

Aus dem Zentrum für Anatomie  
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Das *repulsive guidance molecule* RGMA in  
der Entwicklung und Regeneration des  
entorhino-hippocampalen Systems**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –  
Universitätsmedizin Berlin

von  
Henriette Brinks  
aus Brakel

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Th. Skutella  
2. Prof. Dr. med. J. Priller  
3. Priv.-Doz. Dr. med. B. Müller

Datum der Promotion: 17.07.2006

## Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	8
1.1	Die entorhino-hippocampale Formation als Modell	8
1.2	Mechanismen der axonalen Wegfindung	9
1.2.1	Chemoattraktion und -repulsion	9
1.2.2	Signalverarbeitung im Wachstumskolben	11
1.2.3	Faszikulation und Defaszikulation	12
1.3	Leitmoleküle und ihre Rezeptoren	14
1.3.1	Semaphorine/Neuropiline/Plexine	14
1.3.2	Netrine und ihre Rezeptoren	16
1.3.3	Slits and Robo	17
1.3.4	Ephrine	18
1.3.5	Rezeptor-Protein-Tyrosinphosphatasen (RPTPs)	19
1.3.6	Neurotrophine	20
1.3.7	Zelladhäsions-Rezeptoren	20
1.3.8	ECM-Moleküle und Metalloproteasen	21
1.3.9	Myelin-assoziierte Inhibitoren	22
1.4	Die zeitliche und örtliche Entwicklung des Hippocampus	24
1.5	Regeneration im entorhino-hippocampalen System	26
1.6	Das Repulsive Guidance Molecule RGM	28
2	MATERIAL UND METHODEN	32
2.1	Immunhistochemie	32
2.2	Zellkultur	33
2.3	In situ Hybridisierung	35
2.4	Bindungsstudien	36
2.5	Streifenassay	36
2.6	Auswachsassay	39
2.7	Entorhino-hippocampale Co-Kulturen	40
2.8	Entorhinale Cortexläsion	41

3	ERGEBNISSE	42
3.1	Die Expression von RGMa im Hippocampus perinatal	42
3.1.1	RGMa wird pränatal im Hilus und Gyrus dentatus exprimiert	42
3.1.2	Distribution von RGMa im Gyrus dentatus postnatal	43
3.2	RGMa bindet auf Zellen im Gyrus dentatus und Hippocampus	44
3.3	Wachstum entorhinaler Neuriten ist von RGMa beeinflusst	45
3.3.1	RGMa hat auf entorhinale Fasern einen inhibitorischen Effekt	46
3.3.2	Entorhinale Fasern werden von RGMa abgestossen	49
3.4	Blockierung von RGMa stört die Zielfindung entorhinaler Fasern	51
3.5	Lokalisation von RGMa im adulten Hippocampus und nach ECL	54
3.6	RGMa wird nach ECL in der inneren Molekularschicht exprimiert	56
4	DISKUSSION	60
4.1	Welche Funktion hat RGMa während der Entwicklung?	60
4.1.1	Distribution von RGMa im Gyrus dentatus	60
4.1.2	RGMa-Effekt auf entorhinale und hippocampale Neuriten	62
4.1.3	Konsequenzen eines RGMa-Wirkverlusts	63
4.2	RGMa im Zusammenspiel mit anderen Leitmolekülen	65
4.3	Hat RGMa eine Bedeutung für Regenerationsprozesse im ZNS?	69
4.3.1	Distribution von RGMa im adulten Hirn und nach ECL	69
4.3.2	Gemeinsamkeiten von Entwicklung und Regenerationsprozessen	70
4.3.3	Mögliche weitere Funktionen von RGMa	72
5	Zusammenfassung	74
6	Literaturverzeichnis	76
7	Anhang	98
7.1	Danksagung	98
7.2	Curriculum vitae	99
7.3	Veröffentlichungen	100
7.4	Eidesstattliche Erklärung	101

## Vorwort

Worauf basiert die Bildung spezifischer Verbindungen im Gehirn? Und wie konnektieren Neurone eines funktionellen Systems über weite Strecken hinweg miteinander? Zur Beantwortung dieser Fragen ist es schon seit langem Ziel der Entwicklungsbiologie, ein Modell zu erstellen, das generell anwendbar die Entwicklung des zentralen Nervensystems auf molekularer Ebene beschreibt. Das Wissen über die einflußnehmenden Moleküle verspricht nicht nur einen Erkenntnisgewinn, sondern es wird als möglich erachtet, durch gezielte Beeinflussung der Mechanismen auch die eng verwandten Vorgänge während der De- und Regeneration axonaler Verbindungen zu steuern. Eine Vielzahl degenerativer und traumatischer pathologischer Prozesse wäre hiervon betroffen. Therapeutische Anwendungen sind jedoch zunächst durch die Vielfalt der entdeckten sogenannten Leitmoleküle, die an Entwicklung und Regeneration im ZNS beteiligt sind, kompliziert. Man versucht heute, die gefundenen Wegweiserproteine möglichst vollständig zu charakterisieren, um auf diesem Wege zu einer gemeinsamen Endstrecke ihrer Wirkung und damit zu Mechanismen zu finden, die generalisierbar und möglichst einfach beeinflussbar sind.

In der folgenden Arbeit wurde ein im Jahr 2000 erstmals beschriebenes Leitmolekül, das *repulsive guidance molecule* (RGMa), und seine Rolle während der Entwicklung und Regeneration im Hippocampus charakterisiert. Das Modell des entorhinalen Cortex ist hierzu aufgrund der gut untersuchten Morphologie benutzt worden. Die differenzierte Laminierung, über deren Afferenzen und Efferenzen viel bekannt ist, kann durch ein einfaches Schema dargestellt werden. Die Untersuchung der Expression und Distribution des Proteins in den Schichten des entorhinalen Systems, ferner seiner Effekte auf auswachsende Neuriten belegt eine repulsive und inhibitorische Funktion von RGMa. Speziell die Folgen einer Blockierung und damit des Wirkungsverlusts von RGMa verdeutlichen die Mitwirkung bei der Zielfindung und Retention von afferenten Neuriten in der hippocampalen Formation. Da diese ein Modell für die schichtenspezifische Termination von Axonen im Cortex von höher entwickelten Vertebraten darstellt, wäre die Generalisierung der getroffenen Aussagen möglich.

## 7.2 Curriculum vitae

17.11.1977 geboren in Brakel, Westfalen.

### Schulbildung:

1984-1988 Grundschule Oeynhausen  
1988-1997 Städt. Gymnasium Bad Driburg  
Abschluss: Abitur (Durchschnittsnote 1,8)

### Akademische Bildung:

04/1998-11/2004 Studium der Humanmedizin  
05/2000 Physikum (Note: 3,0)  
03/2001 1. Staatsexamen (Note 3,0)  
06/2001 USMLE Step 1 (score: 192)  
09/2003 2. Staatsexamen (Note 2,0)  
10/2003-09/2004 Praktisches Jahr:  
10/03-02/04: Neurologie, Tygerberg Hospital, Kapstadt, Republik Südafrika (Direktor: Jonathan Carr, MD, PhD)  
02/04-06/04: Herz- und Gefässchirurgie, Inselspital, Bern, Schweiz (Direktor: Prof. Thierry Carrel)  
06/04-09/04: Gastroenterologie, Hepatologie und Endocrinologie, Charité, Berlin (Direktor: Prof. Herbert Lochs)  
11/2004 3. Staatsexamen (Note 1,0)  
Ärztliche Prüfung (Gesamtnote 1,83)

### Forschungsarbeit:

seit 10/2001 Dissertation, AG Zell- und Neurobiologie, Zentrum für Anatomie, Charité, Berlin (Direktor Prof. Robert Nitsch),  
Betreuer der Arbeit: Prof. Thomas Skutella

### Berufsweg:

Seit 01/2005 Assistenzärztin, Klinik für Herz- und Gefässchirurgie, Bern, Schweiz (Direktor: Prof. Thierry Carrel)