

M.Sc. (Physics) Jiraporn Luengviriya

Thema:

Spatiotemporal metabolic organization during development of brain cell cultures

Zusammenfassung

Das Gehirn benötigt für eine fehlerfreie Funktion einen großen Energieumsatz, wodurch eine Vergrößerung der neuronalen Kommunikation, allein schon durch die begrenzt Energiezufuhr, beschränkt wird. Dieses Problem kann durch eine Optimierung neuronaler Verbindungen, anstelle einer Zunahme von Neuronen, umgangen werden. Solch eine Reorganisation neuronaler Verbindungen findet während der frühen postnatalen Entwicklung des Gehirns statt.

In dieser Doktorarbeit wurden entwicklungsabhängige Änderungen des Energiestoffwechsels während der Ausbildung neuronaler Netzwerke untersucht, um tiefere Einblicke in die Bedeutung des Energiestoffwechsels für die Optimierung neuronaler Kommunikation zu erhalten. Hippokampale Zellkulturen neugeborener Ratten, welche Neuronen und Gliazellen enthielten, wurden in Nährmedium für 3 Wochen inkubiert. In dieser Zeit wurde der Energiestoffwechsel dieser Zellkulturen während der Ausbildung neuronaler Netzwerke durch Fluoreszenzmessungen verfolgt. Gleichzeitig erfolgte eine chemische Stimulierung der Zellen. Als Indikatoren für den Energiestoffwechsel wurden NAD(P)H und intrazelluläre Protonen gemessen, da diese während der Glykolyse produziert und NAD(P)H anschließend während der mitochondrialen Atmung wieder zu NAD(P)⁺ oxidiert wird. NAD(P)H wurde über dessen Autofluoreszenz gemessen wohingegen zum Nachweis intrazellulärer Protonen (pH_i) ein pH-Indikator verwendet wurde.

Es wurden entwicklungsabhängige Änderungen des Energiestoffwechsels untersucht. Hierzu wurde durch Zugabe von NMDA eine neuronale Aktivität ausgelöst und die Antwort der Zellen mittels NAD(P)H-Fluoreszenz verfolgt. Es konnten progressive Änderungen der NMDA-evozierten Signale während der ersten drei

Wochen *in vitro* beobachtet werden. Dabei traten zwei Minima auf, am 7. Tag *in vitro* (DIV) und am 16 DIV, wodurch ein biphasischer Verlauf entstand, der frühere Messungen anderer Gruppen über den entwicklungsabhängigen Verlauf von Populations-Spike (d.h. eine Änderung des elektrischen Potentials als Folge der Bewegung von Ionen, die an der Entstehung und Propagation von Aktionspotentialen beteiligt sind) Amplituden oder Glutamat Freisetzung in neugeborenen Ratten reproduzierte. Versuche zur Inhibierung der mitochondrialen Atmung durch Kaliumcyanid ergaben, dass die NMDA-evozierte Stimulierung des Energiestoffwechsels hauptsächlich auf die Glykolyse zurück zu führen ist.

Durch Visualisierung des intrazellulären pH-Wertes konnten wandernde Protonenwellen nachgewiesen werden. Diese Wellen wurden durch Inhibierung der mitochondrialen Respiration durch Kaliumcyanid induziert. Gleichzeitig mit diesen Wellen traten auch Netzwerkoszillationen des pH_i auf. Während des Beobachtungszeitraumes (3 DIV-22 DIV) zeigten die meisten Zellen eine biphasische Antwort auf eine Kaliumcyanid-Zugabe. Diese war durch eine anfängliche Ansäuerung und eine nachfolgende Alkalisierung charakterisiert. Die Wellen und Netzwerkoszillationen traten während der Alkalisierungsphase auf, allerdings erst nach dem 14 DIV. NMDA induzierte ähnliche Änderungen im pH_i , mit Ausnahme der Entstehung von Wellen und Netzwerkoszillationen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der Energiestoffwechsel hippokampaler Zellkulturen neugeborener Ratten entwicklungsabhängige Änderungen durchläuft, die zu dynamischen Instabilitäten in Form von wandernden Protonenwellen und Netzwerkoszillationen führen.