

Aus dem Institut für Anatomie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin  
Arbeitsgruppe für molekulare Neurobiologie im NWFZ, Charité Campus  
Berlin Mitte

DISSERTATION

„Entwicklung der segmentalen Innervation im peripheren  
Nervensystem beim Vertebraten“

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sonia Montazeri  
aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Thomas Skutella  
2. PD Dr. med. Olaf Süss  
3. Prof. Dr. Bernd Heimrich

Datum der Promotion: 04.02.1011

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1 Zusammenfassung</b>	<b>01</b>
1.1 Abstract	01
1.2 Einleitung	02
1.3 Aufgabenstellung	04
1.4 Methodik	04
1.5 Ergebnisse	07
1.6 Diskussion	09
1.7 Referenzen	12
<b>2 Anteilserklärung</b>	<b>15</b>
<b>4 Lebenslauf</b>	<b>18</b>
<b>5 komplette Publikationsliste</b>	<b>18</b>
<b>6 Selbständigkeitserklärung</b>	<b>19</b>
<b>7 Danksagung</b>	<b>20</b>

# **1 Zusammenfassung**

## **1.1 Abstract**

Die molekularen und zellbiologischen Mechanismen der axonalen Wegfindung beschäftigt die Neurowissenschaft schon seit Jahrzehnten. Ausgehend von den Spinalganglien und deren Neuriten entwickelt sich die periphere sensible Hautinnervation, die in der segmentalen Dermatombildung zum Ausdruck kommt. Dieses Muster findet sich durchgehend im Vertebraten und Evertrebraten, weshalb es für die Untersuchung molekularer Wegfindungsmechanismen ein anschauliches Modell bietet. Auch im zentralen Nervensystem (ZNS) liefert die Entstehung des Gyrus dentatus ein einfaches Modell zur Untersuchung axonaler Wegfindungsmechanismen. Es ist bereits bekannt, dass drei unterschiedliche Substanzklassen bei der axonalen Wegfindung eine wichtige Rolle spielen. Neurotrophine wie BDNF, NGF und NT-3 sind für das Überleben von verschiedenen Neuronenpopulationen unerlässlich. Darüber hinaus bewirken sie das Auswachsen und bestimmen die Auswachsweite der verschiedenen sensorischen Axone. Wegfindungsmoleküle wie u.a. Semaphorine, Ephrine, Netrine, Slits und RGMs sind Moleküle, die rezeptorvermittelt die Auswachsrichtung der Axone steuern. Sie können sekretiert oder membranständig sein. Als dritte Substanzklasse haben extrazelluläre Matrixmoleküle wie u. a. Kollagene, Laminine oder Proteoglykane einen wichtigen Stellenwert bei der axonalen Wegfindung. Um die Mechanismen bei der Entstehung der peripheren Innervation weiter zu verfolgen, untersuchten wir das Auswachsverhalten von Axonen sensibler Spinalganglien am Rattenmodell in der Zellkultur. Hierfür wurden thorakale Spinalganglien von Ratten am Embryonaltag 13 in einer Kollagenmatrix in einem geringen Abstand zueinander kokultiviert. Diese wurden dann mit verschiedenen Neurotrophinen stimuliert, womit das Auswachsen unterschiedlicher Axonenpopulationen hervorgerufen wird. Axone NGF stimulierter einander gegenüberliegender Ganglien zeigten ein deutliches repulsives Verhalten gegeneinander, wodurch sich ein freier angrenzender Bereich bildete. Im Gegensatz hierzu war unter NT-3 Stimulation ein Ineinanderwachsen der Axone zu beobachten. Um den Einfluss extrazellulärer Matrixmoleküle auf den repulsiven Effekt zu verifizieren, führten wir die Kokulturen auf unterschiedlichen Oberflächen durch. Hierbei konnte die Repulsion lediglich auf einer Lamininoberfläche mit NGF-Stimulation beobachtet werden. Weiterführende Experimente mit cDNA Mikroarrays und Real-Time PCRs mit bekannten Guidancemolekülen von NGF- und NT-3

stimulierten Ganglien führten zu möglichen Kandidaten, die für die Repulsion verantwortlich sein könnten. Anschließend Versuche mit funktionellen Antikörpern gegen diese bereits bekannten sekretierten Wegfindungsmoleküle konnten die repulsiven Effekte jedoch nicht blockieren. Unsere Daten führen zu der Annahme, dass der von uns beobachtete Effekt von einem noch unbekanntem Molekül gesteuert wird, das von den nozizeptiven Axonen selbst sekretiert zu werden scheint. Des Weiteren scheint dieses Molekül mit dem extrazellulären Matrixmolekül Laminin zu interagieren. Wir nehmen an, dass es von Laminin gebunden wird, was erklären würde, dass es auf dieser Oberfläche seine Wirkung nicht verliert.

## **1.2 Einleitung**

Innerhalb der neuronalen Grundlagenforschung wird die axonale Wegfindung im sich entwickelnden Nervensystem des Vertebraten noch nicht vollständig verstanden. Die außergewöhnliche Komplexität des gesamten Nervensystems wirft die Frage nach einem universellen Bauplan auf. Dies liegt zum einen an der großen Anzahl von Neuronen und zum anderen an der Organisation der Nervenzellen in Kerne, Areale und deren Verschaltungen untereinander. Die korrekte Verschaltung von Komponenten des Nervensystems ist eine notwendige Voraussetzung für die interne Organisation eines Organismus und seiner Fähigkeit, mit der Umwelt zu kommunizieren. Unter Kommunikation verstehen sich hierbei beispielsweise die Wahrnehmung und Verarbeitung unterschiedlicher Reize aus der Umwelt wie die Temperatur- und Schmerzempfindung, die motorische Kontrolle des Bewegungsapparates und die Gedächtnisfunktion.

Das periphere Nervensystem (PNS) höherer Vertebraten weist eine segmentale Gliederung auf. Diese wird deutlich in der Anordnung von Dermatomen, definitionsgemäß Hautarealen, die von genau einem Spinalnerv und dem dazugehörigen Spinalganglion sensibel versorgt werden.

Auch bei der Entwicklung des ZNS entstehen funktionell wichtige Areale wie beispielsweise die Hippocampusformation, die aus dem Hippocampus, dem Gyrus dentatus und dem Subiculum gebildet wird. Die korrekte Verschaltung dieser Formation ist essentiell für ein funktionsfähiges Gedächtnis.

Es ist davon auszugehen, dass im PNS wie auch im ZNS Wegfindungsfaktoren eine

entscheidende Rolle bei der Entstehung dieser spezifischen Areale spielen. Man weiß, dass unterschiedliche Substanzklassen an der axonalen Wegfindung beteiligt sind. Hierzu zählen u.a. lösliche und membrangebundene Wegfindungsmoleküle, Wachstumsfaktoren und extrazelluläre Matrixmoleküle.

Um die molekularen Mechanismen der axonalen Wegfindung zu verstehen, bietet die einfache segmentale Anordnung der sensiblen Dermatome ein gutes Modell.

Einen ersten Erklärungsansatz zum Verständnis des Mechanismus für die Entstehung der Dermatome lieferte 1919 Ramon y Cajal. Er maß jedoch den Leitfaktoren keine größere Bedeutung zu, sondern nahm an, dass eine Art Wettbewerb um Raum (competition for space) zwischen den auswachsenden Axonen dazu führt, dass die segmentale Gliederung der austretenden Rückenmarksnerven bis in die Peripherie fortgesetzt wird.

Dieser Erklärungsansatz lässt aber noch immer viele Fragen offen. Der Entstehungsmechanismus der komplexen segmentalen Gliederung der sensorischen Hautinnervation konnte bis heute noch nicht befriedigend aufgeklärt werden.

Zu den grundsätzlichen Mechanismen der axonalen Wegfindung gibt es dennoch bereits viele aufschlussreiche Arbeiten (u.a. Tessier- Lavigne und Goodman, 1996; Song und Poo, 1999; Yu und Bargmann, 2001). Hier konnte sowohl beim Vertebraten, als auch beim Evertbraten gezeigt werden, dass eine Kombination aus verschiedenen Mechanismen der axonalen Wegfindung während der embryonalen Entwicklung zugrunde liegt. Die Neuriten werden sowohl durch sekretierte, als auch durch membranständige Faktoren zu ihrer Zielregion geleitet. Diese Faktoren wirken entweder attraktiv oder repulsiv auf die auswachsenden Axone und deren Wachstumskolben. Keynes et al. (1994, 1995, 1997) haben in ihren Arbeiten gezeigt, dass die Axone der Spinalganglien durch sekretierte Moleküle aus Geweben der Umgebung zielgeleitet werden. Darüber hinaus weiß man, dass sich Wegfindungsmoleküle in ihrer Funktion gegenseitig beeinflussen können (Dickson, 2003). Wachstumsfaktoren, auch Neurotrophine genannt, sind Moleküle, die für das Überleben spezifischer Neuronenpopulationen unerlässlich sind (Goedert et. Al., 1984; Urschel et al., 1991; Ruit et al., 1992; Smeyne et al., 1994; Snider, 1994; Ernfors et al., 1994; Klein et al., 1994; Airaksinen et al., 1996). Darüber hinaus stimulieren oder hemmen Neurotrophine das Wachstum von Axonen. Mittlerweile ist eine große Anzahl verschiedener Neurotrophine bekannt, die mit einem oder mehreren Rezeptoren interagieren. Neben Zellteilung und Zellwachstum vermitteln

die Wachstumsfaktoren Differenzierung, Überleben, Apoptose, Bewegung und andere spezielle Funktionen von Zellen. Dies geschieht je nach Wachstumsfaktor unterschiedlich.

Weiterhin beeinflussen extrazelluläre Matrixmoleküle das Verhalten auswachsender Neuriten bei der axonalen Wegfindung (Garcia-Alonso et al., 1996; Forrester und Garriga, 1997). Hierzu zählen z.B. Laminin, Fibronektin und Kollagen. Die extrazellulären Matrixmoleküle können mit Wachstumsfaktoren interagieren und damit Konzentrationsgradienten aufbauen.

### **1.3 Aufgabenstellung**

Diese Dissertation beschäftigt sich mit der Aufklärung von Mechanismen der axonalen Wegfindung im sich entwickelnden Nervensystem des Vertebraten.

Als Modellsysteme dienten das Modell des Auswachsverhaltens von sensiblen Spinalganglien und der sich entwickelnde Hippocampus. Bei der Aufklärung der Mechanismen im peripheren Nervensystem wurde am Rattenmodell eine neue Beobachtung gemacht, und zwar, dass sich die auswachsenden Nervenfasern von NGF stimulierten Ganglien gegenseitig meiden und Abgrenzungen bilden. Die zell- und molekularbiologischen Grundlagen dieses Phänomens, das an die Entstehung der peripheren Dermatome erinnert, sollen in dieser Arbeit näher betrachtet werden.

In einem weiteren Schritt wurde der Einfluss eines spezifischen axonalen Wegfindungsmoleküls aus der Familie der RGMs (repulsive Guidance Molecules), das RGMb und sein von unserer Arbeitsgruppe mit entdeckter Rezeptor Neogenin am Modell der sich entwickelnden Gyrus dentatus Formation untersucht.

### **1.3 Methodik**

#### **Präparation der DRGs, Vorbereitung der Kollagenmatrix und Zellkulturassay mit NGF und NT-3 stimulierten Ganglien**

Es wurden thorakale Spinalganglien von Rattenembryonen (E11 bis E21) präpariert. Das komplette Rückenmark aus dem sich bildenden Wirbelkanal sowie den angrenzenden Spinalganglien wurden in toto dargestellt. Von den Hinterwurzelganglien wurden die ausgehenden Spinalnerven, sowie zum Teil vorliegende Bindegewebshäute entfernt und die Ganglien in einer Kokultur in einem

Abstand von einem Millimeter im Kollagentropfen (Kollagen Typ 1) platziert.

Die Kokulturen wurden für 48 bis 72 Stunden bei 38 Grad Celsius und 4% CO<sub>2</sub> in einem Brutschrank inkubiert. Dem Kulturmedium wurden Neurotrophine (NT-3 bzw. 50 ng/ml NGF, Sigma) zugesetzt. Danach wurden die DRGs mittels Immunhistochemie mit anti-Neurofilamentantikörpern (Sigma) gefärbt und das Auswachsverhalten der Axone beurteilt.

### **Auswertung des axonalen Wachstumsverhaltens**

Das axonale Auswachsmuster der kokultivierten DRGs wurde mit jeweils einem einzelnen Spinalganglion, das unter selben Bedingungen kultiviert wurde, verglichen und von einem unabhängigen Betrachter beurteilt.

Zur Beurteilung des axonalen Wachstumsmaßes wurde die proximale, dem Koexemplat zugewandte Seite, mit der distalen Seite des Spinalganglions verglichen und mittels einer Skala von 0-10 graduiert.

### **Unterschiedliches Auswachsen der Nervenfasern bei NGF- und NT-3 stimulierten DRGs in der Kokultur**

Um das Verhalten auswachsender Neuriten aus DRGs in Abhängigkeit von verschiedenen Neurotrophinen zu untersuchen, wurden DRGs aus E14 Ratten präpariert in einer dreidimensionalen Kollagenmatrix paarweise kokultiviert. Das axonale Wachstum wurde mittels NGF, beziehungsweise NT-3 stimuliert.

### **Kultivierung der Ganglien auf verschiedenen Oberflächenbeschichtungen**

Erst wurden Deckgläschen mit je Laminin, Fibronectin, Poly-l-lysin und Kollagen beschichtet. Auf den verschiedenen Oberflächen wurden Spinalganglien kokultiviert und mit unterschiedlichen Neurotrophinen stimuliert. Nach einer Inkubationszeit von 48 bis 72h bei 35 Grad Celsius wurde das Auswachsverhalten der Axone nach den oben genannten Kriterien beurteilt und ausgewertet.

### **Kokultivierung der DRGs mit funktionellen Antikörpern und Inhibitoren**

Funktionelle Antikörper gegen bereits bekannte sekretierte Lenkungsfaktoren wurden sowohl in die Kollagenmatrix, als auch in das Zellkulturmedium gegeben. Unter diesen Bedingungen wurden die DRGs für 24h kokultiviert und das Auswachsen ihrer



Neuriten mit NGF oder NT-3 stimuliert. Das Verhalten der Axone wurde beobachtet und dokumentiert.

### **Identifizierung bekannter sekretierter Lenkungsfaktoren mittels cDNA-Mikroarray und TaqMan PCR**

Zur Durchführung des Microarrays wurde eine RNA-Präparation von NGF- und NT-3 stimulierten Spinalganglien durchgeführt. Die daraus hergestellte biotinmarkierte cRNA wurde für die Hybridisierung des Genchips benutzt. Der Chip bestand aus 60 bekannten Lenkungsmolekülen, wie Semaphorinen, Plexinen, Neuropillinen, Slits, Robos, Ephrinen, EPH-Rezeptoren, DCCs und Netrinen. Spezifische NGF- und NT-3 abhängige Expressionsmuster wurden mit Hilfe von typischen Markern wie TrkA, TrkC, Calretinin, Parvalbumin, Calbindin und Calcitonin detektiert. Zur Bestätigung der Ergebnisse wurden mit denselben mRNA-Pools TaqMan Real-Time PCRs durchgeführt.

### **Herstellung von RGMb- und Neogeninkonstrukten für funktionelle Experimente**

Zunächst wurde eine PCR-Amplifikation der RGMb-kodierenden Sequenz ohne Signalpeptide und GPI-Anker (Schmidtmer and Engelkamp, 2004) mit Sfi I und Hind III Erkennungssequenzen durchgeführt und diese in einen pAPtag-5 Vektor (GenHunter) kloniert, um ein RGMb Fusionsprotein zu erhalten. Das (alkalische Phosphatase) AP-markierte sekretierte Neogenin (Neo-AP) Expressionskonstrukt wurde folgenderweise hergestellt: Das extrazelluläre Fragment von Maus Neogenin wurde ohne die kodierenden Anteile der transmembranären und intrazellulären Domänen über PCR mit der gesamten Neogenin ORF Sequenz aus dem fpCMVSPORT6NEO1 (RZPD clone: IMAGp998C128552Q3) amplifiziert und in einem pAPtag-5 Vektor (GenHunter) kloniert. Das RGMb-Fc Konstrukt wurde in einem Pigplus-Tail Vektor (Novagen) generiert. Dazu wurde die RGMb kodierende Sequenz (Schmidtmer and Engelkamp, 2004) ohne das Signalpeptid und den GPI-Anker über PCR mit den Hind III und Xba I Erkennungssequenzen amplifiziert. Die generierten RGMb-AP, Neogenin-AP und RGMb-Fc-Konstrukte wurden stabil in human embryonic kidney 293 (HEK293) Zellen transfiziert und die Überstände mit den Fusionsproteinen für die Bindungsstudien und die Koimmunopräzipitationsexperimente aufgereinigt.

## 1.4 Ergebnisse

Die Entstehung der segmentalen Gliederung des PNS, die in der Anordnung der Dermatome in der Haut zum Ausdruck kommt, ist bis heute noch weitgehend unaufgeklärt. Hierfür wurden die Mechanismen der Wegfindung von sensorischen Axonen aus Spinalganglien am Rattenmodell untersucht.

Thorakale NGF- und NT-3 stimulierte Ganglien von E13 Ratten wurden in kleinem Abstand zueinander in einer Kollagengelmatrix kokultiviert. Bei der Stimulation mit NGF zeigten die beidseits auswachsenden Axone gegeneinander ein deutlich repulsives Verhalten. Im Gegensatz hierzu sah man unter gleichen Kulturbedingungen unter NT-3-Stimulation keine Repulsion der Axone, sondern ein ineinander Einwachsen der Neuriten. Das Fehlen des repulsiven Verhaltens war ebenfalls zu beobachten, wenn die Ganglien auf einer Oberfläche ohne Kollageneinbettung, lediglich auf einer Kollagenbeschichtung kokultiviert wurden. Unter diesen Bedingungen können lösliche axonale Wegfindungsmoleküle keinen Gradienten aufbauen.

Um den Einfluss von extrazellulären Matrixmolekülen auf die axonale Wegfindung zu untersuchen, wurden Spinalganglien auf Kollagen, Laminin, Fibronectin und Poly-L-lysin ausplattiert. Nur Axone, die unter NGF- Stimulation auf Laminin kokultiviert wurden, zeigten den oben beschriebenen repulsiven Effekt. Auf allen anderen Oberflächen, einschließlich der Kollagenoberfläche war ein Ineinandereinwachsen der Axone, sowohl unter NGF, als auch unter NT-3 Bedingungen zu beobachten.

Die molekulare Analyse von möglichen bekannten chemorepulsiven Kandidatenmolekülen wurde mittels cDNA Mikroarrays und TaqMan Real-Time PCRs durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass eine große Anzahl von bekannten Wegfindungsmolekülen von den Ganglien exprimiert werden, wobei keine großen Unterschiede zwischen NFG und NT-3 stimulierten Ganglien beobachtet werden konnten.

Kokulturassays mit funktionellen Antikörpern gegen bereits bekannte sekretierte Kandidatenmoleküle wie Neuropilin1 und 2, Slit-2 und Netrin-1 konnten deren Beteiligung an dem von uns beobachteten Effekt ausschließen.

Die aufgeführten Beobachtungen führen zu der Annahme, dass die Repulsion vermutlich durch einen sekretierten Faktor getriggert wird, der durch eine Gelmatrix einen repulsiven Gradienten aufbauen kann, aber auf einer Oberfläche durch

Diffusion seine Wirkung verliert. Eine kontaktgetriggerte Repulsion hätte seine Wirkung unter der Oberflächenbedingung beibehalten.

Es ist anzunehmen, dass das von uns beobachtete Phänomen von einem noch unbekanntem Faktor vermittelt wird, da unsere Experimente mit funktionellen Antikörpern gegen schon bekannte sekretierte Wegfindungsmoleküle die Repulsion nicht blockieren konnten. Dieses Molekül scheint mit Laminin zu interagieren, weil es seine Wirkung auf dieser Oberfläche nicht verliert.

Wie im PNS, spielen auch im ZNS Lenkungsfaktoren bei der Entwicklung der unterschiedlichen Strukturen eine große Rolle. Die Formation des Gyrus dentatus mit seinen Verschaltungen bietet ein einfaches Modell um axonale Wegfindungsmechanismen zu analysieren.

In einem weiteren Projekt von mir wurden Plasmid-Konstrukte (RGMb– Alkalinephosphatase Fusionsprotein (RGM–AP) Expressionsvektor, AP-markierte sekretierte Neogenin (Neo-AP), Neogenin-Expressionskonstrukte und RGMb-Fc in einem pIgplus-Tail Vektor) für funktionelle Untersuchungen der Interaktion von Neogenin und RGMb im sich entwickelnden Kortex der Maus hergestellt.

Neogenin und RGMb werden in nicht überlappenden Bereichen des sich entwickelnden Gyrus dentatus exprimiert. Der Rezeptor Neogenin wird von Vorläufern der Körnerzellen des Gyrus Dentatus exprimiert, wohingegen sein Ligand RGMb in Cajal Retzius-Zellen in der hippocampalen Fissur zu finden ist. Funktionale Assays und Immunfärbungen zeigen eine deutliche Interaktion dieser Molekülpopulationen. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass *in vitro* und *in vivo* die Migration von Vorläuferzellen des Gyrus dentatus durch RGMb eingeschränkt wird. So kommt es zu einer reduzierten Zelladhäsion von RGMb exprimierenden Zellen, wenn diese in Kontakt mit Neogenin exprimierenden Zellen kommen. Neogenin-positive Zellen vermeiden RGMb exprimierende Zellen, wenn diese ektopisch in der Migrationsstraße in der organotypischen hippocampalen Schnittkultur oder nach *in utero* Elektroporation im sich entwickelnden Gyrus dentatus exprimiert werden. In unserer Arbeit konnten wir damit zeigen, dass die Interaktion zwischen RGMb- und Neogenin exprimierenden Zellen eine Rolle bei der Körnerzellwanderung des Gyrus dentatus spielt.

## 1.5 Diskussion

Das Ziel meiner Arbeiten ist es, Mechanismen der axonalen Wegfindung aufzuklären. Die außergewöhnliche Komplexität des ZNS und des PNS macht es erforderlich, die Wegfindungsmechanismen an gut zugänglichen Modellen zu untersuchen, um so eines Tages das Gesamtbild zu verstehen. Dies ist auch die Grundvoraussetzung für mögliche zukünftige Therapien der neuronalen Regeneration.

In unseren Arbeiten, die sich mit der axonalen Wegfindung im ZNS beschäftigen, konnten wir zeigen, dass sich Neogenin- und RGM exprimierende Zellen gegenseitig abstoßen und so die Wanderung spezifischer Zellpopulationen im Gyrus dentatus gesteuert wird (Conrad et al., 2010). Somit konnte nachgewiesen werden, dass Lenkungsmoleküle und ihre Rezeptoren sich gegenseitig so beeinflussen, dass die Wanderung bestimmter Zellpopulationen gesteuert wird.

Die vorangegangenen Arbeiten zum PNS führen zu der Annahme, dass das segmentale Muster der nozizeptiven Hautinnervation durch ein oder mehrere noch unbekannte Moleküle, möglicherweise auch über einen bisher unbekanntem Mechanismus entsteht. Nach unseren Ergebnissen ist davon auszugehen, dass der auswachsende Neurit selbst das repulsiv wirkende Molekül sekretiert.

Die simple Dermatomkartierung im thorakalen Bereich bietet ein einfaches Modell für die Untersuchung der allgemeinen Mechanismen der axonalen Wegfindung. Jedes Dermatom wird von genau einem Spinalganglion sensibel versorgt. Die bandförmige Anordnung der sich teilweise überlappenden Dermatome zeigt einen universellen Code, was bedeutet, dass deren Anordnung und Überlappungsgrad organismenübergreifend wieder zu finden ist (Scott, 1984). Auf Grund dieser Tatsache ist ein universell vorhandener Entstehungsmechanismus zu erwarten.

Es gibt verschiedene Erklärungsansätze, um die Entwicklung der Dermatomkartierung zu verstehen. Anfang des 20. Jahrhunderts ging man von der Annahme aus, dass zwischen den auswachsenden Neuriten eine Art Wettbewerb um Raum besteht und so die im Myelon vorhandene Segmentierung bis in die Peripherie beibehalten wird (Ramon y Cajal, 1919). Wegfindungsmolekülen wurde in dieser Theorie keine große Bedeutung zugeschrieben. Die Untersuchung der Wirkung von Lenkungsfaktoren auf auswachsende Axone anderer Arbeitsgruppen und unsere

experimentellen Ergebnisse geben jedoch Grund zu der Annahme, dass die Mechanismen der axonalen Wegfindung weitaus komplizierter sind.

Mit den Grundzügen dieser Mechanismen haben sich auch schon viele andere Arbeitsgruppen beschäftigt. Axone werden während der Entwicklung sowohl durch sekretierte, als auch durch membranständige repulsiv oder attraktiv wirkende Moleküle zu ihrer Zielregion geleitet (Tessier- Lavigne and Goodman, 1996; Song and Poo 1999; Yu und Bergmann, 2001). In vielen Arbeiten wurde dies sowohl in *in-vivo*-, als auch in *in-vitro* Experimenten nachgewiesen (Keynes et al. 1994, 1995, 1997). In den Arbeiten von Keynes et al. wurde gezeigt, dass auswachsende periphere Axone durch die Sekretion von Lenkungsfaktoren aus deren Zielregion richtungsgeleitet werden. Hier konnte ebenfalls in Zellkulturexperimenten die chemorepulsive Wirkung auf Wachstumskolben von mit Neurotrophenen (NGF, BDNF, NT-3) stimulierten Axonen in einer Kollagenmatrix nachgewiesen werden. Auch *in vivo* werden Wachstumsfaktoren in der Zielregion der peripheren Axone produziert. Hierbei bewirkt NGF hauptsächlich die Elongation der Axone, wobei NT-3 für die Terminierung und das Branching der axonalen Endigungen verantwortlich ist (Lentz et al. 1999). Darüber hinaus weiß man heute auch einiges über molekulare Mechanismen, die die Funktion der Lenkungskoleküle beeinflussen. Als Beispiel hierfür sei erwähnt, dass eine Blockade von Ca- Rezeptoren an Wachstumskolben zu einer Umkehr der attraktiven Funktion von Netrin-1 in eine repulsive Funktion führt (Hong et al, 2000). Auch über die Bedeutung extrazellulärer Matrixmoleküle ist bereits einiges bekannt. Man weiß, dass diese die Wirkung von Wegfindungsmolekülen verändern können. Hierbei haben Laminine einen besonderen Stellenwert. Es konnte beobachtet werden, die repulsive Wirkung von Netrin-1 auf retinale Axone durch Laminin-1 in einen attraktiven Effekt umgekehrt werden kann (Hopker et al. 1999; Stuermer et al. 2000; Ratcliffe et al. 2008).

NGF wird während der embryonalen Entwicklung in der Zielregion der Axone produziert und triggert deren Wachstum. In unseren *in-vitro* Experimenten konnten wir zeigen, dass die Wegfindung NGF sensibler Fasern über einen sekretierten repulsiv wirkenden Lenkungsmolekülmechanismus gesteuert wird. Darüber hinaus konnten wir durch unsere Experimente zeigen, dass das extrazelluläre Matrixmolekül Laminin bei der Wegfindung NGF- sensibler Fasern einen wichtigen Stellenwert hat. Es ist davon auszugehen, dass Laminin mit diesem unbekanntem Molekül interagiert. Daher ist es wahrscheinlich, dass Laminin dieses Molekül über einen

Rezeptormechanismus bindet. Dies würde erklären, dass bei den von uns durchgeführten Experimenten auf der Lamininoberfläche der repulsive Effekt weiterhin zu beobachten war.

In weiterführenden Experimenten habe ich bereits versucht, dieses unbekannte Lenkungsmolekül zu identifizieren. Hierfür sind cDNA- Microarrays und TaqMan-Real-Time PCRs mit bis dahin bekannten axonalen Wegfindungsmolekülen durchgeführt worden, um die molekulare Expression von NGF- und NT-3 stimulierten Ganglien zu vergleichen. Da hier keine signifikanten Unterschiede im Expressionsmuster zu erkennen waren, planen wir eine erneute Durchführung von whole genome cDNA- Microarrays der neueren Generation.

Dem Verständnis der axonalen Wegfindung kommt eine hohe klinische Bedeutung zu. In diesem Bereich gibt es neue interessante Arbeiten, die darlegen, dass die Überexpression von NGF im adulten Myelon von Säugetieren zu einer funktionell verbesserten axonalen Regeneration führt (Tang et al. 2007). Auch für periphere Nerven im adulten Tier konnte gezeigt werden, dass sowohl Laminin, als auch NGF bei der Regeneration sensibler Fasern eine wichtige Rolle spielen (Webber et al. 2008). Diese Beispiele zeigen, dass das Verständnis der Funktion extrazellulärer Matrixmoleküle, Wachstumsfaktoren und Lenkungsmoleküle, sowie deren Interaktion von großer Relevanz sind. Versteht man erst die komplexen Wegfindungsmechanismen, so kann dies die Grundlage für die Entwicklung von Therapien der spinalen Regeneration, beispielsweise bei traumatischer Para- oder Tetraplegie oder auch für die Regeneration peripherer Nerven im erwachsenen Organismus bilden.

## 1.7 Referenzen

Airaksinen, M.S., Koltzenburg, M., Lewin, G.R., Masu, Y., Helbig, C., Wolf, E., Brem, G., Toyka, K.V., Thoenen, H., Meyer, M., 1996. Specific subtypes of cutaneous mechanoreceptors require neurotrophin-3 following peripheral target innervation. *Neuron* 16, 287-295.

Conrad, S., Stimpfle, F., Montazeri, S., Oldekamp, J., Seid, K., Alvarez-Bolado, G., Skutella, T., 2010. RGMB controls aggregation and migration of Neogenin-positive cells in vitro and in vivo. *Mol. Cell. Neurosci.* 43, 222-231.

Dickson, B.J., 2002. Molecular mechanisms of axon guidance. *Science.* 298, 1959-1964

Ernfors, P., Lee, K.F., Kucera, J., Jaenisch, R., 1994. Lack of neurotrophin-3 leads to deficiencies in the peripheral nervous system and loss of limb proprioceptive afferents. *Cell* 77, 503-512.

Forrester, W.C., Garriga, G., 1997. Genes necessary for *C. elegans* cell and growth cone migrations. *Development* 124, 1831-1843.

Garcia-Alonso, L., Fetter, R.D., Goodman, C.S., 1996. Genetic analysis of Laminin A in *Drosophila*: extracellular matrix containing Laminin A is required for ocellar axon pathfinding. *Development* 122, 2611-2621.

Goedert, M., Otten, U., Hunt, S.P., Bond, A., Chapman, D., Schlumpf, M., Lichtensteiger, W., 1984. Biochemical and anatomical effects of antibodies against nerve growth factor on developing rat sensory ganglia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 8, 1580-1584

Hong, K., Nishiyama, M., Henley, J., Tessier-Lavigne, M., Poo, M., 2000. Calcium signalling in the guidance of nerve growth by Netrin-1, *Nature* 403, 93-98.

Hopker, V.H., Shewan, D., Tessier-Lavigne, M., Poo, M., Holt, C., 1999. Growth-cone attraction to netrin-1 is converted to repulsion by laminin-1. *Nature* 401, 69-73.

Keynes, R.J., Stem, C.D., 1994. Segmentation in the vertebrate nervous system. *Nature* 310, 786-789.

Keynes, R., Cook, G.M.W., 1995. Axon guidance molecules. *Cell* 83, 161-169

Keynes, R., Tannahill, D., Morgenstern, D.A., Johnson, A.R., Cook, G.M., Pini, A., 1997. Surround repulsion of spinal sensory axons in higher vertebrate embryos. *Neuron* 18 (6), 889-897.

Klein, R., Silos-Santiago, I., Smeyne, R.J., Lira, S.A., Brambilla, R., Bryant, S., Zhang, L., Snider, W.D., Barbacid, M., 1994. Disruption of the neurotrophin-3 receptor gene *trkC* eliminates 1a muscle afferents and results in abnormal movements. *Nature* 368, 249-251.

Lentz, S.I., Knudson, M., Korsmeyer, S.J., Snider, W.K., 1999. Neurotrophins support the development of diverse sensory axon morphologies. *J. Neurosci.* 19, 1038-1048.

Ramón y Cajal, S., 1919. Accion neurotropica de los epitelios. In: Guth, L. (ED), *Studies in Vertebrate Neurogenesis* (übersetzt im Jahre 1960). Thomas, Springfield, pp. 149-200.

Ratcliffe, E.M., D'Autréaux, F., Gershon, M.D., 2008. Laminin terminates the Netrin/DCC mediated attraction of vagal sensory axons. *Dev. Neurobiol.* 68, 960-971.

Ruit, K.G., Elliot, J.L., Osborne, P.A., Yan, Q., Snider, W.D., 1992. Selective dependence of mammalian dorsal root ganglion neurons on nerve growth factor during embryonic development. *Neuron* 8, 573-587.

Scott, S.A., 1994. The effects of neuronal crest deletions on the development of sensory innervation patterns in embryonic chick hind limb. *J. Physiolog.* 352, 285-304.



Smeyne, R.J., Klein, R., Schnapp, A., Long, L.K., Bryant, S., Lewin, A., Lira, S.A., Barbacid, M., 1994. Severe sensory and sympathetic neuropathies in mice carrying a disrupted Trk/NGF receptor gene. *Nature* 368, 246-249.

Snider, W.D., 1994. Functions of neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us. *Cell* 77, 627-638.

Song, H.J., Poo, M.M., 1999. Signal transduction underlying growth cone guidance by diffusible factors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9, 355-363.

Stuermer, C.A., Bastmeyer, M., 2000. The retinal axon's pathfinding to the optic disk. *Prog. Neurobiol.* 62, 197-214.

Tang, X.Q., Heron, P., Mashburn, C., Smith, G.M., 2007. Targeting sensory axon regeneration in adult spinal cord. *J. Neurosci.* 27, 6068-6078.

Tessier- Lavigne, M., Goodman, C.S., 1996. The molecular biology of axon guidance. *Science* 274, 1123-1133.

Urschel, B.A., Brown, P.N., Hulsebosch, C.E., 1991. Differential effects on sensory nerve processes and behavioral alterations in the rat after treatment with antibodies to nerve growth factor. *Exp. Neurol.* 114, 44-52.

Webber, C.A., Xu, Y., Vanneste, K.J., Martinez, J.A., Verge, V.M., Zochodne, D.W., 2008. Guiding adult Mammalian sensory axons during regeneration. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 67, 212-222.

Yu, T.W., Bargmann, C.I., 2001. Dynamic regulation of axon guidance. *Nat. Neurosci. Suppl.* 1169-1176.

## 2 Anteilserklärung

Sonia Montazeri hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

### Publikation 1:

Montazeri S, Skutella T., „Secretion of intrinsic cues controls repulsion of nociceptive neurons.“, Molecular and Cellular Neuroscience, 2003, ca. 80% Anteil

Sonia Montazeri führte die Präparation der thorakalen Spinalganglien der E11- E21 Ratten durch, die für die *in vitro*- Zellkulturassays benutzt wurden. Darüber hinaus präparierte sie das Typ1 Kollagen und bereitete die Kollagenlösungen und die Zellkulturmedien für die Experimente vor. Frau Montazeri führte die *in vitro* Kokulturassays mit funktionellen Antikörpern gegen verschiedene zu dem Zeitpunkt bekannte Lenkungsfaktoren durch.

Die RNA- Präparation und Biotin-Markierung der NGF- und NT-3 stimulierten Spinalganglien zur Durchführung der Microarrays und der TaqMan PCRs wurde ebenfalls von Frau Montazeri durchgeführt. Des Weiteren wurden die TaqMan PCRs von Frau Montazeri durchgeführt. Frau Montazeri verfasste das Manuskript.

Thomas Skutella leitete das Projekt und betreute die praktische Durchführung der Experimente. Darüber hinaus wertete er das Auswachsmuster der kokultivierten Spinalganglien mit Frau Montazeri aus.

### Publikation 2:

Hari A, Djohar B, Skutella T, Montazeri S., „Neurotrophins and extracellular matrix molecules modulate sensory axon outgrowth.“, International Journal of Molecular and Cellular Neuroscience, 2004, ca. 60% Anteil

Aswinii Hari und Baharak Djohar führten unter Anleitung von Sonia Montazeri die Präparation der thorakalen Spinalganglien und die Durchführung der *in vitro*-Zellkulturassays durch.

Sonia Montazeri leitete das Projekt und betreute die praktische Durchführung der Experimente. Darüber hinaus wertete sie die Auswachsmuster der kokultivierten Spinalganglien auf den verschiedenen Matrices aus und verfasste das Manuskript mit Aswinii Hari und Thomas Skutella.

### Publikation 3:

Conrad S, Stimpfle F, Montazeri S, Oldekamp J, Seid K, Alvarez-Bolado G, Skutella T., „RGMB controls aggregation and migration of Neogenin-positive cells in vitro and in vivo.“, Molecular and Cellular Neuroscience, 2010, ca. 10% Anteil

Sonia Montazeri klonierte RGMB in den pIlgplus-Tail Vektor. Sie führte außerdem die Klonierung von Neogenin in den pAPtag-5 Vektor durch. Frau Montazeri verfasste den Material- und Methodenteil zu den von ihr durchgeführten Experimenten.

Sabine Conrad führte die Klonierung von RGMB in einen pCAGGS-mRFP Vektor durch, der für die Elektroporationsexperimente benutzt wurde. Sowohl die *in vitro* als auch die *in vivo* Elektroporationsexperimente wurden von Sabine Conrad durchgeführt. Außerdem stellte sie die für die Co-Immunoprecipitation notwendigen stabil transfizierten HEK 293 Zellkulturen her und führte die Co-Immunoprecipitationsexperimente durch. Frau Conrad verfasste den Material- und Methodenteil zu den von ihr durchgeführten Experimenten und erstellte Abbildungen und die zugehörigen Legenden.

Fabian Stimpfle führte die *in situ* Hybridisierung der Embryonalstadien E16 und E18 sowie für RGMB als auch für Neogenin durch. Er stellte die Doppelfärbungen mit *in situ* Hybridisierung von Neogenin und die Immunfärbung von Prox1 her und fertigte die dafür nötigen Kryostatschnitte an. Außerdem führte er die Experimente zur Zellaggregation mit 3T3-L1 Zellen durch. Fabian Stimpfle stellte ebenfalls die Explant outgrowth assays von Dentatusneuroepithel auf HEK 293 Zellen her. Er verfasste den Material- und Methodenteil zu den von ihr durchgeführten Experimenten und erstellte die Abbildungen und zugehörigen Legenden. Außerdem führte er Literaturrecherchen durch.

Judit Oldekamp führte die *in situ* Hybridisierung des Embryonalstadiums E14 sowie für RGMB als auch für Neogenin durch und fertigte die hierfür notwendigen Schnitte an.

Karin Seid führte die Immunfärbungen mit Prox1 Antikörpern für die Kokulturrexperimente und für die Schnitte der *in utero* elektroporierten Embryonen durch.

Gonzalo Alvarez-Bolado betreute die praktische Durchführung und die Auswertung der Experimente.

Thomas Skutella leitete das Projekt und betreute die praktische Durchführung und die Auswertung der Experimente. Er verfasste die Einleitung und den Ergebnis- und Diskussionsteil des Manuskripts.

Berlin, 22.05.2010

Sonia Montazeri

Prof. Dr. med. Thomas Skutella

#### **4 Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

#### **5 komplette Publikationsliste**

„RGMB controls aggregation and migration of Neogenin-positive cells in vitro and in vivo.“ Conrad S, Stimpfle F, Montazeri S, Oldekamp J, Seid K, Alvarez-Bolado G, Skutella T. Mol Cell Neurosci. 2010 Feb;43(2):222-31. Epub 2009 Nov 26.

„Neurotrophins and extracellular matrix molecules modulate sensory axon outgrowth.“

Hari A, Djohar B, Skutella T, Montazeri S.

Int J Dev Neurosci. 2004 Apr;22(2):113-7.

„Secretion of intrinsic cues controls repulsion of nociceptive neurons.“

Montazeri S, Skutella T.

Mol Cell Neurosci. 2003 Nov;24(3):595-602.

## **6 Erklärung**

Ich, Sonia Montazeri, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Entwicklung der segmentalen Innervation im peripheren Nervensystem beim Vertebraten“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

10.07.2010

Sonia Montazeri

## 7 Danksagung

Bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Thomas Skutella möchte ich mich für seine großartige Unterstützung während der gesamten Arbeit danken. Er hat mir schon als junge Studentin die einmalige Möglichkeit gegeben, ein äußerst interessantes wissenschaftliches Projekt selbstständig zu betreuen und schon so früh viel Erfahrung im wissenschaftlichen Arbeiten zu sammeln. Dies wird mich in meiner gesamten Laufbahn als Ärztin positiv beeinflussen.

Herrn Dr. Olaf Ninnemann danke ich für seine uneingeschränkte Geduld und sein Vertrauen in mich. Er stand mir während der gesamten experimentellen Arbeit ausnahmslos mit Rat und Tat zur Seite. Ohne ihn wäre diese Dissertation nicht möglich gewesen und ich bin froh mit einem so großartigen Wissenschaftler zusammengearbeitet haben zu dürfen.

An Frau Hartel geht ein großer Dank für ihren Einsatz bei der Korrektur meines Manuskripts.

Ganz besonders möchte ich meinen Freunden und meiner Familie danken, die mir während meines gesamten Studiums beigestanden haben. Insbesondere möchte ich hier Frau Dr. Heide Volger, Carolina Volger und Caterina Lorenz danken.