

3 ERGEBNISSE

3.1 Die Expression von RGMA im Hippocampus perinatal

Um das Expressionsmuster von RGMA während der Entwicklung der hippocampalen Formation zu charakterisieren, wurden immunhistologische Färbungen und in-situ-Hybridisierungen von perinatalen Stadien E16.5, E18.5, P1 und P7 angefertigt. In-situ-Hybridisierung ermöglicht die Detektion von mRNA-Expression in den Zellen auf dünnen Gewebeschnitten, während durch Immunfärbungen das Protein und seine Lokalisation nachgewiesen werden kann, sei dies in der Zelle, auf der Zellmembran oder bei sekretierten Proteinen im extrazellulären Raum.

3.1.1 RGMA wird pränatal im Hilus und Gyrus dentatus exprimiert

Zum Entwicklungszeitpunkt E16.5 zeigte sich RGMA-mRNA vor allem auf dem Neuroepithel im Cortex, in der Umgebung der Ventrikel und im Thalamus (Abb. 6). Im Stadium E18.5 läßt sich RGMA-Expression in der cortikalen Subplatte und auf Neuronen in der CA1- und CA3-Region des Hippocampus nachweisen. Dieses Signal auf hippocampalen Pyramidenzellen war beständig und über das Stadium P0 hinaus bei P7 in der CA1-Region, Subikulum und Hilus stark vorhanden. Es fand sich dann stärker in CA1 und etwas schwächer in der Region 3 des Cornu ammonis. Weiterhin waren ubiquitär im Cortex die Neurone der Schichten 3 und 5 mit der RGMA-spezifischen Sonde markiert, sowie das Septum, der Balken, der Thalamus und das Neuroepithel entlang der Ventrikel bis in den Spinalkanal. Die Färbung zeigte sich im frontalen Cortex am wenigsten stark. Weitere Gewebe zeigten keine Expression von RGMA-mRNA.

Bezüglich des Gyrus dentatus konnte RGMA auf Körnerzellen lokalisiert werden, allerdings mit leicht schwächerer Färbung als in der CA1-Region. Auf den distalen Dendriten dieser Zellen terminieren die entorhinalen Fasern. Bei stärkerer Vergrößerung sah man ein intensives Signal auf den hilären Mooszellen (siehe Abb. 6, Bild E) in der polymorphen Schicht des Hippocampus, die die commissurale Projektion in die innere Molekularschicht des contralateralen Hippocampus senden. Die Kontrollen mit einer RGMA-sense Sonde zeigten kein Signal.

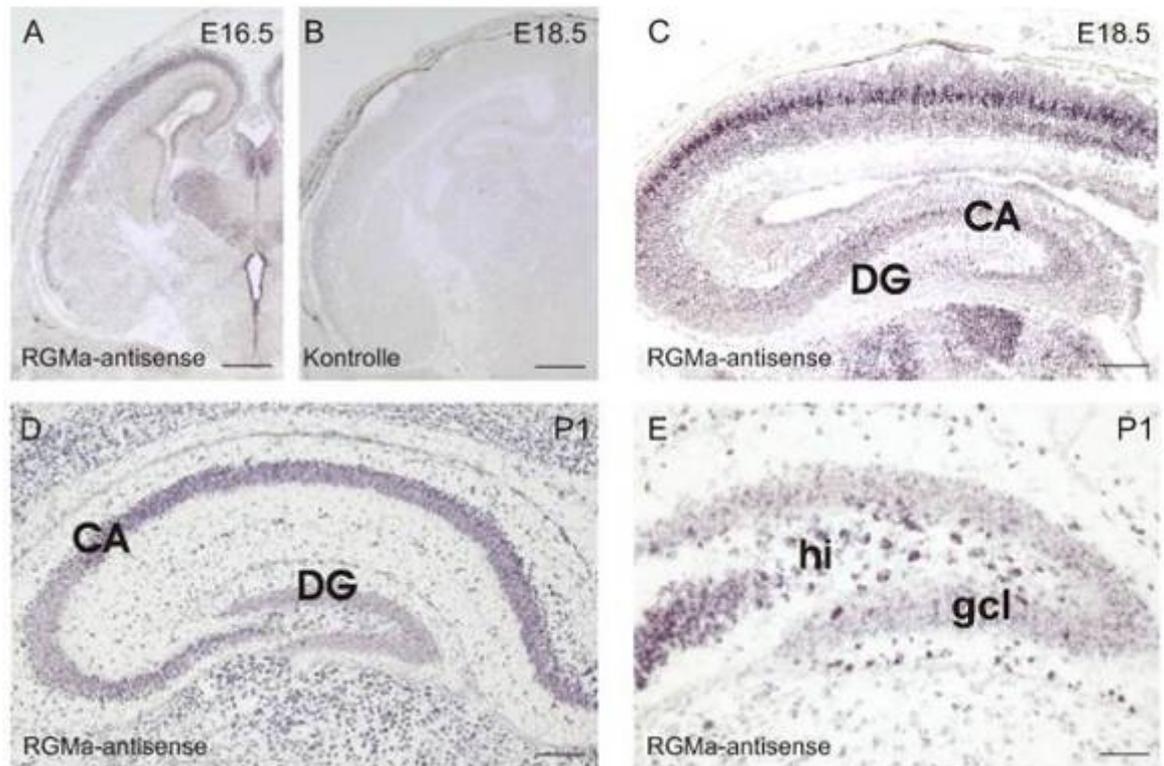


Abbildung 6: Die in-situ-Hybridisation zeigt die Expression von RGMa-mRNA am Tag E 16.5, E18.5 und P1. CA: Cornu ammonis; DG: Gyrus dentatus; hi: Hilus; gcl: Körnerzellschicht. Scale bars in A und B: 25 μ m, in C und D: 50 μ m, in E: 100 μ m.

3.1.2 Distribution von RGMa im Gyrus dentatus postnatal

Die immunhistochemischen Färbungen mit RGMa-Antikörper zum Zeitpunkt P1 und P7 zeigten das Protein auf hilären Neuronen, bei P7 auch auf Fasern über den Körnerzellen im sich entwickelnden Gyrus dentatus. Die Distribution des RGMa-Proteins zum Zeitpunkt der Geburt ist dieselbe wie in den in-situ-Hybridisierungen, nämlich auf den hilären Mooszellen und auf Pyramidenzellen des Cornu ammonis. Im Stadium P7 (siehe Abb. 7) konnte die Färbung als starkes Signal auf axonalen Strukturen in der inneren Molekularschicht lokalisiert werden. Diese Fasern bilden die commissurale/assoziative Projektion des contralateralen Hippocampus und wachsen postnatal in den Gyrus dentatus ein. Sie stellen die Neuriten von hilären Neuronen des contralateralen Cortex dar, die weiterhin auch an den RGMa-Antikörper binden. Die Färbung der Pyramidenzellen in der CA 1 – 3 Region des Hippocampus geht bei P7 zurück. Im entorhinalen Cortex, sowie anderen Bereichen des Cortex, der Fimbria und des Septums zeigten sich einzelne angefärbte Neurone. Die Körnerzellschicht sowie die äußere Molekularschicht zeigten keine Färbung. Kontrollschnitte, die eine unspezifische Bindung des Zweitantikörpers verdeutlichen können, zeigten keine Färbung.

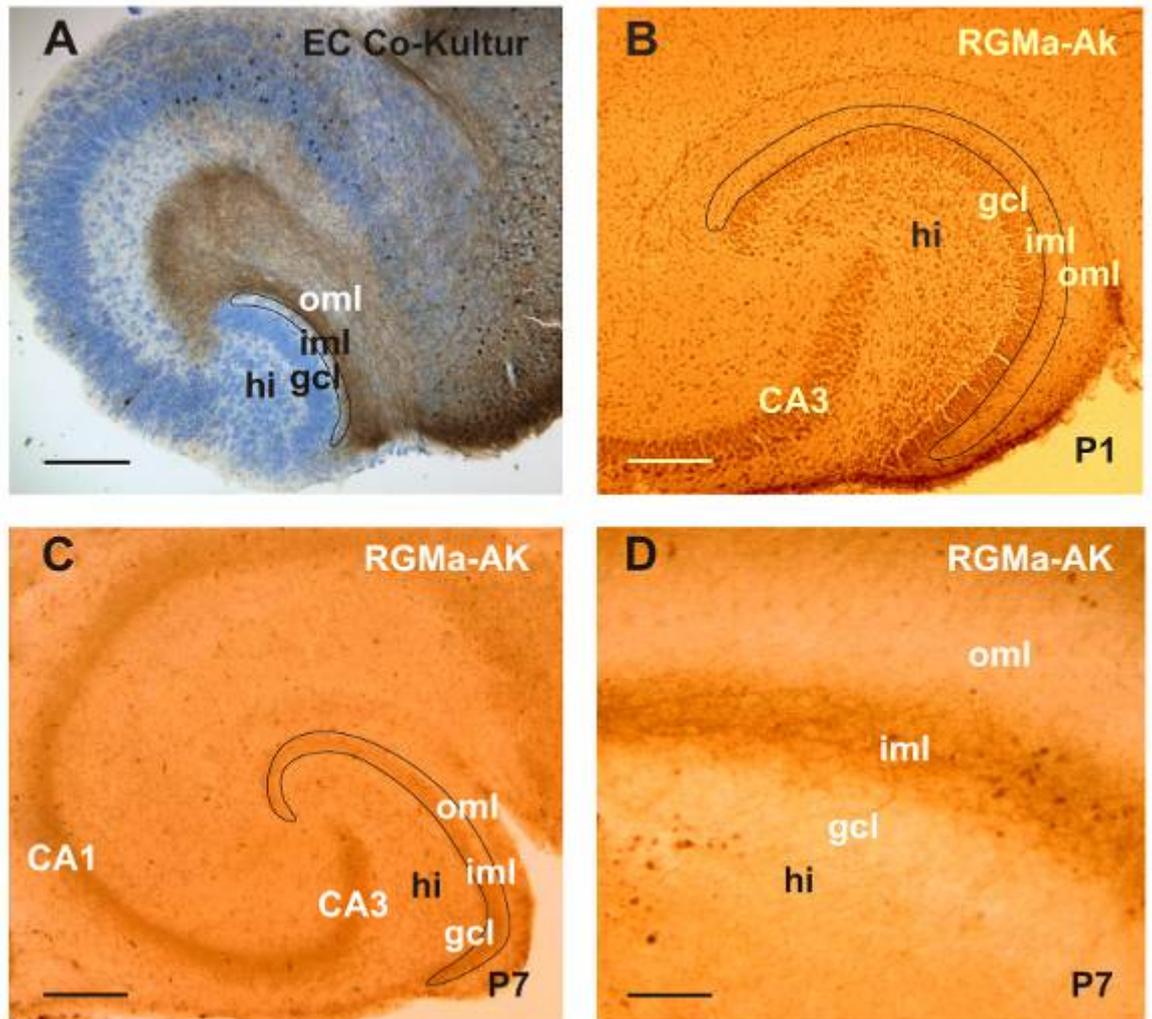


Abbildung 7: Die Immunhistochemie von Entwicklungsstadien. A: Die entorhinale Projektion in die äußere Molekularschicht kann man mittels Biocytintracer in Co-Kulturen darstellen. Die Fasern terminieren in der äußeren Molekularschicht unter Aussparung der inneren. RGMa-Antikörper färbten im Stadium P7 axonale Strukturen in der inneren Molekularschicht (C, D) an, während diese bei P1 noch nicht gefärbt wurden (B). Scale bars: A, B und C: 100 μm ; D: 200 μm .

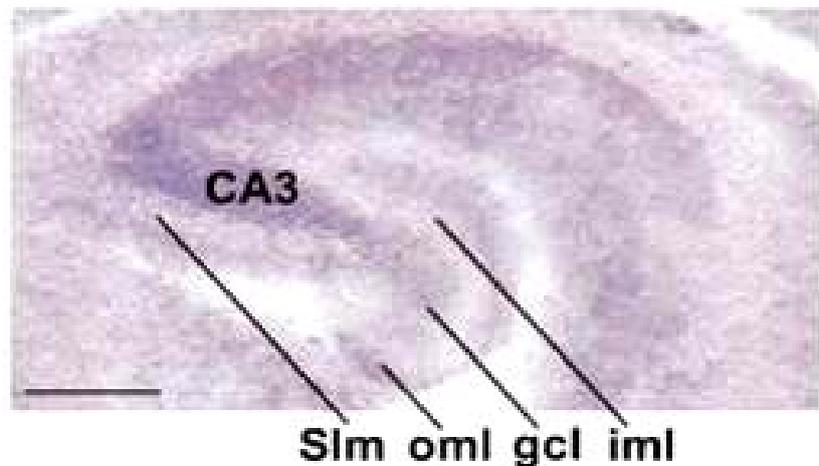
RGMa konnte in Entwicklungsstadien also während der embryonalen Entwicklung mittels in-situ-Hybridisation auf Hilusneuronen und Pyramidenzellen der Cornu ammonis Regionen 1 bis 3 nachgewiesen werden. Weiterhin ist eine Distribution der mRNA und des Proteins zum Zeitpunkt der Geburt und bis P7 auf Fasern der inneren Molekularschicht des Gyrus dentatus identifiziert worden.

3.2 RGMa bindet auf Zellen im Gyrus dentatus und Hippocampus

Die Lokalisation des RGMa-Rezeptors wurde durch Bindungsstudien mit einem Fusionsprotein aus RGMa und alkalischer Phosphatase ermittelt. RGMa wird im Stadium P1 am stärksten in den dendritischen Feldern der CA3-Region und des Gyrus dentatus, das heißt in der äußeren Molekularschicht und im Stratum

radiatum und Stratum lucidum des Hippocampus spezifisch gebunden und konnte mittels Farbreaktion sichtbar gemacht werden.

Abbildung 8: Die Bindungsstudien mit RGMa-Fusionsprotein: CA3: Cornu ammonis Region 3; SIm: Stratum lacunosum moleculare; oml: äußere Molekularschicht; gcl: Körnerzellschicht; iml: innere Molekularschicht



In etwas geringerem Maße war die Bindung auch in der inneren Molekularschicht sichtbar (Abb. 8). Ein Rezeptor für RGMa wurde also auf entorhinalen Fasern, die hauptsächlich in der äußeren Molekularschicht des Gyrus dentatus terminieren, exprimiert. Gleichermassen kann man davon ausgehen, dass die Moosfasern, die im Stratum lucidum der CA3-Region enden, auch den Rezeptor auf ihrer Oberfläche zeigen. Für beide Projektionen gilt, daß sie in einer streng geordneten laminären Art und Weise in ihrem Zielgebiet nur auf den äußeren Teilen der Dendriten von Pyramiden- und Körnerzellen Synapsen bilden. Die Pyramidenzellschicht sowie die Neuronen in der Körnerzellschicht wurden mit dem Fusionsprotein nicht markiert. Als Kontrolle wurden Schnitte mit alkalischer Phosphatase allein inkubiert, sowie ein western blot durchgeführt, der den Nachweis einer gelungenen Fusion und korrekter Erkennung des Produkts durch RGMa-Antikörper erbrachte (Brinks et al., 2004).

3.3 Wachstum entorhinaler Neuriten ist von RGMa beeinflusst

Untersucht wurde die Auswirkung von RGMa auf das Wachstum von Neuriten in vitro durch Streifen- und Auswachsassays unter der Annahme, daß sich ein repulsiver Effekt von RGMa auf die Wachstumskolben von entorhinalen Axonen selektiv darstellen läßt.

3.3.1 RGMa hat auf entorhinale Fasern einen inhibitorischen Effekt

Explantate aus dem entorhinalen Cortex wurden auf einer konfluierenden Zellschicht aus HEK 293-Zellen kultiviert, die zuvor stabil mit einem RGMa-enthaltenden Vektor transfiziert worden waren und RGMa auf der Zelloberfläche exprimierten. Das Wachstum der Neuriten von entorhinalen Explantaten war im Vergleich zu dem auf nicht-transfizierten Zellen deutlich eingeschränkt, sowohl was die Anzahl als auch was die Länge der auswachsenden Axone betraf. Verdeutlicht wurde der spezifische, inhibitorische Effekt durch das normale Wachstumsverhalten von Kontrolleplantaten aus dem frontalen Cortex und von entorhinalen Explantaten auf mock-transfizierten Zellen (Tabelle 1).

Beschichtung der HEK293-Zellen / Explantat	Anzahl der Explantate	Kein signifikantes Auswachsen	Wenig Wachstum der Neuriten	Moderates Auswachsen	Starkes Wachstum
		0	+ Neuriten ~ 100µm	++ Neuriten ~ 200µm	+++ Neuriten ~ 500µm
RGMa / EC	25	12	36	15	3
Mock / EC	25	2	178	179	167
RGMa / EC RGMa-AK	25	1	139	196	72
RGMa / EC PI-PLC	25	1	109	169	85
RGMa/ Kontrolle	15	1	186	256	167

Tabelle 1: Die Auswertung der Auswachsassays zeigt die inhibitorische Potenz von RGMa. Zeilen 5 und 6 zeigen die Ergebnisse nach Behandlung der Kulturen mit RGMa-Antikörper oder PI-PLC. Es zeigt sich ein Auswachsverhalten, das dem der Fasern gleicht, die auf mock-transfizierten Zellen wuchsen, sowie dem von Kontrolleplantaten auf RGMa-beschichteten Zellen.

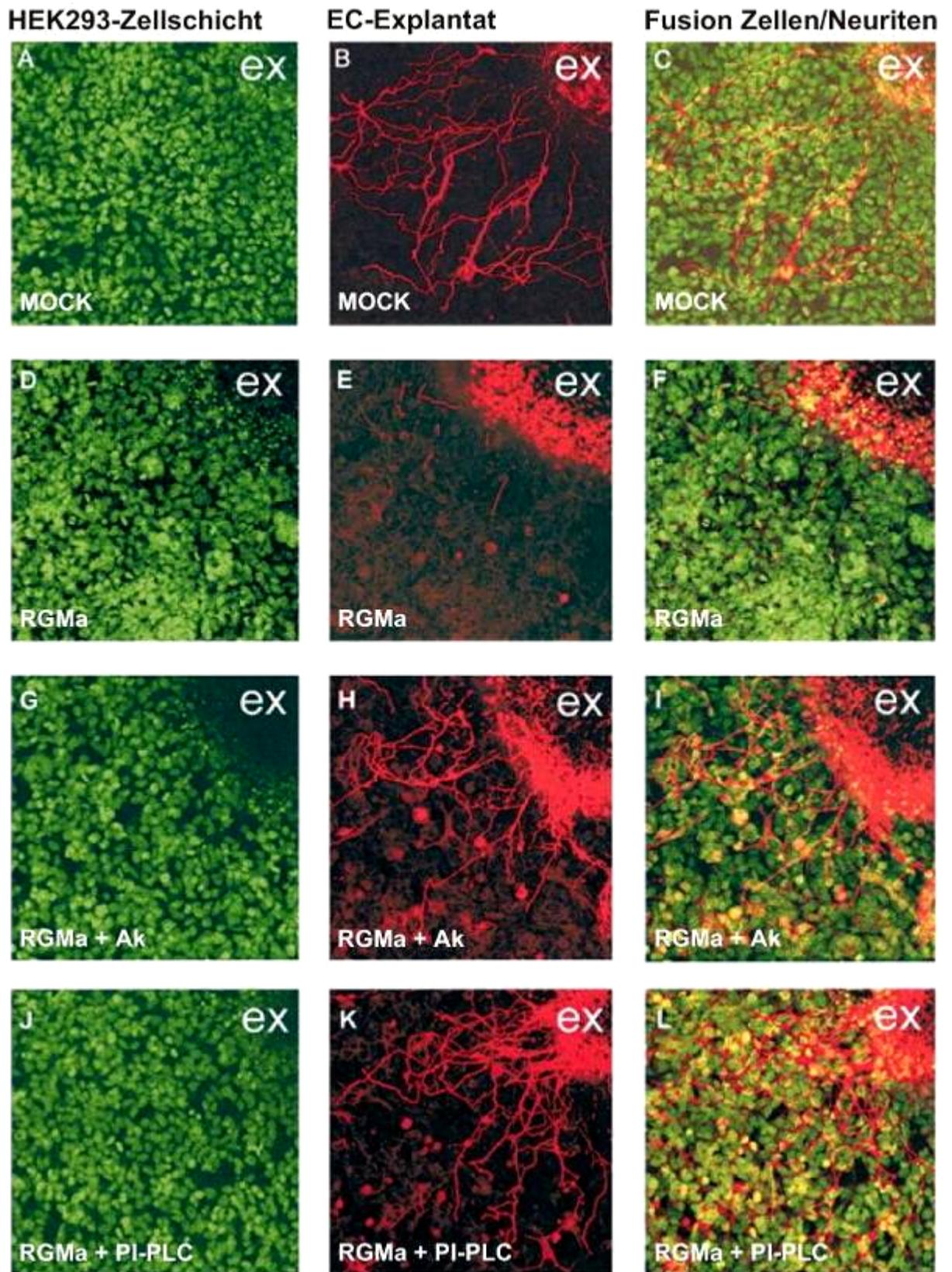


Abbildung 9: Das Auswachsverhalten entorhinaler Axone wird durch RGMa inhibitorisch beeinflusst (D – F). Dieser Effekt kann durch selektive Unterbrechung des RGMa-Effekts aufgehoben werden. Hierzu wurden die Kulturen mit Phosphoinositol-spezifischer Phospholipase C behandelt (J – L) oder mit einem funktionellen anti-RGMa-Antikörper (G – I).

Weiterhin konnte die Wirkung von RGMa durch zwei verschiedene Mechanismen aufgehoben werden: Unter Behandlung entweder mit einem blockierenden RGMa-Antikörper oder mit Phosphatidyl-inositol-spezifischer Phospholipase C, einem Enzym, das GPI-geankerte Proteine von der Zellmembran abspaltet und somit zu einer Ablösung von RGMa von der Zellmembran führt, ließ sich das Auswachsen der Neuriten wiederherstellen. Tägliche Behandlung der Kulturen führte zu einem Auswachsverhalten, das dem der Kontrollen glich (Abb. 9, G – L, Abb. 10, M - O).

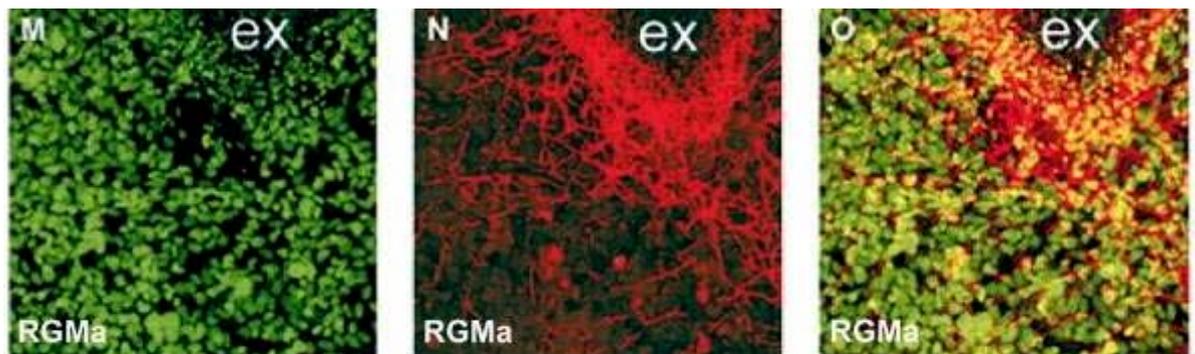
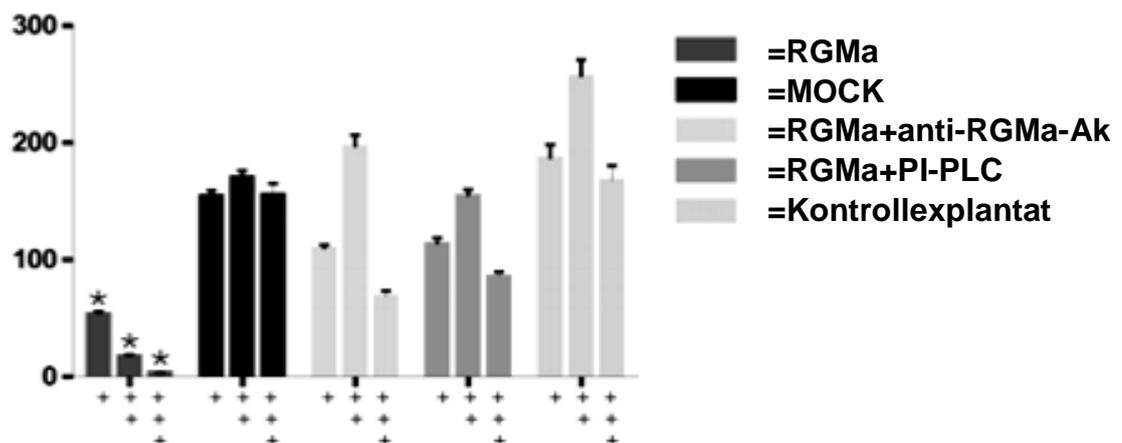


Abbildung 10: Neuriten, die aus Explantaten des frontalen Cortex auswachsen, zeigen keine Beeinträchtigung ihres Wachstums durch RGMa-exprimierende HEK293-Zellen: Bild M: RGMa-transfizierte HEK293-Zellenkultur, Bild N: auswachsende Neuriten aus einem Explantat des frontalen Cortex, Bild O: Fusion der beiden vorhergehenden Bilder.

An Kontrollexplantaten (Abb. 10) wurde nachgewiesen, dass der Effekt von RGMa spezifisch auf Fasern aus dem entorhinalen Cortex war, indem sie ein normales Auswachsverhalten auf RGMa-exprimierenden Zellen als Untergrund zeigten.



Grafik 1: Auswachsverhalten entorhinaler Neuriten in Kultur auf RGMa-exprimierenden HEK293-Zellen. + : Neuritenlänge ca. 100 µm, ++: Neuritenlänge bis ca. 200 µm, +++: Neuritenlänge bis zu 500 µm. Die Standardabweichung wird jeweils durch T-Balken angezeigt.

Zusammenfassend ergibt sich eine wachstumshemmende Wirkung für RGMa, die ein vermindertes Auswachsen von Fasern aus dem entorhinalen Cortex, jedoch nicht von solchen aus anderen Cortexregionen bewirkt (Grafik 1).

3.3.2 Entorhinale Fasern werden von RGMA abgestossen

Stellte man Explantaten aus dem entorhinalen Cortex als Untergrund einen Streifenteppich aus Membranproteinen zur Verfügung, die alternierend RGMA-Protein und allein das Vektorpeptid enthielten, so wuchsen Neuriten dieser Zellpopulation bevorzugt auf den Streifen, die nicht mit RGMA-Protein beschichtet worden waren. Darüberhinaus bildeten die Neuriten ausschließlich zwischen den RGMA-beschichteten Streifen Faszikel: Die einzelnen Axone wuchsen also nicht getrennt voneinander auf den RGMA-freien Streifen, sondern bündelten sich zu Fasersträngen, meist in der Mitte der "lane". Es war zu beobachten, daß dieser Effekt sich mit der Entfernung der Neuriten vom Explantat zunehmend verstärkte (Abb.11).

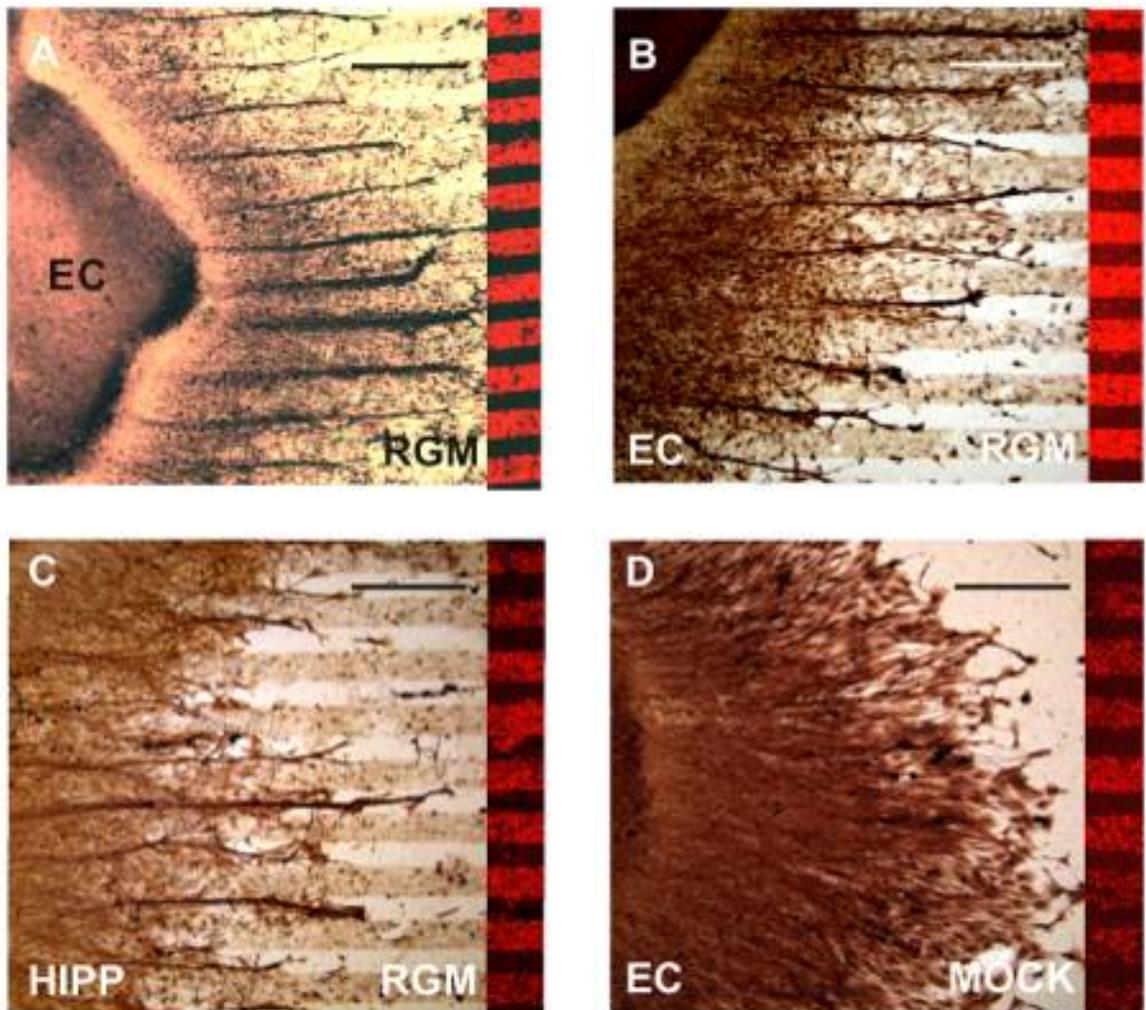


Abbildung 11: Der repulsive Effekt von RGMA wird durch das Vermeiden von RGMA-enthaltenden Streifen durch entorhinale und hippocampale Neuriten verdeutlicht. Die mit rot gekennzeichneten Streifen sind in A, B und C mit RGMA beschichtet, in D mit mock-transfizierten Zellmembranen. EC: Explantat aus entorhinalen Cortex; HIPP: Explantat aus Hippocampus. Scale bars: 100 µm.

Die Wirkung auf die Wachstumskolben der Axone war an der Grenzfläche zwischen RGM-enthaltenden Streifen und Kontrollprotein-enthaltenden Streifen erkennbar: Neuriten wechselten entweder die Wachstumsrichtung oder wiesen eine deutliche Wachstumsminde- rung bis hin zum Kollaps der Wachstumskolben auf, waren also verkürzt.

Die Bewertung des Wachstumsverhaltens der entorhinalen Explantate durch verblindete Untersucher ergab, daß bei allen Explantaten ein repulsiver Effekt von RGMa auf die auswachsenden Neuriten zu erkennen war. In über 50% der Explantate stellte sich eine klare Präferenz der Axone für die RGMa freien Streifen dar, während von den restlichen Explantaten einige auswachsende Neuriten keine Beeinflussbarkeit zeigten, die Mehrzahl jedoch auch von RGMa-beschichtetem Untergrund abgestossen wurde.

Art der Streifen	Anzahl der entorhinalen Explantate	keine Präferenz	teilweise Präferenz	Klare Präferenz
RGMa / mock	30	0	13	17
Mock / mock	30	22	8	0

Tabelle 2: Auswertung der Präferenz von Axonen entorhinaler Neurone im Streifen-assay. Es wurden RGMa- und mock-beschichtete Streifenteppeiche verwendet und als Kontrolle mock- gegen mock-beschichtete Streifen den Explantaten als Untergrund zur Verfügung gestellt.

Bei der Auswertung der hippocampalen Explantate zeigte sich, daß nicht alle auswachsenden Neuriten auf die Wirkung von RGMa reagierten. Viele der Neuriten wuchsen über die RGMa-beschichteten Streifen hinweg wie in den Kontrollen. Es zeigte sich jedoch auch hier ein repulsiver Effekt auf ca. 30% der aus den Explantaten auswachsenden Neuriten, die ein selektives Wachstum in den RGM-freien "lanes" zeigten, wie die entorhinalen Neuriten.

Art der Streifen	Anzahl der hippocampalen Explantate	keine Präferenz	teilweise Präferenz	Klare Präferenz
RGMa / mock	11	6	4	1
Mock / mock	10	10	0	0

Tabelle 3: Auswertung der Präferenz von Fasern aus hippocampalen Explantaten im Streifen-assay. Rot geschrieben wurden die mit beads gekennzeichneten Membranbestandteile, die auch in den Abbildungen rot fluoreszieren.

RGMa zeigte also auch auf hippocampale Explantate einen Effekt, der jedoch nicht alle Fasern betraf. Ein Teil der Axone wurde als Präferenz zeigend ausgewertet, einige Explantate zeigten jedoch nur teilweises oder kein bevorzugtes Wachstum. Der Anteil von Präferenz zeigenden Explantaten war unabhängig von den jeweiligen Streifenteppichen. Zu erkennen war dies daran, daß auf einem Teppich sowohl klar Präferenz zeigende, als auch völlig unbeeinflusst wachsende Axone zu finden waren (Abb. 11, Bild C).

Als Kontrollen wurden die PVP-Membranen abwechselnd mit markierten und unmarkierten Zellmembranproteinen ausschließlich ohne RGMa-Protein beschichtet, was ein gleichmäßig ungerichtetes Wachstum ohne Faszikelbildung zufolge hatte.

3.4 Blockierung von RGMa stört die Zielfindung entorhinaler Fasern

In organotypischen Schnittkulturen kann das entorhino-hippocampale System ähnlich der *in vivo* Situation dargestellt werden. Die entorhinale Projektion in die äußere Molekularschicht wurde mittels Biocytin als sogenannter *tracer* sichtbar gemacht und konnte in ihrer Entwicklung selektiv beeinflusst werden. In diesem Versuchsaufbau wurde, um die Rolle von RGMa genauer zu charakterisieren, eine Blockierung des Proteins und somit ein Wirkungsverlust herbeigeführt.

Die entorhino-hippocampalen Kulturen wurden am Tag P0 entnommen und aufgeteilt in eine Gruppe, die mit einem funktionellen Antikörper gegen RGMa behandelt wurde, sowie eine Gruppe, die mit verschiedenen Konzentrationen von PI-PLC behandelt wurde und eine Kontrollgruppe.

Nach Entnahme wurden die Kontrollkulturen sieben Tage im Brutschrank inkubiert und zusätzlich 24 Stunden Zeit für den anterograden Transport des *tracers* Biocytin gegeben. In der darauf folgenden immunhistochemischen Färbung zeigte sich die korrekte Terminierung der entorhinalen Fasern in der äußeren Molekularschicht. Hier endeten die markierten Axone von Neuronen der Region II des entorhinalen Cortex unter Aussparung der direkt darunter liegenden inneren Molekularschicht, wo nur einige wenige Fasern endeten.

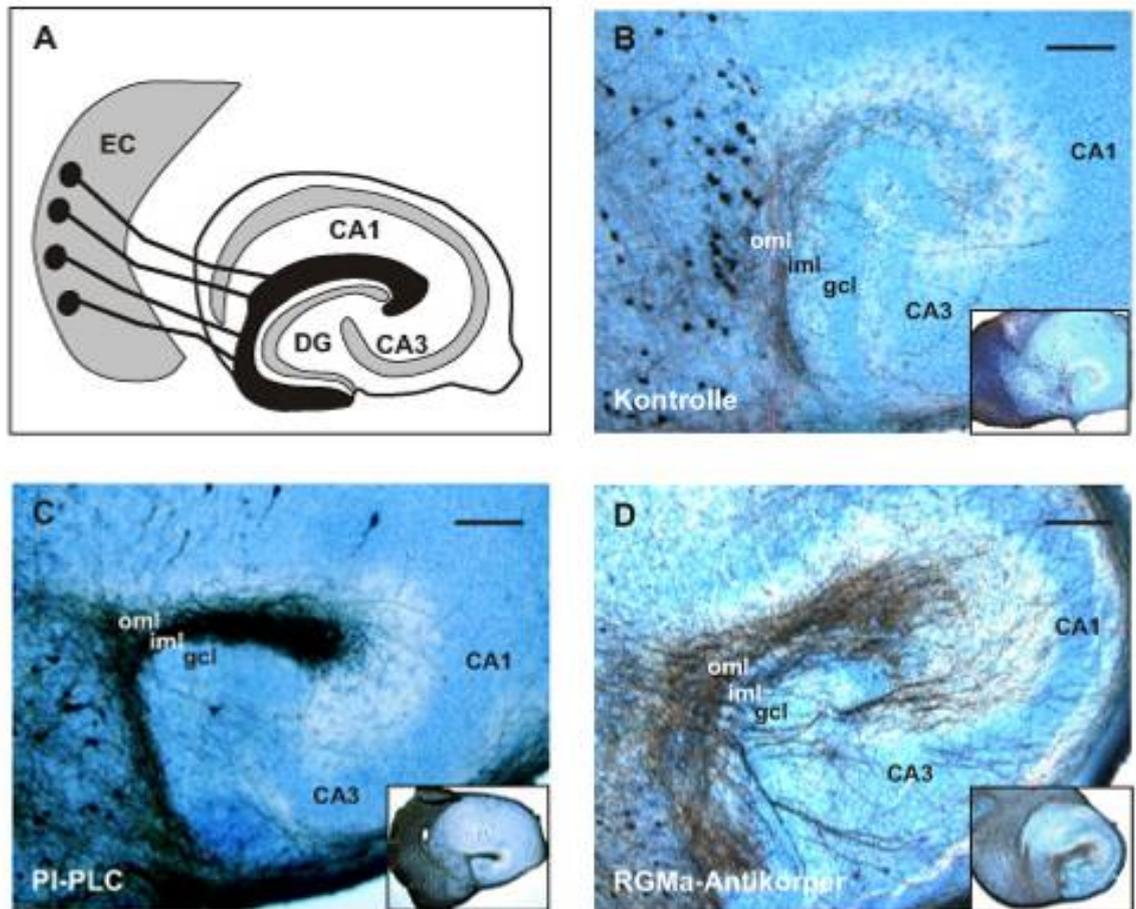
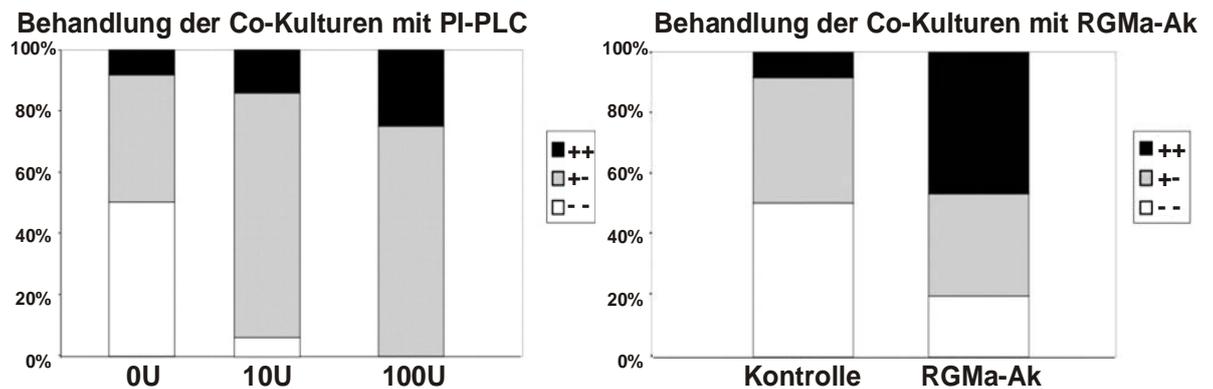


Abbildung 12: Die Blockierung von RGMa in entorhino-hippocampalen Co-Kulturen führte zu einer aberranten Terminierung entorhinaler Fasern in vitro. CA1: Cornu ammonis Region 1; CA3: Cornu ammonis Region 3; gcl: Körnerzellschicht; iml: innere Molekularschicht; oml: äußere Molekularschicht. A: Schema der normalen Endigung der Fasern aus dem entorhinalen Cortex. B: Kontrollkultur ohne Behandlung, C: mit PI-PLC behandelte Kultur; D: mit funktionellem RGMa-Antikörper behandelte Kultur. Scale bars: B,C und D: 100 μ m

Bei den Co-Kulturen der zweiten Gruppe wurden durch die Behandlung mit PI-PLC alle Proteine mit einem Glykosylphosphatidylinositol-Anker aus der Zellmembran gelöst und ihre Wirkung somit verhindert (Abb. 12, C). Die Explantate wurden mit zwei unterschiedlich hohen Konzentrationen von entweder 10 oder 100 U/ml Medium behandelt, die aber beide die gleiche Wirkung zeigten: Unterbindung der RGMa-Wirkung führte zu einem Einwachsen der Fasern des Tractus perforans in die normalerweise ausgesparte innere Molekularschicht in allen behandelten Kulturen. Wachstumsrichtung und -verhalten der Fasern der entorhinalen Projektion waren zwar intakt, nicht jedoch ihre zielgenaue Terminierung.



Grafik 2: Die Auswertung der entorhinalen Projektion nach Behandlung der Co-Kulturen mit RGMa-Antikörper und Phosphoinositolspezifischer Phospholipase C (PI-PLC): ++ steht für grobes Abweichen der entorhinalen Fasern von ihrer normalen Terminationszone, +-: zahlreiche abweichende Neuriten. - -: normale Termination der entorhinalen Projektion in der äußeren Molekularschicht.

Durch die Behandlung mit blockierendem anti-RGMa-Antikörper und den damit verbundenen Verlust der RGMa-Wirkung kam es zu einem Einwachsen der entorhinalen Fasern durch die innere Molekularschicht und Körnerzellschicht hindurch bis in den Hilus (Abb. 12, D). Bemerkenswert war die teilweise erhaltene Wachstumsrichtung des Tractus perforans in die äußere Molekularschicht, wo etliche Axone terminierten. In der Mehrzahl wuchsen die Fasern jedoch über ihr korrektes Ziel hinaus ungehemmt weiter, was zur Ausbildung einer grob veränderten Projektion führte. In über der Hälfte der Antikörper-behandelten Kulturen fand sich eine massiv zerstörte hippocampale Formation mit Überschreiten des Gyrus dentatus durch entorhinale Fasern. In allen anderen Kulturen dieser Gruppe zeigte sich zumindest ein Auswachsen der Axone über die korrekte Terminierungszone hinweg bis in die innere Molekularschicht.

Zusammenfassend kann die Rolle von RGMa anhand dieser Ergebnisse als die eines repulsiven und inhibitorischen Faktors beschrieben werden, der die Zielfindung entorhinaler Fasern in der äußeren Molekularschicht des Gyrus dentatus steuert. Darüberhinaus legt die Distribution von RGMa im gesamten Neocortex und insbesondere im Cornu ammonis des Hippocampus und auf Hilusneuronen eine solche Funktion auch für die Entwicklung anderer Projektionen nahe.

In einem zweiten Ansatz dieser Arbeit wurde eine mögliche Mitwirkung von RGMA an regenerativen Vorgängen untersucht. Hierzu wurde die entorhinale Cortexläsion (ECL) als Modell für Degeneration durchtrennter Nervenfasern und ihrer Zielzellen genutzt. Auch der Mechanismus der reaktiven Sprossung von Fasern nicht betroffener Neurone lässt sich anhand der Vorgänge in der hippocampalen Formation nach Läsion des Tractus perforans erforschen. Da auch die erneut auswachsenden Fasern der gleichen Schichtung und Ordnung im Gyrus dentatus unterliegen wie während der Entwicklung (Bräuer et al., 2003), liegt die Beteiligung derselben Moleküle nahe. Zunächst wurde das Vorkommen von RGMA in der adulten hippocampalen Formation und insbesondere nach entorhinaler Cortexläsion (ECL) überprüft.

3.5 Lokalisation von RGMA im adulten Hippocampus und nach ECL

Unter Zuhilfenahme immunhistochemischer Färbungen von coronalen Gewebeschnitten aus adulter Maus und Ratte und von selektiv kultivierten Zellen wurde die Expression und Distribution von RGMA im adulten Hippocampus beleuchtet. Hierfür wurden die zuvor beschriebenen anti-RGMA-Antikörper C1 und A2 verwendet.

Im adulten Hirn ist RGMA ähnlich wie im sich entwickelnden distribuiert. Es findet sich eine Verteilung auf Neuronen des Großhirncortex in den Schichten 3 und 5, weiterhin eine Färbung des Septums, des Balkens und im Hippocampus. Hier wiederum zeigt sich RGMA-Protein auf den Hilusneuronen und auf Pyramidenzellen des Cornu ammonis in Region 1 bis 3. Im Gyrus dentatus zeigte sich eine schwache, aber deutliche Anfärbung der inneren Molekularschicht, wobei hier die genaue Lokalisation auf Axonen nicht gelang. Ausgespart waren die Körnerzellen des Gyrus dentatus und die äußere Molekularschicht (siehe Abb. 14, Bild C). Um die Zellen, die mit dem anti-RGMA-Antikörper markiert wurden, näher einzugrenzen, wurden die im Hippocampus vorkommenden Zellen, das heißt, hippocampale Neurone, Astrozyten und Mikrogliazellen in Kultur selektiert, untersucht.

Durch Doppelfluoreszenzfärbungen von selektiv kultivierten, reaktiven Astrozyten ließ sich die Lokalisation von RGMA-Protein auf der Zellmembran von Ratten- und Mausastrozyten verifizieren (siehe Abb. 13). Sowohl die Zellkörper als auch die

Fortsätze der Astrozyten waren mit dem RGMa-Antikörper ebenso stark markiert wie durch den anti-GFAP-Antikörper. Auch die hippocampalen Neurone der stabilen Zellreihe HT-22 wiesen eine Kolo-kalisation für RGMa und Neurofilament, das nur in Neuronen vorkommt, auf. Allerdings konnte die Fluoreszenz eindeutig vermehrt auf den Zellkörpern und schwächer auf den Neuriten nachgewiesen werden.

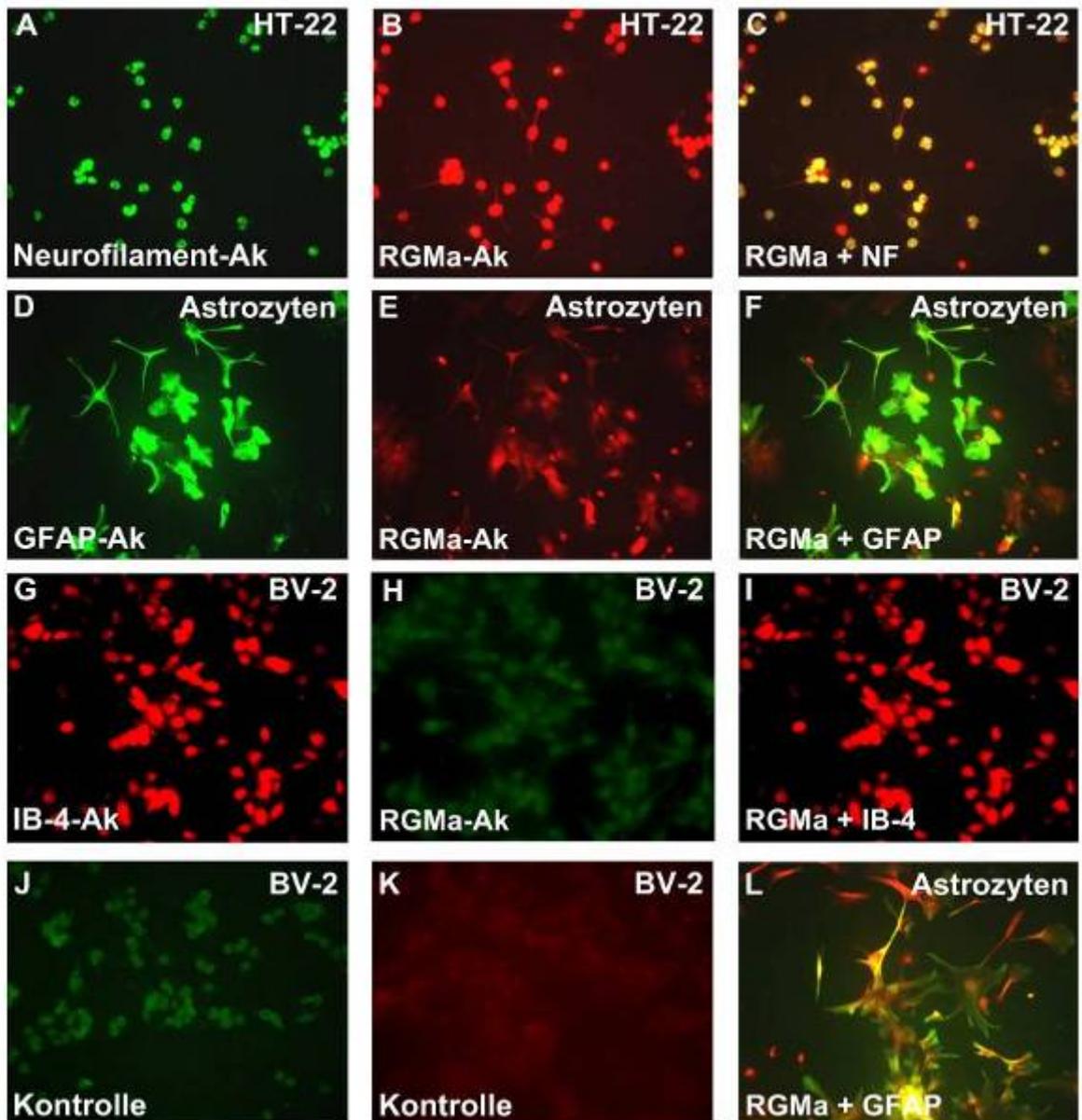


Abbildung 13: Die Doppelfluoreszenzfärbungen von verschiedenen Zellreihen mit anti-RGMa-Antikörper und jeweils spezifisch die Zellen anfärbenden Antikörpern (Neurofilament-Ak für Neurone, glial fibrillary acidic protein GFAP für Astrozyten) zeigen die Co-Expression von RGMa auf hippocampalen Neuronen (HT-22, A – C), reaktiven Astrozyten (D – F), jedoch nicht auf Mikrogliazellen (G – I), die nur den spezifischen Antikörper Isolectin-B4 binden und nicht anti-RGMa. In den Kontrollen wurden jeweils die Schnitte nur mit fluoreszierendem Zweit-Antikörper inkubiert (J und K). L zeigt nochmals die Lokalisation auch auf Astrozytenfortsätzen.

Eine stabile Zellreihe mikroglialer Zellen, BV-2, wurde ebenfalls mit I-B4-Antikörper, der diese Zellen spezifisch markiert, und RGMa-Antikörper inkubiert. Die BV-2-Zellen banden den RGMa-Antikörper jedoch nicht, was dafür spricht, daß diese Zellen das Protein nicht bilden und was weiterhin als Beweis für die Spezifität der Antikörperbindung der Astrozyten und HT-22-Zellen gelten kann. Als weitere Kontrolle diente die Inkubation der Zellen allein mit fluoreszierendem Zweitantikörper (Abb.13, Bilder J und K).

RGMa konnte folglich auf Zellkörpern und Fortsätzen von hippocampalen Neuronen und reaktiven Astrozyten in Maus gefunden werden. Eine klare Zuordnung der zellulären Strukturen, auf denen das Protein lokalisiert wird, ist durch die Immunfärbungen gegeben, in denen hiläre Neurone sowie die Pyramiden- und Körnerzellen gefärbt sind. Zusätzlich war eine schwächere Färbung der inneren Molekularschicht des adulten, nicht-lädierten Gyrus dentatus erkennbar.

3.6 RGMa wird nach ECL in der inneren Molekularschicht exprimiert

Nach einer Läsion im entorhinalen Cortex werden verschiedenste Faktoren im Hirn vermehrt synthetisiert, die Einfluß auf die Reparations- und Regenerationsvorgänge haben. Um eine Rolle von RGM in diesem komplexen System nachzuweisen, wurden die Läsionsstadien 1, 3, 5, 10, 30 und 90 Tage nach Läsion mittels Immunhistologie mit RGMa-Antikörper und mittels Doppelfluoreszenzfärbungen unter Zuhilfenahme von GFAP-Antikörper auf eine veränderte Expression und mögliche Hochregulation des RGMa-Proteins untersucht.

Es zeigte sich nach Läsion keine Veränderung des Expressionsmusters im Sinne einer zusätzlich angefärbten Region, Zellpopulation oder -struktur. Die Intensität der Färbung nahm, erkennbar an einer deutlichen Zunahme der Färbung gegenüber im gleichen Experiment entwickelten Schnitten von Kontroll- und scheinoperierten Tieren, in den frühen Läsionsstadien zu und dann allmählich wieder ab. Im Hippocampus zeigte sich eine intensivere Färbung der Neurone im Umkreis der Läsion, die aber eher einer allgemeinen, reaktiven Proteinüberexpression entsprach. Signifikante Färbung zeigten wieder die Neurone des Hilus und die Pyramidenzellen der CA1-Region des Hippocampus

jeweils stärker auf der lädierten als auf der unlädierten Seite. Deutlich nahm die Färbung der inneren Molekularschicht des Gyrus dentatus nach Läsion in den frühen Stadien zu: Gerade im Gegensatz zur äußeren Molekularschicht und den Körnerzellen, die nicht angefärbt wurden, wurde die innere Molekularschicht deutlich vom RGMa-Antikörper markiert (Abb. 14, C – D).

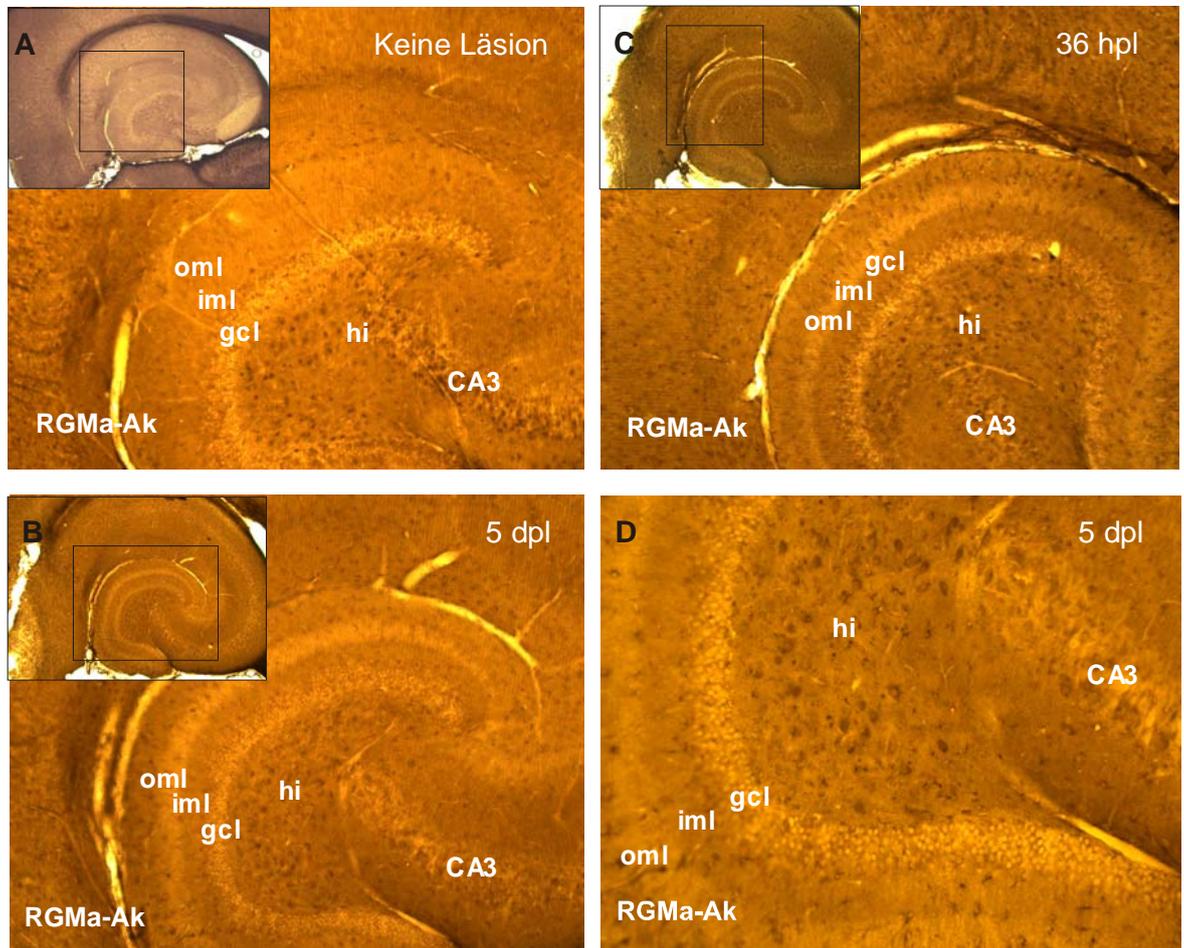


Abbildung 14: Immunhistochemische Färbungen der hippocampalen Formation in Läsionsstadien 36 Stunden (36hpl, hours post lesion) und 5 dpl (days post lesion) zeigen eine deutliche Mehrfärbung der inneren Molekularschicht des Gyrus dentatus (B, C und D) im Gegensatz zum unlädierten Hippocampus (A). Entsprechend markiert der RGMa-Ak auch an die hilären Neurone sowohl der unlädierten als auch der lädierten Seite.

Die vereinzelt in diesen Färbungen sichtbaren Zellen, die nicht Neuronen, sondern glialen Zellen ähneln und die Co-Lokalisation von RGMa auf Astrozyten in Kultur sprachen für eine Expression von RGMa auch auf Astrozyten nach entorhinaler Cortexläsion. In Doppelfluoreszenzfärbungen konnte eine Distribution von RGMa auch auf Astrozyten ubiquitär im Hippocampus nachgewiesen werden (Abb. 15).

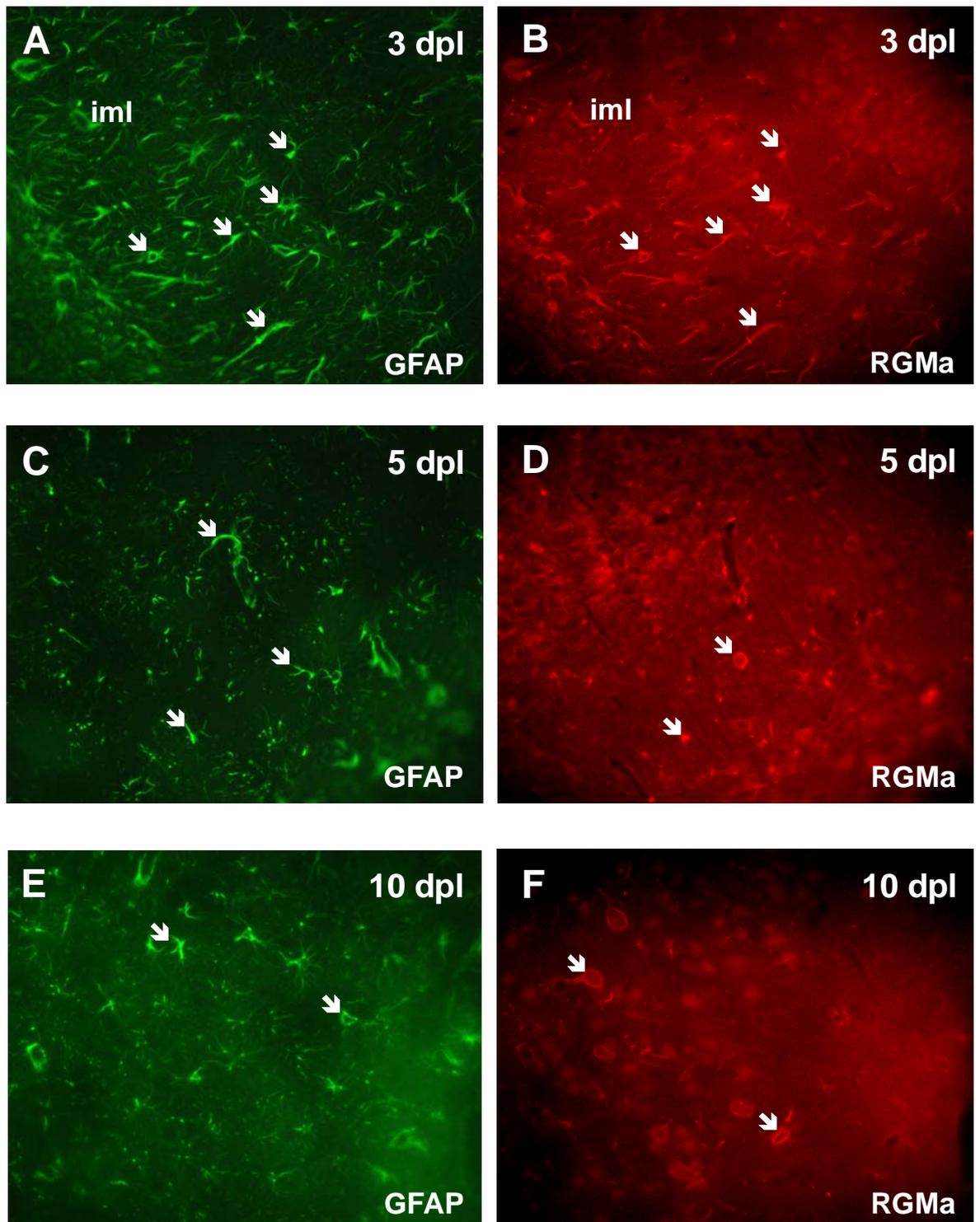


Abbildung 15: Astrozyten exprimieren RGMa am dritten Tag nach entorhinaler Cortexläsion. Astrozyten wurden sowohl mit dem spezifischen Marker GFAP (glial fibrillary acidic protein) angefärbt, als auch mit dem RGMa-Antikörper. 5 bzw. 10 Tage nach Läsion ist das RGMa-Protein nicht mehr auf Astrozyten, sondern auf Neuronen lokalisiert. 3, 5, 10 dpl (days post lesion), iml: innere Molekularschicht. Pfeile in Bild A,C und E zeigen auf mit GFAP-Ak markierte Astrozyten, Pfeile in Bild B,D und F zeigen mit RGMa-Ak markierte Astrozyten (B) und Neurone (D, F).

Es gelang mit den anti-RGMa-Antikörpern eine spezifische Darstellung von Astrozyten im Cortex und Gyrus dentatus in den Stadien 36 Stunden bis ca. 3

Tage nach der Läsion, jedoch nicht mehr ab dem fünften Tag nach der Läsion. Färbungen in den nachfolgenden Stadien zeigten eine Anfärbung von Neuronen im Hilus, die der in den DAB-Färbungen entsprach. Nach entorhinaler Cortexläsion wird RGMA also bis zum ca. fünften postläsionalen Tag auf Astrozyten im Bereich der Läsion, sowie im Gyrus dentatus in der inneren Molekularschicht exprimiert. Ab dem fünften Tag nach Läsion kann RGMA-Protein auch auf Hilusneuronen, sowie in der CA-Region des Hippocampus nachgewiesen werden, während die Astrozytenfärbung abnimmt.

Durch die Läsion wird eine Verstärkung der RGMA-Expression in der inneren Molekularschicht induziert, in die aussprossende Fasern aus dem entorhinalen Cortex nicht hineinwachsen. Diese ist bereits am 1. Tag nach Läsion des Tractus perforans darstellbar und hält bis ca. 10 Tage an, bevor die Expression des RGMA-Proteins auf ein Hintergrundniveau zurückgeht, welches auch in unlädierten oder scheinoperierten Tieren nachweisbar ist.