

Aus dem Institut für Zell- und Neurobiologie
der Medizinischen Fakultät der Charité-Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Axonales Auswachsen in der Hippocampusformation während der
Entwicklung und nach Läsion

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Robert Glumm

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. R. Nitsch
2. Prof. Dr. med. I. Bechmann
3. Prof. Dr. H.-D. Hofmann

Datum der Promotion: 11.06.2007

Meiner Tochter Noa

Inhaltsverzeichnis

Liste der verwendeten Abkürzungen	6
1. Einleitung	
1.1 Vorwort	7
1.2 Anatomischer Aufbau des Hippocampus	9
1.3 Das Homeobox-Gen Emx2 in der Formation des Gyrus dentatus	12
1.4 Leitmoleküle in der Formation spezifischer Verbindungen im Hippocampus	13
1.5 Zelladhäsionsmolekül NCAM	16
1.6 Die hippocampale Formation als organotypische Schnittkultur	19
1.7 Entwicklung der Fragestellung und Versuchsplanung	21
2. Material und Methoden	
2.1 Emx-Tiere	24
2.1.1 Organotypische Schnittkulturen	24
2.1.2 Biocytintracing	25
2.1.3 Immunfluoreszenz	25
2.1.4 Silberimprägnation nach Golgi-Collonier	26
2.2 Modifikation der Polysialylierung von NCAM	27
2.2.1 Messung der PSA- und PropPSA-Inkorporation	27
2.2.2 Komplexkulturen zur Untersuchung des axonalen Auswachsens mit und ohne Läsion	27
2.2.3 <i>In vivo</i> Untersuchung	28
2.2.4 Timm-Imprägnation	28
2.2.5 Immunhistochemie und Immunfluoreszenz	29
2.2.6 Quantifizierung und statistische Auswertung	30
2.3 Organotypische Schnittkulturen mit β -Aktin-GFP transgenen Mäusen	31
3. Ergebnisse	
3.1.1 Veränderungen in Langzeit organotypischen Schnittkulturen von Emx2-Knockout-Mäusen	32

3.1.2 Emx2 ist für die Generierung und Differenzierung von hippocampalen Körnerzellen wesentlich	34
3.2.1 ManProp hemmt die Polysialylierung in organotypischer hippocampaler Schnittkultur	37
3.2.2 Hemmung von PSA beeinträchtigt die Faszikulation (Bündelung) und die Zielfindung der Moosfasern <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	38
3.2.3 Inhibition der PSA-Synthese fördert das axonale Auswachsen <i>in vitro</i>	42
3.2.4 PSA-Mangel begünstigt die Regeneration der Moosfasern nach Läsion	44
3.3 Organotypische Kokultur mit β -Aktin-GFP transgenen Hirnschnitten	46
4. Diskussion	
4.1 Emx2 in der Entwicklung des Gyrus dentatus und seinen Projektionen	51
4.2 Einfluss der PSA-Inhibition auf die axonale Zielfindung in der Entwicklung und nach Läsion	53
4.3 Visualisierung des axonalen Auswachsens in β -Aktin-GFP exprimierender organotypischer Kokultur	55
4.4 Ausblick	56
5. Zusammenfassung	57
6. Summary	59
7. Abbildungsverzeichnis	61
8. Literaturverzeichnis	62
Danksagung	71
Lebenslauf	72
Erklärung	73

Liste der verwendeten Abkürzungen:

a	Alveus
CA	Cornum Ammonis = Pyramidenzellband im Hippocampus
CD	cluster of differentiation
DAB	3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid
DCC	deleted in colorectal carcinoma
DG	Dentate Gyrus (Gyrus dentatus)
DIV	Days <i>in vitro</i> (Tage <i>in vitro</i>)
E18	Embryonaltag 18
EC	entorhinaler Cortex
ems	empty spiracles (Drosophila)
Emx2	empty spiracles homolog 2
EndoN	Endoneuraminidase
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GPI	Glykosyl-Phosphatidylinositol
IgSF	Immunglobulin-Superfamilie
iml	inner molecular layer (innere Molekularschicht)
ManNAc	<i>N</i> -Acetyl-D-Mannosamin
ManNProp	<i>N</i> -Propanoyl-D-Mannosamin
MF	Moosfasern der Gyrus dentatus Körnerzellen
MHC	Major Histocompatibility Complex
NCAM	Neural Cell Adhesion Molecule (Neurales Zelladhäsionsmolekül)
oml	outer molecular layer (äußere Molekularschicht)
P0 bzw. P7	postnataler Tag 0 bzw. 7
PB	Phosphate buffer (Phosphat Puffer)
PBS	Phosphate buffer saline (saliner Phosphat Puffer)
pcl	pyramidal cell layer (Pyramidenzellband)
PFA	Paraformaldehyd
PropPSA	Propanoyl-Polysialinsäure
PSA	Polysialic Acid (Polysialinsäure)
r	Stratum radiatum
Sema3	Semaphorin Klasse 3
SL	Stratum lucidum
ST8Sia-II bzw. -IV	Polysialyltransferase II bzw. IV
Sub	Subiculum
ZNS	zentrales Nervensystem

5. Zusammenfassung

Während der Entwicklung haben die Nervenzellen des Gehirns die bemerkenswerte Fähigkeit, gegenseitige Verbindungen auszubilden, ein Entwicklungsvorgang, der präzises axonales Auswachsen, Wegfindung und korrekte Synapsenbildung voraussetzt. Im Gegensatz dazu, ist die Fähigkeit, neuronale Kontakte nach Läsion wieder herzustellen im ZNS sehr begrenzt.

Zunächst untersuchten wir *in vitro* die späte embryonale und postnatale Entwicklung der hippocampalen Formation mit ihren Projektionen, in für das Homeobox-Gen *Emx2*-defizienten Mäusen. Da die *Emx2*-Knockout-Tiere perinatal versterben, haben wir organotypische Schnittkulturen hergestellt. In Schnitten von Knockout-Tieren war die Zytoarchitektur des prospektiven Gyrus dentatus gestört, reiften die Körnerzellen nicht aus und bildeten auch keinen Moosfasertrakt. Diese Befunde zeigen, dass *Emx2* essentiell für die endgültige Differenzierung der Körnerzellen und ihrer korrekten Ausbildung der intrinsischen hippocampalen Projektionen ist.

Im nächsten Versuchsaufbau konnten wir unter Verwendung der organotypischen Kokultur und anhand von *in vivo* Experimenten weiterhin in unseren Untersuchungen belegen, dass in den Vorgängen des Auswachsens, der Wegfindung und der synaptischen Zielfindung während der Entwicklung und nach Läsion, die Entität der Polysialinsäure (Polysialic Acid = PSA) involviert ist. Diese stellt eine einzigartige während der Entwicklung regulierte posttranslationale Modifikation des Neuralen Zelladhäsionsmolekül (Neural Cell Adhesion Molecule) NCAM dar. Durch die Verwendung eines chemisch veränderten Sialinsäurevorläufers, konnten wir die Polysialylierung von NCAM zu definierten Entwicklungs- und postläsionalen Zeitpunkten hemmen. Der PSA-Mangel bewirkte nicht nur eine fehlerhafte Moosfaserverteilung in der CA3-Pyramidenzellband, sondern auch das aberrante Eindringen von Moosfasern in die CA1-Region *in vivo* und förderte das axonale Auswachsens *in vitro*. Des Weiteren war die Reinnervation der Moosfasern nach Läsion durch die Inhibition der PSA-Synthese *in vitro* signifikant erhöht. Basierend auf diesen Ergebnissen schlussfolgern wir, dass PSA notwendig für die axonale Zielfindung während der Ausbildung neuraler Schaltkreise ist und andererseits die Regeneration nach Läsion stört. Dieses Fazit impliziert umgekehrt einen positiven Effekt der pharmakologischen Modifikation von NCAM auf die Regeneration nach axonaler Schädigung, die sich in weiterführenden Experimenten als viel versprechend, in Hinblick auf einen möglichen therapeutischen Nutzen, herausstellen könnte.

Um das Phänomen des axonalen Auswachsens besser untersuchen zu können, variierten wir das bereits etablierte Modell der organotypischen Kokultur. In dieser Arbeit nutzten wir die

organotypische Kokultur mit neugeborener wildtyp und β -Aktin-GFP transgener Maus. Dies erlaubte es uns, die Axone *in situ* zu markieren und die gesamte Projektion zu verfolgen. In Kokulturen von entorhinalem Cortex und Hippocampus terminierten die GFP-markierten entorhinalen Axone und die kommissuralen Axone in den korrekten hippocampalen Schichten. Ausgehend von diesen Befunden, konnten wir demonstrieren, dass dieser Chimären-Kokultur-Ansatz dazu geeignet ist, die Gesamtheit sich entwickelnder Projektionen darzustellen und die Möglichkeit bietet, direkt das axonale Ansteuern und Auswachsen lebender Neuronen zu beobachten.

6. Summary

During development, nerve cells within the brain have the remarkable ability to form mutual interconnections, a process that relies on precisely orchestrated steps of axonal outgrowth, pathfinding, and correct synaptic targeting. In contrast, reestablishing neuronal circuits after lesion in the CNS is extremely limited.

First we analysed the late embryonic and postnatal development of the hippocampal formation and its axonal projections in mice lacking the homeobox gene *Emx2* expression *in vitro*. Since the *Emx2* mutants die perinatally we used slice cultures of *Emx2* mutant hippocampus to circumvent this problem. In mutant cultured hippocampus the presumptive dentate gyrus failed to develop its normal cytoarchitecture and mature dentate granule cells, including the lack of their mossy fiber projection. These data indicate that *Emx2* is essential for the terminal differentiation of granule cells and the correct formation of intrinsic hippocampal connections.

In another set-up, using the model of the organotypic slice culture as well as *in vivo* experiments in our investigations we were able to provide confirmation, that the processes of outgrowth, pathfinding, and synaptic targeting during development and following lesion involve the polysialic acid (PSA) moiety, which is a unique, developmentally regulated posttranslational modification of the neural cell adhesion molecule (NCAM). Using a chemically modified sialic acid precursor, we inhibited NCAM polysialylation at selected developmental and postlesional time points. PSA deficiency resulted not only in an abnormal mossy fiber pattern in the CA3 pyramidal layer but also in aberrant invasion of mossy fibers into the CA1 region *in vivo* and promotion of axonal outgrowth *in vitro*. Furthermore, the reinnervation by mossy fibers after lesion was significantly enhanced when inhibiting PSA formation *in vitro*. Based on our data, we conclude that PSA is necessary for correct axonal targeting during neuronal circuit formation, but inhibits regeneration after lesion. Conversely, these results imply that pharmacological modification of NCAM could be beneficial for regeneration following axonal damage, and further experiments may be promising with regard to a potential therapeutical use of this approach.

And finally to better investigate the phenomenon of axonal outgrowth, we modified the well-established organotypic slice culture approach. Here we used organotypic slice co-cultures from neonate wild-type mice and β -actin-gfp transgenic mice, which allowed us to prelabel the vital axons and to monitor the complete axonal projection. In co-cultures from entorhinal cortex and hippocampus, gfp-labeled entorhinal axons and commissural projections terminate in their correct hippocampal layers. From our data, we demonstrate that this chimaeric co-culture

approach is appropriate in tracing entire developing projections and may serve as a tool in directly observing the navigation and axonal elongation of living neurons.