

DE GRUYTER

2017 · VOLUME 23 · ISSUE 1  
ISSN 0947-0875 · e-ISSN 1868-856X

# NEUROFORUM

ORGAN DER NEUROWISSENSCHAFTLICHEN GESELLSCHAFT

HERAUSGEGEBEN VON  
*Neurowissenschaftliche Gesellschaft e.V. (NWG)*

CHEFREDAKTEUR  
*Heiko J. Luhmann, Mainz*

NEUROWISSENSCHAFTLICHE  
GESELLSCHAFT



DE  
G

[www.degruyter.com/journals/nf](http://www.degruyter.com/journals/nf)

# NEUROFORUM

## HERAUSGEGEBEN VON

*Neurowissenschaftliche Gesellschaft e.V. (NWG)*

## CHEFREDAKTEUR

*Heiko J. Luhmann, Mainz*

## REDAKTION

*Meino Alexandra Gibson, Berlin*

## REDAKTIONSGREMIUM

*Mathias Bähr, Göttingen*

*Niels Birbaumer, Tübingen*

*Alexander Borst, Martinsried*

*Sebastian Brandner, London,  
Großbritannien*

*Katharina Braun, Magdeburg*

*Nils Brose, Göttingen*

*Ansgar Büschges, Köln*

*Thomas Deller, Frankfurt/M.*

*Ulrich Dirnagl, Berlin*

*Andreas Draguhn, Heidelberg*

*Jens Eilers, Leipzig*

*Herta Flor, Mannheim*

*Eckhard Friauf, Kaiserslautern*

*Giovanni Galizia, Konstanz*

*Magdalena Götz, München*

*Benedikt Grothe, München*

*Sonja Grün, Jülich*

*Onur Güntürkün, Bochum*

*Eckhart Gundelfinger, Magdeburg*

*Ileana Hanganu-Opatz, Hamburg*

*Andreas Heinz, Berlin*

*Charlotte Helfrich-Förster,  
Würzburg*

*Moritz Helmstädter, Frankfurt/M.*

*Michael Heneka, Bonn*

*Anton Hermann, Salzburg,  
Österreich*

*Andreas Herz, München*

*Isabella Heuser, Berlin*

*Sigismund Huck, Wien, Österreich*

*Mark Hübener, Martinsried*

*Reinhard Jahn, Göttingen*

*Sabine Kastner, Princeton, USA*

*Helmut Kettenmann, Berlin*

*Frank Kirchhoff, Homburg*

*Christian Klämbt, Münster*

*Thomas Klockgether, Bonn*

*Matthias Kneussel, Hamburg*

*Michael Koch, Bremen*

*Arthur Konnerth, München*

*Sigrun Korsching, Köln*

*Kerstin Kriegelstein, Freiburg*

*Trese Leinders-Zufall, Homburg*

*Wolfgang Löscher, Hannover*

*Sigrid Löwel, Göttingen*

*Michael Madeja, Frankfurt/M.*

*Denise Manahan-Vaughan, Bochum*

*Thomas Möller, Cambridge, USA*

*Ulrike Müller, Heidelberg*

*Thomas Münte, Lübeck*

*Roger Nitsch, Zürich, Schweiz*

*Christian Pape, Münster*

*Hans-Joachim Pflüger, Berlin*

*Josef Rauschecker, Washington,  
USA*

*Christine Rose, Düsseldorf*

*Susanne Schoch-McGovern, Bonn*

*Rainer Schwarting, Marburg*

*Mikael Simons, Göttingen*

*Christian Steinhäuser, Bonn*

*Monika Stengl, Kassel*

*Christiane Thiel, Oldenburg*

*Stefan Treue, Göttingen*

*Bernd Weber, Bonn*

*Florentin Wörgötter, Göttingen*

**DE GRUYTER**

ISSN 0947-0875 · e-ISSN 1868-856X

Alle Informationen zur Zeitschrift, wie Hinweise für Autoren, Open Access, Bezugsbedingungen und Bestellformulare, sind online zu finden unter <https://www.degruyter.com/view/j/nf>

**CHEFREDAKTEUR** Prof. Dr. Heiko J. Luhmann, Institute of Physiology, University Medical Center, Duesbergweg 6, D-55128 Mainz (Germany), Phone: +49 (0)6131 39 26070, <http://physiologie.uni-mainz.de/physio/luhmann/index.htm>

**REDAKTION** Meino Alexandra Gibson, Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Robert-Rössle-Str. 10, 13092 Berlin (Germany), Tel.: +49 (0)30 9406 3336, [gibson@mdc-berlin.de](mailto:gibson@mdc-berlin.de)

**JOURNAL MANAGER** Torsten Krüger, De Gruyter, Genthiner Straße 13, 10785 Berlin, Germany.  
Tel.: +49 (0)30 260 05-173, Fax: +49 (0)30 260 05-250, E-Mail: [Neuroforum.Editorial@degruyter.com](mailto:Neuroforum.Editorial@degruyter.com)

**ANZEIGENVERANTWORTLICHE** top-ad Bernd Beutel, Schlossergäßchen 10, 69469 Weinheim,  
Tel.: +49 (0)6201 290 92-0, Fax +49 (0)6201 290 92-20

© 2017 Walter de Gruyter GmbH, Berlin/Boston

**COVER ILLUSTRATION** Jochen Meier, Braunschweig

**SATZ** fidus Publikations-Service GmbH, Nördlingen

**DRUCK** Franz X. Stücker Druck und Verlag e.K., Ettenheim  
Printed in Germany



Offenlegung der Inhaber und Beteiligungsverhältnisse gem. § 7a Abs. 1 Ziff. 1, Abs. 2 Ziff. 3 des Berliner Pressegesetzes: Die Gesellschafter der Walter de Gruyter GmbH sind: Cram, Gisela, Rentnerin, Berlin; Cram, Elsbeth, Pensionärin, Rosengarten-Alvesen; Cram, Dr. Georg-Martin, Unternehmens-Systemberater, Stadtbergen; Cram, Maike, Wien (Österreich); Cram, Jens, Mannheim; Cram, Ingrid, Betriebsleiterin, Tuxpan/Michoacan (Mexiko); Cram, Sabina, Mexico, DF (Mexiko); Cram, Silke, Wissenschaftlerin, Mexico DF (Mexiko); Cram, Björn, Aachen; Cram, Cram, Berit, Hamm; Cram-Gomez, Susana, Mexico DF (Mexiko); Cram-Heydrich, Walter, Mexico DF (Mexiko); Cram-Heydrich, Kurt, Angestellter, Mexico DF (Mexiko); Duvenbeck, Brigitta, Oberstudienrätin i.R., Bad Homburg; Gädeke, Gudula, M.A., Atemtherapeutin/Lehrerin, Tübingen; Gädeke, Martin, Einzelunternehmer, Ingolstadt; Lubasch, Dr. Annette, Ärztin, Berlin; Schütz, Dr. Christa, Ärztin, Mannheim; Schütz, Sonja, Berlin; Schütz, Juliane, Berlin; Schütz, Antje, Berlin; Schütz, Valentin, Mannheim; Seils, Dorothee, Apothekerin, Stuttgart; Seils, Gabriele, Journalistin, Berlin; Seils, Christoph, Journalist, Berlin; Siebert, John-Walter, Pfarrer, Oberstenfeld; Tran, Renate, Mediatorin, Zürich (Schweiz).

## VORSTAND DER AMTSPERIODE 2015–2017

### PRÄSIDENT

*Hans-Joachim Pflüger, Berlin*

Kognitive Neurowissenschaften

*Herta Flor, Mannheim*

### VIZEPRÄSIDENT

*Eckhard Friauf, Kaiserslautern*

Molekulare Neurobiologie

*Matthias Kneussel, Hamburg*

### GENERALSEKRETÄR

*Christian Steinhäuser, Bonn*

Neuropharmakologie/-toxikologie

*Michael Koch, Bremen*

### SCHATZMEISTER

*Ansgar Büschges, Köln*

Systemneurobiologie

*Tobias Moser, Göttingen*

### SEKTIONSSPRECHER:

Computational Neuroscience

*Stefan Rotter, Freiburg*

Verhaltensneurowissenschaften

*Charlotte Förster, Würzburg*

Entwicklungsneurobiologie/Neurogenetik

*Gerd Kempermann, Dresden*

Zelluläre Neurowissenschaften

*Christine R. Rose, Düsseldorf*

Klinische Neurowissenschaften

*Albert Ludolph, Ulm*

# Inhalt

## Editorial

Mehr als nur ein neuer *Look* — 1

## Übersichtsartikel

Joachim W. Deitmer, Shefeeq M. Theparambil,  
Iván Ruminot und Holger M. Becker  
**Unser hungriges Gehirn: Welche Rolle spielen Gliazellen  
bei der Energieversorgung?** — 2

Joachim W. Deitmer, Shefeeq M. Theparambil,  
Iván Ruminot und Holger M. Becker  
**Our hungry brain: Which role do glial cells play for the  
energy supply?** — A1

Andreas Vlachos, Klaus Funke und Ulf Ziemann  
**Untersuchung und Modulation kortikaler Inhibition  
mittels transkranieller Magnetstimulation** — 13

Andreas Vlachos, Klaus Funke und Ulf Ziemann  
**Assessment and modulation of cortical inhibition using  
transcranial magnetic stimulation** — A9

Sebastian Rumpf, Sandra Rode, Rafael Krumkamp und  
Svende Herzmann  
**Mechanismen des Neuritischen Prunings** — 23

Sebastian Rumpf, Sandra Rode, Rafael Krumkamp and  
Svende Herzmann  
**Mechanisms of Neurite Pruning** — A19

Knut Kirmse und Knut Holthoff  
**Funktionen der GABAergen Übertragung im unreifen  
Gehirn** — 30

Knut Kirmse und Knut Holthoff  
**Functions of GABAergic transmission in the immature  
brain** — A27

Thomas Künzel und Hermann Wagner  
**Cholinerge Rückkopplungen auf den auditorischen  
Hirnstamm** — 38

Thomas Künzel und Hermann Wagner  
**Cholinergic top-down influences on the auditory  
brainstem** — A35

## Forschungsförderung

Alexander Gottschalk  
**DFG Schwerpunktprogramm (SPP) 1926  
“Next Generation Optogenetics – Tools and  
Application”** — 49

## Rezension

Anja Hoffmann  
**Joachim Müller-Jung (Hrsg.): Hirnforschung 8: Sprache  
und Kommunikation (F.A.Z.-Hörbuch)** — 51

Arno Villringer  
**Ich glaub, mich trifft der Schlag: Warum das Gehirn tut,  
was es tun soll, oder manchmal auch nicht** — 53

## Nachruf

Rolf Sprengel  
**Peter H. Seeburg (21.8.1944–22.8.2016)** — 55

## Nachrichten

**Einladung zur Mitgliederversammlung auf der  
12. Göttinger Tagung der Neurowissenschaftlichen  
Gesellschaft (22.–25. März 2017)** — 58

**Reisestipendien für Göttinger Tagung 2017  
vergeben** — 58

**Ausblick** — 59





## Editorial

# Mehr als nur ein neuer *Look*

DOI 10.1515/nf-2016-1111

Sie halten die neueste Ausgabe des Neuroforums in Ihren Händen. Beginnend mit der ersten Ausgabe im Jahr 2017 hat sich beim Neuroforum vieles geändert, und einiges ist neu. Nach 21 Jahren beim Springer Spektrum Verlag hat sich der Vorstand der Neurowissenschaftlichen Gesellschaft im vergangenen Jahr entschlossen, den Verlag zu wechseln. Zukünftig wird nicht nur die deutsche Druckversion des Neuroforums, sondern auch die deutsche und die englische online-Fassung, das e-Neuroforum, über den De Gruyter Verlag veröffentlicht und vertrieben. Der internationale De Gruyter Verlag besteht seit über 260 Jahren, hat seinen Hauptsitz in Berlin und veröffentlicht jährlich über 1.300 neue Buchtitel und mehr als 750 Zeitschriften. Wir erhoffen uns vom Wechsel zu De Gruyter eine professionellere Unterstützung beim Produktionsprozess und bei der Herausgabe unserer Zeitschrift.

Übersichtsartikel werden weiterhin den Kern eines jeden Neuroforum-Heftes darstellen, wobei fortan fünf statt bisher durchschnittlich drei Artikel pro Ausgabe publiziert werden. Neu ist, dass alle Beiträge über *ScholarOne* eingereicht und auch begutachtet werden. Auf der Neuroforum-Website von De Gruyter können interessierte Leser *Email alerts* und *Electronic table of contents* anfordern, um so über neu publizierte Artikel aktuell informiert zu sein. Begleitmaterialien zu den Übersichtsartikeln, wie Videos und Bilder mit hoher Auflösung, können kostenfrei über die Neuroforum-Website veröffentlicht werden. Dort werden in Kürze auch alle Ausgaben von Neuroforum, beginnend im Jahr 1995, als PDF zur Verfügung stehen.

In den nächsten Jahren können ausgewählte Übersichtsartikel kostenfrei im *Open access* publiziert werden. Wir erhoffen uns von diesen Erneuerungen eine bessere nationale und internationale Sichtbarkeit. Das wird sicherlich auch zu einer erhöhten Zitation von im Neuroforum und e-Neuroforum publizierten Artikeln führen.

Wir hoffen, dass Ihnen das neue Neuroforum gefällt und dass Sie den vom NWG-Vorstand eingeschlagenen Weg unterstützen. In diesem Sinne freuen wir uns auch zukünftig über Vorschläge für interessante und spannenden Übersichtsartikel aus den Neurowissenschaften.

Mit freundlichen Grüßen



Heiko J. Luhmann

Editor-in-Chief Neuroforum



Eckhard Friauf

NWG-Präsident

## Übersichtsartikel

Joachim W. Deitmer\*, Shefeeq M. Theparambil, Iván Ruminot und Holger M. Becker

# Unser hungriges Gehirn: Welche Rolle spielen Gliazellen bei der Energieversorgung?

DOI 10.1515/nf-2016-1102

**Zusammenfassung:** Unser Gehirn, das etwa 2 % unseres Körpergewichts ausmacht, beansprucht bis zu 20 % unseres Energiebedarfs. Die Versorgung aller Gehirnzellen, die besonders beim Menschen sehr dicht gepackt sind, mit ausreichend Energiesubstraten ist eine große logistische Herausforderung. Das wichtigste Energiesubstrat für unser Gehirn ist Glukose, die über den Blutkreislauf ins Gehirn gelangt. Glukose wird dabei nicht nur direkt von den Nervenzellen genutzt, sondern vor allem auch von Gliazellen aufgenommen, die es dann zum erheblichen Teil als Energiereserve in Form von Glykogen speichern oder als Milchsäuresalz (Laktat) an die Nervenzellen weitergeben können. Laktat seinerseits kann dann in Nervenzellen in Pyruvat umgewandelt und mithilfe von Sauerstoff effizient für die Bildung von chemischer Energie in Form von ATP genutzt werden. Das metabolische Zwischenprodukt Laktat spielt somit eine wichtige Rolle als energiereiches Substrat, das zwischen den Zellen sowohl unter aeroben wie anaeroben Bedingungen ausgetauscht wird. Der Transport von Laktat über die Zellmembran geschieht im Kotransport mit Protonen ( $H^+$ ), welche ihrerseits entscheidende Regulatoren verschiedener Stoffwechselprozesse und Membrantransporter sind. Die Laktat-Carrier bilden zudem ein funktionelles Netzwerk mit Carboanhydrasen, Enzymen, die nicht nur das Gleichgewicht zwischen Kohlendioxid, Hydrogenkarbonat ("Bikarbonat") und Protonen beschleunigen, sondern auch den Laktattransport begünstigen. In diesem Artikel legen wir ein besonderes Augenmerk auf physiologische Prozesse des Energiestoffwechsels in Gliazellen sowie den Transfer energiereicher Substrate an Nervenzellen, Abläufe, die wiederum durch

den pH-Wert und seine Regulation in Gliazellen wesentlich beeinflusst werden.

**Schlüsselwörter:** Zucker; Laktat; pH; Membrantransport; Carboanhydrasen

## Einleitung

Das Gehirn eines erwachsenen Menschen macht etwa 2 % seines Körpergewichts aus (ca. 1400 g), verbraucht aber bis zu 20 % der gesamten Energie, die unser Körper benötigt. Nur durch ausreichend hochwertige, d. h. protein- und zuckerhaltige Nahrungsaufnahme, konnte sich unser Gehirn im Laufe unserer Evolution zu einem Hochleistungsorgan entwickeln. Die Funktionen unseres Gehirns hängen ganz unmittelbar von der ausreichenden Zufuhr von Sauerstoff und energiereichen Nährstoffen ab. Die Lieferung dieser Stoffe erfolgt über das Blutgefäßsystem, das einerseits das Gehirn mit ausreichend Blut versorgen und andererseits die Nährstoffe im Gehirn in alle Bereiche verteilen muss. Unser Kreislaufsystem im Gehirn besteht aus ca. 600 km Gefäße und macht fast ein Drittel des Gehirnvolumens aus. Dennoch erreichen die Blutkapillaren bei Weitem nicht alle Zellen des Gehirns, von denen es hundert Milliarden Nervenzellen (Neurone) und mindestens ebenso viele Gliazellen in unserem Gehirn gibt. Jede dieser Zellen muss mit genügend Energie versorgt werden, damit sie ihre Funktionen ohne Beeinträchtigung ausüben kann. Das ist eine ungeheure logistische Aufgabe, die ein komplexes Netzwerk von Verteilung und Nutzung energiereicher Substrate benötigt. Diese Aufgabe geht von der Regulation des zerebralen Blutflusses bis hin zur effizienten Verarbeitung der Substrate durch jede einzelne Zelle und deren anatomischen Spezialisierungen wie Synapsen und Nervenfasern. Wie bewältigt unser Gehirn diese enorme Aufgabe?

**\*Korrespondenzautor:** Dr. Joachim W. Deitmer, Fachbereich Biologie, TU Kaiserslautern, Postfach 3049, 67653 Kaiserslautern, E-Mail: deitmer@bio.uni-kl.de, Tel.: +49 631 2052877

**Dr. Shefeeq M. Theparambil**, Fachbereich Biologie, TU Kaiserslautern, Postfach 3049, 67653 Kaiserslautern

**Dr. Iván Ruminot**, Fachbereich Biologie, TU Kaiserslautern, Postfach 3049, 67653 Kaiserslautern

**Dr. Holger M. Becker**, Fachbereich Biologie, TU Kaiserslautern, Postfach 3049, 67653 Kaiserslautern

## Liegt das Geheimnis des Energiehaushaltes in einer Aufgabenteilung?

Unter den Gehirnzellen unterscheidet man Nervenzellen und Gliazellen, von denen es jeweils wiederum verschiedenen Typen und zahlreiche unterschiedliche “Aufgabenträger” gibt. Neurone verbrauchen dabei deutlich mehr Energie als Gliazellen, weil die Funktion der Synapsen, die chemisch-elektrischen Verbindungsstellen zwischen den Neuronen, sehr viel Energieverbrauch nach sich ziehen. Auch für die Fortleitung der elektrischen Impulse entlang der Nervenfasern wird viel Energie aufgewendet, nicht so sehr, weil ein Impuls viel Energie benötigt, sondern wegen der sehr großen Anzahl von Impulsen, mit denen gleichzeitig in unserem Gehirn Informationen von einem Teil in andere Bereiche des Gehirns geschickt werden. In beiden Fällen, an Synapsen und an Nervenfasern, fließen kleine Ströme, die von Ionen getragen werden und entlang ihres elektrochemischen Gradienten fließen. Zusätzlich wird besonders der Natriumgradient über die Zellmembran

energetisch genutzt, um die Überträgerstoffe (Neurotransmitter), die für die Übermittlung der Information an Synapsen zwischen den Neuronen freigesetzt werden, wieder in Zellen aufzunehmen. Um die Ionengradienten aufrecht zu erhalten, müssen die Ionen, vor allem Natrium, Kalium, Wasserstoff, Kalzium, Chlorid und Hydrogenkarbonat (Bikarbonat) gegen ihre Gradienten transportiert werden, um den ursprünglichen Zustand wiederherzustellen (“ionale Homöostase”). Es ist dieser Transport von Ionen gegen ihre Gradienten, der im Gehirn – und ebenso in vielen anderen Organen – die meiste Energie kostet. Letztlich sind es die ATP-spaltenden Transportenzyme, allen voran die ‘Natrium-Kalium-Pumpe’ (oder ‘Na-K-ATPase’, hier abgekürzt Na-K-Pumpe) und die Kalziumpumpe (oder ‘Ca-ATPase’), die einen Großteil der in ATP gespeicherten Energie verbrauchen. Die Na-K-Pumpe in der Zellmembran schafft in einem komplexen Zyklus unter Spaltung von ATP entgegen den elektrochemischen Gradienten Natrium-Ionen aus der Zelle heraus und Kalium-Ionen in die Zelle hinein (im Verhältnis 3 Natrium-Ionen zu 2 Kalium-Ionen). Kalzium hingegen wird sowohl aus der Zelle hinaus als auch in intrazellulären Speicher (Endoplasmatisches Retikulum,

**F · S · T<sup>®</sup>**  
FINE SCIENCE TOOLS

## Blueprint for Exceptional Customer Service

Since the inception of Fine Science Tools in 1974, it has been our goal to provide the highest quality surgical and microsurgical instruments to meet your research needs. To be sure we meet your high standards, every product we sell comes with our 100% satisfaction guarantee. If, for any reason, you are not completely satisfied with your purchase, you may return it for a full refund.

FINE SURGICAL INSTRUMENTS FOR RESEARCH™

Visit us at [finescience.de](https://www.finescience.de) or call +49 (0)6221 90 50 50



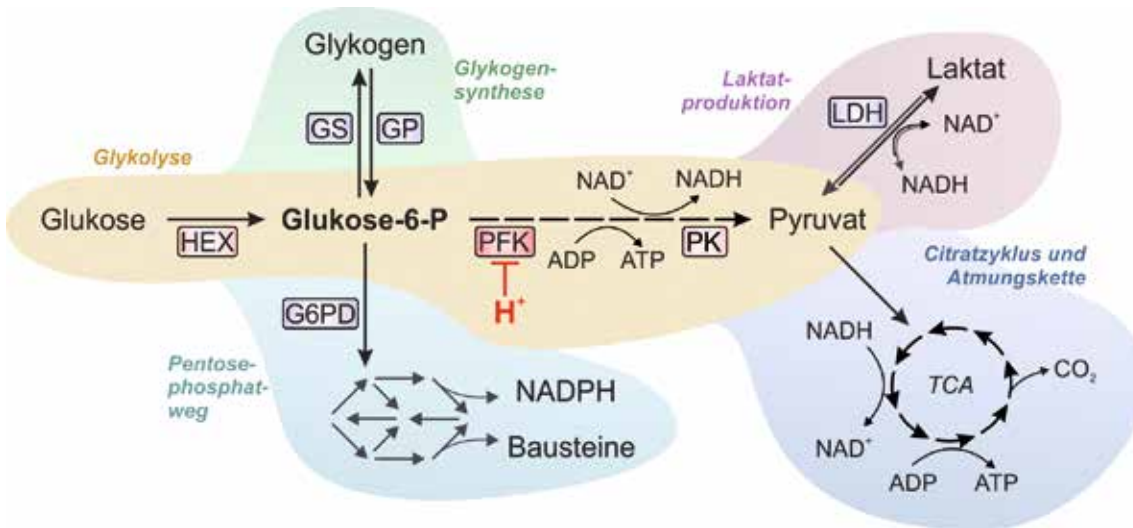


Mitochondrien) gegen steile Gradienten gepumpt, oft im Austausch mit Protonen (Deitmer und Rose, 2010).

Gliazellen helfen den Neuronen dabei, die ionale Homöostase aufrecht zu erhalten, Neurotransmitter aus dem synaptischen Spalt aufzunehmen und vermutlich auch in einzigartiger Weise, Neurone mit energiereichen Substraten zu versorgen. Dass Gliazellen Neurone “ernährend” unterstützen, hatte schon Camillo Golgi (Pavia, Italien) Ende des 19. Jahrhunderts aufgrund histologischer Befunde vermutet (Golgi, 1882–1883). Mit einigen Aspekten dieses metabolischen Zusammenspiels von Nerven- und Gliazellen wollen wir uns in diesem Artikel etwas eingehender befassen.

## Zucker und Milchsäure sind wichtige Energiesubstrate im Gehirn

Die systemische Blutzufuhr liefert die wichtigsten Energiesubstrate ins Gehirn: Glukose und Sauerstoff. Mithilfe des Sauerstoffs kann die Glukose effizient in Energie in Form von ATP umgesetzt werden (“oxidative Phosphorylierung”). Glukose wird über Glukosetransporter (GLUT) in den Blutendothelzellen, vom Blut ins Gehirngewebe transportiert. Da diese GLUTs lediglich den Transport entlang des chemischen Gradienten von Glukose begünstigen (“faszilitierender Transport”), liegt die Glukosekonzentration im Gehirngewebe nie höher vor als im Blut, wo es



**Abb. 1:** Glukosestoffwechsel. Die Glykolyse bildet das Rückgrat des Kohlenhydratstoffwechsels sämtlicher eukaryotischer Lebewesen. Zusammen mit ihrem anabolen Zweig, dem Pentosephosphatweg, erfüllt sie drei essenzielle Funktionen: (1) Die Versorgung der Mitochondrien mit Treibstoff in Form von Pyruvat, (2) die Produktion von Bausteinen für die Biosynthese und (3) die Herstellung von Reduktionsmitteln für Biosynthese und Antioxidanzien. Den ersten Schritt der Glykolyse bildet die Phosphorylierung der Glukose zu Glukose-6-phosphat durch das Enzym Hexokinase (HEX). Durch diese irreversible Reaktion wird zum einen Glukose in der Zelle “gefangen” und angereichert; zum anderen dient Glukose-6-phosphat als Ausgangspunkt für verschiedene metabolische Pfade: (1) Im Rahmen der Glykogensynthese kann Glukose-6-phosphat zu Glykogen (“tierischer Stärke”) umgewandelt und gespeichert werden. Diese, durch das Enzym Glykogensynthase (GS) katalysierte Reaktion findet im Gehirn nahezu ausschließlich in Astrozyten statt. Bei Bedarf kann das Glykogen mittels des Enzyms Glykogenphosphorylase (GP) wieder mobilisiert und verstoffwechselt werden. (2) Über den Pentosephosphatweg dient Glukose-6-phosphat zur Produktion von Bausteinen für die Biosynthese und zur Regeneration des Reduktionsmittels Nicotinamadenindinukleotidphosphat (NADPH). Die Einspeisung von Glukose-6-phosphat in den Pentosephosphatweg wird durch das Enzym Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PD) kontrolliert. (3) In der Glykolyse wird Glukose-6-phosphat unter Gewinnung von Adenosintri-phosphat (ATP) und der Umwandlung der oxidierten Form von Nicotinamadenindinukleotid (NAD<sup>+</sup>) in dessen reduzierte Form (NADH) zu Pyruvat verstoffwechselt. Kontrolliert wird die Glykolyse von drei irreversiblen Reaktionen, welche durch die Enzyme Hexokinase (HEX), Phosphofruktokinase (PFK) und Pyruvatkinase (PK) katalysiert werden. Innerhalb der Zelle wird die katalytische Aktivität der PFK durch eine Erhöhung der Protonenkonzentration (Ansäuerung) inhibiert, wodurch sich eine direkte Kontrolle der Glykolyse durch den intrazellulären pH-Wert ergibt. Das aus der Glykolyse entstandene Pyruvat kann nun in die Mitochondrien transportiert und dort in Citratzyklus (TCA) und anschließender oxidativer Phosphorylierung in der Atmungskette weiter metabolisiert werden. Alternativ kann Pyruvat, katalysiert durch das Enzym Laktatdehydrogenase (LDH), reversibel in Laktat umgewandelt werden, wobei das in der Glykolyse verbrauchte NAD<sup>+</sup> regeneriert wird. Die Regulation der einzelnen Schlüsselenzyme und damit der verschiedenen Stoffwechselwege hängt vom Zelltyp ab. So scheint in Astrozyten die Produktion von Glykogen und Laktat vorzuherrschen, während in Neuronen die aufgenommene Glukose vor allem im Pentosephosphatweg verstoffwechselt wird, und die Energiegewinnung über die “Verbrennung” von Laktat erfolgt.

auf ca. 5 mM reguliert wird. Tatsächlich liegt Glukose im Gehirngewebe aber viel niedriger vor, meist nur zwischen 1–2 mM, da es über weitere GLUTs in der Zellmembran von Nerven- und Gliazellen rasch in die Zellen aufgenommen wird. Einmal aufgenommen, wird Glukose sofort phosphoryliert (zu Glukose-6-phosphat), sodass ständig ein Gradient von Glukose einerseits von Blut zu Gehirngewebe und zum anderen ins Innere der Zellen vorliegt. Dies stellt eine permanente Aufnahme von Glukose ins Gehirn und in die Zellen sicher. Astrozyten, die mit ihren Endfüßchen (Zellfortsätze, die sich auf den Blutgefäßen “breiten”) über 99 % der Blutkapillaren bedecken, scheinen dadurch den direktesten Zugang zu der von Blutgefäßen angelieferten Glukose zu haben und nehmen Glukose über den GLUT1 auf. Neurone nehmen Glukose mittels GLUT3 aus dem Gehirngewebe auf. Nach ihrer Phosphorylierung kann Glukose in den Zellen dann unmittelbar in die Glykolyse (Spaltung der Glukose) eingespeist werden (Abb. 1). In Astrozyten, und möglicherweise auch in einigen wenigen Neuronen, kann Glukose dazu genutzt werden, Energiespeicher in Form von Glykogen anzulegen. Glykogen ist ein

großes Molekül, in dem Tausende von Glukosemolekülen verkettet sind. Kommt es zu einem Zuckermangel im Gehirn, so kann das Glykogen wieder zu Glukose-6-phosphat abgebaut und in die Glykolyse eingespeist werden.

In der Glykolyse finden enzymatische Prozesse statt, die äußerst pH-abhängig sind und durch  $H^+$  unmittelbar reguliert werden, so wie vor allem die Phosphofruktokinase (PFK, Abb. 1). Endprodukt der Glykolyse ist das Pyruvat, ein Molekül mit 3 C-Atomen; d. h. aus einem Glukosemolekül entstehen durch die Glykolyse 2 Pyruvat-Moleküle. Pyruvat wird einerseits in die Mitochondrien aufgenommen und dort in weiteren enzymatischen Schritten der oxidativen Phosphorylierung zugänglich gemacht, die mit Sauerstoff den Großteil des energiereichen ATPs herstellt. Während in der Glykolyse netto 2 ATP-Moleküle erzeugt werden, sind es in der oxidativen Phosphorylierung deren 34.

Pyruvat kann aber auch, statt in die Mitochondrien transportiert zu werden, im Cytosol in eine ganz ähnliche Substanz umgewandelt werden, nämlich in Laktat, dem Anion der Milchsäure. Laktat ist ebenfalls ein Molekül mit drei C-Atomen und aus ihm können, ähnlich wie aus Py-



# Thomas RECORDING GmbH

High Tech Made in GERMANY - [info@ThomasRECORDING.com](mailto:info@ThomasRECORDING.com)

## Thomas Wireless System

4 recording channels  
1 stimulation channel  
Implantable electrodes



Wireless Solutions for Neuroscience

## Thomas Dual Stimulator

Wireless neurostimulator  
2 stimulation channels  
Implantable electrodes



Visit us at the 12th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society  
Booth #21

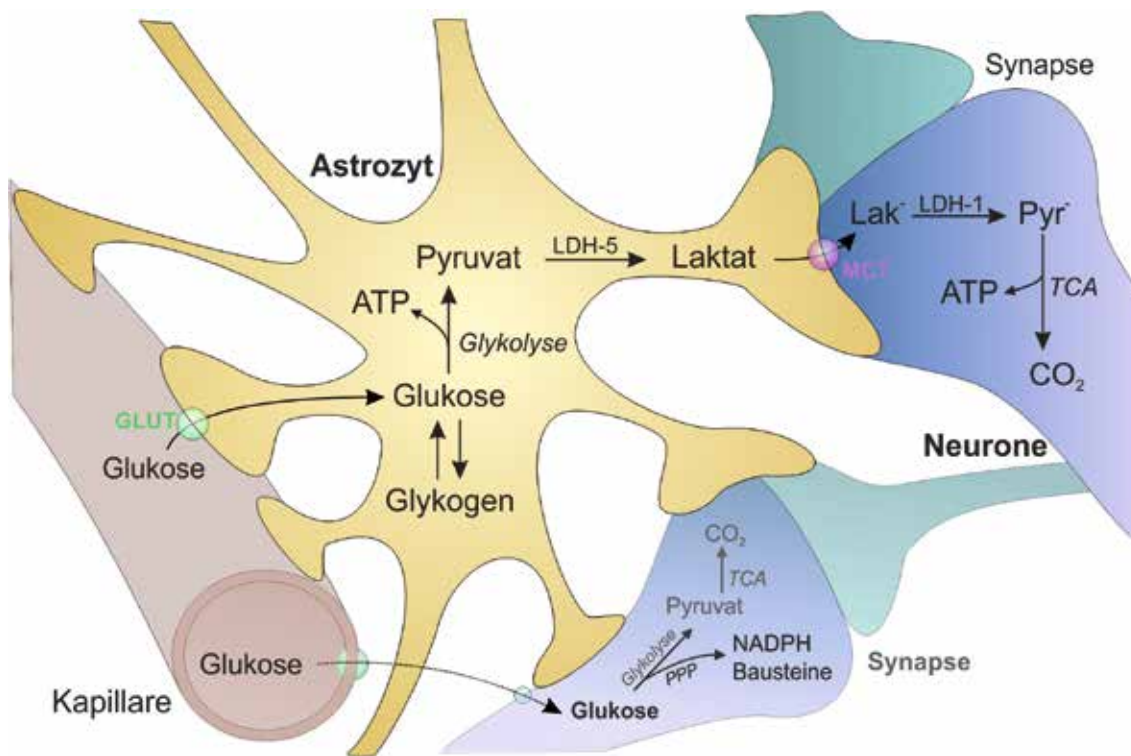
[www.ThomasRECORDING.com](http://www.ThomasRECORDING.com)

ruvat, 16–17 ATP-Moleküle produziert werden (das wären pro Glukosemolekül dann bis zu 34 ATP-Moleküle). Die Umwandlung von Pyruvat in Laktat geschieht in einem einzigen, reversiblen, enzymatischen Schritt mithilfe der Laktatdehydrogenase (LDH). Dieses Enzym hat mehrere Isoformen, die u. a. darüber entscheiden, ob Pyruvat in Laktat oder Laktat in Pyruvat umgewandelt wird. Dies ist ein wichtiges Kriterium, um zu erklären, ob und warum manche Zellen Laktat auch unter aeroben Bedingungen anhäufen und an benachbarte Zellen abgeben können. Dieser Transfer von Laktat von einer Zelle zur anderen scheint im Gehirn, aber nicht nur dort, eine wichtige Rolle bei der Energieverteilung zu spielen. Nach der Astrozyten-Neuronen-Laktat-Shuttle (ANLS)-Hypothese (Brooks, 2009; Magistretti et al., 1999) wird Glukose in Astrozyten

hauptsächlich bis zum Pyruvat abgebaut, das dann mit der LDH-5 in Laktat umgewandelt und an die Neurone abgegeben wird (Abb. 2). Neurone wandeln Laktat wieder mit der LDH-1 in Pyruvat um, das zur weiteren Energiegewinnung in die oxidative Phosphorylierung geschleust wird. Die Prozesse des Laktattransfers sollen nun etwas detaillierter erörtert werden.

## Die ANLS-Hypothese und der Transport von Laktat

Es besteht weitgehend Konsens in der Fachliteratur, dass Neurone deutlich mehr Energie verbrauchen als Gliazel-



**Abb. 2:** Die Astrozyten-Neuronen-Laktat-Shuttle-Hypothese. Die Astrozyten-Neuronen-Laktat-Shuttle (ANLS)-Hypothese besagt, dass Astrozyten Glukose zu Laktat verstoffwechseln, welches an die Neurone transferiert und dort auch unter aeroben Bedingungen zur Energiegewinnung genutzt wird. Glukose wird von den Astrozyten, welche mit ihren Endfüßchen direkten Kontakt zu den Endothelzellen der Kapillaren haben, aus dem Blut aufgenommen. Die Aufnahme von Glukose erfolgt dabei über den Glukosetransporter (GLUT) Isoform 1. In den Astrozyten kann Glukose entweder als Glykogen gespeichert oder in der Glykolyse, unter Gewinnung von ATP, zu Pyruvat verstoffwechselt werden. Pyruvat wird anschließend durch das Enzym Laktatdehydrogenase Isoform 5 (LDH-5) in Laktat umgewandelt und an die Neurone transferiert. Hierzu wird das Laktat über die Monocarboxylat-Transporter (MCT) Isoform 1 und 4 aus den Astrozyten exportiert und über den MCT Isoform 2 in die Neurone importiert. In den Neuronen wird das Laktat dann mittels des Enzyms Laktatdehydrogenase Isoform 1 (LDH-1) wieder in Pyruvat umgewandelt und unter Gewinnung von ATP in Citratzyklus (TCA) und anschließender oxidativer Phosphorylierung metabolisiert. Neben Laktat nehmen Neurone auch Glukose aus dem Parenchym auf, welche sie über den Glukose-Transporter Isoform 3 importieren. Die aufgenommene Glukose kann entweder mittels Glykolyse, Citratzyklus und anschließender oxidativer Phosphorylierung zur Energiegewinnung genutzt, oder im Pentosephosphatweg (PPP) zur Produktion von Bausteinen für die Biosynthese und des Reduktionsmittels NADPH verwendet werden.

len (Harris und Attwell, 2012), und daher wurde lange angenommen, dass sie auch das meiste an Glukose verarbeiten. Es wird aber seit etwa 20 Jahren die Frage diskutiert, ob sie Glukose *direkt* verarbeiten, um ihren Energiebedarf zu decken, oder ob sie einen Teil mit Laktat decken, den ihnen Astrozyten überlassen. Obwohl die ANLS-Hypothese (Abb. 2) nicht von allen geteilt wird (Dienel, 2014), hat es gerade in den letzten Jahren viele Befunde gegeben, die die ANLS-Hypothese nachhaltig unterstützen (zusammengefasst in Magistretti und Allaman, 2015; Barros und Deitmer, 2010). Die wichtigsten Indizien sind: (1) Astrozyten haben den direkteren Zugang zu den vom Blut gelieferten Nährstoffen einschließlich der Glukose; (2) Astrozyten besitzen die LDH-Isoform 5, die Pyruvat in Laktat umwandelt, und Neurone haben vorwiegend LDH-Isoform 1, die Laktat in Pyruvat umwandelt; (3) die zellabhängige Expression verschiedener Isoformen von Laktat-Transportern in Astrozyten und Neuronen sprechen für einen Transfer von Laktat von Astrozyten zu Neuronen (später mehr über diese Transporter); (4) Laktat kann synaptische und andere neuronale Funktionen in Abwesenheit

von Glukose erhalten bzw. wiederherstellen (Schurr et al., 1988). Der Vorteil für Neurone, Laktat aufzunehmen, in Pyruvat umzuwandeln und dieses in den Mitochondrien zu verarbeiten, wäre, dass sie die aufwändige Glykolyse zumindest z. T. umgehen könnten. Denn es ist die oxidative Phosphorylierung, und nicht die Glykolyse, die in großer Menge ATP bildet, solange die Sauerstoffversorgung gewährleistet ist. Astrozyten hingegen könnten ihren geringeren Energieverbrauch auch weitgehend durch die Glykolyse decken. Zudem erlaubt die Energiegewinnung durch Laktat es den Neuronen, einen Teil der aufgenommenen Glukose nicht in der Glykolyse zu “verbrennen”, sondern im Pentosephosphatweg zur Herstellung von Antioxidantien und Ausgangsstoffen für die Biosynthese zu nutzen (Abb. 1).

Sicher scheint, dass beide Zelltypen, Neurone wie Astrozyten, sowohl Glykolyse als auch oxidative Phosphorylierung betreiben, aber, nach der ANLS-Hypothese, sind die Gewichte unterschiedlich verteilt; Neurone sind vorrangig *oxidativ*, und Astrozyten sind hauptsächlich *glykolytisch* aktiv. Die Gewichtung kann wahrscheinlich

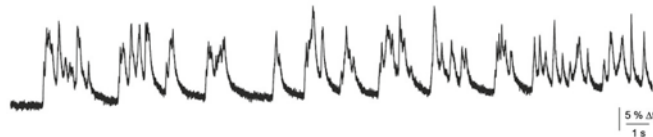
## FiberOptoMeter II

### FOM-02M

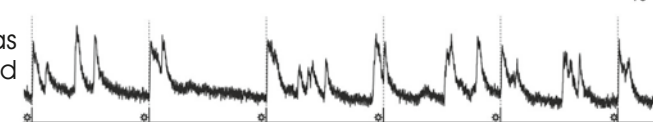
Optogenetic Stimulation and Fluorescence  
Measurement *via* the Same Fiber  
**Now available with 2 Detectors**

OGB-1 Fluorescence Measurement *via* a 200  $\mu\text{m}$  Fiber

Slow calcium waves,  
spontaneous activity



Same measurement as  
above, evoked (\*) and  
spontaneous slow  
calcium waves



Data kindly provided by  
Dr. A. Stroh and M. Schwalm, Mainz



**npi**  
Electronic Instruments  
for the Life Sciences

*made to measure*

**npi electronic GmbH**

Phone: +49-(0)7141-97302-30  
<http://www.npielectronic.com>  
[support@npielelectronic.com](mailto:support@npielelectronic.com)

REF: Justus et al. (2016), Nat. Neurosci. <http://dx.doi.org/10.1038/nn.4447>

Adelsberger et al. (2014), Cold Spring Harb Protoc. <http://dx.doi.org/10.1101/pdb.prot084145>

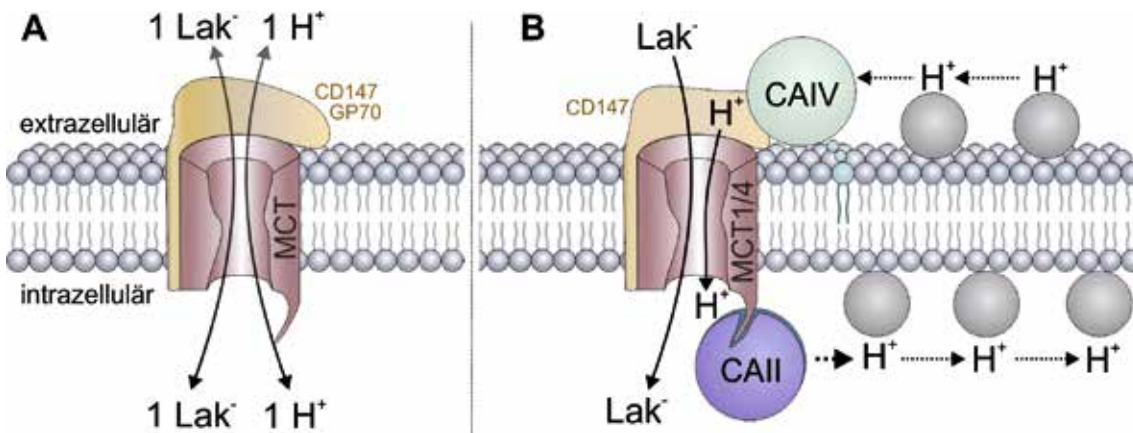


bei der Vielzahl verschiedener Subtypen von Neuronen wie Astrozyten sowie für Gehirnregionen unterschiedlich sein, mehr oder weniger stark oxidative Neurone und mehr oder weniger stark glykolytische Astrozyten, wobei glykolytische Neurone und oxidative Astrozyten wohl eher die Ausnahmen sind.

Eine entscheidende Rolle kommt nach der ANLS-Hypothese dem Transport von Laktat über die Zellmembranen zu, aus den Astrozyten heraus und in die Neurone hinein. Dieser Transport wird von drei Isoformen der Monocarboxylat-Transporterfamilie (MCT) durchgeführt, MCT1, MCT2 und MCT4, mit denen sich unsere Arbeitsgruppe in den letzten 20 Jahren ausführlich beschäftigt hat (Deitmer et al., 2015). Die MCT-Familie (*SLC16*) umfasst 14 Isoformen, von denen MCT1-4 Monocarboxylatanionen in einer 1 : 1 – Stöchiometrie mit  $H^+$  transportieren (Abb. 3

A). Der Transport ist also elektroneutral, d. h. er generiert keinen Strom über die Zellmembran. Einbau dieser MCTs in die Zellmembran und Transportaktivität werden durch Hilfsproteine vermittelt, und zwar Basigin (CD147) oder Embigin (GP70).

Es galt zunächst die Transporteigenschaften der MCTs für Laktat und andere Substrate zu charakterisieren, was wir durch heterologe Expression der MCT-Isoformen in Froschzellen (Oozyten von *Xenopus laevis*) in Zusammenarbeit mit Stefan Bröer durchführten (Bröer et al., 1998, 1999; Dimmer et al., 2000). In Ergänzung dazu haben verschiedene Arbeitsgruppen die Bedeutung der MCTs für den Energiemetabolismus im Gehirn erarbeitet. MCT1 ist danach der ubiquitäre Laktattransporter in nahezu allen Geweben und Organen mit einer mittleren Affinität für Substrate ( $K_m$  für Laktat 3–5 mM). MCT2 ist ein hochaffi-



**Abb. 3:** Monocarboxylat-Transporter: Stöchiometrie und Interaktion mit Carboanhydrasen. (A) Die Monocarboxylat-Transporter (MCT) Isoform 1 bis 4 transportieren Monocarboxylate, wie Laktat, Pyruvat sowie die Ketonkörper Acetoacetat und  $\beta$ -Hydroxybutyrat über die Zellmembran, wobei die Affinität der Transporter für die Substrate zwischen den einzelnen Isoformen variiert. Zudem vermitteln MCTs auch den Transport verschiedener Wirkstoffe mit ähnlicher Struktur, wie Valproinsäure (ein Antiepileptikum), Atorvastatin (Markennamen Sortis®, Atorvalan®, Lipitor®, eingesetzt zur Senkung des Cholesterinspiegels), Nateglinid (Markenname Starlix®; ein Mittel gegen Typ-2-Diabetes) und Nikotinsäure über die Plasmamembran der Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes und der Niere, sowie über die Blut-Hirn-Schranke. Der Transport der Monocarboxylat-Anionen erfolgt stets im Symport mit einem Proton ( $H^+$ ), ist also elektroneutral. Die Transportrichtung folgt den Substratgradienten, d. h. der Import oder Export der Monocarboxylate hängt von deren intra- und extrazellulären Konzentrationen sowie den intra- und extrazellulären pH-Werten ab. MCTs benötigen bestimmte Hilfsproteine, welche für die Lokalisation der Transporter in der Zellmembran und ihre Transportaktivität unerlässlich sind. Die Isoformen MCT1, MCT3 und MCT4 interagieren hierbei mit dem Protein CD147 (Basigin, EMMPRIN), während MCT2 primär mit GP70 (Embigin) interagiert. (B) MCTs können mit verschiedenen Isoformen von Carboanhydrasen (CAs) funktionelle Proteinkomplexe, sogenannte "Transport-Metabolons", bilden, wodurch die Transportaktivität der MCTs gesteigert wird. So bildet beispielsweise MCT1 ein Transport-Metabolon mit den Carboanhydrasen CAII und CAIV, wobei die intrazelluläre CAII an den C-Terminus des Transporters bindet, während die extrazellulär lokalisierte CAIV vermutlich nicht direkt mit dem MCT, sondern mit dessen Hilfsprotein, CD147, interagiert. Im Gegensatz zu anderen Transport-Metabolons wird die Erhöhung der Transportrate der MCTs nicht durch die katalytische Aktivität der Carboanhydrasen vermittelt. Diese scheinen vielmehr als eine "Protonen-antenne" für den MCT zu fungieren, welche den raschen Austausch von Protonen zwischen dem Transporter und verschiedenen protonierbaren Stellen in seiner unmittelbaren Umgebung vermittelt. Im Falle des Transport-Metabolons aus MCT1, CAII und CAIV würde während des Imports von Laktat CAIV Protonen von protonierbaren Stellen auf der extrazellulären Seite der Zellmembran abziehen und an den MCT1 abgeben, während auf der intrazellulären Seite CAII Protonen vom Transporter abziehen und an umliegende protonierbare Stellen weitergeben würde. Während des Exports von Laktat würde CAII auf der intrazellulären Seite dem Transporter Protonen zur Verfügung stellen, während CAIV diese auf der extrazellulären Seite wieder entfernt. Durch diesen Protonenshuttle würde der Protonengradient in unmittelbarer Nähe des Transporters stabilisiert und die Aktivität des Transporters erhöht.



ner Laktattransporter ( $K_m$  für Laktat 0,5–1 mM), und wird im Gehirn vor allem, möglicherweise ausschließlich, von Neuronen, vor allem in postsynaptischen Regionen, exprimiert. MCT4 ist ein niedrigaffiner Laktattransporter ( $K_m$  für Laktat 17–35 mM) mit hoher Kapazität, der im Gehirn vorwiegend in Astrozyten exprimiert wird. Die  $K_m$ -Werte legen nahe, dass MCT1 sowohl für Import wie Export von Laktat in und aus den Zellen verantwortlich sein kann, während mittels MCT2 eher Aufnahme von Laktat und mittels MCT4 eher Abgabe von Laktat erfolgen könnte.

Wenn wir den Weg des Laktats im Gehirn, einerseits aus dem Blut ins Gehirnparenchym und andererseits von Astrozyten in die Neurone betrachten, so könnte Laktat über die Endothelzellen der Blutkapillaren mithilfe des MCT1 sowohl vom Blut ins Gehirn als auch vom Gehirn ins Blut transportiert werden. MCT2 in Neuronen würde eine Aufnahme von Laktat favorisieren, während MCT1 und MCT4 in Astrozyten Abgabe und Aufnahme von Laktat ermöglichen.

## pH-Wert und Carboanhydrasen spielen besondere Rollen für MCT-Transportaktivität

Aufgrund des Kotransports von organischen Anionen mit Protonen spielt der pH-Wert im Gewebe, in den Zellen sowie der  $H^+$ -Gradient über die Zellmembran eine wichtige regulatorische Rolle für die Aktivität von MCT1-4. So begünstigt eine extrazelluläre Ansäuerung den Transport von Laktat in die Zellen, andererseits kann Laktattransport aus den Zellen heraus oft nur gegen einen  $H^+$ -Gradienten erfolgen, bedarf also eines robusten Laktatgradienten von innen nach außen. Die Regulation des cytosolischen pH-Wertes spielt eine wichtige Rolle für die Aktivität der MCTs wie für alle  $H^+$ -gekoppelten Transportprozesse. Dafür ist in fast allen Zelltypen der Natrium-Protonen-Austausch ( $Na^+/H^+$ ) zuständig, unterstützt durch verschiedene  $HCO_3^-$ -gekoppelte Transporter. In Gliazellen spielt hier der elek-



WORLD  
PRECISION  
INSTRUMENTS  
*instrumenting scientific ideas*

### New Motorized Stereotaxic Frame

Increased Precision and Repeatability of motion over traditional manual Stereotaxic Frames.



- Accurate microstepping motor drive for high resolution placement
- Touch screen for ease of control
- Graphic controller display for instant operational feedback
- Brain atlas coordinates can be input into the controller, no computer required
- Coordinate distances are automatically calculated
- No more error resulting from reading Vernier scales

See us at the 12th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society, March 22-25, 2017 Booth 23

For more information please visit us at **wpi-europe.com**

World Precision Instruments Germany GmbH Tel +49 (0)30 6188845 E-Mail [wpide@wpi-europe.com](mailto:wpide@wpi-europe.com)

trogene Natrium-Bikarbonat- ( $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ ) Kotransporter (NBCe1, *SLC4A4*), der 2  $\text{HCO}_3^-$  mit 1  $\text{Na}^+$  membranpotenzialabhängig in beide Richtungen über die Zellmembran transportiert, eine herausragende Rolle. In kortikalen Astrozyten konnten wir eine überragende Beteiligung des NBCe1 an der cytosolischen pH-Regulation und pH-Pufferung feststellen (Theparambil et al., 2014; Theparambil und Deitmer, 2015), da der NBCe1 hocheffizient  $\text{HCO}_3^-$  in die Zelle hinein oder aus der Zelle heraus trägt, abhängig vom elektrochemischen Gradienten für diesen Carrier. Wir konnten zeigen, dass der NBCe1, koexprimiert in *Xenopus* Oozyten, den Laktattransport durch MCT1 erhöht (Becker et al., 2004) und die Glykolyse in Astrozyten moduliert (Ruminot et al., 2011).

Damit sich beim Laktattransport Protonen nicht rasch auf der einen oder anderen Seite der Zellmembran anreichern, kommt die  $\text{H}^+$ -Pufferstärke ins Spiel. Da  $\text{H}^+$  im Cytosol nur in sehr geringem Maße als freie Ionen vorliegen (30–100 nM) und überwiegend gebunden sind (10–30 mM), u. a. auch an intrazelluläre mobile  $\text{H}^+$ -Puffermoleküle (HB), die recht langsam diffundieren, kann es recht schnell zur lokalen Anreicherung von  $\text{H}^+$ /HB kommen. Solche lokalen  $\text{H}^+$ -Anreicherungen wirken dann wie eine Bremse für den weiteren Transport von  $\text{H}^+$  und Laktat, der durch eine geringe Pufferstärke zunehmend verlangsamt würde. Alles, was die  $\text{H}^+$ -Pufferstärke dagegen erhöht, begünstigt auch die Kapazität des Laktattransporters. Wesentlich an der Pufferstärke in Astrozyten ist der rasche Transport von  $\text{HCO}_3^-$  mittels des NBCe1. Und hier kommen die Carboanhydrasen ins Spiel, die in einzigartiger Weise mit der Transportaktivität der MCTs kooperieren (Becker et al., 2011, 2014).

Carboanhydrasen (CA) liegen in zahlreichen Isoformen in fast allen Zellen und Organismen vor und katalysieren die reversible Hydratation von Kohlendioxid ( $\text{CO}_2$ ), eine der wichtigsten biochemischen Reaktionen überhaupt ( $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$ ). Beim Menschen kennt man allein 15 CA-Isoformen, von denen einige cytosolisch, an/in Zellorganellen oder in der Zellmembran und extrazellulär aktiv sind. Offensichtlich spielt die Beschleunigung der Reaktion für Lebensvorgänge eine sehr wichtige Rolle, so wie bei der Atmung, der Nierenfunktion und in vielen Epithelien, und eben auch im Gehirn, wo vor allem die CA-Isoformen II, IV, XII und XIV vorliegen.

Koexpression von MCT1 und Carboanhydrase Isoform II (CAII), die aktivste und am weitesten verbreitete cytosolische Isoform, in *Xenopus*-Oozyten, führte zu unserer Überraschung zu einer deutlichen Steigerung des Laktattransports. Die Transportrate wurde um das 2–3-fache erhöht und ließ sich auch nicht durch Hemmung der katalytischen Aktivität der CAII unterdrücken. Eine enzymatisch

inaktive CAII-Mutante steigerte die MCT1-Transportrate wie die Wildtyp-CAII; damit haben wir eine erste nicht-enzymatische Funktion der CA zeigen können (Becker et al., 2011, 2014). Wir überprüften daraufhin die Frage, wie spezifisch die Interaktion zwischen MCT und CA ist und fanden, dass auch MCT2 und MCT4 mit einigen, aber nicht allen untersuchten CA-Isoformen interagieren. Wir stellten fest, dass diese Wechselwirkungen isoform-spezifisch sind; so interagiert CAII mit MCT1 und MCT4, nicht aber mit MCT2, während die extrazellulären CAIV und CAIX die Transportaktivität aller drei MCT-Isoformen erhöht und CAI und CAIII mit keiner der untersuchten MCT-Isoformen wechselwirken.

Bei der Aufklärung der Wirkmechanismen dieses funktionellen “Transport-Metabolons” (Becker et al., 2014, Deitmer et al., 2015) stellte sich heraus, dass die CA an den MCT bindet und dadurch als eine Art “Protonenantenne” die lokale  $\text{H}^+$ -Pufferstärke erhöht (Abb. 3 B) (Becker et al., 2011, Noor et al., 2015; Deitmer et al., 2015). Wir konnten dann zeigen, dass diese nicht-enzymatische Wechselwirkung zwischen MCT und CA nicht nur im heterologen Expressionssystem (Frosch-Oozyte) funktioniert, sondern auch in Astrozyten der Maus (Stridh et al., 2012).

## Schlußfolgerungen

Die globale Energieversorgung des Gehirns wie die auf zellulärer Ebene stellen komplexe Systeme von Stoffwechsel- und Transportprozessen dar, die hochgradig reguliert werden. Die pH-Werte im Gehirnparenchym wie in den Zellen spielen bei diesen Vorgängen eine herausragende Rolle. Wir sind erst in den Anfängen, die Proteinnetzwerke zu verstehen, die die Verteilung von Nährstoffen und Energieträgern effizient gestalten. Da viele neurologische Erkrankungen direkt oder indirekt mit der Energieversorgung der Zellen und ganzer Hirnareale gekoppelt sind, könnten Metabolit-Transport, Stoffwechselwege und pH-Regulation mögliche Ziele therapeutischer Medikamente sein. Wir müssen aber noch mehr verstehen, vor allem über die unterschiedliche Ausprägung der hier beschriebenen Vorgänge in verschiedenen Hirngebieten und über die Möglichkeiten von gezielten Eingriffen in diese Prozesse. Es scheint sicher, dass Energiemetabolismus und Energieverteilung im Gehirn auch in Zukunft von herausragendem Interesse für die Neurobiologie wie für die klinische Neurologie sein werden.

## Literatur

- Barros, L.F. and Deitmer, J.W. (2010). Glucose and lactate supply to the synapse. *Brain Res. Rev.* 63, 149–159.
- Becker, H., Bröer, S. and Deitmer, J.W. (2004). Facilitated lactate transport by MCT1 when coexpressed with the sodium bicarbonate cotransporter (NBC) in *Xenopus* oocytes. *Biophys. J.* 86, 235–247.
- Becker, H.M., Klier, M., Schüler, C., McKenna, R. and Deitmer, J.W. (2011). The intramolecular proton shuttle supports not only catalytic, but also non-catalytic function of carbonic anhydrase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 3071–3076.
- Becker, H.M., Klier, M. and Deitmer, J.W. (2014). Carbonic anhydrase and their interplay with acid/base-coupled membrane transporters. In: *Carbonic Anhydrase: Mechanism, Regulation, Links to Disease and Industrial Applications.* (eds. Susan Frost, Robert McKenna) Subcell. Biochem. 75, 105–134.
- Bröer, S., Schneider, H., Bröer, A. and Deitmer, J.W. (1998). Characterization of the monocarboxylate transporter 1 expressed in *Xenopus laevis* oocytes by changes in cytosolic pH. *Biochem. J.* 174, 167–174.
- Bröer, S., Bröer, A., Schneider, H., Stegen, C., Halestrap, A.P. and Deitmer, J.W. (1999). Characterization of the high-affinity monocarboxylate transporter MCT2 in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem. J.* 535, 529–535.
- Brooks, G.A. (2009). Cell-cell and intracellular lactate shuttles. *J. Physiol.* 587, 5591–5600.
- Deitmer, J.W. and Rose, C.R. (2010). Ion changes and signaling perisynaptic glia. *Brain Res. Rev.* 63, 113–129.
- Deitmer, J.W., Thepambil, S.M., Ruminot, I. and Becker, H.M. (2015). The role of membrane acid/base transporters and carbonic anhydrases for cellular pH and metabolic processes. *Front. Neurosci.* 8: 430, doi:10.3389/fnins.2014.00430.
- Dienel, G.A. (2014). Lactate shuttling and lactate use as fuel after traumatic brain injury: metabolic considerations. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 34, 1736–1748.
- Dimmer, K.S., Friedrich, B., Lang, F., Deitmer, J.W. and Bröer, S. (2000). The low-affinity monocarboxylate transporter MCT4 is adapted to the export of lactate in highly glycolytic cells. *Biochem. J.* 350, 219–227.
- Golgi, C. (1882–1883). Sulla fine anatomia degli organi centrali del sistema nervoso.
- Harris, J.J. and Attwell, D. (2012). The Energetics of CNS White Matter. *J. Neurosci.* 32, 356–371.
- Jakoby, P., Schmidt, E., Ruminot, I., Gutierrez, R., Barros, L.F. and Deitmer, J.W. (2014). Higher transport and metabolism of glucose in astrocytes compared to neurons: A multiphoton study of hippocampal and cerebellar tissue slices. *Cereb. Cortex* 24, 222–231.
- Magistretti, P.J. and Allaman, I. (2015). A Cellular Perspective on Brain Energy Metabolism and Functional Imaging. *Neuron* 86, 883–901.
- Magistretti, P.J., Pellerin, L., Rothman, D.L. and Shulman, R.G. (1999). Energy on demand. *Science* 283, 496–497.
- Noor, S.I., Dietz, S., Heidtmann, H., Boone, C.D., McKenna, R., Deitmer, J.W. and Becker, H.M. (2015). Analysis of the Binding Moiety Mediating the Interaction between Monocarboxylate Transporters and Carbonic Anhydrase II. *J. Biol. Chem.* 290, 4476–4486.
- Ruminot, I., Gutiérrez, R., Peña-Münzenmayer, G., Añazco, C., Sotelo-Hitschfeld, T., Lerchundi, R., Niemeyer, M.I., Shull, G.E. and Barros, L.F. (2011). NBCe1 mediates the acute stimulation of astrocytic glycolysis by extracellular K<sup>+</sup>. *J. Neurosci.* 31, 14264–71.
- Schurr, A., West, C. A. and Rigor, B.M. (1988). Lactate-supported synaptic function in the rat hippocampal slice preparation. *Science* 240, 1326–1328.
- Stridh, M., Alt, M., Wittmann, S., Heidtmann, H., Aggarwal, A., Riederer, B., Seidler, U., Wennemuth, G., McKenna, R., Deitmer, J.W. and Becker, H.M. (2012). Lactate fluxes in astrocytes enhanced by a non-catalytic action of carbonic anhydrase II. *J. Physiol.* 590.10, 2333–2351.
- Thepambil, S.M., Ruminot, I., Schneider, H.P., Shull, G.E. and Deitmer, J.W. (2014). The electrogenic sodium-bicarbonate cotransporter NBCe1 is a high-affinity bicarbonate carrier in mouse cortical astrocytes. *J. Neurosci.* 34, 1148–1157.
- Thepambil, S.M. and Deitmer, J.W. (2015). High effective cytosolic H<sup>+</sup> buffering in mouse cortical astrocytes attributable to fast bicarbonate transport. *Glia* 63, 1581–1594.

## Autoreninformationen



### Dr. Joachim W. Deitmer

Fachbereich Biologie, TU Kaiserslautern,  
Postfach 3049, 67653 Kaiserslautern,  
E-Mail: [deitmer@bio.uni-kl.de](mailto:deitmer@bio.uni-kl.de),  
Tel.: +49 631 2052877

Joachim W. Deitmer ist Senior-Forschungsprofessor am Fachbereich Biologie der TU Kaiserslautern. Er leitete von 1989 bis 2015 die Abteilung für Allgemeine Zoologie an der TU. Seine Forschung hat sich mit Membrantransport von Laktat, Bikarbonat und Protonen sowie mit Kalzium-, pH- und Bikarbonat-Regulation und –Signalling in Gliazellen beschäftigt; im Fokus standen vor allem Monocarboxylat-Transporter (MCT), Natrium-Bikarbonat Kotransporter (NBC) und Carboanhydrasen.



### Dr. Shefteeq M. Thepambil

Fachbereich Biologie, TU Kaiserslautern,  
Postfach 3049, 67653 Kaiserslautern

Shefteeq M. Thepambil hat einen M.Sc. in Biophysik (Bangalore, Indien) erworben und hat ab 2010 in Deitmers Labor promoviert und war dort von 2014 bis 2016 Postdoc. Seine Forschung beschäftigt sich mit der Regulation von pH und Bikarbonat in Astrozyten und ihre funktionellen Auswirkungen auf den Metabolismus.

**Dr. Iván Ruminot**

Fachbereich Biologie, TU Kaiserslautern,  
Postfach 3049, 67653 Kaiserslautern

Iván Ruminot hat in L.F. Barros' Labor promoviert und war danach von 2012 bis 2015 Postdoc in Deitmers Labor. Seine Forschung hat sich auf die funktionelle Wechselwirkungen zwischen pH und Laktat- und Glukosemetabolismus in Astrozyten konzentriert. Er arbeitet derzeit als Leiter einer Nachwuchsgruppe am CECS in Valdivia, Chile.

**Dr. Holger M. Becker**

Fachbereich Biologie, TU Kaiserslautern,  
Postfach 3049, 67653 Kaiserslautern

Holger M. Becker hat 2005 in Deitmers Labor promoviert; nach einigen Jahren Postdoc war er Juniorprofessor am Fachbereich Biologie der TU Kaiserslautern und habilitierte sich dort auch 2015. In seiner Forschung hat er sich mit funktionellen Proteinwechselwirkungen zwischen Monocarboxylat-Transportern und Carboanhydrasen und ihre Auswirkungen auf den Energiemetabolismus beschäftigt, zunächst vorwiegend in *Xenopus*-Oocyten, seit einigen Jahren auch in Tumorzellen.



Joachim W. Deitmer\*, Shefeeq M. Theparambil, Iván Ruminot and Holger M. Becker

# Our hungry brain: Which role do glial cells play for the energy supply?

DOI 10.1515/nf-2016-A102

**Abstract:** Our brain, which accounts for about 2 % of our body weight, uses up to 20 % of our total energy requirements. The supply with sufficient energetic substrates to all brain cells, which are very densely packed, in particular in the human brain, is a huge logistic challenge. The most important energy substrate for our brain is glucose, which reaches the brain via the blood circulation. Glucose is not only utilized by nerve cells directly, but to a large extent also taken up by glial cells, which then either store glucose after conversion to glycogen as energy reserve, or transfer it as lactate to nerve cells. Lactate in nerve cells can then be converted to pyruvate, which is efficiently utilized together with oxygen for the formation of chemical energy in form of ATP. The intermediate metabolic product lactate hence plays an important role as energetic substrate, which is exchanged between cells both under aerobic and non-aerobic conditions. Transport of lactate across the cell membrane is carried out in co-transport with protons ( $H^+$ ), which are crucial regulators of various metabolic processes and membrane transporters. In addition, the lactate carriers form a functional network with carbonic anhydrases, enzymes, which not only catalyze the equilibrium between carbon dioxide, hydrogen carbonate (bicarbonate) and protons, but also facilitate lactate transport. In this article, we focus on physiological processes of the energy metabolism in glial cells as well as on the transfer of energetic substrates to nerve cells, processes, which themselves are critically modulated by pH and its regulation in glial cells.

**Keywords:** sugar; lactate; pH; membrane transport; carbonic anhydrases

## Introduction

The brain accounts for about 2 % of our body weight (about 1400 g) but consumes up to 20 % of our total energy requirement. Only due to sufficient uptake of protein- and sugar-rich food was our brain able to develop into a high-performance organ during the evolution of man. Functions of our brain directly correlate with a sufficient supply of oxygen and nutrient-rich food. These substances are transported via the vasculature, which supplies the brain with sufficient blood and ensures that all nutrients are distributed to different regions of the brain. The circulation system of our brain consists of about 600 km of vessels and almost accounts for one third of the total brain volume. Still, blood capillaries are unable to reach all cells in the brain, which is made up of hundred billion nerve cells (neurons) and at least the same number of glia cells. Every single cell needs to be supplied with enough energy to exert its function without impairment. This is an enormous logistic challenge, which requires a complex network of distribution and utilisation of energy-rich substrates. This logistic task comprises regulation of the cerebral blood flow and efficient transport and utilisation of substrates by all cells and their anatomic specialisations like synapses and nerve fibres. How does our brain cope with this enormous task?

## Is task sharing the secret of energy metabolism?

Brain cells are divided into nerve cells and glial cells, of which there are distinct types and many different "task bearer". Neurons consume a considerably higher amount of energy than glial cells because functional tasks of synapses, the chemical-electric links between neurons consume a lot of energy. Conduction of electric impulses along nerve fibres also requires a considerable amount of energy, not because one single impulse needs a lot of energy but because of the high number of impulses, which are fired simultaneously to send information from one part of our brain to the other. There are small electric currents at both synapses and nerve fibres, which are gener-

---

\*Corresponding author: Dr. Joachim W. Deitmer, Fachbereich Biologie, TU Kaiserslautern, Postfach 3049, 67653 Kaiserslautern, E-Mail: deitmer@bio.uni-kl.de, Tel.: +49 631 2052877

Dr. Shefeeq M. Theparambil, Fachbereich Biologie, TU Kaiserslautern, Postfach 3049, 67653 Kaiserslautern

Dr. Iván Ruminot, Fachbereich Biologie, TU Kaiserslautern, Postfach 3049, 67653 Kaiserslautern

Dr. Holger M. Becker, Fachbereich Biologie, TU Kaiserslautern, Postfach 3049, 67653 Kaiserslautern

ated by ions and which flow along their electrochemical gradient. It is especially the sodium gradient across the cell membrane, which is used energetically to take up the neurotransmitters, which are released at synapses between neurons, in order to transmit certain information. In order to maintain the ion gradients, especially sodium, potassium, hydrogen, calcium, chloride and hydrogencarbonate (bicarbonate) have to be transported against their gradient so that the initial ion distribution can be restored ("ionic homeostasis"). It is this transport of ions against their gradient requires most of the energy in our brain – and also in most other organs. Ultimately, most of the energy, which is stored as ATP, is consumed by ATP-cleaving transport enzymes, notably the "sodium-potassium pump" (also known as Na-K-ATPase or Na-K-pump), and the calcium-pump (or Ca-ATPase). The Na-K-pump in the cell membrane escorts sodium ions against their electrochemical gradient out of the cell and exchanges them with potassium ions (three sodium ions per two potassium ions). This process is driven by a complex cycle, which requires cleavage of ATP. In contrast to sodium, calcium is not only pumped out of the cell, but also into intracellular stores (endoplasmatic reticulum, mitochondria) against large gradients, often in exchange with protons (Deitmer and Rose, 2010).

Glial cells aid neurons to maintain the ionic homeostasis, take up neurotransmitters from the synaptic cleft and, probably in a unique manner, supply neurons with energy-rich substrates. Based on histological findings, Camillo Golgi (Pavia, Italy) already proposed at the end of the 19<sup>th</sup> century that glial cells provide nutrimental support to neurons. In this article we want to shed light on some aspects of this metabolic interaction of nerve- and glial cells.

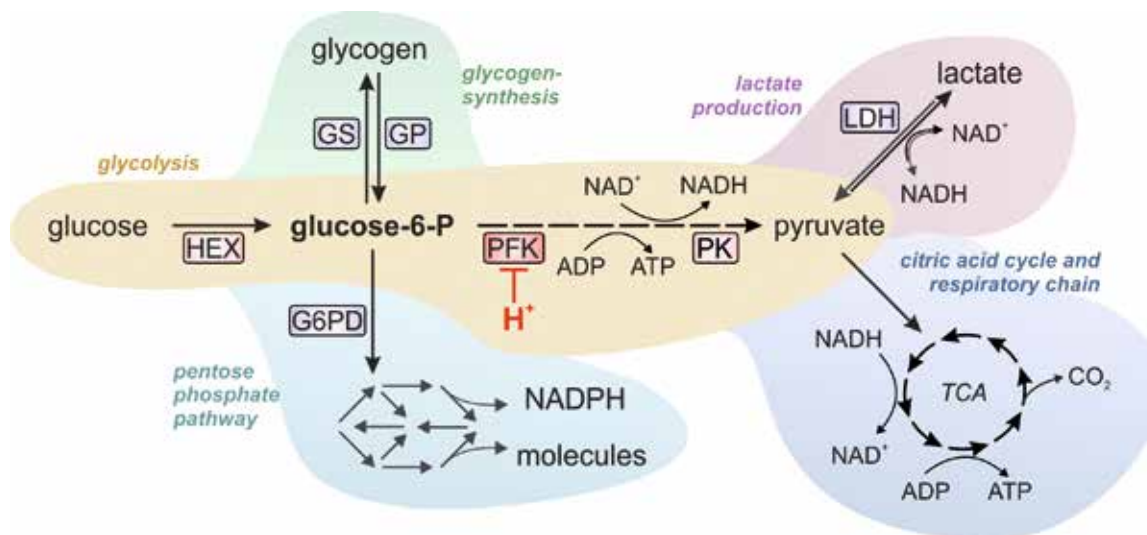
## Sugar and lactate are important energy substrates in our brain

The systemic blood supply provides the two most important energy substrates for our brain: glucose and oxygen. In the presence of oxygen, glucose can efficiently be metabolised into energy in form of ATP ("oxidative phosphorylation"). Glucose is transported from blood into brain tissue via glucose transporters (GLUT) in blood endothelial cells. Since those GLUTs merely favour transport down the chemical gradient of glucose ("facilitating transport") glucose concentration in brain tissue is never higher than in blood, where it is stabilised at approximately 5 mM. In fact, the glucose concentration in brain tissue is a lot low-

er, usually between 1–2 mM, because it is rapidly taken up into cells by more GLUTs located in the cell membrane of nerve- and glial cells. Once taken up, glucose gets immediately phosphorylated (to glucose-6-phosphate) so that there is a constant gradient of glucose from both blood to brain tissue and also from there to the cell interior. This ensures a constant uptake of glucose into the brain and into cells. Thus, astrocytes, which cover more than 99 % of all blood capillaries with their processes (cell processes, which extensively cover blood vessels), seem to have the best access to glucose, which is provided by blood vessels and take it up via GLUT1. Neurons take up glucose from brain tissue via GLUT3. After being phosphorylated, glucose can directly be fed into glycolysis (cleavage of glucose) inside the cell (Fig. 1). In astrocytes, possibly also in a few neurons, glucose can be used to generate energy reservoirs in form of glycogen. Glycogen is a large molecule, which consists of thousands of interlinked glucose molecules. In the case of sugar deprivation in the brain, glycogen can be degraded to glucose-6-phosphate and then fed into glycolysis.

During glycolysis, enzymatic processes take place, which are extremely pH-dependent and directly regulated by H<sup>+</sup>, especially processes in which phosphofructokinase is involved (PFK, Fig. 1). End product of glycolysis is pyruvate, a molecule with three C-atoms, which means that one glucose molecule gets metabolised into two pyruvate molecules during glycolysis. Pyruvate is taken up into mitochondria, where it undergoes more enzymatic steps, which make it accessible for oxidative phosphorylation, which, while using oxygen, produces most of energy-rich ATP. While the net yield of glycolysis are 2 ATP-molecules, it is 34 by oxidative phosphorylation.

Instead of being transported into mitochondria, pyruvate can also be metabolised into a very similar substance in the cytosol, namely lactate, the anion of lactic acid. Lactate is also a molecule carrying three C-atoms and, similar to pyruvate, it can be metabolised into 16–17 ATP-molecules (this would mean up to 34 ATP-molecules per one glucose molecule). The conversion of pyruvate into lactate occurs in a single reversible enzymatic step with the help of lactate dehydrogenase (LDH). This enzyme exists in several isoforms, which determine whether pyruvate is metabolised into lactate or lactate into pyruvate. This is an important criterion in order to explain if and why some cells accumulate lactate also under aerobic conditions and release it to adjacent cells. This transfer of lactate from one cell to the other seems to play an important role in energy distribution in general and is not restricted to the brain. Based on the astrocyte-neuron-lactate-shuttle (ANLS)-hypothesis (Brooks, 2009; Magistretti et al., 1999), the glu-



**Fig. 1:** glucose metabolism. Glycolysis is the backbone of carbohydrate metabolism in all eukaryotic organisms. Together with its anabolic pathway, the pentose phosphate pathway, it secures three essential functions: (1) Supplying mitochondria with fuel in form of pyruvate, (2) producing molecules for biosynthesis and (3) producing reducing agents for biosynthesis and antioxidants. The first step of glycolysis is phosphorylation of glucose to glucose-6-phosphate by the enzyme hexokinase (HEX). Attributable to this irreversible reaction, glucose gets "trapped" inside the cell and accumulates there. Glucose-6-phosphate is also the source for several metabolic pathways: (1) In the process of glycogen synthesis glucose-6-phosphate can be converted to and stored as glycogen (animal starch). This reaction, which is catalysed by the enzyme glycogen synthase (GS), occurs almost exclusively in astrocytes in the brain. As needed, glycogen can be mobilised via the enzyme glycogen phosphorylase (GP) and subsequently be metabolised. (2) Glucose-6-phosphate secures the production of molecules for biosynthesis and regeneration of the reducing agent nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) via the pentose phosphate pathway. Feeding of glucose-6-phosphate into the pentose phosphate pathway is controlled by the enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD). (3) During glycolysis, glucose-6-phosphate is metabolised into pyruvate while producing ATP and converting the oxidised form of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>) to its reduced form (NADH). Glycolysis is controlled by three irreversible reactions, which are catalysed by the enzymes hexokinase (HEX), phosphofructokinase (PFK) and pyruvate kinase (PK). Within the cell, the catalytic activity of PFK is inhibited by increasing the proton concentration (acidification), making the intracellular pH a direct control mechanism of glycolysis. Pyruvate resulting from glycolysis can now be transported into mitochondria, where it is ready to be further metabolised in the Tricarboxylic acid cycle (TCA) and subsequent oxidative phosphorylation in the respiratory chain. Alternatively, driven by the enzyme lactate dehydrogenase (LDH), pyruvate can reversely be converted into lactate while NAD<sup>+</sup>, which has been used during glycolysis, is being regenerated. Regulation of single key enzymes and therefore of different metabolic pathways is dependent on the cell type. Thus, in astrocytes, the production of glycogen and lactate seems to prevail while in neurons, glucose is mainly metabolised via the pentose phosphate pathway and energy production occurs via "consumption" of lactate.

cose in astrocytes is mainly degraded to pyruvate, which in turn is converted into lactate by LDH-5 and released to neurons (Fig. 2). In neurons, lactate is converted by LDH-1 into pyruvate again which is fed into oxidative phosphorylation for further energy production. The processes involved in lactate transfer shall now be discussed in more detail.

## The ANLS-hypothesis and lactate transport

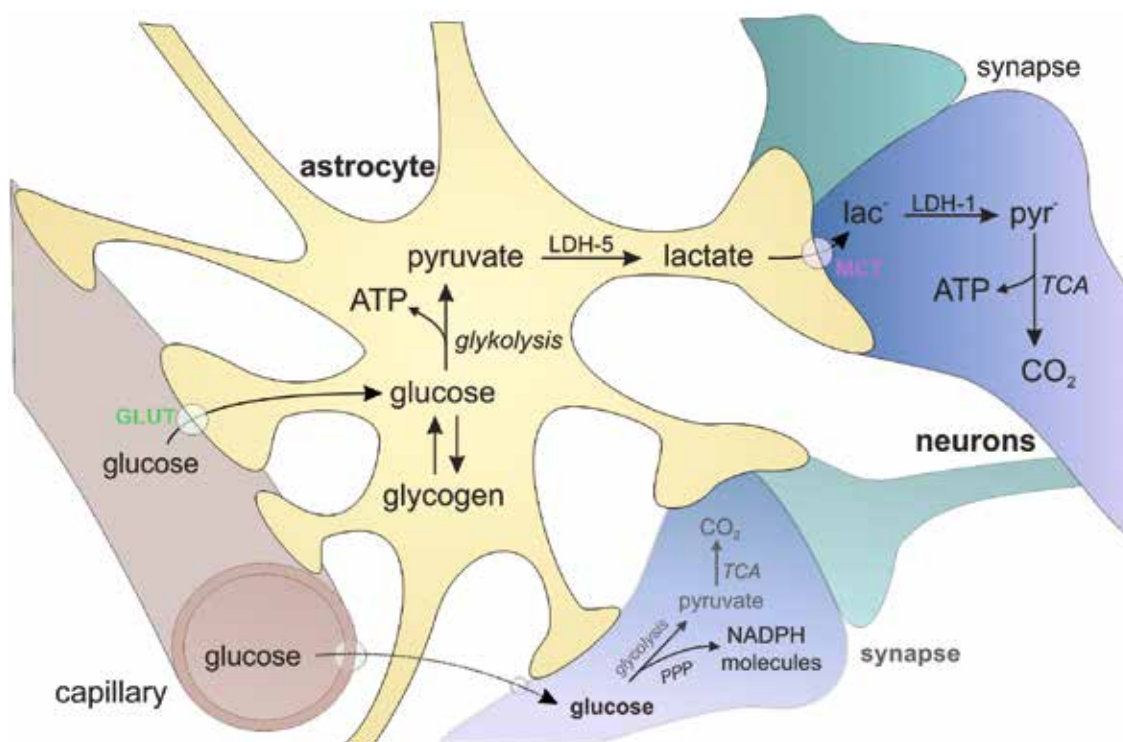
Recent findings largely agree that neurons consume more energy than glial cells (Harris and Atwell, 2012). There-

fore, it has long been assumed that they also consume most of the glucose. However, there has been a discussion for about 20 years now about whether neurons metabolise glucose directly to suffice their energy demands or if they partly utilise lactate, which is provided by astrocytes. Although the ANLS-hypothesis (Fig. 2) is not supported by everyone (Dienel, 2014), there has been growing evidence over the last few years, which supports this hypothesis (summarised in Magistretti and Allaman, 2015; Barros and Deitmer, 2010). The most important evidence is (1) astrocytes have more direct access to nutrients provided by the blood, including glucose; (2) astrocytes are equipped with the LDH-isoform 5, which converts pyruvate into lactate whereas neurons mainly have LDH-isoform 1, which converts lactate into pyruvate; (3) cell-dependent expression

of various isoforms of lactate transporters in astrocytes and neurons favour transfer of lactate from astrocytes to neurons (more about these transporters below); (4) lactate can maintain or restore synaptic and other neuronal functions in the absence of glucose (Schurr et al., 1988). The advantage for neurons in taking up lactate, converting it into pyruvate and metabolising it inside the mitochondria would be that they could at least partly bypass the lavish glycolysis. Large amounts of ATP are produced upon oxidative phosphorylation and not upon glycolysis, as long as oxygen supply is secured. Astrocytes on the other hand could cover their low energy demand largely by performing glycolysis. Further, energy production from lactate allows neurons to not “burn” some of the consumed glucose for glycolysis, but to use it to produce antioxidants and basic substances for biosynthesis via the pentose phosphate pathway (Fig. 1).

It seems confirmed that both cell types, neurons and astrocytes, perform both glycolysis and oxidative phosphorylation but, according to the ANLS-hypothesis, they perform it to different extents; neurons mainly operate *oxidative* and astrocytes mainly *glycolytic*. The exact balance can vary between the numerous subtypes of neurons and astrocytes, and also between different regions of the brain, more or less oxidative neurons and more or less glycolytic astrocytes with glycolytic neurons and oxidative astrocytes being rather exceptions.

According to the ANLS-hypothesis, transport of lactate across the cell membrane, out of astrocytes and into neurons, is critical. This transport is performed by the three isoforms of the monocarboxylate transporter-family (MCT), MCT1, MCT2, and MCT4, which have been extensively studied by our group for the last 20 years (Deitmer et al., 2015). The MCT family (*SLC16*) comprises



**Fig. 2:** the astrocyte-neuron-lactate-shuttle hypothesis. The astrocyte-neuron-lactate-shuttle (ANLS) hypothesis indicates that astrocytes metabolise glucose to lactate, which is then transferred to neurons, where it is used for energy production also under aerobic conditions. Glucose is taken up from the blood by astrocytes, which make contact with endothelial cells of capillaries using their cellular end feet. Uptake of glucose occurs via glucose transporter (GLUT) isoform 1. In astrocytes, glucose can either be stored as glycogen or be metabolised to pyruvate with the yield of ATP. Pyruvate is converted by the enzyme lactate dehydrogenase into lactate and transferred to neurons. For this, lactate is exported from astrocytes via monocarboxylate transporter (MCT) isoform 1 and 4 and imported into neurons via MCT isoform 2. In neurons, lactate is then converted by the enzyme lactate dehydrogenase isoform 1 (LDH-1) back into pyruvate and further metabolised in the Tricarboxylic acid cycle (TCA) and subsequent oxidative phosphorylation with the yield of ATP. Apart from lactate, neurons also take up glucose from the parenchyma, which they transport via glucose transporter isoform 3. The imported glucose can either be used for energy production via glycolysis, citric acid cycle and subsequent oxidative phosphorylation or, alternatively, via the pentose phosphate pathway (PPP), for production of molecules for biosynthesis and the reducing agent NADPH.



14 isoforms, of which MCT1-4 transport monocarboxylate anions 1:1 with  $H^+$  (Fig. 3A). Thus, this transport is electroneutral, i.e. it does not generate any current across the cell membrane. Chaperone proteins, namely basigin (CD147) and embigin (GP70) support integration of these MCTs into the cell membrane and their transport activity.

At first, transport properties of MCTs for lactate and other substances needed to be characterised, which we did by heterologous expression of MCT isoforms in frog egg cells (oocytes of *Xenopus laevis*) in cooperation with Stefan Bröer (Bröer et al., 1998, 1999; Dimmer et al., 2000). In addition to that, several research groups examined the importance of MCTs for the energy metabolism in the brain. Based on their findings, the ubiquitous lactate transporter in almost all tissues and organs is MCT1 with an average affinity for substrates ( $K_m$  for lactate 3–5mM). MCT2 is a highly affine lactate transporter ( $K_m$  for lactate 0.5–1mM) and is expressed in the brain mainly, possibly exclusively, by neurons located primarily in postsynaptic regions. MCT4 is a lactate transporter with low affinity ( $K_m$  for lactate 17–35mM) and high capacity, which is expressed in the brain mostly by astrocytes.  $K_m$  values suggest that MCT1 can be responsible for both import and export of lactate into and out of cells, while uptake of lactate could occur mainly via MCT2 and release rather via MCT4.

When looking at the transport of lactate in the brain, both from blood into the brain parenchyma and from astrocytes into neurons, lactate could be transported across endothelial cells of blood capillaries via MCT1 both from blood into the brain and also vice versa. MCT2 in neurons would favour uptake of lactate, whereas MCT1 and MCT4 in astrocytes allow release and uptake of lactate.

## pH and carbonic anhydrases play important in MCT transport activity

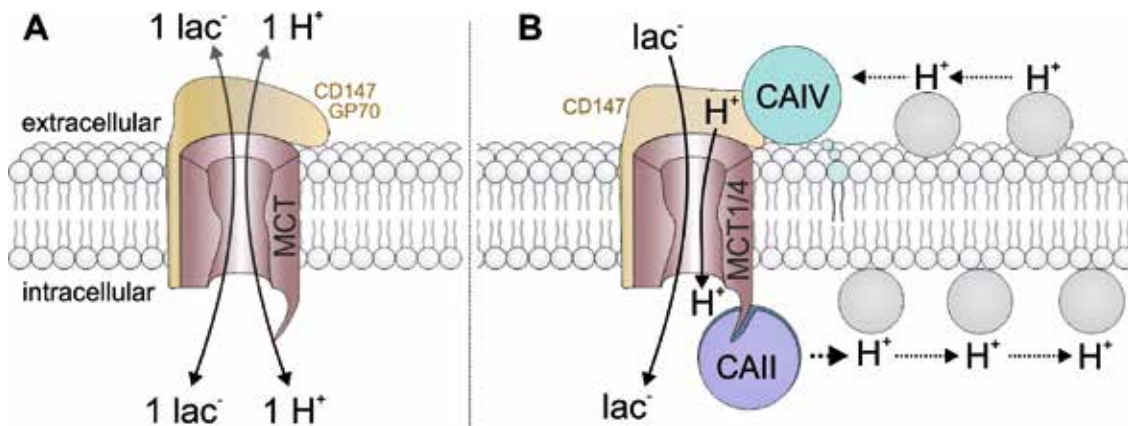
Based on co-transport of organic anions with protons, pH in the tissue, inside the cells, and also the  $H^+$  gradient across the cell membrane play important regulatory for the activity of MCT1-4. Thus, extracellular acidification favours lactate transport into the cell, whereas transport out of the cell can often only occur against the  $H^+$  gradient, hence requires a robust lactate gradient from the inside to the outside. Regulation of cytosolic pH plays an important role for the activity of MCTs and also for all  $H^+$ -dependent transport processes. Almost all cell types require a sodium-proton-exchange ( $Na^+/H^+$ ) for these processes, supported by several  $HCO_3^-$ -dependent transporters. An essential transporter in glial cells is the electrogenic so-

dium-bicarbonate ( $Na^+-HCO_3^-$ ) co-transporter (NBCe1, *SLC4A4*), which transports 2  $HCO_3^-$  with 1  $Na^+$ , dependent on the membrane potential, in both directions across the cell membrane. In cortical astrocytes we noticed a paramount involvement of NBCe1 in cytosolic pH-regulation and pH-buffering (Theparambil et al., 2014; Theparambil and Deitmer, 2015) as, dependent on the electrochemical gradient for this carrier, NBCe1 transports  $HCO_3^-$  highly efficiently into or out of the cells. We were able to demonstrate that NBCe1, when it is co-expressed in *Xenopus* oocytes, increases lactate transport by MCT1 (Becker et al., 2004) and modulates glycolysis in astrocytes (Rumino et al., 2011).

$H^+$  buffer capacity is a measure in order to avoid rapid accumulation of protons during the transport of lactate on either one or the other side of the cell membrane. Since there is only a small amount of  $H^+$  in form of free ions in the cytosol (30–100nM), but they are rather bound (10–30mM), also as intracellular mobile  $H^+$  buffer molecules (HB), which undergo slow diffusion, local accumulation of  $H^+$ /HB can occur quickly. Such local accumulation in turn inhibits further transport of  $H^+$  and lactate, which would be increasingly reduced by the low buffer capacity. In contrast, all factors, which increase  $H^+$  buffer capacity also increase the capacity of the lactate transporter. An important factor for the buffer capacity in astrocytes is the rapid transport of  $HCO_3^-$  via NBCe1. At this point carbonic anhydrases cooperate with transport activities of MCTs in a unique manner (Becker et al., 2011, 2014).

Carbonic anhydrases (CA) exist in numerous isoforms in almost all cells and organisms and catalyse the reversible hydration of carbon dioxide ( $CO_2$ ), one of the most important biochemical reactions ( $CO_2 + H_2O \leftrightarrow H^+ + HCO_3^-$ ). In humans, there are 15 CA-isoforms, of which some show cytosolic activity on and inside cell organelles, and some are active inside the cell membrane and outside of the cell. Apparently, accelerating the reaction time plays a very important role in vital functions like respiration, renal function and in many epithelial tissues as well as in the brain, where mainly CA-isoforms II, IV, XII and XIV exist.

Co-expression of MCT1 and carbonic anhydrase isoform II (CAII), the most active and most common isoform, which exists in almost all cells in the cytosol, in *Xenopus* oocytes, surprisingly resulted in a significant increase of lactate transport. Transport rate was increased 2–3 fold and even inhibition of the catalytic activity of CAII was not able to diminish this increase. An enzymatically inactive CAII mutant lead to an increased MCT1 transport rate, similar to wildtype CAII; herewith we were able to demonstrate a novel non-enzymatic function of CA (Beck-



**Fig. 3:** monocarboxylate transporter: stoichiometry and interaction with carbonic anhydrases. **(A)** Monocarboxylate transporter (MCT) isoform 1 to 4 transport monocarboxylates such as lactate, pyruvate and the ketone bodies acetoacetate and  $\beta$ -hydroxybutyrate across the cell membrane. The transporters' affinity for the substrates varies between the single isoforms. MCTs further mediate transport of several substances with similar structure like valproic acid (an anti-epileptic), Atorvastatin (brand names Sortis®, Atorvalan®, Lipitor®, administered to lower cholesterol levels), Nateglinid (brand names Starlix®, a drug against type-2 diabetes) and nicotinic acid across the plasma membrane of epithelial cells in the gastrointestinal tract and kidney as well as across the blood brain barrier. Transport of monocarboxylate anions always occurs in symport with one proton ( $H^+$ ) and is therefore electroneutral. Transport always occurs down the substrate gradient, therefore import or export of monocarboxylates depends on their intra- and extracellular concentrations as well as on intra- and extracellular pH. MCTs require certain chaperone proteins, which are crucial for localisation of transporters within the cell membrane and their transport activity. Here, isoform MCT1, MCT3 and MCT4 interact with protein CD147 (basigin, EMMPRIN) whereas MCT2 primarily interacts with GP70 (embigin). **(B)** Together with different isoforms of carbonic anhydrases (CAs) MCTs can form functional protein complexes, so-called "transport metabolons", which increase transport activity of MCTs. For example, MCT1 forms a transport metabolon with carbonic anhydrases CAII and CAIV. In doing so, intracellular CAII binds to the C-terminus of the transporter whereas extracellular CAIV interacts presumably not directly with MCT, but with its chaperone protein CD147. In contrast to other transport metabolons, increase of the transport rate of MCTs is not regulated by the catalytic activity of carbonic anhydrases. They rather seem to function as a "proton antenna" for MCTs, which mediate the rapid exchange of protons between the transporter and several protonable moieties in its direct vicinity. In the case of the transport metabolon consisting of MCT1, CAII and CAIV, the latter would move protons from protonable moieties on the extracellular side of the cell membrane during the import of lactate and transfer them to MCT1. On the intracellular side on the other hand, CAII would move protons from the transporter and transfer them to protonable moieties in the vicinity. During the export of lactate, CAII would provide protons for the transporter on the intracellular side while CAIV would remove them again on the extracellular side. Based on this proton shuttle, the proton gradient would be stabilised in the direct vicinity of the transporter, and its activity would increase.

er et al., 2011, 2014). Next, we investigated the specificity of the interaction between MCT and CA and found that also MCT2 and MCT4 interact with some but not with all of the analysed CA isoforms. We noticed that these interactions are isoform-specific; therefore, CAII interacts with MCT1 and MCT4, but not with MCT2, whereas extracellular CAIV and CAIX increase transport activity of all three MCT-isoforms, and CAI and CAIII interact with none of the analysed MCT-isoforms.

While elucidating mechanisms of this functional "transport metabolon" (Becker et al., 2014, Deitmer et al., 2015), it was found that CA binds to MCT and thereby acts as kind of a "proton antenna" and increases the local  $H^+$  buffer capacity (Fig. 3B) (Becker et al., 2011, Noor et al., 2015; Deitmer et al., 2015). We then showed that this non-enzymatic interaction between MCT and CA not only

occurs in heterologous expression systems (frog oocyte), but also in murine astrocytes (Stridh et al., 2012).

## Conclusions

The global energy supply for the brain, and also at the cellular level, are complex systems consisting of metabolic and transport processes, which are tightly regulated. The pH in the brain parenchyma as well as inside cells plays a critical role for these processes. We have only just started to understand the protein networks, which enable efficient distribution of nutrients and energy carriers. Since many neurological disorders are directly or indirectly linked with the energy supply of cells and whole brain areas, metabolite transport, metabolic pathways and pH regulation could represent potential targets for therapeutic

tic drugs. We yet have to understand the described processes in more detail, especially to what extent they occur in different brain regions, and how targeted interventions into these processes are possible. It seems certain that energy metabolism and energy distribution in the brain will be of preeminent interest in the field of neurobiology and clinical neurology in the future.

## References

- Barros, L.F. and Deitmer, J.W. (2010). Glucose and lactate supply to the synapse. *Brain Res. Rev.* 63, 149–159.
- Becker, H., Bröer, S. and Deitmer, J.W. (2004). Facilitated lactate transport by MCT1 when coexpressed with the sodium bicarbonate cotransporter (NBC) in *Xenopus* oocytes. *Biophys. J.* 86, 235–247.
- Becker, H.M., Klier, M., Schüler, C., McKenna, R. and Deitmer, J.W. (2011). The intramolecular proton shuttle supports not only catalytic, but also non-catalytic function of carbonic anhydrase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 3071–3076.
- Becker, H.M., Klier, M. and Deitmer, J.W. (2014). Carbonic anhydrase and their interplay with acid/base-coupled membrane transporters. In: *Carbonic Anhydrase: Mechanism, Regulation, Links to Disease and Industrial Applications*. (eds. Susan Frost, Robert McKenna) Subcell. Biochem. 75, 105–134.
- Bröer, S., Schneider, H., Bröer, A. and Deitmer, J.W. (1998). Characterization of the monocarboxylate transporter 1 expressed in *Xenopus laevis* oocytes by changes in cytosolic pH. *Biochem. J.* 174, 167–174.
- Bröer, S., Bröer, A., Schneider, H., Stegen, C., Halestrap, A.P. and Deitmer, J.W. (1999). Characterization of the high-affinity monocarboxylate transporter MCT2 in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem. J.* 535, 529–535.
- Brooks, G.A. (2009). Cell-cell and intracellular lactate shuttles. *J. Physiol.* 587, 5591–5600.
- Deitmer, J.W. and Rose, C.R. (2010). Ion changes and signaling perisynaptic glia. *Brain Res. Rev.* 63, 113–129.
- Deitmer, J.W., Thepambil, S.M., Ruminot, I. and Becker, H.M. (2015). The role of membrane acid/base transporters and carbonic anhydrases for cellular pH and metabolic processes. *Front. Neurosci.* 8: 430, doi:10.3389/fnins.2014.00430.
- Dienel, G.A. (2014). Lactate shuttling and lactate use as fuel after traumatic brain injury: metabolic considerations. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 34, 1736–1748.
- Dimmer, K.S., Friedrich, B., Lang, F., Deitmer, J.W. and Bröer, S. (2000). The low-affinity monocarboxylate transporter MCT4 is adapted to the export of lactate in highly glycolytic cells. *Biochem. J.* 350, 219–227.
- Golgi, C. (1882–1883). Sulla fine anatomia degli organi centrali del sistema nervoso.
- Harris, J.J. and Attwell, D. (2012). The Energetics of CNS White Matter. *J. Neurosci.* 32, 356–371.
- Jakoby, P., Schmidt, E., Ruminot, I., Gutierrez, R., Barros, L.F. and Deitmer, J.W. (2014). Higher transport and metabolism of glucose in astrocytes compared to neurons: A multiphoton study of hippocampal and cerebellar tissue slices. *Cereb. Cortex* 24, 222–231.
- Magistretti, P.J. and Allaman, I. (2015). A Cellular Perspective on Brain Energy Metabolism and Functional Imaging. *Neuron* 86, 883–901.
- Magistretti, P.J., Pellerin, L., Rothman, D.L. and Shulman, R.G. (1999). Energy on demand. *Science* 283, 496–497.
- Noor, S.I., Dietz, S., Heidtmann, H., Boone, C.D., McKenna, R., Deitmer, J.W. and Becker, H.M. (2015). Analysis of the Binding Moiety Mediating the Interaction between Monocarboxylate Transporters and Carbonic Anhydrase II. *J. Biol. Chem.* 290, 4476–4486.
- Ruminot, I., Gutiérrez, R., Peña-Münzenmayer, G., Añazco, C., Sotelo-Hitschfeld, T., Lerchundi, R., Niemeyer, M.I., Shull, G.E. and Barros, L.F. (2011). NBCe1 mediates the acute stimulation of astrocytic glycolysis by extracellular K<sup>+</sup>. *J. Neurosci.* 31, 14264–71.
- Schurr, A., West, C. A. and Rigor, B.M. (1988). Lactate-supported synaptic function in the rat hippocampal slice preparation. *Science* 240, 1326–1328.
- Stridh, M., Alt, M., Wittmann, S., Heidtmann, H., Aggarwal, A., Riederer, B., Seidler, U., Wennemuth, G., McKenna, R., Deitmer, J.W. and Becker, H.M. (2012). Lactate fluxes in astrocytes enhanced by a non-catalytic action of carbonic anhydrase II. *J. Physiol.* 590.10, 2333–2351.
- Thepambil, S.M., Ruminot, I., Schneider, H.P., Shull, G.E. and Deitmer, J.W. (2014). The electrogenic sodium-bicarbonate cotransporter NBCe1 is a high-affinity bicarbonate carrier in mouse cortical astrocytes. *J. Neurosci.* 34, 1148–1157.
- Thepambil, S.M. and Deitmer, J.W. (2015). High effective cytosolic H<sup>+</sup> buffering in mouse cortical astrocytes attributable to fast bicarbonate transport. *Glia* 63, 1581–1594.

## Bionotes



**Dr. Joachim W. Deitmer**

Fachbereich Biologie, TU Kaiserslautern,  
Postfach 3049, 67653 Kaiserslautern,  
E-Mail: [deitmer@bio.uni-kl.de](mailto:deitmer@bio.uni-kl.de),  
Tel.: +49 631 2052877

Joachim W. Deitmer is senior professor at the faculty of biology of TU Kaiserslautern. Between 1989 and 2015 he was head of the department of general zoology at the TU. His research focused on membrane transport of lactate, bicarbonate and protons as well as calcium, pH and bicarbonate regulation and signalling in glia cells. He especially focused on monocarboxylate transporters (MCT), sodium-bicarbonate co-transporter (NBC) and carbonic anhydrases.



**Dr. Shefteeq M. Theparambil**  
Fachbereich Biologie, TU Kaiserslautern,  
Postfach 3049, 67653 Kaiserslautern

Shefteeq M. Theparambil holds a MSc in biophysics (Bangalore, India), started his PhD in Deitmer's lab in 2010 and worked there as a postdoc between 2014 and 2016. His research focuses on regulation of pH and bicarbonate in astrocytes and their functional impact on metabolism.



**Dr. Iván Ruminot**  
Fachbereich Biologie, TU Kaiserslautern,  
Postfach 3049, 67653 Kaiserslautern

Iván Ruminot received his PhD in L.F. Barros' lab and after that worked as a postdoc in Deitmer's lab between 2012 and 2015. He was working on functional interactions between pH and lactate as well as glucose metabolism in astrocytes. He now works as junior group leader at the CECS in Valdivia, Chile.



**Dr. Holger M. Becker**  
Fachbereich Biologie, TU Kaiserslautern,  
Postfach 3049, 67653 Kaiserslautern

Holger M. Becker received his PhD in Deitmer's lab in 2005; after a few years of postdoc he became junior professor at the faculty of biology at the TU Kaiserslautern and habilitated there 2015. His research focused on functional protein interactions between monocarboxylate transporters and carbonic anhydrases and their effects on the energy metabolism, first in *Xenopus* oocytes and since a few years also in tumour cells.



## Übersichtsartikel

Andreas Vlachos\*, Klaus Funke und Ulf Ziemann

# Untersuchung und Modulation kortikaler Inhibition mittels transkranieller Magnetstimulation

DOI 10.1515/nf-2016-1103

**Zusammenfassung:** Die Transkranielle Magnetstimulation (TMS) ist eine nicht-invasive Hirnstimulationstechnik, die zu diagnostischen, therapeutischen und wissenschaftlichen Zwecken in der Neurologie und Psychiatrie eingesetzt wird. Sie beruht auf dem physikalischen Grundprinzip der elektromagnetischen Induktion und ermöglicht die lokale Aktivierung kortikaler Areale durch den intakten Schädel des wachen Probanden oder Patienten. Eine sogenannte repetitive TMS (rTMS) kann zu anhaltenden Veränderungen der kortikalen Erregbarkeit führen. Die TMS stellt somit einen vielversprechenden Ansatz zur nicht-invasiven Untersuchung neuronaler Netzwerke, sowie deren lang anhaltender Beeinflussung dar. Trotz ihres mittlerweile breiten klinischen Einsatzes, sind die zellulären und molekularen Wirkmechanismen der TMS noch nicht genau geklärt. Etablierte Therapiekonzepte gehen von einer Wiederherstellung einer krankheitsbedingt veränderten kortikalen Erregbarkeit aus, die auf einer „Langzeit-Potenzierung“ oder „Langzeit-Depression“ erregender Synapsen beruhen könnte. Tatsächlich zeigen tierexperimentelle Studien, dass die rTMS in der Lage ist, anhaltende Veränderungen erregender Neurotransmission zu bewirken. Es bleibt allerdings unklar, auf welche Weise synaptische Veränderungen, die durch eine elektromagnetische Aktivierung der Hirnrinde bewirkt werden und demnach nicht kontext- oder verhaltensspezifisch sind, einen positiven Einfluss auf Hirnfunktionen haben. Neuere Befunde deuten nun darauf hin, dass die rTMS in

der Lage ist, neben erregenden auch hemmende neuronale Netzwerke anhaltend zu beeinflussen. So gelang es nachzuweisen, dass 10 Hz repetitive Magnetstimulation zu einer kalziumabhängigen „Langzeit-Depression“ inhibitorischer GABAerger Synapsen führt. Da der Verminderung hemmender Neurotransmission (=Disinhibition) eine wichtige Rolle bei der Bahnung assoziativer Plastizität erregender Synapsen beigemessen wird, ist davon auszugehen, dass rTMS-induzierte Disinhibition die Ausbildung kontext- und verhaltensspezifischer synaptischer Veränderungen begünstigt. Das Modell der *rTMS-induzierten lokalen Disinhibition* bietet somit einen attraktiven Erklärungsansatz für die Beobachtung, dass eine scheinbar unspezifische exogene Magnetstimulation spezifische endogene strukturelle, funktionelle und molekulare Veränderungen kortikaler Synapsen fördern könnte. Untersuchungen zu Wirkungen rTMS-induzierter Disinhibition auf synaptische Plastizität in geeigneten Tiermodellen (*in vitro* und *in vivo*) sind Gegenstand aktueller Forschung. Neben ihrem diagnostischen und therapeutischen Potenzial stellt die TMS somit auch einen vielversprechenden methodischen Ansatz zur Durchführung klinisch orientierter translationaler Plastizitätsstudien dar.

**Schlüsselwörter:** nicht-invasive Hirnstimulation; synaptische Plastizität; Disinhibition; Interneurone

## Einführung

Die Fähigkeit des Gehirns, auf einen spezifischen Stimulus mit strukturellen, funktionellen und molekularen Veränderungen zu reagieren wird im Allgemeinen als Plastizität bezeichnet (Konorski 1948). Aktivitätsabhängige Veränderungen an den Kontaktstellen zwischen Nervenzellen, sogenannte synaptische Plastizität, spielt hierbei eine außerordentlich wichtige Rolle bei physiologischen Hirnfunktionen, wie beispielsweise Lern- und Gedächtnisprozessen oder Orientierung in Raum und Zeit. In den letzten Jahrzehnten wurden in diesem Kontext zelluläre

\*Korrespondenzautor: Prof. Dr. Andreas Vlachos, Institut für Anatomie II, Medizinische Fakultät, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Moorenstraße 5, 40225 Düsseldorf, E-Mail: andreas.vlachos@med.uni-duesseldorf.de

Prof. Dr. Klaus Funke, Institut für Neurophysiologie, Medizinische Fakultät, Ruhr-Universität Bochum, 44780 Bochum

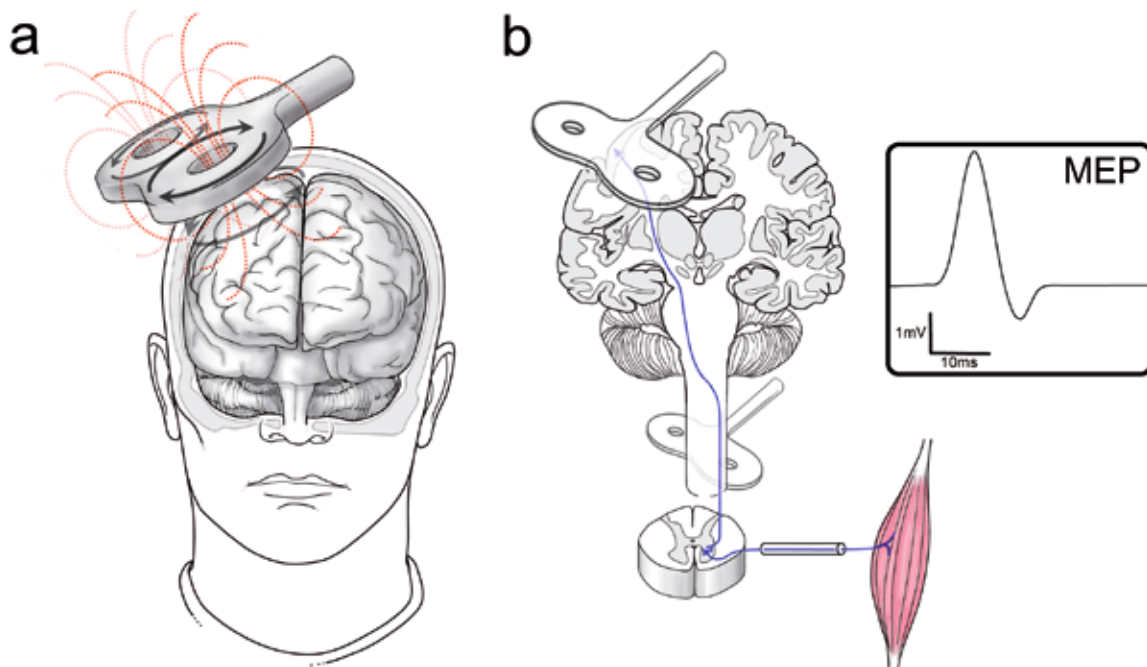
Prof. Dr. Ulf Ziemann, Abteilung für Neurologie mit Schwerpunkt neurovaskuläre Erkrankungen und Hertie-Institut für klinische Hirnforschung, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 72076 Tübingen

und molekulare Wirkmechanismen der sogenannten assoziativen Plastizität (Hebb 1949), die als zelluläres Korrelat kontext- und verhaltensspezifischer Anpassungsreaktionen im Gehirn gilt, intensiv beforscht (siehe z. B. Bliss und Collingridge 1993; Nicoll und Roche 2013).

Hinweise für plastische Veränderungen im Gehirn des Menschen gehen unter anderem auf TMS-Studien zurück (Ziemann et al. 2008). Bei der TMS handelt es sich um ein nicht-invasives Hirnstimulationsverfahren, das auf dem physikalischen Prinzip der elektromagnetischen Induktion beruht. Hierbei wird ein sehr kurzes ( $\sim 500\mu\text{s}$ ) und starkes Magnetfeld ( $>1\text{Tesla}$ ) mittels einer geeigneten Spule über dem Schädel des Probanden/Patienten aufgebaut (Abb. 1a). Dieses Feld führt innerhalb des Schädels zur Induktion elektrischer Felder im Gehirn, die eine Aktivierung von Nervenzellen bewirken. Da die Magnetfelder die Haut und den intakten Schädelknochen durchdringen (= transkranial), gilt dieses Stimulationsverfahren als nicht-invasiv. Die TMS gilt unter Beachtung etablierter Sicherheitsrichtlinien (Rossi et al. 2009) als ungefährlich und wird im Allgemeinen gut toleriert.

Die Effekte einzelner TMS-Pulse über dem primären Motorkortex werden typischerweise durch die Ableitung sogenannter Motorisch Evozierter Potenziale (MEP) im Zielmuskel erfasst und quantifiziert (Abb. 1b). Kombinierte Stimulationen des Motorkortex und Rückenmarks dienen hierbei der diagnostischen Bestimmung der zen-

tralmotorischen Leitungszeit, die z. B. bei demyelinisierenden Erkrankungen wie Multipler Sklerose verlängert ist. Die Applikation von Reizzügen mit mehreren hundert TMS-Pulsen (repetitive TMS, rTMS) über dem Motorkortex kann zu einer anhaltenden Veränderung der kortikalen Erregbarkeit führen: Hochfrequente rTMS ( $\geq 5\text{Hz}$ ) bewirkt typischerweise eine Erhöhung der kortiko-spinalen Erregbarkeit, gemessen als Zunahme der MEP-Amplitude, wohingegen niederfrequente rTMS ( $1\text{Hz}$ ) selbige herabsetzt. Basierend auf pharmakologischen Studien und Analogien zu klassischen Plastizitätsexperimenten der Grundlagenforschung wurde die Hypothese aufgestellt, dass rTMS-induzierte Veränderungen der kortikalen Erregbarkeit eine Langzeitpotenzierung bzw. Langzeitdepression erregender Kontakte zwischen Nervenzellen darstellen könnte (Ziemann et al. 2008). Tatsächlich gelang es in organotypischen Hirnschnittkulturen nachzuweisen, dass repetitive Magnetstimulation strukturelle, funktionelle und molekulare Veränderungen an erregenden Synapsen induziert, die einer Langzeitpotenzierung und somit assoziativer synaptischer Plastizität entsprechen (Vlachos et al. 2012). Scheinbar konsistent mit diesen Befunden zeigte sich, dass rTMS das Lernverhalten im Tierexperiment verbessert (Mix et al. 2010) und Bewegungslernen nach einem Schlaganfall beim Menschen fördern kann (Brodie et al. 2014; Volz et al., 2016). Es bleibt allerdings unklar, auf welche Weise aktivitätsabhängige Modifikationen von



**Abb. 1:** Transkranielle Magnetstimulation (TMS). (a) Darstellungen transkranieller Magnetstimulation (b) des Motorkortex und Rückenmarks. Die Effekte der TMS werden mittels Ableitung von Motorisch Evozierten Potentialen (MEP) quantifiziert.

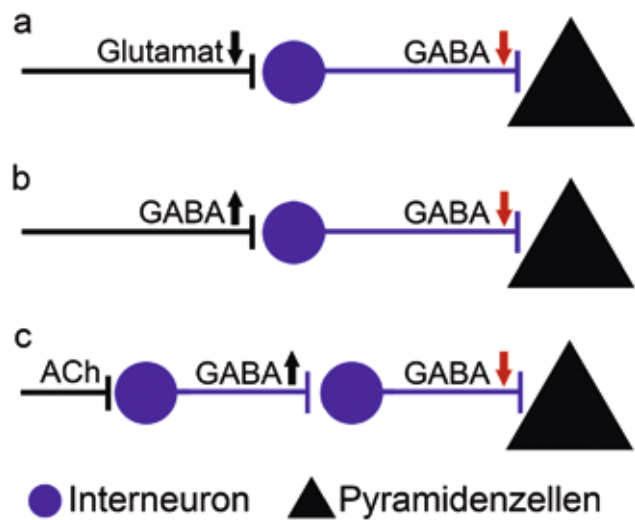
Nervenverbindungen, die durch mehrere hundert exogene Magnetpulse bewirkt werden, komplexe Hirnfunktionen beim Gesunden und Kranken verbessern könnten.

## Rolle inhibitorischer Netzwerke bei assoziativer synaptischer Plastizität

Die Bedeutung hemmender neuronaler Netzwerke für physiologische Hirnfunktionen wurde in den letzten Jahren intensiv beforscht (Tremblay et al. 2016). Davon ausgehend, dass inhibitorische Interneurone die Aktivität und Erregbarkeit neuronaler Netzwerke kontrollieren, wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine Reduktion hemmender Neurotransmission, sogenannte *Disinhibition*, Lern- und Gedächtnisprozesse und somit auch assoziative synaptische Plastizität erregender Synapsen bahnen könnte. Tatsächlich gelang es in Tierexperimenten aufzuzeigen, dass eine Reduktion GABAerger Inhibition Lern- und Gedächtnisprozesse begünstigt, wohingegen erhöhte Inhibition Plastizität hemmt (Tremblay et al. 2016). Mittlerweile gilt als gesichert, dass *lokale disinhibitorische Netzwerke* eine zentrale regulatorische Rolle bei Lern-/Gedächtnisprozessen spielen (Letzkus et al. 2015).

Neben der Plastizität GABAerger Synapsen (Froemke 2015) kann eine lokale Disinhibition durch eine Reihe unterschiedlicher Netzwerk motive erzielt werden: z. B. durch (1) herabgesetzte glutamaterge Aktivierung lokaler hemmender Interneurone, (2) erhöhte Aktivität inhibitorischer Projektionsneurone, die lokale inhibitorische Interneurone anderer kortikaler Areale hemmen, oder (3) durch neuromodulatorische Projektionsbahnen, die aktivierend auf spezifische lokale Interneurone wirken, die wiederum die Hemmung anderer lokaler Interneurone vermitteln (Abb. 2; Letzkus et al. 2015).

Die klinische Relevanz dieser Mechanismen spiegelt sich auch in der Tatsache wider, dass Störungen der sogenannten Erregungs-/Hemmungs-Balance für das Auftreten neurologischer und psychiatrischer Symptome verantwortlich gemacht werden (z. B. Nelson und Valakh 2015). Aus klinischer Sicht erscheint somit die Untersuchung und Modulation (dis)inhibitorischer Netzwerke äußerst attraktiv. Geeignete diagnostische und/oder interventionelle Maßnahmen könnten diesbezüglich die Fähigkeit des menschlichen Gehirns zur Expression endogener Plastizität erfassen und darüber hinaus beeinflussen. Die TMS stellt in diesem Kontext ein überaus interessantes klinisches Werkzeug dar.



**Abb. 2:** Netzwerk motive lokaler Disinhibition. Neben einer „Langzeit-Depression“ inhibitorischer Synapsen auf Pyramidenzellen kann eine lokale Disinhibition durch eine Reihe unterschiedlicher Netzwerk motive erzielt werden: z. B. durch (a) herabgesetzte glutamaterge Aktivierung lokaler hemmender Interneurone, (b) erhöhte Aktivität inhibitorischer Projektionsneurone, die lokale Interneurone innervieren, oder (c) durch neuromodulatorische Projektionsbahnen (z. B. cholinerge Projektionen; Acetylcholin, ACh), die aktivierend auf spezifische lokale Interneurone wirken, die wiederum die Hemmung anderer lokaler Interneurone vermitteln.

## TMS-basierte Untersuchung inhibitorischer kortikaler Netzwerke

Funktionelle Untersuchungen intra- und interkortikaler Inhibition im Motorkortex des Menschen gehen überwiegend auf TMS-Studien zurück (Di Lazzaro und Ziemann 2013). In diesem Bereich wurde in den letzten Jahren eine Reihe spezifischer Doppelpulsprotokolle etabliert: So beruht die Untersuchung der sogenannten „short-interval intracortical inhibition“ (SICI) auf der Applikation eines unterschwelligen konditionierenden TMS-Pulses, der selbst kein MEP induziert, gefolgt von einem überschweligen Test-Puls innerhalb eines kurzen Intervalls (1–5ms), wohingegen bei der Untersuchung sogenannter „long-interval intracortical inhibition“ (LICI) zwei überschwellige TMS-Pulse mit längerem Intervall (50–200ms) gepaart werden. In beiden Fällen kommt es zu einer intervallabhängigen Inhibition des durch den Test-Puls ausgelösten MEPs. Während die zugrundeliegenden Netzwerkmechanismen noch ungeklärt sind (Di Lazzaro und Ziemann 2013), geht man davon aus, dass der erste Puls eine charakteristische (direkte oder indirekte) Aktivierung inhibitorischer Interneurone bewirkt, die eine quantifizierbare

Abschwächung des Test-MEPs zur Folge hat. Pharmakologische Studien deuten darauf hin, dass SICI den Einfluss ionotroper GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren abbildet, während LICI eher auf metabotrope GABA<sub>B</sub>-Rezeptor zurückzuführen ist (Ziemann et al. 2015). Demnach ermöglichen charakteristische TMS-Protokolle prinzipiell die nicht-invasive, funktionelle Untersuchung lokaler kortikaler Inhibition im Motorkortex des Menschen.

Eine bedeutende Limitierung stellt in diesem Kontext allerdings die Tatsache dar, dass zur Quantifizierung der TMS-Effekte die Ableitung von MEPs erforderlich ist. Abgesehen von der Tatsache, dass es sich hierbei um die Messung von Potenzialen handelt, die nicht unmittelbar am Ort der Stimulation abgeleitet werden, sondern nachgeschaltet mindestens zwei Synapsen vom stimulierten Motorkortex entfernt liegen (Abb. 1b), lassen sich diese Protokolle auch nicht auf andere (krankheitsrelevante) Hirnareale übertragen. Ein direkter Bezug zwischen MEP-Amplitude und kortikaler Erregbarkeit bleibt durch den ungeklärten Einfluss der „Filterfunktionen“ kortikospinaler Synapsen sowie der motorischen Endplatte kontrovers. In diesem Zusammenhang zeichnen sich intensive Bemühungen ab, mittels TMS-evozierter elektroenzephalografischer (EEG) Potenziale kortikale Inhibition unabhängig vom stimulierten Kortexareal direkter zu erfassen (Rogasch und Fitzgerald 2013; Premoli et al. 2014). Unterstützt werden diese Ansätze durch weitere Verfahren, wie z. B. GABA-Magnetresonanzspektroskopie (Stagg et al. 2011). Inwiefern plastizitäts-induzierende rTMS-Protokolle allerdings in der Lage sind, TMS-evozierte EEG-Signale lang anhaltend zu modulieren und welche Mechanismen diesen Änderungen zugrunde liegen, wurde bislang nicht systematisch untersucht.

## rTMS-induzierte Modulation inhibitorischer Netzwerke

Während der Einfluss der rTMS auf erregende Synapsen tierexperimentell als gesichert gilt (Tang et al. 2015), bleiben rTMS-induzierte Veränderungen hemmender Synapsen wenig erforscht. Es liegen allerdings robuste Grundlagendaten vor, die aufzeigen, dass spezifische rTMS-Protokolle kalziumbindende Moleküle beeinflussen, die als Aktivitäts- und Plastizitätsmarker inhibitorischer Interneurone gewertet werden können (Caroni 2015). So bewirkt beispielsweise die sogenannte intermittierende theta-burst Stimulation (iTBS) eine Reduktion der Parvalbumin (PV)-Expression in hemmenden Neuronen des Rattencortex, wohingegen eine kontinuierliche theta-burst

Stimulation (cTBS) und eine niederfrequente rTMS (1 Hz) eher die Calbindin-Expression in einer anderen Klasse von inhibitorischen Neuronen reduzieren (Benali et al. 2011). Da PV-positive Interneurone die somatische Inhibition von Projektionsneuronen vermitteln, während Calbindin-positive Interneurone auf Dendriten wirken, deuten diese Arbeiten daraufhin, dass die rTMS je nach Stimulationsprotokoll spezifische Aspekte der Netzwerk-Inhibition (z. B. Kontrolle der Ausgangs- vs. Eingangsaktivität an Pyramidenzellen) beeinflussen könnte. Interessanterweise zeigte sich in den bisherigen Studien vornehmlich eine Abnahme der entsprechenden Markermoleküle im Sinne einer rTMS-induzierten Disinhibition.

Bisher nicht publizierte Daten deuten darauf hin, dass Interneurone mit reduzierter PV-Expression weniger kortikale glutamaterge Eingänge haben, als solche mit einer hohen PV-Expression (siehe hierzu auch Abb. 2). Ähnliche Zusammenhänge zwischen PV-Expression und der Balance erregender zu hemmenden synaptischen Eingängen wurden auch im Hippokampus von Mäusen beschrieben (Donato et al. 2013). Eine elektrophysiologische Studie im primären somatosensorischen Kortex der Ratte zeigte dann auch, dass eine durch iTBS-rTMS-induzierte Abnahme der PV-Expression von einer Steigerung sensorischer Antworten begleitet ist (Thimm und Funke 2015), die ursächlich für die zuvor beschriebene Steigerung der Lernleistung sein könnte (Mix et al. 2010), sodass diese Studien das Model der rTMS-induzierten Disinhibition stützen. Allerdings lassen Untersuchungen inhibitorischer Aktivitäts- und Plastizitätsmarker nur indirekte Aussagen über rTMS-induzierte funktionelle Veränderungen inhibitorischer Synapsen zu.

## rTMS-induzierte Langzeit-Depression inhibitorischer Synapsen

In einer aktuellen Studie untersuchten wir die Effekte der repetitiven Magnetstimulation (rMS) auf strukturelle, funktionelle und molekulare Eigenschaften inhibitorischer Synapsen (Lenz et al. 2016). In organotypischen Hirnschnittkulturen der Maus gelang es mittels Einzelzellableitungen zu zeigen, dass rMS tatsächlich in der Lage ist, eine Abschwächung inhibitorischer Neurotransmission zu bewirken. Diese funktionellen Veränderungen gehen mit strukturellen und molekularen Änderungen inhibitorischer Postsynapsen einher: einer Verkleinerung und Destabilisierung von Gephyrin-Aggregaten, den wich-



tigsten postsynaptischen Ankermolekülen der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren (Tyagarajan und Fritschy 2014; Kneussel und Hausrat 2016).

Die rMS-induzierte Abschwächung inhibitorischer Neurotransmission erfordert die Aktivierung von spannungsabhängigen Natriumkanälen, NMDA-Rezeptoren und L-Typ spannungsabhängigen Kalziumkanälen während der Stimulation. Außerdem sind die Effekte in Anwesenheit eines Inhibitors der Calcineurin-abhängigen Phosphatase nicht nachweisbar. Wir schließen aus diesen Befunden, dass rMS kalziumabhängige Phosphorylierungs-/Dephosphorylierungsreaktionen induziert, die zu einer Destabilisierung von Gephyrin-Aggregaten führen können und dadurch eine lang anhaltende Verminderung der GABAergen Neurotransmission bewirken. Die durch extrasynaptische GABA-Rezeptoren vermittelte tonische Inhibition war in unseren Experimenten nach rMS nicht verändert (Lenz et al., 2016).

Die pharmakologische Hemmung Calpain-abhängiger Proteasen konnte die Effekte der rMS nicht verhindern. Da Calpain unter anderem für die kalziumabhängige Degradation von Gephyrin unter Bedingungen einer Übererregung verantwortlich gemacht werden kann (Tyagarajan und Fritschy 2014), legen diese Daten nahe, dass das eingesetzte 10Hz rMS-Protokoll nicht zu einer übermäßigen und potenziell toxischen Erregung neuronaler Netzwerke führt, die sonst mit einem proteolytischen Abbau essenzieller synaptischer Bestandteile einhergeht.

Die rTMS-induzierten Veränderungen von Gephyrin ließen sich auch *in vivo* in anästhesierten Mäusen nachweisen, sodass unsere Arbeiten insgesamt aufzeigen, dass die rTMS ein vielversprechendes Interventionsverfahren zur Beeinflussung Gephyrin-abhängiger inhibitorischer Neurotransmission darstellt. Dieser Schluss ist von klinischer Bedeutung, da Veränderungen des humanen Genlocus für Gephyrin mit einem erhöhten Risiko zur Ausbildung von Autismus, Schizophrenie und Epilepsie in Verbindung gebracht wird (Lionel et al. 2013). Gemeinsam mit den oben beschriebenen Arbeiten zu den Effekten der rTMS auf Markermoleküle hemmender Interneurone zeigen diese Arbeiten, dass die rTMS in der Lage ist, anhaltende Veränderungen inhibitorischer Neurotransmission im Sinne einer Disinhibition zu bewirken.

## Wechselwirkung zwischen rTMS-induzierten Veränderungen an hemmenden und erregenden Synapsen?

Offensichtlich ist es mittels rTMS möglich, sowohl hemmende als auch erregende Synapsen zu modulieren. Interessanterweise zeigen unsere Experimente, dass beide Prozesse kalziumabhängig sind und die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren und L-Typ spannungsabhängigen Kalziumkanälen erfordern (Vlachos et al. 2012; Lenz et al. 2015, 2016). Hieraus ergibt sich die wichtige Frage nach der zeitlichen, örtlichen und molekularen Wechselwirkung zwischen rTMS-induzierten inhibitorischen und exzitatorischen synaptischen Veränderungen.

Basierend auf dem vorgestellten Modell der rTMS-induzierten Disinhibition ergibt sich die interessante Hypothese, dass die rTMS vornehmlich auf hemmende Synapsen wirken könnte, wohingegen die Veränderungen erregender Synapsen ein Ergebnis der „Disinhibitionsbedingten Bahnung assoziativer synaptischer Plastizität“ darstellen könnte. Tatsächlich zeigen unsere *in vitro* Experimente, dass es nach 10 Hz rMS nicht zu einer unmittelbaren post-tetanischen Verstärkung erregender Synapsen kommt, wie sie bei lokaler elektrischer Stimulation in klassischen LTP-Experimenten beobachtet wird. Vielmehr kommt es zu einer langsamen Potenzierung erregender Synapsen innerhalb der ersten 1–2 h nach Stimulation, die 2–4 h nach Stimulation ein Plateau erreicht (Vlachos et al. 2012). Dagegen lässt sich eine Veränderung der Expression inhibitorischer Markermoleküle im Rattenkortex bereits ca. 30 Minuten nach rTMS nachweisen (Hoppenrath und Funke 2013). Diese Beobachtungen unterstützen die Hypothese, dass die Plastizität erregender Synapsen nicht unmittelbarer Effekt der rTMS ist. Vor diesem Hintergrund erscheint die Untersuchung der genauen zeitlichen Abfolge rTMS-induzierter Langzeit-Depression inhibitorischer Synapsen (Lenz et al. 2016) und rTMS-induzierter Veränderungen erregender Synapsen (Vlachos et al. 2012) überaus wichtig. Experimente, in denen die Netzwerkaktivität vor, während und nach rTMS systematisch moduliert wird (z. B. mittels pharmakologischer oder optogenetischer Techniken) könnten in diesem Zusammenhang wichtige Erkenntnisse zur Frage beitragen, inwiefern die Effekte der rTMS vom Aktivitätszustand des Netzwerkes abhängig sind. Wir sind zuversichtlich, dass diese Studien den Einfluss rTMS-induzierter Disinhibition auf Metaplastizität und homöostatische Plastizität beleuchten werden und darüber hinaus wichtige Beiträge zu der jüngst geführten

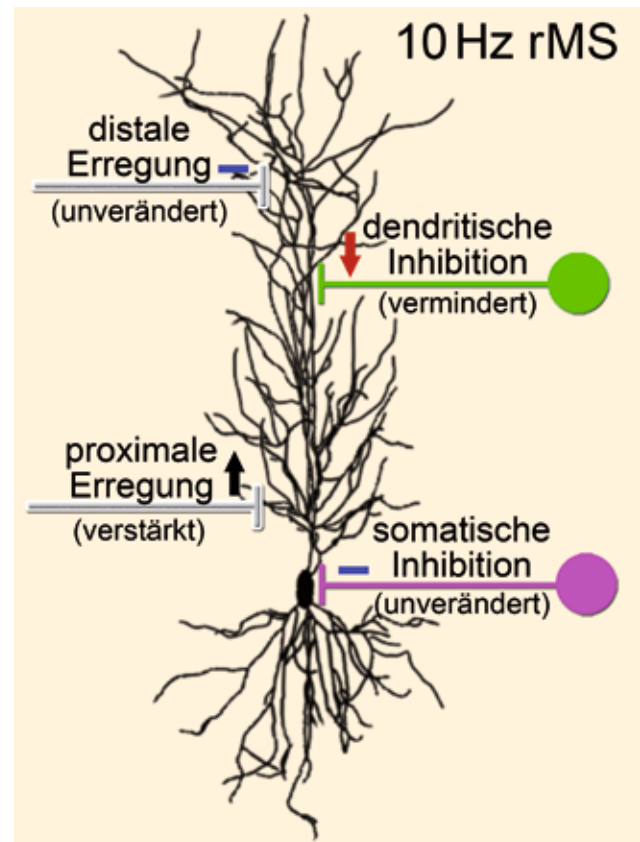
Diskussion bezüglich einer erheblichen inter- und intra-individuellen Variabilität der rTMS-Effekte beim Menschen beitragen können (Muller-Dahlhaus et al. 2008; Hamada et al. 2013; Lopez-Alonso et al. 2014). Es ist interessant in diesem Kontext zu vermuten, dass die zellulären und molekularen Prozesse, die durch ein spezifisches rTMS-Protokoll *per se* induziert werden, wenig variabel sind, die Langzeiteffekte aber sehr wohl von inter- und intra-individuellen Faktoren abhängig sein könnten (z. B. Alter, Aufmerksamkeitszustand, Tageszeit der Stimulation etc. – Ridding und Ziemann 2010).

## Synapsenspezifische Effekte der rTMS

Das Modell der rTMS-induzierten Disinhibition bietet einen interessanten Erklärungsansatz für die Beobachtung, dass eine scheinbar unspezifische exogene Stimulation kortikaler Netzwerke zu kontext- und verhaltensspezifischen Veränderungen führen kann. So wäre beispielsweise denkbar, dass vor einer rehabilitativen Trainingsmaßnahme nach einem Schlaganfall 10Hz rTMS oder iTBS eingesetzt wird, um den Trainingseffekt durch „Disinhibitionsbedingte Bahnung assoziativer Plastizität“ an spezifischen erregenden Synapsen zu unterstützen (Volz et al. 2016). Der Einfluss rTMS-induzierter Disinhibition auf physiologische und pathologische Hirnfunktionen ist Gegenstand aktueller Forschung.

Tatsächlich gelang es bereits zu zeigen, dass die rMS in der Lage ist, Plastizität an spezifischen Synapsen einer Zelle zu induzieren (Abb. 3). So konnten nachgewiesen werden, dass 10 Hz rMS vornehmlich auf dendritische aber nicht somatische Inhibition wirkt (Lenz et al. 2016). Dasselbe Stimulationsprotokoll führt wiederum zu einer Potenzierung somanaher erregender Synapsen auf kleinen dendritischen Dornen (Vlachos et al. 2012; Lenz et al. 2015). Die genauen Mechanismen, die zu diesen spezifischen Effekten führen, sind noch nicht geklärt. Nichtsdestotrotz ist es aus anatomischer Sicht ein interessantes Konzept, dass spezifische rTMS-Parameter zu einer selektiven Verstärkung somanaher erregender Synapsen auf Projektionsneuronen führen könnten, z. B. thalamokortikaler Projektionen in Schicht IV des Kortex, während dendritische Disinhibition die Fähigkeit zur Ausbildung assoziativer Plastizität an Dendriten der äußeren Assoziationsschichten bahnen könnte. Inwiefern diese synapsenspezifischen Effekte der rMS, die auf CA1 – Pyramidenzellen in organotypischen Schnittkulturen des Hippokampus nachweisbar sind, auch auf andere Neurone und Netzwer-

ke des Kortex übertragen werden können, muss geklärt werden.



**Abb. 3:** Synapsenspezifische Effekte der repetitiven Magnetstimulation (rMS). Trotz des verhältnismäßig großen induzierten elektromagnetischen Feldes kann die rMS differenzielle Effekte an spezifischen Synapsen einer Pyramidenzelle induzieren. *In vitro* Experimente zeigen, dass 10 Hz rMS zu einer Abschwächung dendritischer Inhibition sowie Verstärkung somanaher erregender Synapsen auf kleinen dendritischen Dornen führt. Die genauen Mechanismen, die zu diesen spezifischen Effekten führen sind noch nicht geklärt.

## Wie wirkt TMS während der Stimulation?

Eine der wichtigen noch ungeklärten Fragen ist die nach der Wirkung der TMS während der Stimulation. Die meisten Annahmen in diesem Bereich beruhen auf computerbasierten Modellen (Esser et al. 2005; Rusu et al. 2014). In diesem Zusammenhang besteht die große technische Herausforderung in den starken elektromagnetischen Feldern, die während der Stimulation aufgebaut werden. Diese Felder erschweren elektrophysiologische Untersu-

chungen, d. h. Ableitungen neuronaler Aktivität auf Einzelzellebene, auch wenn es einige wenige Arbeiten gibt, die bei niedriger Feldstärke und geeigneter Ausrichtung der Ableitelektroden durchgeführt werden konnten (Moliadze et al. 2005; Mueller et al. 2014; Pashut et al. 2014). Der Einsatz „kontaktfreier“ funktioneller Mikroskopieverfahren, z. B. mittels kalzium- oder spannungssensitiver Farbstoffe (Kozyrev et al. 2014; Murphy et al. 2016), deutet darauf hin, dass bei geringer Stimulationsintensität vornehmlich inhibitorische Interneurone aktiviert werden, während Projektionsneurone erst bei höheren Intensitäten rekrutiert werden (siehe auch Pashut et al. 2014). Somit bieten diese Studien einen plausiblen Erklärungsansatz für das bereits beschriebene SICI-Doppelpulsprotokoll, bei dem der unterschwellige konditionierende TMS-Puls zu einer GABA<sub>A</sub>-abhängigen Inhibition der durch den TMS Test-Puls induzierten MEP-Antwort führt.

Um die Effekte der rTMS genauer zu verstehen, ist es dringend erforderlich, das Aktivitätsmuster ganzer Populationen von Neuronen simultan mit hoher zeitlicher und örtlicher Auflösung abzuleiten. Diese Studien könnten auch dazu beitragen, die Rolle sogenannter rückwärts propagierender Aktionspotenziale zu beleuchten, die eine wichtige Rolle bei der rTMS-induzierten synaptischen Plastizität spielen könnten (Lenz et al. 2015). Fest steht, dass die gegenwärtig vorliegenden Informationen nicht ausreichen, um mittels computerbasierter Simulationen zuverlässige Voraussagen über die Wirkung der rTMS zu machen. Unsere pharmakologischen Studien zeigen bislang auf, dass die Aktivierung von spannungsabhängigen Natriumkanälen, NMDA-Rezeptoren und L-Typ spannungsabhängigen Kalziumkanälen während der Stimulation erforderlich ist, um rTMS-induzierte Veränderungen erregender und hemmender Synapsen *in vitro* zu induzieren. Der potenzielle Einfluss der TMS auf Gliazellen (Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikrogliazellen) und auf das neurovaskuläre System müssen in diesem Kontext ebenfalls berücksichtigt werden.

## Offene Fragen und einige Ausblicke

30 Jahre nach der Entwicklung des ersten TMS-Gerätes durch Anthony Barker und Kollegen (Barker et al. 1985) zeichnen sich wichtige Hinweise auf die zellulären und molekularen Wirkmechanismen der TMS ab. Gegenwärtige TMS-basierte Therapien führen allerdings nicht zu einer ausgeprägten und nachhaltigen Verbesserung neurologischer und psychiatrischer Symptome (Lefaucheur et al. 2014). Ein substanzieller Fortschritt in diesem Bereich

wird durch das immer noch eingeschränkte Wissen über die Wirkmechanismen der TMS erschwert. Des Weiteren steht unser limitiertes Wissen bezüglich der Rolle synaptischer Plastizität unter pathologischen Bedingungen einem effizienten Einsatz der rTMS in der Klinik entgegen.

Arbeiten aus den letzten Jahren konnten zeigen, dass eine Störung assoziativer synaptischer Plastizität nicht zwingend als Merkmal neurologischer oder psychiatrischer Erkrankungen gewertet werden kann (Maggio und Vlachos 2014). Tatsächlich könnte eine Verminderung der Fähigkeit von Nervenzellen, synaptische Plastizität zu exprimieren auch protektiven Charakter haben, indem sogenannte „maladaptive Veränderungen“ verhindert werden. Gleichzeitig müssen mögliche negative Auswirkungen auf den Erfolg von Rehabilitationsmaßnahmen in diesem Kontext diskutiert werden. Unser gegenwärtiges Verständnis ist, dass sich der Schwellenwert zur Expression von Plastizität im Laufe einer Erkrankung des Gehirns ändern kann. Änderungen der Erregungs-/Hemmungs-Balance scheinen hierbei eine wichtige Rolle zu spielen, da wie in diesem Artikel diskutiert, Veränderungen inhibitorischer Synapsen die Plastizität an erregenden Synapsen beeinflussen. Fest steht, dass ein übergreifendes Verständnis zur Rolle unterschiedlicher Formen synaptischer Plastizität (assoziative, homöostatische Plastizität und Metaplastizität) unter pathologischen Bedingungen dringend erforderlich ist.

Zukünftige diagnostische und therapeutische Interventionen könnten darauf abzielen, zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Laufe einer Erkrankung (und ggf. davor), in einzelnen kortikalen Arealen die Fähigkeit von Nervenzellen zur Expression von Plastizität zu erfassen und zu modulieren. Die TMS stellt in diesem Zusammenhang offensichtlich ein attraktives klinisches Werkzeug dar. Tatsächlich könnte es mittels der TMS auch gelingen, Nachteile der klassischen pharmakologischen Behandlung, der die erforderliche örtliche und zeitliche Spezifität fehlt, zu überwinden bzw. zu komplementieren. Während das diagnostische Potenzial der rTMS in Bezug auf (dis)inhibitorische Netzwerke weiter ausgearbeitet werden muss und weitere zelluläre und molekulare Effekte der rTMS berücksichtigt werden sollten, z. B. Einfluss auf Genexpression, mRNA-Transport/Stabilität, lokale Proteinbiosynthese, Interaktionen mit Mitochondrien, Rolle glialer und vaskulärer Faktoren, liefert das vorgestellte Konzept der rTMS-induzierten Disinhibition eine vielversprechende Arbeitshypothese für zukünftige Studien.

In diesem Kontext wird es nun auch erforderlich sein, den Einfluss der rTMS auf die beschriebenen Netzwerk-motive lokaler (Dis)Inhibition zu erfassen (Abb. 2); also den Einfluss der rTMS auf (1) glutamaterge Synapsen auf

inhibitorischen Interneuronen, (2) auf interkortikale inhibitorische Projektionen und (3) neuromodulatorische Projektionsbahnen. Des Weiteren müssen die Effekte unterschiedlicher Stimulationsparameter systematisch untersucht werden, um beispielsweise zu überprüfen, ob mittels rTMS auch die Verstärkung inhibitorischer Synapsen oder die Modulation somatischer Inhibition möglich ist (Abb. 3). Ferner wird derzeit daran gearbeitet, Aktivitätszustände neuronaler Netzwerke des Gehirns (“brain-states”) mittels EEG in Echtzeit auszulesen und TMS-Pulse spezifisch repetitiv immer nur zu Zeitpunkten eines bestimmten Zustandes, z. B. verminderter instantaner Inhibition, zu applizieren (Zrenner et al. 2016). Dieser Ansatz basiert auf der Theorie, dass die Erregbarkeit neuronaler Netzwerke durch gepulste Inhibition reguliert wird (Jensen und Mazaheri 2010). Wir erwarten, dass hirnzustandsabhängige TMS gegenüber konventioneller “open-loop” Stimulation die rTMS-Effektstärke in Richtung lang anhaltender Plastizität erheblich steigern kann und somit die Zukunft therapeutischer rTMS-Protokolle in “closed-loop” Ansätzen liegt, die spontane rhythmische Oszillationen inhibitorischer Aktivität konsequent nutzen.

Perspektivisch könnten computerbasierte Simulationen in diesem Kontext äußerst hilfreich sein. Allerdings fehlen gegenwärtig die hierzu erforderlichen Grundlageninformationen zu den genauen Wirkmechanismen der TMS während und nach der Stimulation. Insgesamt ist zu erwarten, dass ein besseres Verständnis rTMS-induzierter Plastizität zu einer Optimierung bestehender Therapiekonzepte führen wird, die auf eine Beeinflussung der Erregungs-/Hemmungs-Balance abzielen (z. B. im Rahmen der Behandlung nach einem Schlaganfall oder bei der Epilepsitherapie). Wir sind überzeugt, dass das neue Konzept der rTMS-induzierten lokalen Disinhibition an Beachtung gewinnen wird. Neben ihrem diagnostischen und therapeutischen Potenzial, stellt die TMS somit auch einen vielversprechenden methodischen Ansatz zur Durchführung klinisch-orientierter translationaler Plastizitätsstudien dar.

**Danksagung:** Unsere Arbeiten wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Bundesministerium für Bildung und Forschung gefördert.

## Literatur

Barker, A.T., Jalinous, R. und Freeston, I.L. (1985): Non-invasive magnetic stimulation of human motor cortex. *Lancet* 1, 1106–1107.

- Benali, A., Trippe, J., Weiler, E., Mix, A., Petrasch-Parwez, E., Girzalsky, W., Eysel, U.T., Erdmann, R. und Funke, K. (2011): Theta-burst transcranial magnetic stimulation alters cortical inhibition. *J Neurosci* 31, 1193–1203.
- Bliss, T.V. und Collingridge, G.L. (1993): A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, 31–39.
- Brodie, S.M., Meehan, S., Borich, M.R. und Boyd, L.A. (2014): 5 Hz repetitive transcranial magnetic stimulation over the ipsilesional sensory cortex enhances motor learning after stroke. *Front Hum Neurosci* 8, 143.
- Caroni, P. (2015): Regulation of Parvalbumin Basket cell plasticity in rule learning. *Biochem Biophys Res Commun* 460, 100–103.
- Di Lazzaro, V. und Ziemann, U. (2013): The contribution of transcranial magnetic stimulation in the functional evaluation of microcircuits in human motor cortex. *Front Neural Circuits* 7, 18.
- Donato, F., Rompani, S.B. und Caroni, P. (2013): Parvalbumin-expressing basket-cell network plasticity induced by experience regulates adult learning. *Nature* 504, 272–276.
- Esser, S.K., Hill, S.L. und Tononi, G. (2005): Modeling the effects of transcranial magnetic stimulation on cortical circuits. *J Neurophysiol* 94, 622–639.
- Fromme, R.C. (2015): Plasticity of cortical excitatory-inhibitory balance. *Annu Rev Neurosci* 38, 195–219.
- Hamada, M., Murase, N., Hasan, A., Balaratnam, M. und Rothwell, J.C. (2013): The role of interneuron networks in driving human motor cortical plasticity. *Cereb Cortex* 23, 1593–1605.
- Hebb, D.O. (1949): *The organization of behavior; a neuropsychological theory*. New York, Wiley.
- Hoppenrath, K. und Funke, K. (2013): Time-course of changes in neuronal activity markers following iTBS-TMS of the rat neocortex. *Neurosci Lett* 536, 19–23.
- Jensen, O. und Mazaheri, A. (2010): Shaping functional architecture by oscillatory alpha activity: gating by inhibition. *Front Hum Neurosci* 4, 186.
- Kneussel, M. und Hausrat, T.J. (2016): Postsynaptic neurotransmitter receptor reserve pools for synaptic potentiation. *Trends Neurosci* 39, 170–182.
- Konorski, J. (1948): *Conditioned reflexes and neuron organization*. Cambridge Eng.: University Press.
- Kozyrev, V., Eysel, U.T. und Jancke, D. (2014): Voltage-sensitive dye imaging of transcranial magnetic stimulation-induced intracortical dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA* 111, 13553–13558.
- Lefaucheur, J.P., Andre-Obadia, N., Antal, A., Ayache, S.S., Baeken, C., Benninger, D.H., Cantello, R.M., Cincotta, M., De Carvalho, M., De Ridder, D., Devanne, H., Di Lazzaro, V., Filipovic, S.R., Hummel, F.C., Jaaskelainen, S.K., Kimiskidis, V.K., Koch, G., Langguth, B., Nyffeler, T., Oliviero, A., Padberg, F., Poulet, E., Rossi, S., Rossini, P.M., Rothwell, J.C., Schonfeldt-Lecuona, C., Siebner, H.R., Slotema, C.W., Stagg, C.J., Valls-Sole, J., Ziemann, U., Paulus, W. und Garcia-Larrea, L. (2014): Evidence-based guidelines on the therapeutic use of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS). *Clin Neurophysiol* 125, 2150–2206.
- Lenz, M., Galanis, C., Muller-Dahlhaus, F., Opitz, A., Wierenga, C.J., Szabo, G., Ziemann, U., Deller, T., Funke, K. und Vlachos, A. (2016): Repetitive magnetic stimulation induces plasticity of inhibitory synapses. *Nat Commun* 7, 10020.



- Lenz, M., Platschek, S., Priesemann, V., Becker, D., Willems, L.M., Ziemann, U., Deller, T., Muller-Dahlhaus, F., Jedlicka, P. und Vlachos, A. (2015): Repetitive magnetic stimulation induces plasticity of excitatory postsynapses on proximal dendrites of cultured mouse CA1 pyramidal neurons. *Brain Struct Funct* 220, 3323–3337.
- Letzkus, J.J., Wolff, S.B. und Luthi, A. (2015): Disinhibition, a Circuit Mechanism for Associative Learning and Memory. *Neuron* 88, 264–276.
- Lionel, A.C., Vaags, A.K., Sato, D., Gazzellone, M.J., Mitchell, E.B., Chen, H.Y., Costain, G., Walker, S., Egger, G., Thiruvahindrapuram, B., Merico, D., Prasad, A., Anagnostou, E., Fombonne, E., Zwaigenbaum, L., Roberts, W., Szatmari, P., Fernandez, B.A., Georgieva, L., Brzustowicz, L.M., Roetzer, K., Kaschnitz, W., Vincent, J.B., Windpassinger, C., Marshall, C.R., Trifiletti, R.R., Kirmani, S., Kirov, G., Petek, E., Hodge, J.C., Bassett, A.S. und Scherer, S.W. (2013): Rare exonic deletions implicate the synaptic organizer Gephyrin (GPHN) in risk for autism, schizophrenia and seizures. *Hum Mol Genet* 22, 2055–2066.
- Lopez-Alonso, V., Cheeran, B., Rio-Rodriguez, D. und Fernandez-Del-Olmo, M. (2014): Inter-individual variability in response to non-invasive brain stimulation paradigms. *Brain Stimul* 7, 372–380.
- Maggio, N. und Vlachos, A. (2014): Synaptic plasticity at the interface of health and disease: New insights on the role of endoplasmic reticulum intracellular calcium stores. *Neuroscience* 281, 135–146.
- Mix, A., Benali, A., Eysel, U.T. und Funke, K. (2010): Continuous and intermittent transcranial magnetic theta burst stimulation modify tactile learning performance and cortical protein expression in the rat differently. *Eur J Neurosci* 32, 1575–1586.
- Moliadze, V., Giannikopoulos, D., Eysel, U.T. und Funke, K. (2005): Paired-pulse transcranial magnetic stimulation protocol applied to visual cortex of anaesthetized cat: effects on visually evoked single-unit activity. *J Physiol* 566, 955–965.
- Mueller, J.K., Grigsby, E.M., Prevosto, V., Petraglia, F.W., 3rd, Rao, H., Deng, Z.D., Peterchev, A.V., Sommer, M.A., Egner, T., Platt, M.L. und Grill, W.M. (2014): Simultaneous transcranial magnetic stimulation and single-neuron recording in alert non-human primates. *Nat Neurosci* 17, 1130–1136.
- Muller-Dahlhaus, J.F., Orekhov, Y., Liu, Y. und Ziemann, U. (2008): Interindividual variability and age-dependency of motor cortical plasticity induced by paired associative stimulation. *Exp Brain Res* 187, 467–475.
- Murphy, S.C., Palmer, L.M., Nyffeler, T., Müri, R.M. und Larkum, M.E. (2016) Transcranial magnetic stimulation (TMS) inhibits cortical dendrites. *Elife* pii:e13598.
- Nelson, S.B. und Valakh, V. (2015): Excitatory/Inhibitory Balance and Circuit Homeostasis in Autism Spectrum Disorders. *Neuron* 87, 684–698.
- Nicoll, R.A. und Roche, K.W. (2013): Long-term potentiation: peeling the onion. *Neuropharmacology* 74, 18–22.
- Pashut, T., Magidov, D., Ben-Porat, H., Wolfus, S., Friedman, A., Perel, E., Lavidor, M., Bar-Gad, I., Yeshurun, Y. und Korngreen, A. (2014): Patch-clamp recordings of rat neurons from acute brain slices of the somatosensory cortex during magnetic stimulation. *Front Cell Neurosci* 8, 145.
- Premoli, I., Castellanos, N., Rivolta, D., Belardinelli, P., Bajo, R., Zipser, C., Espenhahn, S., Heidegger, T., Muller-Dahlhaus, F. und Ziemann, U. (2014): TMS-EEG signatures of GABAergic neurotransmission in the human cortex. *J Neurosci* 34, 5603–5612.
- Ridding, M.C. und Ziemann, U. (2010): Determinants of the induction of cortical plasticity by non-invasive brain stimulation in healthy subjects. *J Physiol* 588, 2291–2304.
- Rogasch, N.C. und Fitzgerald, P.B. (2013): Assessing cortical network properties using TMS-EEG. *Hum Brain Mapp* 34, 1652–1669.
- Rossi, S., Hallett, M., Rossini, P.M., Pascual-Leone, A. und Safety of TMS Consensus Group. (2009): Safety, ethical considerations, and application guidelines for the use of transcranial magnetic stimulation in clinical practice and research. *Clin Neurophysiol* 120, 2008–2039.
- Rusu, C.V., Murakami, M., Ziemann, U. und Triesch, J. (2014): A model of TMS-induced I-waves in motor cortex. *Brain Stimul* 7, 401–414.
- Stagg, C.J., Bestmann, S., Constantinescu, A.O., Moreno, L.M., Allman, C., Meke, R., Woolrich, M., Near, J., Johansen-Berg, H. und Rothwell, J.C. (2011): Relationship between physiological measures of excitability and levels of glutamate and GABA in the human motor cortex. *J Physiol* 589, 5845–5855.
- Tang, A., Thickbroom, G. und Rodger, J. (2015): Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation of the Brain: Mechanisms from Animal and Experimental Models. *Neuroscientist*.
- Thimm, A. und Funke, K. (2015): Multiple blocks of intermittent and continuous theta-burst stimulation applied via transcranial magnetic stimulation differently affect sensory responses in rat barrel cortex. *J Physiol* 593, 967–985.
- Tremblay, R., Lee, S. und Rudy, B. (2016): GABAergic Interneurons in the Neocortex: From Cellular Properties to Circuits. *Neuron* 91, 260–292.
- Tyagarajan, S.K. und Fritschy, J.M. (2014) Gephyrin: a master regulator of neuronal function? *Nat Rev Neurosci* 15, 141–156.
- Vlachos, A., Muller-Dahlhaus, F., Rosskopf, J., Lenz, M., Ziemann, U. und Deller, T. (2012): Repetitive magnetic stimulation induces functional and structural plasticity of excitatory postsynapses in mouse organotypic hippocampal slice cultures. *J Neurosci* 32, 17514–17523.
- Volz, L.J., Rehme, A.K., Michely, J., Nettekoven, C., Eickhoff, S.B., Fink, G.R., Grefkes, C. (2016): Shaping early reorganization of neural networks promotes motor function after Stroke. *Cereb Cortex* 26, 2882–2894.
- Ziemann, U., Paulus, W., Nitsche, M.A., Pascual-Leone, A., Byblow, W.D., Berardelli, A., Siebner, H.R., Classen, J., Cohen, L.G. und Rothwell, J.C. (2008): Consensus: Motor cortex plasticity protocols. *Brain Stimul* 1, 164–182.
- Ziemann, U., Reis, J., Schwenkreis, P., Rosanova, M., Strafella, A., Badawy, R. und Muller-Dahlhaus, F. (2015): TMS and drugs revisited 2014. *Clin Neurophysiol* 126, 1847–1868.
- Zrenner, C., Belardinelli, P., Muller-Dahlhaus, F. und Ziemann, U. (2016): Closed-Loop Neuroscience and Non-Invasive Brain Stimulation: A Tale of Two Loops. *Front Cell Neurosci* 10, 92.

## Autoreninformationen



**Prof. Dr. Andreas Vlachos**

Institut für Anatomie II, Medizinische Fakultät, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Moorenstraße 5, 40225 Düsseldorf, E-Mail: [andreas.vlachos@med.uni-duesseldorf.de](mailto:andreas.vlachos@med.uni-duesseldorf.de)

Prof. Dr. Andreas Vlachos studierte Medizin an der Goethe-Universität in Frankfurt/M. (2001–2008) und promovierte nach einem Forschungsaufenthalt am Weizmann Institute of Science (Rehovot, Israel) im Jahre 2010 in Frankfurt/M. über die Rolle des aktin-bindenden Proteins Synaptopodin bei synaptischer Plastizität. 2011 erhielt er den Nachwuchspreis der Anatomischen Gesellschaft und habilitierte 2014 für das Gesamtfach Anatomie. Im März 2016 folgte er einem Ruf auf eine W2-Professur für Anatomie an die Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf. Der wissenschaftliche Schwerpunkt seiner Arbeitsgruppe liegt in der Untersuchung und Modulation homöostatischer Struktur-Funktions-Beziehungen im Zentralnervensystem.



**Prof. Dr. Klaus Funke**

Institut für Neurophysiologie, Medizinische Fakultät, Ruhr-Universität Bochum, 44780 Bochum

Prof. Dr. Klaus Funke erwarb 1983 sein Diplom in Biologie mit Studien am spinalen somatosensorischen System der Taube. Die elektrophysiologische und histologische Charakterisierung der

spezifischen und multimodalen somatosensorischen Repräsentationsareale im Vorderhirn der Taube war dann Gegenstand seiner Promotion im Jahr 1988. Als wissenschaftlicher Mitarbeiter und später akademischer Rat in der Abteilung für Neurophysiologie der Medizinischen Fakultät der Ruhr-Universität Bochum widmete er sich der zustandsabhängigen (EEG, Neuromodulatoren) Verarbeitung visueller Signale im Thalamus und Kortex und habilitierte sich 1996 in Physiologie. Seit nunmehr 15 Jahren untersucht er die zellulären Mechanismen der transkraniellen Magnetstimulation mittels elektrophysiologischer und histologisch/biochemischer Ansätze und ist derzeit Mitglied des German Center for Brain Stimulation (GCBS) als Teil des BMBF Forschungsnetzes zu psychiatrischen Erkrankungen.



**Prof. Dr. Ulf Ziemann**

Abteilung für Neurologie mit Schwerpunkt neurovaskuläre Erkrankungen und Hertie-Institut für klinische Hirnforschung, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 72076 Tübingen

Prof. Dr. Ulf Ziemann ist Klinischer Direktor der Abteilung Neurologie mit Schwerpunkt neurovaskuläre Erkrankungen, und Direktor am Hertie-Institut für Klinische Hirnforschung, Universität Tübingen. Seine wissenschaftlichen Schwerpunkte liegen im Bereich der systemischen Neurowissenschaften, Motorkortex Erregbarkeit und Plastizität, motorisches Lernen, nicht-invasive Hirnstimulation inklusive hirnzustandsabhängiger Stimulation und Neuropharmakologie. Er ist Chef-Editor von *Clinical Neurophysiology*. Er erhielt mehrere Preise, darunter den Richard-Jung-Preis der Dt. Gesellschaft für klinische Neurophysiologie und funktionelle Bildgebung, den NIH Merit Award und den NIH Fellowship Award for Research Excellence.

Andreas Vlachos\*, Klaus Funke and Ulf Ziemann

# Assessment and modulation of cortical inhibition using transcranial magnetic stimulation

DOI 10.1515/nf-2016-A103

**Abstract:** Transcranial magnetic stimulation (TMS) is a non-invasive brain stimulation technique, which is used for diagnostic, therapeutic and scientific purposes in the field of neurology and psychiatry. It is based on the physical principle of electromagnetic induction and allows for the local activation of cortical areas through the intact skull of conscious humans. When applied repeatedly (repetitive TMS; rTMS) sustained changes of cortical excitability can be observed. Hence, TMS resembles a promising approach for assessing and modulating neuronal networks in a non-invasive manner. However, despite its broad clinical application, the cellular and molecular mechanisms of rTMS-based therapies remain not well understood. Established therapeutic concepts assume that pathologically altered cortical excitability is normalised, which may involve ‘long-term potentiation’ or ‘long-term depression’ of excitatory synapses. Indeed, animal studies demonstrate that rTMS induces long-term changes of excitatory neurotransmission. However, it is unclear through which mechanisms synaptic changes, which are caused by external electromagnetic activation of the cortex and therefore are not specific for context or behaviour, could have a positive impact on complex brain function. More recent findings suggest that not only excitatory but also inhibitory neuronal networks are modulated by rTMS. It was shown for example that 10 Hz rTMS leads to a calcium-dependent long-term depression of inhibitory GABAergic synapses. Since the reduction of inhibitory neurotransmission (= disinhibition) is considered important for the expression of associative plasticity at excitatory synapses, it is conceivable that rTMS-induced disinhibition may promote context- and behaviour-specific synaptic changes. Hence, the model of *rTMS-induced local disinhibition* represents an attractive explanation for

the observation that a seemingly unspecific (exogenous) magnetic stimulation could induce specific (endogenous) structural, functional and molecular changes of cortical synapses. Current research focuses on the effect of rTMS-induced disinhibition on synaptic plasticity in suitable animal models (both *in vivo* and *in vitro*). Thus, apart from its diagnostic and therapeutic potential TMS represents a promising method for conducting clinically-oriented translational plasticity studies.

**Keywords:** non-invasive brain stimulation, synaptic plasticity, disinhibition, interneurons

## Introduction

The ability of the brain to respond with structural, functional and molecular changes to a specific stimulus is generally called plasticity (Konorski, 1948). Activity-dependent changes at neuronal contact sites, so-called synaptic plasticity, play a crucial role in physiological brain functions, such as learning, memory and orientation in space and time. The cellular and molecular mechanisms of associative synaptic plasticity (Hebb, 1949), i.e., the cellular and molecular correlate of context- and behaviour-specific modifications in the brain, have been thoroughly investigated during the past decades [see for example (Bliss and Collingridge, 1993; Nicoll and Roche, 2013)].

Evidence for plastic changes in the human brain comes from TMS-studies (among others; Ziemann et al., 2008). TMS is a non-invasive brain stimulation method utilising the principle of electromagnetic induction. A very brief (~500 µs) and strong magnetic field (> 1 Tesla) is generated over the skull of a healthy subject or patient using an appropriate stimulation coil (Fig. 1a). This magnetic field results in the induction of electric fields in the brain, which in turn activate neurons. Since magnetic fields penetrate skin and the intact skull (= transcranial), this stimulation technique is regarded as *non-invasive*. TMS is considered safe if performed according to established security guidelines and is in general well tolerated (Rossi et al., 2009).

Typically, the effects of single TMS pulses over the primary motor cortex are assessed and quantified by re-

\*Corresponding author: Prof. Dr. Andreas Vlachos, Institute of Anatomy II, Faculty of Medicine, Heinrich-Heine-University Düsseldorf, Moorenstraße 5, 40225 Düsseldorf, E-mail: andreas.vlachos@med.uni-duesseldorf.de

Prof. Dr. Klaus Funke, Institute of Neurophysiology, Medical Faculty, Ruhr-University Bochum, 44780 Bochum

Prof. Dr. Ulf Ziemann, Department of Neurology and Stroke and Hertie Institute of Clinical Brain Research, Eberhard-Karls-University Tübingen, 72076 Tübingen

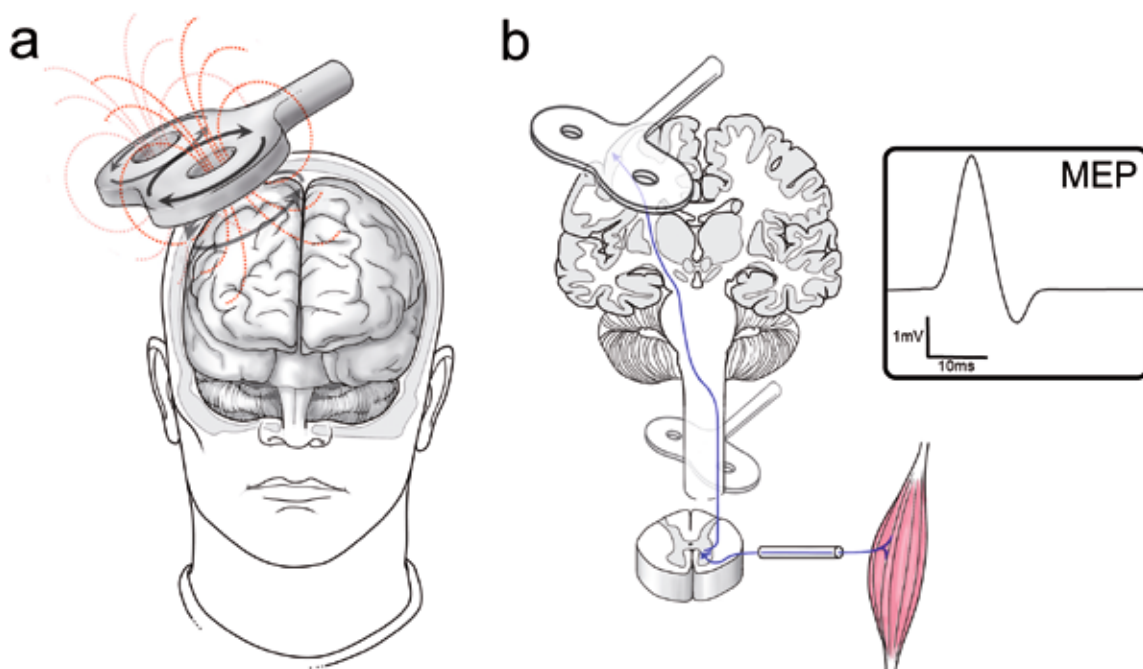
cording of so-called motor evoked potentials (MEP) in the target muscle (Fig. 1b). Combined stimulation of the motor cortex and the spinal cord can be used to diagnostically assess the central motor conduction time, which is prolonged in demyelinating diseases like multiple sclerosis. Application of consecutive trains of stimuli with up to several hundreds of TMS pulses (repetitive TMS, rTMS) over the motor cortex can lead to changes of cortical excitability beyond the period of stimulation: high-frequency rTMS ( $\geq 5$  Hz) typically increases cortico-spinal excitability, measured as an increase of MEP amplitude, whereas low-frequency rTMS (1 Hz) reduces it. Based on pharmacological studies and analogies to conventional plasticity experiments, it has been hypothesised that rTMS-induced changes of cortical excitability may represent long-term potentiation or long-term depression of excitatory synapses (Ziemann et al. 2008). Indeed, using organotypic brain slice cultures, it was shown that repetitive magnetic stimulation induces structural, functional and molecular changes of excitatory synapses, corresponding long-term potentiation and thus associative excitatory synaptic plasticity (Vlachos et al., 2012). Consistent with these findings it was shown that rTMS promotes learning in animal experiments (Mix et al., 2010) and motor rehabilitation following ischemic stroke in humans (Brodie et al., 2014; Volz et al., 2016). However, it remains unclear how complex brain function in healthy subjects and in patients is improved by activity-dependent modifications of neu-

ronal networks, caused by several hundred of exogenous magnetic pulses.

## Role of inhibitory networks in associative synaptic plasticity

In recent years the role of inhibitory neuronal networks on physiological brain functions has been carefully investigated (Trembley et al., 2016). It is now well accepted that inhibitory interneurons control the activity and excitability of neuronal networks. This observation led to the hypothesis that a decrease of inhibitory neurotransmission, i.e. *disinhibition*, may promote associative synaptic plasticity and thus learning and memory formation. Indeed, evidence has been provided that a reduction of GABAergic inhibition improves learning and memory, whereas increased inhibition impairs plasticity induction (Trembley et al., 2016). Thus, our current understanding is that *local disinhibitory networks* play a central role in regulating learning and memory formation (Letzkus et al., 2015).

Apart from plasticity of GABAergic synapses (Frommeke, 2015), local disinhibition can be achieved through different network motifs: for example by 1) decreased glutamatergic activation of local inhibitory interneurons, 2) increased activity of inhibitory projection neurons, which inhibit local inhibitory interneurons of other cortical areas,

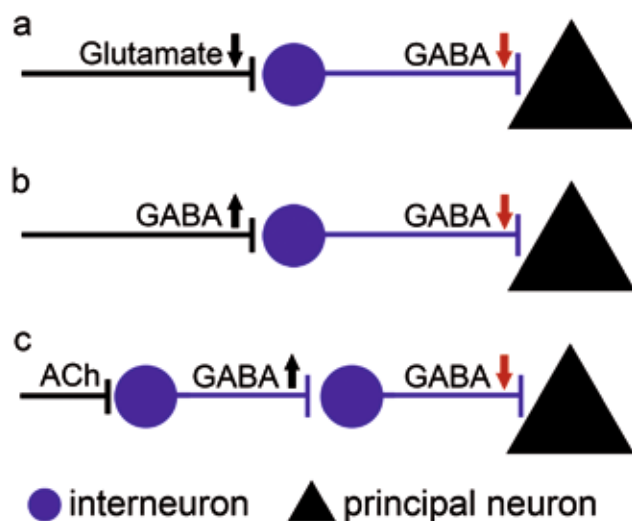


**Fig. 1:** Transcranial magnetic stimulation (TMS). (a) Visualisation of transcranial magnetic stimulation (b) of the motor cortex and the spinal cord. The effects of TMS are quantified by recording of motor evoked potentials (MEPs).



or 3) by neuromodulatory projection pathways that activate specific local interneurons, which in turn inhibit other local interneurons [Fig. 2; see also (Letzkus et al., 2015)].

The clinical relevance of disinhibition [e.g. (Nelson and Valakh, 2015)] is also reflected by the fact that alterations of excitation/inhibition-balance are considered a major cause for neurological and psychiatric symptoms. Therefore, from a clinical point of view tools/approaches enabling the assessment and modulation of (dis)inhibitory networks seem highly attractive. Appropriate diagnostic and/or interventional measures could detect and moreover influence the ability of the human brain to express endogenous plasticity, making TMS an interesting clinical tool.



**Fig. 2: Network motifs of local disinhibition.** Besides a ‘long-term depression’ of inhibitory synapses on pyramidal cells local disinhibition can be achieved by several network motifs: e.g. by (a) decreased glutamatergic activation of local inhibitory interneurons, (b) increased activity of inhibitory projection neurons, which innervate local interneurons or by (c) neuromodulatory projection pathways (e.g. cholinergic projections; acetylcholine, ACh), which activate specific local interneurons, which in turn mediate inhibition of other local interneurons.

## TMS-based assessment of inhibitory cortical networks

Functional experiments of intra- and intercortical inhibition in the motor cortex of the human brain are mainly based on TMS-studies (Di Lazzaro and Ziemann, 2013). In recent years, several specific double-pulse protocols have been established in this context: the so-called ‘short-interval intracortical inhibition’ (SICI) is based on application

of a subthreshold conditioning TMS pulse, which does not induce MEPs itself, followed by a suprathreshold test pulse within a short interval (1–5 ms). In contrast, ‘long-interval intracortical inhibition’ (LICI) consists of pairing of two suprathreshold TMS pulses with a longer interval (50–200 ms). In both cases, inhibition of the test MEP amplitude can be observed. While the fundamental network mechanisms still remain elusive (Di Lazzaro and Ziemann, 2013), it is assumed that the initial pulse is responsible for a characteristic (direct or indirect) activation of inhibitory interneurons, triggering a quantifiable reduction of the test MEP. Meanwhile, pharmacological studies indicate that SICI reflects the influence of ionotropic GABA<sub>A</sub> receptors, whereas LICI is rather attributed to metabotropic GABA<sub>B</sub> receptors (Ziemann et al., 2015). Thus, characteristic TMS protocols allow for the non-invasive, functional analysis of local inhibitory networks in the human motor cortex.

However, an important limitation in this context is the fact that quantification of TMS effects require recordings of MEPs. These potentials are not recorded at the point of stimulation, meaning at least two synapses beyond the stimulated motor cortex (Fig. 1b). Also, these protocols cannot be translated to other (disease-related) brain regions. Furthermore, because of possible ‘filtering’ of cortico-spinal synapses and the motor endplate, a direct correlation between MEP amplitude and cortical excitability remains controversial. Accordingly, efforts are currently focusing on a more direct analysis of cortical inhibition, which is independent of the stimulated area of the cortex, using TMS-evoked electroencephalographic (EEG) potentials (Rogasch and Fitzgerald, 2013; Premoli et al., 2014). This attempt is supported by other techniques, e.g. GABA-magnetic resonance spectroscopy (Stagg et al., 2011). However, it remains to be shown, to what extent plasticity inducing rTMS protocols change TMS-evoked EEG signals and what the underlying mechanisms might be.

## rTMS-induced modulation of inhibitory networks

While the effects of rTMS on excitatory synapses have been demonstrated in several animal models (both *in vivo* and *in vitro*; Tang et al, 2015), rTMS-induced changes in inhibitory synapses remain not well characterized. However, robust experimental data show that specific rTMS protocols differentially affect calcium-binding molecules, which are regarded as activity- and plasticity-markers of inhibitory interneurons (Caroni, 2015). Thus, for example intermit-

tent theta-burst stimulation (iTBS) causes a reduction of parvalbumin (PV) expression in inhibitory interneurons of the rat cortex, whereas a continuous theta-burst stimulation (cTBS) and low-frequency rTMS (1 Hz) rather reduce calbindin expression in another set of interneurons (Benali et al., 2011). Since PV-expressing interneurons mediate somatic inhibition of principal neurons and calbindin-positive interneurons affect dendritic inhibition, these studies suggest that rTMS can influence specific aspects of network inhibition (e.g. control of efferent and afferent activity on pyramidal cells) based on the particular rTMS protocol employed. Notably, current studies mainly show a decrease of the relevant marker molecules, which is consistent with rTMS-induced disinhibition.

Unpublished data suggest that interneurons with reduced PV expression receive fewer neocortical glutamatergic inputs than those with high PV expression (also see Fig. 2). Similar correlations between PV expression and the balance of excitatory and inhibitory synaptic inputs were earlier described in the hippocampus of mice (Donato et al., 2013). Another electrophysiological study in the primary somatosensory cortex of rats further demonstrates that a decrease of PV expression, induced by iTBS-rTMS, is accompanied by an increase of sensory responses (Thimm and Funke, 2015). This observation supports the notion that rTMS-induced disinhibition could underlie the previously described improvement in learning behaviour (Mix et al., 2010). Albeit, studies of interneuronal activity- and plasticity-markers are not directly demonstrating rTMS-induced functional changes of inhibitory synapses.

## rTMS-induced long-term depression of inhibitory synapses

In a recent study the effects of repetitive magnetic stimulation (rMS) on structural, functional and molecular properties of inhibitory synapses were studied (Lenz et al., 2016). Using single cell recordings of CA1 pyramidal neurons in mouse brain slice cultures, we showed that rMS indeed reduces inhibitory neurotransmission. These functional changes were accompanied by structural and molecular changes of inhibitory postsynapses, i.e. the reduction and destabilisation of gephyrin clusters, the major scaffolding protein at inhibitory postsynapses to which GABA<sub>A</sub> receptors anchor (Tyagarajan and Fritschy 2014; Kneussel and Hausrat 2016).

The rMS-induced reduction in inhibitory neurotransmission requires the activation of voltage-gated sodium channels, NMDA receptors and L-type voltage-gated calci-

um channels during stimulation. Furthermore, the effects of rMS on inhibition are not detectable in the presence of cyclosporine A, an inhibitor of calcineurin-dependent phosphatase. Based on these results we conclude that rMS induces calcium-dependent phosphorylation/dephosphorylation reactions, which destabilize gephyrin scaffolds and thereby mediate a long-term depression of GABAergic neurotransmission. In our experimental setting tonic inhibition, mediated by extrasynaptic GABA receptors, was not affected by rMS (Lenz et al., 2016).

Pharmacological inhibition of calpain-dependent proteases did not alter the effects of rMS. Since calpain has been linked to the calcium-dependent degradation of gephyrin under conditions of hyperexcitation (Tyagarajan and Fritschy 2014), these data indicate that the applied 10 Hz rMS protocol does not result in excessive and potentially toxic excitation of neuronal networks, which is usually accompanied by proteolytic degradation of essential synaptic elements.

Since rTMS-induced changes in gephyrin were also observed *in vivo*, using anaesthetized mice, our results indicate that rTMS could be a promising interventional tool to regulate gephyrin-dependent inhibitory synaptic plasticity. This conclusion is of clinical relevance since changes of the human gene locus for gephyrin are linked with an increased risk to develop autism, schizophrenia and epilepsy (Lionel et al., 2013). Together with the studies described above, these results show that rTMS is able to mediate long-term changes of inhibitory neurotransmission consistent with rTMS-induced disinhibition.

## Interactions of rTMS-induced inhibitory and excitatory synaptic plasticity

Apparently, rTMS is capable of modulating inhibitory and excitatory neurotransmission. Interestingly our experiments show that both processes are calcium-dependent and require the activation of NMDA receptors and L-type voltage-gated calcium channels (Vlachos et al., 2012; Lenz et al., 2015, 2016). Based on this observation, the question arises how rTMS-induced inhibitory and excitatory synaptic modifications interact with each other (at the temporal, spatial and molecular level).

Based on the proposed concept of *rTMS-induced disinhibition*, it is interesting to hypothesize that rTMS mainly modulates inhibitory synapses whereas changes of excitatory synapses rather reflect the result of a 'disinhibition-in-

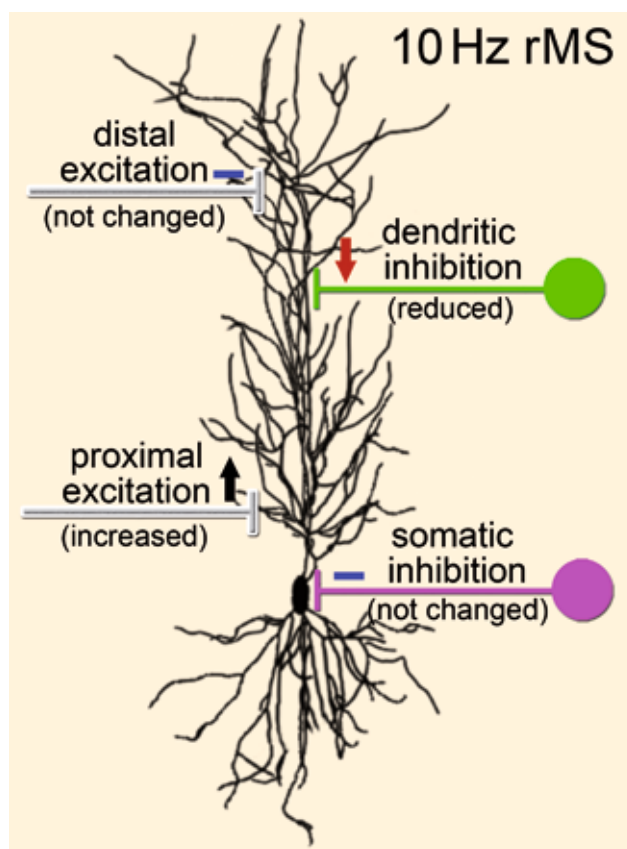
duced gating of associative excitatory synaptic plasticity'. Indeed, our *in vitro* experiments reveal that 10 Hz rMS is not immediately followed by a post-tetanic increase of excitatory synaptic strength as seen in classic LTP-experiments using local electric stimulation. Instead, a slow-onset potentiation of excitatory synapses within 1–2 h after stimulation, plateauing after 2–4 h, is observed (Vlachos et al., 2012). In contrast, expression changes of inhibitory marker molecules in the rat cortex can already be detected after 30 min following rTMS (Hoppenrath and Funke, 2013). These findings support the hypothesis that plasticity of excitatory synapses is not directly attributed to rTMS. In light of this hypothesis experiments addressing the exact temporal sequence of rTMS-induced long-term depression of inhibitory synapses (Lenz et al., 2016) and of rTMS-induced modification of excitatory synapses (Vlachos et al., 2012) seem crucial. Moreover, studies in which network activity is systematically modulated before, during and after rTMS (e.g. by applying pharmacological or optogenetic techniques) could help answering the question to what extent the effects of rTMS depend on the activity-state of the network. We are optimistic that this work will also shed a light on the influence of rTMS-induced disinhibition on metaplasticity and homeostatic plasticity. Furthermore, it could contribute to the recent discussion about the significant inter- and intra-individual variability of rTMS-effects in humans (Muller-Dahlhaus et al., 2008; Hamada et al., 2013; Lopez-Alonso et al., 2014). In this context it is interesting to speculate that the cellular and molecular processes, induced by a specific rTMS protocol *per se*, are not that variable, whereas the long-term effects could very well depend on various inter- and intra-individual parameters [(e.g. age, alertness, time of stimulation, etc. (Ridding and Ziemann, 2010))].

## Synapse-specific effects of rTMS

rTMS-induced disinhibition represents an interesting explanation for the observation that a seemingly unspecific exogenous stimulation of cortical networks can lead to context- and behaviour-specific changes. For example, it might be possible to apply 10 Hz rTMS or iTBS prior to rehabilitation methods following stroke, in order to support specific training effects by 'disinhibition-induced gating of associative plasticity' at specific excitatory synapses (Volz et al., 2016).

Indeed, evidence has been provided that rMS is able to induce plasticity of specific synapses on principal neurons (Fig. 3): 10 Hz rMS mainly affects dendritic but not somatic inhibition (Lenz et al., 2016). In turn, the same sti-

mulation protocol results in potentiation of excitatory synapses on small dendritic spines close to the soma of pyramidal neurons (Vlachos et al., 2012; Lenz et al., 2015). The exact mechanisms leading to these synapse/input-specific effects of rTMS need to be determined. Nevertheless, from an anatomical point of view it is an interesting concept that specific rTMS parameter may selectively enhance excitatory synapses close to the soma of projection neurons, e.g. thalamo-cortical projections in lamina 4 of the cortex, while dendritic disinhibition could facilitate the ability to express plasticity in dendrites of the superficial associative cortical layers. It remains to be clarified to what extent the synapse-specific effects of rMS, which are detected on CA1 pyramidal cells of organotypic hippocampal cultures, can be transferred to other neuronal cell types and networks of the cortex.



**Fig. 3: Synapse-specific effects of repetitive magnetic stimulation (rMS).** Despite the relatively large induced electromagnetic field, rMS is able to differentially affect distinct synapses on pyramidal cells. *In vitro* studies show that 10 Hz rMS results in decreased dendritic inhibition, and in an increase of excitatory synaptic neurotransmission on small dendritic spines close to the soma of pyramidal neurons. The exact mechanisms of these input-specific effects of rMS are currently under investigation.

## Effects of TMS during stimulation

An import, still unanswered question concerns the neural effects of TMS during stimulation. Most of the assumptions in this context are based on computational approaches (Esser et al., 2005; Rusu et al., 2014). One of the major technical challenges are the strong electromagnetic fields generated during stimulation. These fields impede electrophysiological recordings, i.e. single-cell recording of neural activity, despite a few studies, which were performed with a low field strength and adequate position of the recording electrodes (Moliadze et al., 2005; Mueller et al., 2014; Pashut et al., 2014). Meanwhile ‘contact-free’ functional microscopy techniques, e.g. via calcium- or voltage-sensitive dyes (Kozyrev et al., 2014; Murphy et al., 2016), indicate that a low stimulation intensity mainly activates inhibitory interneurons, whereas projection neurons will be recruited with higher intensities [see (Pashut et al., 2014)]. Hence, these studies convey a plausible explanation for the already described SICI double-pulse protocol, where the subthreshold conditioning TMS pulse results in a GABA<sub>A</sub> receptor-dependent inhibition of the test MEP response.

In order to understand the effects of rTMS in more detail it will be important to simultaneously record the activity pattern of whole neuron populations with a high temporal and spatial resolution. Such studies may also shed light on the role of so-called backward propagating action potentials, which seem to play an important role in rTMS-induced synaptic plasticity (Lenz et al., 2015). Certainly, the currently available information is not enough to reliably predict effects of rTMS using computer-based simulations. Our pharmacological studies have so far only reveal that during stimulation, the activation of voltage-gated sodium channels, NMDA-receptors and L-type voltage-gated calcium channels is required in order to mediate rTMS-induced changes in excitatory and inhibitory neurotransmission *in vitro*. In this context, the potential influence of TMS on glia cells (astrocytes, oligodendrocytes and microglia) as well as on the neurovascular system also needs to be considered.

## Open questions and perspectives

30 years after the development of the first TMS device by Anthony Barker and colleagues (Barker et al., 1985) important information about the cellular and molecular mechanisms of TMS have started to emerge. However, current rTMS-based therapies do not result in significant and

long-lasting improvement of neurological and psychiatric symptoms (Lefaucheur et al., 2014). The fact that the mechanisms of rTMS are still poorly understood hinders substantial progress in this clinically relevant area. Furthermore, our limited knowledge about the role of synaptic plasticity under pathological conditions restricts a more efficient application of rTMS.

Studies from recent years showed that alterations of synaptic plasticity are not necessarily reflecting neurological or psychiatric diseases (Maggio and Vlachos, 2014). In fact, a decrease in the ability of neurons to express plasticity could also protect networks from ‘maladaptive changes’. At the same time potential negative effects on the success of rehabilitation measures need to be considered in this context. Our current understanding is that the threshold for the expression of plasticity changes during the course of a disease. Changes in the excitation/inhibition-balance seem to play a crucial role since, as it is discussed in this article, changes of inhibitory synapses influence plasticity of excitatory synapses. It is clear that a comprehensive understanding of the role of various forms of synaptic plasticity (associative, homeostatic plasticity and metaplasticity) under pathological conditions needs to be obtained in order to successfully employ plasticity modulating therapeutic strategies.

Future diagnostic and therapeutic interventions could be aimed at assessing and modulating the ability of neural networks to express plasticity at different time points in the course of a disease and in identified cortical regions. Apparently, TMS resembles an attractive clinical tool in this respect. In fact, TMS may also overcome or complement deficits of conventional pharmacologic treatment, which lacks the required temporal and spatial specificity. Accordingly, the diagnostic and therapeutic potential of rTMS regarding inhibitory networks needs to be further elaborated and additional cellular and molecular effects of rTMS need to be considered, e.g. influence on gene expression, mRNA transport/stability, local protein biosynthesis, interaction with mitochondria and role of glial and vascular factors. Yet, *rTMS-induced disinhibition* represents a promising working hypothesis for future studies.

In this context it will also be necessary to consider the influence of rTMS on the described network motifs of local (dis)inhibition (Fig. 2); thus, the influence of rTMS on (1) glutamatergic synapses on inhibitory interneurons, (2) on intercortical inhibitory projections and (3) neuromodulatory projection pathways. Moreover, the effects of different TMS stimulation parameters need to be studied systematically, in order to determine for example whether it is also possible to increase inhibition and/or modulate somatic inhibitory neurotransmission (Fig. 3). Current studies are



trying to read activity states of neuronal networks in the brain ('brain states') by EEG in real time and to apply repetitive TMS pulses specifically only at time points of a certain state (Zrenner et al., 2016). This approach is based on the theory that the excitability of neuronal networks is regulated by pulsed inhibition (Jensen and Mazaheri, 2010). We anticipate that brain state-dependent rTMS, in contrast to conventional 'open-loop' stimulation, will significantly improve the effects of rTMS toward long-term plasticity. Thus, the future of therapeutic rTMS protocols may lie in 'closed-loop' approaches, which consequently utilise spontaneous rhythmic oscillations of inhibitory activity.

Perspectively, computational approaches could be helpful in selecting 'ideal' stimulation parameters/protocols for a given individual. However, the required basic information regarding the exact modes of action of TMS during and after the stimulation currently still remains elusive. It is clear that a better understanding of rTMS-induced plasticity will support the optimisation of existing therapeutic concepts, which already focus on modulating excitation/inhibition-balance (e.g. in the context of stroke or epilepsy therapy). We are convinced that the concept of *rTMS-induced local disinhibition* will gain attention in this context. Thus, apart from its diagnostic and therapeutic potential TMS represents a promising methodical tool to perform clinically orientated translational plasticity studies, addressing the relevance of disinhibition and synaptic plasticity under physiological and pathological conditions.

**Acknowledgement:** Supported by the German research foundation and the German Ministry of Science and Education

## References

- Barker, A.T., Jalinous, R. and Freeston, I.L. (1985): Non-invasive magnetic stimulation of human motor cortex. *Lancet* 1, 1106–1107.
- Benali, A., Trippe, J., Weiler, E., Mix, A., Petrasch-Parwez, E., Girzalsky, W., Eysel, U.T., Erdmann, R. and Funke, K. (2011): Theta-burst transcranial magnetic stimulation alters cortical inhibition. *J Neurosci* 31, 1193–1203.
- Bliss, T.V. and Collingridge, G.L. (1993): A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, 31–39.
- Brodie, S.M., Meehan, S., Borich, M.R. and Boyd, L.A. (2014): 5 Hz repetitive transcranial magnetic stimulation over the ipsilesional sensory cortex enhances motor learning after stroke. *Front Hum Neurosci* 8, 143.
- Caroni, P. (2015): Regulation of Parvalbumin Basket cell plasticity in rule learning. *Biochem Biophys Res Commun* 460, 100–103.
- Di Lazzaro, V. and Ziemann, U. (2013): The contribution of transcranial magnetic stimulation in the functional evaluation of microcircuits in human motor cortex. *Front Neural Circuits* 7, 18.
- Donato, F., Rompani, S.B. and Caroni, P. (2013): Parvalbumin-expressing basket-cell network plasticity induced by experience regulates adult learning. *Nature* 504, 272–276.
- Esser, S.K., Hill, S.L. and Tononi, G. (2005): Modeling the effects of transcranial magnetic stimulation on cortical circuits. *J Neurophysiol* 94, 622–639.
- Froemke, R.C. (2015): Plasticity of cortical excitatory-inhibitory balance. *Annu Rev Neurosci* 38, 195–219.
- Hamada, M., Murase, N., Hasan, A., Balaratnam, M. and Rothwell, J.C. (2013): The role of interneuron networks in driving human motor cortical plasticity. *Cereb Cortex* 23, 1593–1605.
- Hebb, D.O. (1949): *The organization of behavior; a neuropsychological theory*. New York, Wiley.
- Hoppenrath, K. and Funke, K. (2013): Time-course of changes in neuronal activity markers following iTBS-TMS of the rat neocortex. *Neurosci Lett* 536, 19–23.
- Jensen, O. and Mazaheri, A. (2010): Shaping functional architecture by oscillatory alpha activity: gating by inhibition. *Front Hum Neurosci* 4, 186.
- Kneussel, M. und Hausrat, T.J. (2016): Postsynaptic neurotransmitter receptor reserve pools for synaptic potentiation. *Trends Neurosci* 39, 170–182.
- Konorski, J. (1948): *Conditioned reflexes and neuron organization*. Cambridge Eng.: University Press.
- Kozyrev, V., Eysel, U.T. and Jancke, D. (2014): Voltage-sensitive dye imaging of transcranial magnetic stimulation-induced intracortical dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA* 111, 13553–13558.
- Lefaucheur, J.P., Andre-Obadia, N., Antal, A., Ayache, S.S., Baeken, C., Benninger, D.H., Cantello, R.M., Cincotta, M., De Carvalho, M., De Ridder, D., Devanne, H., Di Lazzaro, V., Filipovic, S.R., Hummel, F.C., Jaaskelainen, S.K., Kimiskidis, V.K., Koch, G., Langguth, B., Nyffeler, T., Oliviero, A., Padberg, F., Poulet, E., Rossi, S., Rossini, P.M., Rothwell, J.C., Schonfeldt-Lecuona, C., Siebner, H.R., Slotema, C.W., Stagg, C.J., Valls-Sole, J., Ziemann, U., Paulus, W. and Garcia-Larrea, L. (2014): Evidence-based guidelines on the therapeutic use of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS). *Clin Neurophysiol* 125, 2150–2206.
- Lenz, M., Galanis, C., Muller-Dahlhaus, F., Opitz, A., Wierenga, C.J., Szabo, G., Ziemann, U., Deller, T., Funke, K. and Vlachos, A. (2016): Repetitive magnetic stimulation induces plasticity of inhibitory synapses. *Nat Commun* 7, 10020.
- Lenz, M., Platschek, S., Priesemann, V., Becker, D., Willems, L.M., Ziemann, U., Deller, T., Muller-Dahlhaus, F., Jedlicka, P. and Vlachos, A. (2015): Repetitive magnetic stimulation induces plasticity of excitatory postsynapses on proximal dendrites of cultured mouse CA1 pyramidal neurons. *Brain Struct Funct* 220, 3323–3337.
- Letzkus, J.J., Wolff, S.B. and Luthi, A. (2015): Disinhibition, a Circuit Mechanism for Associative Learning and Memory. *Neuron* 88, 264–276.
- Lionel, A.C., Vaags, A.K., Sato, D., Gazzellone, M.J., Mitchell, E.B., Chen, H.Y., Costain, G., Walker, S., Egger, G., Thiruv-

- hindrapuram, B., Merico, D., Prasad, A., Anagnostou, E., Fombonne, E., Zwaigenbaum, L., Roberts, W., Szatmari, P., Fernandez, B.A., Georgieva, L., Brzustowicz, L.M., Roetzer, K., Kaschnitz, W., Vincent, J.B., Windpassinger, C., Marshall, C.R., Trifiletti, R.R., Kirmani, S., Kirov, G., Petek, E., Hodge, J.C., Bassett, A.S. and Scherer, S.W. (2013): Rare exonic deletions implicate the synaptic organizer Gephyrin (GPHN) in risk for autism, schizophrenia and seizures. *Hum Mol Genet* 22, 2055–2066.
- Lopez-Alonso, V., Cheeran, B., Rio-Rodriguez, D. and Fernandez-Del-Olmo, M. (2014): Inter-individual variability in response to non-invasive brain stimulation paradigms. *Brain Stimul* 7, 372–380.
- Maggio, N. and Vlachos, A. (2014): Synaptic plasticity at the interface of health and disease: New insights on the role of endoplasmic reticulum intracellular calcium stores. *Neuroscience* 281, 135–146.
- Mix, A., Benali, A., Eysel, U.T. and Funke, K. (2010): Continuous and intermittent transcranial magnetic theta burst stimulation modify tactile learning performance and cortical protein expression in the rat differently. *Eur J Neurosci* 32, 1575–1586.
- Moliadze, V., Giannikopoulos, D., Eysel, U.T. and Funke, K. (2005): Paired-pulse transcranial magnetic stimulation protocol applied to visual cortex of anaesthetized cat: effects on visually evoked single-unit activity. *J Physiol* 566, 955–965.
- Mueller, J.K., Grigsby, E.M., Prevosto, V., Petraglia, F.W., 3rd, Rao, H., Deng, Z.D., Peterchev, A.V., Sommer, M.A., Egner, T., Platt, M.L. and Grill, W.M. (2014): Simultaneous transcranial magnetic stimulation and single-neuron recording in alert non-human primates. *Nat Neurosci* 17, 1130–1136.
- Muller-Dahlhaus, J.F., Orekhov, Y., Liu, Y. and Ziemann, U. (2008): Interindividual variability and age-dependency of motor cortical plasticity induced by paired associative stimulation. *Exp Brain Res* 187, 467–475.
- Murphy, S.C., Palmer, L.M., Nyffeler, T., Müri, R.M. und Larkum, M.E. (2016) Transcranial magnetic stimulation (TMS) inhibits cortical dendrites. *Elife* pii:e13598.
- Nelson, S.B. and Valakh, V. (2015): Excitatory/Inhibitory Balance and Circuit Homeostasis in Autism Spectrum Disorders. *Neuron* 87, 684–698.
- Nicoll, R.A. and Roche, K.W. (2013): Long-term potentiation: peeling the onion. *Neuropharmacology* 74, 18–22.
- Pashut, T., Magidov, D., Ben-Porat, H., Wolfus, S., Friedman, A., Perel, E., Lavidor, M., Bar-Gad, I., Yeshurun, Y. and Korngreen, A. (2014): Patch-clamp recordings of rat neurons from acute brain slices of the somatosensory cortex during magnetic stimulation. *Front Cell Neurosci* 8, 145.
- Premoli, I., Castellanos, N., Rivolta, D., Belardinelli, P., Bajo, R., Zipser, C., Espenhahn, S., Heidegger, T., Muller-Dahlhaus, F. and Ziemann, U. (2014): TMS-EEG signatures of GABAergic neurotransmission in the human cortex. *J Neurosci* 34, 5603–5612.
- Ridding, M.C. and Ziemann, U. (2010): Determinants of the induction of cortical plasticity by non-invasive brain stimulation in healthy subjects. *J Physiol* 588, 2291–2304.
- Rogasch, N.C. and Fitzgerald, P.B. (2013): Assessing cortical network properties using TMS-EEG. *Hum Brain Mapp* 34, 1652–1669.
- Rossi, S., Hallett, M., Rossini, P.M., Pascual-Leone, A. and Safety of TMS Consensus Group. (2009): Safety, ethical considerations, and application guidelines for the use of transcranial magnetic stimulation in clinical practice and research. *Clin Neurophysiol* 120, 2008–2039.
- Rusu, C.V., Murakami, M., Ziemann, U. and Triesch, J. (2014): A model of TMS-induced I-waves in motor cortex. *Brain Stimul* 7, 401–414.
- Stagg, C.J., Bestmann, S., Constantinescu, A.O., Moreno, L.M., Allman, C., Meke, R., Woolrich, M., Near, J., Johansen-Berg, H. and Rothwell, J.C. (2011): Relationship between physiological measures of excitability and levels of glutamate and GABA in the human motor cortex. *J Physiol* 589, 5845–5855.
- Tang, A., Thickbroom, G. and Rodger, J. (2015): Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation of the Brain: Mechanisms from Animal and Experimental Models. *Neuroscientist*.
- Thimm, A. and Funke, K. (2015): Multiple blocks of intermittent and continuous theta-burst stimulation applied via transcranial magnetic stimulation differently affect sensory responses in rat barrel cortex. *J Physiol* 593, 967–985.
- Tremblay, R., Lee, S. and Rudy, B. (2016): GABAergic Interneurons in the Neocortex: From Cellular Properties to Circuits. *Neuron* 91, 260–292.
- Tyagarajan, S.K. und Fritschy, J.M. (2014) Gephyrin: a master regulator of neuronal function? *Nat Rev Neurosci* 15, 141–156.
- Vlachos, A., Muller-Dahlhaus, F., Rosskopf, J., Lenz, M., Ziemann, U. and Deller, T. (2012): Repetitive magnetic stimulation induces functional and structural plasticity of excitatory postsynapses in mouse organotypic hippocampal slice cultures. *J Neurosci* 32, 17514–17523.
- Volz, L.J., Rehme, A.K., Michely, J., Nettekoven, C., Eickhoff, S.B., Fink, G.R., Grefkes, C. (2016): Shaping early reorganization of neural networks promotes motor function after Stroke. *Cereb Cortex* 26, 2882–2894.
- Ziemann, U., Paulus, W., Nitsche, M.A., Pascual-Leone, A., Byblow, W.D., Berardelli, A., Siebner, H.R., Classen, J., Cohen, L.G. and Rothwell, J.C. (2008): Consensus: Motor cortex plasticity protocols. *Brain Stimul* 1, 164–182.
- Ziemann, U., Reis, J., Schwenkreis, P., Rosanova, M., Strafella, A., Badawy, R. and Muller-Dahlhaus, F. (2015): TMS and drugs revisited 2014. *Clin Neurophysiol* 126, 1847–1868.
- Zrenner, C., Belardinelli, P., Muller-Dahlhaus, F. and Ziemann, U. (2016): Closed-Loop Neuroscience and Non-Invasive Brain Stimulation: A Tale of Two Loops. *Front Cell Neurosci* 10, 92.

## Bionotes



**Prof. Dr. Andreas Vlachos**

Institute of Anatomy II, Faculty of Medicine,  
Heinrich-Heine-University Düsseldorf,  
Moorenstraße 5, 40225 Düsseldorf, E-Mail:  
[andreas.vlachos@med.uni-duesseldorf.de](mailto:andreas.vlachos@med.uni-duesseldorf.de)

Andreas Vlachos studied medicine at the Goethe-University in Frankfurt (2001–2008). Following a research stay at the Weizmann Institute of Science (Rehovot, Israel) he received his PhD in Frankfurt (2010) for his work on synaptopodin and synaptic plasticity. He was awarded the young investigator prize of the Anatomical Society and received his habilitation/venia legendi in anatomy in 2014. In March 2016 he was appointed W2 professor at Heinrich-Heine-University in Duesseldorf. His scientific work focuses on the assessment and modulation of homeostatic structure-function interactions in the central nervous system.



**Prof. Dr. Klaus Funke**

Institute of Neurophysiology, Medical  
Faculty, Ruhr-University Bochum,  
44780 Bochum

Klaus Funke received a diploma in biology for his work on the spinal somatosensory system of the pigeon in 1983. He continued his

studies on the electrophysiological and histological characterization of the specific and multimodal somatosensory representation areas in the pigeon forebrain for which he got his PhD in 1988. As a postdoc and later on as academic councilor his work focused on the state dependent (EEG, neuromodulators) processing of visual signals in the thalamus and the cortex. He habilitated in physiology in 1996. Over the last 15 years he has investigated the cellular mechanisms of transcranial magnetic stimulation using electrophysiological and histological/biochemical approaches. He is currently a member of the German Center for Brain Stimulation (GCBS) which is part of the BMBF network for psychiatric diseases.



**Prof. Dr. Ulf Ziemann**

Department of Neurology and Stroke and  
Hertie Institute of Clinical Brain Research,  
Eberhard-Karls-University Tübingen,  
72076 Tübingen

Ulf Ziemann is clinical director of the department of neurology with a special focus on neurovascular diseases, and director at the Hertie-Institute for Clinical Brain Research at the University of Tübingen. His research focuses on systems neuroscience, excitability and plasticity of the motor cortex, motor learning, non-invasive brain stimulation including brain-state dependent stimulation, and neuropharmacology. He is editor-in-chief of Clinical Neurophysiology. He was awarded several research prizes, among those the Richard-Jung-Prize of the German Society for Clinical Neurophysiology, the NIH Merit Award, and the NIH Fellowship Award for Research Excellence.

## Übersichtsartikel

Sebastian Rumpf\*, Sandra Rode, Rafael Krumkamp und Svende Herzmann

# Mechanismen des Neuritischen Prunings

DOI 10.1515/nf-2016-1105

**Zusammenfassung:** Die Entwicklung des Nervensystems beinhaltet sowohl progressive Phasen, in denen Neuriten und Synapsen geformt werden, als auch regressive Phasen, in denen überzählige Fortsätze zurückgezogen und abgebaut werden. Solche regressiven Mechanismen werden auch als *Pruning*-Prozesse bezeichnet. *Pruning* wird zur Spezifizierung neuronaler Verbindungen benötigt, aber auch, um temporär benötigte Strukturen wieder zu entfernen. Dabei können sowohl einzelne Synapsen als auch lange Neuriten entfernt werden. Hier stellen wir vier Beispiele für entwicklungsabhängiges *Pruning* aus Säugern und *Drosophila* mit ihrem biologischen Zweck und zellbiologischem Mechanismus vor. Dabei wollen wir mechanistische Gemeinsamkeiten der verschiedenen Modelle hervorheben.

**Schlüsselwörter:** Neuronalentwicklung; Neuronale Schaltkreise; Neurodegeneration; Phagozytose

## Einleitung

Nervenzellen besitzen charakteristische lange und verzweigte Fortsätze (Neuriten), die Dendriten und Axone, die über Synapsen miteinander verbunden sind. Sie dienen der Aufnahme bzw. der Weiterleitung von Information in Form von elektrischen Reizen. Während der Entwicklung wachsen Neuriten mit hoher Zielgenauigkeit und über lange Strecken, bis sie ihre jeweilige Zielregion erreicht

haben. Aber nicht nur Neuritenwachstum und Synapsenbildung sind für die Vernetzung im Nervensystem wichtig, sondern auch die regulierte Entfernung von Neuriten und Synapsen. Solche regressiven Mechanismen werden oft unter dem Begriff *Pruning* zusammengefasst (englisch *to prune*: auslauben, stutzen, beschneiden) (Schuldiner und Yaron, 2015). So wächst die Synapsendichte im menschlichen Gehirn während des ersten Lebensjahrs rapide, fällt dann jedoch bis nach der Pubertät wieder stetig (Huttenlocher, 1990). Durch *Pruning* können nicht nur kleine Synapsen, sondern auch lange Abschnitte von Axonen oder Dendriten entfernt werden. Hier stellen wir vier Beispiele für entwicklungsabhängiges *Pruning* und die dazugehörigen zellbiologischen Mechanismen vor: Synapsenelimination an der Neuromuskulären Endplatte in Säugern, *Pruning* bei der Ausbildung von augenspezifischen Verbindungen im visuellen System, Spezifizierung von efferenten Axonen von Neuronen in der kortikalen Schicht V, und das *Pruning* von sensorischen *class IV dendritic arborization* (c4da)-Neuronen in der Fruchtfliege *Drosophila*. Anhand dieser Beispiele diskutieren wir dann allgemeine zellbiologische Mechanismen des *Pruning*.

## *Pruning*: Spezifizierung neuronaler Schaltkreise und mehr

Warum werden während der Entwicklung Neuriten und Synapsen gebildet, nur um kurz darauf wieder abgebaut zu werden? Zum einen müssen die Milliarden Nervenzellen im Säugergehirn eine Vielzahl hochspezifischer Synapsen bilden (manche Neuronen haben über tausend Synapsen). Diese hohe Anzahl erfordert Mechanismen, die die Zielgenauigkeit von Axonen und Dendriten und die Spezifität der Synapsenbildung regulieren. Solche Mechanismen beruhen meist auf spezifischen Paaren von Transmembranrezeptoren, die jeweils passende Prä- und Postsynapsen markieren. Die Diversität solcher Rezeptorpaare im Säuger genom ist tatsächlich relativ hoch und wird durch alternatives *Splicing* noch erhöht (einige *axon guidance*-Rezeptoren haben potenziell Hunderte Isoformen). Wahrscheinlich sind die kombinatorischen Möglichkeiten von einigen tausend Rezeptoren aber nicht

\*Korrespondenzautor: Dr. Sebastian Rumpf, Institut für Neuro- und Verhaltensbiologie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Badestraße 9, 48149 Münster, E-Mail: sebastian.rumpf@uni-muenster.de

Sandra Rode, Institut für Neuro- und Verhaltensbiologie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Badestraße 9, 48149 Münster

Rafael Krumkamp, Institut für Neuro- und Verhaltensbiologie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Badestraße 9, 48149 Münster

Svende Herzmann, Institut für Neuro- und Verhaltensbiologie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Badestraße 9, 48149 Münster



genug, um Billionen von Synapsen im Genom eindeutig zu spezifizieren. Das hätte zwangsweise Verknüpfungsfehler bei der Gehirnentwicklung zur Folge. Erst nachfolgende Korrekturmechanismen wie *Pruning* könnten dann die hohe Spezifität der Gehirnverschaltungen ermöglichen. Möglicherweise erfolgt die initiale Verschaltung des Gehirns auch nach dem *trial-and-error*-Prinzip. Danach würden die geeignetsten Synapsen durch funktionelle Tests – wie häufiger Gebrauch – identifiziert und ungeeignete durch *Pruning* wieder entfernt. In jedem Fall dient *Pruning* der Spezifität von synaptischen Verbindungen.

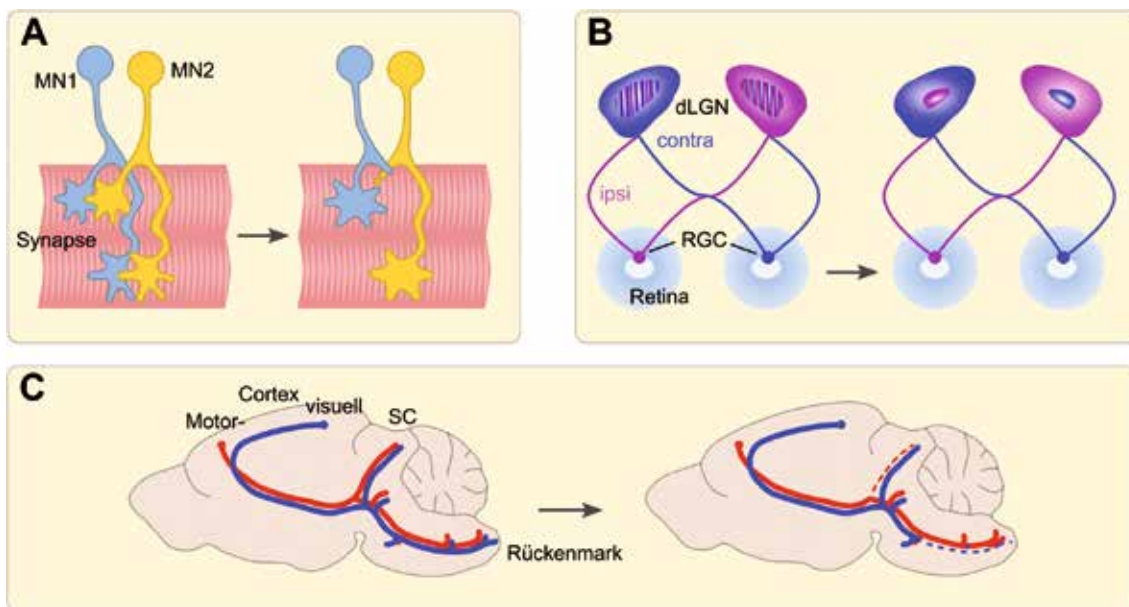
*Pruning*-Mechanismen werden auch in Fällen benötigt, in denen das Nervensystem an unterschiedliche Entwicklungsphasen adaptiert ist. Dies ist bei holometabolen Insekten der Fall, deren Lebenszyklus in die morphologisch sehr verschiedenen Larven- und adulte Phasen unterteilt sind. Die Nervensysteme von Larve und Fliege sind an die jeweilige Lebensweise angepasst: Kriechen und Fressen bzw. Fliegen und Paarung. Große Teile des larvalen Nervensystems sind daher in der Fliege nutzlos. Solche Entwicklungsintermediate werden in der Metamorphose u. a. durch *Pruning* entfernt.

Allgemein wird zwischen klein- und großskaligem *Pruning* unterschieden. Beim kleinskaligen *Pruning* werden meist nur einzelne Synapsen oder kleine Teile von

Axonen oder Dendriten eliminiert, während beim großskaligen *Pruning* lange Abschnitte von primären Axonen oder Dendriten abgebaut werden. Beim kleinskaligen *Pruning* können Synapsen einfach durch Zurückziehen entfernt werden. Beim großskaligen *Pruning* dagegen fragmentieren und degenerieren abzubauende Neuriten. Diese Art von *Pruning* erfolgt meist nach stereotypischen Mustern: Die Identität des abzubauenden Neuriten sowie der Zeitpunkt sind genau vorhersagbar. Kleinskaliges *Pruning* ist oft das Ergebnis aktivitätsabhängiger Synapsenkompetition, sodass die Identität der abzubauenden Synapse nicht von vornherein feststeht. Großskaliges *Pruning* spielt oft eine Rolle beim Entfernen von Entwicklungsintermediaten, etwa bei der Metamorphose von Insekten.

### Beispiel 1: Synapseneliminierung an der Neuromuskulären Endplatte

Bei der Geburt sind die meisten neuromuskulären Endplatten in Säugern von mehreren Motoneuron-Axonen innerviert. Während der ersten beiden Wochen nach der Geburt werden dann systematisch Axone eliminiert, bis jede Endplatte nur noch von einem Axon innerviert wird (Abb. 1A). Schwächere Axone werden zunächst dünner,



**Abb. 1:** Beispiele für *Pruning* während der neuronalen Entwicklung in Säugern. (A) Synapseneliminierung an der Neuromuskulären Endplatte. Anfänglich sind Endplatten von mehreren Motoneuronen (MN) innerviert (links), dann ziehen sich die schwächeren Axone zurück (rechts). (B) Augenspezifische Segregation der Axone von Retinalen Ganglienzellen (RGC) im *Corpus geniculatum laterale* (dLGN). Kurz nach der Geburt überlappen die Zielareale der ipsi- und kontralateralen RGC-Axone (links), die nicht-spezifischen Inputs werden dann eliminiert, sodass die Zielareale segregiert sind (rechts). (C) *Pruning* von Axonen von kortikalen L5-Neuronen. L5-Neurone aus visuellem und Motorkortex projizieren anfänglich sowohl ins Rückenmark als auch in visuelle Zentren wie den *Superior Colliculus* (SC) (links), dann degenerieren nichtspezifische Axone (rechts).

um sich schließlich von der Endplatte bis zum nächsten Verästelungspunkt zurückzuziehen, während die stärkeren Axone die gesamte Endplatte ausfüllen. Beim Rückzug bilden Axone am Ende eine charakteristische runde Struktur, die *retraction bulb* genannt wird, und hinterlassen *Axosomen*, kleine Membranpartikel (Bishop et al., 2004).

Motoneuron-Axone werden durch Konkurrenz eliminiert. An jeder Endplatte wird dasjenige Axon stabilisiert, das mehr Neurotransmitter ausschüttet und den Muskel besser stimuliert, während das schwächere Axon destabilisiert wird. Wenn man experimentell einzelne Axone aktiviert oder inhibiert, erhöht bzw. verringert dies seine Chancen, die Endplatte zu übernehmen. Stabilisierung und Destabilisierung beinhalten retrogrades Feedback vom Muskel an die individuellen Präsynapsen. Dieses Feedback wird von verschiedenen Isoformen des *Brain-derived Neurotrophic Factor* (BDNF) durch Stimulation verschiedener präsynaptischer Rezeptoren vermittelt (Je 2012). Schwächere Axone werden systematisch destabilisiert: Sie enthalten weniger stabilisierende Zytoskelettelemente, und *retraction bulbs* enthalten Lysosomen (Membranabbau-Organellen). Synapseneliminierung an der Endplatte ist ein Beispiel für kleinskaliges *Pruning*, das der Spezifizierung dient.

## Beispiel 2: Augenspezifische Segregation der Axone von Retinalen Ganglienzellen

Retinale Ganglienzellen (engl., *retinal ganglion cells*, RGCs) leiten visuelle Information aus der Netzhaut ins

zentrale Nervensystem (ZNS). Einer der ersten Verschaltungspunkte ist der *Corpus geniculatum laterale* (engl., *dorsal Lateral Geniculate Nucleus*, dLGN) im Thalamus. RGCs aus dem ipsi- und dem kontralateralen Auge senden Axone in beide Hemisphären des dLGN (Abb. 1B). Durch Injektion von verschiedenen Farbstoffen in beide Augen konnte gezeigt werden, dass die ipsi- und kontralateralen RGCs in streng voneinander getrennte fleckförmige Bereiche des dLGN projizieren. Diese räumliche Trennung ermöglicht den höheren visuellen Zentren die Kalkulation von Stereobildern. Die Segregation der ipsi- und kontralateralen Axone im dLGN während der Entwicklung entsteht durch *Pruning* von fehlgeleiteten Axonen. Wenn neuronale Aktivität in einem Auge experimentell vermindert wird, werden RGC-Axone aus diesem Auge präferenziell durch *Pruning* entfernt, was zu Segregationsdefekten führt (Schafer et al., 2012) und auf einen aktivitätsabhängigen (Konkurrenz-) Mechanismus hindeutet. Abzubauen RGC-Synapsen werden durch Komplementproteine markiert. Diese sind eigentlich Komponenten des angeborenen Immunsystems, die im Blut an Bakterien binden und diese für die Phagozytose markieren. Während der Entwicklung können sie aber auch im ZNS nachgewiesen werden. Komplement-markierte Bakterien werden durch Phagozyten eingeschlossen und verdaut. In einer ähnlichen Weise werden Komplement-markierte RGC-Synapsen von hirnständigen Immunzellen, den Mikroglia, phagozytiert. Diese exprimieren ebenfalls während der Entwicklung entsprechende Komplement-Rezeptoren. Außer von Mikroglia können RGC-Synapsen auch von Astrozyten, einer anderen Art von Gliazellen, abgebaut werden. Diese

## SCIENCE PRODUCTS GmbH

for Research in Life Sciences



2-Photon Microscopy, Amplifiers, Micromanipulators, Stimulators & Stimulus Isolators, Electrodes, Data Acquisition & Data Analysis Systems, Microinjection & Perfusion Systems, Temperature Controlling Systems, Stereotaxic Instruments, Micropipette Pullers, Microforges & Bevelers, Glass Capillaries, Wires, Tables & Faraday Cages ...and more!



SCIENCE PRODUCTS GmbH  
Hofheimer Str. 63 · D-65719 Hofheim · Germany  
Tel.: +49 6192 / 90 13 96 · Fax: +49 6192 / 90 13 98  
info@science-products.com · www.science-products.com



benutzen dazu den MEGF10-Rezeptor, der normalerweise apoptotische (absterbende) Zellen erkennt (Chung, 2013). Mausmutanten, die einen dieser Rezeptoren nicht besitzen, zeigen Segregations- und neurophysiologische Defekte im dLGN. Die Segregation von Inputs im dLGN dient der Spezifizierung der Kontakte im visuellen System und beruht auf kleinskaligem *Pruning*.

### Beispiel 3: Pruning von kortikospinalen Axonen von L5-Neuronen

Der Neokortex von Säugern ist in fünf Schichten aufgebaut. Pyramidalzellen der Schicht V (engl. *Layer V*, L5) senden Axone in verschiedene ausführende ZNS-Regionen. L5-Neurone des visuellen Kortex projizieren Axone in die Sehhügel (engl., *superior colliculus*, SC) im Mittelhirn, während L5-Neurone des Motorkortex Axone ins Rückenmark senden. Die Axone von L5-Neuronen fangen kurz nach der Geburt an zu wachsen. Alle L5-Axone verlassen den Kortex zunächst über einen gemeinsamen Pfad und wachsen gemeinsam ins Rückenmark. Dann bilden alle L5-Axone Verästelungen, die in die anderen Zielregionen wie den SC wachsen (Abb. 1C). Eine Spezifizierung wird erst dann durch *Pruning* der falschen Projektionen erreicht: Im Rückenmark werden die L5-Axone aus dem visuellen Kortex entfernt, und im SC die L5-Axone aus dem Motorkortex. Diese Spezifizierung erfolgt in der zweiten postnatalen Woche, wenn die verschiedenen Kortexareale beginnen, sich zu spezialisieren. Dabei fragmentieren Axonäste in den falschen Zielregionen bis zur Verzweigung und lösen sich auf. *Pruning* von L5-Axonon erfolgt also durch einen degenerativen Mechanismus. Dabei werden die falschen Axonäste wahrscheinlich von den jeweiligen Zielarealen abgestoßen. Visuelle L5-Neurone, aber nicht jene aus dem Motorkortex, exprimieren die repulsiven *axon guidance*-Rezeptoren Neuropilin-2 und PlexinA3/A4, deren repulsiver Ligand Semaphorin 3F (Sema 3F) im Rückenmark exprimiert wird. Durch Aktivierung des Rezeptors werden die visuellen L5-Axonäste im Rückenmark abgestoßen. In PlexinA3/A4-Mutanten persistieren diese Äste im Rückenmark (Low et al., 2008). *Pruning* von L5-Axonon ist großskalig und stereotypisch, da die Identität der zu entfernenden Axonäste und der Zeitverlauf genau vorhergesagt werden können.

### Beispiel 4: Dendritisches Pruning von *Drosophila* c4da-Neuronen

C4da-Neurone sind nozizeptive sensorische Nervenzellen in der Haut von Larven von *Drosophila*-Fruchtfliegen. Diese Neurone haben lange und verzweigte sensorische Dendriten, die die gesamte Haut der Larve abdecken. Die Dendriten sind eng mit den Epidermiszellen verbunden. Während der Puppenphase werden die larvalen Epidermiszellen durch neue adult-spezifische Zellen ersetzt. Dadurch verlieren die c4da-Dendriten ihr Substrat, sie müssen durch *Pruning* abgebaut werden (Abb. 2A). Sowohl der Zellkörper als auch das Axon bleiben intakt. Da c4da-Neurone leicht genetisch manipuliert und sehr gut mikroskopisch untersucht werden können, ist dies eines der am besten verstandenen Modelle für *Pruning*. Dendriten-*Pruning* von c4da-Neuronen wird durch das Verpupphormon Ecdyson ausgelöst. Ecdyson aktiviert den Ecdysonrezeptor EcR-B1, einen Transkriptionsfaktor, der die Transkription einer kleinen Zahl von *Pruning*-Genen aktiviert (Abb. 2B). Dazu gehört Sox14, ein Transkriptionsfaktor, der das MICAL-Gen aktiviert (Kirilly, 2009). MICAL kodiert für ein Enzym, das Aktinfilamente – stabilisierende Zytoskelettkomponenten – auflöst. In den Dendriten können die ersten Anzeichen von *Pruning* etwa fünf Stunden nach Beginn der Puppenphase (engl. *hours after puparium formation*, h APF) detektiert werden. Dabei wird im proximalen Dendritenabschnitt das Zytoskelett (insbesondere die Mikrotubuli) abgebaut. Für den Abbau der Mikrotubuli wird das Enzym Katanin p60-like 1 benötigt, das Mikrotubuli zerbrechen kann (Lee, 2009). Außerdem werden in proximalen Dendriten vermehrt endozytische Vesikel gebildet, die Membranmaterial von der Plasmamembran abziehen (Kanamori et al., 2015). Durch die Kombination von Zytoskelettabbau und Membranabzug wird der Dendrit an der Basis ausgedünnt und destabilisiert (Abb. 2B). Die Ausdünnung der proximalen Dendriten isoliert die Dendriten vom Soma. In ihnen kann man nun häufig räumlich und zeitlich begrenzte Kalziumströme beobachten, sogenannte *transients*. Das Auftreten dieser *transients* ist ein Indikator, dass der betreffende Dendrit demnächst im proximalen Bereich abbrechen wird (Kanamori et al., 2015), was ab etwa 6 h APF passiert. Zur selben Zeit kann man in den abgeschnürten Dendriten aktive Caspasen detektieren – Proteasen, die normalerweise den regulierten Zelltod auslösen (Williams, 2006). Die Caspasen bewirken, dass abgebrochene Dendriten in kleine Fragmente zerfallen, die dann von den umgebenden Epidermiszellen phagozytisch aufgenommen werden (Han, 2014) (Abb. 2B). Dabei benutzen sie den Rezeptor *Draper*, der dem glialen Synapsenrezeptor MEGF10 ähnlich ist.

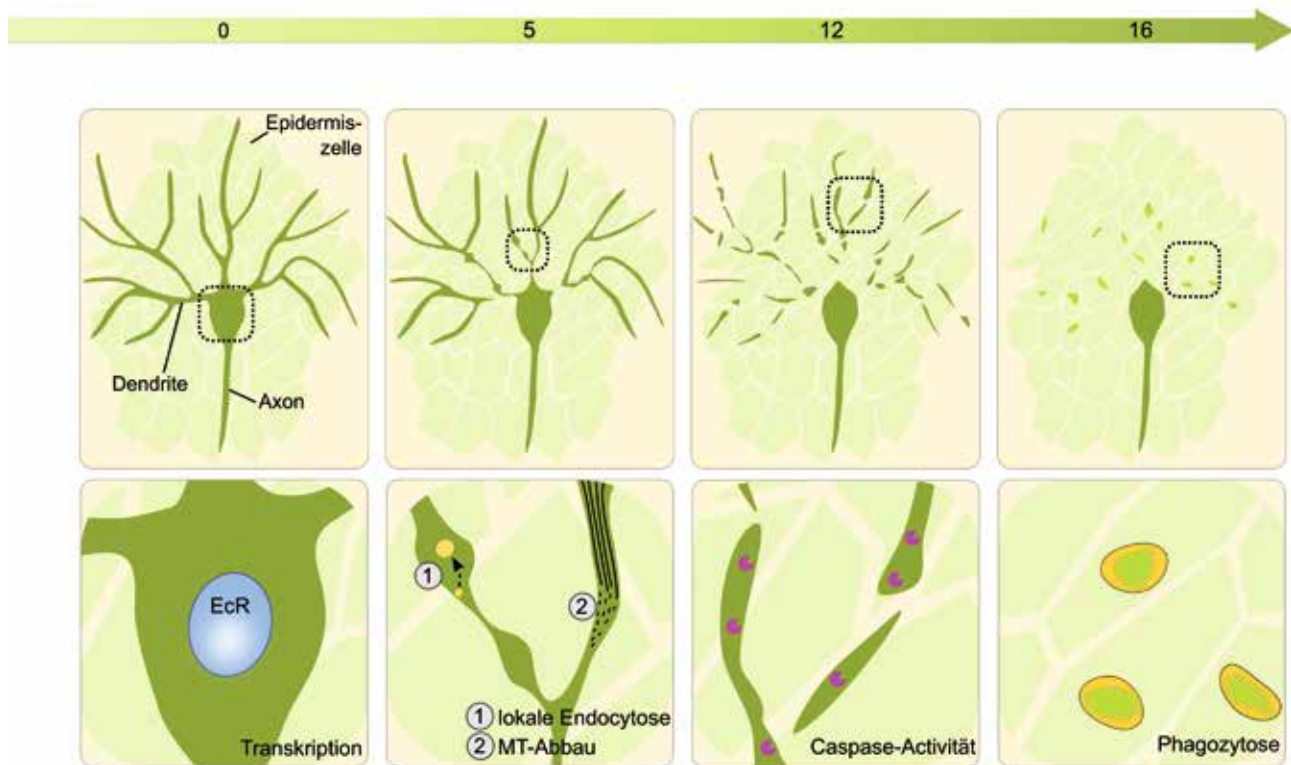
Nach etwa 16 h APF sind die Dendriten von c4da-Neuronen komplett abgebaut. Nun werden die umgebenden Epidermis- und Muskelzellen erneuert. Nach etwa zwei Tagen wachsen den c4da-Neuronen neue Dendriten, die an die neue Umgebung angepasst sind. Larvale Dendriten von c4da-Neuronen sind Entwicklungsintermedie, und das dendritische *Pruning* ist ein Beispiel für stereotypisches großskaliges *Pruning*.

## Wie wird *Pruning* initiiert?

Es scheint mindestens zwei prinzipielle Mechanismen zu geben, die *Pruning* auslösen. An der neuromuskulären Endplatte und bei der Spezifizierung der axonalen Kontakte von RGCs wird *Pruning* wahrscheinlich durch synaptische **Kompetition** ausgelöst. Diejenigen Synapsen, die weniger **synaptische Aktivität** (als ihre Nachbarsynapsen) haben, werden abgebaut. Bei Motoneuron-Synapsen

führt starke Aktivität zu einem positiven Feedback von der postsynaptischen Muskelzelle (*trophic support*), das wahrscheinlich aus Wachstumsfaktoren besteht. Schwache Aktivität hat ein negatives Feedback zur Folge, entweder Entzug von *trophic support*, oder sogar ein *punishment*- (d. h., Straf-)Signal. Wie solche Signale lokal auf engem Raum vermittelt werden, ist unbekannt. Bei der dLGN-Entwicklung findet man die Komplement-Untereinheit C1q als Phagozytosesignal auf präsynaptischen Strukturen, die nicht in unmittelbarer Nachbarschaft einer Postsynapse sind. In beiden Beispielen wird durch einen funktionellen Test entschieden, ob die Synapse entfernt wird oder nicht.

In *Drosophila* c4da-Neuronen wird *Pruning* durch das Verpuppungshormon Ecdyson ausgelöst, dessen Konzentration zu Beginn der Puppenphase stark ansteigt. Ecdyson induziert die **Expression von *Pruning*-Genen**, die den Dendritenabbau intrinsisch, also ohne Feedback von anderen Zellen bewirken. *Pruning* von L5-corticospinalen



**Abb. 2:** Zeitverlauf und zellbiologische Mechanismen des dendritischen *Pruning* von *Drosophila* c4da-Neuronen. (A) Zeitverlauf. Larvale c4da-Neurone haben zu Beginn der Puppenphase (0 hours after puparium formation, h APF) lange und verzweigte sensorische Dendriten. Nach etwa 5 h APF dünne die Dendriten proximal aus und brechen. Bis 12 h APF fragmentieren die abgebrochenen Dendriten und werden anschließend phagozytisch entfernt. Nach 16 Stunden ist der Prozess beendet, die Axone bleiben bestehen. (B) Zellbiologische Mechanismen. In der Reihenfolge des zeitlichen Auftretens: Ecdyson-abhängige Transkription von *Pruning*-Genen im Zellkern (blau) ab 0 h APF; Dendritendestabilisierung um 5 h APF: Mikrotubuli (schwarze Linien) werden lokal abgebaut, und Plasmamembran wird lokal durch Endozytose entfernt (gelbe Vesikel); Fragmentierung von Dendriten durch Caspasen (lila) zwischen 5–12 h APF; anschließend Phagozytose durch Epidermiszellen (gelbe Vesikel).



Axonen beruht auf Abstoßung durch die repulsiven *axon guidance*-Rezeptoren PlexinA3/A4. Die Spezifität dieser Abstoßung wird dadurch erreicht, dass nur L5-Neuronen aus dem visuellen Kortex, aber nicht jene aus dem Motorkortex, diese Rezeptoren exprimieren. Daher sind die Axone von L5-Neuronen aus dem Motorkortex insensitive gegen das Sema 3F-Signal und persistieren, während die der L5-Neurone aus dem visuellen Kortex im Rückenmark entfernt werden. Der entscheidende Faktor ist hier ebenfalls ein (gewebespezifischer) Unterschied in der Genexpression – ob Unterschiede in der neuronalen Aktivität hier auch eine Rolle spielen, ist noch unbekannt. Stereotypisches großskaliges *Pruning* wird also oft durch Änderungen der Genexpression kontrolliert.

## Lokale intrinsische Effekte auf Zytoskelett und Plasmamembran

Sowohl beim *Pruning* durch Retraktion als auch beim *Pruning* durch Degeneration spielen lokale Änderungen in Zytoskelett und Plasmamembran eine wichtige Rolle. Im Rückzug befindliche Motoneuron-Axone an der neuromuskulären Endplatte zeigen im Vergleich zu stabilen Axonen weniger Mikrotubuli und desorganisierte Neurofilamente (Bishop et al., 2004). Wie diese Aktivitäten durch negatives Feedback vom Muskel ausgelöst werden, ist unklar.

In c4da-Neuronen werden Mikrotubuli lokal in proximalen Dendriten zerstört, wo der Dendrit schließlich abbrechen wird. Die Plasmamembran von c4da-Neuronen ist zu Beginn der Puppenphase ebenfalls starken Änderungen unterworfen. So wird durch lokale Endozytose in proximalen Dendriten Membran abgezogen (Kanamori et al., 2015). Durch welche Signalwege Ecdyson diese lokalen Effekte bewirkt, ist noch unbekannt.

Membran- und Zytoskelettregulation spielen höchstwahrscheinlich auch eine wichtige Rolle beim *Pruning* von L5-Axonen. Ob RGC-Synapsen vor der Phagozytose intrinsisch destabilisiert werden müssen, ist unklar.

## Fragmentierung durch Caspasen und Phagozytose

Beim stereotypischen großskaligen *Pruning* zerfallen Neuriten meist noch vor ihrer Phagozytose in kleine Fragmente. Interessanterweise fragmentieren Neuriten auch, wenn Nervenzellen durch Apoptose absterben, was auf

einen ähnlichen Mechanismus hinweist. Tatsächlich wird die Fragmentierung in c4da-Neuronen durch Caspasen vermittelt, und Caspasen sind mittlerweile in mehreren *Pruning*-Modellen impliziert worden (Schuldiner und Yaron, 2015). Ob die Fragmentierung von L5-Axonen oder die Entstehung von Axosomen beim *Pruning* von Motoneuron-Axonen ebenfalls auf Caspasen beruht, ist noch nicht untersucht worden.

Ein sehr wichtiger Mechanismus beim *Pruning* ist Phagozytose. In c4da-Neuronen werden die fragmentierten Dendriten durch Epidermiszellen phagozytisch entfernt (Han, 2014). Phagozytose ist auch für das *Pruning* von RGC-Synapsen wichtig, diese können also nicht allein durch Retraktion entfernt werden. Wenn die Phagozytose von RGC-Synapsen im dLGN inhibiert ist, bleiben die überzähligen Synapsen funktional, offensichtlich haben hier die Phagozyten auch eine Funktion bei der Inaktivierung der Synapsen. Bei der Motoneuron-Synapseneliminierung werden Axosomen von myelinisierten Schwannzellen aufgenommen, eine potenzielle Rolle der Phagozytose beim *Pruning* von L5-Axonen ist wahrscheinlich, wurde aber noch nicht untersucht.

## Ausblick

Viele Mechanismen des *Pruning* sind in den Grundrissen schon gut verstanden. Eine der wichtigsten offenen Fragen ist die der räumlichen Regulation – wie wird bestimmt, bis wohin ein Axon oder ein Dendrit abstirbt? Ebenfalls noch nicht sehr gut verstanden ist der Mechanismus der Synapsenkompetition. Die Erforschung der genauen molekularen Signalwege, durch die die *Pruning*-Auslöser wirken, wird sicher bald Antworten auf diese Fragen geben.

## Literatur

- Bishop, D. L., Misgeld, T., Walsh, M. K., Gan, W. B., Lichtman, J. W. (2004). Axon branch removal at developing synapses by axosome shedding. *Neuron* 44, 651–661.
- Chung, W. S., Clarke, L. E., Wang, G. X., Stafford, B. K., Sher, A., Chakraborty, C., Joung, J., Foo, L. C., Thompson, A., Chen, C., Smith, S. J., Barres, B. A. (2013) Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways. *Nature* 504, 394–400.
- Han, C., Song, Y., Xiao, H., Wang, D., Franc, N. C., Jan, L. Y., Jan, Y. N. (2014) Epidermal cells are the primary phagocytes in the fragmentation and clearance of degenerating dendrites in *Drosophila*. *Neuron* 81, 544–560.
- Huttenlocher, P. R. (1990). Morphometric study of human cerebral cortex development. *Neuropsychologia* 28, 517–527.

- Je, H. S., Yang, F., Ji, Y., Nagappan, G., Hempstead, B. L., Lu, B. (2012). Role of pro-brain-derived neurotrophic factor (proBDNF) to mature BDNF conversion in activity-dependent competition at developing neuromuscular synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 109, 15924–15929.
- Kanamori T, Yoshino J, Yasunaga K, Dairyō Y, Emoto K. (2015). Local endocytosis triggers dendritic thinning and pruning in *Drosophila* sensory neurons. *Nat. Comm.* 12, 6515.
- Kirilly, D., Gu, Y., Huang, Y., Wu, Z., Bashirullah, A., Low, B. C., Kolodkin, A. L., Wang, H., Yu, F. (2009). A genetic pathway composed of Sox14 and Mical governs severing of dendrites during pruning. *Nat. Neurosci.* 12, 1497–1505.
- Lee, H. H., Jan, L. Y., Jan, Y. N. (2009). *Drosophila* IKK-related kinase Ikk2 and Katanin p60-like 1 regulate dendrite pruning of sensory neuron during metamorphosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 106, 6363–6368.
- Low, L. K., Liu, X. B., Faulkner, R. L., Coble, J., Cheng, H. J. (2008). Plexin signaling selectively regulates the stereotyped pruning of corticospinal axons from visual cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 8136–8141.
- Schafer, D. P., Lehrman, E. K., Kautzman, A. G., Koyama, R., Mardinly, A. R., Yamasaki, R., Ransohoff, R. M., Greenberg, M. E., Barres, B. A., Stevens, B. (2012). Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity- and complement-dependent manner. *Neuron* 24, 691–705.
- Schuldiner, O. and Yaron, A. (2015). Mechanisms of developmental neurite pruning. *Cell Mol Life Sci* 72, 101–119.
- Williams, D. W., Kondo, S., Krzyzowska, A., Hiromi, Y., Truman, J. W. (2006). Local caspase activity directs engulfment of dendrites during pruning. *Nat. Neurosci.* 9, 1234–1236.

## Autoreninformationen



### Dr. Sebastian Rumpf

Institut für Neuro- und Verhaltensbiologie,  
Westfälische Wilhelms-Universität Münster,  
Badestraße 9, 48149 Münster, E-Mail:  
[sebastian.rumpf@uni-muenster.de](mailto:sebastian.rumpf@uni-muenster.de)

Dr. Sebastian Rumpf (\*1975) Biologiestudium in Heidelberg, *Dr. rer. nat.* am Max-Planck-Institut für Biochemie (2006). Postdoc an der University of California San Francisco im Labor von Prof. Yuh Nung Jan, Juniorgruppenleiter an der WWU Münster seit 2013. Dr. Rumpf untersucht Pruning-Mechanismen in *Drosophila*.



### Sandra Rode

Institut für Neuro- und Verhaltensbiologie,  
Westfälische Wilhelms-Universität Münster,  
Badestraße 9, 48149 Münster

Sandra Rode (\*1987) Biologiestudium an der WWU Münster, Masterarbeit im Labor von C. Klämbt über die Funktion von Gliazellen. Seit 2013 Promotionsstudentin an der WWU zum Thema *Pruning von C4da-Neuronen*.



### Svende Herzmann

Institut für Neuro- und Verhaltensbiologie,  
Westfälische Wilhelms-Universität Münster,  
Badestraße 9, 48149 Münster

Svende Herzmann (\*1988) Biologiestudium an der WWU Münster, Masterarbeit im Labor von C. Klämbt über die Entwicklung von Gliazellen. Seit 2013 Promotionsstudentin an der WWU zum Thema *Pruning von C4da-Neuronen*.



### Rafael Krumkamp

Institut für Neuro- und Verhaltensbiologie,  
Westfälische Wilhelms-Universität Münster,  
Badestraße 9, 48149 Münster

Rafael Krumkamp (\*1987) Biologiestudium an der WWU Münster, Masterarbeit im Labor von S. Rumpf über *Pruning von C4da-Neuronen*. Seit 2015 Promotionsstudent an der WWU zum selben Thema.

Sebastian Rumpf\*, Sandra Rode, Rafael Krumkamp and Svende Herzmann

# Mechanisms of Neurite Pruning

DOI 10.1515/nf-2016-A105

**Abstract:** The axons, dendrites and synapses of neurons are among the most intricate structures cells can build. Their morphogenesis involves growth mechanisms, but also regressive mechanisms like retraction or degeneration of supernumerary or non-specific processes. Regressive mechanisms are collectively known as pruning. Pruning can serve the specification of neuronal circuits or the removal of developmentally intermediate structures. Pruning can affect both single synapses or long stretches of neurite. Here, we introduce well-characterized models of developmental pruning in mammals and *Drosophila* with their presumed purpose, triggers and cell biological mechanisms. We will then define general mechanistic features of pruning.

**Keywords:** circuit assembly; neurodegeneration; phagocytosis

## Introduction

The long and often branched processes of neurons, axons and dendrites, are specialized compartments used to collect and propagate information, respectively. Information is passed on between neurons through synaptic connections. During development, neurites can grow long distances towards their respective target areas, and several mechanisms ensure that growing neurites find their proper synaptic targets with high precision. However, phases of neurite outgrowth are often also followed by phases of neurite removal during development. Such regressive mechanisms are often collectively referred to as

“pruning” (from a gardening expression that means “to weed out branches”) (Schuldiner and Yaron, 2015). For example, after a phase of rapid synapse formation during the first year after birth, the human brain experiences a steady decrease in synapse density during later development until a plateau is reached at the onset of adulthood (Huttenlocher, 1990). But it is not only small synapses that can be removed through pruning, but also long stretches of axon or dendrite. In this review, we discuss four examples of neurite pruning across model organisms in order to explain the general features and cell biological mechanisms of pruning. These examples are: (1) motoneuron axon pruning at the mammalian neuromuscular junction, (2) pruning of retinal ganglion cell synapses in the higher order visual system, (3) pruning of corticospinal tract axons of layer V cortical neurons, and (4) pruning of class IV dendritic arborization (c4da) neurons in the fruit fly *Drosophila*.

## Pruning: circuit specification and more

Why do neurons build synapses or neurites just to degrade them again later on during development? For one, neurons (many billions in the mammalian brain) must make many highly specific synaptic connections (often thousands for a mammalian neuron in the brain). Accordingly, many specificity pathways are known that guide axons to their correct targets and promote synaptic connections only between specific pre- and postsynaptic partners. These systems usually consist of transmembrane receptors and their respective ligands on synaptic partners. The diversity of these receptors is relatively high, and is even increased by alternative splicing (some axon guidance receptors have hundreds of splice isoforms). Yet the question arises if the combinatorial possibilities of a few thousand transmembrane receptors can encode enough specificity for each of these many billions of synapses to be purely genetically encoded. In other words, errors in connectivity during the initial progressive phase of neuronal development might be unavoidable. Subsequent corrective measures such as pruning would be required to achieve the connection specificity needed for proper brain function. Alternatively, mammalian brain circuit development might actually

---

\*Corresponding author: Dr. Sebastian Rumpf, Institut für Neuro- und Verhaltensbiologie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Badestraße 9, 48149 Münster, Germany, E-Mail: sebastian.rumpf@uni-muenster.de

**Sandra Rode**, Institut für Neuro- und Verhaltensbiologie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Badestraße 9, 48149 Münster, Germany

**Rafael Krumkamp**, Institut für Neuro- und Verhaltensbiologie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Badestraße 9, 48149 Münster, Germany

**Svende Herzmann**, Institut für Neuro- und Verhaltensbiologie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Badestraße 9, 48149 Münster, Germany

involve a *trial-and-error* mechanism. In such a scenario, the best-suited out of a number of randomly-made synaptic connections would be selected by functional tests, and others would be removed. In both scenarios, pruning enhances the specificity of brain connectivity.

Another case where pruning is necessary are developmental transitions of the nervous system. A good example for this type of pruning are holometabolous insects, whose life cycles are divided into morphologically very distinct larval and adult phases. The nervous system of a fly larva is adapted to its lifestyle of crawling and eating, while that of the adult fly is adapted to flying and reproducing. Many parts of the larval nervous system are useless in adult life and are therefore removed during metamorphosis, the larval-to-adult transition. Here, pruning serves the removal of developmental intermediates.

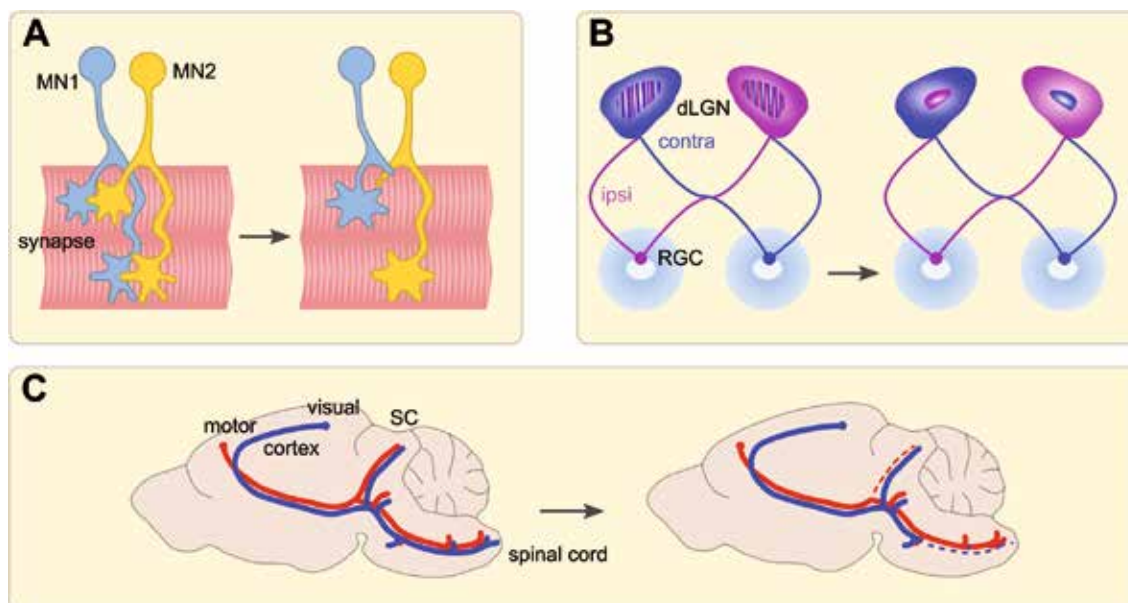
A distinction that is often made is between small-scale and large-scale pruning. Small-scale pruning refers to the pruning of single synapses or small stretches of neurite, whereas large-scale pruning can remove long parts of primary axons or dendrites. Small-scale pruning involves retraction as a mechanism, whereas large-scale pruning uses neurite degeneration (i. e., severing and fragmentation) as a mechanism. Large-scale pruning tends to be stereotyped, i. e., the identity of the pruned branch, the tim-

ing, and the spatial aspects of the degeneration process are predetermined. Small-scale pruning is usually the result of activity-dependent synapse competition, such that the identity of the pruned synapse or branch is not clear from the beginning. Large-scale pruning events are usually involved in the removal of developmental intermediates such as during insect metamorphosis.

### (1) Synapse elimination at the mammalian neuromuscular junction (NMJ)

At birth, skeletal NMJs in mammals are innervated by multiple motoneuron axons. During the first two postnatal weeks, motoneuron axon branches are systematically eliminated until each NMJ is only innervated by one motoneuron axon (Fig. 1A). Pruning axons initially thin out and retract from the NMJ, while the prevailing axon takes over the whole NMJ. Retreating axons often form a characteristic “retraction bulb” at the end, and they leave behind small membrane-bound particles termed axosomes (Bishop et al., 2004). Retraction stops at the next axon branch point.

Motoneuron synapses are eliminated by a competitive mechanism. For each NMJ, the presynaptic terminal that



**Fig. 1:** Examples of pruning during mammalian neuronal development. **A** Synapse elimination at the Neuromuscular junction (NMJ). First, NMJs receive input from multiple motoneurons (MN) (left), weaker axons retract in the following (right). **B** Eye specific segregation of retinal ganglion cell (RGC) axons in the dorsal *Lateral Geniculate Nucleus* (dLGN). Target areas of ipsi- and contralateral RGC axons overlap around birth (left), non-specific inputs are eliminated, leading to segregation of target areas (right). **C** Axon pruning of cortical L5-neurons. L5-neurons from visual and motor cortex project initially both to the spinal cord and to visual centers such as the *Superior Colliculus* (SC) (left), nonspecific axons degenerate eventually (right).



releases more neurotransmitter – and hence activates the muscle better – is stabilized, while the weaker presynaptic terminal is destabilized. This can be mimicked experimentally by activating or inhibiting single axons, which enhances or decreases their chances of prevailing at the NMJ. Stabilization and destabilization involve retrograde feedback from the muscle to the individual presynaptic axon terminals. It has been postulated that mature and immature isoforms of *Brain-derived Neurotrophic Factor* (BDNF) can act as such stabilizing and destabilizing feedback signals, respectively (Je et al., 2012). Weak axon branches are systematically destabilized. They contain fewer stabilizing cytoskeletal elements, and retraction bulbs contain lysosomes (membrane degrading organelles). Axosomes are often engulfed by myelinating Schwann cells. NMJ synapse elimination serves to specify muscle inputs and is an example of small-scale pruning.

## (2) Eye-specific segregation of retinal ganglion cell axons

Retinal ganglion cells (RGCs) transfer visual information from the eye into the brain for information processing in the central nervous system (CNS). One of the first relay centers in this pathway is the dorsal *Lateral Geniculate Nucleus* (dLGN), a thalamic center in the diencephalon. Each dLGN hemisphere receives major input from the optic nerves and from both the ipsi- and the contralateral eye (Fig. 1B). It could be demonstrated through dye injection experiments that ipsi- and contralateral RGC projections in the dLGN are strictly segregated into patch-like structures. This segregation is important for the calculation of stereo vision in the brain. Segregation of inputs arises developmentally through pruning of wrongly targeted inputs. RGC segregation is probably driven by competition between RGC axons. If neuronal transmission is experimentally decreased in one eye, RGC inputs in the dLGN from this eye are preferentially pruned, and segregation defects occur (Schafer et al., 2012). Weak RGC synapses are marked by components of the complement cascade. Complement proteins are part of the innate immune system in the blood that bind to bacteria and mark them for phagocytosis. During development, they are also found in the CNS. Just as complement-marked bacteria in the blood are engulfed and digested by phagocytes, complement-marked RGC synapses are phagocytosed by microglia, the CNS immune cells. Apart from microglia, synapses can also be engulfed by astrocytes. This type of glial cell does not use complement to detect weak synapses, but the receptor MEGF10 that normally recognizes apoptotic

(i. e., dying) cells (Chung et al., 2013). Lack of the above receptors leads to segregation and connectivity defects in the dLGN. RGC axon segregation is an example of small-scale pruning and serves to specify visual circuits.

## (3) Selective elimination of layer V corticospinal tracts

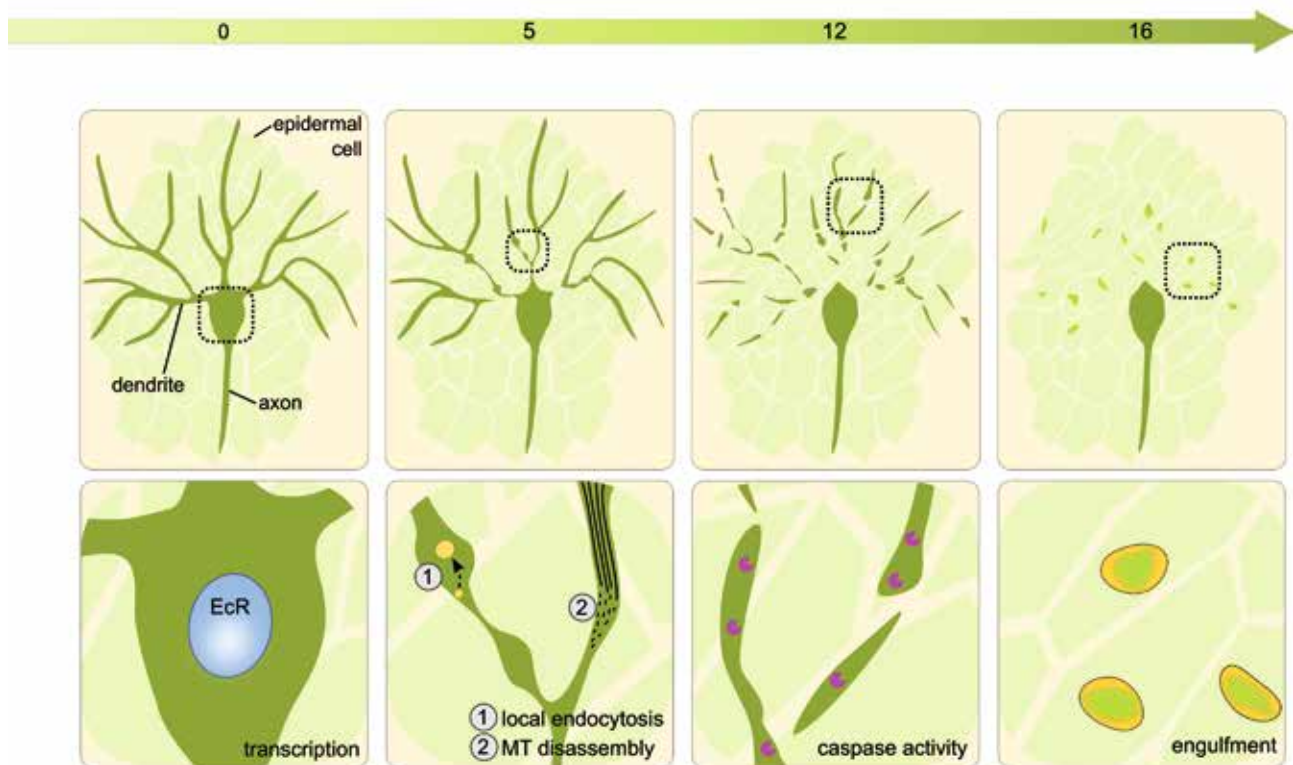
The mammalian neocortex is organized into five layers of neurons. Pyramidal neurons in layer V (L5) signal cortical output to other regions in the CNS. Layer V neurons from different cortical areas project axons to different targets: L5 neurons in the visual cortex project to the Superior Colliculus (SC), a visual computation center, whereas L5 neurons in the motor cortex project axons to the spinal cord. In mice, L5 neuron axons start to grow around birth. All L5 neuron axons extend out of the cortex through a common pathway, and all L5 neuron axons initially extend to the spinal cord. Next, collateral axon branches start to grow out of the primary axon to other targets (Fig. 1C). Specificity is eventually achieved through pruning of non-specific projections, i. e., spinal cord projections of visual cortex L5 neurons and SC projections of motor cortex L5 neurons are removed. This specification occurs within the next week after birth when the different areas in the cortex acquire specific functions. The wrongly projected axonal branches (some centimetres in length) become fragmented and eventually disappear. Thus, L5 axons are pruned through a degenerative mechanism. Wrongly targeted L5 axons are probably repulsed by their targets: layer V neurons from visual cortex, but not from motor cortex, express the repulsive axon guidance receptors neuropilin-2 and PlexinA3/A4, whose repulsive ligand Semaphorin 3F is expressed in the spinal cord (Low et al., 2008). Activation of this receptor leads to repulsion from the spinal cord. Mutants for PlexinA3/A4 cannot prune their visual corticospinal projections. In this way, visual L5 axons in the spinal cord are pruned but motor L5 axons are not. L5 neuron axon pruning is large-scale and stereotyped, as the timing and the identity of the pruned branches can be precisely predicted.

## (4) Dendrite pruning of *Drosophila* c4da neurons

Class IV dendritic arborization (c4da) neurons are nociceptive sensory neurons in the skin of larvae of *Drosophila* fruit flies. These neurons have long and branched sen-

sory dendrites which cover the whole larval body wall. These dendrites are in close association with epidermal cells. During metamorphosis, larval epidermal cells are replaced by new adult skin cells, and the c4da neuron dendrites lose their substrate. They are therefore pruned at the onset of the pupal phase (Fig. 2A), while the cell body and axon of the neuron stay intact. Because of the ease of genetic manipulation and the accessibility of c4da neurons for microscopic analysis, c4da neuron dendrite pruning is one of the best-understood pruning models. C4da neuron dendrite pruning is induced by the pupariation hormone ecdysone. Ecdysone activates the ecdysone receptor EcR-B1, a transcription factor which activates a relatively small number of pruning genes (Fig. 2B). These include Sox14, a transcription factor which in turn activates the transcription of the MICAL gene (Kirilly et al., 2009). MICAL encodes an enzyme that can sever actin filaments, stabilizing cytoskeletal components. At the cell biological level, signs of dendrite pruning can be detected

at three to five hours after the onset of the pupal phase (hours after puparium formation, h APF). Firstly, the cytoskeleton (in particular, microtubules) are disassembled in the proximal dendrites (Lee et al., 2009) (Fig. 2B). Microtubule disassembly requires the activity of a microtubule severing enzyme known as Katanin p60-like1. Secondly, endocytic vesicles are observed in proximal dendrites (Kanamori et al., 2015). These vesicles retrieve membrane material from the plasma membrane. The combination of microtubule disassembly and membrane retrieval leads to thinning and destabilization of proximal dendrites. Proximal thinnings act as diffusion barriers between the distal dendrites and the soma. These distal parts display spatially confined pulses (“transients”) of  $\text{Ca}^{2+}$  influx. Their appearance is a good indicator that the dendrite will soon break off (Kanamori et al., 2015). At about 6h APF, dendrites start to break at the proximal thin sites. At this time, active caspases can be detected in the dendrites (Fig. 2A, B). These proteases are usually activated



**Fig. 2:** Timecourse and cell biology of *Drosophila* c4da neuron dendrite pruning. **A** Timecourse. Larval c4da neurons have long and branched sensory dendrites at the start of the pupal phase (0 hours after puparium formation, h APF). At about 5 h APF, dendrites thin out proximally and start to break. Fragmentation of broken dendrites lasts until 12 h APF, and fragments are removed by phagocytosis. Dendrite pruning is finished after about 16 h APF. C4da neuron axons persist. **B** Cell biology of dendrite pruning. In order of occurrence: ecdysone-dependent expression of pruning genes in the cell nucleus (blue) at 0 h APF; dendrite destabilisation around 5 h APF: microtubules (black lines) are destroyed locally, and membrane material is retrieved through endocytosis (yellow vesicles); fragmentation of dendrites by caspases (purple) between 5–12 h APF; phagocytosis by epidermal cells (yellow vesicles).

in cells undergoing regulated cell death (Williams et al., 2006). Caspase activation leads to dendrite fragmentation between six and ten hours APF. The dendritic remnants are then phagocytosed by the epidermal cells surrounding the dendrite (Han et al., 2014) (Fig. 2A, B). To this end, epidermal cells use the receptor *Draper*, a homolog of the glial synapse receptor MEGF10. By 16 hours APF, c4da neuron dendrite pruning is completed. During the next two days, the epidermis and the muscle cells surrounding c4da neurons are renewed, after which the c4da neurons extend new dendrites that are adapted to the adult skin. C4da neuron dendrites are developmental intermediates, and their pruning is an example of stereotypic large-scale pruning.

## How is pruning initiated?

There are two principle ways to trigger pruning. In the case of synapse elimination at the NMJ and RGC axon pruning in the dLGN, pruning is induced if the synaptic connection does not hold up to a certain standard, or is weaker than its neighbors. At the NMJ, sufficient activity leads to positive feedback in the form of growth factors (also known as trophic support), while insufficient activity leads to withdrawal of support, or even to a “punishment” signal. How these support or punishment signals are applied locally is not known, nor how they induce retraction. In the developing dLGN, the complement component C1q is found on presynaptic terminals that are not closely appositioned onto postsynapses. In both cases, a **functional test** determines whether a synapse should be pruned or not.

In *Drosophila* c4da neurons, the trigger for dendrite pruning is the pupariation hormone ecdysone whose levels rise sharply at the onset of metamorphosis. Ecdysone induces the **expression of pruning genes**. This set of genes induces an intrinsic dendrite pruning program, i. e., no information from other cell types is needed. One trigger for L5 neuron axon pruning are repulsive cues in the environment. Interestingly, the specificity here arises through the tissue-specific expression of repulsion receptors. The repulsive ligand Sema 3F is expressed in the spinal cord. The repulsive receptors are expressed in neurons from visual cortex, but not in neurons from the motor cortex. Therefore, only axons of L5 neurons from visual cortex can be repulsed (and pruned), the axons of motor cortex neurons are insensitive to the signal. Thus, the cause for pruning is a **tissue-specific** difference in **gene expression**. Whether activity also plays a role in L5 axon pruning has not been determined. Taken together, stereotypic

large-scale pruning is often induced through changes in gene expression.

## Local effects on cytoskeleton and plasma membrane

Both pruning by retraction and pruning through degeneration must involve alterations of the cytoskeleton and plasma membrane of the affected neurite. During motoneuron synapse elimination, retracting axons have fewer microtubules and disorganized neurofilaments compared to stable branches (Bishop et al., 2004). It is unknown how these effects are induced by negative feedback from the muscle.

In c4da neurons, microtubules are selectively destroyed in the proximal regions where the dendrite will eventually break. The plasma membrane of c4da neurons is also strongly altered at the onset of metamorphosis. In particular, a local increase in endocytosis in proximal dendrites thins dendrites locally and generates presumptive break sites. How microtubule removal and endocytosis are induced by ecdysone is not yet known.

Membrane and cytoskeletal destabilization are sure to play a role during L5 axon pruning. It will be interesting to see whether single RGC synapses need to be destabilized before microglial phagocytosis.

## Fragmentation by caspases and phagocytosis

During stereotypic large scale pruning, neurites are usually fragmented before their phagocytosis. Fragmentation of neurites also occurs during neuronal cell death, indicating mechanistic similarities. Indeed, fragmentation depends on caspases in c4da neurons, and caspases have been implicated in other pruning models as well (Schuldiner and Yaron, 2015). It is interesting to speculate that also motoneuron axosome shedding and fragmentation of L5 axons might involve caspases.

Phagocytosis is a very important mechanism during pruning. It is required for removal of dendritic debris during c4da neuron dendrite pruning (Han et al., 2014), and also for RGC synapse pruning in the dLGN – apparently, these synapses cannot be pruned through retraction. Inhibition of phagocytosis in the dLGN results in hyperinnervation (Schafer et al., 2012). Thus, phagocytosis actively promotes synapse disassembly. Potential roles for phago-

cytosis during motoneuron axon pruning or L5 axon pruning have not been assessed. Based on the observation that L5 axons prune by fragmentation, at least in this model a phagocytic mechanism is likely.

## Outlook

Several pruning mechanisms have now been described and much can be inferred from comparisons as seen above. One important open question is that of spatial regulation – how are severing sites determined, and what determines where pruning stops? The mechanisms underlying synaptic competition are also not yet well understood. The elucidation of the signaling pathways downstream of pruning triggers (i. e., how do hormones or punishment signals signal to the cytoskeleton?) will probably give new insights into these questions.

## References

- Bishop, D. L., Misgeld, T., Walsh, M. K., Gan, W. B., Lichtman, J. W. (2004). Axon branch removal at developing synapses by axosome shedding. *Neuron* 44, 651–661.
- Chung, W. S., Clarke, L. E., Wang, G. X., Stafford, B. K., Sher, A., Chakraborty, C., Joung, J., Foo, L. C., Thompson, A., Chen, C., Smith, S. J., Barres, B. A. (2013) Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways. *Nature* 504, 394–400.
- Han, C., Song, Y., Xiao, H., Wang, D., Franc, N. C., Jan, L. Y., Jan, Y. N. (2014) Epidermal cells are the primary phagocytes in the fragmentation and clearance of degenerating dendrites in *Drosophila*. *Neuron* 81, 544–560.
- Huttenlocher, P. R. (1990). Morphometric study of human cerebral cortex development. *Neuropsychologia* 28, 517–527.
- Je, H. S., Yang, F., Ji, Y., Nagappan, G., Hempstead, B. L., Lu, B. (2012). Role of pro-brain-derived neurotrophic factor (proBDNF) to mature BDNF conversion in activity-dependent competition at developing neuromuscular synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 109, 15924–15929.
- Kanamori T, Yoshino J, Yasunaga K, Dairyyo Y, Emoto K. (2015). Local endocytosis triggers dendritic thinning and pruning in *Drosophila* sensory neurons. *Nat. Comm.* 12, 6515.
- Kirilly, D., Gu, Y., Huang, Y., Wu, Z., Bashirullah, A., Low, B. C., Kolodkin, A. L., Wang, H., Yu, F. (2009). A genetic pathway composed of Sox14 and Mical governs severing of dendrites during pruning. *Nat. Neurosci.* 12, 1497–1505.
- Lee, H. H., Jan, L. Y., Jan, Y. N. (2009). *Drosophila* IKK-related kinase Ikk2 and Katanin p60-like 1 regulate dendrite pruning of sensory neuron during metamorphosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 106, 6363–6368.
- Low, L. K., Liu, X. B., Faulkner, R. L., Coble, J., Cheng, H. J. (2008). Plexin signaling selectively regulates the stereotyped pruning of corticospinal axons from visual cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 8136–8141.
- Schafer, D. P., Lehrman, E. K., Kautzman, A. G., Koyama, R., Mardinly, A. R., Yamasaki, R., Ransohoff, R. M., Greenberg, M. E., Barres, B. A., Stevens, B. (2012). Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity- and complement-dependent manner. *Neuron* 24, 691–705.
- Schuldiner, O. and Yaron, A. (2015). Mechanisms of developmental neurite pruning. *Cell Mol Life Sci* 72, 101–119.
- Williams, D. W., Kondo, S., Krzyzowska, A., Hiromi, Y., Truman, J. W. (2006). Local caspase activity directs engulfment of dendrites during pruning. *Nat. Neurosci.* 9, 1234–1236.

## Bionotes



### Dr. Sebastian Rumpf

Institut für Neuro- und Verhaltensbiologie,  
Westfälische Wilhelms-Universität Münster,  
Badestraße 9, 48149 Münster, Germany,  
E-Mail: [sebastian.rumpf@uni-muenster.de](mailto:sebastian.rumpf@uni-muenster.de)

Dr. Sebastian Rumpf (\*1975) studied Biology in Heidelberg, PhD at the Max Planck Institute of Biochemistry (2006). Postdoctoral work at the University of California San Francisco in the laboratory of Prof. Yuh Nung Jan, research group leader at the University of Münster, Germany since 2013. Dr. Rumpf focuses on pruning mechanisms in *Drosophila*.



### Sandra Rode

Institut für Neuro- und Verhaltensbiologie,  
Westfälische Wilhelms-Universität Münster,  
Badestraße 9, 48149 Münster, Germany

Sandra Rode (\*1987) studied Biology in Münster. Master thesis in the lab of Prof. C. Klämbt on functional aspects of glial cells. Since 2013 PhD student at the University of Münster where she studies the mechanism of dendrite pruning.



**Svende Herzmann**

Institut für Neuro- und Verhaltensbiologie,  
Westfälische Wilhelms-Universität Münster,  
Badestraße 9, 48149 Münster, Germany

SvendeHerzmann (\*1988) studied Biology in Münster. Master thesis in the lab of Prof. C. Klämbt on development of glial cells. Since 2013 PhD student at the University of Münster where she studies the mechanism of dendrite pruning.

**Rafael Krumkamp**

Institut für Neuro- und Verhaltensbiologie,  
Westfälische Wilhelms-Universität Münster,  
Badestraße 9, 48149 Münster, Germany

Rafael Krumkamp (\*1987) studied Biology in Münster. Master thesis in the lab of S. Rumpf where he is also a PhD student since 2015 and studies the mechanism of dendrite pruning.

## Übersichtsartikel

Knut Kirmse\* und Knut Holthoff

## Funktionen der GABAergen Übertragung im unreifen Gehirn

DOI 10.1515/nf-2016-1106

**Zusammenfassung:** Während  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) im adulten Gehirn synaptische Hemmung vermittelt, wirkt es auf unreife Nervenzellen zumeist depolarisierend und teilweise erregend. *In-vivo*-Studien haben jüngst wesentliche Aspekte dieses Konzeptes bestätigt, zugleich aber deutliche Belege für eine primär hemmende GABA-Wirkung bereits im neonatalen Kortex geliefert. Erste experimentelle Daten deuten an, dass depolarisierende GABA-Antworten für die aktivitätsabhängige Ausreifung neuronaler Schaltkreise *in vivo* von erheblicher Relevanz sein könnten. Ein kohärentes Bild der Bedeutung GABAerger Synapsen im unreifen Gehirn kann gegenwärtig jedoch nicht gezeichnet werden. Die Aufklärung möglicher entwicklungsbiologischer Funktionen der GABAergen Depolarisation bleibt daher ein wichtiges Anliegen für zukünftige Untersuchungen.

**Schlüsselwörter:** Entwicklung; Erregung; GABA; Hemmung; *in vivo*

## Einleitung

Der Informationstransfer im zentralen Nervensystem (ZNS) ist im Wesentlichen an die Funktion chemischer Synapsen gebunden. Dabei diktiert das räumlich-zeitliche Muster erregender und hemmender synaptischer Eingänge maßgeblich das Aktivitätsniveau eines Neurons. Wegweisende Arbeiten der 1950 bis 1970er Jahre konnten nachweisen, dass die synaptische Hemmung im Gehirn

adulter Säugetiere vor allem durch den Neurotransmitter  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) vermittelt wird. Intakte GABAerge Übertragung bildet die Grundlage einer Balance von Erregung und Hemmung, deren Störung im Rahmen zahlreicher ZNS-Erkrankungen bedeutsam ist. *In-vitro*-Arbeiten haben zudem eine ausgeprägte Entwicklungsabhängigkeit der GABAergen Übertragung aufgedeckt. Im vorliegenden Übersichtartikel werden wir die Grundlagen dieser ontogenetischen Entwicklung beleuchten und insbesondere neue Daten aus *In-vivo*-Untersuchungen am unreifen Gehirn vorstellen.

## GABAerge Hemmung im adulten Gehirn

Schnelle postsynaptische GABA-Effekte werden in erster Linie über ionotrope GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren (GABA<sub>A</sub>R) vermittelt, die für Chlorid- und in geringerem Maße Bikarbonationen permeabel sind (Bormann et al., 1987) (Abb. 1A). Dabei beruht die GABA<sub>A</sub>R-vermittelte Hemmwirkung auf zwei Hauptmechanismen: I) Hyperpolarisation (*voltage inhibition*) und II) Erhöhung der Membranleitfähigkeit (*shunting inhibition*). Erstere kommt zustande, wenn das Umkehrpotential für GABA<sub>A</sub>-abhängige Ströme ( $E_{\text{GABA}}$ ) negativer als das Membranpotential ( $V_m$ ) ist, und ist daher zwingend an eine niedrige intrazelluläre Chloridkonzentration ( $[\text{Cl}^-]_{\text{in}}$ ) gebunden. *Shunting inhibition* beruht hingegen auf einem (partiellen) Kurzschluss erregender Membranströme, die zum Beispiel an benachbarten glutamatergen Synapsen generiert werden. Entsprechend dem Ohmschen Gesetz vermindert die lokale Absenkung des Membranwiderstandes die Auslenkung von  $V_m$ , und zwar unabhängig von der treibenden elektrochemischen Kraft ( $DF_{\text{GABA}} = V_m - E_{\text{GABA}}$ , *driving force*). Mit anderen Worten: Selbst depolarisierende GABA<sub>A</sub>R-vermittelte Ströme können eine Hemmung neuronaler Aktivität zur Folge haben.

Hyperpolarisierende GABA<sub>A</sub>R-Antworten gehen also mit einem Chlorideinstrom einher, welcher wiederum  $DF_{\text{GABA}}$  vermindert. Diese Chloridbeladung kann durch die Bikarbonatleitfähigkeit der GABA<sub>A</sub>R weiter verstärkt

\*Korrespondenzautor: PD Dr. Knut Kirmse, Biolumaging, Hans-Berger-Klinik für Neurologie, Universitätsklinikum Jena, Am Klinikum 1, 07747 Jena, Tel.: +49 (0)3641 9 325 998, Fax: +49 (0)3641 9 325 902, E-Mail: knut.kirmse@med.uni-jena.de, Web: www.biolumaging.uniklinikum-jena.de/Biolumaging.html  
Prof. Dr. Knut Holthoff, Biolumaging, Hans-Berger-Klinik für Neurologie, Universitätsklinikum Jena, Am Klinikum 1, 07747 Jena, Tel.: +49 (0)3641 9 323 418, Fax: +49 (0)3641 9 325 902, E-Mail: knut.holthoff@med.uni-jena.de, Web: www.biolumaging.uniklinikum-jena.de/Biolumaging.html

werden: Da das Umkehrpotential für Bikarbonationen (ca.  $-10$  mV) deutlich positiver als das Ruhemembranpotential ist, führt die Aktivierung von  $\text{GABA}_A\text{R}$  zu einem depolarisierenden Bikarbonatausstrom. Zeitgleich wird die intrazelluläre Bikarbonatkonzentration durch die Aktivität von Carboanhydrasen (Isoformen 2 und 7) stabilisiert (Abb. 1A). Intensive  $\text{GABA}_A\text{R}$ -Aktivierung resultiert daher in einem schnellen Kollaps der treibenden Kraft für Chlorid-, nicht aber Bikarbonationen. Dieser Mechanismus kann in adulten Neuronen zu  $\text{GABA}_A\text{R}$ -vermittelter Depolarisation führen, welche eine weitere passive Chloridbeladung nach sich zieht (siehe Hübner & Holthoff, 2013).

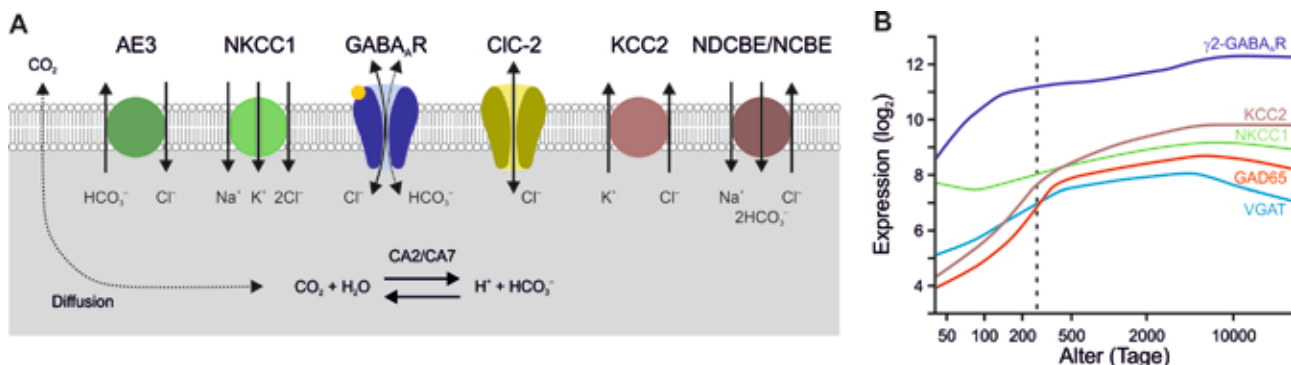
## Neuronale Chloridextrusion

Neurone sind daher auf Mechanismen der Chloridextrusion angewiesen, um die Effektivität synaptischer (nicht notwendigerweise hyperpolarisierender) Inhibition aufrechtzuerhalten. Die neuronale Chloridextrusion beruht vor allem auf einem elektroneutralen, sekundär-aktiven  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Kotransport (Misgeld et al., 1986) (Abb. 1A). Dieser ist in den meisten Neuronen des adulten ZNS durch den  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Kotransporter KCC2 (*SLC12A5*) repräsentiert (Rivera et al., 1999; Hübner et al., 2001). Zudem können  $\text{Na}^+$ -abhängige (zum Beispiel NCBE und NDCBE, *Na<sup>+</sup>-dependent chloride-bicarbonate exchanger*) sowie  $\text{Na}^+$ -unabhängige (zum Beispiel AE3, *anion exchanger 3*)  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  Austauschere die  $[\text{Cl}^-]_{\text{in}}$  modulieren (Hübner & Holthoff, 2013). Ferner sind Chloridkanäle in die Regulation der  $[\text{Cl}^-]_{\text{in}}$  involviert, indem sie bestehende Gradienten durch passiven Ionenfluss vermindern. Beispielpfadt sei

der einwärts gleichrichtende Chloridkanal  $\text{ClC}2$  genannt, der in hippokampalen Pyramidenzellen wesentlich zur Ruhemembranleitfähigkeit beiträgt und an der passiven Chloridextrusion nach aktivitätsinduzierter Chloridbeladung beteiligt ist (Rinke et al., 2010).

## Ontogenetische Veränderungen der Chloridhomöostase

Es wird häufig übersehen, dass die niedrige  $[\text{Cl}^-]_{\text{in}}$  eine Spezialisierung reifer ZNS-Neurone und zugleich eine zellbiologische Ausnahme darstellt. Diese trifft für unreife Nervenzellen nicht zu. Wegweisende Arbeiten der 1990er Jahre haben einen ausgeprägten Anstieg der neuronalen Chloridextrusion im Verlauf der frühen postnatalen Entwicklung nachgewiesen (Luhmann & Prince, 1991). Dieser ist vor allem auf eine Zunahme der KCC2-Expression zurückzuführen (Rivera et al., 1999; Hübner et al., 2001) (Abb. 1B). Welche Folgen hat die geringe Kapazität der Chloridextrusion für die GABAerge Übertragung im unreifen ZNS? Umfangreiche *In-vitro*-Studien belegen, dass GABA unreife Neurone meist depolarisiert (Ben-Ari et al., 1989). Dieser Befund wurde durch diverse elektrophysiologische und optische Messmethoden bestätigt, welche die  $[\text{Cl}^-]_{\text{in}}$  nicht beeinflussen (Owens et al., 1996; Yamada et al., 2004; Achilles et al., 2007; Kirmse et al., 2010; Tyzio et al., 2011). Wesentliche Erkenntnisse aus diesen Untersuchungen lauten: 1)  $E_{\text{GABA}}$  ist in unreifen Neuronen typischerweise weniger negativ als das Ruhemembranpotential, weshalb die  $\text{DF}_{\text{GABA}}$  depolarisierend wirkt; 2) GABA



**Abb. 1:** Zelluläre Grundlagen der  $\text{GABA}_A\text{R}$ -Wirkung. **A**, Darstellung wichtiger Mechanismen, die an der Festsetzung von  $E_{\text{GABA}}$  beteiligt sind. Der intrazelluläre pH wird effektiv durch die Hydratisierung von  $\text{CO}_2$  gepuffert, welche durch Carboanhydrase (CA) 2/7 katalysiert wird. **B**, Neokortikale mRNA-Expression von NKCC1 (*SLC12A2*), KCC2 (*SLC12A5*), den präsynaptischen GABAergen Markern VGAT (*SLC32A1*, vesikulärer GABA-Transporter) und GAD65 (*GAD2*, Glutamatdecarboxylase 65) sowie der  $\gamma 2\text{-GABA}_A\text{R}$ -Untereinheit (*GABRG2*) während der Humanentwicklung. Die gestrichelte Linie entspricht dem normalen Geburtstermin. Schematisch nach Human Brain Transcriptome Project ([www.hbatlas.org](http://www.hbatlas.org)) (Kang et al., 2011).

kann in unreifen Neuronen Aktionspotentiale auslösen; 3)  $[Cl^-]_{in}$  nimmt im Verlauf der postnatalen Entwicklung deutlich ab.

Insofern nicht allein von einem Bikarbonatstrom getragen, reflektiert die GABA<sub>A</sub>-abhängige Depolarisation eine nicht-passive Chloridverteilung. Letztere resultiert aus einer sekundär-aktiven Chloridakkumulation, die wesentlich durch den elektroneutralen  $Na^+/K^+/2Cl^-$ -Kotransporter NKCC1 (*SLC12A2*) bedingt ist (Yamada et al., 2004; Sipilä et al., 2006; Wang & Kriegstein, 2008; Pfeffer et al., 2009). Ferner konnte in Hirnschnitten gezeigt werden, dass NKCC1 essentiell für die Generierung bestimmter Formen synchronisierter Netzwerkaktivität (sogenannter *giant depolarizing potentials*) ist (Ben-Ari et al., 1989; Pfeffer et al., 2009). Insgesamt führten die Befunde zur weithin anerkannten Schlussfolgerung, dass GABA als wichtiger (eventuell wichtigster) exzitatorischer Transmitter des heranreifenden Gehirns fungiert. Während frühere Untersuchungen an Nagern mehrheitlich eine Abnahme der NKCC1-Expression über die postnatale Entwicklung berichteten (für eine Übersicht siehe Kirmse et al., 2011), konnte dies durch jüngere quantitative Untersuchungen an humanem Material nicht bestätigt werden (Kang et al., 2011) (Abb. 1B). In welchem Maße weitere Chloridtransporter in die Aufrechterhaltung einer depolarisierenden  $DF_{GABA}$  in unreifen Neuronen involviert sind, kann aktuell nicht abschließend beurteilt werden (Hübner & Holthoff, 2013).

## Die Problematik von *Steady-state*-Messungen in *In-vitro*-Modellen

Typische Werte für  $E_{GABA}$  in neonatalen Neuronen *in vitro* belaufen sich auf  $-60$  bis  $-30$  mV. Folglich operiert NKCC1 nicht im thermodynamischen Gleichgewicht (in dem  $E_{Cl^-} \sim -10$  mV), sondern vermittelt einen Nettoeinwärts-transport. Die Abweichung ist auf ein dynamisches Fließgleichgewicht zwischen Chloridtransport und passiven Chloridströmen durch Ionenkanäle zurückzuführen, in welchem Änderungen der Chloridleitfähigkeit ( $g_{Cl^-}$ ) und/oder Chloridtransportrate zu Änderungen der  $[Cl^-]_{in}$  und damit  $E_{GABA}$  führen. Hinzu kommt, dass elektrophysiologische Analysen eine geringe Kapazität der NKCC1-vermittelten Chloridakkumulation ergaben (Achilles et al., 2007). An Hirnschnitten gewonnene Daten belegen beispielsweise, dass eine vermehrte synaptische GABA<sub>A</sub>-Aktivierung  $DF_{GABA}$  stark vermindern kann (Kolbaev et al., 2011). Die frühe Netzwerkaktivität tritt typischerweise in Form diskreter Ereignisse auf, welche große Neuronenpopulatio-

nen synchronisieren und mit Salven GABA<sub>A</sub>-vermittelter postsynaptischer Ströme (PSC, *postsynaptic currents*) einhergehen (Khazipov et al., 2004; Kummer et al., 2016). Daher kann o. g. ionale Plastizität für die aktivitätsabhängige Modulation GABAerger Übertragung *in vivo* von erheblicher Bedeutung sein. Zudem wird deutlich, dass  $E_{GABA}$  im intakten Gehirn nicht aus *In-vitro*-Schätzwerten abgeleitet werden kann. Um die zellulären Funktionen GABAerger Übertragung beurteilen zu können, sind *In-vivo*-Messungen folglich von elementarer Wichtigkeit.

## Zelluläre und Netzwerkwirkungen GABAerger Übertragung im unreifen ZNS *in vivo*

Vor dem Hintergrund fehlender *In-vivo*-Daten wurde das Konzept der GABAergen Depolarisation/Exzitation grundsätzlich in Frage gestellt. Konkret wurde postuliert, dass die depolarisierende GABA-Wirkung I) aus einer energetischen Deprivation der *In-vitro*-Präparationen resultiere (Rheims et al., 2009) oder II) Folge der traumatischen Schädigung von Hirnschnitten sei (Dzhala et al., 2012). Die vorgebrachten Einwände konnten jedoch in unabhängigen Studien widerlegt bzw. nicht bestätigt werden (für weiterführende Darstellungen siehe Kirmse et al., 2011; Ben-Ari et al., 2012).

Jüngste Untersuchungen an *In-vivo*-Präparationen haben unser Verständnis der GABA-Wirkung im intakten unreifen Gehirn beachtlich erweitert. So gelang Zhang und Kollegen mittels *Perforated-patch-clamp*-Ableitungen der Nachweis einer depolarisierenden GABA-Wirkung in retinalen Ganglienzellen des Zebrafisches (Zhang et al., 2010). Hierbei zeigte sich ein Wechsel von de- zu hyperpolarisierender GABA-Wirkung zwischen Tag 2 und 3 nach Fertilisation, welcher zeitlich mit der Ausbildung sensorisch-evozierter PSC überlappte. Unterschwellig depolarisierende GABAerge Eingänge konnten kürzlich auch im optischen Tektum von Kaulquappen des Krallenfrosches nachgewiesen werden (van Rheede et al., 2015).

*Cell-attached*-Registrierungen von Neuronen der kortikalen Schicht 2/3 in 3–4 Tage alten Mäusen lieferten jüngst den ersten direkten Nachweis GABAerger Depolarisation im intakten Säugerhirn (Kirmse et al., 2015). 2-Photonen- $Ca^{2+}$ -*Imaging* legte zudem nahe, dass die GABAerge Depolarisation auch *in vivo* entscheidend von NKCC1 abhängt. Ein überraschendes Ergebnis dieser Studie war, dass die alleinige GABA<sub>A</sub>-Aktivierung keine Aktionspotentiale induzierte. Diese Beobachtung impliziert eine vorwiegend



unterschwellige GABAerge Depolarisation *in vivo* – im Gegensatz zu Befunden *in vitro* (Achilles et al., 2007; Kirmse et al., 2010). Welche Konsequenzen hat dies für die frühe Netzwerkaktivität? Zur Klärung der Frage bedienten sich Valeeva und Kollegen jüngst einer optogenetischen Strategie, indem sie Channelrhodopsin-2 in GABAergen Interneuronen exprimierten und glutamaterge PSC ableiteten (Valeeva et al., 2016). Letztere fungieren dabei als Maß für die Aktivität der präsynaptischen glutamatergen Neurone. Die Stimulation GABAerger Interneurone steigerte die Frequenz glutamaterger PSC in akuten Hirnschnitten, reduzierte sie hingegen *in vivo*. Die Ergebnisse lieferten einen überzeugenden Beleg für eine primär hemmende GABA-Wirkung *in vivo* bereits in der Neonatalperiode und zeigten eine erhebliche Diskrepanz zum Hirnschnittmodell auf. Welche Faktoren diese Diskrepanz bedingen, bleibt gegenwärtig spekulativ, wenngleich die  $g_{Cl^-}$ -abhängige Verschiebung von  $E_{GABA}$  eine plausible Möglichkeit darstellt.

Eine Hauptform koordinierter Netzwerkaktivität im neonatalen Neokortex *in vivo* sind sogenannte *Spindle bursts* bzw.  $Ca^{2+}$ -Cluster, welche niederfrequent auftreten

und kortikale Neurone kolumnenartig aktivieren (Khazipov et al., 2004; Kummer et al., 2016). Im Einklang mit der Schlussfolgerung, dass Inhibition die primäre Funktion GABAerger Übertragung auf Netzwerkebene darstellt, erhöhte eine lokale  $GABA_A$ -Blockade die Frequenz und horizontale Ausdehnung dieser Netzwerkereignisse sowohl im somatosensorischen (Minlebaev et al., 2007) als auch im okzipitalen (Kirmse et al., 2015) Kortex. Interessanterweise war die Generierung der  $Ca^{2+}$ -Cluster bzw. *Spindle bursts* weitgehend unabhängig von NKCC1 (Minlebaev et al., 2007; Kirmse et al., 2015). Es kann gegenwärtig nicht abschließend beurteilt werden, inwiefern die Verhältnisse im Neokortex auch auf andere Hirnareale zutreffen. Beispielsweise führte die systemische Gabe des NKCC1/2-Inhibitors Bumetanid zu einer vollständigen Unterdrückung von *Sharp waves* im neonatalen Hippokampus *in vivo* (wie auch von *giant depolarizing potentials in vitro*), was im Sinne einer Notwendigkeit depolarisierender GABAerger Übertragung für die Generierung koordinierter Netzwerkaktivität gedeutet wurde (Sipilä et al., 2006). Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, dass Bumetanid die Blut-Hirn-Schranke allenfalls in geringem Maße über-



We've advanced our imaging technology, with your research in mind

### New ORCA-Flash4.0 V3 sCMOS Camera

This one camera expertly handles applications ranging from the acquisition of accurate scientific images to experiments that demand sensitivity, quantification and speed.

- Intelligent data reduction
- Highly refined in-camera pixel-level calibrations
- Individual camera noise characterization
- Increased USB3.0 frame rates
- Purposeful and innovative triggering capabilities
- Patented lightsheet read out modes

### New W-VIEW GEMINI-2C Image Splitting Optics

The first dual camera, dual channel system engineered with super resolution quality; simultaneously offering versatility, expandability and ease of use.

- Wide field of view  
(20 mm for standard imaging, 12 mm for diffraction-limited imaging)
- Ultra-low distortion (0.05%)
- High spatial uniformity (98%)
- High transmission (98% @ 450-800nm)
- Robust opto-mechanical design for ease of alignment and versatility

**HAMAMATSU**  
PHOTON IS OUR BUSINESS  
[www.hamamatsucameras.com](http://www.hamamatsucameras.com)

windet. Es bleibt daher unklar, ob der beobachtete Effekt tatsächlich auf eine Abschwächung der GABAergen Depolarisation oder eine periphere Wirkung von Bumetanid zurückzuführen ist.

## Entwicklungsbiologische Funktionen der GABAergen Depolarisation *in vivo*

Warum verfügen unreife Neurone über eine geringe Kapazität der Chloridextrusion, die zu GABA<sub>A</sub>-abhängiger Depolarisation prädisponiert? Diese Frage ist freilich teleologischer Natur. Dennoch sollen im Folgenden drei mögliche Szenarien diskutiert werden.

*Szenario 1: Das bestehende Maß an Chloridextrusion ist für die Aufrechterhaltung einer effektiven GABAergen Inhibition ausreichend.*

Diese Variante könnte als Trivialfall angesehen werden, wird aber *expressis verbis* kaum diskutiert. Der zugrunde liegende provokative Hauptgedanke lautet, dass eine spezifische Notwendigkeit für depolarisierende (sic!) GABAerge Übertragung nicht existiert. Dieses Szenario fußt auf den dargestellten *In-vivo*-Daten, welche GABA als hemmenden Transmitter des unreifen Gehirns ausweisen, und fehlenden direkten Belegen für GABAerge Exzitatorik *in vivo*. Die über die postnatale Entwicklung beobachtete Zunahme der Chloridextrusion könnte demnach im Wesentlichen einen gesteigerten Bedarf reflektieren, welcher durch einen immensen Anstieg der GABAergen Synapsendichte im gleichen Zeitraum entsteht (Abb. 1B). Es ist ferner darauf hinzuweisen, dass die Aufrechterhaltung einer niedrigen  $[Cl^-]_{in}$  durch KCC2 energetisch aufwendig ist, da der Kcotransport vom elektrochemischen Kaliumgradienten und somit von der Aktivität der  $Na^+/K^+$ -ATPase abhängt. Dieser Aspekt dürfte insbesondere für die Periode des strukturellen Hirnaufbaus bedeutsam sein.

*Szenario 2: Die geringe Kapazität der Chloridextrusion prädisponiert zu exzitatorischen GABA-Antworten, welche für die Generierung früher Netzwerkaktivität entscheidend sind.*

Dieses Szenario wird durch umfangreiche Befunde aus *In-vitro*-Untersuchungen bestätigt, die GABA als wichtigen exzitatorischen Neurotransmitter der frühen ZNS-Entwicklung ausweisen (Kirmse et al., 2011). Exzitatorische GABA-Effekte hängen entscheidend von aktiver Chloridakkumulation ab und kommen näherungsweise dann zustande,

wenn  $E_{GABA}$  positiver als die Aktionspotentialschwelle ist. Wie oben dargestellt, wird diese These andererseits durch die gegenwärtig vorhandenen Befunde aus *In-vivo*-Untersuchungen am intakten ZNS kaum unterstützt (siehe aber Sipilä et al., 2006). Weitere einzelzelluläre Untersuchungen am intakten unreifen Hirn sind dringend nötig, um abschließend über diese Hypothese und die sich aktuell darstellende Diskrepanz zwischen *In-vitro*- und *In-vivo*-Ergebnissen entscheiden zu können.

*Szenario 3: Die geringe Kapazität der Chloridextrusion ermöglicht depolarisierende GABA-Antworten, die entwicklungsbiologisch bedeutsam sind, deren primäre Funktion aber nicht in postsynaptischer Erregung besteht.*

Worin besteht die mögliche entwicklungsbiologische Relevanz einer zumeist unterschwelligen GABAergen Depolarisation *in vivo*? GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-(NMDAR-) abhängige Ströme durch eine Verminderung des spannungsabhängigen  $Mg^{2+}$ -Blocks verstärken (Leinekugel et al., 1997). Dies ist insofern bedeutsam, als GABA dadurch NMDAR-abhängige Formen synaptischer Plastizität begünstigen könnte. Viele glutamaterge Synapsen unreifer Neurone verfügen initial lediglich über postsynaptische NMDAR, nicht aber AMPA-Rezeptoren (AMPA). Experimentell können diese durch Paarung von präsynaptischer Glutamatfreisetzung mit postsynaptischer Depolarisation binnen Minuten in funktionelle AMPAR-/NMDAR-Synapsen konvertiert werden (Durand et al., 1996). Prinzipiell sind GABA<sub>A</sub> geeignet, die hierfür notwendige postsynaptische Depolarisation zu vermitteln (Abb. 2). Dieses Konzept wird bestätigt durch Untersuchungen im unreifen Kortex der Maus, in denen ein *Knockdown* von NKCC1 eine drastische Verminderung der Frequenz AMPAR-vermittelter PSC im Alter von 2 bis 3 postnatalen Wochen sowie eine deutlich verminderte Dichte dendritischer Dornfortsätze (*Spines*) zur Folge hatte. Diese synaptischen Defizite konnten zudem durch Expression einer spannungsunabhängigen NMDAR-Mutante verhindert werden (Wang & Kriegstein, 2008). Die systemische Gabe des NKCC1-Inhibitors Bumetanid bei Ratten führte bei täglicher Verabreichung von Embryonaltag 15 bis zum Postnataltag (P) 7 zu ähnlichen Effekten, blieb jedoch bei ausschließlicher Verabreichung in der Postnatalperiode wirkungslos (Wang & Kriegstein, 2011). Auf die Problematik der äußerst geringen Blut-Hirnschrankgängigkeit und peripherer Effekte von Bumetanid wurde bereits hingewiesen. Letzteres gilt auch für die Beobachtung, dass die systemische Applikation von Bumetanid (P3–7) bei Ratten zu einer moderaten Verlängerung der kritischen Periode für okuläre Dominanzplastizität führte (Deidda et al., 2015). Diese ging mit einer

verzögerten Reifung ausschließlich GABAerger Synapsen einher, während die Ausreifung glutamaterger Kontakte, die Dendritenmorphologie und das Sehvermögen davon unberührt blieben.

Eine geringe Verzögerung in der Entwicklung glutamaterger und GABAerger Synapsen wurde darüber hinaus für hippocampale Pyramidenzellen in *NKCC1-Knockout*-Mäusen nachgewiesen (Pfeffer et al., 2009). Bei der Interpretation muss berücksichtigt werden, dass der konstitutive *NKCC1-Knockout* einen schweren Phänotyp entwickelt, welcher nicht primär auf fehlender neuronaler *NKCC1*-Expression beruht. Ein alternativer experimenteller Ansatz, die GABAerge Depolarisation zu unterbinden, besteht in der vorzeitigen Expression von *KCC2*. Hierbei kommt komplizierend hinzu, dass *KCC2* über Interaktionen mit dem Zytoskelett an der Ausreifung dendritischer *Spines* beteiligt ist. In der Tat führte die *KCC2*-Überexpression via *In-utero*-Elektroporation zu einem massiven Anstieg der Dichte dendritischer *Spines*. Dieser konnte durch Expression einer transport-defizienten *KCC2*-Mutante imitiert werden und war von Änderungen der Chloridhomöostase unabhängig (Fiumelli et al., 2013).

Die beschriebene  $\text{GABA}_A$ -NMDAR-Interaktion wird als synapsenspezifisch erachtet (Durand et al., 1996) und ist möglicherweise nicht von überschwelliger Erregung der postsynaptischen Zelle abhängig. Belege dafür sind jüngst im optischen Tektum von *Xenopus laevis* gewonnen worden (van Rheede et al., 2015). Zu Beginn der sensorischen Periode führte die visuelle Stimulation in vielen tektalen Neuronen nicht zur Generierung von Aktionspotentialen, jedoch konnte visuelles Training innerhalb von Minuten unter- in überschwellige Antworten umwandeln. Dieser

Prozess beruhte auf einer selektiven Zunahme AMPAR-abhängiger PSC und wurde *in vivo* durch Antagonisten von *NKCC1* oder *NMDAR* aufgehoben. Interessanterweise wurden depolarisierende GABA-Antworten ausschließlich in denjenigen Neuronen beobachtet, welche unterschwellig auf visuelle Reizung reagierten. Diese Daten belegen beispielhaft eine entwicklungsbiologische Funktion GABAerger Depolarisation im optischen Tektum, welche nicht von postsynaptischer Exzitation abhängt (van Rheede et al., 2015).

## Schlussbemerkungen

Es ist anzunehmen, dass keines der o.g. Szenarien die Funktionen GABAerger Übertragung im unreifen Gehirn hinlänglich beschreibt. Es wird zudem ersichtlich, dass ein kohärentes Bild dieser Funktionen gegenwärtig nicht gezeichnet werden kann. Letzteres ist partiell der mangelnden Spezifität bestimmter experimenteller Manipulationen geschuldet, gegebenenfalls aber auch als Ausdruck der Komplexität der GABA-Wirkung (in verschiedenen Hirnarealen, Zelltypen, subzellulären Kompartimenten etc.) zu verstehen. Dennoch mehren sich Hinweise für eine entwicklungsphysiologische Notwendigkeit depolarisierender GABAerger Übertragung im unreifen Gehirn. Inwiefern die GABAerge Depolarisation für synaptische Erregung *in vivo* relevant ist, ist eine interessante Frage für zukünftige Untersuchungen. Wichtig bleibt festzuhalten, dass GABAerge Übertragung auch im unreifen Gehirn synaptische Hemmung vermittelt. Wir postulieren daher, dass eine *Balance von GABAerger Depolarisation und Hemmung*



**Abb. 2:** Modell der Fasilitasiierung NMDAR-abhängiger synaptischer Plastizität durch depolarisierende GABAerge Übertragung. Unreife glutamaterge Synapsen besitzen initial nur NMDAR (links). Die  $\text{GABA}_A$ -vermittelte Depolarisation verstärkt den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom via NMDAR durch Abschwächung des spannungsabhängigen  $\text{Mg}^{2+}$ -Blocks. Paarung von Glutamatfreisetzung und GABAerger Depolarisation führt zu einem Einbau von AMPAR in die postsynaptische Membran. Dies „aktiviert“ die Postsynapse, welche nun auch nach alleiniger Glutamatfreisetzung postsynaptische Ströme generieren kann (*synapse unsilencing*). In reifen glutamatergen Synapsen (rechts) werden NMDAR-abhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale lokal über die AMPAR-bedingte Depolarisation verstärkt.



für die regelgerechte Ausreifung neonataler neuronaler Schaltkreise essentiell ist.

## Literatur

- Achilles K, Okabe A, Ikeda M, Shimizu-Okabe C, Yamada J, Fukuda A et al. (2007) Kinetic properties of Cl uptake mediated by Na<sup>+</sup>-dependent K<sup>+</sup>-2Cl cotransport in immature rat neocortical neurons. *J Neurosci* 27, 8616–8627.
- Ben-Ari Y, Cherubini E, Corradetti R, Gaiarsa JL (1989) Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *J Physiol* 416, 303–325.
- Ben-Ari Y, Woodin MA, Sernagor E, Cancedda L, Vinay L, Rivera C et al. (2012) Refuting the challenges of the developmental shift of polarity of GABA actions: GABA more exciting than ever! *Front Cell Neurosci* 6, 35.
- Bormann J, Hamill OP, Sakmann B (1987) Mechanism of anion permeation through channels gated by glycine and gamma-aminobutyric acid in mouse cultured spinal neurones. *J Physiol* 385, 243–286.
- Deidda G, Allegra M, Cerri C, Naskar S, Bony G, Zunino G et al. (2015) Early depolarizing GABA controls critical-period plasticity in the rat visual cortex. *Nat Neurosci* 18, 87–96.
- Dzhala V, Valeeva G, Glykys J, Khazipov R, Staley K (2012) Traumatic Alterations in GABA Signaling Disrupt Hippocampal Network Activity in the Developing Brain. *J Neurosci* 32, 4017–4031.
- Durand GM, Kovalchuk Y, Konnerth A (1996) Long-term potentiation and functional synapse induction in developing hippocampus. *Nature* 381, 71–75.
- Fiumelli H, Briner A, Puskarjov M, Blaesse P, Belem BJ, Dayer AG et al. (2013) An Ion Transport-Independent Role for the Cation-Chloride Cotransporter KCC2 in Dendritic Spinogenesis In Vivo. *Cereb Cortex* 23, 378–388.
- Hübner CA, Holthoff K (2013) Anion transport and GABA signaling. *Front Cell Neurosci* 7, 177.
- Hübner CA, Stein V, Hermans-Borgmeyer I, Meyer T, Ballanyi K, Jentsch TJ (2001) Disruption of KCC2 reveals an essential role of K-Cl cotransport already in early synaptic inhibition. *Neuron* 30, 515–524.
- Kang HJ, Kawasaki YI, Cheng F, Zhu Y, Xu X, Li M et al. (2011) Spatio-temporal transcriptome of the human brain. *Nature* 478, 483–489.
- Khazipov R, Sirota A, Leinekugel X, Holmes GL, Ben-Ari Y, Buzsáki G (2004) Early motor activity drives spindle bursts in the developing somatosensory cortex. *Nature* 432, 758–761.
- Kirmse K, Kummer M, Kovalchuk Y, Witte OW, Garaschuk O, Holthoff K (2015) GABA depolarizes immature neurons and inhibits network activity in the neonatal neocortex in vivo. *Nat Commun* 6, 7750.
- Kirmse K, Witte OW, Holthoff K (2010) GABA Depolarizes Immature Neocortical Neurons in the Presence of the Ketone Body  $\beta$ -Hydroxybutyrate. *J Neurosci* 30, 16002–16007.
- Kirmse K, Witte OW, Holthoff K (2011) GABAergic depolarization during early cortical development and implications for anticonvulsive therapy in neonates. *Epilepsia* 52, 1532–1543.
- Kummer M, Kirmse K, Zhang C, Haueisen J, Witte OW, Holthoff K (2016) Column-like Ca<sup>2+</sup> clusters in the mouse neonatal neocortex revealed by three-dimensional two-photon Ca<sup>2+</sup> imaging in vivo. *Neuroimage* 138, 64–75.
- Leinekugel X, Medina I, Khalilov I, Ben-Ari Y, Khazipov R (1997) Ca<sup>2+</sup> oscillations mediated by the synergistic excitatory actions of GABA(A) and NMDA receptors in the neonatal hippocampus. *Neuron* 18, 243–255.
- Luhmann HJ, Prince DA (1991) Postnatal maturation of the GABAergic system in rat neocortex. *J Neurophysiol* 65, 247–263.
- Minlebaev M, Ben-Ari Y, Khazipov R (2007) Network mechanisms of spindle-burst oscillations in the neonatal rat barrel cortex in vivo. *J Neurophysiol* 97, 692–700.
- Misgeld U, Deisz RA, Dodt HU, Lux HD (1986) The role of chloride transport in postsynaptic inhibition of hippocampal neurons. *Science* 232, 1413–1415.
- Owens DF, Boyce LH, Davis MB, Kriegstein AR (1996) Excitatory GABA responses in embryonic and neonatal cortical slices demonstrated by gramicidin perforated-patch recordings and calcium imaging. *J Neurosci* 16, 6414–6423.
- Pfeffer CK, Stein V, Keating DJ, Maier H, Rinke I, Rudhard Y et al. (2009) NKCC1-dependent GABAergic excitation drives synaptic network maturation during early hippocampal development. *J Neurosci* 29, 3419–3430.
- Rheims S, Holmgren CD, Chazal G, Mulder J, Harkany T, Zilberter T et al. (2009) GABA action in immature neocortical neurons directly depends on the availability of ketone bodies. *J Neurochem* 110, 1330–1338.
- Rinke I, Artmann J, Stein V (2010) ClC-2 voltage-gated channels constitute part of the background conductance and assist chloride extrusion. *J Neurosci* 30, 4776–4786.
- Rivera C, Voipio J, Payne JA, Ruusuvuori E, Lahtinen H, Lamsa K et al. (1999) The K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* 397, 251–255.
- Sipilä ST, Schuchmann S, Voipio J, Yamada J, Kaila K (2006) The cation-chloride cotransporter NKCC1 promotes sharp waves in the neonatal rat hippocampus. *J Physiol* 573, 765–773.
- Tyzio R, Allene C, Nardou R, Picardo MA, Yamamoto S, Sivakumaran S et al. (2011) Depolarizing Actions of GABA in Immature Neurons Depend Neither on Ketone Bodies Nor on Pyruvate. *J Neurosci* 31, 34–45.
- Valeeva G, Tressard T, Mukhtarov M, Baude A, Khazipov R (2016) An Optogenetic Approach for Investigation of Excitatory and Inhibitory Network GABA Actions in Mice Expressing Channel-rhodopsin-2 in GABAergic Neurons. *J Neurosci* 36, 5961–5973.
- van Rheede JJ, Richards BA, Akerman CJ (2015) Sensory-Evoked Spiking Behavior Emerges via an Experience-Dependent Plasticity Mechanism. *Neuron* 87, 1050–1062.
- Wang DD, Kriegstein AR (2008) GABA regulates excitatory synapse formation in the neocortex via NMDA receptor activation. *J Neurosci* 28, 5547–5558.
- Wang DD, Kriegstein AR (2011) Blocking Early GABA Depolarization with Bumetanide Results in Permanent Alterations in Cortical Circuits and Sensorimotor Gating Deficits. *Cereb Cortex* 21, 574–587.
- Yamada J, Okabe A, Toyoda H, Kilb W, Luhmann HJ, Fukuda A (2004) Cl<sup>-</sup> uptake promoting depolarizing GABA actions in immature rat neocortical neurones is mediated by NKCC1. *J Physiol* 557, 829–841.
- Zhang RW, Wei HP, Xia YM, Du JL (2010) Development of light response and GABAergic excitation-to-inhibition switch in zebrafish retinal ganglion cells. *J Physiol* 588, 2557–2569.



## Autoreninformationen

**PD Dr. Knut Kirmse**

Biolmaging, Hans-Berger-Klinik für Neurologie, Universitätsklinikum Jena, Am Klinikum 1, 07747 Jena, Tel.: +49 (0)3641 9 325 998, Fax: +49 (0)3641 9 325 902, E-Mail: [knut.kirmse@med.uni-jena.de](mailto:knut.kirmse@med.uni-jena.de), Web: [www.biolmaging.uniklinikum-jena.de/Biolmaging.html](http://www.biolmaging.uniklinikum-jena.de/Biolmaging.html)

Knut Kirmse (geboren 1981) studierte Humanmedizin an der Berliner Charité. Am dortigen Institut für Neurophysiologie promovierte er bei Rosemarie Grantyn und Sergei Kirischuk über GABAerge Synapsen in der Hirnentwicklung. Für seine Dissertation erhielt er den Robert-Koch-Preis der Charité. Nach zweijähriger Postdoktorandenzeit wechselte er 2009 in die Abteilung Biolmaging von Knut Holthoff und Otto W. Witte am Universitätsklinikum Jena. Sein wissenschaftliches Interesse gilt der Physiologie der Hirnentwicklung, insbesondere im Hinblick auf die Bedeutung GABAerger Übertragung sowie die Funktionen kortikaler Pionierneurone. Seit 2013 leitet Knut Kirmse eine Nachwuchsgruppe an der Hans-Berger-Klinik für Neurologie Jena, im Jahr 2014 erhielt er die Venia legendi für Neurowissenschaften.

**Prof. Dr. Knut Holthoff**

Biolmaging, Hans-Berger-Klinik für Neurologie, Universitätsklinikum Jena, Am Klinikum 1, 07747 Jena, Tel.: +49 (0)3641 9 323 418, Fax: +49 (0)3641 9 325 902, E-Mail: [knut.holthoff@med.uni-jena.de](mailto:knut.holthoff@med.uni-jena.de), Web: [www.biolmaging.uniklinikum-jena.de/Biolmaging.html](http://www.biolmaging.uniklinikum-jena.de/Biolmaging.html)

Knut Holthoff (geboren 1964) studierte Biologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. An der dortigen Klinik für Neurologie promovierte er bei Otto W. Witte über intrinsische optische Signale in Hirnschnitten der Ratte. Nach einer zweijährigen Postdoktorandenzeit wechselte er 1998 in das Labor von Rafael Yuste an der Columbia University in New York. Dort untersuchte er mit Hilfe der 2-Photonen-Kalzium-Bildgebung dendritische Mechanismen synaptischer Plastizität. Er setzte seine Studien ab 2001 im Labor von Arthur Konnerth an der Ludwig-Maximilians-Universität in München fort und erhielt an der Technischen Universität München im Jahr 2007 die Venia legendi für Neurowissenschaften. Sein wissenschaftliches Interesse gilt der Physiologie synaptischer Übertragung und den Mechanismen neuronaler Netzwerkaktivität im Gehirn. Im Jahr 2008 nahm er den Ruf auf die Professur für Experimentelle Neurologie am Universitätsklinikum Jena an.

Knut Kirmse\* and Knut Holthoff

# Functions of GABAergic transmission in the immature brain

DOI 10.1515/nf-2016-A106

**Abstract:**  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) mediates synaptic inhibition in the adult brain, but acts as a predominantly depolarizing and partially excitatory neurotransmitter in immature neurons. Recent *in vivo* studies have confirmed important aspects of this concept and at the same time provided clear evidence for mainly inhibitory GABA actions already in the neonatal cortex. First experimental data suggest that depolarizing responses to GABA might contribute to the activity-dependent maturation of neuronal circuits *in vivo*. Currently, however, a coherent picture of the role of GABAergic synapses in the immature brain cannot be drawn. Elucidating potential developmental functions of GABAergic depolarization therefore remains an important objective for future research.

**Keywords:** development; excitation; GABA; inhibition; *in vivo*

## Introduction

Information transfer in the central nervous system (CNS) is mainly based on chemical synapses. The spatiotemporal pattern of excitatory and inhibitory synaptic inputs largely dictates the output activity of a neuron. Pioneering studies in the 1950s to 1970s revealed that synaptic inhibition in the adult mammalian brain is primarily mediated by the neurotransmitter  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA). Intact GABAergic transmission serves as the basis for a balance of excitation and inhibition, impairments of which contribute to diverse CNS disorders. In addition, *in vitro* investigations revealed that the mode of GABA action undergoes

a profound change during development. In the present review we will outline the principles underlying this ontogenetic development and particularly discuss novel results obtained from *in vivo* investigations in the immature brain.

## GABAergic inhibition in the adult brain

Fast postsynaptic GABA actions are primarily mediated by ionotropic GABA<sub>A</sub> receptors (GABA<sub>A</sub>Rs), i. e. ligand-gated ion channels mainly permeable to chloride and, to a lesser extent, bicarbonate (Bormann et al., 1987) (Fig. 1A). GABA<sub>A</sub>R-dependent inhibition relies on two main mechanisms: I) hyperpolarization (voltage inhibition) and II) increase in membrane conductance (shunting inhibition). Hyperpolarization requires that the reversal potential of GABA<sub>A</sub>R-dependent currents ( $E_{\text{GABA}}$ ) is more negative than the membrane potential ( $V_m$ ), and therefore crucially depends on a low intracellular chloride concentration  $[\text{Cl}^-]_{\text{in}}$ . Shunting inhibition, in contrast, short-circuits excitatory membrane currents which are generated, for example, at neighboring glutamatergic synapses. According to Ohm's law, the local decrease in membrane resistance attenuates changes in  $V_m$ , which is notably independent of the electrochemical driving force ( $\text{DF}_{\text{GABA}} = V_m - E_{\text{GABA}}$ ). In other words, even depolarizing GABA<sub>A</sub>R-dependent currents may cause inhibition of neuronal activity.

Hence, hyperpolarizing GABA<sub>A</sub>R-mediated responses involve chloride influx which, in turn, reduces  $\text{DF}_{\text{GABA}}$ . The bicarbonate permeability of GABA<sub>A</sub>Rs may further promote such chloride loads: Since the reversal potential of bicarbonate (approximately  $-10$  mV) is considerably more positive than the resting membrane potential, GABA<sub>A</sub>R activation leads to a depolarizing efflux of bicarbonate. At the same time, the intracellular bicarbonate concentration is stabilized by carbonic anhydrases (isoforms 2 and 7) (Fig. 1A). Intense GABA<sub>A</sub>R activation may therefore cause a rapid collapse of the driving force of chloride, but not bicarbonate. This mechanism may mediate GABA<sub>A</sub>R-dependent depolarization in adult neurons which will result in a further passive chloride load (see Hübner & Holthoff, 2013).

\*Corresponding author: PD Dr. Knut Kirmse, Biolumaging, Hans-Berger Department of Neurology, Jena University Hospital, 07747 Jena, Germany, Tel.: +49 (0)3641 9 325 998, Fax: +49 (0)3641 9 325 902, E-Mail: knut.kirmse@med.uni-jena.de, Web: www.biolumaging.uniklinikum-jena.de/Biolumaging.html  
 Prof. Dr. Knut Holthoff, Biolumaging, Hans-Berger Department of Neurology, Jena University Hospital, 07747 Jena, Germany, Tel.: +49 (0)3641 9 323 418, Fax: +49 (0)3641 9 325 902, E-Mail: knut.holthoff@med.uni-jena.de, Web: www.biolumaging.uniklinikum-jena.de/Biolumaging.html

## Neuronal chloride extrusion

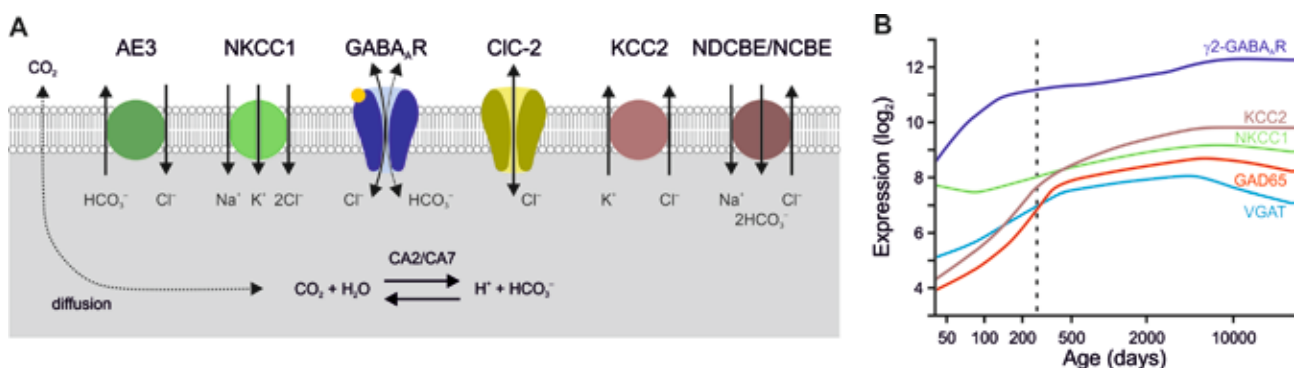
Neurons require mechanisms of chloride extrusion in order to maintain efficient (not necessarily hyperpolarizing) synaptic inhibition. Neuronal chloride extrusion is mainly mediated by electroneutral, secondary active  $K^+/Cl^-$  co-transport (Misgeld et al., 1986) (Fig. 1A). In most neurons of the adult CNS, the latter function is represented by the  $K^+/Cl^-$  co-transporter KCC2 (*SLC12A5*) (Rivera et al., 1999; Hübner et al., 2001). However,  $[Cl^-]_{in}$  may also be modulated by  $Na^+$ -dependent (e. g. NCBE und NDCBE) and  $Na^+$ -independent (e. g. AE3, anion exchanger 3)  $Cl^-/HCO_3^-$  exchangers (Hübner & Holthoff, 2013). Furthermore, chloride channels are involved in the regulation of  $[Cl^-]_{in}$  by dissipating electrochemical gradients due to passive ion flow. An example is the inwardly rectifying chloride channel CIC-2 which substantially contributes to the resting membrane conductance of hippocampal pyramidal cells and participates in chloride extrusion (efflux) following activity-induced chloride loads (Rinke et al., 2010).

## Ontogenetic alterations in chloride homeostasis

It is frequently overlooked that a low  $[Cl^-]_{in}$  represents a specialization of mature neurons and, at the same time, an exceptional case in cell biology. Indeed, a similar situation does not apply to immature neurons. Seminal studies of the 1990s revealed a marked increase in neuronal chloride extrusion during the first month of postnatal development in rodents (Luhmann & Prince, 1991), largely re-

sulting from a developmental increase in KCC2 expression (Rivera et al., 1999; Hübner et al., 2001) (Fig. 1B). Which are the consequences of a low capacity of chloride extrusion for GABAergic transmission in the immature CNS? A large body of evidence obtained from *in vitro* preparations shows that GABA mostly depolarizes immature neurons (Ben-Ari et al., 1989). This conclusion has been corroborated by multiple electrophysiological and optical methods that do not affect  $[Cl^-]_{in}$  (Owens et al., 1996; Yamada et al., 2004; Achilles et al., 2007; Kirmse et al., 2010; Tyzio et al., 2011). Main conclusions from these investigations are: 1)  $E_{GABA}$  is typically less negative than the resting membrane potential (i. e.  $DF_{GABA}$  is depolarizing); 2) GABA may induce action potential firing in immature neurons; 3)  $[Cl^-]_{in}$  declines during postnatal development.

Unless solely carried by efflux of bicarbonate, GABA-dependent depolarization reflects a non-passive chloride distribution. The latter results from secondary active chloride accumulation mainly mediated by the electroneutral  $Na^+/K^+/2Cl^-$  co-transporter NKCC1 (*SLC12A2*) (Yamada et al., 2004; Sipilä et al., 2006; Wang & Kriegstein, 2008; Pfeffer et al., 2009). In addition, experiments in brain slices revealed that NKCC1-dependent chloride accumulation is essential for the generation of certain forms of synchronized network activity (so-called *giant depolarizing potentials*) (Ben-Ari et al., 1989; Pfeffer et al., 2009). Together, the aforementioned observations led to the widely accepted conclusion that GABA functions as an important (possibly the most important) excitatory neurotransmitter in the developing brain. Whereas most earlier studies in rodents reported a decline in NKCC1 expression over postnatal development (for review see Kirmse et al., 2011), recent quantitative data from human samples do not support this



**Fig. 1:** Cellular basis of GABA<sub>A</sub>R signaling. **A**, Schematic representation of the main mechanisms determining  $E_{GABA}$ . Intracellular pH is effectively buffered by hydration of  $CO_2$  catalyzed by carbonic anhydrase (CA) isoforms 2 and 7. **B**, Neocortical mRNA expression of NKCC1 (*SLC12A2*), KCC2 (*SLC12A5*), the presynaptic GABAergic markers VGAT (*SLC32A1*, vesicular GABA transporter) and GAD65 (*GAD2*, glutamate decarboxylase 65) as well as  $\gamma 2$ -GABA<sub>A</sub>R subunits (*GABRG2*) during human development. The dashed line corresponds to the time of birth. Scheme modified from the Human Brain Transcriptome Project (accessible via [www.hbatlas.org](http://www.hbatlas.org)) (Kang et al., 2011).

conclusion (Kang et al., 2011) (Fig. 1B). As to which extent chloride transporters other than NKCC1 contribute to the maintenance of  $DF_{GABA}$  in immature neuronal cells has not yet been fully resolved (Hübner & Holthoff, 2013).

## The value of steady-state measurements in *in vitro* models

Typical  $E_{GABA}$  values measured in neonatal neurons *in vitro* are in the range of  $-60$  to  $-30$  mV. Consequently, NKCC1 is not at thermodynamic equilibrium (in which  $E_{Cl^-} \sim -10$  mV), but mediates a net inward transport of chloride. The discrepancy reflects a dynamic steady state depending on both chloride transport and passive chloride currents (via ion channels) in which alterations in chloride conductance ( $g_{Cl^-}$ ) or chloride transport affect  $[Cl^-]_{in}$  and thereby  $E_{GABA}$ . In addition, electrophysiological analyses revealed a low capacity of NKCC1-mediated chloride accumulation in immature cells (Achilles et al., 2007). Data from brain slices, for instance, confirmed that increased synaptic GABA<sub>A</sub>R activation may strongly reduce  $DF_{GABA}$ . Early network activity typically occurs in the form of discrete bursts reflecting large numbers of co-active neurons and involving barrages of GABA<sub>A</sub>R-mediated postsynaptic currents (PSCs) (Khazipov et al., 2004; Kummer et al., 2016). Hence, such ionic plasticity might be particularly relevant under *in vivo* conditions. Consequently,  $E_{GABA}$  in the intact brain cannot be deduced from *in vitro* estimates. In order to properly assess the functions of GABAergic transmission, *in vivo* measurements are therefore of crucial importance.

## Cellular and network effects of GABAergic transmission in the immature CNS *in vivo*

Due to a lack of *in vivo* data, the concept of GABAergic depolarization/excitation was seriously questioned in recent years. Specifically, it was postulated that GABAergic depolarization represents an artefact of *in vitro* preparations due to I) energetic deprivation (Rheims et al., 2009) or II) traumatic injury resulting from the slicing procedure (Dzhala et al., 2012). However, these concerns could not be substantiated in a series of independent studies (for review see Kirmse et al., 2011; Ben-Ari et al., 2012).

Recent *in vivo* investigations have considerably extended our present understanding of GABA actions in

the intact immature brain. Using gramicidin-perforated patch-clamp recordings, Zhang and colleagues demonstrated a depolarizing mode of GABA action in retinal ganglion cells of intact zebrafish larvae (Zhang et al., 2010). GABA actions shifted from de- to hyperpolarizing between two and three days post fertilization precisely coinciding with the emergence of sensory-evoked postsynaptic responses. Moreover, sub-threshold depolarizing GABAergic inputs have recently been demonstrated in the optic tectum of *Xenopus laevis* tadpoles (stage 41–44) (van Rheede et al., 2015).

Cell-attached current-clamp recordings from layer 2/3 neurons in mice at postnatal days 3–4 yielded first direct electrophysiological evidence of GABA-dependent depolarization in the intact mammalian brain (Kirmse et al., 2015). Two-photon  $Ca^{2+}$  imaging data further suggested that NKCC1-mediated chloride accumulation is critical for the maintenance of depolarizing GABA responses *in vivo* (Kirmse et al., 2015). An unexpected outcome of this study was that GABA<sub>A</sub>R activation alone did not suffice to induce action potential firing. This observation implies a mainly sub-threshold GABAergic depolarization *in vivo* – in contrast to previous *in vitro* findings (Achilles et al., 2007; Kirmse et al., 2010). What are the consequences for the generation of early network activity? In order to address the question, Valeeva and colleagues recently employed an optogenetic strategy by selectively expressing channelrhodopsin-2 in GABAergic interneurons and recording glutamatergic PSCs (EPSCs) (Valeeva et al., 2016). The latter serve as a measure of activity of presynaptic glutamatergic neurons. Interestingly, EPSC frequency was increased by stimulation of GABAergic interneurons in acute brain slices, but reduced *in vivo*. These results provided convincing evidence for a primarily inhibitory action of GABA *in vivo* already in the neonatal period and pointed to a substantial discrepancy between *in vivo* and acute slice models. Though speculative, a  $g_{Cl^-}$ -dependent shift in  $E_{GABA}$  represents a plausible explanation.

A principal form of coordinated network activity in the neonatal neocortex *in vivo* are so-called spindle bursts or  $Ca^{2+}$  clusters which occur at low frequencies and reflect a column-like activation of cortical neurons (Khazipov et al., 2004; Kummer et al., 2016). In line with the above conclusions, local block of GABA<sub>A</sub>Rs was found to increase the frequency and horizontal extent of these network events both in the somatosensory (Minlebaev et al., 2007) and occipital (Kirmse et al., 2015) cortex. One interesting aspect is that the generation of  $Ca^{2+}$  clusters and spindle bursts was largely independent of NKCC1 (Minlebaev et al., 2007; Kirmse et al., 2015). At present, it is not possible to conclusively assess as to which extent a similar situation



also applies to other brain regions. For example, systemic administration of the NKCC1/2 inhibitor bumetanide was reported to result in a complete and reversible suppression of sharp waves in the neonatal hippocampus *in vivo* (similar to giant depolarizing potentials *in vitro*). While this finding was interpreted as evidence for a requirement of GABAergic depolarization (Sipilä et al., 2006), it should be recalled that bumetanide exhibits a particularly low blood-brain barrier permeability. Consequently, it remains unclear whether the observed effect does indeed result from attenuated GABAergic depolarization or rather peripheral actions of bumetanide.

## Potential developmental functions of depolarizing GABA *in vivo*

Why are immature neurons equipped with a low capacity of chloride extrusion which promotes GABA<sub>A</sub>R-dependent depolarization? Obviously, this question is teleological in nature. Nonetheless, three potential scenarios shall be discussed in the following.

*Scenario 1: The existing degree of chloride extrusion is sufficient to maintain effective GABAergic inhibition.*

This possibility could be regarded as a trivial case, but is *expressis verbis* hardly discussed. The underlying provocative idea is that a specific requirement for depolarizing (sic!) GABAergic transmission does not exist. The scenario is based on recent *in vivo* data that identified GABA as an inhibitory transmitter of the immature brain as well as a lack of direct evidence for GABAergic excitation *in vivo*. Accordingly, the developmental increase in chloride extrusion capacity could essentially reflect an increased demand which, in turn, results from an enormous increase in GABAergic synapse density during the same developmental period (Fig. 1B). It should further be noted that the maintenance of low  $[Cl^-]_{in}$  by means of KCC2 is energetically expensive because chloride co-transport depends on the electrochemical  $K^+$  gradient and, therefore, the activity of  $Na^+/K^+$ -ATPase. This aspect might be particularly relevant for the time period of structural assembly during brain development.

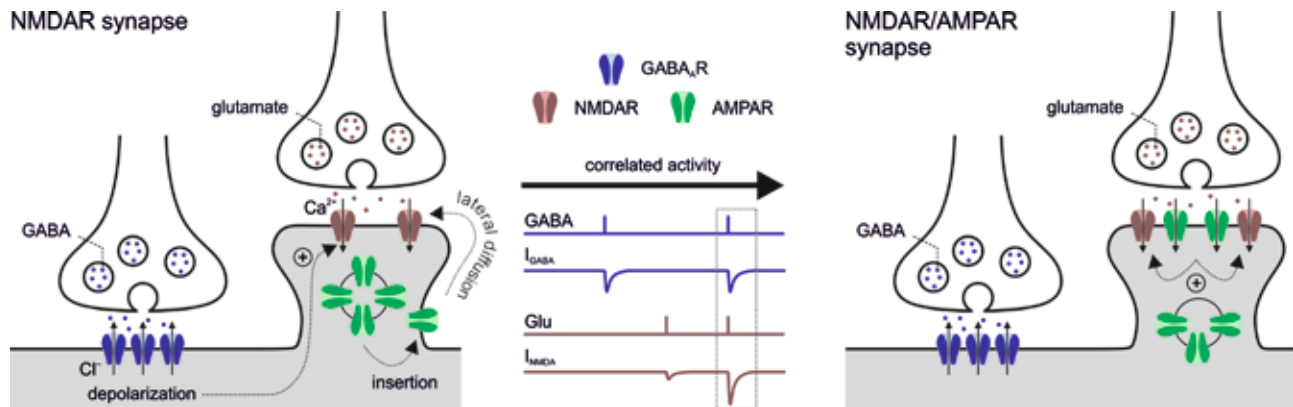
*Scenario 2: The low capacity of chloride extrusion predisposes to excitatory GABA responses which are crucial for the generation of early network activity.*

The scenario is based on a large body of evidence from *in vitro* investigations suggesting that GABA is an important excitatory neurotransmitter during early CNS develop-

ment (Kirmse et al., 2011). Excitatory GABA effects crucially depend on active chloride accumulation and occur (in a first approximation) if  $E_{GABA}$  is more positive than the action potential threshold. As discussed above, the scenario is hardly supported by currently available *in vivo* data (but see Sipilä et al., 2006). Further studies at the single-cell level are highly required in order to conclusively assess the discrepant nature of results obtained from *in vitro* and *in vivo* investigations, respectively.

*Scenario 3: The low capacity of chloride extrusion enables depolarizing GABA responses which fulfil important developmental functions in the absence of overt postsynaptic excitation.*

What is the developmental relevance of a primarily sub-threshold GABAergic depolarization *in vivo*? GABA<sub>A</sub>R activation may facilitate NMDA receptor- (NMDAR-) mediated currents in neonatal neurons *in vitro* by attenuating their voltage-dependent  $Mg^{2+}$  block (Leinekugel et al., 1997). This aspect could be relevant since it provides a mechanism by which GABA might promote NMDAR-dependent forms of synaptic plasticity. In immature neurons, many glutamatergic synapses are initially equipped with NMDARs but not AMPA receptors (AMPA). Pairing presynaptic glutamate release with postsynaptic depolarization was experimentally shown to convert pure NMDAR-containing into functional NMDAR/AMPA synapses within minutes (Durand et al., 1996). In principle, GABA<sub>A</sub>Rs are in a position to provide the required postsynaptic depolarization (Fig. 2). The concept is supported by investigations in the immature mouse neocortex in which GABA-mediated depolarization was abolished by knock-down of NKCC1. This resulted in a dramatic reduction in the frequency of AMPAR-mediated PSCs at postnatal weeks 2–3 accompanied by a profoundly lower density of dendritic spines. Importantly, synaptic impairments were rescued by overexpression of a voltage-independent NMDAR (Wang & Kriegstein, 2008). Daily systemic administration of the NKCC1 inhibitor bumetanide in rats from E15 to postnatal day (P) 7 caused similar synaptic alterations, but was ineffective if only performed in the postnatal period (Wang & Kriegstein, 2011). Owing to a low blood-brain barrier permeability and potential peripheral effects of bumetanide (see above), it remains unclear whether the described effects are causally related to an attenuation of cortical GABAergic depolarization. The same reasoning applies to the observation that systemic bumetanide application (P3–7) led to a moderate prolongation of the critical period of ocular dominance plasticity in rats (Deidda et al., 2015). In contrast to previous data, this effect was accompanied by a selective delay in the



**Fig. 2:** Model for the facilitation of NMDAR-dependent synaptic plasticity by depolarizing GABAergic transmission. Immature glutamatergic synapses initially lack AMPARs (*left*). GABA<sub>A</sub>R-mediated depolarization enhances Ca<sup>2+</sup> influx via NMDARs by attenuating their voltage-dependent Mg<sup>2+</sup> block. Pairing glutamate release with postsynaptic depolarization induces incorporation of AMPARs into the postsynaptic membrane. This process is referred to as synapse unsilencing and renders the postsynaptic membrane able to generate currents upon sole glutamate release. In more mature glutamatergic synapses (*right*), NMDAR-dependent Ca<sup>2+</sup> signals are locally facilitated by AMPAR-mediated depolarization.

maturation of GABAergic synaptic transmission whereas the development of glutamatergic contacts, dendritic morphology and visual capabilities remained unaffected.

A slight delay in the maturation of glutamatergic and GABAergic synapses was also found in hippocampal pyramidal cells of constitutive NKCC1 knockout mice (Pfeffer et al., 2009). It should be noted, however, that constitutive NKCC1 knockout mice exhibit a severe phenotype unrelated to a lack of neuronal NKCC1. An alternative experimental strategy to abolish depolarizing GABA effects relies in the premature (over)expression of the chloride extruder KCC2. Here, a complicating factor is that KCC2 contributes to the structural development of dendritic spines via interactions with the cytoskeleton. In line with this, KCC2 overexpression via *in utero* electroporation resulted in a massive increase in spine density which was mimicked by a transport-deficient KCC2 variant and hence was independent of alterations in chloride homeostasis (Fiumelli et al., 2013).

The described interaction between GABA<sub>A</sub>Rs and NMDARs is assumed to be synapse-specific (Durand et al., 1996) and possibly independent of (supra-threshold) excitation of the postsynaptic neuron. Evidence for this suggestion has recently been obtained in the optic tectum of *Xenopus laevis* tadpoles (van Rheede et al., 2015). Here, visual stimulation at the onset of sensory development did not induce action potential discharge in a substantial fraction of tectal neurons. Interestingly, visual experience was suited to convert sub-threshold into supra-threshold responses within minutes. This process involved a selective strengthening of AMPAR-dependent PSCs and was crucially dependent on both GABAergic depolarization

(via NKCC1) and NMDARs *in vivo*. Interestingly, depolarizing responses to GABA were exclusively observed in those tectal neurons which lacked sensory-evoked spiking activity. These data provide clear evidence for a developmental function of GABAergic depolarization in the optic tectum which is independent of postsynaptic excitation (van Rheede et al., 2015).

## Concluding remarks

It is conceivable that neither of the aforementioned scenarios fully describes the functions of GABAergic transmission in the immature brain. In addition, it becomes apparent that a coherent picture of these functions cannot be drawn at present. The latter is partially related to the limited specificity of certain experimental manipulations of  $[Cl^-]_{in}$ , but possibly also reflects the complexity and diversity of GABA actions (in different brain areas, cell types, subcellular compartments etc.). Notwithstanding, recent *in vivo* research yielded first indications for developmental functions of depolarizing GABAergic transmission in the immature brain. As to which extent GABAergic depolarization mediates synaptic excitation *in vivo* remains an interesting question for future investigations. It should be stressed that GABAergic transmission mediates synaptic inhibition already in the immature brain. On the basis of currently available evidence, we postulate that a *balance of GABAergic depolarization and inhibition* is essential for the proper maturation of neonatal neuronal circuits.

## References

- Achilles K, Okabe A, Ikeda M, Shimizu-Okabe C, Yamada J, Fukuda A et al. (2007) Kinetic properties of Cl uptake mediated by Na<sup>+</sup>-dependent K<sup>+</sup>-2Cl cotransport in immature rat neocortical neurons. *J Neurosci* 27, 8616–8627.
- Ben-Ari Y, Cherubini E, Corradetti R, Gaiarsa JL (1989) Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *J Physiol* 416, 303–325.
- Ben-Ari Y, Woodin MA, Sernagor E, Cancedda L, Vinay L, Rivera C et al. (2012) Refuting the challenges of the developmental shift of polarity of GABA actions: GABA more exciting than ever! *Front Cell Neurosci* 6, 35.
- Bormann J, Hamill OP, Sakmann B (1987) Mechanism of anion permeation through channels gated by glycine and gamma-aminobutyric acid in mouse cultured spinal neurones. *J Physiol* 385, 243–286.
- Deidda G, Allegra M, Cerri C, Naskar S, Bony G, Zunino G et al. (2015) Early depolarizing GABA controls critical-period plasticity in the rat visual cortex. *Nat Neurosci* 18, 87–96.
- Dzhala V, Valeeva G, Glykys J, Khazipov R, Staley K (2012) Traumatic Alterations in GABA Signaling Disrupt Hippocampal Network Activity in the Developing Brain. *J Neurosci* 32, 4017–4031.
- Durand GM, Kovalchuk Y, Konnerth A (1996) Long-term potentiation and functional synapse induction in developing hippocampus. *Nature* 381, 71–75.
- Fiumelli H, Briner A, Puskarjov M, Blaesse P, Belem BJ, Dayer AG et al. (2013) An Ion Transport-Independent Role for the Cation-Chloride Cotransporter KCC2 in Dendritic Spinogenesis In Vivo. *Cereb Cortex* 23, 378–388.
- Hübner CA, Holthoff K (2013) Anion transport and GABA signaling. *Front Cell Neurosci* 7, 177.
- Hübner CA, Stein V, Hermans-Borgmeyer I, Meyer T, Ballanyi K, Jentsch TJ (2001) Disruption of KCC2 reveals an essential role of K-Cl cotransport already in early synaptic inhibition. *Neuron* 30, 515–524.
- Kang HJ, Kawasaki YI, Cheng F, Zhu Y, Xu X, Li M et al. (2011) Spatio-temporal transcriptome of the human brain. *Nature* 478, 483–489.
- Khazipov R, Sirota A, Leinekugel X, Holmes GL, Ben-Ari Y, Buzsáki G (2004) Early motor activity drives spindle bursts in the developing somatosensory cortex. *Nature* 432, 758–761.
- Kirmse K, Kummer M, Kovalchuk Y, Witte OW, Garaschuk O, Holthoff K (2015) GABA depolarizes immature neurons and inhibits network activity in the neonatal neocortex in vivo. *Nat Commun* 6, 7750.
- Kirmse K, Witte OW, Holthoff K (2010) GABA Depolarizes Immature Neocortical Neurons in the Presence of the Ketone Body  $\beta$ -Hydroxybutyrate. *J Neurosci* 30, 16002–16007.
- Kirmse K, Witte OW, Holthoff K (2011) GABAergic depolarization during early cortical development and implications for anticonvulsive therapy in neonates. *Epilepsia* 52, 1532–1543.
- Kummer M, Kirmse K, Zhang C, Haueisen J, Witte OW, Holthoff K (2016) Column-like Ca<sup>2+</sup> clusters in the mouse neonatal neocortex revealed by three-dimensional two-photon Ca<sup>2+</sup> imaging in vivo. *Neuroimage* 138, 64–75.
- Leinekugel X, Medina I, Khalilov I, Ben-Ari Y, Khazipov R (1997) Ca<sup>2+</sup> oscillations mediated by the synergistic excitatory actions of GABA(A) and NMDA receptors in the neonatal hippocampus. *Neuron* 18, 243–255.
- Luhmann HJ, Prince DA (1991) Postnatal maturation of the GABAergic system in rat neocortex. *J Neurophysiol* 65, 247–263.
- Minlebaev M, Ben-Ari Y, Khazipov R (2007) Network mechanisms of spindle-burst oscillations in the neonatal rat barrel cortex in vivo. *J Neurophysiol* 97, 692–700.
- Misgeld U, Deisz RA, Dodt HU, Lux HD (1986) The role of chloride transport in postsynaptic inhibition of hippocampal neurons. *Science* 232, 1413–1415.
- Owens DF, Boyce LH, Davis MB, Kriegstein AR (1996) Excitatory GABA responses in embryonic and neonatal cortical slices demonstrated by gramicidin perforated-patch recordings and calcium imaging. *J Neurosci* 16, 6414–6423.
- Pfeffer CK, Stein V, Keating DJ, Maier H, Rinke I, Rudhard Y et al. (2009) NKCC1-dependent GABAergic excitation drives synaptic network maturation during early hippocampal development. *J Neurosci* 29, 3419–3430.
- Rheims S, Holmgren CD, Chazal G, Mulder J, Harkany T, Zilberter T et al. (2009) GABA action in immature neocortical neurons directly depends on the availability of ketone bodies. *J Neurochem* 110, 1330–1338.
- Rinke I, Artmann J, Stein V (2010) ClC-2 voltage-gated channels constitute part of the background conductance and assist chloride extrusion. *J Neurosci* 30, 4776–4786.
- Rivera C, Voipio J, Payne JA, Ruusuvaari E, Lahtinen H, Lamsa K et al. (1999) The K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* 397, 251–255.
- Sipilä ST, Schuchmann S, Voipio J, Yamada J, Kaila K (2006) The cation-chloride cotransporter NKCC1 promotes sharp waves in the neonatal rat hippocampus. *J Physiol* 573, 765–773.
- Tyzio R, Allene C, Nardou R, Picardo MA, Yamamoto S, Sivakumaran S et al. (2011) Depolarizing Actions of GABA in Immature Neurons Depend Neither on Ketone Bodies Nor on Pyruvate. *J Neurosci* 31, 34–45.
- Valeeva G, Tressard T, Mukhtarov M, Baude A, Khazipov R (2016) An Optogenetic Approach for Investigation of Excitatory and Inhibitory Network GABA Actions in Mice Expressing Channel-rhodopsin-2 in GABAergic Neurons. *J Neurosci* 36, 5961–5973.
- van Rheede JJ, Richards BA, Akerman CJ (2015) Sensory-Evoked Spiking Behavior Emerges via an Experience-Dependent Plasticity Mechanism. *Neuron* 87, 1050–1062.
- Wang DD, Kriegstein AR (2008) GABA regulates excitatory synapse formation in the neocortex via NMDA receptor activation. *J Neurosci* 28, 5547–5558.
- Wang DD, Kriegstein AR (2011) Blocking Early GABA Depolarization with Bumetanide Results in Permanent Alterations in Cortical Circuits and Sensorimotor Gating Deficits. *Cereb Cortex* 21, 574–587.
- Yamada J, Okabe A, Toyoda H, Kilb W, Luhmann HJ, Fukuda A (2004) Cl<sup>-</sup> uptake promoting depolarizing GABA actions in immature rat neocortical neurones is mediated by NKCC1. *J Physiol* 557, 829–841.
- Zhang RW, Wei HP, Xia YM, Du JL (2010) Development of light response and GABAergic excitation-to-inhibition switch in zebrafish retinal ganglion cells. *J Physiol* 588, 2557–2569.

## Bionotes



### PD Dr. Knut Kirmse

Biolmaging, Hans-Berger Department of Neurology, Jena University Hospital, 07747 Jena, Germany,  
Tel.: +49 (0)3641 9 325 998,  
Fax: +49 (0)3641 9 325 902,  
E-Mail: [knut.kirmse@med.uni-jena.de](mailto:knut.kirmse@med.uni-jena.de),  
Web: [www.biolmaging.uniklinikum-jena.de/Biolmaging.html](http://www.biolmaging.uniklinikum-jena.de/Biolmaging.html)

Knut Kirmse (born 1981) studied Medicine at the Charité in Berlin. He performed his doctoral studies at the Institute of Neurophysiology (supervised by Rosemarie Grantyn and Sergei Kirischuk) for which he received the Robert-Koch award from the Charité in 2007. He continued his work on GABAergic synapses during brain development as a postdoctoral fellow before joining the Biolmaging laboratory of Knut Holthoff and Otto W. Witte at Jena University Hospital in 2009. His main scientific interest focusses on the physiology of brain development, in particular the functions of GABAergic transmission and cortical pioneer neurons. Since 2013 Knut Kirmse is a junior research group leader at the Hans-Berger Department of Neurology Jena, in 2014 he received his *venia legendi* in Neurosciences.



### Prof. Dr. Knut Holthoff

Biolmaging, Hans-Berger Department of Neurology, Jena University Hospital, 07747 Jena, Germany,  
Tel.: +49 (0)3641 9 323 418,  
Fax: +49 (0)3641 9 325 902,  
E-Mail: [knut.holthoff@med.uni-jena.de](mailto:knut.holthoff@med.uni-jena.de),  
Web: [www.biolmaging.uniklinikum-jena.de/Biolmaging.html](http://www.biolmaging.uniklinikum-jena.de/Biolmaging.html)

Knut Holthoff (born 1964) studied Biology at the Heinrich-Heine-University Düsseldorf. At the Department of Neurology in the lab of Otto W. Witte, he wrote his doctoral thesis about intrinsic optical signals in rat brain slices. After a subsequent two-year postdoc, he moved to the lab of Rafael Yuste at Columbia University in New York, where he studied dendritic mechanisms of synaptic plasticity using 2-photon calcium imaging. Starting in 2001, he continued his studies in the lab of Arthur Konnerth at the Ludwig-Maximilians-University in Munich and received his *venia legendi* for Neurosciences at the Technical University Munich in 2007. His main scientific interest focuses on the physiology of synaptic transmission and the mechanisms of neuronal network activity in the brain. In 2008, he was appointed Professor for Experimental Neurology at the University Hospital Jena.



## Übersichtsartikel

Thomas Künzel\* und Hermann Wagner

# Cholinerge Rückkopplungen auf den auditorischen Hirnstamm

DOI 10.1515/nf-2016-1107

**Zusammenfassung:** Absteigende Verbindungen von höheren Hirnarealen zurück in die Peripherie sind in vielen sensorischen Bahnen vorhanden und machen adaptive Informationsverarbeitung möglich, so dass eine größere Bandbreite von Eingängen verarbeitet werden kann. Ein gut charakterisiertes absteigendes System ist die olivo-cochleäre Innervation des Innenohrs, welche eine Reduktion der Sensitivität des Innenohrs aufgrund der Wahrnehmung eines lauten Schallreizes vermittelt. Das olivo-cochleäre System unterstützt die Detektion von kurzzeitigen Schallereignissen durch Hemmung der Antworten im Innenohr auf anhaltendes Hintergrundrauschen. Olivo-cochleäre Neurone innervieren aber auch den Nukleus cochlearis durch kollaterale Axone. Hier erhöht der Transmitter Acetylcholin die Erregbarkeit von zentralen Neuronen, ohne ihre zeitliche Präzision zu verringern. So können ihre Zielneurone im superioren Olivenkomplex effektiver die binauralen Informationen verarbeiten. Dieser zentrale Effekt des olivo-cochleären Systems ergänzt die peripheren Effekte in sinnvoller Weise. Zusätzlich stehen olivo-cochleäre Neurone unter dem Einfluss kortikaler Eingänge, was weitergehende Anpassungsmöglichkeiten der Informationsverarbeitung auf der Ebene des auditorischen Hirnstamms ermöglicht.

**Schlüsselwörter:** Auditorischer Hirnstamm; Schalllokalisierung; Nukleus cochlearis; Modulation; Acetylcholin

Nach einem Spaziergang in ruhiger Umgebung kommen Sie auf eine Party. Plötzlich sind Sie in einem Raum, der mit lauter Musik und redenden Menschen gefüllt ist. Sie tauchen ein in Lärm, der aus allen Richtungen zu kommen scheint. Die Lautstärke ist nun viel höher als draußen und

relevante Informationen können von den verschiedenen Lärmquellen im Raum überdeckt („maskiert“) werden. Trotzdem können sie noch individuelle Sprecher identifizieren und lokalisieren, wenn auch mit größeren Schwierigkeiten als in einer stillen Umgebung. Welche Mechanismen in ihrem Gehirn machen diese Leistung möglich?

Sensorische Bahnen werden oft fälschlicherweise als rein aufsteigende Informationsströme betrachtet, in denen ein gegebenes Neuron seine Informationen nur „noch oben“, an immer komplexere Stationen in höheren hierarchischen Ebenen weitergibt. Ein bekanntes Beispiel dafür sind zeitkodierende Neurone im Nukleus cochlearis, die von synaptischen Riesenterminalen des Hörnervs kontaktiert werden (Felmy und Künzel, 2014). Sie geben ihre Informationen über die zeitlichen Aspekte des wahrgenommenen Schallsignals in der Hörbahn an binaurale Kerngebiete mit komplexerer Funktion weiter. Diese Neurone werden eindeutig vom Informationsfluss von der niedrigen auf die hierarchisch höhere Ebene dominiert, da die aufsteigende synaptische Verbindung vom Hörnerv auf die zeitkodierenden Neurone sehr stark ist. Obwohl es gut erforscht ist, dass die auditorische Peripherie und die ersten Stationen der Hörbahn auch aktivitätsabhängige Dynamik zeigen, können diese adaptiven Phänomene stets nur mit den begrenzten Informationen arbeiten, die im jeweiligen Neuron gerade verfügbar sind. In diesem Schema würde der Hintergrundlärm der Feier aus dem Einführungsbeispiel wichtige Information übertönen, da die Hintergrundgeräusche den aufsteigenden Strom der auditorischen Information ebenso intensiv aktivieren wie relevante auditorische Ereignisse. Es existieren jedoch in allen Modalitäten rekurrente Verbindungen innerhalb hierarchischer Ebenen und absteigende Verbindungen mit Neuronen in tieferen hierarchischen Ebenen, welche gemeinsam dynamische und adaptive Veränderung in den sensorischen Systemen erlauben (Engel et al., 2001; Briggs and Usrey, 2011; Gilbert and Li, 2013; D’Souza and Vijayaraghavan, 2014; Llorca-Torralba et al., 2016). Eine besonders gut erforschte Rückkopplung in einer sensorischen Bahn ist die olivo-cochleäre Projektion im auditorischen Hirnstamm, welche den sogenannten olivo-cochleären Reflex vermittelt (Guinan, 2006). Dieses neuronale System

\*Korrespondenzautor: Thomas Künzel, Institut für Biologie 2, RWTH Aachen, Worringerweg 3, 52074 Aachen, E-Mail: kuenzel@bio2.rwth-aachen.de

Hermann Wagner, Institut für Biologie 2, RWTH Aachen, Worringerweg 3, 52074 Aachen

wird von auditorischen Eingängen angeregt und innerviert das Innenohr aber auch zentrale Neurone in den ersten Stationen der Hörbahn, wie die oben erwähnten zeitkodierenden Neuronen, mit Acetylcholin als Transmitter. Diese absteigenden Verbindungen werden zunehmend als wichtig für die optimale Informationsverarbeitung angesehen, die zum Beispiel durch adaptive Verarbeitungsprozesse gewährleistet wird.

In diesem Artikel wollen wir zunächst einen kurzen Überblick über die Anatomie und Physiologie des peripheren olivo-cochleären Systems geben und seine Funktion für das Hören erläutern. Dann wollen wir im nächsten Schritt neuere Ergebnisse zu zentralen Effekten der olivo-cochleären Innervation auf Neurone des Nukleus cochlearis diskutieren. Wir wollen diese Schaltkreise als Beispielsystem für die allgemeine Frage der Interaktion von vorwärts- und rückwärts-gekoppelten Verbindungen benutzen, und herausarbeiten, wie die Funktion der zentralen Nebenverbindungen des olivo-cochleären Systems seine Effekte auf das Innenohr sinnvoll ergänzt und in der Tat zusätzliche Freiheitsgrade für komplexe absteigende („top-down“) Einflüsse auf die adaptive Informationsverarbeitung in der Hörbahn bietet.

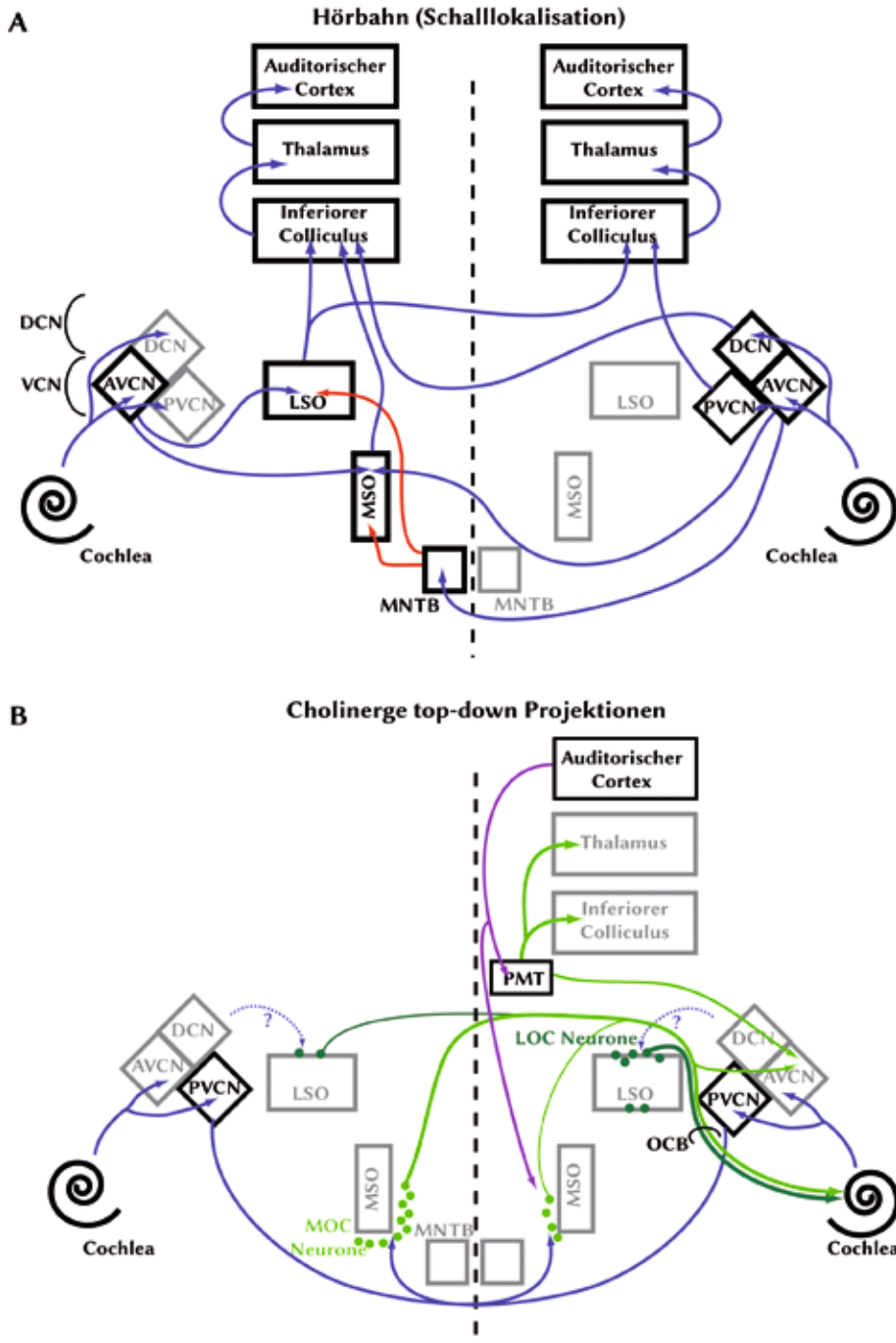
## Anatomie und Physiologie des olivo-cochleären Systems

Die Hörinformation erreicht das Gehirn über den Hörnerv, der die drei Untereinheiten des Nukleus cochlearis innerviert. Von hier aus wird die Hörinformation an den oberen Olivenkomplex und andere Kerngebiete weitergeleitet (Abb. 1A). Die olivo-cochleäre Innervation (Abb. 1B) des Innenohrs, das sogenannte olivo-cochleäre Bündel (OCB), wird hauptsächlich von Projektionsaxonen zweier bilateraler Neuronengruppen gebildet, den medialen (MOC) und lateralen (LOC) olivo-cochleären Neuronen (Brown, 2011). Beide Neuronengruppen befinden sich in der Nähe des oberen Olivenkomplexes. Die MOC Neurone findet man nahe der medialen oberen Olive (vor allem im ventralen Nukleus des Trapezkörpers), während die LOC Neurone in und um die laterale obere Olive (Radtko-Schuller et al., 2015) zu finden sind. Die Axone sowohl der contra- als auch der ipsilateralen MOC und LOC Neurone innervieren das Innenohr (Brown, 1993). MOC Axone haben dabei einen großen Durchmesser und sind stark myelinisiert, was eine schnelle Aktionspotentialfortleitung anzeigt. Im Gegensatz dazu sind LOC Axone dünn und weisen keine Myelinschicht auf, was eine langsame, nicht zeitkritische Funktion vermuten lässt. Die MOC Axone bilden cholinerge

ge Kontaktstellen mit dem basalen Teil der äußeren Haarsinneszellen aus (Wersinger and Fuchs, 2011; Elgoyhen and Katz, 2012). Die LOC Axone hingegen kontaktieren die peripheren Endigungen des Hörnervs ganz in der Nähe der inneren Haarsinneszellen und benutzen neben dem Neurotransmitter Acetylcholin noch eine Vielzahl von Co-Transmittern (Guinan, 2006).

Über die Innervation der LOC Neurone ist wenig bekannt. Es wird angenommen, dass LOC Neurone auf Schallreize reagieren und Eingänge aus dem ipsilateralen posteroventralen Nukleus cochlearis (PVCN) erhalten. Die Axone der LOC Neurone innervieren dann ihrerseits fast ausschließlich die ipsilaterale Cochlea. Daher kreuzt die Mehrheit der LOC Fasern nicht die Mittellinie. Allerdings ist unklar was der genaue Effekt der Innervation der peripheren Endigungen des Hörnervs durch die LOC Axone ist. Im Allgemeinen scheint die LOC Aktivität die Erregbarkeit der Hörnervfasern zu modulieren, vor allem in dem Sinne, dass erhöhte LOC Aktivität die Aktivität im Hörnerv inhibiert (Groff and Liberman, 2003; Darrow et al., 2006).

Im Gegensatz zum LOC System ist über die Anatomie und Physiologie des MOC Systems mehr bekannt (Brown et al., 2003). Einzelne MOC Neurone sind schmalbandig auf Schallreize abgestimmt. Sie werden von Neuronen im contralateralen PVCN innerviert. Die meisten MOC Axone überqueren die Mittellinie im Boden des vierten Ventrikels und erreichen das Innenohr durch den vestibulären Teil des achten Hirnnervs (Brown, 1993). Diese Axone bilden also eine zweifach gekreuzte Bahn für den ipsilateralen olivo-cochleären Reflex, in der Schallreize über den rechten Nukleus cochlearis die MOC Neurone in der linken Gehirnhälfte erregen, welche wiederum das rechte Innenohr innervieren. Ein gewisser Anteil an MOC Axonen kreuzt jedoch nicht die Mittellinie. Stattdessen treten diese Fasern dem ipsilateralen OCB bei und bilden so eine zweite Bahn, in der Schallreize über den rechten Nukleus cochlearis die MOC Neurone in der linken Gehirnhälfte erregen, welche dann jedoch das linke Innenohr innervieren. Diese kontralaterale Reflexbahn ist von besonderer Bedeutung, weil durch diese olivo-cochleäre Innervation Schallreize, die von dem einen Ohr empfangen werden, die Verarbeitung von Schallreizen im gegenüberliegenden Ohr beeinflussen können. Aus mechanistischer Sicht wäre es besonders interessant, die ipsi- und kontralateralen Anteile des olivo-cochleären Reflexes voneinander zu trennen. Dies ist experimentell durch die Entkopplung der Eingänge zu den beiden Ohren möglich: spielt man dem einen Ohr ein breitbandiges Rauschen vor, verringert sich die Sensitivität des anderen Ohrs. Dieses Phänomen wird als „kontralaterale Unterdrückung“ bezeichnet, die wahrscheinlich durch das olivo-cochleäre System vermittelt



**Abb. 1:** Neuroanatomie aufsteigender und absteigender Verbindungen im auditorischen Hirnstamm. **A** Vereinfachte Darstellung aufsteigender auditorischer Verbindungen mit Schwerpunkt auf Strukturen, die in die Schalllokalisation involviert sind. Idealisierter Koronalschnitt des Gehirns, gestrichelte Linie zeigt die Mittellinie an um gekreuzte vs. ungekreuzte Verbindungen deutlich zu machen. Blaue Pfeile zeigen erregende Verbindungen an, rote Pfeile hemmende Verbindungen. Einige Verbindungen und Kerngebiete wurden zur Vereinfachung weggelassen. Für Zusammenfassungen mit größerer Detailtiefe, siehe Pollak et al., 2003; Grothe et al., 2010; Grothe and Pecka, 2014. **B** Überblick über die wichtigsten absteigenden cholinergen Verbindungen im auditorischen Hirnstamm. Grüne Pfeile zeigen cholinerge Verbindungen an (dunkelgrün wird benutzt um LOC und MOC Fasern/Neurone zur unterscheiden). Violette Pfeile zeigen absteigende kortikale Verbindungen auf cholinerge Neurone an. Eingänge zu den LOC Neuronen sind nicht genau bekannt (gestrichelter blauer Pfeil mit Fragezeichen). Informationen übernommen von: Guinan, 2006; Schofield et al., 2011. Abkürzungen: AVCN anteroventraler Nukleus cochlearis, DCN dorsaler Nukleus cochlearis, LOC laterale olivo-cochleär, LSO laterale obere Olive, MNTB medialer Kern des Trapezkörpers, MOC mediale olivo-cochleär, MSO mediale obere Olive, OCB olivo-cochleäres Bündel, PMT Kerngebiete des pontomesencephalischen Tegmentums, PVCN posteroventraler Nukleus cochlearis, VCN ventraler Nukleus cochlearis.

telt wird (Knudson et al., 2014). Das genaue Verhältnis von ipsi- und kontralateraler olivo-cochleärer Innervation ist variabel und hängt von der untersuchten Spezies und der betrachteten tonotopen Position in der Cochlea ab. Im Allgemeinen wird angenommen, dass die ipsilaterale Komponente zwei bis dreimal stärker ist als die kontralaterale (Guinan, 2006). Bei Menschen ist jedoch der Anteil von gekreuzten und ungekreuzten MOC Axonen ungefähr gleich hoch. Dies ist auch in niederfrequenten Teilen des Hörsystems von Tieren der Fall (Guinan, 2006; Brown, 2011). Sowohl kontra- als ipsilaterale MOC Axone vermitteln Rückkopplung an die äußeren Haarsinneszellen (ÄHZ) des Innenohrs mit Hilfe cholinergischer Synapsen. Dieser synaptische Kontakt ist sehr gut untersucht (Elgoyhen und Katz, 2012). Das Acetylcholin, das von den MOC Axonen freigesetzt wird, bindet an pharmakologisch einzigartige cholinerge Rezeptoren auf der postsynaptischen Seite. Diese Rezeptoren werden von  $\alpha$ -9 und  $\alpha$ -10 Untereinheiten des nikotinischen Acetylcholinrezeptors gebildet, welche eine besonders hohe Kalziumleitfähigkeit aufweisen (Elgoyhen et al., 2011). Die rasche Folge des durch Acetylcholin induzierten Kalziumeinstroms ist eine Hyperpolarisierung des Membranpotentials der ÄHZ, welche durch kalzium-aktivierte Kaliumkanäle erzeugt wird (Elgoyhen und Katz, 2012). Diese Hyperpolarisation erzeugt eine sehr effektive Hemmung der Funktion der ÄHZ, indem direkt die membranpotentialabhängige Motilität der ÄHZ beeinflusst wird. Des Weiteren beeinflusst der Kalziumeinstrom über längere Zeiträume die Steifheit der ÄHZ durch eine Beeinflussung des Zytoskeletts und der Prestinproteine, was wiederum die Motilität der ÄHZ verändert (Cooper und Guinan, 2003; He et al., 2003). Dementsprechend kann der olivo-cochleäre Reflex auch physiologisch in eine Komponente mit schnellem Effekt und eine Komponente mit langsamem Effekt unterteilt werden. Diese beiden Komponenten können direkt auf die zwei oben beschriebenen molekularen Mechanismen zurückgeführt werden.

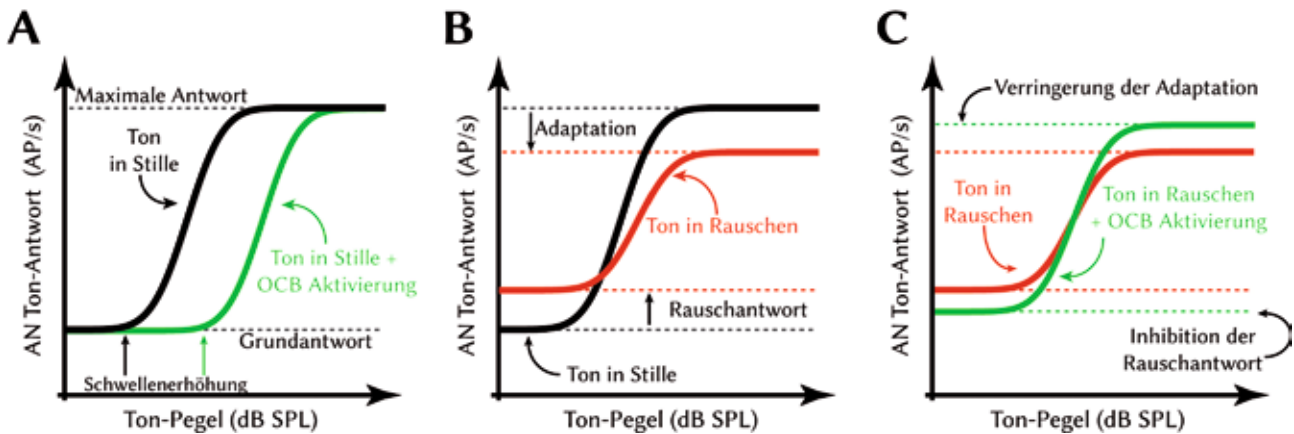
## Olivo-cochleäre Aktivierung verbessert das Hören in Rauschen

Wie wirkt sich die Rückkopplung durch das MOC System nun auf das Hören aus? Der MOC Effekt reduziert den Grad der cochleären Verstärkung, indem er die Motilität der ÄHZ verändert. Dies verringert wiederum die Antwort des Innenohrs bei einem gegebenen Schallpegel (Wersinger und Fuchs, 2011). Dies tritt als Aufwärtsverschiebung der Antwortkurve der Hörnervfasern auf ein Signal verschie-

dener Schallpegel in Erscheinung (Abb. 2A). Daher macht die Aktivierung des olivo-cochleären Reflexes das Innenohr genau genommen weniger sensitiv für Schallsignale (Cooper und Guinan, 2003; Francis und Guinan, 2010). Dies könnte zwei mögliche Funktionen haben: 1) der olivo-cochleäre Reflex könnte dazu dienen das Innenohr vor sehr lauten Geräuschen zu schützen. 2) Die Antwort auf Signale, die in Rauschen verborgen sind, könnte verbessert werden. Der erste Effekt ist intuitiv verständlich. Es gibt in der Tat Beweise dafür, dass Tiere mit experimentell beeinträchtigtem olivo-cochleärem Reflex stärker von rauscherzeugten Hörschäden betroffen sind und ein frühzeitiges Altern des Hörsystems aufweisen (Guinan, 2006; Liberman et al., 2014). Anders ausgedrückt ergänzt der olivo-cochleäre Reflex also andere otoprotektive Reflexe wie den Stapediusreflex, welcher die Schallweiterleitung im Mittelohr durch eine Versteifung der Gehörknöchelchenkette verringert, wenn laute Schallsignale wahrgenommen werden. Es ist jedoch umstritten ob dies wirklich die Hauptaufgabe des komplexen olivo-cochleären Systems ist (Kirk und Smith, 2003), besonders weil der olivo-cochleäre Reflex schon von Schallintensitäten aktiviert wird, wie weit unterhalb traumatischer Pegel liegen. Es muss also mindestens eine weitere zusätzliche Funktion geben.

Die zweite Funktion des olivo-cochleären Reflex liegt in seiner Beeinflussung der Antwort des Innenohrs auf konstante Reizung durch breitbandiges Rauschen. Dies kommt in natürlicher Umgebung häufig als sogenanntes Hintergrundrauschen (z. B. durch rauschendes Wasser oder Wind in Blättern) vor. Die Veränderungen, die im Innenohr durch das Hintergrundrauschen hervorgerufen werden, können durch die Messung der Antworten auf genau definierte Stimuli wie Sinustöne mit und ohne Rauschen analysiert werden. Man findet, dass breitbandiges Rauschen eine Reduktion oder Kompression des dynamischen Antwortbereichs der Hörnervfasern auf Sinustöne erzeugt. Dies geschieht zum einen durch eine Erhöhung der Grundantwort, weil das Hintergrundrauschen konstant alle Hörnervfasern anregt. Gleichzeitig wird die maximale Antwort auf den Teststimulus verringert, da durch die konstante Erregung der Haarsinneszellen des Innenohrs eine Adaptation auftritt (Abb. 2B). Jedoch löst breitbandiges Rauschen von schon moderaten Schallpegeln bereits effektiv den olivo-cochleären Reflex aus. Die Antwort auf transiente Schallereignisse, z. B. sehr kurze Sinustöne, welche vor dem Hintergrund des konstanten Rauschens auftreten, wird durch die inhibitorische Funktion des olivo-cochleären Reflexes verbessert (Kawase et al., 1993). Wie ist das möglich? Indem die anhaltende Antwort auf das Breitbandrauschen unterdrückt wird, wird sowohl die Erhöhung der Grundantwort und, als Folge dessen,





**Abb. 2:** Effekt des olivo-cochleären Reflexes auf Tonantworten im Hörnerv. **A** Schematische Darstellung der Schwellenerhöhung, welche die OCB Aktivierung auslöst. Schwarze Linie: Raten-Pegel Funktion der Hörnervantwort auf ipsilateral präsentierte Töne in Stille. Grüne Linie: Raten-Pegel Funktion der Hörnervantwort auf ipsilateral präsentierte Töne in Stille bei zusätzlichem kontralateral präsentierten Rauschen. Das kontralateral präsentierte Rauschen aktiviert den olivo-cochleären Reflex über die MOC Axone. **B** Schematische Darstellung des Effekts, den Hintergrundrauschen auf die Tonantwort hat. Schwarze Linie: wie in A. Rote Linie: Raten-Pegel Funktion der Hörnervantwort auf ipsilateral präsentierte Töne in ipsilateral präsentierten Rauschen. Wegen der Antwort auf den konstanten Rauschstimulus ist die Grundrate höher. Aufgrund von Adaptationseffekten, ausgelöst durch die konstante Antwort, ist die Maximalantwort kleiner. **C** Schematische Darstellung des Effekts, den die OCB Aktivierung auf die Tonantwort in Rauschen hat. Rote Linie: wie in B. Grüne Linie: Raten-Pegel Funktion der Hörnervantwort auf ipsilateral präsentierte Töne in ipsilateral präsentierten Rauschen mit kontralateral präsentierten Rauschen. Die olivo-cochleäre Aktivierung hemmt die konstante Antwort auf das ipsilaterale Rauschen und verringert so auch die Adaptation der Hörnervfasern. Informationen übernommen aus: Kawase et al., 1993; Guinan, 2006. Bitte beachten, dass die Effekte in dieser Abb. zur Verdeutlichung teilweise überhöht dargestellt sind. Abkürzungen: AN Auditorischer Nerv, AP Aktionspotential, SPL Schalldruckpegel.

auch die Adaptation der Maximalantwort verringert. Der olivo-cochleäre Reflex erlaubt also eine stärkere Antwort auf den Testton, der im Rauschen verborgen ist, ein Phänomen das als Aufhebung der Maskierung bezeichnet wird. Die Aufhebung der Maskierung des Sinustons ist jedoch nicht perfekt: die Antwort auf den Ton im Rauschen hat, trotz der Verbesserung durch den olivo-cochleären Reflex, eine geringere Sensitivität und einen schmalen dynamischen Bereich im Vergleich zur Antwort auf den gleichen Ton in Stille (Abb. 2C). Dennoch ist der olivo-cochleäre Reflex in der Lage, die Antwort auf transiente, schmalbandige Schallereignisse in Rauschen entscheidend zu verbessern. Dabei handelt es sich um eine sehr häufige und höchst relevante Höraufgabe. Der Leser möge an menschliche Sprache oder Tierlaute denken, welche beide durch sehr kurze ton-artige Signalabschnitte (Formanten) charakterisiert sind, die zuverlässig detektiert werden müssen, trotz häufig starken Hintergrundlärms wie zum Beispiel Wind, der in den Blättern der Bäume im Wald rauscht.

Des Weiteren beeinflusst olivo-cochleäre Aktivierung nicht nur die Detektion von Tönen, sondern auch die Genauigkeit der Lokalisation von Tönen in Rauschen bei Tieren (May et al., 2004) und Menschen (Andeol et al., 2011). Schalllokalisation ist vor allem eine Leistung des Gehirns,

bei der binaurale Informationen miteinander verglichen und analysiert werden. Bisher ist nicht vollständig verstanden, wie der periphere olivo-cochleäre Reflex bei dieser Aufgabe von Nutzen sein könnte. Weiter unten in diesem Artikel werden wir jedoch Ergebnisse unserer eigenen Experimente präsentieren, die erklären könnten, wie eine Verbesserung der Lokalisation auf neuronaler Ebene begründet sein könnte. Des Weiteren wurde vorgeschlagen, dass das LOC System die Stärke der neuronalen Erregung zwischen den beiden Hemisphären angleichen könnte, was für die Schalllokalisation mit Hilfe interauraler Pegelunterschiede notwendig ist (Darrow et al., 2006; aber beachte: Larsen und Liberman, 2010). Interessanterweise ist jedoch bei menschlichen Patienten, die eine Schädigung des peripheren Teils des olivo-cochleären Bündels erlitten haben, das Hören im Grunde genommen völlig normal (Scharf et al., 1994, 1997). Zudem sind Korrelationen zwischen der MOC Aktivierungsstärke, welche üblicherweise nur peripher mit Hilfe von otoakustischen Emissionen gemessen wird, und dem Erfolg in komplexen Höraufgaben nicht immer besonders stark (Boothalingam et al., 2016). Eine mögliche Interpretation dieser Befunde, welche wir in diesem Artikel betonen wollen, ist, dass der periphere Teil des olivo-cochleären Reflexes weniger entscheidend bei komplexen Höraufgaben ist und dass ein zentraler An-

teil des olivo-cochleären Systems hier eine größere Rolle spielt. Im Folgenden wollen wir deshalb einen Überblick darüber bieten, was zur Innervation zentraler Neurone durch olivo-cochleäre Axone bekannt ist, besonders mit Hinblick auf neuere Befunde zum Effekt von Acetylcholin auf zeitkodierende Neurone.

## Zentrale Effekte der olivo-cochleären Aktivierung

MOC Aktivierung kann sowohl auf der Ebene des Hörnervs als auch in zentralen Stationen wie dem Nukleus cochlearis und dem Colliculus inferior die Maskierung der Antwort auf Töne durch Rauschen aufheben (Kawase and Liberman, 1993; Kawase et al., 1993; Mulders et al., 2008; Seluakumaran et al., 2008). Jedoch deutet eine physiologische Analyse des olivo-cochleären Reflexes in zentralen Neuronen einen mehrfachen Effekt der olivo-cochleären Aktivierung an, den indirekten Einfluss über die periphere Projektion und einen zweiten, direkteren zentralen Effekt (Mulders et al., 2002). Dazu passend wurde in zahlreichen Studien für verschiedene Spezies gezeigt, dass olivo-cochleäre Axone kollaterale Verbindungen bilden, die in den Nukleus cochlearis reichen (Brown et al., 1988; Benson and Brown, 1990; Horváth et al., 2000; Brown, 2011; Baashar et al., 2015) und dort primäre Neurone innervieren (Benson et al., 1996). Hier erregt die olivo-cochleäre Aktivität, die durch Rauschstimuli im kontralateralen Ohr ausgelöst wird, die Neurone des ventralen Nukleus cochlearis (VCN) (Mulders et al., 2003, 2009). Andere, nicht olivo-cochleäre kommissurale Verbindungen existieren ebenfalls und erzeugen schnelle phasische, kontralaterale Exzitation (Bledsoe et al., 2009), worauf hier aber nicht weiter eingegangen werden kann. Wir verfolgen die Hypothese, dass die kontralateral ausgelösten olivo-cochleären Antworten im VCN einen allgemeinen Mechanismus anzeigen: immer wenn das Innenohr einer Kopfseite olivo-cochleäre Inhibition erhält (unabhängig davon ob diese ipsi-, contra- oder bilateral induziert wurde), steigern die kollateralen Axone des OCB die Erregung im VCN. Dies wird von anatomischen Studien unterstützt, welche besagen, dass ein überwiegender Anteil der cholinergen Axone, die den VCN innervieren, von MOC/LOC Neuronen im oberen Olivenkomplex stammen. Dabei haben allein 44 % ihren Ursprung im ipsilateralen oberen Olivenkomplex (Mellott et al., 2011).

Welche Neurone sind die Ziele der erregenden kollateralen Verbindung des OCB im VCN? Physiologische Studien in-vivo deuteten auf Neurone vom Onset-Typ (Mulders

et al., 2003) oder beinahe alle Neuronentypen (Mulders et al., 2008) als potentielle Ziele des olivo-cochleären Reflexes hin. Bedenkt man jedoch die Komplexität der rekurrenten Verbindungen innerhalb des VCN (Campagnola und Manis, 2014), ist es schwer anhand dieser Ergebnisse allein zu entschlüsseln wie der olivo-cochleäre Reflex die Funktion des VCN bei einer Höraufgabe wie der Schalllokalisation beeinflusst. Jedoch zeigten in-vitro Experimente, dass die sogenannten T-Sternzellen im VCN (Oertel et al., 2011) eindeutig auf Acetylcholin reagieren (Fujino und Oertel, 2001), den Neurotransmitter des OCB. Diese Neurone werden von Acetylcholin erregt, vermittelt durch nikotinische und muskarinische Acetylcholinrezeptoren. T-Sternzellen bilden lokale und entfernte Verbindungen mit unterschiedlichsten Projektionszielen in der Hörbahn aus, unter anderem dem VCN selbst, dem dorsalen Nukleus cochlearis, periolivären Regionen im oberen Olivenkomplex, den Kerngebieten des lateralen Lemniskus und schließlich dem inferioren Colliculus (Oertel et al., 2011). Aufgrund des Antwortverhaltens der T-Sternzellen auf Schallreize kann man schließen, dass sie Informationen über den Pegel und Hüllkurvenmodulation des Signals weiterleiten und so, als Population, in der Lage sind den Frequenzgehalt des wahrgenommenen Schallsignals zu kodieren. Interessanterweise tragen die T-Sternzellen auch zum erregenden Eingang der kontralateralen MOC Neuronen bei, was eine weitere positive Rückkopplungsschleife bildet (Oertel et al., 2011). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die zusätzliche Erregung durch die cholinergen Kollateralen den dynamischen Bereich der Antwort der T-Sternzellen erweitern kann. Es ist aber aufgrund der diffusen Funktion und Projektionsmuster der T-Sternzellen sehr schwer zu verstehen, was die genaue Rolle des cholinergen Eingangs ist. Um dieses Problem zu lösen wurde in einer kürzlich veröffentlichten Studie die cholinerge Innervation eines anderen Neuronentyps im VCN untersucht, den sphärischen Buschzellen („spherical bushy cells“, SBZ) (Goyer et al., 2016).

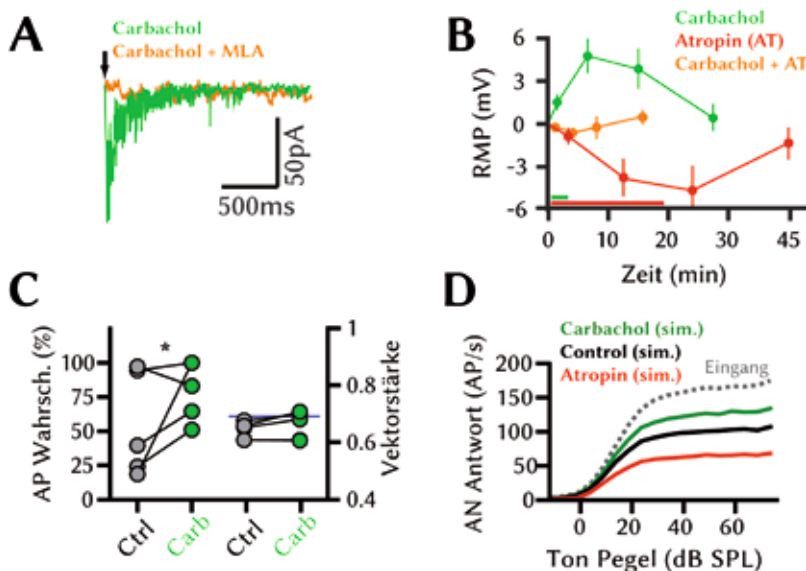
## Cholinerge Modulation zeitkodierender Neurone

Sphärische Buschzellen (SBZ) werden (ebenso wie die ähnlichen globulären Buschzellen) vom Hörnerv mittels somatischer Riesensynapsen, den so genannten Held'schen Endkolben, kontaktiert (Felmy und Künzel, 2014). Aufgrund dieser starken synaptischen Verbindung und ihrer spezialisierten Physiologie sind diese Neurone in der Lage die exquisite zeitliche Präzision der Aktions-

potentiale im Hörnerv zu erhalten oder diesen Zeit-Code sogar noch zu verbessern, indem sie konvergierende erregende und inhibitorische Eingänge verwenden. Indem sie die Zeiten der Aktionspotentiale exakt an eine bestimmte Phase des wahrgenommenen Schallsignals koppeln, können SBZ die relative zeitliche Lage des Stimulus kodieren, was eine Schalllokalisierung mittels interauraler Zeitunterschiede erst möglich macht. Die Aktionspotentiale der SBZ kodieren die zeitliche Lage des Schallsignals mit einer Genauigkeit im Mikrosekundenbereich. Diese zeitlichen Informationen werden im oberen Olivenkomplex kombiniert (Goldberg und Brown, 1969; Grothe et al., 2010), einem direkten bilateralen Projektionsziel der SBZ. Die Genauigkeit, mit der SBZ die relative zeitliche Lage der Schallstimuli kodieren können, wird hier übersetzt in die Genauigkeit, mit der Schallquellen in der Horizontalebene lokalisiert werden können.

Die Antwortcharakteristika der SBZ sind einfach. Daher sind diese Zellen besonders gut geeignet, um abstei-

gende und rückkoppelnde Einflüsse auf den auditorischen Hirnstamm zu untersuchen. In einer kürzlich erschienenen Studie (Goyer et al., 2016) wurde analysiert, wie SBZ auf Acetylcholin antworten. In einem in-vitro Ansatz mit akuten Gehirnschnitten applizierten die Autoren Carbachol, einen Agonisten für Acetylcholin, gezielt auf SBZ und leiteten gleichzeitig in der Ganzzell-Konfiguration von ihnen ab (Abb. 3). Dieses Experiment erlaubte zudem die gleichzeitige Stimulation der Hörnerveingänge auf die SBZ. Es wurde gefunden, dass SBZ durch die Aktivierung von  $\alpha$ -7 nikotinischen Acetylcholinrezeptoren depolarisiert werden, und zwar mit einem Zeitverlauf, der mit der schnellen Komponente des olivo-cochleären Reflexes in Einklang steht, d. h. einige Hundert Millisekunden (Abb. 3A). Jedoch zeigte diese Studie auch, dass zusätzlich dazu das Ruhemembranpotential (RMP) der SBZ durch Carbachol depolarisiert wurde, mit einem langsamen Zeitverlauf von Minuten (Abb. 3B). Für diesen Effekt waren muskarinische Acetylcholinrezeptoren verantwortlich.



**Abb. 3:** Effekt der cholinergen Modulation von zeitkodierenden zentralen Neuronen. **A** Nikotinische transiente Einwärtsströme in sphärischen Buschzellen (SBZ) der Wüstenrennmaus mit der Ganzzell-Spannungsklemme ( $-65$  mV Haltepotential) abgeleitet nach kurzer Druckapplikation (Applikationszeitpunkt durch Pfeil markiert) von Carbachol (ein stabiles Analogon von Acetylcholin). Die nikotinischen Einwärtsströme werden durch den spezifischen  $\alpha$ -7 nikotinischen Antagonisten Methyllycaconitin blockiert. Grüne Spur: durch Carbachol induzierter Einwärtsstrom. Orange Spur: Strom gemessen nach Applikation von Carbachol in Anwesenheit von Methyllycaconitin. **B** Ruhemembranpotential (RMP) von SBZ wird von muskarinischen Rezeptoren über Minuten moduliert. Grüne Datenpunkte: RMP Änderungen gemessen nach wiederholter Druckapplikation (grüner Balken) von Carbachol. Rote Datenpunkte: RMP gemessen nach dem Einwaschen (roter Balken) des muskarinischen Antagonisten Atropin. Orange Datenpunkte: RMP gemessen nach wiederholter Druckapplikation von Carbachol in Anwesenheit von Atropin. Fehlerbalken zeigen Standardfehler des Mittelwerts. **C** Cholinerge Modulation erhöht die Wahrscheinlichkeit für Aktionspotentiale in vitro aber verringert nicht die zeitliche Präzision (Vektorstärke). Ctrl = Kontrollbedingung, Carb = Carbacholbedingung. Blaue Linie zeigt Vektorstärke des Eingangs, ein Maß für die zeitliche Präzision von Aktionspotenzialen in Bezug auf die Phase des Schallstimulus. Stern:  $p < 0.05$ , gepaarter T-Test. **D** Simulierte Raten-Pegel Funktionen von sphärischen Buschzellen, Grundraten subtrahiert. Graue gestrichelte Linie: simulierte Eingangsrate durch den Hörnerv. Schwarze Linie: simulierte SBZ-Antwort, Kontrollbedingung. Grüne Linie: Simulierte SBZ-Antwort, Carbacholbedingung (RMP depolarisiert). Rote Linie: Simulierte SBZ-Antwort, Atropinbedingung (RMP hyperpolarisiert). Alle Daten in dieser Abb. (A–D) adaptiert und nachgeplottet aus Goyer et al., 2016.

Die Blockierung von muskarinischen Rezeptoren hyperpolarisierte das Ruhemembranpotential der SBZ in langsamer Weise (Abb. 3B). Dies führte zu dem Schluss, dass ein gewisses konstantes Niveau muskarinischer Aktivierung zur Einstellung des tatsächlichen Ruhemembranpotentials der SBZ beiträgt. Die Autoren der Studie testeten zudem den Einfluss der cholinergen Modulation auf die synaptische Übertragung und fanden heraus, dass unter dem Einfluss von Acetylcholin dieselbe Hörnervaktivität mehr Aktionspotentiale in den SBZ erzeugte (Abb. 3C). Auch in-vivo Experimente mit iontophoretischer Applikation von Carbachol bestätigten, dass eine Erhöhung der spontanen Aktionspotentialrate der SBZ auftritt. Bemerkenswerterweise zeigten weitere in-vitro Experimente, dass eine Reduktion der zeitlichen Präzision der Aktionspotentiale, welche die Phase des Stimulus kodieren, nicht eintritt wenn die Erregbarkeit der Zellen durch Acetylcholin erhöht ist (Abb. 3C). Das bedeutet, dass aufgrund der Erhöhung der Erregbarkeit durch Acetylcholin die SBZ eine größere Anzahl zeitlich präziser Aktionspotentiale erzeugen. Dies verbessert sehr wahrscheinlich die Schalllokalisation mit Hilfe von zeitlichen Informationen in den nachfolgenden Stationen der Hörbahn.

Mit Hilfe eines Computermodells der SBZ, des Innenohrs und Hörnervs wurde vorhergesagt, dass die cholinerge Modulation der SBZ den dynamischen Antwortbereich der simulierten SBZ erweitern und die Antwort auf sehr leise Schallereignisse verbessern kann, ohne die zeitliche Präzision der Antworten zu verringern (Abb. 3D). Dies deckte sich mit der Hypothese, die oben schon aufgestellt wurde: die zentralen Effekte des olivo-cochleären Reflexes unterstützen die peripheren Effekte insofern, dass der dynamische Antwortbereich für Töne in Rauschen, der ja durch die Rauschantwort verkleinert wird (vgl. Abb. 2B&C), nochmals erweitert wird. Insgesamt kann man sagen, dass diese neueren Befunde (Goyer et al., 2016) die Schlussfolgerung zulassen, dass der zentrale Anteil des olivo-cochleären Reflexes eine kompensatorische Erhöhung der Erregbarkeit der zeitkodierenden Neurone erzeugt, welche der peripheren Verringerung der Sensitivität entgegenwirkt. Man kann also sagen, dass dieses Rückkopplungssystem die Anzahl der zeitlich präzisen Aktionspotentiale, welche die SBZ an höhere Stationen weiterleitet, über einen weiten Bereich von Hörbedingungen stabilisiert.

## Cholinerge Rückkopplungen vom Kortex auf den auditorischen Hirnstamm

Zusätzlich zu den bisher genannten Punkten gibt es weitere Komplexitätsstufen in der Anatomie der cholinergen Innervation des Nukleus cochlearis: zum einen erhalten die Neurone des olivo-cochleären Systems im oberen Olivenkomplex nicht nur direkte auditorische Eingänge durch Interneurone im Nukleus cochlearis, sondern sie stehen auch zusätzlich unter der Kontrolle höherer Hirnareale. Es wurde gezeigt, dass absteigende Projektionen vom inferioren Colliculus (Brown et al., 2013), dem auditorischen Kortex (Schofield et al., 2011) und weiteren, nicht-auditorischen Hirnarealen (Brown et al., 2013) bis hinunter zu den olivo-cochleären Neuronen im oberen Olivenkomplex reichen. Des Weiteren existiert eine eigene Klasse cholinergischer Neurone in einem Mittelhirnareal namens pontomesencephalisches Tegmentum, welche unter kortikaler Kontrolle steht und weitreichende Verbindungen in jede Station der Hörbahn ausbildet, auch in den Nukleus cochlearis (Behrens., 2002; Schofield et al., 2011; Mellot et al., 2011). Letztere Neurone stellen etwa 25 % aller cholinergen Axone in den Nukleus cochlearis von Nagetieren. Obwohl diese Schaltkreise streng genommen immer noch eine Form schallgetriebener cholinergischer Rückkopplung liefern, kann man durchaus annehmen, dass diese nicht so unmittelbar reizgetrieben ist wie die direkteren cholinergen Rückkopplungsschleifen, die durch den olivo-cochleären Schaltkreis im auditorischen Hirnstamm gebildet werden. Es werden eher komplexere Eigenschaften des wahrgenommenen Schallsignals oder der Hörsituation sein, wie zum Beispiel die Neuheit eines wahrgenommenen Geräuschs oder die Bedeutung eines wahrgenommenen Geräuschs für den Organismus, welche diese „langen“ absteigenden cholinergen Verbindungen aktivieren. Nichtsdestotrotz wird eine verstärkte cholinerge Übertragung auf SBZ auch hier wieder die Erregbarkeit dieser Neurone ändern, da dieser Mechanismus sehr wahrscheinlich unabhängig vom Ursprung der cholinergen Axone ist. Das bedeutet, dass durch unterschiedliche Effektorneurone (entweder im Tegmentum oder im olivo-cochleären System) kortikale Neurone Einfluss darauf nehmen können, wie die Informationsverarbeitung im Innenohr und den frühen Stationen der Hörbahn abläuft, ebenso wie das proximale Eigenschaften des Schallstimulus durch Auslösen des olivo-cochleären Reflexes können. Bestimmte Verhaltenssituationen wie Exploration oder ein bestimmter sensorische Kontext der Schallstimuli, wie zum Beispiel bei der Angstkonditionierung, könnten also



potentiell die Informationsverarbeitung in den frühen Stationen der Hörbahn recht dramatisch verändern. Dies ist eine Funktionalität, die bisher als größtenteils auf den Kortex selber beschränkt angesehen wurde.

## Schlussfolgerung

Dieses Beispiel aus der Hörbahn macht deutlich, dass kein Teil des sensorischen Gehirns als „passiver“ Informationsempfänger arbeitet. Eher ist es so, dass alle Stationen der sensorischen Verarbeitung einander aktiv beeinflussen und den Informationsfluss in der aufsteigenden sensorischen Bahn in Abhängigkeit von internen und externen Bedingungen unter denen die Wahrnehmungsleistung geschieht dynamisch formen und modulieren. Es wird interessant sein, die Prinzipien der absteigenden und rückgekoppelten Kontrolle im auditorischen Hirnstamm mit anderen sensorischen Systemen, wie den olfaktorischen oder somatosensorischen Systemen zu vergleichen, in denen funktionell ähnliche absteigende Schaltkreise beschrieben wurden. Was sind die Gemeinsamkeiten bei den Kodierungsprinzipien und wie sehen die neuronalen Verrechnungen aus, welche die Evolution dieser prominenten absteigenden Verbindungen gefördert haben? Weiterhin könnten Vergleiche mit gut bekannten Rückkopplungsverbindungen im Gehirn, wie die kortiko-thalamische Projektion im Sehsystem, welche auf den ersten Blick den hier beschriebenen Hirnstammschaltkreisen nicht sehr ähnlich sind, dennoch lohnende vergleichende Einsichten über allgemeine Prinzipien der Informationsverarbeitung im sensorischen Gehirn vermitteln.

**Danksagung:** Wir danken Dr. David Goyer und Charlene Gillét für Diskussion und hilfreiche Kommentare zum Manuskript.

TK wird unterstützt von der Deutschen Forschungsgemeinschaft DFG SPP1608 „Ultrafast and temporally precise information processing: Normal and dysfunctional hearing“ (KU2529/2-2). HW wird unterstützt von der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Projekt Wa606/23-1.

## Literatur

Andeol, G., Guillaume, A., Michey, C., Savel, S., Pellieux, L. and Moulin, A. (2011). Auditory Efferents Facilitate Sound Localization in Noise in Humans. *J. Neurosci.* 31, 6759–6763.

- Baashar, A., Robertson, D. and Mulders, W.H.A.M. (2015). A novel method for selectively labelling olivocochlear collaterals in the rat. *Hear. Res.* 325, 35–41.
- Behrens, E.G., Schofield, B.R. and Thompson, A.M. (2002). Aminergic projections to cochlear nucleus via descending auditory pathways. *Brain Res.* 955, 34–44.
- Benson, T.E., Berglund, A.M. and Brown, M.C. (1996). Synaptic input to cochlear nucleus dendrites that receive medial olivocochlear synapses. *J. Comp. Neurol.* 365, 27–41.
- Benson, T.E. and Brown, M.C. (1990). Synapses formed by olivocochlear axon branches in the mouse cochlear nucleus. *J. Comp. Neurol.* 295, 52–70.
- Bledsoe, S.C., Koehler, S., Tucci, D.L., Zhou, J., Prell, C. Le. and Shore, S.E. (2009). Ventral cochlear nucleus responses to contralateral sound are mediated by commissural and olivocochlear pathways. *J. Neurophysiol.* 102, 886–900.
- Boothalingam, S., Macpherson, E.A., Allan, C., Allen, P. and Purcell, D. (2016). Localization-in-noise and binaural medial olivocochlear functioning in children and young adults. *J. Acoust. Soc. Am.* 139, 247–262.
- Briggs, F. and Usrey, W.M. (2011). Corticogeniculate feedback and visual processing in the primate. *J. Physiol.* 589, 33–40.
- Brown, M.C. (1993). Fiber pathways and branching patterns of biocytin-labeled olivocochlear neurons in the mouse brainstem. *J. Comp. Neurol.* 337, 600–613.
- Brown, M.C. (2011): Anatomy of Olivocochlear Neurons In: D. K. Ryugo, R. R. Fay and A. N. Popper, eds. *Auditory and Vestibular Efferents Springer Handbook of Auditory Research*. New York, NY: Springer, p. 17–37.
- Brown, M.C., Liberman, M.C., Benson, T.E. and Ryugo, D.K. (1988). Brainstem branches from olivocochlear axons in cats and rodents. *J. Comp. Neurol.* 278, 591–603.
- Brown, M.C., Mukerji, S., Drott, M., Windsor, A.M. and Lee, D.J. (2013). Identification of inputs to olivocochlear neurons using transneuronal labeling with pseudorabies virus (PRV). *JARO – J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 14, 703–717.
- Brown, M.C., Venecia, R.K. De, Guinan, J.J. (2003). Responses of medial olivocochlear neurons: Specifying the central pathways of the medial olivocochlear reflex. *Exp. Brain Res.* 153, 491–498.
- Campagnola, L. and Manis, P.B. (2014). A map of functional synaptic connectivity in the mouse anteroventral cochlear nucleus. *J. Neurosci.* 34, 2214–30.
- Cooper, N.P. and Guinan, J.J. (2003). Separate mechanical processes underlie fast and slow effects of medial olivocochlear efferent activity. *J. Physiol.* 548, 307–12.
- D’Souza, R.D. and Vijayaraghavan, S. (2014). Paying attention to smell: cholinergic signaling in the olfactory bulb. *Front. Synaptic Neurosci.* 6, 21.
- Darrow, K.N., Maison, S.F. and Liberman, M.C. (2006). Cochlear efferent feedback balances interaural sensitivity. *Nat. Neurosci.* 9, 1474–1476.
- Elgoyhen, A.B., Vetter, D.E., Katz, E., Rothlin, C. V., Heinemann, S.F. and Boulter, J. (2001). Alpha10: a Determinant of Nicotinic Cholinergic Receptor Function in Mammalian Vestibular and Cochlear Mechanosensory Hair Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 3501–3506.
- Elgoyhen, A.B. and Katz, E. (2012): The efferent medial olivocochlear-hair cell synapse. *J. Physiol. Paris* 106, 47–56.

- Engel, A.K., Fries, P. and Singer, W. (2001). Dynamic Predictions: Oscillations and Synchrony in Top-Down Processing. 2, 704–716.
- Felmy, F. and Künzel, T. (2014). Giant synapses in the central auditory system. *e-Neuroforum* 5, 53–59.
- Francis, N.A. and Guinan, J.J. (2010). Acoustic stimulation of human medial olivocochlear efferents reduces stimulus-frequency and click-evoked otoacoustic emission delays: Implications for cochlear filter bandwidths. *Hear. Res.* 267, 36–45.
- Fujino, K. and Oertel, D. (2001). Cholinergic modulation of stellate cells in the mammalian ventral cochlear nucleus. *J. Neurosci.* 21, 7372–7383.
- Gilbert, C.D. and Li, W. (2013). Top down influences on visual processing. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 350–363.
- Goldberg JM, Brown PB (1969) Response of binaural neurons of dog superior olivary complex to dichotic tonal stimuli: some physiological mechanisms of sound localization. *J. Neurophysiol.* 32:613–636
- Goyer, D., Kurth, S., Gillet, C., Keine, C., Rübsamen, R. and Kuenzel, T. (2016). Slow Cholinergic Modulation of Spike Probability in Ultra-Fast Time-Coding Sensory Neurons. *eNeuro* 3.
- Groff, J.A. and Liberman, M.C. (2003). Modulation of cochlear afferent response by the lateral olivocochlear system: activation via electrical stimulation of the inferior colliculus. *J. Neurophysiol.* 90, 3178–3200.
- Grothe, B. and Pecka, M. (2014). The natural history of sound localization in mammals – a story of neuronal inhibition. *Front. Neural Circuits* 8, 1–19.
- Grothe, B., Pecka, M. and McAlpine, D. (2010). Mechanisms of sound localization in mammals. *Physiol. Rev.* 90, 983–1012.
- Guinan, J.J. (2006). Olivocochlear efferents: anatomy, physiology, function, and the measurement of efferent effects in humans. *Ear Hear.* 27, 589–607.
- He, D.Z.Z., Jia, S. and Dallos, P. (2003). Prestin and the dynamic stiffness of cochlear outer hair cells. *J. Neurosci.* 23, 9089–96.
- Horváth, M., Kraus, K.S. and Illing, R.B. (2000): Olivocochlear neurons sending axon collaterals into the ventral cochlear nucleus of the rat. *J. Comp. Neurol.* 422, 95–105.
- Kawase, T., Delgutte, B. and Liberman, M.C. (1993). Antimasking effects of the olivocochlear reflex. II. Enhancement of auditory-nerve response to masked tones. *J. Neurophysiol.* 70, 2533–2549.
- Kawase, T. and Liberman, M.C. (1993). Antimasking effects of the olivocochlear reflex. I. Enhancement of compound action potentials to masked tones. *J. Neurophysiol.* 70, 2519–2532.
- Kirk, E.C. and Smith, D.W. (2003). Protection from Acoustic Trauma Is Not a Primary Function of the Medial Olivocochlear Efferent System. *JARO – J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 4, 445–465.
- Knudson, I.M., Shera, C.A. and Melcher, J.R. (2014). Increased Contralateral Suppression of Otoacoustic Emissions Indicates a Hyper-responsive Medial Olivocochlear System in Humans with Tinnitus and Hyperacusis. *J. Neurophysiol.* 112, 3107–3208.
- Liberman, M.C., Liberman, L.D. and Maison, S.F. (2014): Efferent Feedback Slows Cochlear Aging. *J. Neurosci.* 34, 4599–4607.
- Llorca-Torralba, M., Borges, G., Neto, F., Mico, J.A. and Berrocoso, E. (2016). Noradrenergic Locus Coeruleus pathways in pain modulation. *Neuroscience* 338, 93–113.
- Mellott, J.G., Motts, S.D. and Schofield, B.R. (2011). Multiple origins of cholinergic innervation of the cochlear nucleus. *Neuroscience* 180, 138–147.
- Mulders, W.H.A.M., Paolini, A.G., Needham, K. and Robertson, D. (2003). Olivocochlear collaterals evoke excitatory effects in onset neurones of the rat cochlear nucleus. *Hear. Res.* 176, 113–121.
- Mulders, W.H.A.M., Paolini, A.G., Needham, K. and Robertson, D. (2009). Synaptic responses in cochlear nucleus neurons evoked by activation of the olivocochlear system. *Hear. Res.* 256, 85–92.
- Mulders, W.H.A.M., Seluakumaran, K. and Robertson, D. (2008). Effects of centrifugal pathways on responses of cochlear nucleus neurons to signals in noise. *Eur. J. Neurosci.* 27, 702–714.
- Mulders, W.H.A.M., Winter, I.M. and Robertson, D. (2002). Dual action of olivocochlear collaterals in the guinea pig cochlear nucleus. *Hear. Res.* 174, 264–280.
- Oertel, D., Wright, S., Cao, X.-J., Ferragamo, M. and Bal, R. (2011). The multiple functions of T stellate/multipolar/chopper cells in the ventral cochlear nucleus. *Hear. Res.* 276, 61–69.
- Pollak, G.D., Burger, R.M. and Klug, A. (2003). Dissecting the circuitry of the auditory system. *Trends Neurosci.* 26, 33–39.
- Radtke-Schuller, S., Seeler, S. and Grothe, B. (2015). Restricted loss of olivocochlear but not vestibular efferent neurons in the senescent gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Front. Aging Neurosci.* 7, 1–12.
- Scharf, B., Magnan, J. and Chays, A. (1997). On the role of the olivocochlear bundle in hearing: 16 case studies. *Hear. Res.* 103, 101–122.
- Scharf, B., Magnan, J., Collet, L., Ulmer, E. and Chays, A. (1994). On the role of the olivocochlear bundle in hearing: a case study. *Hear. Res.* 75, 11–26.
- Schofield, B.R., Motts, S.D. and Mellott, J.G. (2011). Cholinergic cells of the pontomesencephalic tegmentum: Connections with auditory structures from cochlear nucleus to cortex. *Hear. Res.* 279, 85–95.
- Seluakumaran, K., Mulders, W.H.A.M. and Robertson, D. (2008). Unmasking effects of olivocochlear efferent activation on responses of inferior colliculus neurons. *Hear. Res.* 243, 35–46.
- Wersinger, E. and Fuchs, P.A. (2011). Modulation of hair cell efferents. *Hear. Res.* 279, 1–12.

## Autoreninformationen



**Thomas Künzel**  
Institut für Biologie 2, RWTH Aachen,  
Worringerweg 3, 52074 Aachen,  
E-Mail: [kuenzel@bio2.rwth-aachen.de](mailto:kuenzel@bio2.rwth-aachen.de)

Thomas Künzel studierte Biologie an der Ruhr-Universität Bochum. Er erlangte seinen Doktorgrad an der RWTH Aachen mit einer Dissertation über die Entwicklung von auditorischen Hirnstammneuronen unter der Betreuung von Prof. Harald Luksch. Anschließend nahm er kurz eine Stelle als wissenschaftlicher Assistent an der RWTH Aachen an, ehe er seine Ausbildung als Postdoc am Erasmus Medical Center in Rotterdam bei Prof. Marcel van der Heijden und Prof. Gerard Borst fortsetzte. Im Jahr 2011 kehrte er an die RWTH Aachen zurück als Assistent von Prof. Hermann Wagner und leitet eine unabhängige Arbeitsgruppe, welche seit 2012 DFG finanziert ist (DFG PP1608 "Ultrafast and temporally precise information processing: Normal and dysfunctional hearing"). Sein Forschungsschwerpunkt liegt auf der Entwicklung und der zellulären Physiologie von phasenkodierenden Neuronen in auditorischen Hirnstammschaltkreisen von Vögeln und Säugetieren.



**Hermann Wagner**  
Institut für Biologie 2, RWTH Aachen,  
Worringerweg 3, 52074 Aachen

Hermann Wagner studierte Biologie in Ulm, Erlangen und Tübingen. Nach seiner Diplom- und Doktorarbeit unter der Betreuung von Werner Reichardt am Max-Planck-Institut für Biologische Kybernetik war er Postdoc bei Mark Konishi am California Institute of Technology, Pasadena, USA. Er kehrte ans Max-Planck-Institut zurück, um bei Kuno Kirschfeld zu arbeiten, erhielt ein Heisenbergstipendium, um bei Geoff Manley an der TU München zu forschen, bevor er auf den Lehrstuhl für Zoologie/Tierphysiologie der RWTH Aachen wechselte. Er interessiert sich für die Mechanismen, welche Orientierungsleistungen bei Tieren ermöglichen auf verschiedenen Ebenen der Analyse – von der Ökologie über die Neuroethologie zu Systemphysiologie und Kognition.

Thomas Künzel\* and Hermann Wagner

# Cholinergic top-down influences on the auditory brainstem

DOI 10.1515/nf-2016-A107

**Abstract:** Descending connections are present in many sensory systems and support adaptive information processing. This allows the sensory brain to code a wider range of inputs. A well characterized descending system is the olivo-cochlear cholinergic innervation of the inner ear, which mediates a reduction of the sensitivity of the inner ear upon perception of intense sounds. Because this inhibits the response to background noise, the olivo-cochlear system supports detection of transient sound events. Olivo-cochlear neurons also innervate the cochlear nucleus through axon collaterals. Here, acetylcholine increases the excitability of central neurons without reducing their temporal precision. Thus their target neurons in the superior olivary complex can more effectively process binaural temporal cues. We argue that the central effect of the olivo-cochlear system augments the peripheral effect. In addition, olivo-cochlear cholinergic neurons are under top-down control of cortical inputs, providing further adaptability of information processing on the level of the auditory brainstem.

**Keywords:** auditory brainstem; sound localization; cochlear nucleus; modulation; acetylcholine

Imagine you return to a cocktail party after a quiet walk outside. Suddenly you are in a room filled with loud music and many talking people and are engulfed in intense noisiness coming from many directions. The sound level is much higher now and relevant information can be overpowered (“masked”) by the various noise sources in the room. Identification and localization of individual speakers is still possible, although more difficult than in a quiet room. What are the mechanisms in the brain that allow you to do this?

Sensory pathways are often mistakenly seen as purely ascending streams of information, where a given neuron feeds information only “upwards” to stations of increasing complexity in a higher hierarchical level. In a well-known example, time-coding neurons in the cochlear nucleus are contacted by giant synaptic terminals of the auditory nerve (Felmy and Künzel, 2014) and pass information about the timing of the perceived sound up along the auditory pathway into binaural nuclei with more complex functions. These neurons are clearly dominated by information flow from hierarchically lower to higher stations, as the ascending synaptic connection from the auditory nerve onto the time-coding neuron is very powerful. Although it is well established that the auditory periphery and the first stages of the auditory pathway indeed show activity dependent dynamics, these adaptive phenomena can only rely on the limited information that is available at the given neuron. In this scheme, however, the background noise from the cocktail party could easily drown the important information, since one can expect it to activate the ascending stream of auditory information as intense as the relevant auditory event. However, recurrent connections within hierarchical levels and descending connections towards neurons in lower hierarchical orders that provide dynamic and adaptive changes to the sensory systems are common in all sensory modalities (Engel et al., 2001; Briggs and Usrey, 2011; Gilbert and Li, 2013; D’Souza and Vijayaraghavan, 2014; Llorca-Torralba et al., 2016), including the auditory brainstem. One especially well characterized top-down connection in a sensory pathway is the olivo-cochlear projection in the lower auditory brainstem, which mediates the so-called olivo-cochlear reflex (Guinan, 2006). This neuronal system is driven by auditory inputs and provides cholinergic innervation back to the inner ear and also to central neurons in the lower auditory pathway, like the time-coding neurons in the cochlear nucleus that we mentioned earlier. So while bottom-up computations definitely play a large role in time-coding neurons, descending projections become more important for optimal encoding of information as it exists, for example, in adaptive processing. In this article, we shall first briefly review the anatomy and physiology of the peripheral olivo-cochlear pathway, discuss its function in hearing and then move on to discuss recent find-

\*Corresponding author: Thomas Künzel, Institute for Biology 2, RWTH Aachen University, Worringerweg 3, 52074 Aachen, Germany, E-Mail: kuenzel@bio2.rwth-aachen.de

Hermann Wagner, Institute for Biology 2, RWTH Aachen University, Worringerweg 3, 52074 Aachen, Germany



ings about the central effects of the olivo-cochlear innervation on neurons in the cochlear nucleus. We shall use this circuit as a study case for the general problem of the interaction of feedforward and feedback connections. We will also work out that the function of centrally connected collaterals of the olivo-cochlear innervation complement the effects it has on the inner ear. This may in fact provide additional avenues for complex top-down influences on adaptive information processing in the auditory pathway.

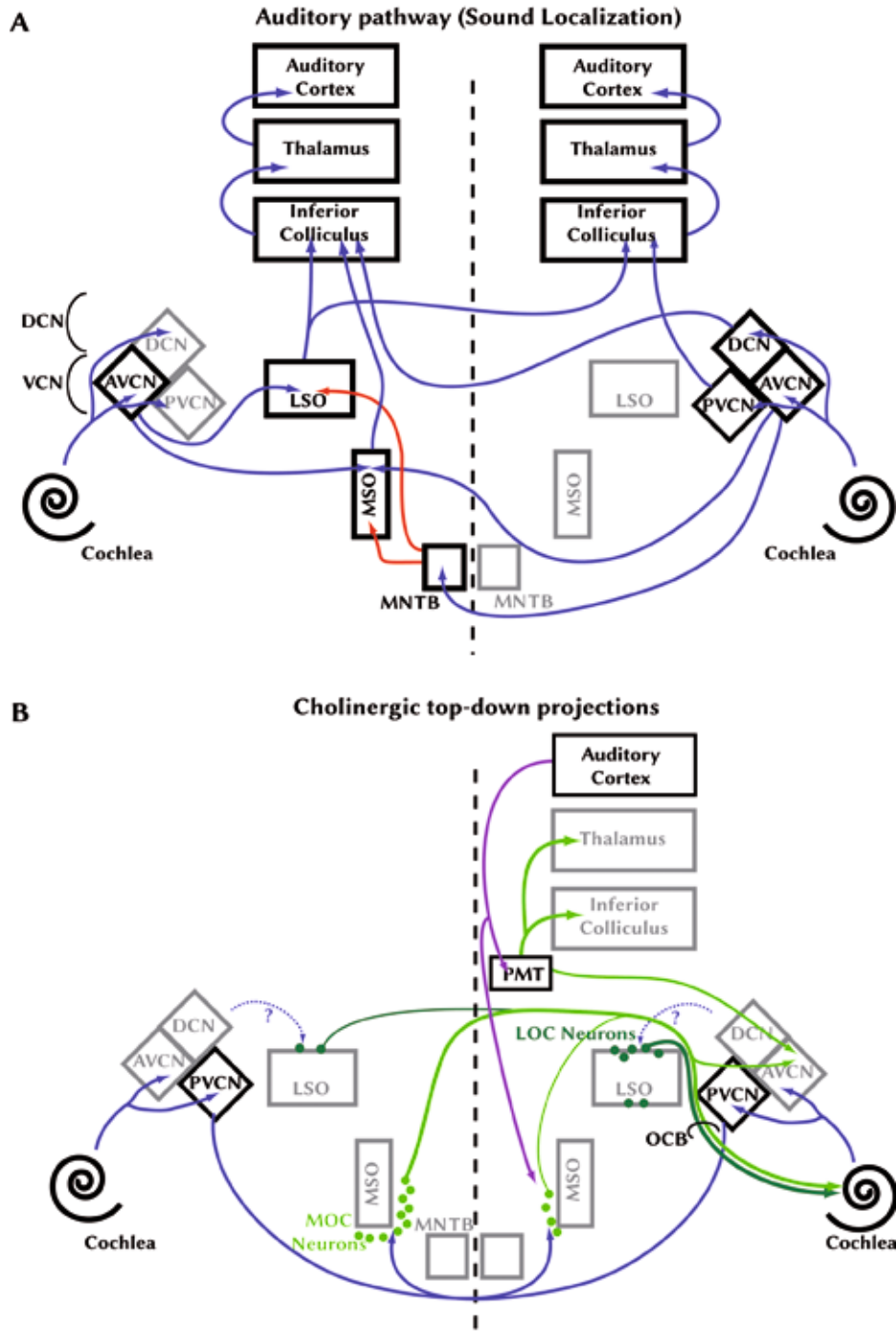
## Anatomy and physiology of the olivo-cochlear system

Auditory information reaches the brain via the auditory nerve that innervates the three subdivisions of the cochlear nucleus. From there, auditory information is conveyed to the superior olivary complex and other brain nuclei (Fig. 1A). The olivo-cochlear innervation (Fig. 1B) of the inner ear, the so called olivo-cochlear bundle (OCB), is formed by the projecting axons of two major bilateral neuron groups, the medial (MOC) and the lateral (LOC) olivo-cochlear neurons (Brown, 2011). Both neuron groups are situated in close vicinity to the superior olivary complex. The MOC neurons are found close to the medial superior olive, mostly in the ventral nucleus of the trapezoid body, while the LOC neurons are found inside of and surrounding the lateral superior olive (Radtke-Schuller et al., 2015). Axons from both the contralateral and the ipsilateral MOC and LOC innervate the inner ear (Brown, 1993). Axons from MOC neurons are thick and heavily myelinated, indicating rapid action potential conduction. In contrast, axons of LOC neurons are thin and non-myelinated, which indicates a slow function that is not time-critical. MOC axons form cholinergic contacts with the basal parts of outer hair cells (Wersinger and Fuchs, 2011; Elgoyhen and Katz, 2012). In contrast, LOC axons contact auditory nerve endings close to inner hair cells and together with acetylcholine as a neurotransmitter they use a variety of co-transmitters (Guinan, 2006).

The innervation of the LOC neurons is not well understood. It is assumed that LOC neurons are driven by sound and receive inputs from the ipsilateral posteroventral cochlear nucleus (PVCN). Axons of LOC neurons then almost exclusively innervate the ipsilateral cochlea. Thus the majority of LOC fibers are uncrossed. However, it remains unclear what the exact effect of the innervation of auditory nerve endings by the LOC axons is. Generally, LOC activity seems to modulate the excitability of auditory nerve fibers mostly in such a way that increased LOC ac-

tivity inhibits auditory nerve activity (Groff and Liberman, 2003; Darrow et al., 2006).

In contrast to the LOC system, more is known about MOC anatomy and physiology (Brown et al., 2003). Individual MOC neurons respond to narrow-band sound. They are innervated by neurons in the contralateral PVCN. Most MOC axons cross the midline below the floor of the fourth ventricle and enter the inner ear through the vestibular part of the eighth nerve (Brown, 1993). These axons form the double-crossed pathway for the ipsilateral olivo-cochlear reflex, where sound in the right cochlear nucleus excites MOC neurons in the left brain hemisphere which, in turn, innervate the right inner ear again. However, a certain proportion of MOC axons do not cross the midline. Instead, these axons join the ipsilateral OCB, forming a second pathway, where sound in the right ear excites MOC neurons in the left hemisphere, which then innervate the left inner ear. This contralateral reflex pathway is of special interest, because through the olivo-cochlear innervation sound in one ear may influence the way sounds in the opposing ear are processed. From a mechanistic point of view, it would be interesting to separate ipsi- and contralateral contributions to the olivo-cochlear reflex. This is possible experimentally by decoupling the input to the two ears: When playing broadband noise to one ear, the sensitivity of the other ear is reduced. This is called contralateral suppression and presumably mediated by the olivo-cochlear system (Knudson et al., 2014). The exact proportion of ipsi- vs. contralateral olivo-cochlear innervation is variable and depends on the species and tonotopic position on the cochlea. In general it is assumed, that the ipsilateral component is 2–3 times stronger than the contralateral component (Guinan, 2006). However, in humans the proportion of crossed vs. uncrossed MOC axons seems to be roughly equal. This also holds true for the low frequency parts of the auditory system of animals (Guinan, 2006; Brown, 2011). Both contra- and ipsilateral MOC axons provide feedback to outer hair cells (OHC) with cholinergic synapses. This synaptic contact is well studied (Elgoyhen and Katz, 2012). Acetylcholine, upon release from the MOC axon, binds to pharmacologically unique cholinergic receptors on the postsynaptic site. These receptors contain  $\alpha$ -9 and  $\alpha$ -10 nicotinic acetylcholine-receptor subunits, which show a high calcium conductivity (Elgoyhen et al., 2001). The fast effect of the acetylcholine-induced calcium influx is hyperpolarization of the OHC membrane potential mediated by calcium-activated potassium channels (Elgoyhen and Katz, 2012). This hyperpolarization yields effective inhibition of the OHC function by directly influencing the membrane-potential dependent motility of the OHC. Furthermore, on longer



**Fig. 1:** Neuroanatomy of ascending and descending projections in the auditory brainstem. **A** Simplified depiction of the ascending auditory projections with emphasis on structures involved in sound localization. Idealized coronal section of the brain is shown, dashed line depicts midline to show crossed vs. uncrossed projections. Blue arrows indicate predominantly excitatory connections, red arrows indicate inhibitory connections. Please note that some connections and nuclei were left out for clarity, for greater detail see reviews Pollak et al., 2003; Grothe et al., 2010; Grothe and Pecka, 2014. **B** Overview of the cholinergic descending projections in the auditory brainstem. Green arrows indicate cholinergic connections (dark green used to distinguish LOC from MOC axons/neurons). Purple arrows indicate descending cortical connections onto cholinergic neurons. Inputs to LOC neurons are not well known (dashed blue arrow with question marks). Adapted from: Guinan, 2006; Schofield et al., 2011. Abbreviations: AVCN anteroventral cochlear nucleus, DCN dorsal cochlear nucleus, LOC lateral olivo-cochlear, LSO lateral superior olive, MNTB medial nucleus of the trapezoid body, MOC medial olivo-cochlear, MSO medial superior olive, OCB olivo-cochlear bundle, PMT Nuclei of the ponto-mesencephalic tegmentum, PVCN posteroventral cochlear nucleus, VCN ventral cochlear nucleus.

time-scales the cholinergic calcium influx also influences the stiffness of the OHC by acting on cytoskeleton and prestin proteins, again impacting the motility of the OHC (Cooper and Guinan, 2003; He et al., 2003). Accordingly, the olivo-cochlear reflex can be physiologically separated into a component having a fast effect and into a component having a slow effect. These two components may be attributed to the two molecular effects described above.

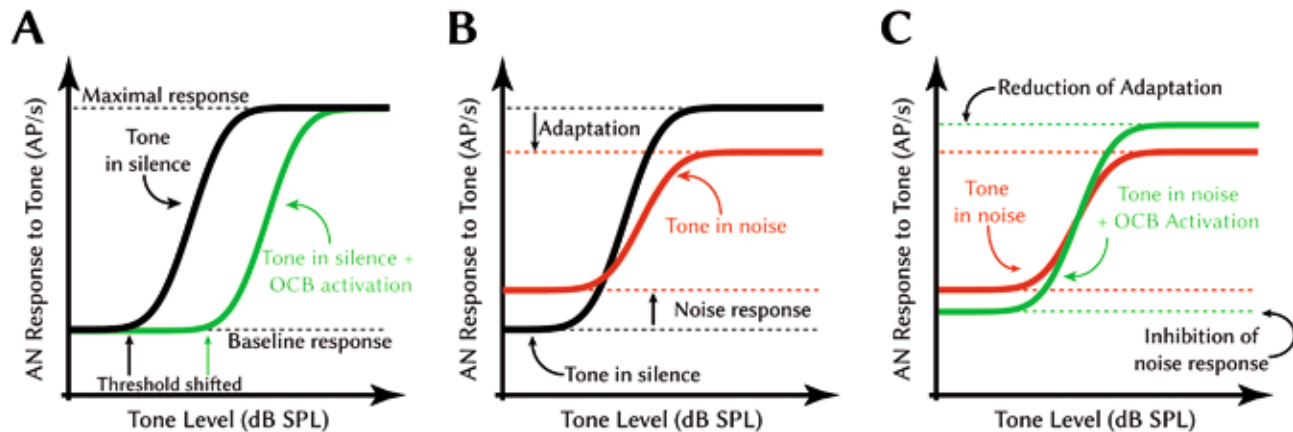
## Olivo-cochlear activation improves hearing in noise

What is the effect of MOC feedback on hearing? By acting on the OHC motility the MOC effect reduces the gain of the cochlear amplification, which reduces the response of the cochlea to a given sound level (Wersinger and Fuchs, 2011). This manifests as an upward shift of the response curve of auditory nerve fibers to sound levels (Fig. 2A). Thus, activation of the olivo-cochlear reflex per se makes the inner ear less sensitive to sounds (Cooper and Guinan, 2003; Francis and Guinan, 2010). This has two possible functions: 1) the olivo-cochlear reflex may serve to protect the inner ear from loud sounds. 2) the response to sounds in background noise is improved. The first effect is very intuitive. There is indeed evidence that animals with experimentally impaired olivo-cochlear reflex suffer more from noise-induced trauma and show premature auditory aging (Guinan, 2006; Liberman et al., 2014). In other words, the olivo-cochlear reflex augments other otoprotective reflexes like the middle-ear reflex, which actively reduces transmission of sound by the middle-ear through stiffening of the ossicular chain, upon intense sounds. However there is some debate whether this is really the main function of the elaborate olivo-cochlear system (Kirk and Smith, 2003), especially since the olivo-cochlear reflex is already activated by sound intensities way below traumatic levels. Hence it must have at least one or more additional functions.

The second function of the olivo-cochlear reflex is concerned with the response of the inner ear to constant broadband stimulation, which often occurs in real life as background noise (e. g. rushing water or wind in the trees). The changes that occur in the inner ear due to the background noise can be analyzed by measuring the responses to defined stimuli like tones with and without noise. One finds that broadband noise causes reduction or compression of the dynamic response range of auditory nerve fibers to tones. This is due to the increase of the baseline response by background that constantly excites all auditory nerve fibers. At the same time, the maximal response rate to the

test stimulus is diminished due to adaptation caused by the constantly high excitation of the hairs cells of the inner ear (Fig. 2B). However, broadband noise of moderate levels already effectively activates the olivo-cochlear reflex. The response to transient sounds, especially tones, that occur among the constant background noise is then improved by the inhibitory function of the olivo-cochlear reflex (Kawase et al., 1993). How is that possible? By inhibiting the constant response to the broadband noise, both the increased baseline response and consecutively also the adaptation is reduced. The olivo-cochlear reflex, thus, allows a stronger response to the test tone hidden in the noise, a phenomenon called “unmasking”. The unmasking of tones is not perfect however: the response to the tone in noise, despite the augmentation by the olivo-cochlear reflex, has lower sensitivity and a smaller dynamic range compared to the response to tone in silence (Fig. 2C). Nevertheless, in this interpretation, the action of olivo-cochlear reflex appears capable to critically improve the response to transient narrow-band sounds in noise, which is a very common and highly relevant listening task. Think about human speech or animal vocalizations, both of which are characterized by brief periods of specific tone-like sounds (“formants”) that must be reliably detected despite strong broadband background noise like wind roaring in the leaves of a tree.

Furthermore, olivo-cochlear activation not only influences detection of tones but also improves the localization of sounds in noise in animals (May et al., 2004) and humans (Andeol et al., 2011; Boothalingam et al., 2016). Sound localization is mostly a computational task of the brain where binaural information must be compared and analyzed. So far it is not fully understood how the peripheral olivo-cochlear reflex could help with this. Below we will show results from our own experiments that may explain how an improvement of tone-detection might be possible on a neuronal level. Furthermore, it was proposed, that the LOC system may balance overall neuronal excitation levels between the two ears, which is needed for sound localization with interaural intensity differences (Darrow et al., 2006; but see: Larsen and Liberman, 2010). Interestingly, in human subjects with transection of the peripheral part of the olivocochlear bundle (Scharf et al., 1994, 1997), hearing was essentially normal. Also, correlations between MOC activation strength, which is usually measured only in the periphery using otoacoustic emissions, and success in complex listening tasks are not always strong (Boothalingam et al., 2016). One possible interpretation for these findings that we would like to stress in this article is that the peripheral part of the olivo-cochlear system is less decisive for complex hearing tasks and a central portion of the olivo-cochlear system begins to play



**Fig. 2:** Effect of the olivo-cochlear reflex on auditory nerve response to tones. **A** Schematic depiction of the threshold shift caused by OCB activation. Black line: rate-level function of auditory nerve responses to ipsilaterally presented tones in silence. Green line: rate-level function of auditory nerve responses to ipsilaterally presented tones with contralaterally presented noise. The contralaterally presented noise activates the olivo-cochlear reflex via MOC axons. **B** Schematic depiction of the effect of background noise on the tone response. Black line: as in A. Red line: rate-level function of auditory nerve responses to ipsilaterally presented tones hidden in ipsilaterally presented noise. Due to the response to the constant noise stimulus, the baseline response is higher. Due to adaptation effects caused by the constant response to the noise, the maximal response is smaller. **C** Schematic depiction of the effect of OCB activation on the response to tones in noise. Red line: as in B. Green line: rate-level function of auditory nerve responses to ipsilaterally presented tones hidden in ipsilaterally presented noise with contralaterally presented noise. The olivo-cochlear activation inhibits the constant response to the ipsilaterally presented noise and thus releases the auditory nerve fibers from their adapted state. Adapted from: Kawase et al., 1993; Guinan, 2006. Please note that effects are exaggerated in this figure for clarity. Abbreviations: AN auditory nerve, AP action potential, SPL sound pressure level.

a larger role. In the following, we shall therefore review what is known about the innervation of central neurons by the olivo-cochlear axons, especially recent findings on the effects of acetylcholine on time-coding neurons.

## Central effects of olivo-cochlear activation

The efficacy of MOC activation in unmasking the response to a tone in noise has been shown not only on the level of the auditory nerve (Kawase and Liberman, 1993; Kawase et al., 1993) but also in central stations of the auditory pathway, like the cochlear nucleus (Mulders et al., 2008) and the inferior colliculus (Selvakumaran et al., 2008). However, physiological analysis of the olivo-cochlear reflex in central neurons points towards a dual effect of the olivo-cochlear activation, one indirectly via the peripheral projection and a second more direct central effect (Mulders et al., 2002). In accordance with this it was shown in numerous studies for several species that olivo-cochlear axons form collaterals that enter the cochlear nucleus (Brown et al., 1988; Benson and Brown, 1990; Horváth et al., 2000; Brown, 2011; Baashar et al., 2015) and innervate primary neurons in the cochlear nucleus (Benson et al.,

1996). There olivo-cochlear activity induced by presenting noise stimuli to the contralateral ear excited ventral cochlear nucleus neurons (VCN) (Mulders et al., 2003, 2009). Other, non olivo-cochlear, commissural connections also exist and cause rapid or onset type contralateral excitation (Bledsoe et al., 2009), but are not discussed further here. We hypothesize that the contralaterally induced olivo-cochlear responses in the VCN discussed above are indicative of a general theme: whenever the inner ear on one side receives olivo-cochlear inhibition (be it ipsi-, contra- or, in most cases, bilaterally induced) axon collaterals of the OCB deliver excitation to the VCN. This is backed by anatomical studies, stating that a large proportion of cholinergic axons entering the VCN comes from MOC/LOC neurons in the superior olivary complex, with about 44 % originating in the ipsilateral SOC (Mellott et al., 2011).

What are the target neurons of this excitatory collateral connection of the OCB in the VCN? In-vivo physiological studies indicated onset neurons (Mulders et al., 2003) or almost all neuron types (Mulders et al., 2008) as potential targets of the olivo-cochlear reflex. Given the complex nature of recurrent connections within the VCN (Campagnola and Manis, 2014), it is hard to decipher how the olivo-cochlear reflex is effecting the function of the VCN in hearing tasks like sound localization, from these



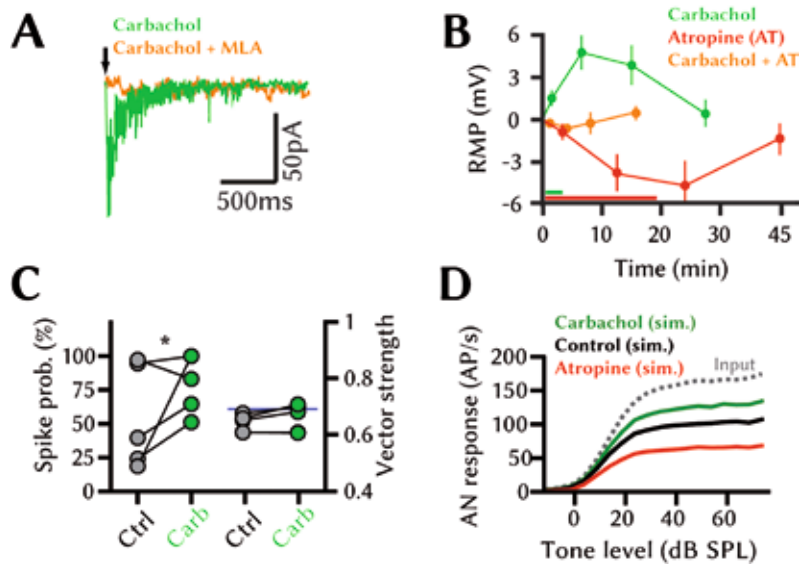
results alone. However, *in vitro* experiments showed that T-stellate neurons in the VCN (Oertel et al., 2011) clearly respond to acetylcholine (Fujino and Oertel, 2001), the neurotransmitter of the OCB. These neurons are excited by acetylcholine through nicotinic and muscarinic cholinergic receptors. T-stellate cells project locally and remotely to diverse targets in the auditory pathway, among others the VCN itself, the dorsal cochlear nucleus, periolivary regions in the superior olivary complex, the nuclei of the lateral lemniscus and ultimately the inferior colliculus (Oertel et al., 2011). Due to the nature of the responses of T-stellate cells to sounds one can derive that they provide information about the level and the envelope modulation of stimulus and thus, as a population, they are able to encode the frequency content of the perceived signal. Interestingly, T-stellate cells provide excitatory inputs to contralateral MOC neurons, forming another positive feedback loop (Oertel et al., 2011). It was hypothesized that the extra excitation provided by the cholinergic collaterals extends the dynamic range of response of the T-stellate cells. However, due to the diffuse nature of the functions and projections of T-stellate cells it is still hard to understand what the exact role of the cholinergic input is. To address this, a recent study analyzed the cholinergic innervation of another type of VCN neurons, the time-coding spherical bushy cells (Goyer et al., 2016).

## Cholinergic modulation of time-coding neurons

Spherical bushy cells (and the similar globular bushy cells) are contacted by the auditory nerve with giant somatic terminals, the so called endbulbs of Held (Felmy and Künzel, 2014). Through these powerful synaptic connections and their specialized physiology, these neurons retain the exquisite temporal precision of the action potentials in the auditory nerve or even improve this temporal code with the help of convergent excitatory inputs and inhibition. By exactly locking the times of action potential firing to a certain phase of the perceived sound, the spherical bushy cell encode the relative temporal alignment of the stimulus, which makes sound localization with interaural time differences possible. Action potentials of spherical bushy cells indeed encode the phase of sounds with microsecond precision. The temporal cues are exploited in the medial superior olivary nucleus (Goldberg and Brown, 1969; Grothe et al., 2010), a direct bilateral target of spherical bushy cells. Here, the precision with which the spherical bushy cells can encode the relative timing of the stimulus

is translated into how precise the source of a sound can be localized in the horizontal plane.

The computational properties of spherical bushy cells are straightforward. Therefore, these cells are especially well suited to study top-down influences on the auditory brainstem. In a recent study (Goyer et al., 2016) it was thus analyzed how spherical bushy cells respond to acetylcholine. In an *in-vitro* approach in acute brain slices the authors locally applied carbachol, a cholinergic agonist, to spherical bushy cells while recording in whole-cell configuration (Fig. 3). This experiment also allowed simultaneous stimulation of auditory nerve inputs to the spherical bushy cells. It was found that spherical bushy cells are depolarized through  $\alpha$ -7 nicotinic acetylcholine receptors on a time-scale that is congruent with the fast component of the olivo-cochlear reflex, i. e. a few hundred milliseconds (Fig. 3A). However, on top of that the study also found that the resting membrane potential of spherical bushy cells is depolarized by carbachol in a time course of minutes (Fig. 3B). The study demonstrated that muscarinic acetylcholine receptors are responsible for this. Since blocking muscarinic receptors slowly hyperpolarized the resting membrane potential (Fig. 3B), it was concluded that a certain constant level of muscarinic activation is involved in setting the actual resting membrane potential of the spherical bushy cell. The authors went on to test the effects of the cholinergic modulation on synaptic transmission and found that under the effect of acetylcholine more action potentials are caused by the same activity of auditory nerve fibers (Fig. 3C). In *in-vivo* experiments iontophoretic application of carbachol increased the spontaneous firing rate of spherical bushy cells. Remarkably, further *in-vitro* experiments showed no reduction of the temporal precision in which spherical bushy cells encode the phase of the stimulus, when the excitability is increased by acetylcholine (Fig. 3C). This means that through the increased excitability caused by acetylcholine a higher amount of well-timed action potentials are produced by spherical bushy cells. This likely improves sound localization with temporal cues in the following stages of the auditory pathway. In a computer model of spherical bushy cells, the inner ear and the auditory nerve cholinergic modulation of the spherical bushy cells excitability expanded the dynamic response range of the model neurons and increased the responses to faint sounds, without decreasing the temporal precision of the response (Fig. 3D). This was exactly in line with the hypothesis outlined above: the central effect of the olivo-cochlear reflex augments the peripheral olivo-cochlear effect insofar that it further expands the dynamic response range for tones in noise, which was compressed by the constant background



**Fig. 3:** Effect of cholinergic modulation on time-coding central neurons. **A** Nicotinic transient inward currents recorded from gerbil spherical bushy cell (SBC) in whole-cell voltage clamp ( $-65\text{mV}$  holding potential) upon brief pressure application (arrow) of carbachol (a stable analogon of acetylcholine) are blocked by the specific  $\alpha$ -7 nicotinic antagonist methyllycaconitine. Green trace: carbachol induced inward current. Orange trace: current measured upon carbachol application in the presence of methyllycaconitine. **B** SBC resting membrane potential (RMP) is modulated by muscarinic receptors over minutes. Green data points: changes of RMP measured after repeated pressure application (green bar) of carbachol. Red data points: RMP measured after wash-in (red bar) of the muscarinic antagonist atropine. Orange data points: RMP measured after repeated pressure application of carbachol in the presence of atropine. Error bars depict standard error of the mean for y-axis. **C** Cholinergic modulation increases spike-probability in vitro but does not decrease temporal precision. Ctrl = control condition, Carb = carbachol application. Blue line denotes input vector strength, a metric for temporal precision of action potentials in relation to the phase of the sound stimulus. Asterisk:  $p < 0.05$ , paired t-test. **D** Simulated rate-level functions of SBC, spontaneous rate/baseline rate subtracted. Gray dashed line: simulated auditory nerve input rate. Black line: simulated SBC response, control condition. Green line: simulated SBC response, carbachol condition (RMP depolarized). Red line: simulated SBC response, atropine condition (RMP hyperpolarized). All data in this figure replotted and adapted from Goyer et al., 2016.

noise (cf. Fig. 2B, C). Taken together, these recent results (Goyer et al., 2016) allow the conclusion that the central part of the olivo-cochlear reflex causes a compensatory increase in excitability in time-coding neurons to counteract the peripheral reduction in sensitivity. It can be concluded that this feedback system stabilizes the quantity of well-timed action-potentials delivered by the spherical bushy cells to higher-order nuclei over a wider range of hearing conditions.

## Cholinergic top-down influence of the cortex on the auditory brainstem

In addition to what was discussed so far there are further levels of complexity in the anatomy of the cholinergic innervation of the cochlear nucleus: first, the neurons of the olivo-cochlear system in the superior olivary complex not

only receive the direct auditory inputs from interneurons in the cochlear nucleus, they are also under top-down control from higher brain areas. It was shown that descending projections from the inferior colliculus (Brown et al., 2013), the auditory cortex (Schofield et al., 2011) and even non-auditory brain areas (Brown et al., 2013) reach all the way down to the olivo-cochlear neurons in the superior olivary complex. Furthermore, there is a whole class of cholinergic neurons in a midbrain area called the ponto-mesencephalic tegmentum that is under cortical control and projects widely into every station of the auditory pathway, including the cochlear nucleus (Behrens et al., 2002; Schofield et al., 2011; Mellott et al., 2011). The latter comprise about 25 % of all cholinergic axons in the cochlear nucleus of rodents. Although strictly speaking many of these circuits still provide a form of sound driven cholinergic feedback, it is fair to assume that it is not as closely stimulus-driven as the more direct local cholinergic feedback generated by the olivo-cochlear loop in the auditory brainstem. Rather, more advanced features of the perceived sound or listening situation, like the novelty of the

perceived sound or the “meaning” of the perceived sound for the organism is thought to drive these long cholinergic top-down projections. Again, an increase in cholinergic transmission onto spherical bushy cells would change the excitability of these neurons, likely regardless of the origin of the cholinergic axons. That means that through different effector neurons (either in the tegmentum or the olivo-cochlear system) cortical neurons can strongly influence how neuronal information processing occurs in the inner ear and early stages of the auditory pathway, as can proximal properties of the sound that trigger the olivo-cochlear reflex. Specific behavioral situations like exploration or specific sensory contexts of sound stimuli like in fear conditioning thus potentially can change information processing in the very early stages of the auditory pathway in a quite dramatic way. This is a function classically seen as reserved to occur in the cortex itself.

## Conclusion

Up to now we can only speculate on the exact causes and effects of cholinergic top-down control on the auditory brainstem nuclei and why it is useful, from an information processing point of view, to alter the flow of information already so close to the sensory periphery. Nevertheless, this example from the auditory pathway makes it clear that no part of the sensory brain “passively” receives information. Rather, all stages of sensory processing actively influence each other and dynamically modulate the ascending flow of information in the sensory pathway depending on external and internal conditions, under which the sensory perception occurs. It will be interesting to compare the principles of top-down and feedback control in the auditory brainstem with other sensory systems, where functionally similar descending projections have been described, for example in the olfactory and somatosensory systems. What are the common coding principles and computational demands that supported the evolution of these prominent descending pathways? Furthermore, well known feedback connections like the cortico-geniculate projection in the visual system, which at first glance may appear quite dissimilar to the brainstem circuits described here, could also provide worthwhile comparative insights into generalized information processing principles in the sensory brain.

**Acknowledgments:** We thank Dr. David Goyer and Charlene Gillét for discussion and helpful comments on the manuscript.

## References

- Andeol, G., Guillaume, A., Michey, C., Savel, S., Pellieux, L. and Moulin, A. (2011). Auditory Efferents Facilitate Sound Localization in Noise in Humans. *J. Neurosci.* 31, 6759–6763.
- Baashar, A., Robertson, D. and Mulders, W.H.A.M. (2015). A novel method for selectively labelling olivocochlear collaterals in the rat. *Hear. Res.* 325, 35–41.
- Behrens, E.G., Schofield, B.R. and Thompson, A.M. (2002). Aminergic projections to cochlear nucleus via descending auditory pathways. *Brain Res.* 955, 34–44.
- Benson, T.E., Berglund, A.M. and Brown, M.C. (1996). Synaptic input to cochlear nucleus dendrites that receive medial olivocochlear synapses. *J. Comp. Neurol.* 365, 27–41.
- Benson, T.E. and Brown, M.C. (1990). Synapses formed by olivocochlear axon branches in the mouse cochlear nucleus. *J. Comp. Neurol.* 295, 52–70.
- Bledsoe, S.C., Koehler, S., Tucci, D.L., Zhou, J., Prell, C. Le. and Shore, S.E. (2009). Ventral cochlear nucleus responses to contralateral sound are mediated by commissural and olivocochlear pathways. *J. Neurophysiol.* 102, 886–900.
- Boothalingam, S., Macpherson, E.A., Allan, C., Allen, P. and Purcell, D. (2016). Localization-in-noise and binaural medial olivocochlear functioning in children and young adults. *J. Acoust. Soc. Am.* 139, 247–262.
- Briggs, F. and Usrey, W.M. (2011). Corticogeniculate feedback and visual processing in the primate. *J. Physiol.* 589, 33–40.
- Brown, M.C. (1993). Fiber pathways and branching patterns of biocytin-labeled olivocochlear neurons in the mouse brainstem. *J. Comp. Neurol.* 337, 600–613.
- Brown, M.C. (2011): *Anatomy of Olivocochlear Neurons* In: D. K. Ryugo, R. R. Fay and A. N. Popper, eds. *Auditory and Vestibular Efferents Springer Handbook of Auditory Research*. New York, NY: Springer, p. 17–37.
- Brown, M.C., Liberman, M.C., Benson, T.E. and Ryugo, D.K. (1988). Brainstem branches from olivocochlear axons in cats and rodents. *J. Comp. Neurol.* 278, 591–603.
- Brown, M.C., Mukerji, S., Drott, M., Windsor, A.M. and Lee, D.J. (2013). Identification of inputs to olivocochlear neurons using transneuronal labeling with pseudorabies virus (PRV). *JARO – J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 14, 703–717.
- Brown, M.C., Venecia, R.K. De, Guinan, J.J. (2003). Responses of medial olivocochlear neurons: Specifying the central pathways of the medial olivocochlear reflex. *Exp. Brain Res.* 153, 491–498.
- Campagnola, L. and Manis, P.B. (2014). A map of functional synaptic connectivity in the mouse anteroventral cochlear nucleus. *J. Neurosci.* 34, 2214–30.
- Cooper, N.P. and Guinan, J.J. (2003). Separate mechanical processes underlie fast and slow effects of medial olivocochlear efferent activity. *J. Physiol.* 548, 307–12.
- D’Souza, R.D. and Vijayaraghavan, S. (2014). Paying attention to smell: cholinergic signaling in the olfactory bulb. *Front. Synaptic Neurosci.* 6, 21.
- Darrow, K.N., Maison, S.F. and Liberman, M.C. (2006). Cochlear efferent feedback balances interaural sensitivity. *Nat. Neurosci.* 9, 1474–1476.
- Elgoyhen, A.B., Vetter, D.E., Katz, E., Rothlin, C. V., Heinemann, S.F. and Boulter, J. (2001). Alpha10: a Determinant of Nicotinic

- Cholinergic Receptor Function in Mammalian Vestibular and Cochlear Mechanosensory Hair Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 3501–3506.
- Elgoyhen, A.B. and Katz, E. (2012): The efferent medial olivocochlear-hair cell synapse. *J. Physiol. Paris* 106, 47–56.
- Engel, A.K., Fries, P. and Singer, W. (2001). Dynamic Predictions: Oscillations and Synchrony in Top-Down Processing. 2, 704–716.
- Felmy, F. and Künzel, T. (2014). Giant synapses in the central auditory system. *e-Neuroforum* 5, 53–59.
- Francis, N.A. and Guinan, J.J. (2010). Acoustic stimulation of human medial olivocochlear efferents reduces stimulus-frequency and click-evoked otoacoustic emission delays: Implications for cochlear filter bandwidths. *Hear. Res.* 267, 36–45.
- Fujino, K. and Oertel, D. (2001). Cholinergic modulation of stellate cells in the mammalian ventral cochlear nucleus. *J. Neurosci.* 21, 7372–7283.
- Gilbert, C.D. and Li, W. (2013). Top down influences on visual processing. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 350–363.
- Goldberg JM, Brown PB (1969) Response of binaural neurons of dog superior olivary complex to dichotic tonal stimuli: some physiological mechanisms of sound localization. *J. Neurophysiol.* 32:613–636.
- Goyer, D., Kurth, S., Gillet, C., Keine, C., Rübsamen, R. and Kuenzel, T. (2016). Slow Cholinergic Modulation of Spike Probability in Ultra-Fast Time-Coding Sensory Neurons. *eNeuro* 3.
- Groff, J.A. and Liberman, M.C. (2003). Modulation of cochlear afferent response by the lateral olivocochlear system: activation via electrical stimulation of the inferior colliculus. *J. Neurophysiol.* 90, 3178–3200.
- Grothe, B. and Pecka, M. (2014). The natural history of sound localization in mammals – a story of neuronal inhibition. *Front. Neural Circuits* 8, 1–19.
- Grothe, B., Pecka, M. and McAlpine, D. (2010). Mechanisms of sound localization in mammals. *Physiol. Rev.* 90, 983–1012.
- Guinan, J.J. (2006). Olivocochlear efferents: anatomy, physiology, function, and the measurement of efferent effects in humans. *Ear Hear.* 27, 589–607.
- He, D.Z.Z., Jia, S. and Dallos, P. (2003). Prestin and the dynamic stiffness of cochlear outer hair cells. *J. Neurosci.* 23, 9089–96.
- Horváth, M., Kraus, K.S. and Illing, R.B. (2000): Olivocochlear neurons sending axon collaterals into the ventral cochlear nucleus of the rat. *J. Comp. Neurol.* 422, 95–105.
- Kawase, T., Delgutte, B. and Liberman, M.C. (1993). Antimasking effects of the olivocochlear reflex. II. Enhancement of auditory-nerve response to masked tones. *J. Neurophysiol.* 70, 2533–2549.
- Kawase, T. and Liberman, M.C. (1993). Antimasking effects of the olivocochlear reflex. I. Enhancement of compound action potentials to masked tones. *J. Neurophysiol.* 70, 2519–2532.
- Kirk, E.C. and Smith, D.W. (2003). Protection from Acoustic Trauma Is Not a Primary Function of the Medial Olivocochlear Efferent System. *JARO – J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 4, 445–465.
- Knudson, I.M., Shera, C.A. and Melcher, J.R. (2014). Increased Contralateral Suppression of Otoacoustic Emissions Indicates a Hyper-responsive Medial Olivocochlear System in Humans with Tinnitus and Hyperacusis. *J. Neurophysiol.* 112, 3197–3208.
- Liberman, M.C., Liberman, L.D. and Maison, S.F. (2014): Efferent Feedback Slows Cochlear Aging. *J. Neurosci.* 34, 4599–4607.
- Llorca-Torralba, M., Borges, G., Neto, F., Mico, J.A. and Berrococo, E. (2016). Noradrenergic Locus Coeruleus pathways in pain modulation. *Neuroscience*, 338, 93–113.
- Mellott, J.G., Motts, S.D. and Schofield, B.R. (2011). Multiple origins of cholinergic innervation of the cochlear nucleus. *Neuroscience* 180, 138–147.
- Mulders, W.H.A.M., Paolini, A.G., Needham, K. and Robertson, D. (2003). Olivocochlear collaterals evoke excitatory effects in onset neurones of the rat cochlear nucleus. *Hear. Res.* 176, 113–121.
- Mulders, W.H.A.M., Paolini, A.G., Needham, K. and Robertson, D. (2009). Synaptic responses in cochlear nucleus neurons evoked by activation of the olivocochlear system. *Hear. Res.* 256, 85–92.
- Mulders, W.H.A.M., Seluakumaran, K. and Robertson, D. (2008). Effects of centrifugal pathways on responses of cochlear nucleus neurons to signals in noise. *Eur. J. Neurosci.* 27, 702–714.
- Mulders, W.H.A.M., Winter, I.M. and Robertson, D. (2002). Dual action of olivocochlear collaterals in the guinea pig cochlear nucleus. *Hear. Res.* 174, 264–280.
- Oertel, D., Wright, S., Cao, X.-J., Ferragamo, M. and Bal, R. (2011). The multiple functions of T stellate/multipolar/chopper cells in the ventral cochlear nucleus. *Hear. Res.* 276, 61–69.
- Pollak, G.D., Burger, R.M. and Klug, A. (2003). Dissecting the circuitry of the auditory system. *Trends Neurosci.* 26, 33–39.
- Radtke-Schuller, S., Seeler, S. and Grothe, B. (2015). Restricted loss of olivocochlear but not vestibular efferent neurons in the senescent gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Front. Aging Neurosci.* 7, 1–12.
- Scharf, B., Magnan, J. and Chays, A. (1997). On the role of the olivocochlear bundle in hearing: 16 case studies. *Hear. Res.* 103, 101–122.
- Scharf, B., Magnan, J., Collet, L., Ulmer, E. and Chays, A. (1994). On the role of the olivocochlear bundle in hearing: a case study. *Hear. Res.* 75, 11–26.
- Schofield, B.R., Motts, S.D. and Mellott, J.G. (2011). Cholinergic cells of the pontomesencephalic tegmentum: Connections with auditory structures from cochlear nucleus to cortex. *Hear. Res.*, 279, 85–95.
- Seluakumaran, K., Mulders, W.H.A.M. and Robertson, D. (2008). Unmasking effects of olivocochlear efferent activation on responses of inferior colliculus neurons. *Hear. Res.* 243, 35–46.
- Wersinger, E. and Fuchs, P.A. (2011). Modulation of hair cell efferents. *Hear. Res.* 279, 1–12.



## Bionotes



**Thomas Künzel**  
Institute for Biology 2, RWTH Aachen  
University, Worringerweg 3,  
52074 Aachen, Germany,  
E-Mail: [kuenzel@bio2.rwth-aachen.de](mailto:kuenzel@bio2.rwth-aachen.de)

Thomas Künzel studied biology at the Ruhr University in Bochum. He received his doctoral degree from the RWTH Aachen University with a dissertation on the development of auditory brainstem neurons under the supervision of Prof. Harald Luksch. He then briefly took a position as a research assistant at RWTH Aachen before continuing his postdoctoral training at Erasmus Medical Center in Rotterdam with Prof. Marcel van der Heijden and Prof. Gerard Borst. In 2011, he returned to the RWTH Aachen as an assistant to Prof. Hermann Wagner and has headed an independent group, which is supported by the German science foundation DFG (PP1608 “Ultrafast and temporally precise information processing: Normal and dysfunctional hearing”) since 2012. His research focus is on development and cellular physiology of phase-coding neurons in avian and mammalian auditory brainstem circuits.



**Hermann Wagner**  
Institute for Biology 2, RWTH Aachen  
University, Worringerweg 3,  
52074 Aachen, Germany

Hermann Wagner studied biology in Ulm, Erlangen and Tübingen. After his diploma and doctoral thesis with Werner Reichardt at the Max-Planck-Institute of Biological Cybernetics, he was a postdoc with Mark Konishi at the California Institute of Technology, Pasadena, USA. He returned to the Max-Planck Institute to work with Kuno Kirschfeld, received a Heisenberg stipend to work with Geoff Manley at the TU Munich, before he took the chair of Zoology/Animal Physiology at the RWTH Aachen. His interests are in mechanisms of orientation, ranging from ecology via neuro-ethology to system physiology and cognition.

## Forschungsförderung

Alexander Gottschalk\*

# DFG Schwerpunktprogramm (SPP) 1926 “Next Generation Optogenetics – Tools and Application”

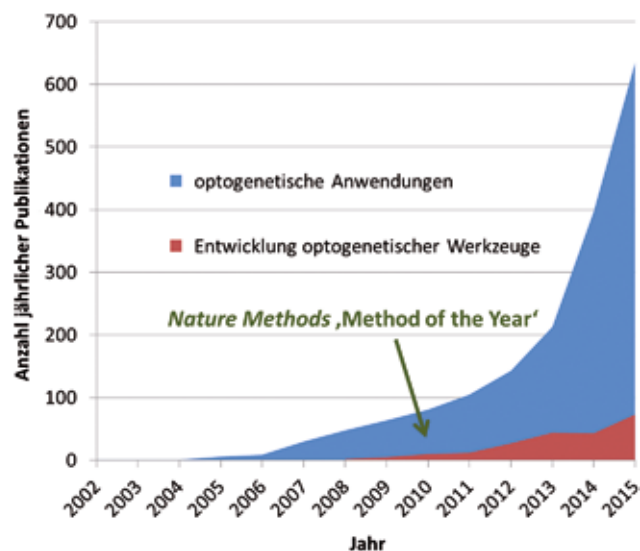


DOI 10.1515/nf-2016-1101

Die Optogenetik ist ein junges Arbeitsgebiet, das sich seit 2005 rasant entwickelt hat. Lichtempfindliche Proteine wurden dabei zuerst in erregbaren Zellen – heterolog – exprimiert („Genetik“) und erlaubten so deren Aktivierung oder Inhibition mithilfe von Licht („Opto“). Dabei wurden zunächst mikrobielle Rhodopsine aus Grünalgen oder Halobakterien verwendet, z. B. Kanalrhodopsin oder Halorhodopsin, welche lichtinduzierte Ionenströme erzeugen. Dies ist in kultivierten Zellen, aber auch in intakten Tieren möglich, sofern die Zellen mit Licht erreicht werden können. Ein paralleler Ansatz zur Erlangung von Lichtkontrolle über neuronale und zelluläre Mechanismen war die Verwendung von lichtschaltbaren Molekülen, die sich kovalent mit spezifisch modifizierten Ionenkanälen verbinden ließen.

Aufgrund der so möglich gewordenen neuen experimentellen Ansätze, vor allem in der Neurowissenschaft, expandierte das Arbeitsgebiet schnell, und vielfältige Anwendungen bis hin zur Erzeugung künstlicher Erinnerungen wurden realisiert. Aber auch Möglichkeiten neuer Therapieformen, z. B. für *Retinitis pigmentosa* oder Epilepsien, scheinen durch die Optogenetik denkbar. Die Erfolge der mikrobiellen Rhodopsine als optogenetische Werkzeuge erzeugten ein Interesse an weiteren Möglichkeiten, Zellen durch Licht zu regulieren. So wurden auch andere lichtaktivierte Proteine aus der Natur entlehnt oder durch Proteindesign erzeugt und als Werkzeuge für optogenetische Anwendungen etabliert. Dadurch werden immer neue Bereiche auch der allgemeinen Zellbiologie und Molekularbiologie durch Licht regulierbar gemacht. Die Veröffentlichungen in diesem Bereich nehmen, vor allem

bei der Anwendung, exponentiell zu. Auch das Arbeitsgebiet zur Erzeugung neuer optogenetischer Werkzeuge ist im Wachstum begriffen, wenn auch langsamer, was aber nicht überrascht, da die Entwicklung neuer Methoden zeitaufwändig ist.



**Abb. 1:** Anzahl der Publikationen zum Thema Optogenetik-Anwendungen, bzw. zum Thema Entwicklung optogenetischer Werkzeuge, in den letzten Jahren.

Hier setzt das SPP1926 thematisch an: Generierung, Charakterisierung und Etablierung optogenetischer Werkzeuge neuer Art, die mit hoher Effizienz und Lichtempfindlichkeit zur Anwendung *in vivo* gelangen. Neue lichtempfindliche Moleküle und Proteine, entweder aus natürlichen Quellen, über Proteindesign oder durch Kopplung verschiedener Proteinkomponenten, aber auch durch chemische Synthese erzeugt, dienen als präzise Instrumente zur spezifischen Steuerung von Prozessen in Zellen und deren Organellen. In Hinsicht auf eine mögliche Verwendung und technische Realisierbarkeit in der Humantherapie werden auch neue Methoden und Hardware (z. B. zur Lichtapplikation im Gewebe) untersucht. Dabei

\*Korrespondenzautor: Prof. Dr. rer. nat. Alexander Gottschalk, Professor für molekulare Zellbiologie und Neurobiochemie, Goethe-Universität, Buchmann Institut für molekulare Lebenswissenschaften und Institut für Biophysikalische Chemie, Max-von-Laue-Str. 15, 60438 Frankfurt, e-mail: a.gottschalk@em.uni-frankfurt.de

sollen die erzeugten Werkzeuge am tatsächlichen Bedarf orientiert, und nicht als reiner Selbstzweck generiert werden – eine Motivation zur Arbeit in interdisziplinären Projektgruppen. So lassen sich optogenetische Werkzeuge am ehesten in Zusammenarbeit von Forschern mehrerer Fachrichtungen etablieren, z. B. durch das Vereinen von Expertise in Photobiologie (zur Identifikation potenziell brauchbarer Proteine), organischer Synthesechemie (zur Erzeugung von ‚Lichtschaltern‘ für proteinspezifische chemisch-biologische Anwendungen), oder auch Strukturbiologie (zum Design artifizierender optogenetischer ‚tools‘), mit Biophysik (zu deren Charakterisierung), bzw. mit Expertise in Modellorganismen (zur Implementation *in vivo*).

Das SPP 1926 hat sich im Sommer 2016 konstituiert, und ein erstes Treffen fand Ende September in Bad Vilbel statt. In dem SPP 1926 wurden 13 Projekte aus ganz Deutschland zur Förderung bewilligt. Diese sind überwiegend kollaborativer Art, unter Beteiligung von bis zu vier Projektpartnern, sodass eine Gesamtanzahl von 28 Arbeitsgruppen resultiert (inkl. einer assoziierten Gruppe aus Österreich). Das SPP 1926 fühlt sich verpflichtet, Expertise über optogenetische Werkzeuge dem wissenschaftlichen Nachwuchs zu vermitteln. Hierzu werden

Methoden-Workshops durchgeführt und Laboraufenthalte gefördert, mit dem Ziel einer interdisziplinären Ausbildung des Nachwuchses auf hohem Niveau. Vermittlung von Information über Optogenetik und zur Arbeit der im SPP 1926 organisierten Gruppen erfolgt z. B. im Internet ([www.spp1926.de](http://www.spp1926.de)) sowie durch Öffentlichkeitsarbeit seitens des Steuerungsgremiums, in dem sowohl etablierte als auch Nachwuchswissenschaftler vertreten sind (Sprecher: Alexander Gottschalk; [a.gottschalk@em.uni-frankfurt.de](mailto:a.gottschalk@em.uni-frankfurt.de)).

## Autoreninformationen



**Prof. Dr. rer. nat. Alexander Gottschalk**  
Heisenberg-Professor for Molecular Cell Biology and Neurobiochemistry, Johann Wolfgang Goethe-University Frankfurt, Institute of Biochemistry and Buchmann Institute for Molecular Life Sciences, Max-von-Laue-Str. 15, D-60438 Frankfurt, E-Mail: [a.gottschalk@em.uni-frankfurt.de](mailto:a.gottschalk@em.uni-frankfurt.de)

## Rezension

### Joachim Müller-Jung: Hirnforschung 8: Sprache und Kommunikation (F.A.Z.-Hörbuch)

besprochen von **Anja Hoffmann**, Bayer AG

DOI 10.1515/nf-2016-1104



Wir tun es täglich. Mal mit Händen und Füßen, meist aber mit viel oder wenig Worten: sprechen und kommunizieren. Sprache ist ein wesentliches Element der zwischenmenschlichen Verständigung. Und gelungene Kommunikation ist ein wichtiges Thema in vielen Bereichen. Es gibt heutzutage wohl kaum jemanden, der nicht irgendwann in seinem beruflichen Leben mit diesem Thema in Form eines Trainings konfrontiert wird. Insofern ist es spannend zu sehen, was die Neurowissenschaft zu diesen Themen beisteuern kann.

„Hirnforschung 8 – Sprache und Kommunikation“ setzt die erfolgreiche Reihe der F.A.Z. Hörbücher aus der Reihe Hirnforschung fort und präsentiert in gewohnter Manier eine Zusammenstellung von Beiträgen namhafter Hirnforscher, hier z. B. von Frau Friederici, und Wissenschaftsjournalisten aus den Jahren 2010 bis 2015. Die insgesamt 10 Texte auf 2 CDs ergeben eine Gesamtspielzeit von ca. 2 Stunden, wobei die Dauer der einzelnen Texte zwischen ca. 6 bis 20 Minuten variiert.

Die erste CD beschäftigt sich in erster Linie mit neurobiologischen Grundlagen von Sprache und Grammatik: Es werden die neuroanatomischen Präsentationen beschrieben („Wenn Worte Wurzeln schlagen“), in „stille Grammatik“ geht es um die Fragestellung, ob es eine innere Grammatik des Gehirnes gibt, Spracherwerb und Entwicklung werden ausführlich geschildert und über verschiedene Sprachräume verglichen, der Einfluss von Mehrsprachigkeit und Dialekten diskutiert („Auch Schwäbisch wäre eine Option“). Sprache wird als Abbildung einer Persönlichkeit beleuchtet, und auch die Diversität der Sprache, das Forschungsgebiet der Ethnolinguistik, und ihre Weiterentwicklung werden in einem Beitrag erläutert. Die zweite CD legt den Schwerpunkt mehr auf Kommunikation: So beschäftigen sich zwei Texte mit dem Beitrag, den

Gesten zu unserer Kommunikation beitragen, inwiefern Sprache und Gestik zusammenhängen und welche Rolle einzelnen, besonders typischen Handgesten zukommt, die Rolle und Weiterentwicklung der Schriftsprache werden kritisch beleuchtet. Die Zusammenstellung endet mit einem Vergleich von Musik und Sprache, Fragen zur Musikästhetik und Betrachtungen, was einen Sommerhit ausmacht. Die einzelnen Texte werden durch musikalisch unterlegte Überleitungen verbunden, die den roten Faden zwischen den Beiträgen sichtbar machen.

Das Hören dieser Doppel-CD war für mich mit vielen überraschenden und erhellenden Erkenntnissen verbunden. Wussten Sie, dass deutsche und französische Babys unterschiedlich betont schreien und damit schon in diesem frühen Sprachentwicklungsstadium die typischen Kennzeichen ihrer Landessprache abbilden? Zum Teil musste ich auch Jahrzehnte gehegtes Wissen über Bord werfen. Wobei es nicht wundert, dass die vermeintlich einfache Anatomie der Sprache, die auch Eingang in Schulbücher gefunden hat, nämlich die Funktionsteilung zwischen dem Broca- und Wernicke-Areal, komplexer ist als lange angenommen. An anderen Stellen habe ich eine wissenschaftliche Erklärung für mein eigenes intuitives Verhalten bekommen: Als in der Gegend von Hannover aufgewachsener Mensch nicht mit einem Dialekt gesegnet, habe ich sowohl in der Schweiz als auch in Berlin festgestellt, dass sich die lokale Sprache heimlich bei mir einschleicht, aber auch, dass ich bei häufigem Kontakt mit Kollegen deren sprachliche Besonderheiten plötzlich übernehme. Seit dem Hören des Artikels „Darf es noch ein bisschen Näseln sein?“ weiß ich, dass ich „Sprachimitation als sozialen Klebstoff“ verwende – eine Verhaltensweise, die seit Anbeginn der Sprache zur Gruppenbildung beigetragen hat und die auch beim Spracherwerb dazugehört.

Die Qualität der Beiträge finde ich durchweg sehr gut: Die Sprache ist gewählt und variantenreich. An manchen Stellen musste ich schmunzeln ob der Bildhaftigkeit der Sprache (der Zeigefinger als „direkter Erfüllungsgehilfe des Gehirns“) oder der offensichtlichen Freude der Autoren an der Sprachgestaltung (die Stimme als „variabelstes Lauterzeugungsinstrument“). Der Vortrag durch die beiden Sprecher ist gut gestaltet. Man kann sehr gut zuhören, und es gab aus meiner Sicht keinen Artikel, dem man nicht gut folgen konnte.

Sehr gefallen hat mir – wie auch schon bei anderen Dossiers – die Tatsache, dass die Autoren die wissenschaftlichen Erkenntnisse nicht nur darstellen, sondern sie in einen größeren Kontext bringen und mit Humor



oder Kritik einordnen. Sehr nachdenklich hat mich z. B. der Artikel „Nur noch Analphabeten“ hinterlassen: Mit der zunehmenden Digitalisierung und dem Übergang in eine immer mehr audiovisuelle Kommunikationskultur nimmt die Kultur der Schriftsprache ab: Wann haben Sie den letzten (handschriftlichen) Brief geschrieben? Wann haben Sie das letzte Bild per Smartphone geteilt? Dass hier reflektiert wurde, wie die Bevölkerung gezielt manipuliert und im Sinne des Kapitalismus zu immer effizienterer Funktion erzogen wird, empfand ich wegen der Klarheit der Positionsbeziehung trotz des eher traurig stimmenden Inhalts positiv.

Auf der CD-Hülle befinden sich (einige wenige) Angaben zu weiterführender Literatur sowie Hinweise auf Internet-Links. Die Hinweise beziehen dabei auch Themen ein, die auf der CD nicht vertieft wurden und ermöglichen somit ein Weiterlesen über das Gehörte hinaus. Insgesamt

finde ich dieses Hörbuch sehr gelungen und empfehlenswert: Es informiert kurzweilig und vielseitig über einen wesentlichen Teil unseres alltäglichen Verhaltens und hält bestimmt auch für andere Hörer die eine oder andere Überraschung bereit.

**Joachim Müller-Jung (Hrsg.): Hirnforschung 8: Sprache und Kommunikation**

**Die besten Beiträge aus F.A.Z. und Sonntagszeitung F.A.Z.-Hörbuch**

*Gesprochen von Olaf Pessler und Markus Kästle*

*Coproduktion der Frankfurter Allgemeinen Zeitung und der Just GmbH*

*2 CDs, Laufzeit ca. 2 Stunden*

*19,90 Euro*

## Rezension

### Ich glaub, mich trifft der Schlag: Warum das Gehirn tut, was es tun soll, oder manchmal auch nicht

Besprochen von **Arno Villringer**, Max-Planck-Institut für Kognitions- und Neurowissenschaften, Leipzig

DOI 10.1515/nf-2016-1110



„Brauchst Du dieses Buch wirklich zweimal“, fragte mich meine Mitarbeiterin, als sie zwei Exemplare desselben Buches in meinem Büro liegen sah und – während sie auf mich gewartet hatte – darin gestöbert hatte (aus Gründen der Mitarbeitermotivation, habe ich jetzt also nur noch ein Exemplar).

Als Neurowissenschaftler und Neurologe interessiert mich die Frage, ‚Was das Gehirn tut, was es tun soll, oder manchmal auch nicht‘ natürlich brennend. Dies ist der Untertitel des Buches ‚Ich glaub, mich trifft der Schlag‘ von Ulrich Dirnagl und Jochen Müller. Diese Namen auf dem Cover des im Droemer Verlag erschienenen Paperback stehen bei mir für wissenschaftliche Solidität: Mit Ulrich Dirnagl verbinden mich viele Jahre gemeinsamer Forschung, und Jochen Müller ist Neurobiologe, der bei Helmut Kettenmann promoviert hat.

Nicht nur der flapsige Titel, auch das poppige Cover signalisiert, daß es sich hier nicht um ein Lehrbuch oder einen der „langweiligen“ Patientenratgeber handelt. Jochen Müller ist nämlich ein prominenter ‚Science Slammer‘. Also jemand, der sich der Wettkampf-mässig betriebenen Kunst verschrieben hat, Nicht-Fachleuten in wenige Minuten dauernden Vorträgen die eigene Forschung unterhalt-

sam nahe zu bringen. Und genau darum geht es in diesem Buch: Interessierten Laien Hirnfunktionen zu erklären. Der Grundgedanke ist im Übrigen in der klinischen Neurologie wie auch der Neurowissenschaft seit vielen Jahren gut etabliert: Wenn was kaputt geht, kann man anhand der resultierenden Störung auf die ursprüngliche Funktion zurückschließen. Dieses Prinzip ist die Basis der Lokalisationstheorien von Paul Broca, einem der Begründer der modernen Neurowissenschaften. Anhand von sechs der häufigsten Hirnerkrankungen, nämlich Kopfschmerz, Schlaganfall, Epilepsie, Multipler Sklerose, Morbus Parkinson und der Alzheimer’schen Erkrankung werden bei Dirnagl und Müller basale Neurophysiologie (Aktionspotential, Nervenleitung, Neurotransmitter usw.), funktionelle Neuroanatomie, und auch höhere Hirnfunktionen behandelt. Die Krankheiten selbst, deren Ursachen und Behandlung, kommen dabei auch nicht zu kurz. Jochen Müller bedient sich dabei der von Fritz Kahn in den dreissiger Jahren des vergangenen Jahrhunderts perfektionierten Technik zur Erklärung komplizierter biologischer Sachverhalte Metaphern und Bilder einzusetzen. Passenderweise, und ebenfalls im Geiste Kahn’s, wird all dies durch Comic-Zeichnungen von Oliver Wunsch illustriert. Die Rolle von Ulrich Dirnagl ist es dabei, den schlammenden Jochen Müller im Schach zu halten, sicherzustellen, daß neurowissenschaftlich alles mit rechten Dingen zugeht, und die Leser auf so manch kleineren Exkurs zu den Kontroversen und offenen Fragen dieser Wissenschaft mitzunehmen. Auch so aktuelle Themen wie CGRP-Antikörperbehandlung bei Migräne, AC- und DCHirnstimulation, Rolle des Mikrobioms, hippocampale Place Cells fehlen deshalb nicht.

Ist es möglich, auf 330 Seiten, inklusive Glossar, Laien auf Grundlagen-wissenschaftlich wie klinisch aktuellem Stand allgemeinverständlich und unterhaltsam die ‚Funktion des Gehirns‘ nahe zu bringen? Müller und Dirnagl zeigen, daß das tatsächlich geht! Außerdem – so sagt meine Mitarbeiterin – macht es Spass. Aber selbst für gestandene Neurowissenschaftler, für die das Buch ja gar nicht geschrieben ist, könnte ‚Ich glaub, mich trifft der Schlag‘ etwas bieten. Es wird Kandel’s Principles und das Brandt’sche Therapiebuch zwar nicht ersetzen, aber nicht jeder Neurowissenschaftler duerfte z. B. die Marburg Variante der MS kennen oder die Therapieprinzipien der Epilepsie. Aber, auch wenn man nicht zugeben möchte, dass man dabei auch was gelernt hat, so bleibt das „gesichtwahrende Argument“ darin viel anschauliches Material, didaktisch geschickte Formulierungen und einige schöne Metaphern für den Studentunterricht zum Einstieg in komplexe Mechanismen zu finden. Ausserdem könnten

die Liebsten zu Hause durch die Lektüre dieses Buches etwas besser verstehen, was man tagsüber (und manchmal auch nachts) so treibt.

***Ich glaub, mich trifft der Schlag: Warum das Gehirn tut, was es tun soll, oder manchmal auch nicht***

*Ulrich Dirnagl und Jochen Müller*

*Broschiert: 336 Seiten*

*Droemer Verlag (2016)*

*ISBN-10: 3426276798*

*ISBN-13: 978-3426276792*

*16,99 € (D), 17,50 € (A)*

## Nachruf

Rolf Sprengel

**Peter H. Seeburg (21.8.1944–22.8.2016)**

DOI 10.1515/nf-2016-1109

*Peter H. Seeburg, eine zentrale Persönlichkeit innerhalb der Gemeinschaft deutscher Neurowissenschaftler, starb in Heidelberg am 22. August 2016 im Alter von 72 Jahren. Seeburgs wissenschaftliches Wirken war geprägt durch seine Fähigkeit, die Grenzen des Bekannten und bis dahin Machbaren zu überschreiten. So erschloss er ständig neue Wege für die biomedizinische Forschung. Peter Seeburg revolutionierte die schnelle DNA-Sequenzierung, eine der wesentlichen Voraussetzungen für das Human Genome Project. Er klonierte und charakterisierte eine Vielzahl wichtiger Peptidhormone, Rezeptoren und Liganden-gesteuerter Ionenkanäle und trug so maßgeblich zum Verständnis von deren komplexer Struktur und Funktion bei. Des Weiteren lieferte er fundamentale genetische Hinweise zur Rolle dieser Schlüsselproteine bei der neuronalen Kommunikation und beim Lernen und Erinnern, und wie diese genetisch reguliert werden können.*

Peter Seeburgs frühe Forscherjahre begannen am Max-Planck-Institut für Virusforschung in Tübingen (heute Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie), wo er als Doktorand bei Heinz Schaller den Umgang mit DNA erlernte. Dann widmete er sich als Postdoc an der Universität von Kalifornien in San Francisco (UCSF) im Labor von Howard M. Goodman neuroendokrinen Fragestellungen. Hier gelang ihm erstmals die Klonierung des menschlichen Wachstumshormons und dessen Expression in Bakterien. Diese Arbeiten sowie die Klonierung von Humaninsulin durch seinen Kollegen Axel Ulrich Ende der 1970er Jahre waren Meilensteine auf dem Weg zur Entwicklung rekombinanter Therapeutika und von entscheidender Bedeutung für die Gründung eines der ersten Biotechnologie-Unternehmen, Genentech. Als einer der ersten Mitarbeiter von Genentech klonierte Peter Seeburg weitere wichtige menschliche Hormonvorläuferproteine, wie z. B. des Gonadotropin-Releasing-Hormons,

und entwickelte zusammen mit Joe Messing eine neue Technologie zur Verwendung des Bakteriophagen M13 für die einzelsträngige DNA-Sequenzierung – ein Erfolg, der maßgeblich zum raschen Fortschritt der molekularbiologischen Forschung beitrug.

In der zweiten Hälfte der 1980er Jahre nutzte Peter Seeburg – inzwischen als unabhängiger Professor am Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg (ZMBH) tätig – seine molekularbiologische Expertise, um Schlüssel-moleküle der schnellen Neurotransmission im menschlichen Gehirn zu identifizieren und funktionell zu charakterisieren. Neben zahlreichen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren klonierten Peter und sein Team die meisten Untereinheiten der wichtigsten inhibitorischen und exzitatorischen ionotropen Rezeptoren des zentralen Nervensystems (GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren, AMPA- und NMDA-Rezeptoren) und charakterisierten diese bis ins kleinste Detail gemeinsam und in enger Zusammenarbeit mit Bert Sakmanns Arbeitsgruppe. Diese Arbeiten zeigten, dass die unerwartet hohe Komplexität der schnellen Neurotransmission auf unterschiedliche genetische Faktoren zurückzuführen ist, die sich während der Entwicklung des Gehirns manifestieren: multiple Rezeptor-Untereinheitengene, die Generierung von Untereinheiten-Isoformen durch alternatives Splicing, pre-mRNA-Editierung und Rezeptor-assoziierte Proteine wie das von Peters Arbeitsgruppe untersuchte Hauptgerüstprotein erregender Postsynapsen, PSD-95. Außerdem schufen sie die Basis für zahllose weiterführende Studien an zentralnervösen Neurotransmitter-Rezeptoren weltweit.

Peters Entdeckung der pre-mRNA-Modifizierung einzelner Nukleoside im Nervensystem höherer Organismen war vollkommen unerwartet – sowohl für ihn selbst als auch für die wissenschaftliche Fachwelt. Seine Publikation in Cell 1991 lieferte überzeugende Beweise, dass ein einzelner Nukleotidaustausch zwischen der mRNA und der entsprechenden Gensequenz der AMPA-Rezeptor-Untereinheit GluA2 (früher als GluR2 oder GluR-B bezeichnet) kein Sequenzierungsartefakt war, sondern durch zwei Enzyme (RED1 und RED2, später DRADA1 und DRADA2 genannt) bewirkt wurde, welche Peter in den Folgejahren erfolgreich charakterisieren konnte.

In der Zwischenzeit hatte die Gliaforschung in Heidelberg unter Leitung von Helmut Kettenmann gezeigt, dass

**\*Korrespondenzautor: Dr. Rolf Sprengel**, Max-Planck-Forschungsgruppe, Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Heidelberg, INF 307, D-69120 Heidelberg, Tel.: 06221-548668, Fax: 06221-548752, E-Mail: sprengel@mpimf-heidelberg.mpg.de



die AMPA-Rezeptor-Untereinheit GluA2 die Permeabilität des AMPA-Rezeptors für das so wichtige Signalmolekül  $\text{Ca}^{2+}$  kontrolliert. Nur in Anwesenheit  $\text{Ca}^{2+}$ -impermeabler synaptischer AMPA-Rezeptoren kann der benachbarte NMDA-Rezeptor in erregenden Neuronen des Gehirns die gleichzeitige Aktivität synaptisch verknüpfter Nervenzellen erkennen und durch seinen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom die Effektivität der Reizweiterleitung modulieren. Die enge Zusammenarbeit der Arbeitsgruppen von Peter Seeburg und Bert Sakmann ergab, dass die RNA-Editierung der GluA2-Untereinheit  $\text{Ca}^{2+}$ -undurchlässige AMPA-Rezeptoren erzeugt. Die Modifikation eines einzigen Nukleotids von einem Adenosin-(CAA) zu einem Inosin-Codon (CAI) im Primärtranskript des GluA2-Gens bewirkt einen Einbau des Aminosäurerests Arginin in einer Region der GluA2-Untereinheit, welche die Ionenselektivität des AMPA-Rezeptor-Kanals vermittelt. Diese enzymatische „Editierung“ einer einzelnen Base ist von vitaler Bedeutung. Mit genetisch modifizierten Mäusen konnte Peters Arbeitsgruppe zeigen, dass die posttranskriptionelle Editierung der GluA2-AMPA-Rezeptor-mRNA essentiell für die normale postnatale Gehirnentwicklung ist: Mäuse, in denen die Editierung des GluA2-Primärtranskripts genetisch verhindert wird, sterben bereits zwei bis drei Wochen nach der Geburt.

Die Experimente mit genetisch veränderten Mäusen weckten bei Peter Seeburg ein starkes Interesse für die molekularen Grundlagen von Lernprozessen. In den letzten 15 bis 20 Jahren widmeten sich er und seine Arbeitsgruppe, nun am Max-Planck-Institut für medizinische Forschung in Heidelberg, dem Thema „Lernen und Gedächtnis“. Die Entschlüsselung der genetischen Komposition der ionotropen Glutamaterezeptoren ermöglichte es, genetisch modifizierte Mäuse zu generieren, die veränderte ionotrope Glutamaterezeptoren exprimieren. Die Analyse einer dieser Mauslinien, bei der das Gen für die AMPA-Rezeptor-Untereinheit GluA1 inaktiviert wurde, stellte die damals allgemein akzeptierte Rolle des dorsalen Hippocampus als alleinige Speicherregion lokaler Informationen in Frage: Der im Hippocampus der GluA1-Knockout-Maus beobachtete Verlust dendritischer AMPA-Rezeptoren und die deutlich reduzierte synaptische Plastizität waren nicht mit dem erwarteten Verlust des räumlichen Erinnerungsvermögens gekoppelt, sondern nur mit einem Totalverlust des räumlichen Kurzzeitgedächtnisses. Diese Befunde belegten, dass im Gegensatz zu den bis dahin gültigen Vorstellungen GluA1-haltige AMPA-Rezeptoren zur synaptischen Plastizität hippocampaler Synapsen beitragen. Überraschend war jedoch die Beobachtung, dass die GluA1-abhängige synaptische Plastizität hippocampaler Verschaltungen zur Ausbildung eines räumlichen Gedächtnisses überhaupt nicht notwendig ist.

In der Hoffnung, die Rolle des Hippocampus bei der Gedächtnisbildung weiter entschlüsseln zu können, intensivierte Peter seine Zusammenarbeit mit Per Andersen, einem der Väter der experimentellen Hippocampusforschung in Oslo. Die damals gültige Vorstellung war, dass der hippocampale NMDA-Rezeptor bei der Gedächtnisbildung eine Schlüsselrolle spielt. Verhaltensanalysen an Mäusen mit genetisch inaktiviertem NMDA-Rezeptor im Hippocampus, die u. a. von Nick Rawlins' Arbeitsgruppe in Oxford durchgeführt wurden, konnten dies jedoch nicht bestätigen. Die Lerndefizite, die Joe Tsien und Susumo Tonegawa vor 20 Jahren in vergleichbaren Mauslinien beobachtet hatten, waren im Seeburg-Labor mit Mäusen, denen die GluA1- oder die NMDAR1-Rezeptor-Untereinheit fehlte, nicht nachweisbar. Diese Ergebnisse untermauerten bereits damals existierende Zweifel an der Interpretation der früheren Ergebnisse. Das Lernverhalten der NMDA-Rezeptor-Mausmutanten spricht für die schon in den 1960er Jahren von Olga Vinogradova postulierte Funktion des dorsalen Hippocampus als 'Spürhund des Gehirns' für Unerwartetes und Neues in der Umgebung.

Zu Seeburgs Enttäuschung wurden diese Ergebnisse von der Fachpresse weitgehend ignoriert. Allerdings gelten inzwischen der oft zum Nachweis des räumlichen Gedächtnisses verwendete 'Morris Water Maze'-Test ebenso wie der elektrophysiologische Nachweis synaptischer Plastizität nicht mehr als zuverlässige Methoden zur Erfassung der Hippocampusfunktion. Peter Seeburgs späte Arbeiten an genetisch veränderten Mäusen haben somit wesentlich zur Umorientierung der experimentellen Neurowissenschaft des Hippocampus beigetragen. Die Analyse komplexer neuronaler Netzwerke und die Kommunikation verschiedener Gehirnregionen beim Verhalten stehen heute im Vordergrund des wissenschaftlichen Interesses und haben einfach strukturierte Korrelationsstudien zwischen synaptischer Plastizität im Hippocampus und räumlichem Lernen in den Hintergrund gedrängt.

Für seine Forschungsarbeiten zur Komplexität der genetisch determinierten und molekularen Zusammensetzung von GABA<sub>A</sub>- AMPA- und NMDA-Rezeptoren erhielt Peter zahlreiche Auszeichnungen wie den Ernst Schering Preis, den Feldberg Prize, den ECNP-Lilly Award und den InBev-Baillet Latour Health Prize. Was bleibt, sind einige offene Fragen, wie z. B., ob die Editierung der GluA2-Untereinheit regulatorisch eingesetzt wird und ob der dorsale Hippocampus als Speicher räumlicher Information genutzt wird oder, wie auch von Peter Seeburg und seinen engen Mitarbeitern 2014 vorgeschlagen, zur Entscheidungsfindung bei der Orientierung im Raum (entsprechend der Funktion des ventralen Hippocampus bei emotionalen Entscheidungen dient).

Bei der Beantwortung dieser Fragen werden uns Peters Scharfsinn und sensibles Gespür für die wichtigsten Experimente und Versuchsansätze nicht mehr assistieren können. Wir verlieren mit Peter Seeburg einen außergewöhnlichen Wissenschaftler, Lehrer und einen, für viele, hervorragenden Mentor und Freund. Peters Tür zu seinem Büro stand immer offen und wurde nur dann schnell von innen verriegelt, wenn ein Handlungsreisender den Chef des Labors sprechen wollte. Doch für wissenschaftliche Belange seiner Mitarbeiter hatte Peter jederzeit ein offenes Ohr und lieferte in diesen Gesprächen die besten Ideen für weiterführende Experimente auch wenn dabei sein Führungsstil eher vorgebend und fordernd war. So war in den 1990er Jahren die Arbeitsaufteilung in seinem Labor sehr untypisch für ein Hochschullabor. Jeder Mitarbeiter war auf eine ganz bestimmte Technik spezialisiert. Peter verteilte persönlich die täglichen Aufgaben, wertete die Ergebnisse aus und fügte die vielen kleinen Bausteine schließlich zu einem logischen, publizierbaren Gesamtwerk zusammen. Die meisten von Peter eingereichten Arbeiten wurden von Gutachtern von Science, Nature, Cell und Neuron mit würdigem Applaus entgegengenommen und immer zeitnah veröffentlicht.

Vor ungeliebten administrativen Verpflichtungen drückte sich Peter, wenn immer es möglich war. Peter konzentrierte sich auf das Wesentliche: herausragende Daten zu produzieren und diese noch vor der sehr kompetitiven Konkurrenz hochrangig zu publizieren. Dabei war sein exzellentes Netzwerk zu Kollegen in aller Welt und Editoren der bedeutenden Journale wie Nature und Science, mit denen er fast täglich in Telefonkontakt stand, ein nicht unwichtiger Faktor, um nur nicht den richtigen Moment für eine Manuskripteinreichung zu verpassen. Manch junger Wissenschaftler seiner Arbeitsgruppe hätte sich hier und da zwar mehr Freiheiten gewünscht. Aber nichtsdestotrotz bereut heute niemand seiner ehemaligen Postdocs und Studenten, zusammen mit und für Peter an vorderster Front geforscht zu haben. Im Namen aller ehemaligen Heidelberger Mitarbeiter und Mitstreiter danken wir Peter von ganzem Herzen dafür, dass die jungen Wissenschaftler und Wissenschaftlerinnen die Welt der Neurowissenschaften in seinem Labor kennen lernen durften und die Kollegen auf seinen Rat und seine Expertise bauen konnten. Durch seine Unterstützung und seinen unermüdlichen Einsatz konnten viele das Feld mit zahlreichen innovativen Befunden bereichern.

Peter, nicht nur wir vermissen dich.

Rolf Sprengel  
Bernd Sommer  
Miyoko Higuchi  
Heinrich Betz  
Bert Sakmann

PS: siehe auch Wisden W(2016) A tribute to Peter H Seeburg (1944–2016): a founding father of molecular neurobiology. *Front. Mol. Neurosci.* 9:133. doi:10.3389/fnmol.2016.00133



**Abb. 1:** Peter Seeburg bei einer Preisverleihung 1997 (links) und bei einem Vortrag im Schloss Ringberg 2011 (rechts). Bildquellen: Miyoko Higuchi und Winfried Denk.

## Nachrichten



DOI 10.1515/nf-2016-1108

## Einladung zur Mitgliederversammlung auf der 12. Göttinger Tagung der Neurowissenschaftlichen Gesellschaft (22.–25. März 2017)

Termin: Donnerstag, 23. März 2017, 13:30–14:30 Uhr  
 Ort: Zentrales Hörsaalgebäude, Hörsaal 11

## Vorläufige Tagesordnung:

1. Begrüßung durch den Präsidenten
2. Bestätigung des Protokolls der letzten Mitgliederversammlung
3. Bericht des Schatzmeisters
4. Mitteilungen
5. Bericht zur Göttinger Tagung
6. Wahl des neuen Vorstandes
7. Aktivitäten der Gesellschaft
8. Verschiedenes

Vorschläge für weitere Tagesordnungspunkte reichen Sie bitte **bis spätestens 9. März 2017** bei der Geschäftsstelle ein.

Neurowissenschaftliche Gesellschaft e. V.  
 Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin (MDC)  
 Robert-Rössle-Str. 10, 13092 Berlin  
 E-Mail: gibson@mdc-berlin.de

## Reisestipendien für Göttinger Tagung 2017 vergeben

Die Stipendenauswahl für die Teilnahme an der Göttinger Tagung der Neurowissenschaftlichen Gesellschaft 2017 (22.–25. März 2017) ist abgeschlossen. 22 Bewerber wurden für die Vergabe eines Stipendiums in Höhe von 300 Euro ausgewählt. Das Stipendium wird in bar am Stand der NWG vor Ort in Göttingen ausgezahlt und kann nach freiem Ermessen des Stipendiaten für die Teilnehmergebühr, Reisekosten oder Unterkunft verwendet werden.

- |                                      |                                           |
|--------------------------------------|-------------------------------------------|
| 1. Bohár, Zsuzsanna (Ungarn)         | 9. Hirschberg, Stefan (UK)                |
| 2. Chighladze, Mariam (Georgien)     | 10. Hoeber, Jan (Schweden)                |
| 3. Chitranshi, Nitin (Australien)    | 11. Horvat, Anemari (Slovenien)           |
| 4. Dylida, Evelyn (UK)               | 12. Kolarova, Michala (Tschechien)        |
| 5. Elgamal, Mohamed (Ägypten)        | 13. Kruashvili, Lali (Georgien)           |
| 6. Fiáth, Richárd (Ungarn)           | 14. Lebitko, Tomasz (Polen)               |
| 7. Grätsch, Swantje (Kanada)         | 15. Martyniuk, Nataliia (Ukraine)         |
| 8. Hartmann, Stephanie (Deutschland) | 16. Moritz, Christian P. (Frankreich)     |
|                                      | 17. Pinheiro, Helena (Portugal)           |
|                                      | 18. Robra, Lena Mareike Josefine (Indien) |
|                                      | 19. Rodewald, Andrea (Deutschland)        |
|                                      | 20. Sathyanarayanan, Ranganayaki (Indien) |
|                                      | 21. Tsitoura, Chryssanthi (Deutschland)   |
|                                      | 22. Ziegart-Sadowska, Karolina (Polen)    |

Herzlichen Glückwunsch!

## Ausblick

Folgende Beiträge werden für die nächsten Ausgaben von Neuroforum vorbereitet:

**Eckart Altenmüller,**

Apollos Fluch und Segen: Musizieren als Neuroplastizitätsmotor

**Philipp Berens, Thomas Euler**

Neuronale Vielfalt in der Netzhaut

**Thomas Elbert, James Moran, Maggie Schauer**

Lust an Gewalt: appetitive Aggression als menschliche Anlage

**Olga Garaschuk**

Altersbedingte Veränderungen der Mikroglia: ihre Rolle bei gesundem Altern des Gehirns und bei neurodegenerativen Erkrankungen

**Alexey Ponomarenko, Tatiana Korotkova**

Schlaf, Nahrungsaufnahme und Fortbewegung – Koordination von angeborenem Verhalten durch den lateralen Hypothalamus

**David R. Stevens und Jens Rettig**

Synaptische Transmission im Immunsystem

**Fang Zheng, Andrea S. Link und Christian Alzheimer**

Bedeutung von Activin für Kognition, Affekt und neuronales Überleben

## Preview

The following contributions are in preparation for the next issues of Neuroforum:

**Eckart Altenmüller,**

Apollos gift and curse – making music as a model for adaptive and maladaptive plasticity

**Philipp Berens, Thomas Euler**

Neuronal diversity in the retina

**Thomas Elbert, James Moran, Maggie Schauer**

Lust for violence: appetitive aggression as human nature

**Olga Garaschuk**

Age-related changes in microglial physiology: the role for healthy brain ageing and neurodegenerative disorders

**Alexey Ponomarenko, Tatiana Korotkova**

To eat? To sleep? To run? Coordination of innate behaviors by lateral hypothalamus

**David R. Stevens und Jens Rettig**

Synaptic transmission in the immune system

**Fang Zheng, Andrea S. Link and Christian Alzheimer**

Role of activin in cognitive functions, affective behavior and neuronal survival





# Neurowissenschaftliche Gesellschaft e.V.

## Beitrittserklärung:

Hiermit erkläre ich meinen Beitritt zur Neurowissenschaftlichen Gesellschaft e.V.

## Eintrag in das Mitgliederverzeichnis

Name

Vorname

Titel

## Dienstadresse

Universität/Institut/Firma

Straße

PLZ, Ort

Tel./E-Mail

## Privatadresse

Straße

PLZ, Ort

Tel.

Datum/Unterschrift des neuen Mitglieds

## Ich unterstütze den Antrag auf Beitritt zur Neurowissenschaftlichen Gesellschaft e.V.:

Datum/Unterschrift

## Ich unterstütze den Antrag auf Beitritt zur Neurowissenschaftlichen Gesellschaft e.V.:

Datum/Unterschrift

Neurowissenschaftliche Gesellschaft e.V.  
Stefanie Korthals  
Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin  
Zelluläre Neurowissenschaften  
Robert-Rössle-Straße 10

13092 Berlin

## Ich optiere für folgende 2 Sektionen: (bitte ankreuzen)

- ☐ Verhaltensneurowissenschaften
- ☐ Zelluläre Neurobiologie
- ☐ Entwicklungsneurobiologie und Neurogenetik
- ☐ Neuropharmakologie und -toxikologie
- ☐ Systemneurobiologie
- ☐ Molekulare Neurobiologie
- ☐ Klinische Neurowissenschaften
- ☐ Computational Neuroscience
- ☐ Kognitive Neurowissenschaften

Ich bin Student ☐ ja ☐ nein  
(Bescheinigung anbei)

Ich bin ☐ weiblich ☐ männlich

## Jahresbeitrag:

(bitte ankreuzen)

- ☐ 70,- €/Jahr ordentliches Mitglied
- ☐ 30,- €/Jahr Studenten, Mitglieder im Ruhestand, Arbeitslose

## Überweisung:

Bankverbindung: Berliner Bank AG,  
IBAN: DE39 1007 0848 0463 8664 05  
BIC: DEUTDEBD110

## Einzug über VISA-Kreditkarte:

## Einzug über EUROcard:

Kartennummer \_\_\_\_\_

Exp. Date \_\_\_\_\_

Betrag \_\_\_\_\_

Name \_\_\_\_\_

Unterschrift \_\_\_\_\_

## Bankeinzugsermächtigung:

Ich ermächtige die Neurowissenschaftliche Gesellschaft e.V. von meinem Konto

bei der Bank \_\_\_\_\_

IBAN \_\_\_\_\_

BIC \_\_\_\_\_

einmal jährlich den Mitgliedsbeitrag in  
Höhe von € \_\_\_\_\_ einzuziehen

Ort, Datum \_\_\_\_\_

Unterschrift \_\_\_\_\_

Kontoinhaber \_\_\_\_\_

Anschrift \_\_\_\_\_

# PUBLIZIEREN BEI DE GRUYTER

Seit über 260 Jahren ist der renommierte De Gruyter Verlag ein verlässlicher Partner der Wissenschaften, weltweit angesehen in der Akademischen Welt.

Das breit aufgestellte Verlagsprogramm umfasst erstklassige Veröffentlichungen auf den Gebieten der Geisteswissenschaften, STM und Rechtswissenschaft. Jedes Jahr erscheinen über 1.300 neue Titel, gedruckt und digital, mehr als 770 Zeitschriften – im Abonnement und Open Access – sowie zahlreiche Datenbanken. Darüber hinaus ist die gesamte Backlist bis 1749 über das De Gruyter e-dition Programm als eBook oder gedruckt erhältlich.

## PUBLIZIEREN BEI DE GRUYTER BEDEUTET

- ▶ Individuelle editorische Betreuung durch akademisch spezialisierte Fachlektoren
- ▶ Qualitätssicherung durch ein strenges Peer-Review-Verfahren
- ▶ Publikationsmöglichkeiten in angesehenen Reihen oder Zeitschriften
- ▶ Eine schnelle Umsetzung und Herstellung Ihrer Veröffentlichung
- ▶ Alle Inhalte grundsätzlich gedruckt und digital
- ▶ Weltweite Bekanntmachung Ihres Werkes durch ein international ausgerichtetes Marketing und Vertriebsteam

---

**Wir sind gespannt auf Ihre Idee, Ihr Projekt, das Sie uns als Autor vorschlagen!**  
**Auf [www.degruyter.com/autoren](http://www.degruyter.com/autoren) finden Sie weitere Informationen über die Publikationsmöglichkeiten und ihre Ansprechpartner.**

# DIE ZUVERLÄSSIGE WISSENSQUELLE FÜR IHRE BIBLIOTHEKSNUTZER

Der Wissenschaftsverlag De Gruyter bietet ein umfangreiches Angebot exzellenter Publikationen in den Gebieten Geisteswissenschaften, Sozialwissenschaften, Medizin, Naturwissenschaften, Rechtswissenschaft und Architektur. Das breit gefächerte Portfolio umfasst zudem bedeutende Werke weltweit renommierter Kooperationspartner.

## eBooks

- ▶ Mehr als 2.000 Neuerscheinungen jährlich
- ▶ Attraktive Rabatte von bis zu 30%
- ▶ Alle De Gruyter Titel ab 2014 im PDF und ePUB-Format
- ▶ Kein DRM: Freie Nutzung der Inhalte zum eigenen Gebrauch
- ▶ Auswahl zwischen Pick & Choose und vorselektierten Paketen

## eJournals

- ▶ Mehr als 750 Zeitschriften
- ▶ 540 Zeitschriften Open Access verfügbar
- ▶ Listung in 200 Indexing Services mit ca. 500 Datenbanken
- ▶ 148 Zeitschriften mit Impact-Factor
- ▶ Auswahl zwischen Pick & Choose und vorselektierten Paketen

## Datenbanken

- ▶ Mehr als 50 umfangreiche Datenbanken
- ▶ Benutzerfreundliche Oberfläche und erweiterte Suchfunktionen
- ▶ Flexible Erwerbsmodelle: Kaufoption oder Jahreslizenz
- ▶ Freischaltung für unbegrenzte Nutzerzahl

**Kostenfreier Testzugang  
und individuelle Beratung:**  
[degruyter.com/sales](http://degruyter.com/sales)



**DE GRUYTER  
PUBLISHER  
GUARANTEE**

Die Publisher Guarantee stellt sicher, dass im Fall wirtschaftlicher Schwierigkeiten von Handelspartnern Zeitschriftenabonnements und Buchfortsetzungen weiterhin ausgeliefert und elektronischer Zugriff garantiert werden.

## UNSERE IMPRINTS:

BIRKHÄUSER

**DE GRUYTER**  
AKADEMIE FORSCHUNG

**DE GRUYTER**  
MOUTON

**DE GRUYTER**  
OLDENBOURG

**DE GRUYTER**  
OPEN

**DE GRUYTER**  
SAUR

## PUBLISHER PARTNER:

**böhlau**

 **COLUMBIA  
UNIVERSITY  
PRESS**

**DETAIL**

GÜTERSLOHER  
VERLAGSHAUS  


 **Harvard  
University Press**

**ottoschmidt**

**UNIVERSITY OF  
PENNsylvania  
PRESS**

 **PRINCETON**

**RWS**

**[transcript]**



**UNIVERSITY OF TORONTO PRESS**

 **Wolters Kluwer**

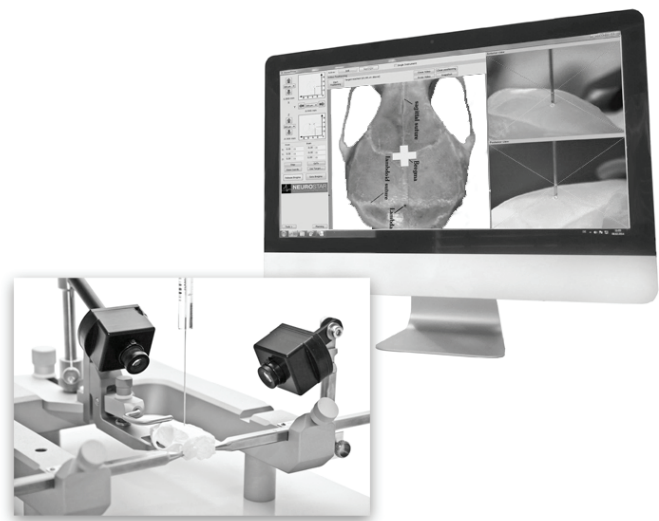


# Drill and Injection Robot



- High Throughput Drill & Inject
- Multiple Animal Procedures
- Multisite Injections
- No Tool Exchange

# Smart BregmaFinder



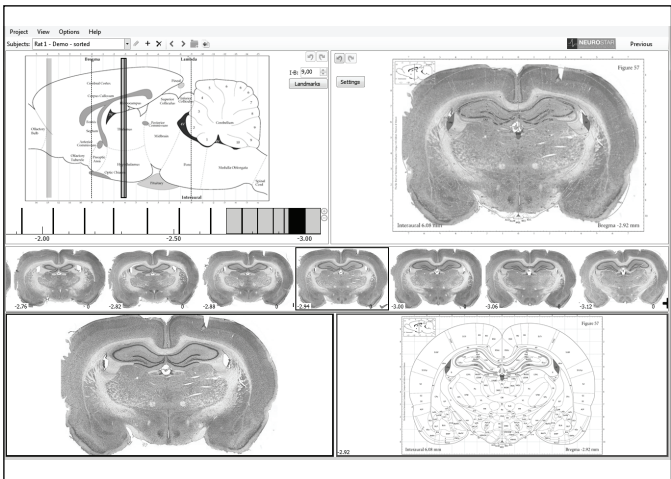
- Bregma Detection
- Camera-Driven Positioning
- Experiment Monitoring
- Video Streaming

# Glass Capillary Injector



- Ultraprecise Nanoinjection
- Wireless Injection Control
- *In Vitro* or *In Vivo* Experiments
- PC and SmartPhone Control

# HistoMatch



- Histology Slice Digitization
- Smart Atlas Matching
- Intuitive Slice Manipulation
- Easy and High Throughput