

DISS. ETH NO. 16140

# **The role of activin in neuroprotection and long-term potentiation**

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH  
for the degree of  
DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

presented by  
**Mischa Müller**  
Dipl. Natw. ETH  
born March 16, 1973  
citizen of Sursee (LU) and Romoos (LU)



accepted on the recommendation of  
Professor Sabine Werner, examiner  
Professor Ueli Suter, co-examiner

2005

## Zusammenfassung

Externe Einwirkungen, wie etwa ein Schädel-Hirn-Trauma, aber auch interne Ursachen, wie beim Schlaganfall oder epileptische Anfälle, insbesondere ein Status Epilepticus, können zu einer Schädigung des Gehirns führen. Unterschiedliche neurologische Schädigungsformen enden molekular in einer gemeinsamen Endstrecke. Hierbei nehmen die erregend wirkenden Aminosäuren (EAS) Glutamat und Aspartat eine Schlüsselrolle ein. Besonders gefährdet sind Hirnregionen, welche eine hohe Dichte an EAS und deren Rezeptoren besitzen, wie der Hippokampus. Durch Injektion des EAS-Vertreters Kainat konnte kürzlich gezeigt werden, dass Activin, ein Mitglied der Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) Superfamilie von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, in der frühen Phase nach Hirnläsion eine grosse Bedeutung zukommt. Im normalen adulten Hippokampus kaum nachweisbar, wird die Produktion von Activin wenige Stunden nach Läsion massiv gesteigert. Die gleiche Studie zeigte auch eine neuroprotektive Wirkung von rekombinantern Activin A auf. Ob endogenes Activin ebenso neuroprotektiv wirkt und ob dieser Effekt direkt über die Nervenzellen, indirekt über Gliazellen, oder über beide Zelltypen vermittelt wird, war bisher unbekannt. Zur Klärung dieser Fragen generierte ich transgene Mäuse, die eine dominant-negative Mutante des Activin Rezeptors IB (dnActRIB) unter der Kontrolle des CaMKII $\alpha$  Promotors exprimieren. Diese exprimieren das Transgen u.a. gleichmäßig in Neuronen aller hippocampalen CA Regionen, sowie im Gyrus Dentatus. Im normalen adulten Hippokampus transgener Mäuse konnten keine auffälligen morphologischen Abnormalitäten und keine erhöhte neuronale Zelltodrate nachgewiesen werden. Nach Injektion von Kainat wurde in Wildtypieren und transgenen Mäusen die Expression von endogenem Activin gleichermassen induziert. Jedoch zeigten die hippocampalen Pyramidalneuronen von dnActRIB transgenen Mäusen eine signifikant höhere Verwundbarkeit durch Kainat auf, v.a. in der CA3 Region. Interessanterweise detektierten wir auch einen höheren neuronalen Zellverlust im kontralateralen Hippokampus. Diese Resultate implizieren, dass die neuroprotektive Wirkung von Activin A zumindest partiell über eine direkte Wirkung auf Neurone

---

vermittelt wird.

Neben dem CaMKII $\alpha$ -dnActRIB Transgen generierte ich auch transgene Mäuse, welche eine konstitutiv aktive ActRIB Mutante unter der Kontrolle des CaMKII $\alpha$  Promoters exprimieren. Aufgrund der schwachen Expression konnte das Transgenprodukt bisher nur auf RNA Ebene nachgewiesen werden. Diese CaMKII $\alpha$ -caActRIB transgenen Mäuse sind histologisch unauffällig; erste Kainat Injektions-Experimente ergaben sowohl in den transgenen als auch in den Wildtyp-Mäusen eine Läsion, welche in den transgenen Tieren jedoch vermindert erschien. Obwohl die geringe Expression des Transgens wahrscheinlich ausreichend für eine konstitutive Aktivierung der Activin Signaltransduktion ist, wäre es interessant zu erfahren, welche Auswirkung eine hohe und insbesondere induzierte Expression haben würde. Daher wurde ein Expressionsvektor kloniert, der die induzierbare Expression von caActRIB ermöglicht, und die Funktionalität dieses Vektors wurde *in vitro* gezeigt. Dieses Konstrukt kann nun für die Generierung transgener Mäuse verwendet werden, die caActRIB induzierbar in Hippocampusneuronen exprimieren.

Diese Arbeit zeigt im weiteren den bisher unbekannten Einfluss von Activin A auf die Induktion der Langzeit Potenzierung (LTP) auf. Elektrische Stimulation in der CA1 Region des Hippocampus resultierte in den CaMKII $\alpha$ -dnActRIB transgenen Mäusen in einer signifikant verminderten LTP. Erste Expressionsanalysen schliessen eine veränderte Expression der wichtigsten NMDA Rezeptor Untereinheiten aus, obwohl elektrophysiologisch eine signifikant veränderte NMDA Antwort in CaMKII $\alpha$ -dnActRIB CA1 Pyramidalzellen nachgewiesen werden konnte. Daher resultieren diese elektrophysiologischen Effekte vermutlich von Veränderungen auf posttranskriptioneller oder posttranslationeller Ebene, wobei eine veränderte NMDA-Rezeptorstabilität oder Änderungen in der Zusammensetzung bzw. Lokalisation der NMDA Rezeptor-Untereinheiten an der Synapse in Frage kommen.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit eine duale Rolle von Activin: einerseits fördert Activin die von Glutamat vermittelten molekularen Mechanismen, welche mit dem Lernen und der Gedächtnisbildung in Verbindung gebracht werden; andererseits schützt Activin Neurone vor der schädigenden Glutamat-Wirkung.

---

## Summary

External insults, such as traumatic brain injury, as well as internal insults, in particular stroke and epileptic seizures, may cause damage to the brain. At the molecular level, different types of neuronal damage converge onto a common final pathway. The excitatory amino acids (EAA) glutamate and aspartate are key players in this process. Especially endangered are hence brain regions with intense glutamatergic innervation, such as the hippocampus. Recent studies suggest a role of activin A, a member of the transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) superfamily of growth and differentiation factors, in the early response to brain injury. Activin is hardly detectable in the normal adult hippocampus, but its expression is strongly up-regulated a few hours upon injection of the EAA analogon kainic acid. The same study showed a neuroprotective action of recombinant activin A. However, it remained to be determined, if endogenous activin is neuroprotective as well, and if this effect is mediated directly via neurons, indirectly via glial cells, or both. To address these questions, I generated transgenic mice expressing a dominant-negative mutant of the activin receptor IB (dnActRIB) under the control of the CaMKII $\alpha$  promoter. Among other regions, the transgene was expressed in all hippocampal CA regions, as well as in the dentate gyrus. Neither morphological abnormalities nor enhanced neuronal cell death could be detected in the non-lesioned hippocampus of adult mice. Furthermore, an equally strong up-regulation of endogenous activin expression was observed in wild-type and transgenic animals after injection of kainic acid. However, the vulnerability to kainic acid was significantly enhanced in the hippocampal pyramidal neurons of dnActRIB transgenic mice, especially in the CA3 region. Furthermore, we observed enhanced neuronal cell loss in the contralateral hippocampus. These results imply that activin exerts its neuroprotective effect at least in part directly via neurons.

In addition to the CaMKII $\alpha$ -dnActRIB transgene I generated transgenic mice expressing a constitutively active ActRIB mutant under the control of the CaMKII $\alpha$  promoter. Expression of the transgene was low in all mouse lines and has as yet

---

only been detected at the RNA level. The CaMKII $\alpha$ -caActRIB mice are macroscopically and histologically normal; first kainic acid injection experiments revealed a hippocampal lesion in both transgenic and wild-type mice, which seemed to be less pronounced in the transgenic animals. Although the expression of low levels of the caActRIB may be sufficient to constitutively activate activin signaling, it would still be interesting to determine the effect of a strong and inducible caActRIB expression. Therefore, an expression vector was cloned, which allows inducible expression of caActRIB, and its functionality was verified *in vitro*. This construct can now be used for the generation of transgenic mice expressing caActRIB in hippocampal neurons in an inducible manner.

Finally, this work describes a novel role of activin receptor signaling on the induction of long-term potentiation (LTP). LTP in the CA1 region was significantly decreased in hippocampal slices from CaMKII $\alpha$ -dnActRIB transgenic mice. Altered expression of the most important NDMA receptor subunits was not observed, although electrophysiological studies revealed an altered NMDA current response in CA1 pyramidal cells of CaMKII $\alpha$ -dnActRIB mice. Therefore, the down-regulation of the NMDA response is likely to occur at the posttranscriptional or even posttranslational level and may include altered protein stability, NMDA receptor trafficking or subunit assembly.

In conclusion, my thesis shows a dual role of activin: on the one hand, it promotes the molecular mechanisms of learning and memory by enhancing glutamate receptor function, while on the other hand it protects pyramidal neurons against the excitotoxic potential of glutamate.

---