

# Eine kursorische Einführung in ausgewählte Methoden der Neurophysiologie

Anhand einer bescheidenen Anfängerarbeit

und dem Paper:

Chen BT, Yau HJ, Hatch C, Kusumoto-Yoshida I, Cho SL, Hopf FW, et al. Rescuing cocaine-induced prefrontal cortex hypoactivity prevents compulsive cocaine seeking. *Nature*. 2013;496(7445):359-62.

**Daniel Bormann**

# On the influence of the dietary intake of chocolate-enriched food on population spike wave–ripple activity in the mouse hippocampus

**Daniel Bormann**

supervised by

**Assoc. Prof. Dr. Francisco Monje Quiroga**

Abteilung Neurophysiologie und -pharmakologie

Zentrum für Physiologie und Pharmakologie

Schwarzspanierstraße 17, 1090 Wien

# Was ich euch gerne über Kakao erzählen will, in weniger als 2 Minuten

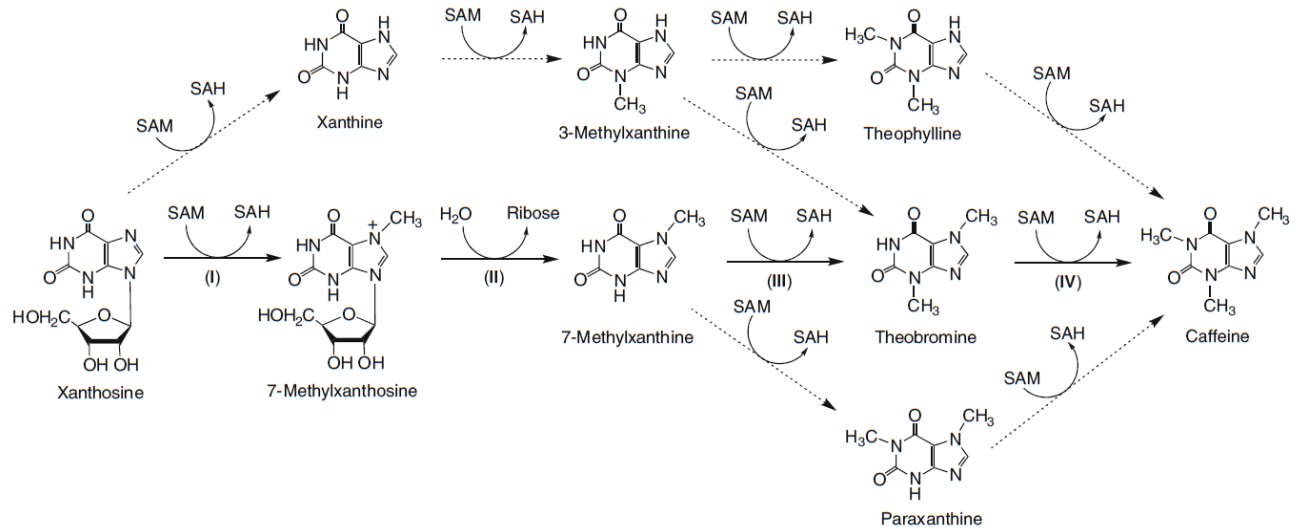


FIG. 1. (a) Cocoa tree (b) Cabossides  
Camellia sinensis and methylxanthine pathway



Unter evolutionärem Druck (e.g. Pathogene, Herbivore) gelang es einigen Mitgliedern der *Rubiaceae*, *Theaceae* and *Sterculiaceae* Familien Alkylxanthenes zu synthetisieren und anzureichern (vermutlich mit allelopathischer oder autotoxischer Funktion)

Dank der kuriosen Anziehung, welche psychoaktive Substanzen auf den Menschen auszuüben scheinen, wurden zunächst die Völker Süd- und Mittelamerikas, sowie Afrikas und Asiens auf den erregenden Effekt dieser Pflanzen aufmerksam.



FIG. 2. Montezuma drinking chocolate



FIG. 3. Columbus and Montezuma

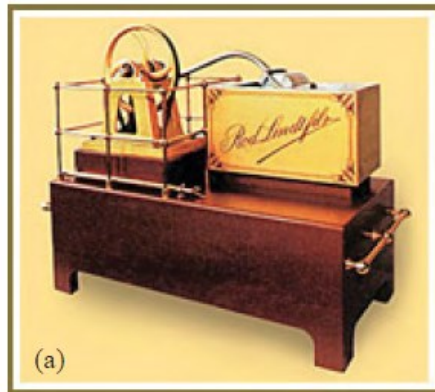


FIG. 4. (a) Conching machine (b) Rudolph Lindt

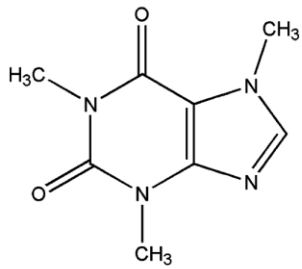
Etwas unfreiwillig teilten sie dieses Wissen mit den Spaniern, Briten, Portugiesen und Niederländern.

Vor allem die Schweizer befassten sich dann intensiv mit der Veredelung und dem Vertrieb dieser Zutat

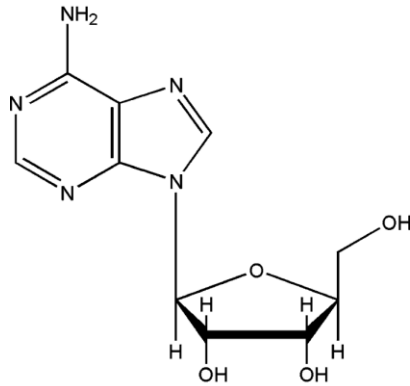
# Potential hazards of methylxanthine containing products

- Consumption of the equivalent of < 400mg of caffeine per day probably harmless or even protective.
- Certain subgroups at risk: children, the elderly, pregnant women, patients with preexisting heart conditions and certain neurological and neuropsychiatric disorders, such as epilepsy and sleep disturbances.
- New onset seizures after methylxanthine consumption, in patients without diagnosed epilepsy (Iyadurai and Chung 2007)
- Increases in epileptiform discharges in diagnosed epilepsy patients (Mackow, Krishnan et al. 2016)
- Decrease of the efficacy of antiepileptic drugs (Chroscinska-Krawczyk, Jargiello-Baszak et al. 2011)

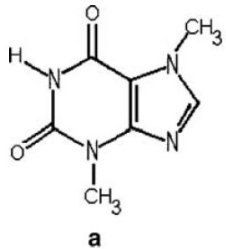
# On the Pharmacodynamics of Methylxanthines



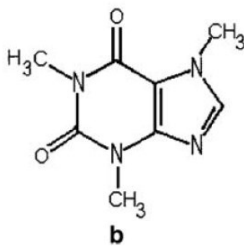
Caffeine



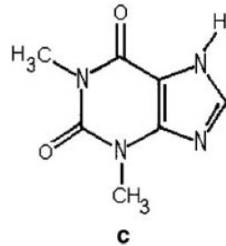
Adenosine



a



b



c

a.) Theobromine b.) Caffeine c.) Theophylline

→ Methylxanthines bind to adenosine receptors with micromolar affinity, and antagonize physiological adenosine binding

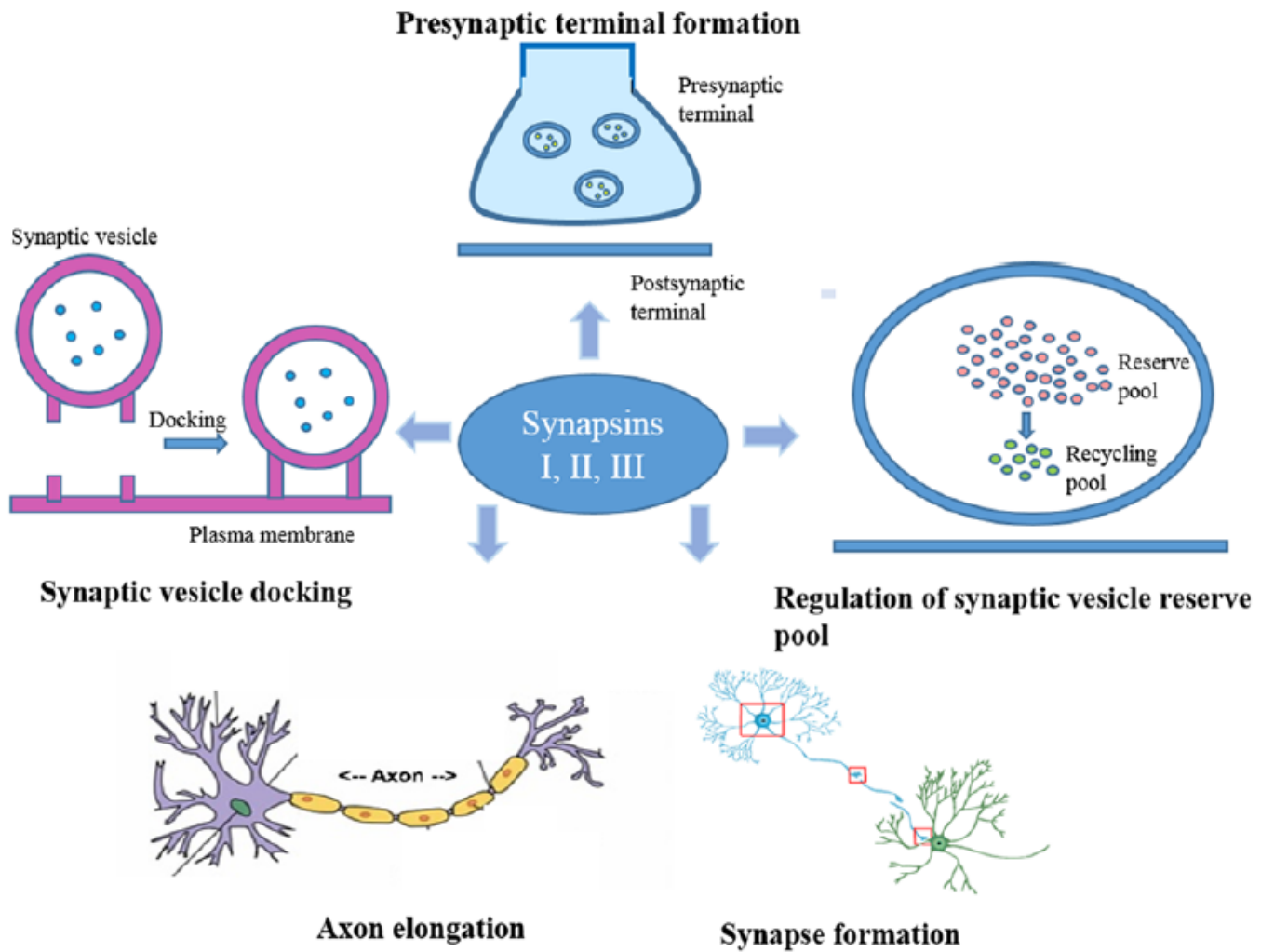
→ 10-60x higher dose necessary to inhibit Phosphodiesterase

→ Up to 250x higher dose necessary to activate RyR in ER → intracellular Calcium release

→ Direct inhibition of GABA<sub>A</sub> receptors unlikely in dietary doses

Kurzgesagt: - Inhaltstoffe im Kakao wirken antagonistisch am inhibitorisch wichtigen Adenosinsystem

# Synapsin



- Synapsin I/II double knockout mice exhibit an epileptogenic phenotype (Etholm and Heggelund 2009),
- SYN 1 loss of function mutations in humans have been associated with epilepsy (Fassio, Patry et al. 2011).
- A2A-receptor impairment leads to alterations in the function of synaptic proteins (Moscoso-Castro, Lopez-Cano et al. 2017)

# Objectives of the thesis proposed

- Elucidate the influence of the sustained intake of cocoa on epileptiform-activity in the hippocampus, as measured by the examination of its electrophysiological correlates and associated altered protein expression.
  - Why cocoa and not just theobromine?
  - When was the last time you had a nice bar of theobromine, when was the last time you ate chocolate ?
- Ecological validity + General lack of cocoa animal models in epilepsy research

Note that cocoa contains around 380 known chemicals, at least 10 of them are psychoactive.



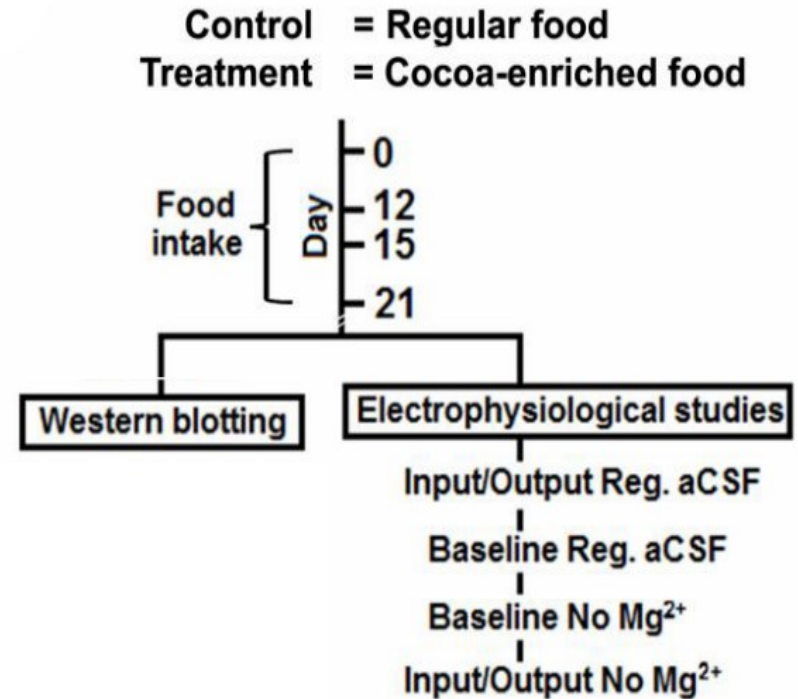
# Open questions addressed – General study design

- Does the continuous intake of cocoa-based dark chocolate elicit **heightened neuronal excitability** in the hippocampus of C57BL/6 wild type mice (6 controls vs. 8 cocoa treated)?

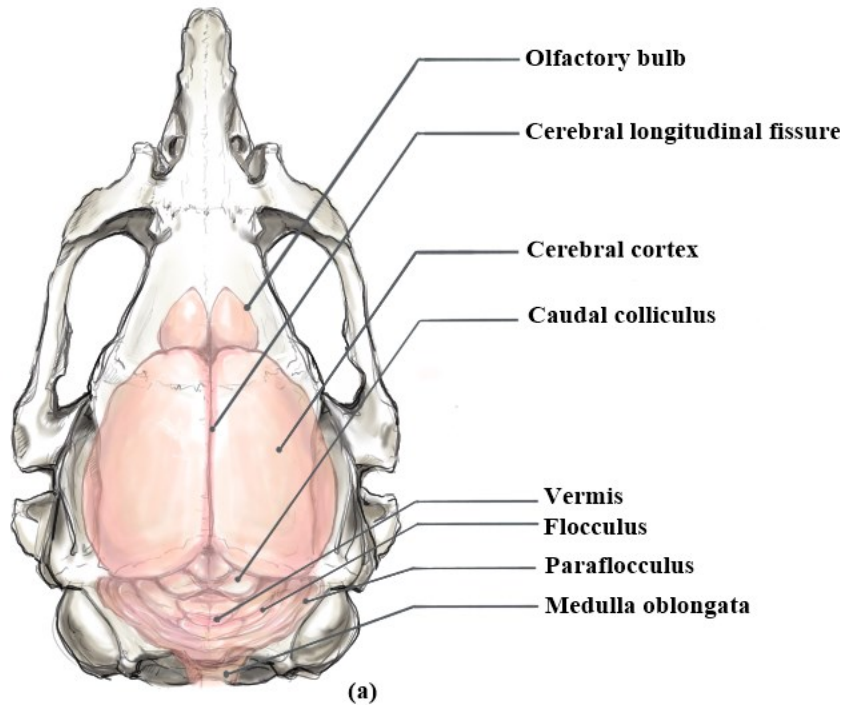
-> Electrophysiological approach

- Does the continuous intake of cocoa-based dark chocolate coincide with **altered expression of vesicular** (notably **Synapsin**) and **transmembrane protein** expression (notably **GABA-A receptors** and **adenosine receptors**)?

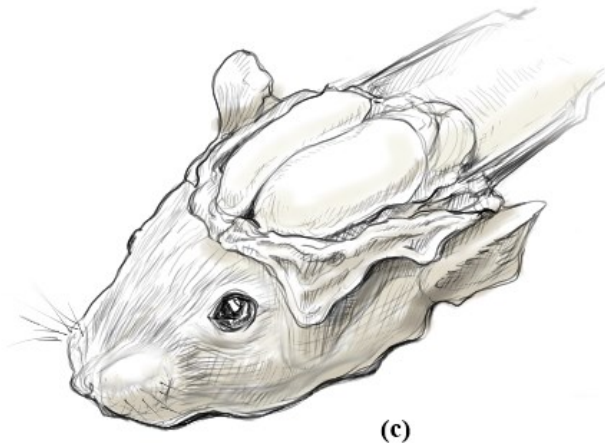
-> Western Blots

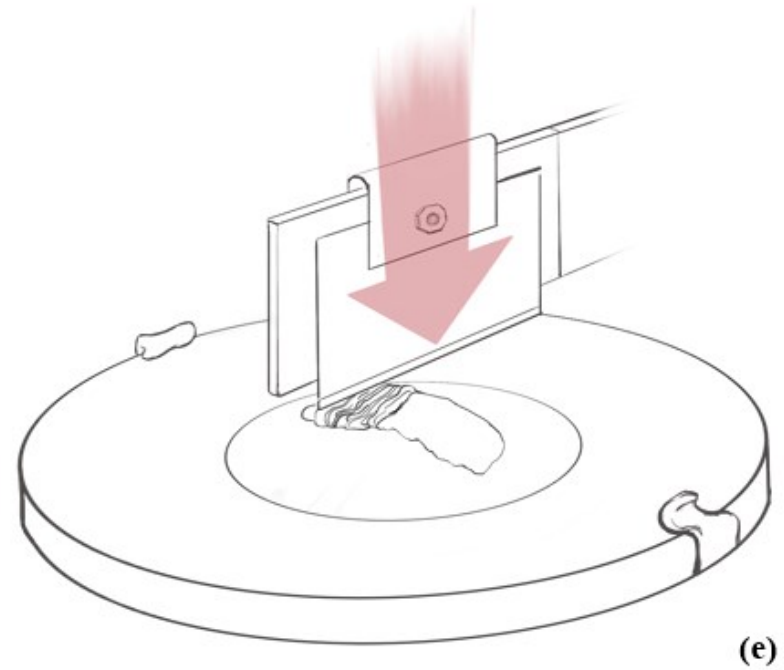
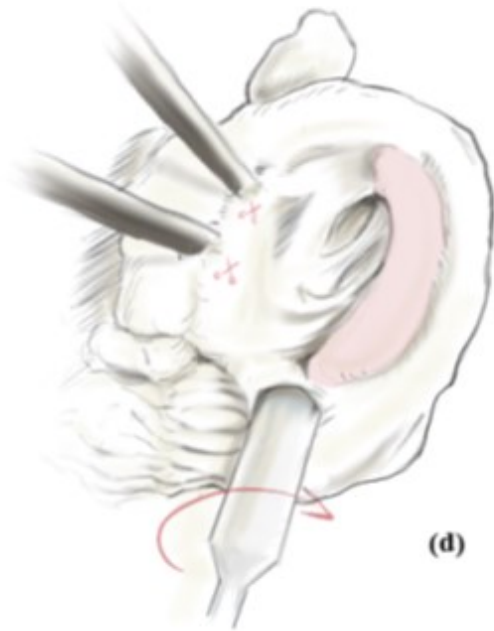


# Präparation der HC-Hirnschnitte



(a) Lage des murinen Gehirns  
(b) Hirnentnahme





(d) Präparation des Hippocampus  
(e) Anfertigung der Schnitte

## Abbreviations

**CA 1-4:** Cornu Ammonis areas 1 – 4

CA 1 pyramidal cells depicted in purple

CA 3 pyramidal cells depicted in red

**DG (A):** Dentate gyrus (Apex)

**DG (H):** Dentate gyrus (Hilus)

**DG (IB):** Dentate gyrus (Inner Blade)

**DG (OB):** Dentate gyrus (Outer Blade)

DG granular cells depicted in orange

**EC:** Entorhinal cortex

**LPP:** Lateral perforant pathway (light green)

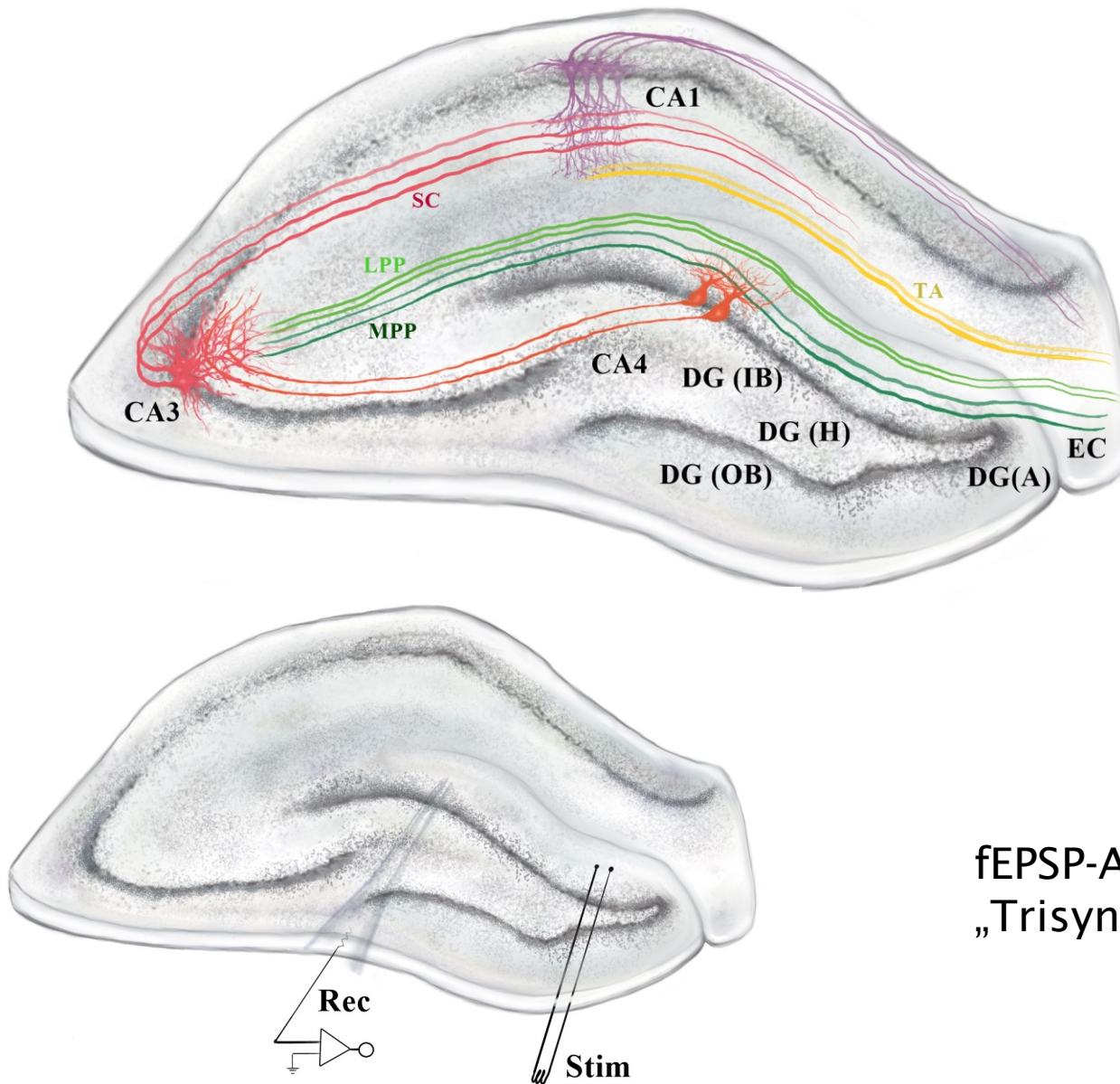
**MPP:** Medial perforant pathway (dark green)

**SC:** Schaffer collateral (red)

**TA:** Temporoammonic pathway (yellow)

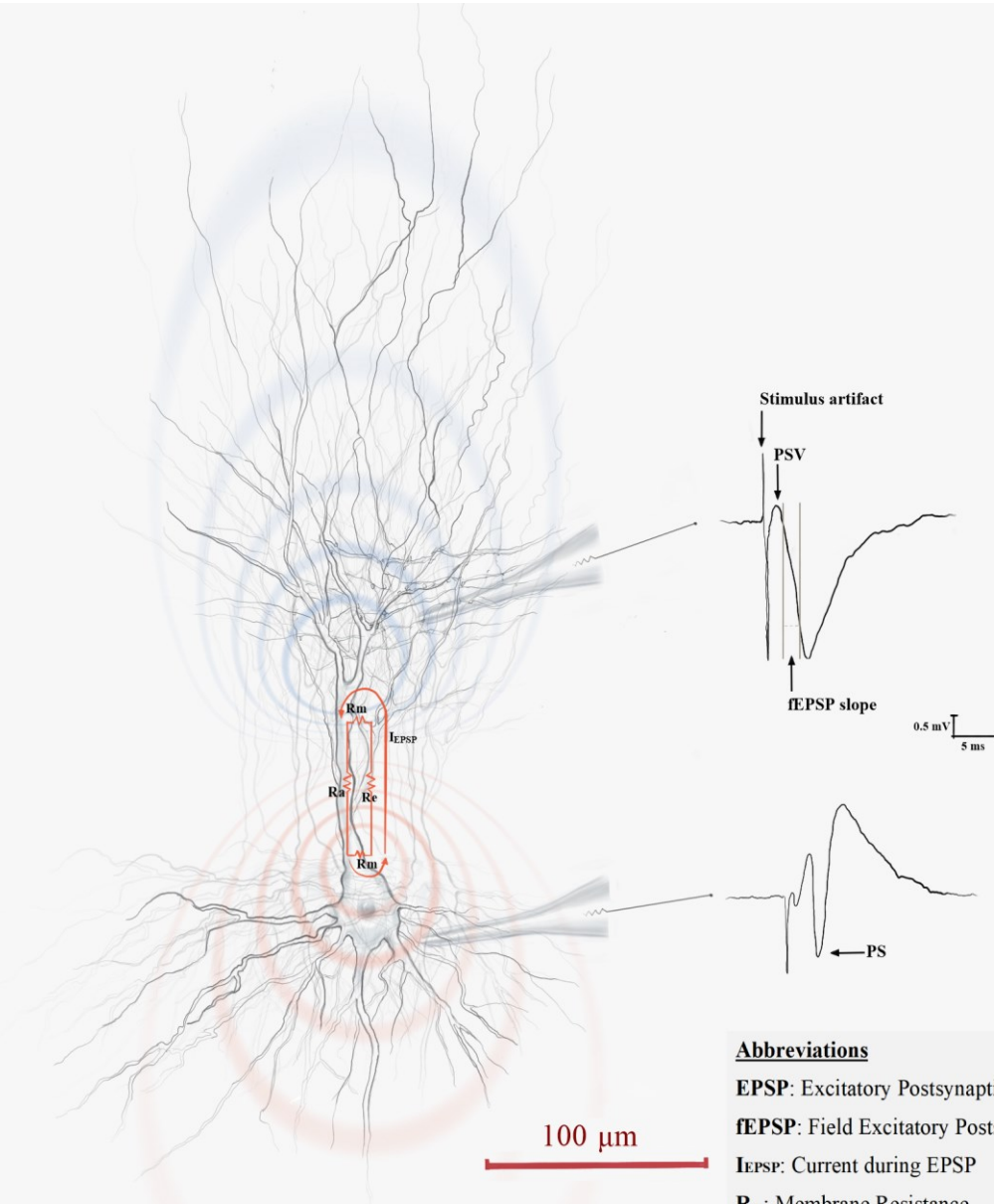
**Stim:** Stimulating electrode

**Rec:** Recording electrode



fEPSP-Aufnahmen im  
„Trisynaptic pathway!“

# Rational der Erfassung extrazellulärer Potentialdifferenzen



## Abbreviations

EPSP: Excitatory Postsynaptic Potential

fEPSP: Field Excitatory Postsynaptic Potential

$I_{EPSP}$ : Current during EPSP

$R_m$ : Membrane Resistance

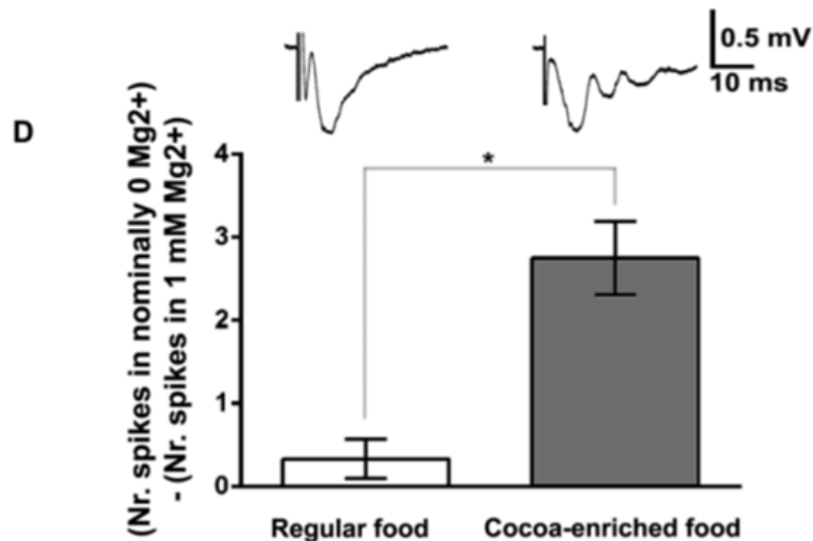
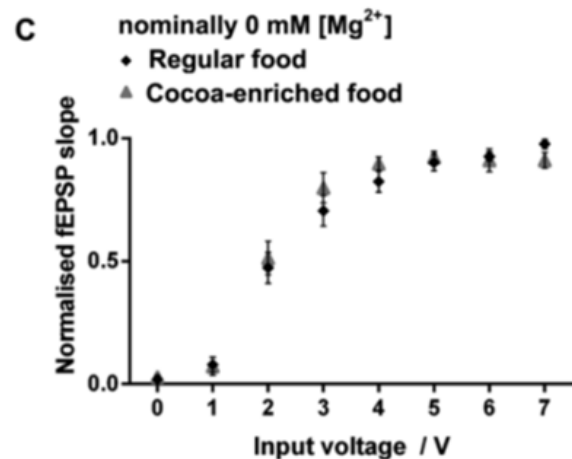
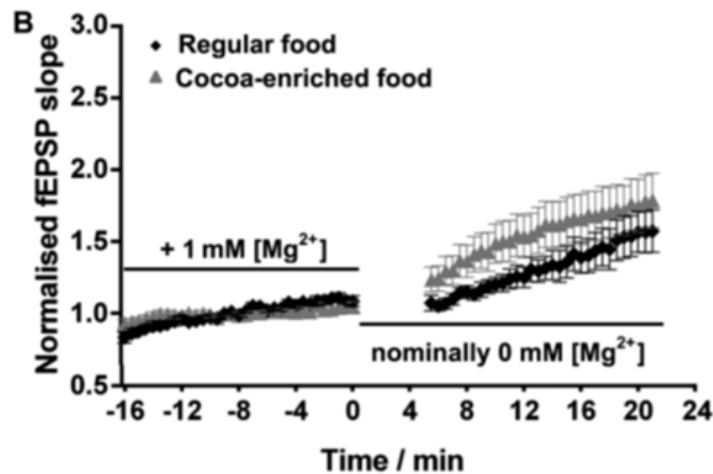
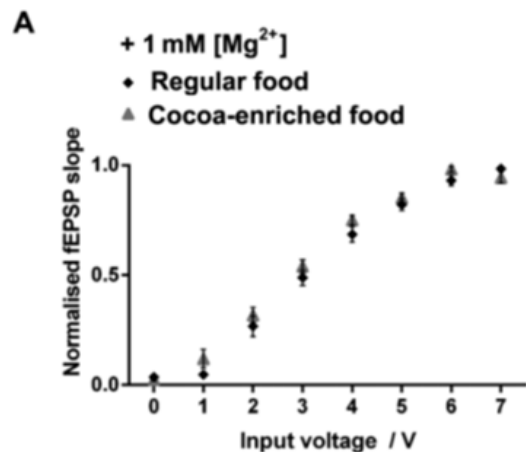
$R_a$ : Cytoplasmatic Resistance

$R_e$ : Resistance of the extracellular space

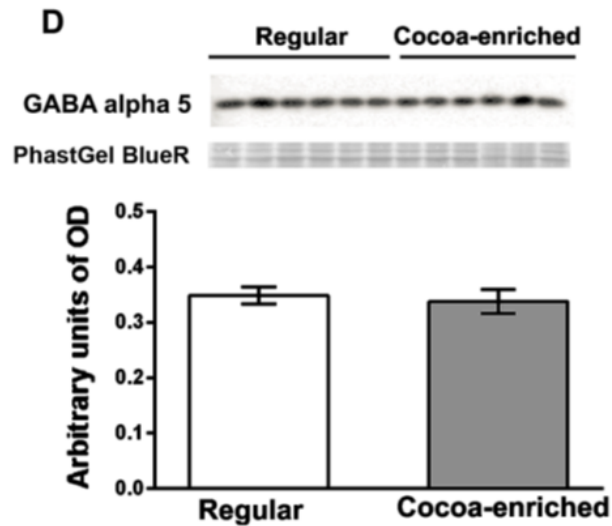
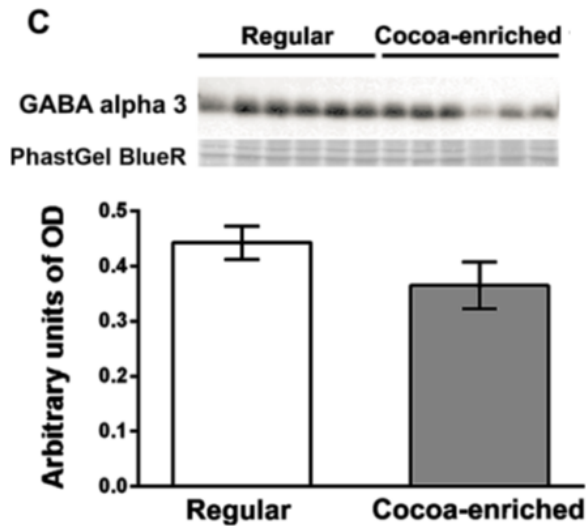
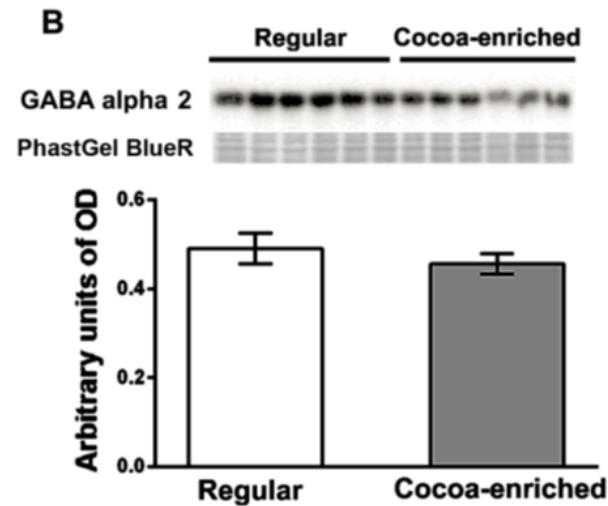
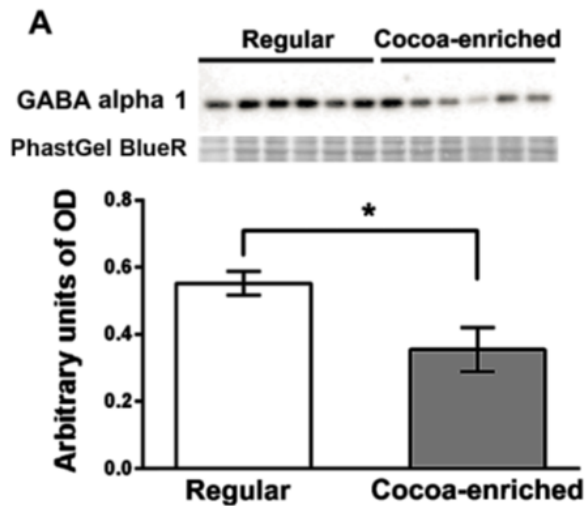
PSV: Presynaptic volley

PS: Population spike

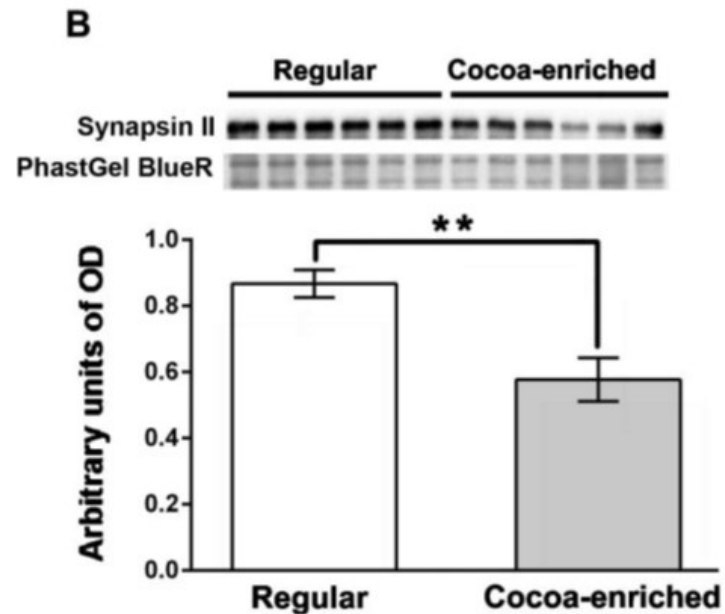
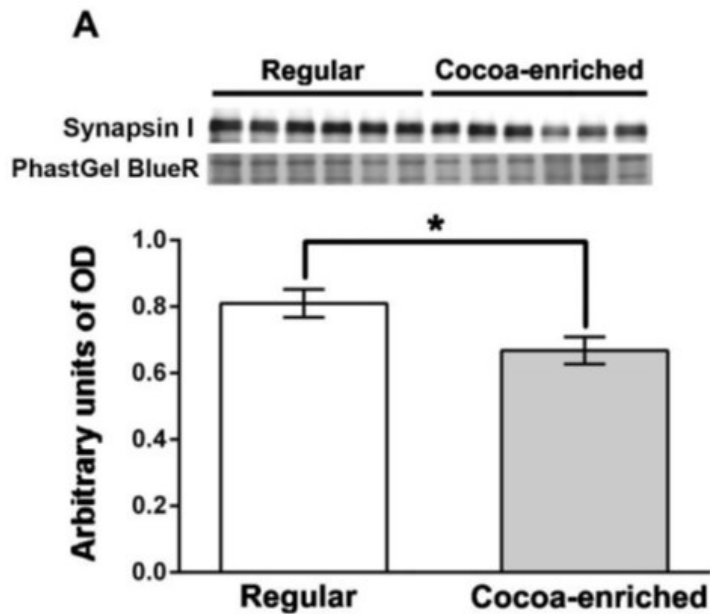
# Ergebnisse - Elektrophysiologie



# Ergebnisse – Western Blots



# Ergebnisse – Western Blots





# Conclusio

- In den elektrophysiologischen Experimenten zeigte sich eine **erhöhte neuronale Erregbarkeit** in den Hirnschnitten jener Versuchstiere, welche mit **kakaohaltiger Nahrung** gefüttert wurden
- Dieser könnten die beobachteten **Veränderungen in der Expression der GABAA  $\alpha$ 1 Rezeptoruntereinheit und der Synapsine I and II** zu Grunde liegen.
- Jene Proteine tragen wesentlich zur **Erregbarkeithomeostase und Neurogenese** bei.
- Diese Beobachtungen könnten dem **Einfluss der Methylxanthine auf die Epilepto- und Ictogenese** zu Grunde liegen.
- Aufgrund der entscheidenden Rolle des GABA-A Rezeptors und der Synapsine I und II in der **Neurogenese** und der stark **eingeschränkten Elimination der Methylxanthine in Schwangeren, Feten und Neugeborenen** werden weitere Studien zum **Einfluss methylxanthine haltiger Speisen und Getränke auf das sich entwickelnde Nervensystem** vorgeschlagen.

Sophisticated Neuroscience – Optogenetics am Beispiel der Arbeit:

Rescuing cocaine-induced prefrontal cortex hypoactivity prevents compulsive cocaine seeking.

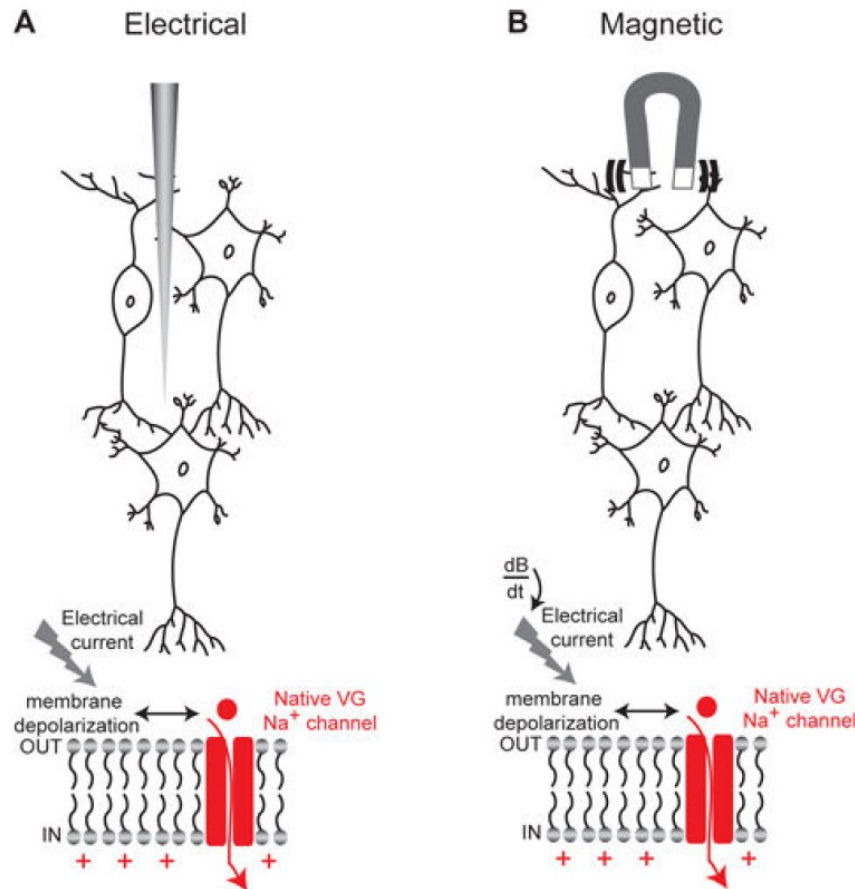
Chen et al. (2013)

# Die grundlegende Motivation hinter der Entwicklung der Methode

“By driving the **activity of a specific set of neurons**, it would be possible to **determine what behaviors, neural computations, or pathologies** those neurons were able to **cause**. And by **silencing the activity of a specific set of neurons**, it would be possible to determine **what brain functions, or pathologies, those neurons were necessary for.**”

Edward S. Boyden (einer der Väter der „optogenetics“ Methode)

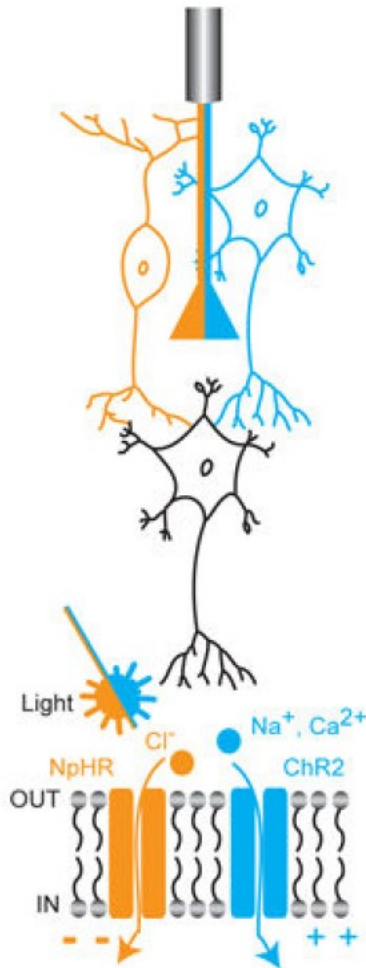
# Konventionelle Methoden zur Stimulation erregbarer Zellen



**A,B.** Extrazellulärer kapazitiver Strom (A) bzw. rasch wechselnde magnetische Felder ( $dB/dt$ ) (B) induzieren eine Depolarisation der Membran -> Öffnung nativer Natriumkanäle -> Aktionspotential der Zelle.

→ UNSELEKTIV über eine bestimmte morphologisch begrenzte Region!

## C Optogenetic



# Der entscheidene Unterschied

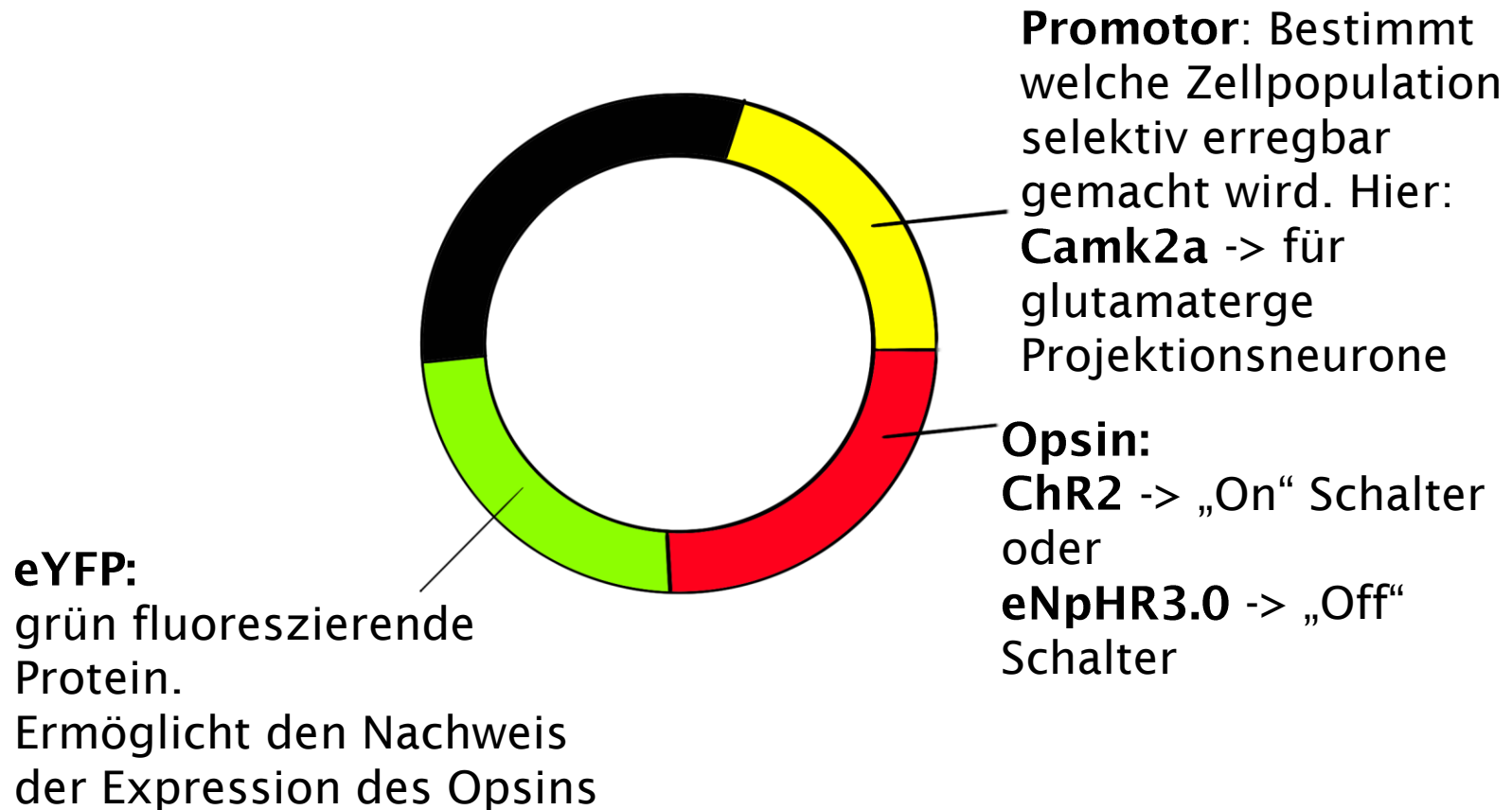
Zelltyp-spezifische Stimulation/Inhibition einer Neuronensubpopulation.

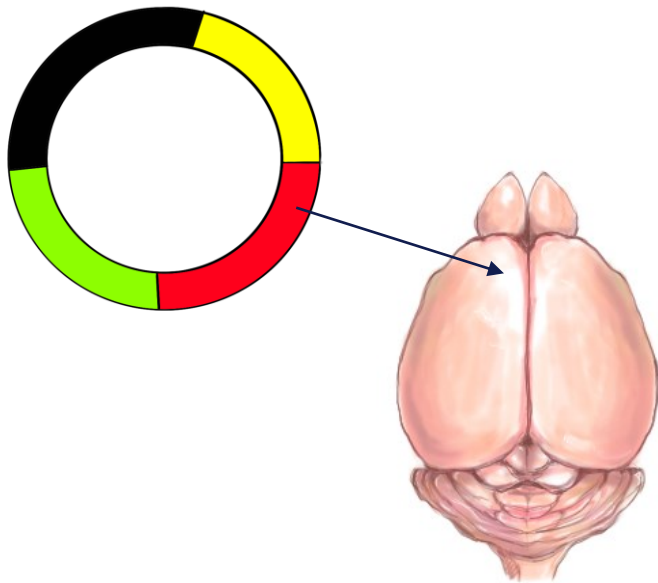
Nur jene Zellen welche einen lichtsensitiven exzitatorischen Kationenkanal (z.B. ChR2 = channelrhodopsin 2) tragen werden durch blaues Licht erregt.

Auch eine gezielte Inhibition ist möglich.  
(Bsp.: Halorhodopsin NpHR -> eine Chloridpumpe)

# Wie bekommt man diesen „Schaltknopf“ in die gewünschten Zellen und kann diese dann beeinflussen ? Chen et al. (2013) - Methods

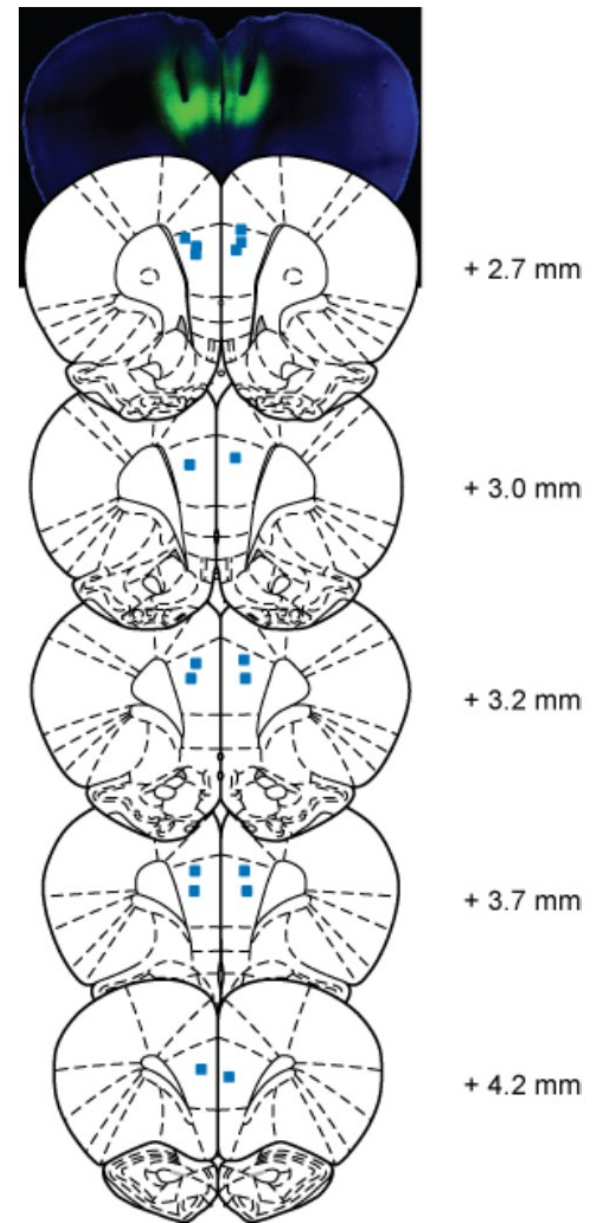
**Stark vereinfacht:**

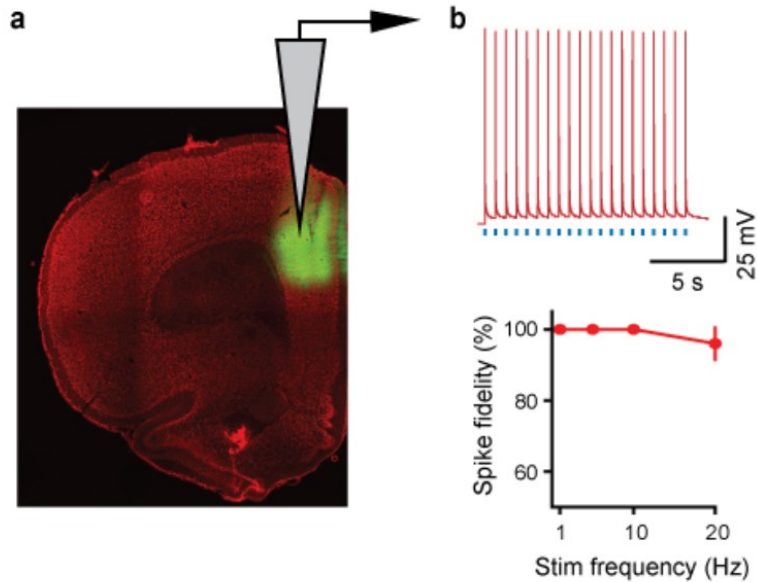




Das Plasmid wird mittels Adeno-assoziiierter Viren (AAV) (hier  $10 \times 10^{12}$  infektiöser Einheiten pro ml) in die gewünschte Region (hier PFC) mittels Injektion eingebracht, in der selben Prozedur werden auch die Elektroden installiert.

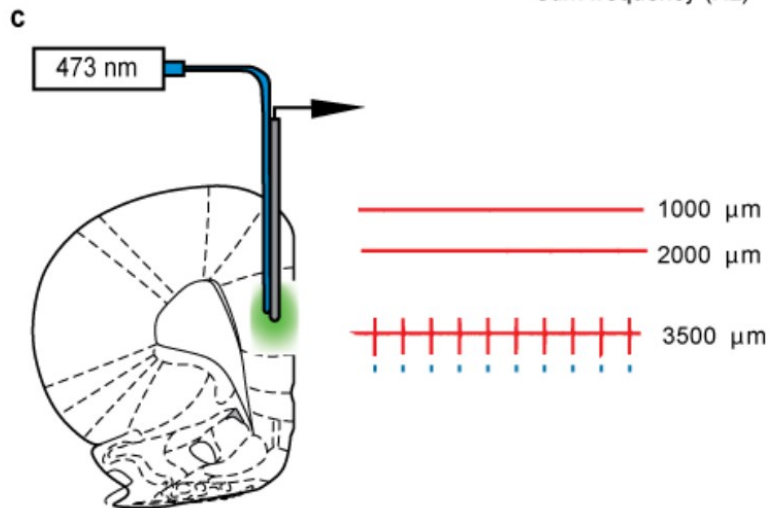
<https://www.youtube.com/watch?v=UBPtYoISgq4>





a.) ChR2-eYFP in grün

b.) Sample trace (top) and average data (bottom) of action potentials in deep-layer pyramidal neurons in the PL evoked by a 5-ms light pulse

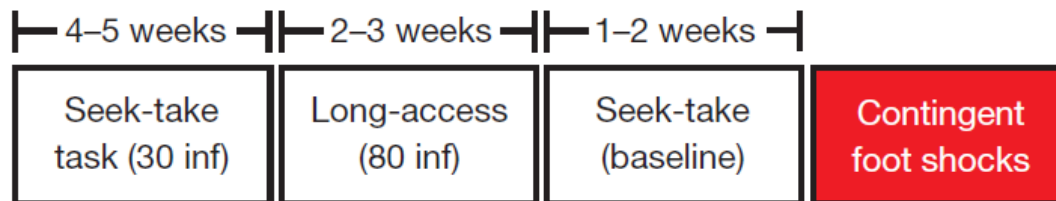


c.) in vivo optrode recording setup:

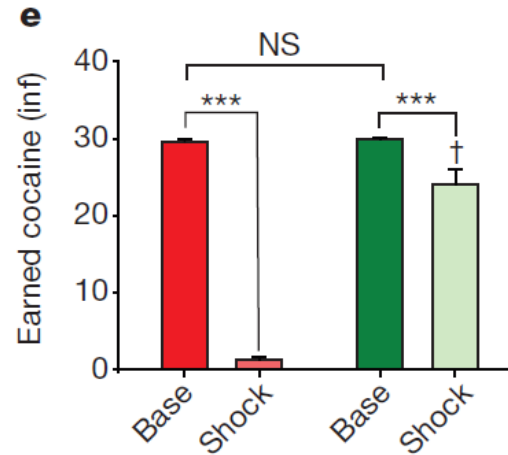
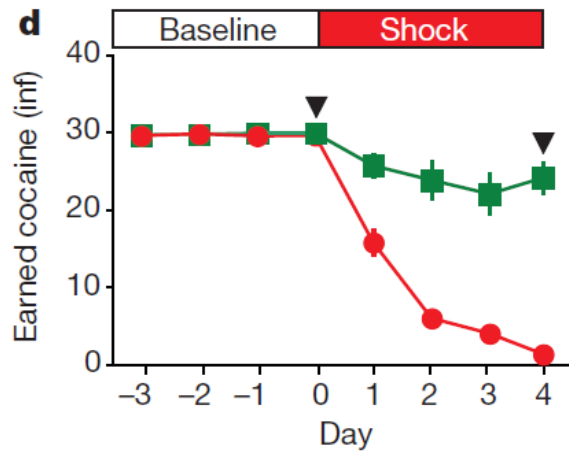
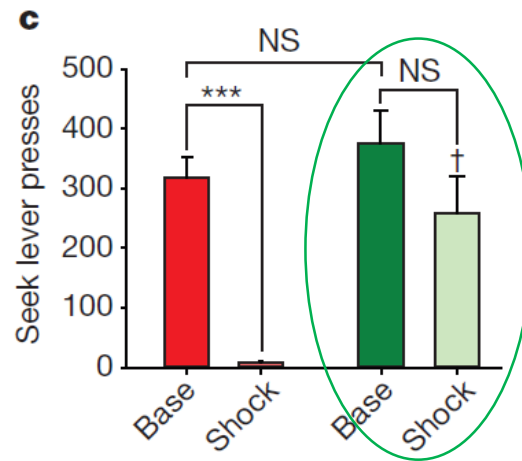
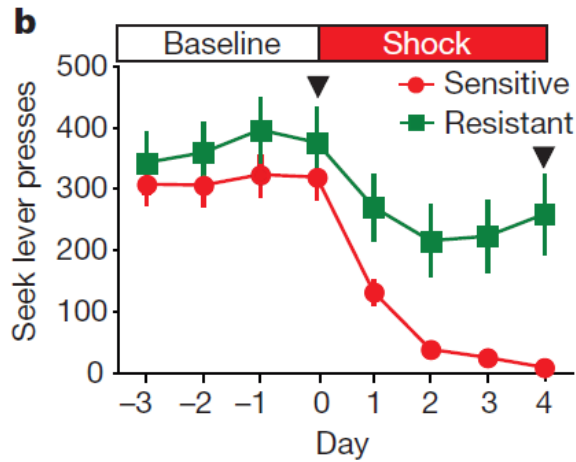
Illustriert dass nur ab der gewünschten Tiefe von unter 3000  $\mu\text{m}$  eine Erregbarkeit mittel 473nm Licht induziert wurde.



- Den Ratten wurde auch ein „ZVK“ zur Applikation des Kokains gelegt.
- Nach Abschluss aller invasiven Eingriffe wurde den Tieren in mehreren Phasen, von insgesamt 6- 8 Wochen eine Kokainabhängigkeit antrainiert. Die Ratten lernten eine Folge von Hebeln in ihrem Käfig zu bedienen, welcher eine Kokainkurzinfusion folgte.
- Das Betätigen des „seek“ Hebels, nach Ablauf eines bestimmten Intervalls (z.B. 5s) schaltet einen „take“ Hebel frei, dessen Betätigung zur Infusion der Substanz führt.
- In diesem Fall müsste die Ratte auch nach 5s noch auf den „seek“ Hebel pressen um den take Hebel freizuschalten.



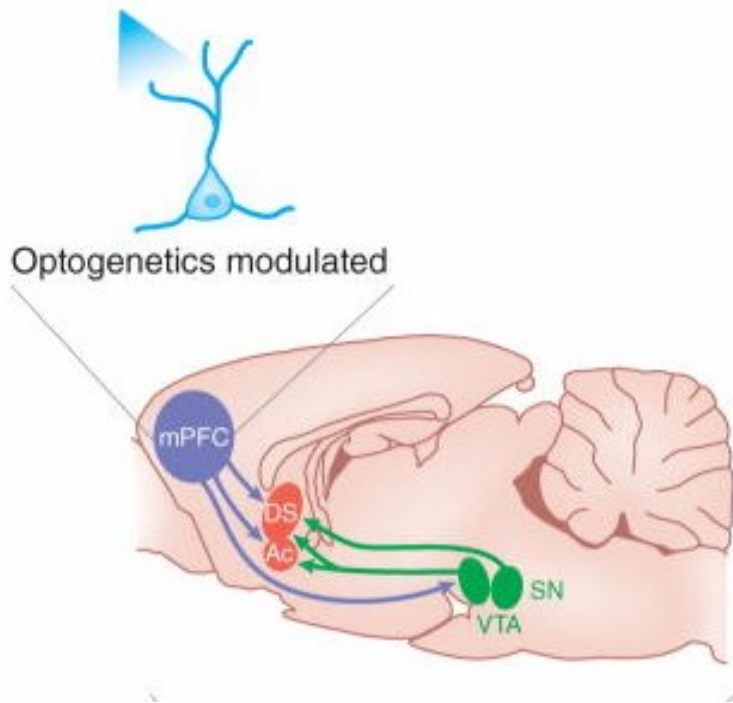
Anschließend wurden 30% aller „Seek“-Hebelbetätigungen mit einem elektrischen Schmerzreiz bestraft.  
-> Bestrafungsphase



- 14 von 46 Ratten waren „Schockresistent“, d.h. sie verdienten sich in der letzten „Bestrafungsphase“ >10 Infusionen, trotz Schmerzreiz

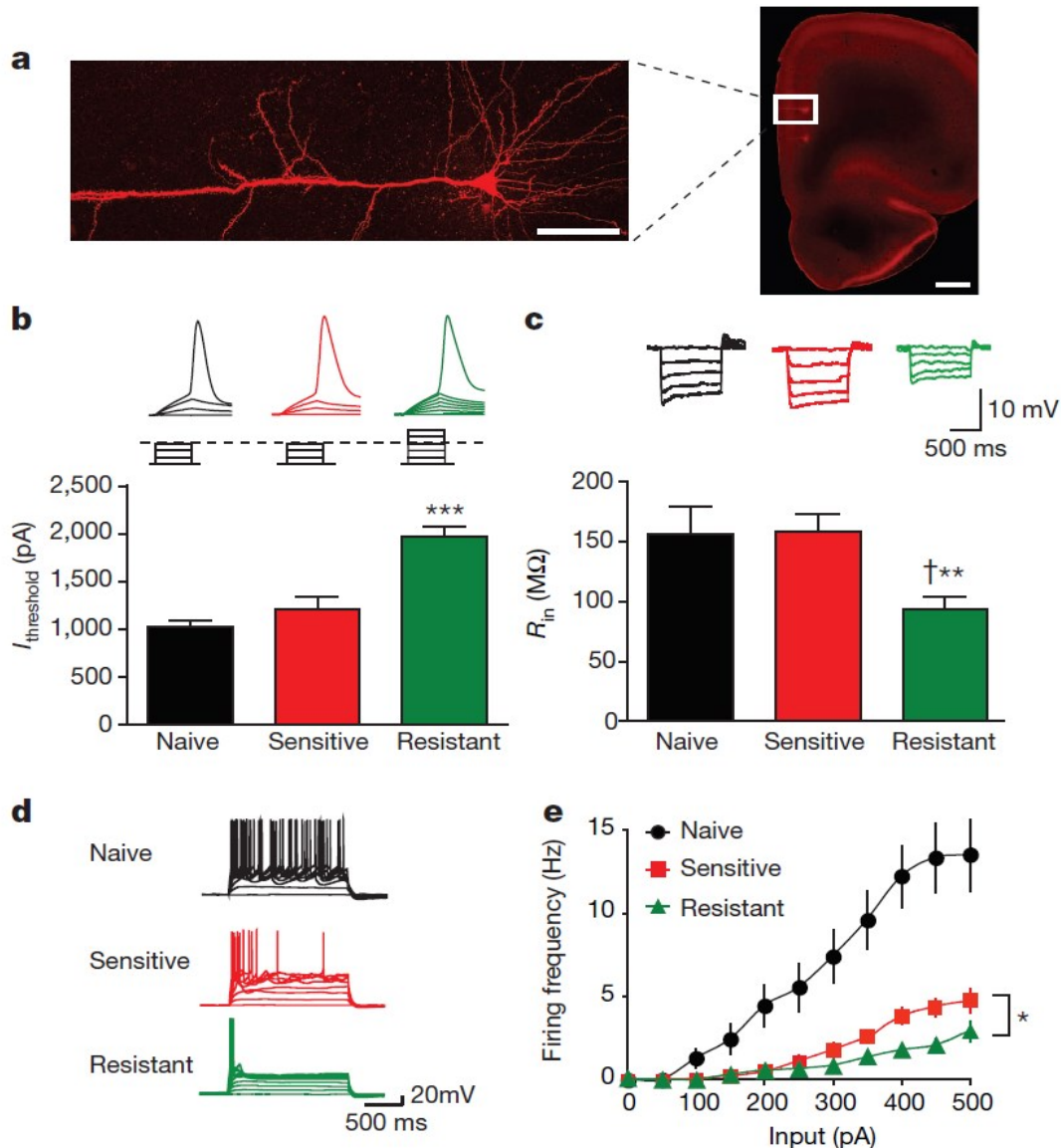
- **Hypothesen:**

Chronischer Kokainkonsum führt zu (I) einer **prelimbischen** (in Menschen präfrontalen) **Unterfunktion**, (II) wodurch die frontale Kontrolle über das Suchtverhalten im Verlauf des Substanzmissbrauchs verloren geht.



## (I) Ex vivo Teil der Studie:

### Nachweis der **Unterfunktion** in Neuronen des **mPFC**



- B.) Höhere Reizschwellen in den Schockresistenten Ratten
- C.) Geringere „Input R“, d.h. es wird mehr Strom benötigt für eine Veränderung der Membranspannung
- D.) Nach Kokainabusus können die mPFC Neurone keine hochfrequenten AP Salven mehr aufbauen

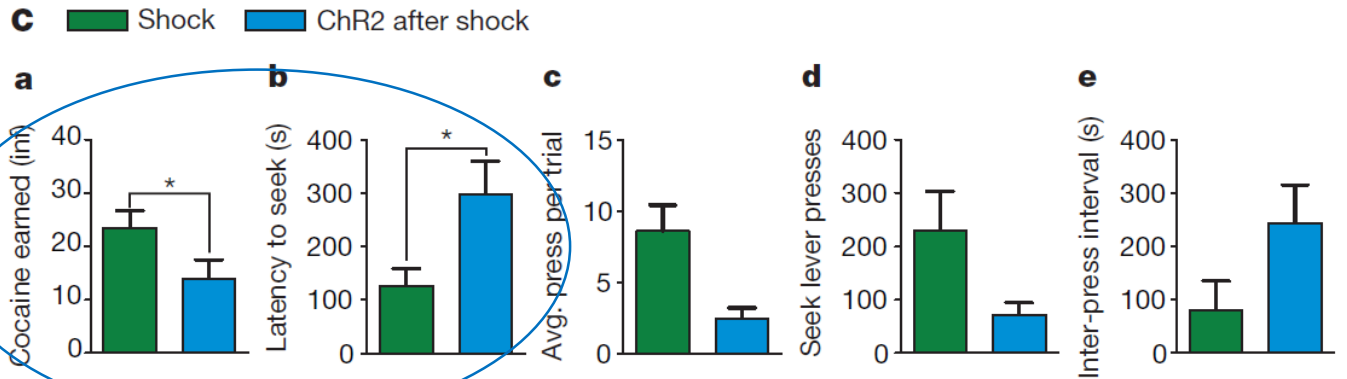
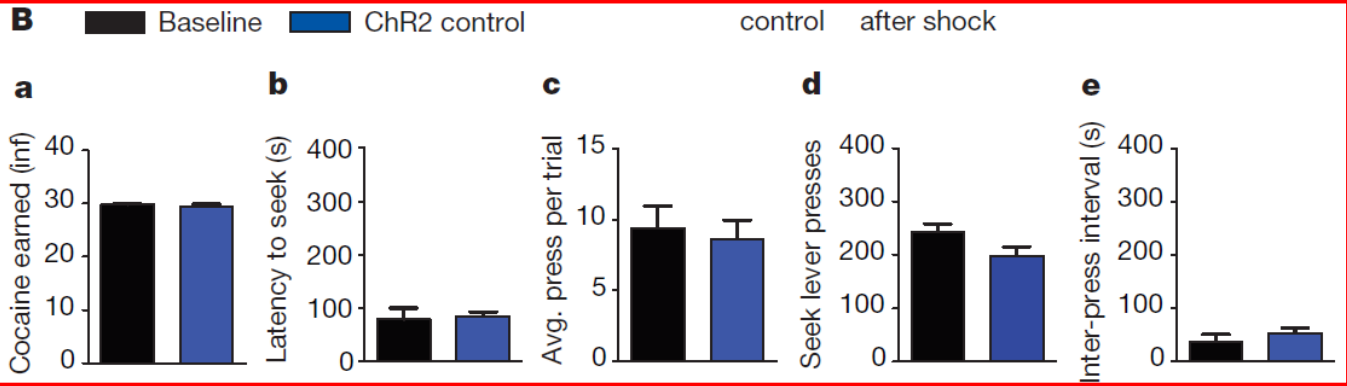
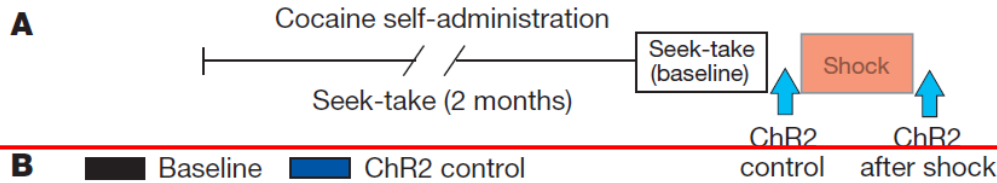
## **In vivo optogenetics: Beeinflussung der schockresistenten Mäuse:**

Eine ChR2 Stimulation während der letzten Kokain Baseline Trainingseinheit

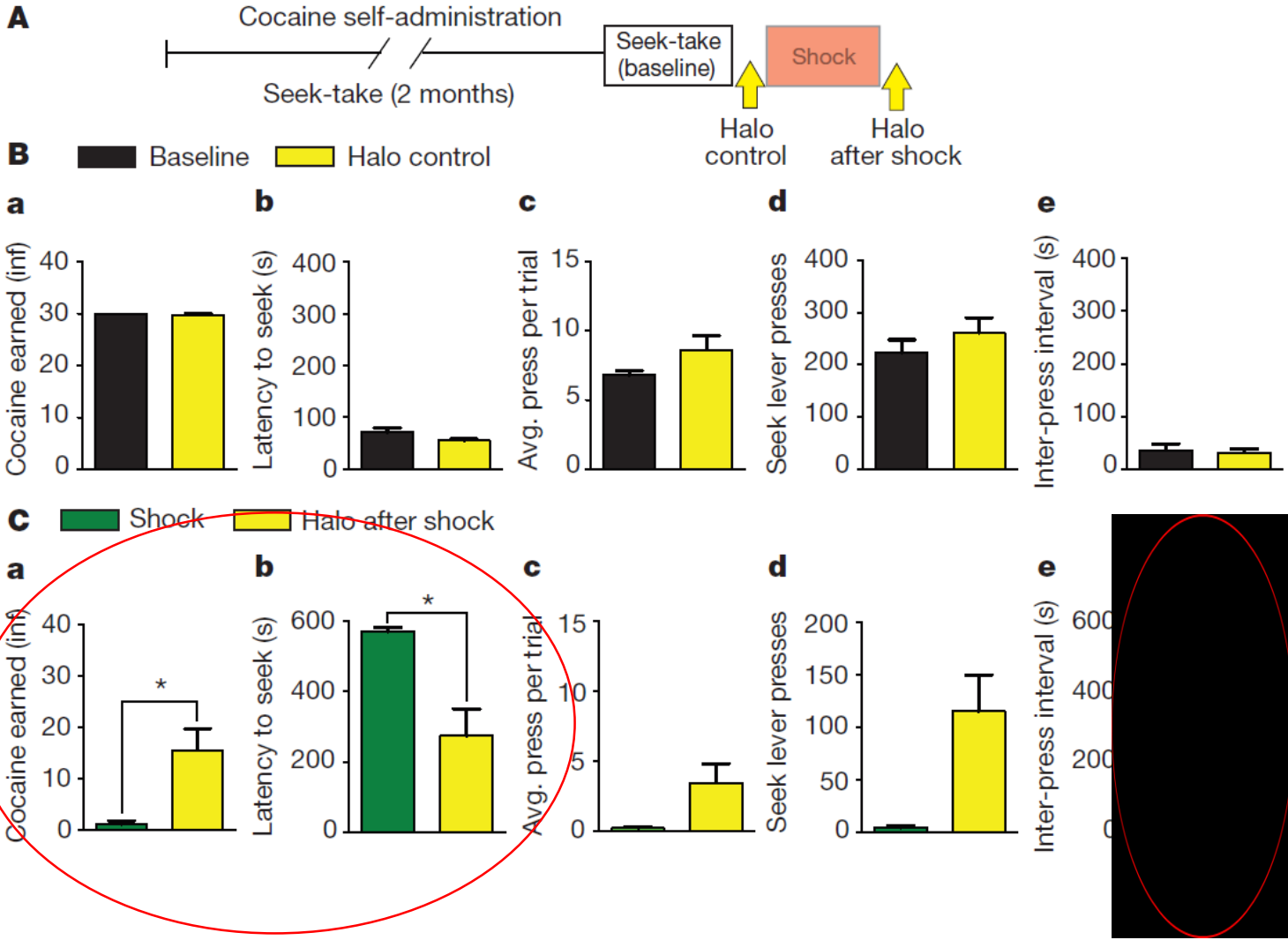
Eine weitere ChR2 stimulation 24h nach der letzten Bestrafungseinheit (shock session). Diese Einheit war im Ablauf identisch zu den anderen Bestrafungseinheiten.

**Einziger Unterschied:** 1Hz, 10ms Lichtpuls im mPFC mit 473nm Licht, appliziert in dem Moment in dem der „seek“ Hebel umgelegt wird, für die Dauer des „seek links“.

# (II) In vivo optogenetic mPFC stimulation suppresses cocaine seeking behaviour in compulsive rats



# Gegenprobe: (II) In vivo optogenetic mPFC inhibition induces cocaine seeking



# In conclusio

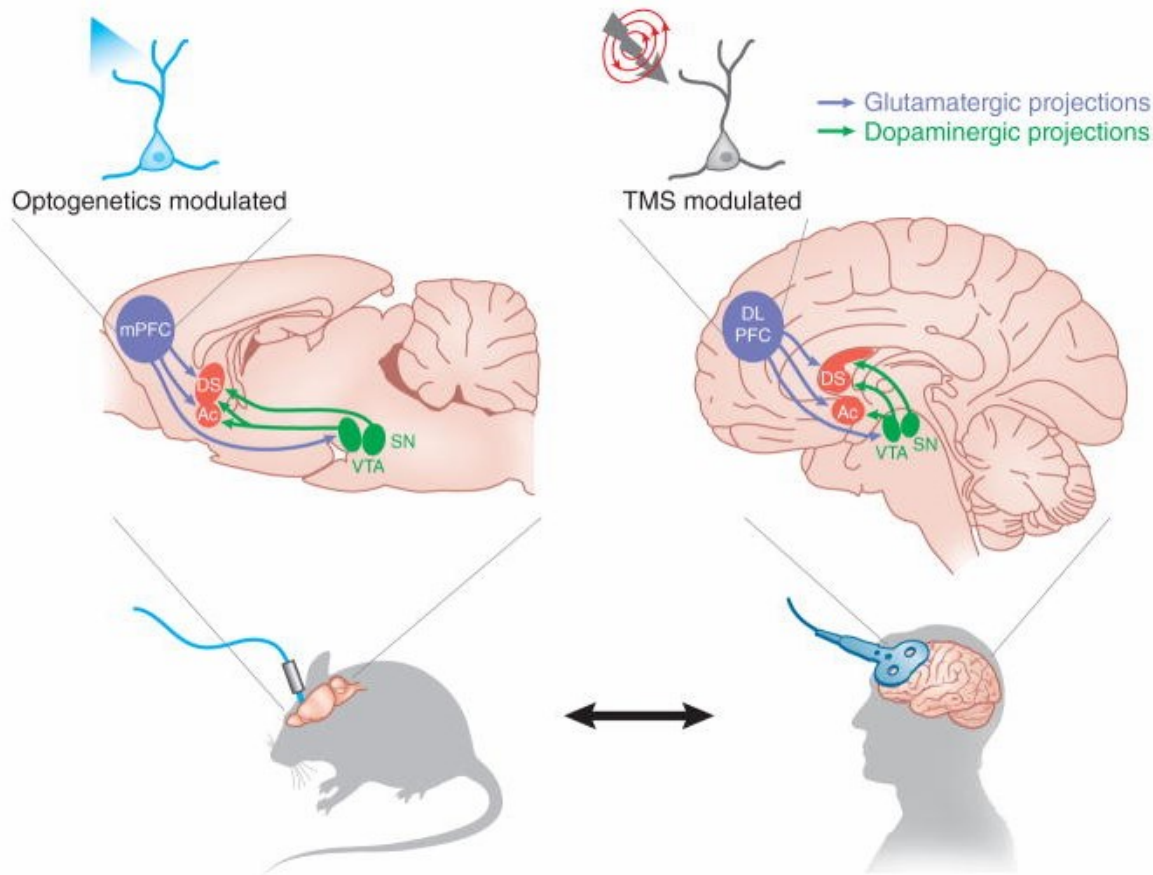
- **Ex vivo Studien:** Chronischer Kokainabusus führt zur Hypofunktion glutamaterger Neuronen des mPFC
- **In vivo Optogenetics:** Erst nach dem das Kokain-Suchverhalten operant mit einem Schmerzreiz gepaart wurde, zeigte die in vivo Stimulation/Inhibition des mPFC einen Effekt.

→ Beleg für eine bisher postulierte mutmaßliche Rolle des mPFC:

Kontrolle eines striatal/limbisch erhaltenen Verhaltens (z.B. Kokainsuchverhalten, physiologisch: u.a. Reproduktion/Kalorienaufnahme) im Angesicht einer neuen Herausforderung des Organismus (z.B. einer Aversion) und in Folge eine Adaptation des Verhaltens.



# Translation in die Klinik



- Terraneo *et al.* (2015):

## Pilotstudie:

32 schwerst kokainabhängige Patienten, randomisiert zu einer Standardbehandlungsgruppe und einer rTMS-Gruppe, zunächst 5 Tage stationär, dann wöchentlich ambulant für 3 Wochen behandelt:

69% der rTMS-Gruppe nach 1 Monat noch clean (laborchemisch abgesichert)

19% in der Standard-Kontrollgruppe

CAVE: Kurze Dauer, Kein TMS-Placebo-Arm, etc...

Aber größer angelegte klinische Studien laufend.

# Ausblick: „Beyond the brain“

“Neocortical **neuronal activity** has recently been found to **promote the growth of malignant gliomas in a circuit-specific manner through activity-regulated secretion of specific growth factors** (Venkatesh et al, 2015). And beyond the central nervous system, **peripheral nerve circuit activity** has been shown to contribute to the **progression of prostate** (Magnon et al, 2013), gastric (Zhao et al, 2014), pancreatic (Stopczynski et al, 2014) and skin (Peterson et al, 2015) **cancers.**”

**aus:** Rajasethupathy P, Ferenczi E, Deisseroth K. Targeting Neural Circuits. Cell. 2016;165(3):524-34.

# Literaturverzeichnis – Kakao und Epilepsie

- Ashihara, H., et al. (2011). "Distribution, biosynthesis and catabolism of methylxanthines in plants." Handb Exp Pharmacol(200): 11-31.
- Amorim, B. O., et al. (2016). "Effects of A1 receptor agonist/antagonist on spontaneous seizures in pilocarpine-induced epileptic rats." Epilepsy Behav 61: 168-173.
- Brackenbury, W. J., et al. (2013). "Abnormal neuronal patterning occurs during early postnatal brain development of *Scn1b*-null mice and precedes hyperexcitability." Proceedings of the National Academy of Sciences 110(3): 1089-1094.
- Boison, D. (2011). "Methylxanthines, seizures, and excitotoxicity." Handb Exp Pharmacol(200): 251-266.
- Chroscinska-Krawczyk, M., et al. (2011). "Caffeine and the anticonvulsant potency of antiepileptic drugs: experimental and clinical data." Pharmacol Rep 63(1): 12-18.
- Etholm, L. and P. Heggelund (2009). "Seizure elements and seizure element transitions during tonic-clonic seizure activity in the synapsin I/II double knockout mouse: A neuroethological description." Epilepsy & Behavior 14(4): 582-590.

- Fassio, A., et al. (2011). "Synapsins: from synapse to network hyperexcitability and epilepsy." Semin Cell Dev Biol **22**(4): 408-415
- Iyadurai, S. J. and S. S. Chung (2007). "New-onset seizures in adults: possible association with consumption of popular energy drinks." Epilepsy Behav **10**(3): 504-508.
- Mackow, M. J., et al. (2016). "Increased caffeine intake leads to worsening of electrocorticographic epileptiform discharges as recorded with a responsive neurostimulation device." Clin Neurophysiol **127**(6): 2341-2342.
- Mirza, F. J. and S. Zahid (2018). "The Role of Synapsins in Neurological Disorders." Neuroscience Bulletin **34**(2): 349-358.
- Moscoso-Castro, M., et al. (2017). "Cognitive impairments associated with alterations in synaptic proteins induced by the genetic loss of adenosine A2A receptors in mice." Neuropharmacology **126**: 48-57.
- Verna, R. (2013). "The history and science of chocolate." Malays J Pathol **35**(2): 111-121.

# Literaturverzeichnis - Optogenetics

- Chen BT, Yau HJ, Hatch C, Kusumoto-Yoshida I, Cho SL, Hopf FW, et al. Rescuing cocaine-induced prefrontal cortex hypoactivity prevents compulsive cocaine seeking. *Nature*. 2013;496(7445):359-62.
- Boyden ES. A history of optogenetics: the development of tools for controlling brain circuits with light. *F1000 Biol Rep*. 2011;3:11.
- Rajasethupathy P, Ferenczi E, Deisseroth K. Targeting Neural Circuits. *Cell*. 2016;165(3):524-34.
- Terraneo A, Leggio L, Saladini M, Ermani M, Bonci A, Gallimberti L. Transcranial magnetic stimulation of dorsolateral prefrontal cortex reduces cocaine use: A pilot study. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2016;26(1):37-44.