

Diplom-Biologe Sören Westerholz

Dissertation: Thyroid hormone modulation of early neocortical network development

Zusammenfassung

Einleitung. GABAerge Interneurone sind ein wichtiger Bestandteil des cerebralen Cortex, da sie durch ihre hemmende Wirkung die Aktivität von erregenden Neuronen in präziser Weise kontrollieren können. Infolgedessen führen Störungen der Entwicklung und Funktion dieser GABAergen Neurone zu einer Reihe von neurologischen und psychiatrischen Störungen, wie z.B. Autismus, Epilepsie und Schizophrenie. Die Entwicklung von GABAergen Interneuronen wird sowohl durch intrinsische wie auch extrinsischen Faktoren beeinflusst. Ein wichtiger intrinsischer Faktor für die Ausbildung von neuronalen Netzwerken ist die sogenannte spontane Netzwerkaktivität, die während der frühen Netzwerkentwicklung das Überleben und die Verknüpfung von Neuronen steuert. Das Aufkommen spontaner Aktivität ist eine generelle Eigenschaft sich entwickelnder neuronaler Strukturen und ist gekennzeichnet durch synchrone Aktivität in einer großen Zahl von benachbarten Neuronen. Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang, dass GABAerge Neurone und die Netzwerkaktivität sich während der Entwicklung gegenseitig beeinflussen, da die Reifung GABAerge Zellen einerseits aktivitäts-abhängig ist, andererseits GABAerge Transmission die Netzwerkaktivität durch eine vorübergehende erregende Wirkung auch fördert. Ein wichtiger extrinsischer Faktor für die Entwicklung GABAerger Interneurone ist das Schilddrüsenhormon Trijodthyronin (T3). Generell ist T3 ein wichtiger Entwicklungsfaktor für eine Vielzahl von Organen einschließlich des Gehirns. Dort steuert es die Migration und Differenzierung von Neuronen und deren Synaptogenese. Ein Mangel an T3 führt zu mentaler Retardierung und kann besonders während der späten embryonalen und frühen postnatalen Phase irreversible Schädigungen verursachen.

Ziel und Methoden. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Einflüsse von T3 während der frühen Entwicklung von neuronalen Netzwerken zu untersuchen. Ein besonderes Augenmerk wurde dabei auf die voneinander abhängige Entwicklung von GABAergen Neuronen und spontaner Netzwerkaktivität gelegt. Die Ergebnisse sollen das grundlegende Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen verbessern, die zur Entwicklung von GABAergen Neuronen und damit der funktionellen Reifung des Cortexes beitragen. Die Versuche wurden an neuronalen Zellkulturen durchgeführt, die aus dem embryonalen Cortex von Ratten gewonnen wurden. Die Aktivität der Neurone wurde mit einem Calciumsensitiven Farbstoff gemessen. Des Weiteren wurden die Zellkulturen immunzytochemisch gefärbt, um GABAerge Neurone sichtbar zu machen.

Ergebnisse. Die Ergebnisse zeigen, dass T3 sowohl die Frequenz der spontanen Netzwerkaktivität als auch die Zahl der glutamatergen und GABAergen Synapsen erhöht. Gleichzeitig beeinflusst T3 die Entwicklung von Neuronen in Zelltyp-spezifischer Weise, wobei die deutlichsten Veränderungen in der Zunahme in der Zellgröße und des Axonwachstums von sogenannten großen L-GABAergen Interneuronen und in der erhöhten Dichte von kleinen S-GABAergen Interneuronen gemessen wurde. Die L-GABAergen

Neurone bilden nach Stimulation mit T3 eine Vielzahl von GABAergen Boutons und weitverzweigte Axone um die Zellkörper von nicht-GABAergen Neuronen aus. Interessanterweise erhöhte T3 auch die Zellgrößen wenn die neuronale Aktivität blockiert wurde, was einen direkten Einfluss von T3 auf das Neuronwachstum vermuten lässt. Allerdings wuchsen die GABAergen Zellen nur dann optimal, wenn sowohl das Hormon als auch neuronale Aktivität vorhanden waren. Die Ausbildung der typische Axonstruktur mit vielen Boutons und feinen Verästelungen durch T3 konnte außerdem mit einem Inhibitor des Neurotrophinrezeptors TrkB verhindert werden, was vermuten lässt, dass das Neurotrophin BDNF eine Rolle bei der Ausprägung der von T3 induzierten Axonstruktur spielt. Darüber hinaus erhöhte T3 die Expression des Kalium-Chlorid-Cotransporters KCC2, der für die hemmende Wirkung von GABA wichtig ist, und beschleunigte damit die für die Entwicklung typische Umkehrung von einer erregenden zu einer hemmenden Wirkung von GABAerger Transmission in nicht-GABAergen Neuronen. Abschließende Experimente haben gezeigt, dass die von T3-Mangel verursachten Entwicklungsstörungen nicht durch eine spätere Stimulation mit T3 nach der zweiten Kulturwoche korrigiert werden können, was darauf hinweist, dass T3-Mangel während der ersten zwei Kulturwochen dauerhafte oder zumindest lang anhaltende Defizite in der Axonausbildung L-GABAerger Neurone, der Dichte S-GABAerger Neurone und der Frequenz spontaner Netzwerkaktivität verursacht.

Diskussion. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass T3 die Reifung des kortikalen GABAergen Systems auf komplexe und in einer Zelltyp-spezifischen Weise moduliert und damit zur funktionalen Reifung von jungen kortikalen Netzwerken beiträgt. Besonders die Veränderungen der L-GABAergen Neurone könnten eine wichtige Rolle bei der Entstehung pathologischer Störungen bei T3-Mangel spielen. Da T3 die Netzwerkaktivität erhöht und diese wiederum die Reifung junger Netzwerke beeinflusst, könnte T3 hierdurch weitere indirekte Effekte auf Entwicklung von Neuronen ausüben. Die lang andauernden Veränderungen der Netzwerkstruktur verdeutlichen zudem die wichtige Bedeutung von T3 während der frühen Gehirnentwicklung.

Diplom-Biologe Sören Westerholz

Dissertation: Thyroid hormone modulation of early neocortical network development

Summary

GABAergic signalling plays a crucial role in the precise control of neuronal activity patterns. The early development of GABAergic neurons is regulated by intrinsic and extrinsic factors, including the thyroid hormone triiodothyronine (T3). Furthermore, GABAergic neurons develop in an intricate interrelationship with spontaneous network activity, which is a general feature of developing neuronal structures and plays a crucial role in the formation of neural networks by modulating survival and connectivity of neurons. The aim of this work was to study the impact of thyroid hormone T3 on early network development, especially on the development of GABAergic neurons and spontaneous network activity, in neuronal cultures prepared from embryonic rat cortex. The results show that T3 increases the overall density of glutamatergic and GABAergic synapses and enhances the frequency of early spontaneous network activity. In parallel, T3 affects neuronal development in a population specific manner, especially promoting somatic and axonal growth of large GABAergic interneurons and the density of small late born GABAergic neurons. In the presence of T3 large GABAergic interneurons form numerous GABAergic boutons and conspicuous axonal arborizations around cell bodies of non-GABAergic neurons. Interestingly, blocking neuronal activity by TTX or glutamate receptor blockers reveals a thyroid hormone-mediated component on somatic growth, but optimal growth of large GABAergic neurons is both activity and hormone-dependent. Additionally, the characteristic axonal innervation pattern could be prevented by the tropomyosin-related kinase B (TrkB) receptor inhibitor K252a, suggesting the involvement of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) signalling in T3-dependent axonal growth. Further, T3 enhanced the expression of the potassium-chloride cotransporter 2 (KCC2), and accelerated the developmental shift from depolarizing to hyperpolarizing GABAergic signalling in non-GABAergic neurons. Finally, recovery experiments indicate that T3-deprivation during the first two weeks *in vitro* induced long-lasting deficits in the patterning of GABAergic axons, the density of small late born GABAergic neurons and the frequency of spontaneous network activity. This critical period parallels the phase of depolarizing GABAergic signalling as revealed by calcium imaging experiments. Taken together, the results indicate that T3 regulates the maturation of the cortical GABAergic system in a complex and subpopulation specific manner and thus contributes to the functional maturation of early cortical networks.