

1. Einleitung:

1.1 Vorwort

Kommunikation, Kooperation und Toleranz - und nicht darwinistische Konkurrenz beschreiben die chilenischen Neurobiologen Humberto Maturana und Francisco Varela in ihrer 1974 veröffentlichten Arbeit „Autopoiesis und die Organisation des Lebendigen“ als Grundlagen aller Lebensvorgänge. So sind in der Individualentwicklung eine in ihrer Bekanntheit immer größer werdende Anzahl von signalübertragenden Botenstoffen maßgeblich für das Entstehen und Wachsen, von der einzelnen Zelle über den Zellverband, dem Gewebe bis hin zum Organsystem. Gerade das zentrale Nervensystem (ZNS), in seiner Komplexität und mit seinen hochspezifischen Verbindungen, hat die Wissenschaft besonders fasziniert. Der spanische Neurowissenschaftler Ramón y Cajal hat schon zu Beginn des letzten Jahrhunderts in seinen Untersuchungen zur Entwicklung des Gehirns, den Grundstock für weitergehende Arbeiten über die Konnektivität und die zeitlich-räumliche Ordnung ontogenetischer Mechanismen gelegt¹. Wie Nervenzellen ihre Axone in Richtung ihrer Bestimmung wachsen lassen und diese die spezifischen Segmente der Zielneurone, zur Errichtung der korrekten Verbindungen erkennen, ist noch nicht vollständig erforscht, aber wesentlich für das Verständnis der Entstehung neuronaler Schaltkreise während der Individualentwicklung und deren Veränderung unter pathologischen Bedingungen, wie Trauma, Degeneration oder Entzündung.

Bei Zerstörung axonaler Verbindungen durch Rückenmarkquerschnittsverletzungen, Schädel-Hirntraumen, M. Alzheimer oder Multipler Sklerose kommt es neben dem Untergang von Nervengewebe auch zum Verlust von synaptischen Verbindungen in den nachgeschalteten Hirnarealen. An der therapeutischen Wiederherstellung dieser verloren gegangenen Konnektivität wurde in den letzten 15 Jahren intensiv geforscht. Dabei ist insbesondere die Mikroumgebung, der sich entwickelnden und der lädierten zentralen Nervenfasern untersucht und eine Vielzahl die axonale Wegfindung lenkende Moleküle beschrieben worden.

Die vorliegende Arbeit versteht sich als ein Beitrag, diesen bisher größtenteils im Dunkeln liegenden Mechanismus der axonalen Zielfindung genauer zu beleuchten. Nachdem zunächst der genetische Einfluss auf die sezernierte Form der Signalübertragung in der Formation spezifischer Verbindungen analysiert wird, zeigt die selektive pharmakologische Modifikation eines

¹ Ramón y Cajal, Santiago. *Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados. Estudios sobre el plan estructural y composición histológica de los centros nerviosos, adicionados de consideraciones fisiológicas fundadas en los nuevos descubrimientos.* (1899-1905)

eigentlich in der embryonalen Entwicklung für die Zell-zu-Zell- und Zell-zu-Matrix-Kommunikation wichtigem membranösen Zelladhäsionsmolekül einen möglichen Ansatz der therapeutischen Intervention zur Reorganisation nach Schädigung im ZNS auf. Dazu wird auch für weiterführende Studien ein neues Modell zur Visualisierung des axonalen Auswachsens etabliert.

Teile dieser Arbeit wurden oder werden publiziert in:

Glumm, R., Klötting A. und Heimrich, B.

Development of Axonal Projections in Cocultures of the Hippocampal Formation Visualized with β -Aktin-gfp Transgenic Slices. *Neuroembryology* :1 17-22. (2002)

Heimrich, B., Vogt, J., Simbürger, E., Skutella, T. und Glumm, R.

Axon Guidance and the Formation of Specific Connections in the Hippocampus.

Neuroembryology 1: 154-160. (2002)

Savaskan, NE., Alvarez-Bolado, G., Glumm, R., Nitsch, R., Skutella, T. und Heimrich, B.

Impaired postnatal development of hippocampal neurons and axon projections in the *Emx2*^{-/-} mutants. *J. Neurochem.* 83: 1-12. (2002)

Vogt, J., Glumm, R., Schlüter, L., Khrulev, S., Schmitz, D., Rost, BR., Savaskan, NE., Bräuer, A., Reutter, W., Heimrich, B., Nitsch, R., Horstkorte, R.

PSA-NCAM guides axons to their target during development, but inhibits regeneration after lesion. (zur Veröffentlichung eingereicht)

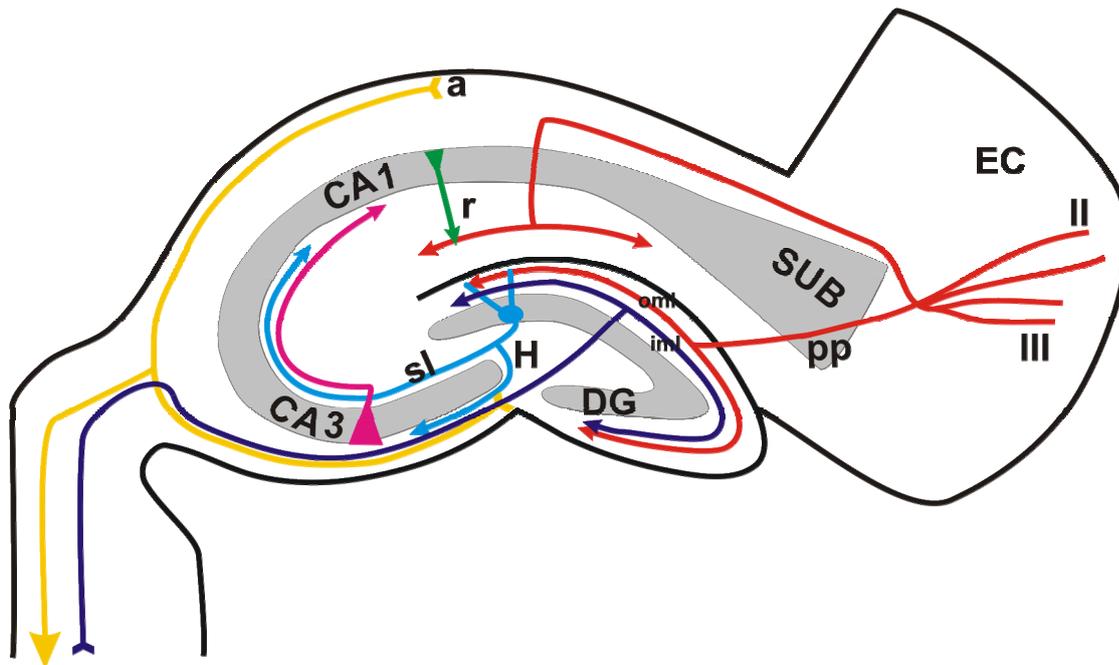
1.2 Anatomischer Aufbau des Hippocampus

Der Hippocampus stellt den Hauptteil des Archicortex dar. Dieser zeigt, im Gegensatz zum sechsschichtigen phylogenetisch jüngeren Isocortex, einen dreischichtigen Aufbau, bestehend aus einem Zellband, das von beiden Seiten durch Dendriten und Fasern umgriffen wird. Durch die Faltung des Neocortex bedingt, liegt der Hippocampus eingerollt an der medialen Fläche des Temporallappens, angrenzend an den lateralen Ventrikel.

Anders als früher angenommen, zählt der Hippocampus nicht zum Riechhirn und hat auch keine unmittelbare Beziehung zum Geruchssinn. Bei Reptilien, die keinen Neocortex besitzen, ist der Hippocampus oberstes Integrationsorgan des Endhirns. Beim Säugetier ist durch elektrophysiologische Untersuchungen gezeigt worden, dass der Hippocampus optische, akustische, taktile, viszerale und in geringem Maße olfaktorische Impulse registriert und durch seine Verbindungen mit dem Hypothalamus, den Septumkernen und dem Gyrus cinguli das endokrine, viszerale und emotionale Geschehen beeinflussen kann. Dem Hippocampus wird, wegen der geringen Reizschwelle für Krampfantladungen der hippocampalen Nervenzellen, eine bedeutende Rolle bei der Entstehung von epileptischen Krampfanfällen zugeschrieben. Dass dem Hippocampus auch eine wesentliche Bedeutung bei Lern- und Gedächtnisprozessen beikommt, wurde klinisch deutlich bei Patienten, denen auf Grund schwerer pharmakoresistenter Epilepsien auf beiden Seiten der Hippocampus entfernt wurde. Diese Patienten hatten einen Verlust der Merkfähigkeit, bei der die alten Erinnerungen zwar erhalten blieben, neue Informationen aber nur für Sekunden behalten werden konnten.

Zu der hippocampalen Formation gehören:

- Der entorhinale Cortex (EC) mit seinem sechsschichtigen Aufbau, eine Art Übergangscortex,
- das Subiculum (SUB), als Schnittstelle vom EC zum Hippocampus und Gyrus dentatus,
- die Hippocampusrinde, auch Cornum ammonis (CA) genannt und
- der Gyrus dentatus (englisch Dentate gyrus: DG).



Das Rindenband des Hippocampus, das Cornu ammonis (CA) gliedert sich beim Menschen in vier und beim Nager in zwei bis drei Abschnitte, bestehend aus CA1-Region (auch Regio superior, enthält kleine Pyramidenzellen, grün, dem Subiculum benachbart), CA2-Region (schmales, dichtes Band größerer Pyramidenzellen, im Nager der CA1-Region zugerechnet), CA3-Region (auch Regio inferior, breiteres, lockeres Band großer Pyramidenzellen, rosa) und die CA4-Region, die den aufgelockerten Abschluss bildet und heutzutage als Hilus (H) beschrieben wird. Dieser Hilus wird von dem Körnerzellband des Gyrus dentatus (DG) umgriffen. Apikal der Körnerzellschicht befindet sich das Stratum lacunosum moleculare. Dort terminieren in den äußeren zwei Dritteln, der äußeren Molekularschicht (engl. Outer molecular layer: oml) an den Dendriten der Körnerzellen afferente Fasern, die den Schichten II und III des EC entspringen und im Bündel des Tractus perforans (rot; engl. perforant path: pp) das Subiculum durchschreiten. Der Tractus perforans stellt mit seinen Kontakten zu den Körnerzellen des DG und den Apikaldendriten der CA1- und CA3-Neurone die maßgebliche Afferenz in den Hippocampus dar. Über die Fimbria hippocampi verlassen zum einen, die im Alveus (a) gebündelten Axone der Prinzipalneurone als Efferenz die hippocampale Rinde, zum anderen treten hier kommissurale Fasern der kontralateralen hippocampalen hilären Mooszellen als weitere Afferenz ein (dunkelblau). Diese Fasern terminieren dann an den Körnerzeldendriten der inneren Molekularschicht (engl. Inner molecular layer: iml). Des Weiteren verteilen sich über die Fimbria/Fornix kommissurale Fasern aus dem medialen Septum in der polymorphen

subgranulären Schicht im Hilus, im Stratum radiatum und zwischen Pyramidenzellband und Alveus im Stratum oriens.

Die Axone der Körnerzellen haben über den so genannten Moosfasertrakt (hellblau; MF-Trakt), synaptische Kontakte in Form von Giant boutons en passant an CA3-Pyramidenzellen, bleiben auf das CA3-Feld begrenzt und fehlen in der benachbarten CA1-Region. Der MF-Trakt teilt sich in ein suprapyramidales und ein infrapyramidales Blatt. Die suprapyridalen MF-Axone sind auf das Stratum lucidum (sl) begrenzt und terminieren an den proximalen Segmenten der apikalen Pyramidenzell-Dendriten. Diese Projektion endet aus bisher unbekanntem Gründen präzise an der Grenze der CA3/CA2-Region zu CA1. Die infrapyramidale MF-Projektion verläuft innerhalb und unter dem Pyramidenzellband von CA3 und variiert in Größe und Ausdehnung. Diese Variation in der Länge ist in der Entwicklung reguliert (Bagri et al., 2003) und korreliert mit der Bewältigung von Lern- und Gedächtnisaufgaben im Tiermodell (Lipp et al., 1988).

Axone der CA3-Neurone finden als retrograde Kollateralen (rosa; Schaffer-Kollateralen) im Stratum radiatum (r) synaptischen Kontakt mit den Dendriten der CA1-Pyramidenzellen (grün). Somit ergibt sich aus dem Verlauf der Erregungsausbreitung im Hippocampus, in der glutamaterge entorhinale Afferenzen die Körnerzellen aktivieren, die über den MF-Trakt CA3-Pyramidenzellen anregen, welche wiederum über die Schaffer-Kollateralen die CA1-Pyramidenzellen innervieren, ein trisynaptischer Erregungsweg des Hippocampus.

1.3 Das Homeobox-Gen *Emx2* in der Ausbildung des Gyrus dentatus

Während der Embryonalentwicklung nehmen Homeobox-Gene innerhalb des Genoms eine Sonderstellung ein. Durch sie werden Proteine, die als Transkriptionsfaktoren, d.h. als Faktoren, die die Übersetzung der Erbinformation in Form von DNS in Proteine in funktionell zusammenhängenden Genkomplexen an- und abschalten können reguliert. Die Homeobox besteht aus etwa 180 Basenpaaren, die einen Proteinabschnitt als Homeodomäne von 60 Aminosäuren codiert, welche dann durch andere Teile des Transkriptionsfaktors gesteuert, spezifisch an die entsprechenden DNS-Sequenzen bindet. Ein Charakteristikum der Homeobox-Gene ist die hohe Ähnlichkeit oder Homologie zwischen den verschiedenen Spezies.

Das *Emx2*-Gen, ein vertebrales Homeobox-Gen, verwandt mit dem *Drosophila emy spiracles (ems)* -Gen (Dalton et al., 1989), wird im vorderen ZNS der embryonalen Maus inklusive dem vorläufigem Hippocampus exprimiert (Simeone et al., 1992; Mallamaci et al., 1998). Die Rolle von *Emx2* in der Entwicklung des Vorderhirns kann aus Studien des Kortex und des Bulbus olfactorius in *Emx2*-Knockout-Tieren abgeleitet werden. Im Isokortex ist *Emx2* nicht nur wesentlich für die korrekte regionale Gebietszuordnung, sondern auch für die angemessene thalamo-kortikale Verbindung (Malamaci et al., 2000a). Die fehlende Ausbildung einer axonalen Verbindungsfähigkeit ist aus dem Bulbus olfactorius von *Emx2*-Mutanten bekannt (Yoshida et al., 1997). Sowohl im Isokortex als auch im Bulbus olfactorius ist ein *Emx2* Mangel mit einer histologischen Desorganisation vergesellschaftet, wahrscheinlich durch inadäquate neuronale Migration auf Grund gestörter Reelin-Signalgebung bedingt (Cecchi und Boncinelli 2000; Mallamaci et al., 2000b).

Reelin stellt ein in der Entwicklung exprimiertes und von in der neuronalen Migration und Positionierung maßgeblichen spezialisierten Neuronen, den Cajal-Retzius-Zellen sezerniertes Glykoprotein dar. Diese Cajal-Retzius-Zellen finden sich während der Embryonalentwicklung in der Marginalzone des Kortex, wo sie frühe neuronale Schaltkreise ausbilden und eine Reihe von für die Ontogenese wichtige Gene exprimieren: Neben *Rln* (Meyer und Goffinet, 1998), das für Reelin codiert und somit verantwortlich für die korrekte Schichtung des Isokortex ist und *LIS1* (Clark et al., 1997), welches bei Fehlen eine Lissencephalie, ein selten auftretendes Fehlen von Hirnfurchen und -windungen auslöst, auch das Homeobox-Gen *Emx2*.

1.4 Leitmoleküle in der Formation spezifischer Verbindungen im Hippocampus

Die Bildung von spezifischen neuronalen Verbindungen im ZNS bedarf eines gerichteten Auswachsens von Axonen über längere Distanzen hinweg, um ihre Zielregionen zu erreichen.

Es ist nun von wachsender Evidenz, dass chemotrophe Mechanismen in der Verschaltung des sich entwickelnden Nervensystems eine wesentliche Rolle spielen. In den vergangenen Jahren wurden dazu verschiedene Moleküle identifiziert. Sie werden in einem räumlich-zeitlichen Muster exprimiert und haben repulsive oder attraktive Wirkung auf auswachsende Axone (Tessier-Lavigne und Goodman 1996). Die chemorepulsiven Faktoren hindern die Axone, in eine Region einzutreten, während auswachsenden Axone von chemoattraktiv wirkenden Leitmolekülen zu ihrem entsprechenden Zielgebiet hin gelenkt werden. Wenn die Nervenfasern ihren Bestimmungsort erreichen, muss das weitere Auswachsen gebremst werden, um das Ausbilden von synaptischen Kontakten zu ermöglichen. Diese koordinierte Expression von attraktiven und repulsiven Leitmolekülen und ihren korrespondierenden Rezeptoren am Wachstumskegel der auswachsenden Nervenfasern, ist eines der wesentlichen Voraussetzungen für die Formation schichtenspezifischer synaptischer Verbindungen (Sanes et al., 1999).

Hier werden nun verschiedene in der Entwicklung und Regeneration des Gehirns maßgeblichen Gruppen von Wegweisern vorgestellt und insbesondere ihre Funktion während der Entwicklung des Hippocampus erläutert.

Semaphorine:

Die sieben Klassen der Semaphorine (engl. semaphore: Flaggsignal) umfassen eine große Familie von sezernierten und membranständigen Mitgliedern (Cheng, et al., 2001), die während der Evolution in Struktur und Funktion bei Invertebraten und Vertebraten weitgehend unverändert geblieben ist (Semaphorin Nomenclature Committee, 1999). Als Rezeptoren stehen den Semaphorinen, die Gruppe der Plexine und der Neuropiline gegenüber (Fujisawa et al., 1997). Semaphorine wirken als repulsive Leitsignale auf eine große Gruppe von Neuronen (Nakamura et al., 2000), so auch im Hippocampus, können aber auch attraktives neuronales Auswachsen vermitteln. Die sezernierten Klasse 3 Semaphorine (Sema3), die wiederum alphabetisch in Untergruppen eingeordnet werden, sind von den zurzeit im Säuger bekannten fünf Gruppen, die am besten charakterisierten Vertebraten-Semaphorine. Axone von embryonalen Neuronen aus Explantaten der verschiedenen hippocampalen Subfelder werden von Sema3A und Sema3F abgestoßen (Chédotal et al., 1998). Im sich entwickelnden Hippocampus der Ratte, ist mRNA von Sema3A in der Körnerzellschicht und an der Grenze vom Subiculum

zur CA1-Region lokalisiert, also in Regionen, in denen das Einwachsen der entorhinalen Axone verhindert wird (Skaliora, et al., 1998). Von Steup und Kollegen konnte 2000 ein repulsiver Effekt von Sema3A auf Schicht II/III-Axone des EC (Ursprungsneuronen des Tractus perforans) gezeigt werden. Pozas et al. demonstrierten 2001 ein zeitlich-räumliches Muster der Chemorepulsion in der embryonalen und perinatalen hippocampalen Formation. In der Sema3A-Knockout Maus entwickelten sich allerdings die entorhinalen Afferenzen und der MF-Trakt normal, was auf funktionelle kompensatorische Mechanismen hinweist (Steup et al., 2000, Catalano et al., 1998). Sema3C, das im CA1-Pyramidenband exprimiert wird, scheint eine repulsive Wirkung auf septale Afferenzen zu haben, wohingegen Neuriten aus EC-, CA3- und DG/Hilus-Explantaten nicht durch dieses Molekül abgestoßen werden (Skutella und Nitsch, 2001). Ein anderes Mitglied der sezernierten Semaphorine, Sema3F, wird im EC und Hippocampus exprimiert und hält CA1-, CA3- und DG-Axone, aber keine EC-Axone fern.

Die zurückweisende Wirkung einiger Klassen der Semaphorine im vertebraten Nervensystem wird durch zwei Rezeptorfamilien, den Plexinen und Neuropilinen, vermittelt (Tamagnone et al., 1999). Experimente mit blockierenden Antikörpern konnten zeigen, dass Plexin A3 und Neuropilin 2 in der korrekten Ausbildung der hippocampalen MF-Projektion involviert sind und ein vermindertes Ansprechen von hippocampalen Axonen auf das repulsive Semaphorin bewirken (Chen, et al 1998; Cheng et al., 2001). So erstreckte sich nach Deletion des Rezeptorgens für Neuropilin 2, der MF-Trakt bis in CA1-Region hinein. Welchen Effekt diese Veränderung auf das Lernverhalten dieser Knockout-Mäuse hat, ist noch Gegenstand von weiterführenden Untersuchungen.

Slit und Robo:

Jüngere Forschungsergebnisse demonstrieren, dass ein anderes repulsives Wegweiser-System, das Slit-Robo-Ligand-Rezeptor-System, für die Ausbildung der schichtenspezifischen Organisation hippocampaler Fasertrakte essentiell ist. Robo1 (robo: roundabout) und Robo2 sind transmembranäre Glykoproteine der Immunglobulin-Superfamilie (IgSF). Die Rezeptoren und ihre Liganden Slit1 und Slit2 werden im sich entwickelnden Hippocampus in einer komplementären Art exprimiert (Kidd et al., 1999). Am Embryonaltag 18 (E18) werden die sezernierten Liganden Slit1 und Slit2 im prospektiven Pyramidenzellband, nicht aber im DG und EC gefunden. Zu gleichen Entwicklungszeitpunkten ist Robo1 und Robo2 in denselben Strukturen zu lokalisieren. Lediglich Robo1 kann aber im DG nachgewiesen werden. Nguyen Ba-Charvet et al. konnten zeigen, dass entorhinale Axone, die Slit2 sezernieren, das Eindringen von MF-Axonem in die oberen dendritischen Segmente der CA3-Neurone verhindern. Slit1 und

Slit2 werden auch zu späteren postnatalen Stadien gefunden, was als möglichen Einfluss auf die axonale Aufzweigung und die synaptische Zielfindung gewertet werden könnte (Özdiner und Erzurumlu, 2002). Interessanterweise konnte der Rezeptor Robo2 auch auf Cajal-Retzius-Zellen nachgewiesen werden (Nguyen Ba-Charvet, et al., 1999). Diese Zellen sind wichtig in der Formation der entorhino-hippocampalen Projektion. Da entorhinale Fasern Slit2 sezernieren, wurde angenommen, dass dieses Molekül für die Cajal-Retzius-Zellen eine Art Barriere gegen das Eindringen in den EC darstellen könnte. Ceranik und Kollegen konnten allerdings zeigen, dass Cajal-Retzius-Zellen Kollateralen in die oberflächlichen Schichten des EC's aussenden. Also müsste die repulsive Wirkung von bisher unbekanntem Mechanismen neutralisiert worden sein. Eine neuere Arbeit von Stevens und Jacobs (2002) demonstriert an Drosophila Embryos, dass Integrine das Ansprechen auf repulsive Signale durch Slit in einer dosisabhängigen Weise regulieren können. Kompensatorische Mechanismen, wie auch die Koexistenz von verschiedenen axonalen Wegfindungssystemen, müssen also bei der Gestaltung des neuronalen Netzwerkes in Betracht gezogen werden.

Netrine:

Netrin1 (netrin, aus dem Sanskrit: „Der führende“), ein Laminin-verwandtes sezerniertes Protein und seine Rezeptoren DCC (deleted in colorectal carcinoma) und Neogenin sind in der Ausbildung der Mittellinie kreuzender, kommissuraler Projektionen involviert. Es hat sich gezeigt, dass Netrin1 dabei eine chemoattraktive Wirkung in Richtung Mittellinie auf kommissurale Axone des Rückenmarks (Kennedy et al., 1994; Serafini et al., 1994) aber eine chemorepulsive Wirkung für Axone verschiedener im Hirnstamm lokalisierter Kerngebiete ausübt (Colamarino, 1995). In der perinatalen Periode (zwischen E19 und P8), wenn sich kommissurale Projektionen ausbilden, wird Netrin1-mRNA im Fimbria-Fornix-System und den Zielregionen der kommissuralen Fasern, der inneren Molekularschicht des DG exprimiert (Chédotal et al., 1998; Steup et al., 2000). Zur gleichen Zeit wird eine DCC-Expression in den hippocampalen Zielfeldern der kommissuralen Projektionen beobachtet. Steup und Kollegen konnten in Experimenten an Explantatkulturen nachweisen, dass Netrin1 kommissurale Axone zum kontralateralen Hippocampus leitet. Ergebnisse aus Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe an Schnittkulturen von Netrin1-Knockout Mäusen legen die Vermutung nahe, dass Netrin1 darüber hinaus die Zielfindung hippocampaler Afferenzen beeinflusst (Heimrich et al., 2002).

1.5 Zelladhäsionsmolekül NCAM

Für viele Vorgänge, wie Proliferation, Differenzierung, Migration und Zellaggregation, die für die Bildung und Aufrechterhaltung funktionsfähiger Gewebe und Organe notwendig sind, spielt die Zelladhäsion eine zentrale Rolle. Diese wird im adulten Organismus, sowohl bei physiologischen (Lymphozytenwanderung, Wundheilung), als auch bei pathologischen (Tumorentstehung, -wachstum, Metastasierung) Prozessen moduliert (Hynes und Lander, 1992). Man versteht unter der Zelladhäsion, einen über Zelladhäsionsmoleküle vermittelten Kontakt zu den Nachbarzellen oder der Extrazellulärmatrix. Dabei sind Zell-zu-Zell-Adhäsionsvorgänge entscheidend für die Ablösung und Aggregation einzelner Zellen oder von Zellgruppen aus einem Zellverband. Zell-zu-Matrix-Interaktionen wiederum sind eher bei der Zellmigration beteiligt. Beide Zelladhäsionsformen sind beim Auswachsen und der Zielfindung von Nervenzellfortsätzen involviert.

Da viele Adhäsionsmoleküle mit Teilen des Zytoskeletts oder mit intrazellulären Signalmolekülen verbunden sind, werden über den mechanischen Kontakt hinaus, Signale aus der Umgebung registriert, integriert und in das Zellinnere weitergeleitet.

Vom Aufbau handelt es sich bei Zelladhäsionsmolekülen meist um transmembranäre Glykoproteine mit entweder einer zytoplasmatischen Domäne unterschiedlicher Länge oder einem Glykosyl-Phosphatidylinositol (GPI)-Rest zur Membranverankerung.

Eingeteilt werden die Zelladhäsionsmoleküle nach ihren strukturellen Ähnlichkeiten in die Gruppe der Cadherine, der Selektine, der Integrine und der IgSF. Die IgSF stellen die größte Gruppe strukturverwandter Proteine mit über 100 Mitgliedern (Brummendorf und Rathjen, 1995), die unterschiedlichste Funktionen erfüllen dar, einige IgSF-Proteine eben die der Zelladhäsion.

Die Zelladhäsionsmoleküle der IgSF spielen unter anderem als T-Zell- und B-Zell-Rezeptor, Korezeptor CD4, CD8, CD28 und als MHC I- und II-Molekül im Immunsystem eine wesentliche Rolle. Im Nervensystem ist eine andere Untergruppe der IgSF für das Auswachsen von Neuriten und das Entstehen sowie das Aufrechterhalten neuronaler Verbindungen essentiell (Baldwin et al., 1996). Zu dieser gehört neben dem Neuron-Glia-Cell-Adhesion-Molecule (NgCAM) und dem Myelin-associated-Glycoprotein (MAG) auch das innerhalb der IgSF-Familie als erstes beschriebene Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM) (Rutishauser et al. 1976).

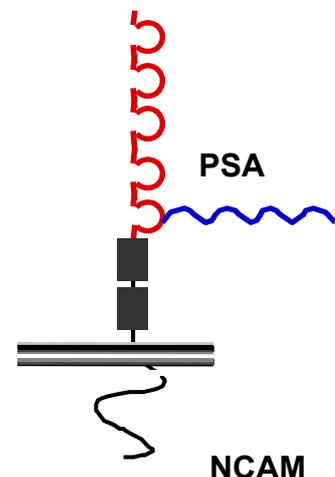
Während der Embryonalentwicklung wird NCAM im Blastoderm und später in den ektodermalen und mesodermalen Abkömmlingen, wie z.B. Neuralplatte, -rohr und Endothel exprimiert. Im weiteren Verlauf nimmt die Expression in den meisten Geweben ab, bleibt jedoch

im adulten Organismus vornehmlich im Nervensystem erhalten. Im ZNS wird NCAM von Neuronen und Astrozyten sowie im peripheren Nervensystem von Neuronen und Schwann-Zellen exprimiert. Außerdem findet sich NCAM auf der Zelloberfläche von Skelettmuskelzellen, β -Zellen des Pankreas und natürlichen Killerzellen (Lanier et al., 1991).

Im Gehirn existieren auf Proteinebene drei Isoformen, die durch alternatives Splicen eines primären Transkripts eines einzigen Gens (bei der Maus auf Chromosom 9 und beim Menschen auf Chromosom 11 gelegen, D'Eustachio, et al., 1985 und Nguyen et al., 1986) entstehen. Diese Isoformen haben ein Molekulargewicht von 120, 140 und 180kDa [Kilo Dalton] und sind mit vergleichbaren extrazellulären Domänen ausgestattet. Während die 140- und 180kDa-Isoformen über transmembranäre Glykoproteine mit einem intrazellulären Anteil unterschiedlicher Größe assoziiert sind, ist die 120kDa-Isoform über einen GPI-Anker an die Zellmembran gebunden (Cunningham et al., 1987). Die unterschiedlichen Funktionen der einzelnen Isoformen wurden durch die variable Lokalisation identifiziert. So liegt NCAM 180 vornehmlich an Zell-zu-Zell-Kontaktstellen von Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten (beim Neuron: Soma, Neurit und Wachstumskegel) vor und ist durch seine Verknüpfung mit dem Zytoskelett (Pollerberg et al., 1990) an der Stabilisierung der interzellulären Kontakte beteiligt. NCAM 140 findet sich auf Neuronen und Muskelzellen und konnte auf prä- und postsynaptischen Membranen detektiert werden. Die 120kDa-Isoform wird vornehmlich von Gliazellen synthetisiert und wird von den drei Isoformen in der Individualentwicklung am spätesten exprimiert.

Somit können die unterschiedlichen NCAM-Isoformen homophile (NCAM-NCAM) Bindungsreaktionen zwischen verschiedenen Zellen als Zell-zu-Zell-Adhäsionsvorgänge sowie auch heterophile Bindungen zwischen Zellen und extrazellulären Proteoglykanen wie Heparansulfat und Chondroitinsulfat als Zell-zu-Matrix-Interaktionen vermitteln. Allen drei Isoformen ist die posttranslationale Modifikation durch Polysialylierung, einem beinahe NCAM-spezifischen Vorgang, gemein.

Bei dieser posttranslationalen Modifikation werden die in α 2,8-glycosidischer Bindung aneinander gereihete und aus 5-*N*-Acetyl-Neuraminsäure bestehende Sialinsäuredimere als Polysialinsäure (Polysialic Acid: PSA; blau) an die äußere Kette der *N*-verknüpften Oligosaccharide (rot) des Trägermoleküls NCAM addiert (Finne et al., 1983). Nur noch von α -Untereinheiten einiger Natriumkanäle im Rattenhirn ist eine ähnliche Polysialylierung bekannt (Zuber et al., 1992).



Sialinsäuremonomere (hauptsächlich 5-*N*-Acetyl-Neuraminsäure) werden im Zytosol aus *N*-Acetyl-D-Mannosamin (ManNAc) synthetisiert und im Zellkern zu CMP-Sialinsäure aktiviert (Kean, 1991, Münster et al., 2002).

Für die Biosynthese von PSA und das Anfügen an NCAM im Golgi-Apparat sind die beiden hoch homologen Polysialyltransferasen ST8Sia-II und -IV (Hildebrandt et al., 1998) verantwortlich und über fast alle Entwicklungsstufen des embryonalen und juvenilen Organismus aktiv, wobei ST8Sia-II pränatal dominiert, dann bis zur Nachweisgrenze abnimmt und im Anschluss ST8Sia-IV im ZNS erhalten bleibt. Das Kohlenhydratpolymer PSA kann aus über 100 Einheiten bestehen. Die sich dadurch ergebene negative Ladung und der stark hydrophile Charakter bedingen eine große Hydrathülle, so dass es sich bei PSA-NCAM nach der Modifikation um eine raumfüllende, Abstand gebietende Struktur handelt.

Der höchste Grad der PSA-Expression wird während der Perinatalperiode, wenn sich neuronale Schaltkreise ausbilden und sich die Synaptogenese auf dem Höhepunkt befindet, erreicht. Die Polysialylierung nimmt dann schnell im adulten Hirn ab und bleibt dann auf Regionen mit anhaltender Neurogenese, neuronaler Migration und synaptischer Plastizität, wie dem Bulbus olfactorius und dem Hippocampus beschränkt (Seki und Arai, 1993, Szele et al., 1994; Rutishauser und Landmesser, 1996, Seki und Rutishauser, 1998).

Neben dieser Rolle in der Entwicklung wird PSA-NCAM unter pathologischen Bedingungen wie bei Malignität und Metastasierung (Michalides et al., 1994) exprimiert und kann als klinischer Prognosemarker für das periphere T-Zelllymphom (Kern et al., 1992), das Neuroblastom (Glüer et al., 1998), den β -Zelltumor des Pankreas (Perl et al., 1999) und das kleinzellige Bronchialkarzinom (Tanaka et al., 2001) genutzt werden.

1.6 Die hippocampale Formation als organotypische Schnittkultur

Viele der Untersuchungen zur Erforschung von Entwicklungs- und Regenerationsvorgängen im ZNS finden nicht nur am Versuchstier (*in vivo*) sondern auch an Zell- und Gewebekulturen (*in vitro*) statt. Dabei sind bei *in vitro* Experimenten die Versuchsbedingungen meist im Vergleich zu der *in vivo* Situation weniger komplex und damit besser einschätzbar. Andererseits bergen Versuche an Zell- und Gewebekulturen die Gefahr, nicht mehr auf den physiologischen Zustand übertragbar zu sein und in eine „Artefaktforschung“ abzugleiten.

Kulturen von Hirngewebe wurden seit den zwanziger Jahren des letzten Jahrhunderts angelegt und im Laufe der Zeit neuroanatomisch, pharmakologisch und später auch elektrophysiologisch untersucht. Gähwiler hat dann zu Beginn der achtziger Jahre die Hirngewebe-Kultur mit einem so genannten Roller-Tube optimiert, so dass nun auch Inkubationen über einen längeren Zeitraum möglich wurden. Bei dieser Technik sind die Gewebekulturen eingebettet in einer Matrix auf einem Objektträger in einem etwa zur Hälfte mit Nährmedium gefülltem Röhrchen untergebracht und werden durch die Rotation dieses Röhrchens alternierend mit dem Inkubationsmedium und dem umgebenen Luftsauerstoff in Kontakt gebracht. Zehn Jahre später wurde von Stoppini eine Alternativtechnik entwickelt, bei der die explantierten Gewebeschnitte auf permeablen Membranen platziert wurden und die Kulturen per Diffusion von unten mit Nährmedium versorgt und oben oxygeniert werden. Diese Methode hat den Vorteil der leichteren Zugänglichkeit bei Untersuchungen während der Inkubation.

Als günstigster Explantationszeitraum hat sich der frühe postnatale Zeitabschnitt zwischen Tag Null (P0) und Tag 7 (P7) nach der Geburt erwiesen. Hier ist auf der einen Seite die Plastizität des entnommenen Hirngewebes zur Kompensation der immensen Manipulation am größten und auf der anderen Seite die Histoarchitektur weitestgehend abgeschlossen oder angelegt. Bevorzugtes Gewebe zur Kultivierung in Schnittkultur sind das Kleinhirn, der Hypothalamus und der Hippocampus (Gähwiler, 1984).

Die hippocampale Formation mit ihrer typischen Zytoarchitektur und laminären Organisation des afferenten Fasersystems ist ein weit verbreitetes Modell zur Untersuchung des neuronalen Auswachsens und der Synapsenbildung. Zwar wird bei der Präparation von organotypischen Schnittkulturen der Hippocampus von seinen Efferenzen und Afferenzen isoliert, der intrinsische Erregungsweg reetabliert sich aber wie *in situ*. So wachsen die bei der Explantation der hippocampalen Formation durchtrennten entorhinalen Fasern wieder in ihre Terminationszone der äußeren Molekularschicht aus, die MF des DG erreichen ihr Zielgebiet in der CA3-Region (Zimmer und Gähwiler, 1984) und auch die Schaffer-Kollaterale sind zwischen CA3 und CA1

präsent (Muller et al., 1993). Auch in elektrophysiologischen Studien (Li et al., 1993) konnte die erhaltene Funktionalität der Schnittkultur belegt werden.

Fügt man nun zwei oder mehr Hirnschnitte aneinander, um beispielsweise das Reetablieren von Afferenzen zu untersuchen, spricht man von einer Kokultur. In der häufig genutzten entorhino-hippocampalen Kokultur konnten in Untersuchungen von Frotscher und Heimrich (1993) das schichtenspezifische Einwachsen der entorhinalen Projektion in die äußere Molekularschicht des DG gezeigt werden.

1.7 Entwicklung der Fragestellung und Versuchsplanung

Die Entwicklungsprozesse im Hippocampus ähneln denen im Isokortex; so findet sich dort auch ein „Inside-Out“-Gradient (Caviness 1973; Caviness und Rakic, 1978; Marin Padilla, 1978). Die hippocampalen Pyramidenzellen, die später das Cornum Ammonis (CA1-CA3) formen, migrieren entlang der Radialglia und terminieren in einer von Innen nach Außen sich orientierenden Weise in der hippocampalen Lamelle.

In diesem Gebiet stellt der DG das zentrale Ziel der Afferenzen als Zusammenführung des „sensorischen“ Inputs in den Hippocampus dar. Die hauptsächlichen Quellen der grundlegenden extrinsischen Projektionen in den Hippocampus hinein entspringen dem ipsi- und kontralateralen EC und Hippocampus (Blackstad et al., 1967; Raisman et al., 1966). Entorhinale und kommissurale Axone terminieren im DG in einer getrennten, nicht überschneidenden Weise. Es ist bemerkenswert, dass die schichtenspezifische Termination der entorhino-hippocampalen Afferenzen unabhängig von den Zielneuronen, den DG-Körnerzellen zu sein scheint. So finden die entorhinalen Axone auch nach Elimination der Körnerzellen durch kurz nach der Geburt applizierte Röntgenstrahlung (Laurberg und Hjorth Simonsen, 1977; Frotscher et al., 2001), nach Depletion von Reelin in der Reeler Knockout-Maus (Deller et al., 1999) und bei veränderter Körnerzellendifferenzierung in der NeuroD-Knockout (Schwab et al., 2000) ihren Bestimmungsort. Die Rolle von Emx2 in der postnatalen Entwicklung, d.h. der Periode, in der sich der DG durch Migration, Proliferation und Differenzierung der Körnerzellen ausbildet und seine Projektion, den MF-Trakt auszusenden beginnt ist bisher, da die homozygoten Emx2-Knockout Embryos am Tage ihrer Geburt auf Grund schwerer Nierenfehlbildung versterben, unbekannt. Emx2 scheint aber in die Regulation der Reelin-Signalübertragung involviert zu sein (Mallamaci et al., 2000b). In Emx2^{-/-} Embryos zeigen der mediale limbische Kortex und der Hippocampus eine Größenabnahme und einen fehlenden DG (Pellegrini et al., 1996; Yoshida et al., 1997).

Die großen hippocampalen Verbindungen werden perinatal gebildet, so dass diese in den Emx2 defizienten Mäusen, auf Grund der postnatalen Letalität nicht ohne weiteres einer Untersuchung zugänglich waren (Pellegrini et al., 1996). Aus diesem Grunde wurden hier organotypische Schnittkulturen des Hippocampus von Emx2^{-/-} Embryos angefertigt und nach entsprechender Inkubationszeit unter Anwendung immunhistochemischer Methoden, die Differenzierung der Körnerzellen inklusive ihres Dendritenbaumes beurteilt.

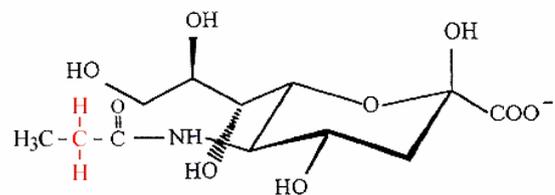
Nach dieser Studie zum Verständnis dieser genetisch determinierten Vorgänge zur Ausbildung der „Schaltstelle“ DG im Hippocampus und der Rolle eines sezernierten Leitmoleküls, stellte sich die Frage nach membranständigen Einflussfaktoren in der Formation der

intrahippocampalen Projektionen und der synaptischen Zielfindung. Hier bot sich das in der Embryonalphase, also der Periode höchster Synaptogenese, aktive PSA-NCAM an.

Zur Untersuchung der Funktion von PSA-NCAM, sind verschiedene Knockout-Modelle entwickelt worden, bei denen durch das gezielte Abschalten oder Entfernen eines Gens die Auswirkung auf den Phänotyp studiert werden kann (Cremer et al., 1994). So sind die NCAM-Knockout-Mäuse lebensfähig und fertil; lediglich die Hirnmasse ist um etwa 10% und die Größe des Bulbus olfactorius, einer Region zeitlebens andauernder neuronaler Proliferation, um ca. 40% reduziert. Im Bereich des DG in der hippocampalen Formation (ebenfalls ein Ort anhaltender Neurogenese) sind die Axone der Körnerzellen, die MF, in ihrer Dichte und Bündelung (Faszikulation) herabgesetzt. Dies korreliert auch mit den beschriebenen Ausfällen beim Bewältigen der Lern- und Gedächtnisaufgaben im Morris-Water-Maze-Test (Cremer et al., 1994), einem Test, in dem die Tiere in undurchsichtigem Wasser schwimmend den kürzesten Weg auf die sichere Plattform finden und bei Wiederholung erinnern sollen.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch durch die enzymatische Entfernung von PSA durch intraventrikuläre Injektion von Endoneuraminidase (EndoN) erzielt (Seki und Rutishauser, 1998). Dies deutete darauf hin, dass die beschriebenen Effekte unabhängig von der Anwesenheit von NCAM, sondern durch den Verlust von PSA bedingt sind.

R:	Formel	Name
-acetyl (AC)	-CO-CH ₃	ManNAc
-propanoyl (Prop)	-CO-CH ₂ -CH ₃	ManNProp



N-Acetyl Sialinsäure bzw.
N-Propanoyl Sialinsäure

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass ein synthetischer Sialinsäurevorläufer mit verlängerter *N*-Acetyl-Seitenkette (*N*-Propanoyl-D-Mannosamin = ManNProp) einen maßgeblichen Inhibitor der Polysialyltransferase ST8Sia-II (Mahal et al., 2001; Horstkorte et al., 2004) darstellt und damit die Biosynthese von PSA verhindert. ManNProp unterscheidet sich von seiner natürlichen Form (*N*-Acetyl-D-Mannosamin = ManNAc) lediglich in einer CH₂-Gruppe in der *N*-Acetyl-Seitenkette (Keppler et al., 2001). Bisher sind als Effekte der ManNAc Substitution durch ManProp eine verstärkte Stabilität der Glucokonjugate (Horstkorte et al., 2001), ein stimuliertes Auswachsen von Neuriten und das gesteigerte Knüpfen neuronaler Verbindungen nach Läsion in neuronaler Zellkultur (Büttner et al., 2002) beschrieben.

Hier soll die Rolle von PSA in der axonalen Zielfindung und der synaptischen Spezifität hippocampaler MF durch die Blockierung der in der Entwicklung regulierten Polysialyltransferase ST8Sia-II mittels ManNProp *in vitro* und *in vivo* untersucht werden. Dieser Ansatz ermöglicht es, die Funktion von PSA zu definierten Zeitpunkten zu untersuchen und dabei mögliche kompensatorische Mechanismen zu minimieren. Weiterhin soll das postläsionale Auswachsen der MF bei biochemisch verursachter Hemmung der Polysialylierung beurteilt werden.

Für die Visualisierung von *in vitro* gewachsenen Faserverläufen werden gewöhnlich sogenannte Tracing-Techniken (engl. to trace: verfolgen) genutzt. Das Ein- oder Aufbringen einer Tracersubstanz kann aber in einigen Fällen zu mechanischer Schädigung der zu verfolgenden Nervenfasern führen, oder die Neuronen nehmen den Tracer nicht auf. Diese technischen Fallgruben können somit das Auffinden von Axonen, die ein Zielgebiet ansteuern und erreichen, stark begrenzen.

Deshalb sollte ein Modell entwickelt werden, das zukünftig die gesamte Entität der aus- und einwachsenden Fasern in dem organotypischen Schnittmodell des Hippocampus detektiert.

Dazu nutzen wir Hirnschnitte transgener Mäuse, die grün-fluoreszierendes Protein (GFP) unter dem β -Aktin-Promoter exprimieren und kulturell diese mit wildtyp-Schnitten. β -Aktin ist integraler Bestandteil des Zytoskeletts und somit in allen Körperzellen erhalten. Diese Methode ermöglicht zukünftig neben der vollständigen Detektion auswachsender Axone auch im umgekehrten Ansatz die Beobachtung der Interaktion von einzelnen Axonen oder Zellen in ihrer Umgebung.