der Neurotrophine intrazelluläre Signalkaskaden, welche Phosphorylierungsprozesse, intrazelluläre Calciumfreisetzung und die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und damit die Genexpression regulieren. Verkompliziert werden dieses Rezeptorsystem und die nachgeschalteten Signalkaskaden dadurch, dass die Rezeptoren sowohl als Homodimere von jeweils 2 Molekülen p75 NTR, TrkA, TrkB oder TrkC als auch als Heterodimere (z.B. p75 NTR-TrkA; p75 NTR-TrkB, p75 NTR-TrkC) vorliegen können.

Die spezifische Expression von bestimmten Neurotrophin-Rezeptoren auf der Zelloberfläche definierter Neuronenpopulationen kann experimentell genutzt werden, um diese selektiv zu schädigen. Dazu wird ein Zellgift an einen Antikörper gegen einen Neurotrophin-Rezeptor gekoppelt und ins Hirn appliziert. Damit lassen sich im Tiermodell krankheitsrelevante Zustände humaner Pathologien erzeugen (z.B. Degeneration cholinergischer Neuronen wie bei der Alzheimerschen Erkrankung), um die Mechanismen der Erkrankung zu untersuchen und therapeutische Konzepte zu testen.

Derzeit werden verschiedene Neurotrophine hinsichtlich ihres therapeutischen Potenzials zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen getestet; z.B. NGF zur Behandlung der Alzheimerschen und BDNF zur Behandlung der Parkinsonschen Erkrankung.

Bindungs-Spezifität der Neurotrophine

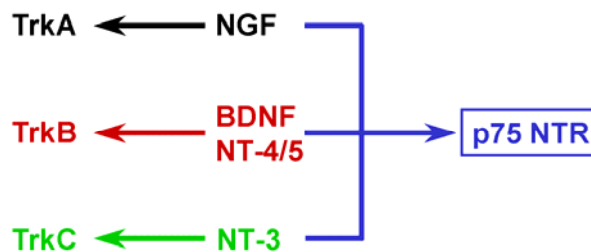


Abb. 1: Alle Neurotrophine (NGF, BDNF, NT -3 und NT-4/5) binden an den p75 Neurotrophin-Rezeptor (p75 NTR). Die Spezifität der Neurotrophin-Wirkung wird von den Tyrosinkinase-gekoppelten Rezeptoren (Trk) vermittelt.

Neurale Stammzellen – Ausgangspunkt der Hirnentwicklung

Prof. Dr. Johannes Schwarz, Neurologische Klinik, Universität Leipzig (stellvertretender Direktor), California Institute of Technology (visiting associate) und Pochon University / Cha Stem Cell Institute Seoul (distinguished Professor)

A. Einteilung der Stammzellen

Es wird erwartet, dass die Stammzellbiologie für die kommenden wichtigen Verbesserungen der Therapie verschiedener Erkrankungen eine besondere Rolle spielen wird. Insbesondere bei der Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen, für die weiterhin allenfalls symptomatische Behandlungen möglich sind, wird von den Stammzellen eine entscheidende Wende erhofft. Im Labor können bereits aus einer Vielzahl verschiedener Stamm- oder Progenitorzellen Zellen gewonnen werden, die viele Charakteristika der dopaminergen Neurone zeigen. Zunächst müssen wir verschiedene Stammzellen unterscheiden:

1. Embryonale Stammzellen (ES-Zellen).

Diese werden aus der Blastozyste zum Zeitpunkt des 16-Zell-Stadiums gewonnen. Das Proliferationspotential dieser Zellen ist unter Zugabe spezifischer Mitogene nahezu unbegrenzt. ES-Zellen sind (wahrscheinlich) totipotent und können dementsprechend nicht nur in jeden Zelltyp des jeweiligen Organismus ausdifferenziert, sondern auch in funktionsfähige Organismen (Individuen) überführt werden. In der Mausgenetik werden diese Zellen benutzt, um Knock-out- oder Knock-in-Mäuse zu generieren. Neben dem unbegrenzten Teilungspotential haben die ES-Zellen den Vorteil, dass sie sehr stabil sind und gut reproduzierbar ausdifferenziert werden können. Im Labor werden diese Zellen in aller Regel zunächst in embryonale Körperchen andifferenziert, die dann weiter amplifiziert und anschließend in spezifische Zellen ausdifferenziert werden können. Die therapeutische Nutzung der ES-Zellen ist wegen ethischer und biologischer Probleme zumindest in den kommenden Jahren wenig wahrscheinlich. ES-Zellen könnten missbraucht werden, um genetisch modifizierte Lebewesen zu erstellen („reproduktives Klonen“). Daher muss die

Forschung mit diesen Zellen strengen Auflagen unterliegen. Andererseits haben diese Zellen ein hohes Potential zur Entartung und nach Transplantation in Ratten wurden häufig Teratokarzinome beobachtet (Bjorklund et al., 2002).

2. Adulte/fetale Stammzellen (Vorläufer- oder Progenitorzellen).

Dies sind organ-spezifische Vorläuferzellen, die sowohl aus dem embryonalen, fetalen und adulten Geweben gewonnen werden können. Leider ist nicht nur das Proliferationspotential dieser Zellen begrenzt, sondern scheint auch das Überleben solcher Zellen im Labor begrenzt zu sein (Milosevic et al., 2004). Dennoch ist es möglich eine Expansion dieser Stammzellen über viele Monate durchzuführen. Als Mitogene (Wachstumsfaktoren) werden in der Regel „epidermal growth factor“ (EGF) und “basic fibroblast growth factor“ (bFGF oder FGF-2) verwendet. Neurale Stammzellen (NSZ) differenzieren ausschließlich in Neuronen oder Glia. Ein Missbrauch ist daher nicht möglich, das Wachstum (Proliferation) ist wie bei den ES-Zellen von der Zugabe von externen Mitogenen abhängig. Bezüglich der Gehirnentwicklung sind die Zellen aus fetalem Gewebe sehr viel potenter als Zellen aus dem adulten Gehirn. In Letzterem finden sich Stammzellen nur noch in den neurogenen Zonen, in subventrikulären Abschnitten und im Gyrus dentatus. Diese Stammzellen können wahrscheinlich nur in wenige Zelltypen ausdifferenzieren. Im Gegensatz dazu können die Stammzellen aus praktisch allen Teilen des fetalen Gehirns gewonnen werden. Diese Zellen können je nach Ursprung mit hoher Wahrscheinlichkeit auch in alle Nervenzellen der jeweiligen Region differenzieren.

3. Induzierte pluripotente Stammzellen (iPCs).

In den vergangenen Monaten haben die iPCs erhebliche Aufmerksamkeit in der Fach- aber auch der Boulevardpresse erhalten. Shinya Yamanaka gelang es erstmals, 4 Gene zu identifizieren, die adulte somatische Zellen in „quasi-ES-Zellen“ transformieren können (Aoi et al., 2008; Takahashi and Yamanaka, 2006; Yamanaka, 2008). Allerdings muss erwähnt werden, dass diese Gene auch Eigenschaften von Onkogenen besitzen und somit die generierten iPCs ebenfalls, ein sehr hohes Entartungspotential aufweisen. Dennoch bieten die iPCs enorme Möglichkeiten. Sollte das Entartungspotential durch eine partielle „Reprogrammierung“ gebannt werden, könnten für jeden Patienten individuelle Ersatzorgane generiert werden. Schon heute können aber von allen Patienten solche Zelllinien angelegt werden, und somit die Entstehung von bisher unerklärten Erkrankungen im Reagenzglas simuliert werden. Dies sollte helfen, viele neue Krankheitsmechanismen zu erkennen.

B. Neurale Stammzellen und die Entwicklung des Gehirns

Es ist mittlerweile gut belegt, dass in der frühen Embryonalentwicklung über die Bildung des Neuralrohres im Gehirn überwiegend neurale Stammzellen gebildet werden. Über diese Zellen wird die wesentliche Amplifikation der Gehirnzellen ermöglicht. Während in den ersten Wochen der Entwicklung (4 – 8 Wochen) nur wenige Millionen dieser Vorläuferzellen vorhanden sind, enthält das humane adulte Gehirn ja ca. 100 vielleicht sogar 1000 Milliarden Nervenzellen und dazu ein Vielfaches an Gliazellen. Humane neurale Stammzellen müssen sich also mindestens 20 mal vervielfachen können, um die Entwicklung des Gehirns zu ermöglichen. Die Regulation dieser Neurogenese aus neuralen Stammzellen ist noch nicht gut verstanden. Viele Forscher gehen aber davon aus, dass die Entschlüsselung dieser Mechanismen viele Möglichkeiten für neue regenerative Therapien bieten wird.

Literatur

- Aoi, T., Yae, K., Nakagawa, M., Ichisaka, T., Okita, K., Takahashi, K., Chiba, T., and Yamanaka, S. (2008). Generation of Pluripotent Stem Cells from Adult Mouse Liver and Stomach Cells. *Science*. 2008 Feb 14; [Epub ahead of print].
- Bjorklund, L.M., Sanchez-Pernaute, R., Chung, S., Andersson, T., Chen, I.Y., McNaught, K.S., Brownell, A.L., Jenkins, B.G., Wahlestedt, C., Kim, K.S., *et al.* (2002). Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2344-2349.
- Milosevic, J., Storch, A., and Schwarz, J. (2004). Spontaneous apoptosis in murine free-floating neurospheres. *Exp Cell Res* 294, 9-17.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.
- Yamanaka, S. (2008). Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblasts by four transcription factors. *Cell proliferation* 41 *Suppl 1*, 51-56.

Kontaktadressen der Referenten

PD Dr. Ulrich Gärtner
Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung, Universität Leipzig
Jahnallee 59, 04109 Leipzig
E-mail: Ulrich.Gaertner@medizin.uni-leipzig.de

Prof. Dr. Andreas Reichenbach
Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung, Universität Leipzig
Jahnallee 59, 04109 Leipzig
E-mail: Andreas.Reichenbach@medizin.uni-leipzig.de

PD Dr. Max Holzer
Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung, Universität Leipzig
Jahnallee 59, 04109 Leipzig
E-mail: holm@medizin.uni-leipzig.de

Professor Dr. Johannes Schwarz
Klinik und Poliklinik für Neurologie
Universitätsklinikum Leipzig
Liebigstraße 22a, 04103 Leipzig
E-mail: Johannes.Schwarz@medizin.uni-leipzig.de

PD Dr. Peter Schönknecht
Klinik und Poliklinik für Psychiatrie
Universitätsklinikum Leipzig
Johannisallee 20, 04317 Leipzig
E-mail: Peter.Schoenkecht@medizin.uni-leipzig.de