

4. Diskussion:

4.1 Emx2 in der Entwicklung des Gyrus dentatus und seinen Projektionen

Einer der Hauptbefunde in der Untersuchung der Rolle des Homeobox-Gens Emx2 in Knockout Tieren war, dass diese keine intrinsischen hippocampalen Projektionen ausbilden.

Die Anzeichen einer fehlenden neuronalen Differenzierung stammen aus der Analyse von der Entwicklung intrinsischer Verbindungen *in vitro*. In wildtyp Kulturen senden die dentatus Körnerzellen ihre Axone wie von Blackstad et al. 1967 *in vivo* und Schwegler et al. 1988 *in vitro* beschrieben via dem MF-Takt zur Regio inferior des Cornum Ammonis (auch CA3) auf eine regional spezifische Art und Weise. Weiterhin entwickelten die Körnerzellaxone charakteristische Giant en passant boutons, was auf eine normale Synaptogenese hindeutet. In Emx2^{-/-} Tiere entstanden diese Merkmale der Körnerzellen auch nicht nach längerer Inkubation von 2 Wochen. Auch die hilären Mooszellen formten keine efferente Projektion. Das Ausbleiben der intrahippocampalen Verschaltung kann hier direkt dem Fehlen von Emx2 zugeordnet werden, ergo der Abwesenheit der Zielzellen: den ausgereiften Körnerzellen.

Der zweite Hauptbefund war, dass Emx2 notwendig für die postnatale Maturation der dentatus Körnerzellen und der hilären neuronalen Organisation ist.

Emx2^{-/-} Mäuse zeigen einen Entwicklungsrückstand im Hilus und im DG. Zu E18,5 ist das Einrollen des Hippocampus verzögert, etwa entsprechend dem Alter eines E15 Wildtypen. Da die Emx2 Genexpression bestimmend für den Großteil des medialen embryonalen Kortex wirkt (Malamaci et al., 1998, Yoshida et al., 1997), kann man annehmen, dass Emx2 die regionalen Phänotypen, zumindest teilweise die des DG (z.B. den polymorphen Hilus und die Prinzipalschicht der Körnerzellen) entscheidend beeinflusst. Basierend auf dieser Rolle der regionalen Spezifikation, erwähnten Pellegrini und Kollegen bereits 1996 einen möglichen Einfluss von Emx2 auf die betroffenen Regionen im Hippocampus. In einer neueren Arbeit konnten Tole et al. (2000) mittels molekularer Marker zeigen, dass jede hippocampale Subregion über ihre charakteristische neuronale Messenger-RNA definiert wird. Darüber hinaus entwickelt jede Zellpopulation ihre korrekte Position in Relation zu einander. Der Großteil der dentatus Körnerzellen wird erst während der ersten Lebenswochen generiert, wo sie zu ihrer endgültigen Position innerhalb des Körnerzellbandes migrieren (Angevine, 1965), somit findet die Maturation der Körnerzellen erst postnatal statt.

Wenn man die Ergebnisse der Schnittkulturen der vorliegenden Arbeit betrachtet, müsste noch eine andere Funktion von Emx2 in Betracht gezogen werden. Die Immunfluoreszenz zeigt

Calbindin-positive Zellen und hiläre Mooszellen in $Emx2^{-/-}$ -Tieren. Allerdings konnte auch nach längerer Inkubationszeit weder die charakteristische C-förmige Schichtung der dentatus Körnerzellen noch die morphologisch als differenziert zu bezeichnenden Körnerzellen in $Emx2^{-/-}$ Schnittkulturen beobachtet werden. Dies offenbart einen Stopp der normalen Migration und Differenzierung dieser Zellpopulation. Außerdem erschien die Verteilung der über ihre Immunreaktivität für das Calcium bindende Protein Calretinin identifizierten hilären Mooszellen, als weniger dicht und somit gestört. Daraus resultiert eine verminderte Projektion an die proximalen Körnerzellendriten in $Emx2^{-/-}$ Mäusen. Das Fehlen von Golgi-gefärbten Neuronen mit charakteristischer Körnerzell-Morphologie deutet darauf hin, dass $Emx2$ wesentlich für die Maturation von dentatus Körnerzellen ist. Sicherlich sind die Befunde wegen der noch im Detail nicht verstandenen Natur der Golgi-Färbung mit Vorsicht zu betrachten. Dennoch zeigen die mit Spines ausgestatteten hilären Neurone in dem gleichen Schnitt, der keine identifizierbaren Körnerzellen aufweist, dass ein $Emx2$ -Defizit nicht generell die Positionierung und Differenzierung, sondern spezifisch die Maturation der Körnerzellen beeinflusst.

In dem ersten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das an der Regulation des sezernierten Leitmoleküls Reelin beteiligte Homeobox-Gen $Emx2$ essentiell für die Ausbildung der intrinsischen Verschaltung und die neuronale Differenzierung im Hippocampus ist. Ein anderer wichtiger Faktor in der Steuerung der neuronalen Verschaltung ist als Vertreter der membranständigen Leitmoleküle das Neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM bzw. dessen verzuckerte (polysialylierte) Oberflächenveränderung.

4.2 Einfluss der PSA-Inhibition auf die axonale Zielfindung in der Entwicklung und nach Läsion

Polysialylierung ist eine einzigartige posttranslationale Modifikation des Neuronalen Zelladhäsionsmolekül NCAM, welches nur während der embryonalen Entwicklung und des frühen postnatalen Stadiums, wenn neuronale Schaltkreise gebildet werden, vorkommt. Diese in der Entwicklung regulierte NCAM-Polysialylierung legt eine wichtige Rolle von PSA in der axonalen Zielfindung und der Synapsenbildung nahe. Obwohl eine Reihe von Knockout Tieren (NCAM^{-/-}, ST8Sia-II^{-/-} und ST8Sia-IV^{-/-}) generiert worden sind, ist die genaue Funktion von PSA noch unklar. Um die Funktion von PSA eingehender zu untersuchen, ist hier der chemisch veränderte Vorläufer der Sialinsäure zur Beeinflussung der Polysialylierung von NCAM zu definierten entwicklungsmaßig und postläsionalen Zeitpunkten verwendet worden. Als Folge veränderten sich das axonale Auswachsen und die synaptische Zielfindung während der Entwicklung, ebenso wie bei der Reinnervation der neuronalen Projektionen nach Läsion.

Die hippocampale MF-Projektion stellt einen prädestinierten Trakt zur Untersuchung der Polysialylierung während der Ausbildung der neuronalen Schaltkreise dar: Diese Projektion hat eine schichtenspezifische Verteilung im Stratum lucidum, ist assoziiert mit der CA3-Region und meidet strikt die CA1-Region (Zimmer und Gähwiler, 1987). Dadurch, dass sich der MF-Trakt erst postnatal entwickelt, können die Effekte, die eine Hemmung der Polysialylierung hervorbringen, zu frühen definierten Zeitpunkten analysiert werden, ohne andere früher gebildete hippocampale Projektionen zu beeinflussen.

Die axonale Zielfindung der MF wurde in der hippocampalen Schnittkultur, einem etabliertem *in vitro* Modell zur funktionellen Analyse von in der Entwicklung des Hippocampus beteiligten Moleküle (Förster et al., 2006), untersucht. Dieses Modell erlaubte es, die Polysialylierung zu definierten Zeitpunkten zu hemmen und damit die Bildung ausgewählter neuronaler Projektionen zu beeinflussen, während mögliche kompensatorische Effekte minimiert wurden.

Ein Hauptbefund dieser Studie war, dass die MF nach Hemmung der PSA-Synthese mit dem unphysiologischen Sialinsäure-Vorläufer ManNProp ihre regionale spezifische Termination verloren haben. Diese MF verliefen nicht nur ektop innerhalb des CA3-Pyramidenzellbandes, sondern drangen auch in die CA1-Region ein. Die Ergebnisse der *in vivo* Untersuchung unterstützen die Hypothese, dass Polysialylierung einen signifikanten Einfluss auf die Zielfindung des MF hat: Die MF erstreckten sich über die CA3/CA2-Grenze hinaus und infiltrierten die CA1-Region. Das infrapyramidale MF-Bündel war in ManNProp behandelten Hippocampi, ähnlich dem Phänotyp der ST8Sia-II-Knockout-Maus (Angata et al., 2004),

deutlich verlängert. Dies demonstriert, dass durch die Verabreichung des chemisch modifizierten Sialinsäure-Vorläufers die embryonale ST8Sia-II-Transferase gehemmt und damit die MF-Verteilung beeinflusst wird.

Nach Hemmung der ST8Sia-II wird PSA noch von der nicht inhibierten ST8Sia-IV synthetisiert. Dies führte in unserer Arbeitsgruppe zu der Beobachtung, dass *in vitro* wie *in vivo* im Vergleich der gegen Calbindin und PSA ko-markierten Hirnschnitte behandelte Tiere PSA nur an Fasern, die der regulären MF-Projektion folgen, aber nicht an MF, die in die CA1-Region eindringen oder ektop im infrapyramidalen Bündel verliefen exprimiert wurde (Vogt et al., *zur Veröffentlichung eingereicht*). Dieser Effekt wird nicht mit einer damit verbundenen veränderten NCAM-Expression beschrieben, da NCAM sowohl auf den die CA3/CA2-Grenze überschreitenden Fasern als auch auf den die CA3-Region infiltrierenden infrapyramidalen MF zu detektieren gewesen sei.

Die *in vitro* und *in vivo* Daten deuten daraufhin, dass PSA massiv bei der Zielspezifität der MF involviert ist. Der Einfluss auf die Zielspezifität schien mit dem Beginn der PSA-Inhibition während der Ausbildung dieser Projektion verbunden zu sein, da früher gebildete Fasertrakte nicht beeinträchtigt waren (Vogt et al., *zur Veröffentlichung eingereicht*).

Der anhaltende wachstumsfördernde Effekt, wie er in den Schnittkulturen zu beobachten war, führte zu der Frage, ob eine Hemmung der PSA-Synthese nicht die Regeneration nach Läsion verstärkt. Da die Regenerationsfähigkeit des MF-Traktes in organotypischen Schnittkulturen normalerweise sehr beschränkt ist (Nguyen et al., 1996), sollte dieses Modell genutzt werden, um eben diese an PSA-mangelnden MF zu untersuchen. Die Daten zeigen, dass bei Hemmung der PSA-Synthese, die Reinnervation der CA3 nach Läsion signifikant verstärkt war. Ein weiteres Indiz für gesteigerte Reinnervation der Körnerzellen in behandelten Kulturen wäre ein besser erhaltener Dendritenbaum, da Retraktion des dendritischen Feldes eigentlich die gewöhnliche Reaktion von Neuronen nach Axotomie (Naumann et al., 1992) darstellt. Eine bessere Erhaltung der Körnerzellen könnte deshalb mit der Reinnervation der vorher deafferenzierten Zielregion zusammenhängen.

In all diesen Experimenten wurde die Möglichkeit der Einflussnahme auf die Polysialylierung von NCAM durch neuartige Sialinsäure-Vorläufer genutzt. Dieses Vorgehen erlaubte es, die Funktion von PSA in spezifischen Situationen zu definierten Zeitpunkten ohne genetische Manipulation zu untersuchen und schloss morphogenetische Nebenwirkungen auf Grund unkontrollierbarer Veränderung der Genexpression in transgenen Tieren aus.

Zusammenfassend zeigen diese Befunde erstmalig, dass PSA einen essentiellen Beitrag zur axonalen Zielspezifität während der Entwicklung leistet. Schließlich fördert die Hemmung der

PSA-Synthese die Reinnervation von MF nach Läsion. Hier wird eine mögliche duale Rolle von PSA deutlich, in der PSA zum einen das korrekte Auswachsen und die Zielspezifität während der Entwicklung in Einklang bringt und zum anderen die axonale Reinnervation nach Läsion hemmt.

4.3 Visualisierung des axonalen Auswachsens in β -Aktin-GFP exprimierender organotypischer Kokultur

In der vorliegenden Arbeit wurde eine neue Methode zur Verfolgung axonaler Projektionen in organotypischen Kokulturen ohne die Applikation eines Tracers etabliert.

Es wurden Langzeit-Kokulturen von wildtyp und transgenen Schnitten, die GFP unter der Kontrolle des β -Aktin Promoters exprimieren, hergestellt. Die Neurone des transgenen Schnittes dienten als Ausgangspunkt der axonalen Projektion. In allen durchgeführten Telexperimenten überlebten die Kokulturen die Inkubationsperiode von bis zu vier Wochen und behielten ihre charakteristische Zytoarchitektur. Unter Epifluoreszenz-Beobachtung konnten Gyrus dentatus und Cornu ammonis im GFP-enthaltenden Schnitt detektiert werden. Es fand sich *in vitro* kein Hinweis auf eine beeinträchtigte Lebensfähigkeit des transgenen Gewebes im Vergleich zum Wildtypen.

In Hippocampus-Hippocampus Kokulturen hat sich eine GFP-positive kommissurale Projektion ausgebildet. In den Kokulturen von transgenem EC mit wildtyp Hippocampus entwickelte sich der Tractus perforans. Beide Projektionen terminierten an ihren korrekten Zielregionen: der inneren bzw. der äußeren Molekularschicht. Diese Befunde gehen mit anderen Beobachtungen, in denen Biocytin als anterograde Tracer genutzt wurde, konform (Del Rio et al., 1997, Frotscher und Heimrich, 1993, Li et al., 1993, Drakew et al., 1999) und belegen den großen Vorteil des hier verwendeten Kokulturmodells. Alle Neurone enthalten GFP, das mit β -Aktin koexprimiert wird, welches wiederum als Grundbaustein des Zytoskeletts im gesamten Soma und in allen Fortsätzen enthalten ist. Dadurch sind jegliche in die wildtyp Kokultur eingedrungenen Fasern zu detektieren und teilweise über längere Distanzen, gelegentlich vergesellschaftet mit großen Auftreibungen, möglicherweise Wachstumskegeln, zu verfolgen.

Neurales Wiederauswachsen, reaktive Synaptogenese und eine zeitabhängige funktionelle Wiederherstellung wurden in einem Läsionsmodell der hippocampalen organotypischen Schnittkultur gezeigt (Stoppini et al., 1993, Muller et al., 1994). In Kokulturen zwischen einem CA3/DG-Schnitt und einem Schnitt, bestehend aus der CA1-Region der wildtyp Maus, reetablierten sich die Schaffer-Kollaterale, die zum Zeitpunkt der Explantation bereits

ausgebildet waren und durch die Separation der hippocampalen Subfelder lädiert wurden. Die Reinnervation der deafferenzierten Zone im Stratum radiatum der CA1-Region durch GFP-enthaltende Schaffer-Kollateralen belegt, dass die Ursprungszellen dieser Projektion, die CA3-Pyramidenzellen, unter den gegebenen Bedingungen wieder auswachsen und regenerieren können.

Insgesamt eröffnet dieses neuartige Modell der organotypischen Kokultur eine Vielzahl von Möglichkeiten der längerfristigen Beobachtung interzellulärer Vorgänge in intaktem Hirngewebe, ohne durch die Applikation von der Visualisierung dienender Substanzen zusätzlich in die Physiologie eingreifen zu müssen. Als ein Beispiel für weitere mögliche Anwendungen sei die Dual-Photonen-Mikroskopie zur Untersuchung von fluoreszenzmarkiertem lebendem Gewebe (Live-Imaging) genannt.

4.4 Ausblick

Zur genaueren Charakterisierung einer unphysiologischen synaptischen Verknüpfung von MF an CA1-Neuronen unter PSA-Inhibition könnten zum einen das entwickelte Modell der GFP-transgenen Kokultur (Glumm et al., 2002) genutzt werden. Zum anderen wären auch elektrophysiologische Versuche, bei denen mittels Patch clamp Aufnahme von CA1-Pyramidenzellen (bei gleichzeitiger Reizung der DG-Körnerzellen) die postsynaptischen Ströme gemessen werden genauso hilfreich und weiterführend, wie elektronenmikroskopische Aufnahmen zur morphologischen Darstellung und Klassifikation dieser synaptischen Verbindung. Auch Experimente über die Auswirkung des Lernverhaltens und der Gedächtniskonsolidierung wie im Morris-Water-Maze-Test würden Aufschluss über eine veränderte Funktionalität des modifizierten MF-Traktes geben.

Durch den pharmakologischen Eingriff in den Aufbau eines für Wachstum und Aussprossung wesentlichen (Neuralen) Zelladhäsionsmoleküls, wird die Mikroumgebung im ZNS und damit die Kommunikation zwischen den betroffenen Zellen und ihrer Umgebung entscheidend beeinflusst. In dieser Manipulation liegt auch ein möglicher Schlüssel für eine therapeutische Intervention bei Zustand nach Läsion im ZNS. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen darauf schließen, dass in künftigen *in vivo* Untersuchungen ein positiver Effekt auf die Reorganisation der axonalen Verbindungen nach Schädigung von Hirngewebe, z.B. in den Tiermodellen der entorhinalen Kortexläsion oder der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis weiter belegt werden kann.