

6. SUMMARY

The present work revealed the important role of extracellular matrix components such as chondroitine sulfates (CSs) borne by chondroitin sulfate proteoglycans (CSPGs), tenascin-R (TN-R), tenascin-C (TN-C) and polysialylated neural cell adhesion molecules (PSA-NCAM) in the modulation of synaptic efficacy of the mouse hippocampus. Different forms of hippocampal synaptic plasticity were investigated in slices treated with chondroitinase ABC, as well as in slices from TN-R, TN-C and polysialyltransferase (PST) deficient mice. Deficiency in these molecules differentially modulated several forms of synaptic plasticity, depending on the hippocampal region, developmental stage, temporal pattern and strength of stimulation used to induce synaptic plasticity, suggesting that different mechanisms are involved.

Despite the functional interaction and colocalization of CSPGs and TN-R our data do not support the possibility of synergetic effects produced by removal of CSs and TN-R on synaptic transmission and plasticity in the CA1 region of hippocampus. CSPGs and TN-R could, however, share some signaling mechanisms related to the impaired expression of theta-burst stimulation (TBS)-induced long-term potentiation (LTP) in the CA1 subfields, the being only similarly found phenotype.

TN-R and TN-C glycoproteins, two members of one gene family are also differently involved in CA1 plasticity. On the one hand, our data showed enhanced excitatory synaptic transmission and modified threshold for induction of LTP/LTD in TN-R deficient mice, correlating with an increased number of perforated synapses in this mutant. On the other hand, TN-C appeared to affect L-type voltage-dependent calcium channel (VDCC)-mediated currents/signaling.

Analysis of mice lacking PST, one of the polysialyltransferases responsible for addition of PSA to NCAM in adult brain, allowed us to distinguish between PSA- and NCAM-dependent phenomena, on the one hand, and between developmental and acute functions, on the other. Loss of PSA in the presence of NCAM protein but in the absence of obvious histological changes allowed us to directly investigate the role of

PSA in synaptic plasticity. Schaffer collateral-CA1 synapses, which express PSA in wild-types, showed impaired LTP and long-term depression (LTD) in adult mutants. This impairment was age-dependent, following the time course of developmental disappearance of PSA. Contrary to NCAM mutant mice, LTP in PST mutants was undisturbed at mossy fiber-CA3 synapses, which do not express PSA in wild-type mice. The results demonstrate an essential role for PST in synaptic plasticity in hippocampal CA1 synapses, whereas PSA produced by different polysialyltransferase or polysialyltransferases at early stages of differentiation regulates correct lamination of mossy fibers. We suggest that NCAM but not PSA is likely to be important for LTP in the hippocampal CA3 region.

Polyspiking activity was differentially affected by deficiency in CSs, TN-R, TN-C and PSA. Treatment of wild-type slices with chondroitinase ABC did not change polyspiking activity, whereas TN-R deficient mice exhibited a significant increase in the area and numbers of secondary polyspikes. TN-C mutants demonstrated a slight reduction in the initial phase of activity-dependent disinhibition profiles. A marginal reduction in the steady-state phase of the polyspiking activity was observed in PST knockout mice. We suggest that recognition molecules are likely to be involved in regulation of excitability via multiple mechanisms, which could represent endogenous processes underlying some aspects of epilepsy.

Thus, the combined observations represent an important advance in elucidating the molecular mechanisms involved in modulation of synaptic functions by extracellular matrix glycoproteins and their associated carbohydrates.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit konnte die Bedeutung folgender Bestandteile der extrazellulären Matrix für die Modulation synaptischer Plastizität im Hippocampus der Maus zeigen: Chondroitinsulfate (CS), den Zuckerresten der Chondroitinsulfatproteoglykane (CSPG), Tenascin-R (TN-R), Tenascin-C (TN-C) und polysyalisiertes neurales Zelladhäsionsmolekül (PSA-NCAM). Unterschiedliche Formen synaptischer Plastizität wurden an akuten Schnitten des Hippocampus untersucht, die entweder mit Chondroitinase ABC behandelt waren, was die Zuckerreste der Proteoglykane entfernt, oder von TN-R, TN-C oder Polysialyltransferase (PST) defizienten Mäusen stammten. Abhängig von der Region innerhalb des Hippocampus, dem Entwicklungsstadium und der unterschiedlichen Stärke und Frequenz der Stimulation führte das Fehlen der einzelnen Moleküle zu einer Modulation unterschiedlicher Formen von synaptischer Plastizität. Dies deutet auf unterschiedliche und spezifische Mechanismen, durch die die oben aufgeführten Moleküle jeweils bestimmte Formen von synaptischer Plastizität beeinflussen.

Trotz bekannter funktioneller Interaktion und Colokalisierung von CSPG und TN-R, wird durch das Fehlen von CS und TN-R in unseren Untersuchungen kein synergistischer Effekt auf synaptische Weiterleitung und Plastizität in der CA1 Region des Hippocampus deutlich. Dennoch könnten sich CSPG und TN-R gemeinsame Mechanismen der Signaltransduktion teilen, da das Fehlen beider Moleküle zu einer verringerten Ausbildung der durch Theta-Burst Stimulation (TBS) induzierten Langzeit-Potenzierung (LTP) führte.

Im Vergleich mit TN-R wirkt auch TN-C, ein Mitglied derselben Genfamilie, unterschiedlich in der Plastizität der CA1 Region des Hippocampus. Die TN-R defizienten Mäuse zeigen eine Erhöhung der exzitatorischen synaptischen Transmission und eine modifizierte Schwelle zur Induktion von LTP/LTD. Diese Daten korrelieren mit einer erhöhten Anzahl perforierter Synapsen. TN-C dagegen beeinflusst die durch L-type spannungsabhängiger Calciumkanäle (VDCC) vermittelte synaptische Potenzierung.

Die Analyse der Mäuse, die in einer der Polysialyltransferasen defizient sind, die für die Anheftung von PSA an NCAM im adulten Gehirn verantwortlich sind, machten es möglich, zwischen PSA- und NCAM - abhängigen Phänomenen zu unterscheiden. Durch das Fehlen von PSA in Anwesenheit des NCAM Protein und ohne offensichtliche histologische Veränderungen konnte direkt die Rolle von PSA in synaptischer Plastizität untersucht werden. Die PSA exprimierenden Schaffer-kollaterale-CA1 Synapsen zeigten ein reduziertes LTP und Lang-Zeit-Depression (LTD) in adulten Mutanten. Diese Veränderung war altersabhängig und korrelierte mit dem Auftreten von PSA. Im Unterschied zur NCAM defizienten Maus war in der PST Mutante LTP an den Moosfaser-CA3 Synapsen, die im Wildtyp kein PSA exprimieren, nicht verändert. Diese Ergebnisse zeigen, daß PST in synaptischer Plastizität in hippocampalen CA1 Synapsen eine wichtige Rolle spielt. Während PSA in früheren Entwicklungsstadien -dann gebildet von anderen Polysialyltransferasen- für eine korrekte Laminiierung der Moosfasern entscheidend ist, nehmen wir an, daß für LTP in der CA3 Region des Hippocampus NCAM und nicht PSA wichtig ist.

Das Auftreten von Polyspikes wurde durch die Abwesenheit von CS, TN-R, TN-C und PSA in unterschiedlicher Weise beeinflusst. Durch die Entfernung von CS durch Chondroitinase ABC in Wildtypschnitten wurde es nicht verändert. TN-R defiziente Mäuse zeigten dagegen eine signifikante Erhöhung der Fläche und Häufigkeit des zweiten Polyspikes. TN-C Mutanten zeigten eine leichte Reduktion in der initialen Phase der aktivitätsabhängigen Disinhibierung. Eine minimale Reduktion in der Gleichgewichtsphase der Polyspiking Aktivität konnte in PST knock-out Mäusen beobachtet werden. Wir nehmen an, daß Zellerkennungsmoleküle an der Regulierung von Erregbarkeit durch mehrere Mechanismen wirken. Diese Mechanismen könnten bei der Entstehung und Ausbreitung epileptischer Anfälle eine Rolle spielen.

Die zusammengefaßten Beobachtungen sind ein wichtiger Fortschritt bei der Aufklärung der molekularen Mechanismen die an der Modulation von synaptischen Funktionen durch extrazelluläre Matrixmoleküle und deren assoziierter Kohlenhydrate beteiligt sind.