

Aus dem Institut für Anatomie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Transsynaptische Apoptose: Eine akute Form sekundärer
Neurodegeneration nach Axotomie im ZNS

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Adam Donovan Kovac

aus Des Plaines, IL USA

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. I Bechmann
2. Prof. Dr. med. F. Paulsen
3. Prof. Dr. med F. Heppner

Datum der Promotion: 15. Januar 2007

Zusammenfassung

Nach Traumata im zentralen Nervensystem (ZNS) kommt es in Regionen fernab des ursprünglichen Läsionsortes zu einem sekundären Zelltod, dessen Ausmaß den Primärschaden deutlich übertreffen kann. Die Prävention sekundärer Degeneration ist daher ein wichtiges Ziel neuropharmakologischer Intervention. Bislang sind die Mechanismen einer sekundäre Schädigung allerdings weitgehend unbekannt. Insbesondere existiert Unklarheit darüber, warum bestimmte Regionen von sekundärer Degeneration betroffen werden, andere dagegen nicht. Anhand des Modells der entorhinalen Cortexläsion, das seit über 30 Jahren zur Untersuchung axonaler Sprossung und reaktiver Synaptogenese in Regionen axonaler Degeneration eingesetzt wird, kann hier nachgewiesen werden, daß die Zielneurone axotomierter Fasersysteme von sekundärer Degeneration betroffen sein können. Dieser akute, transsynaptische Zelltod ist apoptotisch und durch eine Aktivierung der Caspase 3 gekennzeichnet. Zwischen 24 und 48 Stunden nach stereotaktischer Durchtrennung des Tractus perforans, der den entorhinalen Cortex mit dem Hippocampus verbindet, fanden wir eine Aktivierung von Caspase 3 in den denervierten Zellen im Gyrus dentatus. Innerhalb dieser Zellen konnte licht- sowie elektronenmikroskopisch Kernfragmentierung und das Auftreten geschwollener Mitochondrien nachgewiesen werden. Wie von uns auch für die Morphogenese des Hippocampus gezeigt, ist diese Apoptose unabhängig vom Todesligand-Todesrezeptorsystem CD95/CD95L (Fas/FasL), kann aber durch Blockade der Glutamattransmission am NMDA-Rezeptor inhibiert werden. Als *proof of principle* zeigen diese Befunde erstmals, daß die Schädigung von Fasersystemen im ZNS nicht nur eine retrograde Degeneration von Ursprungszellen der durchtrennten Axone induziert, sondern auch einen akuten transsynaptischen Verlust von Nervenzellen in deren Zielregionen auslösen kann. Da eine pharmakologische Prävention durch Inhibitoren von Glutamattoxizität prinzipiell möglich erscheint, wird das Auftreten transsynaptischer Apoptose nun in klinisch relevanten Modellen von Neurotrauma und Rückenmarksläsion zu prüfen sein.

Abkürzungsverzeichnis

AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
AP-5	R-2-amino-5-phosphonopentanoat
APAF-1	apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1
bl6	spezifischer Mausstamm
C57	spezifischer Mausstamm
CA	cornu amonis
CD	Differenzierungskluster
CPP	3-(2-Carboxypiperazin-4-yl)propyl-1-phosphonsäure
DAB	Diaminobenzidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	entorhinale Cortexläsion
GABA	γ -Aminobuttersäure
gld	spezifischer Mausstamm
hpl	Stunden nach Läsion
KG	Körpergewicht
lpr	spezifischer Mausstamm
MK801	(+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine maleat
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PB	Phosphatpuffer
PFA	Paraformaldehyd
RMV	Rückenmarksverletzung
THS	traumatischer Hirnschaden
TUNNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nicked end labeling
ZNS	zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
2. Zielstellung	8
3. Methodik	9
4. Ergebnisse	11
5. Diskussion	13
6. Literatur	17
7. Eigene Publikationen	23
8. Lebenslauf	25
9. Danksagung	27
10. Anteil an den Publikationen	28
11. Eidesstattliche Erklärung	29

7. Eigene Publikationen

- 1: Bechmann I, Kwidzinski E, **Kovac AD**, Simburger E, Horvath T, Gimsa U, Dirnagl U, Priller J, Nitsch R. Turnover of rat brain perivascular cells. *Exp Neurol*. 2001 Apr;168(2):242-9.
- 2: Bechmann I, Priller J, **Kovac A**, Bontert M, Wehner T, Klett FF, Bohsung J, Stuschke M, Dirnagl U, Nitsch R. Immune surveillance of mouse brain perivascular spaces by blood-borne macrophages. *Eur J Neurosci*. 2001 Nov;14(10):1651-8.
- 3: **Kovac AD**, Grammig J, Mahlo J, Steiner B, Roth K, Nitsch R, Bechmann I. Comparison of neuronal density and subfield sizes in the hippocampus of CD95L-deficient (gld), CD95-deficient (lpr) and nondeficient mice. *Eur J Neurosci*. 2002 Jul;16(1):159-63.
- 4: Kwidzinski E, Mutlu LK, **Kovac AD**, Bunse J, Goldmann J, Mahlo J, Aktas O, Zipp F, Kamradt T, Nitsch R, Bechmann I. Self-tolerance in the immune privileged CNS: lessons from the entorhinal cortex lesion model. *J Neural Transm Suppl*. 2003;(65):29-49. Review.
- 5: Schmitz DN, Hofmann N, Tomov TL, **Kovac AD**, Neiss WF, Angelov DN. The correlation between severity of paraparesis and reduced density of resident antigen-presenting cells implicates an unknown role for the spinal perivascular macrophages in experimental autoimmune encephalomyelitis in rats. *J Neuroimmunol*. 2003 Sep;142(1-2):31-46.
- 6: Fadiel A, **Kovac AD**, Jeffrey R, Morsy TA, Helmy MM, Naftolin F, El Deeb HK. Diagnostic microarray: an array of possibilities for parasitology. *J Egypt Soc Parasitol*. 2004 Apr;34(1):65-82. Review.
- 7: Kwidzinski E, Bunse J, **Kovac AD**, Ullrich O, Zipp F, Nitsch R, Bechmann I. IDO (indolamine 2,3-dioxygenase) expression and function in the CNS. *Adv Exp Med Biol*. 2003;527:113-8.
- 8: **Kovac AD**, Kwidzinski E, Heimrich B, Bittigau P, Deller T, Nitsch R, Bechmann I. Entorhinal cortex lesion in the mouse induces transsynaptic death of perforant path target neurons. *Brain Pathol*. 2004 Jul;14(3):249-57.
- 9: Rappert A, Bechmann I, Pivneva T, Mahlo J, Biber K, Nolte C, **Kovac AD**, Gerard C, Boddeke HW, Nitsch R, Kettenmann H. CXCR3-dependent microglial recruitment is essential for dendrite loss after brain lesion. *J Neurosci*. 2004 Sep 29;24(39):8500-9.
- 10: Bechmann I, Goldmann J, **Kovac AD**, Kwidzinski E, Simburger E, Naftolin F, Dirnagl U, Nitsch R, Priller J. Circulating monocytic cells infiltrate layers of anterograde axonal degeneration where they transform into microglia. *FASEB J*. 2005 Apr;19(6):647-9. Epub 2005 Jan 25.
- 11: Lunemann A, Ullrich O, Diestel A, Jons T, Ninnemann O, **Kovac A**, Pohl EE, Hass R, Nitsch R, Hendrix S. Macrophage/microglia activation factor expression is restricted to lesion-associated microglial cells after brain trauma. *Glia*. 2006 Mar;53(4):412-9.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

9 Danksagung

Zuerst möchte ich mich besonders bei meinem Betreuer Ingo Bechmann bedanken, der mein Interesse an der wissenschaftlichen Forschung geweckt und über die Jahre gepflegt hat. Er war für mich ein Doktorvater im eigentlichen Sinne: er sorgte für die intellektuelle Sättigung und auch für mein leibliches Wohlergehen. Er nahm Dinge gelassen hin, wo andere an mir verzweifelt wären.

Professor Robert Nitsch möchte ich danken, dass ich seine Labore verwenden durfte und für seine Unterstützung in bürokratischen Angelegenheiten. Marni Pollrich hat mir durch ihre Hilfe sehr viel Zeit in Verwaltungsangelegenheiten gespart und durch sie begann jeder Tag im Labor mit einem Lächeln.

Die Mitarbeiter der AG Bechmann verschönerten mir nicht nur die Arbeits-, sondern auch die Freizeit. Mein ganz besonderer Dank gilt Erik Kwidzinski für seine unendliche und geduldige Hilfe bei technischen Fragestellungen. In diversen prekären und - im Nachhinein – oftmals witzigen Situationen stand er an meiner Seite. Jacqueline Mahlo danke ich für die technische Unterstützung und die Ruhe und Stabilität die sie in unserem Labor ausstrahlt. Eva Simbürger und Susanne Peter halfen mir bei meinen ersten Schritten im Labor.

Mein Dank gilt ferner allen Mitarbeitern des Instituts für Anatomie, die für eine angenehme und fördernde Arbeitsatmosphäre gesorgt haben.

Meiner Mutter möchte ich dafür danken, dass sie mir das Lesen beigebracht hat und dafür sorgte, dass ich während der Studienzeit nicht verhungern musste.

Diese Arbeit wurde von dem Graduiertenkolleg „Schadensmechanismen im ZNS“ GRK 238 unterstützt. Dafür sei herzlich gedankt.

10. Anteil an den Publikationen

1: **Kovac AD**, Grammig J, Mahlo J, Steiner B, Roth K, Nitsch R, Bechmann I. Comparison of neuronal density and subfield sizes in the hippocampus of CD95L-deficient (gld), CD95-deficient (lpr) and nondeficient mice. *Eur J Neurosci*. 2002 Jul;16(1):159-63.

Anteil: Gewinnung und Verarbeitung von Material. Lichtmikroskopie. Erfassung und statistische Verarbeitung der Rohdaten. Schriftliche Fassung des Textes.

2: **Kovac AD**, Kwidzinski E, Heimrich B, Bittigau P, Deller T, Nitsch R, Bechmann I. Entorhinal cortex lesion in the mouse induces transsynaptic death of perforant path target neurons. *Brain Pathol*. 2004 Jul;14(3):249-57.

Anteil: Durchführung von Läsionen. Gewinnung und Verarbeitung von Material. Anwendung verschiedener Färbungsmethoden. Elektronen- und Lichtmikroskopie. Erfassung und statistische Verarbeitung der Rohdaten. Schriftliche Fassung des Textes.

3: Bechmann I, Goldmann J, **Kovac AD**, Kwidzinski E, Simburger E, Naftolin F, Dirnagl U, Nitsch R, Priller J. Circulating monocytic cells infiltrate layers of anterograde axonal degeneration where they transform into microglia. *FASEB J*. 2005 Apr;19(6):647-9. Epub 2005 Jan 25.

Anteil: Durchführung von Läsionen. Gewinnen und Anfärben von lebenden Zellen. Lichtmikroskopie.

Datum: 17.Januar 2007

(A.D. Kovac)

11. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich meine Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Verfahren, Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe. Meine Dissertation habe ich nicht zuvor für Examenszwecke benutzt.

Berlin, den 17. Januar 2007

(Adam Kovac)