

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Die entorhino-hippocampale Formation als Modell

Die Größe der Aufgabe, im sich entwickelnden und regenerierenden Gehirn spezifische, neuronale Verbindungen in einer einzig richtigen Weise zu bilden, ist kaum zu überschätzen. Sie folgt in niedrig- wie in hochdifferenzierten Organismen ähnlichen Regulationsmechanismen. Die an diesem Prozess beteiligten sogenannten Wegweiser- oder Leitmoleküle werden seit Jahren intensiv erforscht. Es zeigt sich eine immer größer werdende Diversität sowohl der Liganden und ihrer Rezeptoren als auch von Wirkmechanismen und Interaktionen miteinander und mit den Zielzellen. Zur Identifikation dieser Moleküle werden einfache Modelle in niedrig differenzierten Organismen verwendet, die auf hochdifferenzierte Lebewesen übertragen werden können.

Es haben sich einige Versuchstiere von Invertebraten, wie beispielsweise *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster*, bis zu hochdifferenzierten Vertebraten, hier besonders Hühner, Ratten und Mäuse, als geeignet bewährt. Heraus kristallisiert als beispielhaft für die spezifische Konnektionsbildung haben sich spezielle Regionen und Fasertrakte des Gehirns: Die commissuralen Axone in *C. elegans* und *Drosophila*, das visuelle/tectale System im Huhn, die Hinterwurzelganglienzellen und der Hippocampus von Nagetieren, wie beispielsweise Ratten und Mäusen, sind geeignet, die Bildung von Verbindungen, ihre gezielte Unterbrechung und die daraus resultierenden Defizite zu untersuchen. Dies beinhaltet die Möglichkeit, die Entwicklung *in vitro* durch Hirnschnittkulturen nachzustellen und auf bestimmte Prozesse durch externe Manipulation Einfluss zu nehmen.

Das entorhino-hippocampale System stellt mit seinen drei Hauptprojektionen, die in einer spezifischen Weise im Hippocampus terminieren, ein relativ simples Modell für die Entstehung und das Persistieren, sowie für die Neuorientierung nach Läsion von zentralnervösen Projektionen dar. Von diesen Projektionen suchen zwei, die septale und die commissurale, ihr Zielgebiet über einen weiten Weg unter Überkreuzung der Mittellinie und bilden deshalb ein gutes Beispiel für sogenannte "long range acting"-Faktoren. Dahingegen hat die entorhino-hippocampale Projektion, der Tractus perforans, einen relativ kurzen Weg

zurückzulegen. Ebenso wie an intrahippocampalen Verbindungen, beispielsweise dem Moosfasertrakt, können am Tractus perforans "short acting"-Leitmoleküle, also solche, die über kurze Distanzen wirken, erforscht werden (Giger et al., 1998; Skutella et al., 1999). Generell ist die Entwicklung des entorhino-hippocampalen Systems beispielhaft für andere Cortexareale und an diesem erforschbar. Der Vorteil des hippocampalen Modells für die experimentelle Forschung besteht in einer strengen Anordnung der Zielgebiete in relativ einfach aufgebauten Schichten, in der Verfolgbarkeit der Projektionen über weite Strecken und nicht zuletzt in der übersichtlichen Anordnung der Zellgebiete und Faserstränge (Heimrich & Frotscher, 1993).

Weiterhin bietet die entorhinale Cortexläsion eine Möglichkeit, De- und Regenerationsvorgänge im zentralen Nervensystem zu beobachten. Die selektive Durchtrennung einer Afferenz des Gyrus dentatus, des Tractus perforans, resultiert in einer alleinigen Degeneration von Neuriten in der äußeren Molekularschicht und der CA1-Region: Dies lässt, anders als bei der traumatischen Hirnläsion (traumatic brain injury, TBI) oder der Rückenmarksläsion (spinal cord injury, SCI), eine genauere Beurteilung der durch die Läsion verursachten Vorgänge, und insbesondere die getrennte Analyse von anterograder und retrograder Degeneration, da diese an verschiedenen Orten auftreten, zu (Lynch et al, 1972; Deller & Frotscher, 1997; Kwidzinski et al., 2003).

## **1.2 Mechanismen der axonalen Wegfindung**

### **1.2.1 Chemoattraktion und -repulsion**

In einem wegweisenden Review haben Tessier-Lavigne und Goodman die Mechanismen axonaler Wegfindung auf vier grundsätzliche Strategien reduziert: Zum einen gibt es den wichtigen Mechanismus der selektiven Faszikulation, das heißt der schrittweisen Entwicklung von Orientierungsfasern in einem immer komplexer werdenden System, der wahrscheinlich der vorausgehende Schritt ist (Tessier-Lavigne & Goodman, 1996). Das Verständnis für die Entwicklung der Projektionen als einen Prozess, der in vielen kleinen Schritten vor sich geht, bei der präexistente Faszikel mit ihren Oberflächenmolekülen die Leitstrukturen bilden, erleichtert die Vorstellung von der komplexen Vernetzung (Raper et al., 1984; Goodman et al., 1984). Zum Anderen existieren ihnen zufolge sogenannte "choice points", d.h. Stellen, an denen die auswachsenden Fasern auf die

wegweisenden Leitmoleküle reagieren und ihre Wachstumsrichtung an die einflußnehmenden Faktoren anpassen. Hierfür ist auch das Netzwerk von Faszikeln in der Weise verantwortlich, daß sie als Strassen agieren, an denen sich die auswachsenden Fasern orientieren und sich immer wieder an bestimmten Entscheidungspunkten neu ausrichten oder auf der Strasse bleiben.

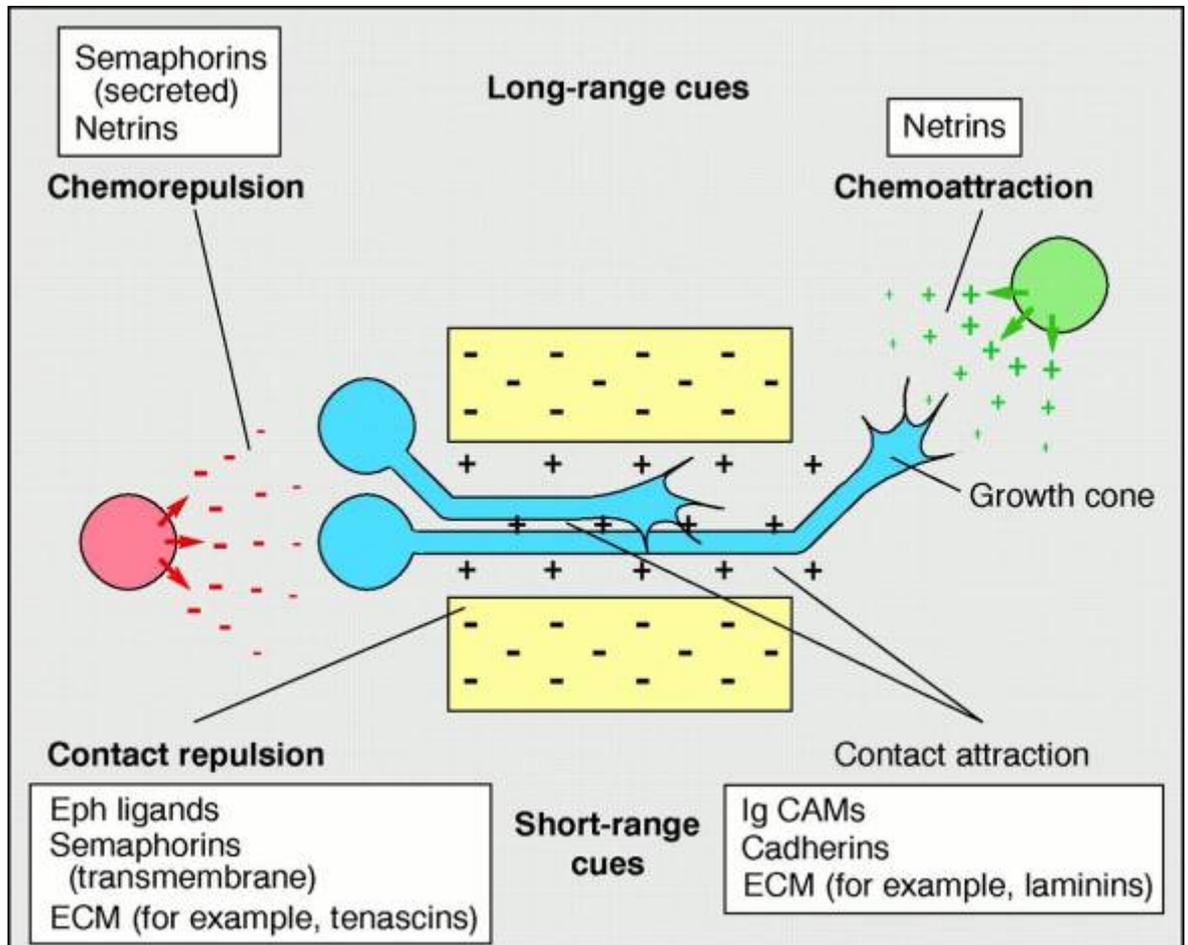


Abbildung 1: Die vier Hauptmechanismen axonaler Wegfindung und die daran hauptsächlich beteiligten Moleküle nach Tessier-Lavigne & Goodman, *The Molecular Biology of Axon Guidance*, 1996 in Science Magazine. repulsion: Abstoßung, attraction: Anziehung, long-range cues: über Distanz wirkende Faktoren, short-range cues: zellgebundene Faktoren, growth cone: Wachstumskolben.

Obwohl sich herausgestellt hat, daß gewisse Leitmoleküle sowohl attraktiv als auch repulsiv wirken können, bleibt ein Basismodell bestehen, demzufolge es attraktive Moleküle gibt, die sezerniert werden können und so als "long range cues" wirken, als auch welche, die örtlich gebunden bleiben und auf der Zelloberfläche mit ihrem Rezeptor interagieren müssen, um eine Wirkung zu entfalten (McKenna & Raper, 1988; Baier & Bonhoeffer, 1994). Kontaktabhängige attraktive Faktoren können sowohl wachstumsfördernd als auch faszikelbildend

auf die Wachstumskolben wirken. Gleiches gilt für die repulsiven Wegweiser, die auf Neuronen oder ihren Fasern exprimiert, aber auch sezerniert werden können. Diese hemmenden Substanzen können lokal als Barrieren wirken und zu einer Wendung, einem Wachstumsstop oder dem Kollaps des Wachstumskolbens führen (Oakley & Tosney, 1993; Wizenman et al., 1993; Fan & Raper, 1995).

Zusammenfassend kann man sagen, daß meist ein Zusammenspiel von allen vier Faktoren - ortsgebundenen oder sezernierten, abweisenden oder anziehenden Molekülen - gleichzeitig oder in bestimmten Phasen einer Projektionsentwicklung zum Zustandekommen einer neuronalen Verbindung führt. Dieses gleichzeitige Ziehen, Schieben und Hemmen von Bewegungen des Wachstumskolbens bewirkt orchestriert dessen Hinwendung zu einem bestimmten Ziel, welches durch eine Redundanz der Signale nicht verfehlt werden kann (Tessier-Lavigne & Goodman, 1996). Andererseits verkompliziert die Vielfalt der zusammenspielenden Faktoren die Analyse der einzelnen Leitmoleküle und ihre Bedeutung für die Entwicklung der einzelnen Projektion.

### **1.2.2 Signalverarbeitung im Wachstumskolben**

Fundamental für die Entwicklung des Nervensystems ist die richtige, präzise Verbindung zwischen Neuronen eines funktionellen Systems untereinander. Die essentielle Struktur für die Zielfindung eines auswachsenden Neuriten ist der sogenannte Wachstumskolben an dessen Spitze. Hier wird auf dem komplizierten Weg zu einem spezifischen Zielgebiet jede wegweisende Information gelesen, ausgewertet und gegebenenfalls entsprechend reagiert. Der Wachstumskolben hat zu diesem Zweck spezielle fingerartige Filopodien und dazwischen netzartige Lamellipodien, deren Gestalt von einem Zytoskelett aus Actinfilamenten aufrechterhalten und verändert werden kann. Der Polymerisationsstatus dieses Actinskeletts kontrolliert die Vorwärts- oder Rückwärtsbewegung der Filopodien, wobei eine Polymerisation durch attraktive und die Depolymerisation durch repulsive Leitmoleküle zustande kommt (Huber et al., 2003).

Der molekulare Mechanismus hierfür konnte in ähnlich strukturierten Fibroblasten auf kleine GTP-bindende Proteine der Rho-Subfamilie zurückgeführt werden (Ridley et al., 1992 und Nobes & Hall, 1995), die als eine Art Schalter fungieren zwischen einem inaktiven GDP-gebundenen Status und einem aktiven GTP-gebundenen Status, in dem die Filopodien sich ausstrecken und fokale

Adhäsionen bilden. In weiterführenden Arbeiten wurde dieser Wirkmechanismus als auf Wachstumskolben übertragbar beschrieben (Mackay et al., 1995), wobei hier drei sogenannte Rho-ähnliche GTPasen, namentlich Cdc42, Rac1 und RhoA, gefunden wurden, die mittels zwischengeschalteter Effektoren die Formation oder den Kollaps der Myosin-Actin-Komplexe und damit der Filo- und Lamellipodien induzieren (Dickson, 2000; Luo, 2000 und 2002). Erst kürzlich konnten vielfältige Mechanismen der Übertragung des Rho-Signals beispielsweise durch den sogenannten N-WASP/Arp2/3-Komplex gezeigt werden (Rohatgi et al., 1999) sowie Profilin-bindende Proteine der VASP/Ena-Familie, die erwiesenermaßen in Vertebraten und Invertebraten die Actinpolymerisation beeinflussen. Auf welchem Weg sie dies tun ist jedoch bisher noch nicht geklärt (Bear et al., 2002). Gezeigt wurde lediglich, daß ein Fehlen dieser Proteine zu gestörtem axonalem Wachstum führt (Yu et al., 2002).

Dieselben Rho-GTPasen vermitteln via p-21-aktivierter Kinase (PAK) und Rho-Kinase (ROCK), die wiederum eine LIM-Kinase (LIMK) aktivieren, den repulsiven Effekt hemmender Leitmoleküle. Die Depolymerisation und damit Retraktion der Filopodien und des Wachstumskolbens wird mittels Cofilin kontrolliert, welches wiederum negativ von LIMK beeinflusst wird (Arber et al., 1998; Yang et al., 1998). Nicht nur Actinpolymerisation wird von den Rho-GTPasen gesteuert, sondern auch der Transport von F-actin und damit die Actin-Myosin-vermittelte Aktivität: Hier sind die ROCK als Mediator einer Kontraktilitätssteigerung und Rac, sowie Cdc42, Gegenspieler, da die beiden letztgenannten zu einer Dephosphorylierung und damit Inaktivierung der Myosinfilamente führen (Kimura et al., 1996; Sanders et al., 1999).

### **1.2.3 Faszikulation und Defaszikulation**

Für die Entwicklung ist der Verlauf von Neuriten in Fasernsträngen oder –bündeln, sogenannten Faszikeln, essentiell. Wachstumskolben orientieren sich an existierenden Faszikeln wie an Strassen, mit denen sie sich an bestimmten Punkten zusammenschließen, um sie an anderen wieder zu verlassen.

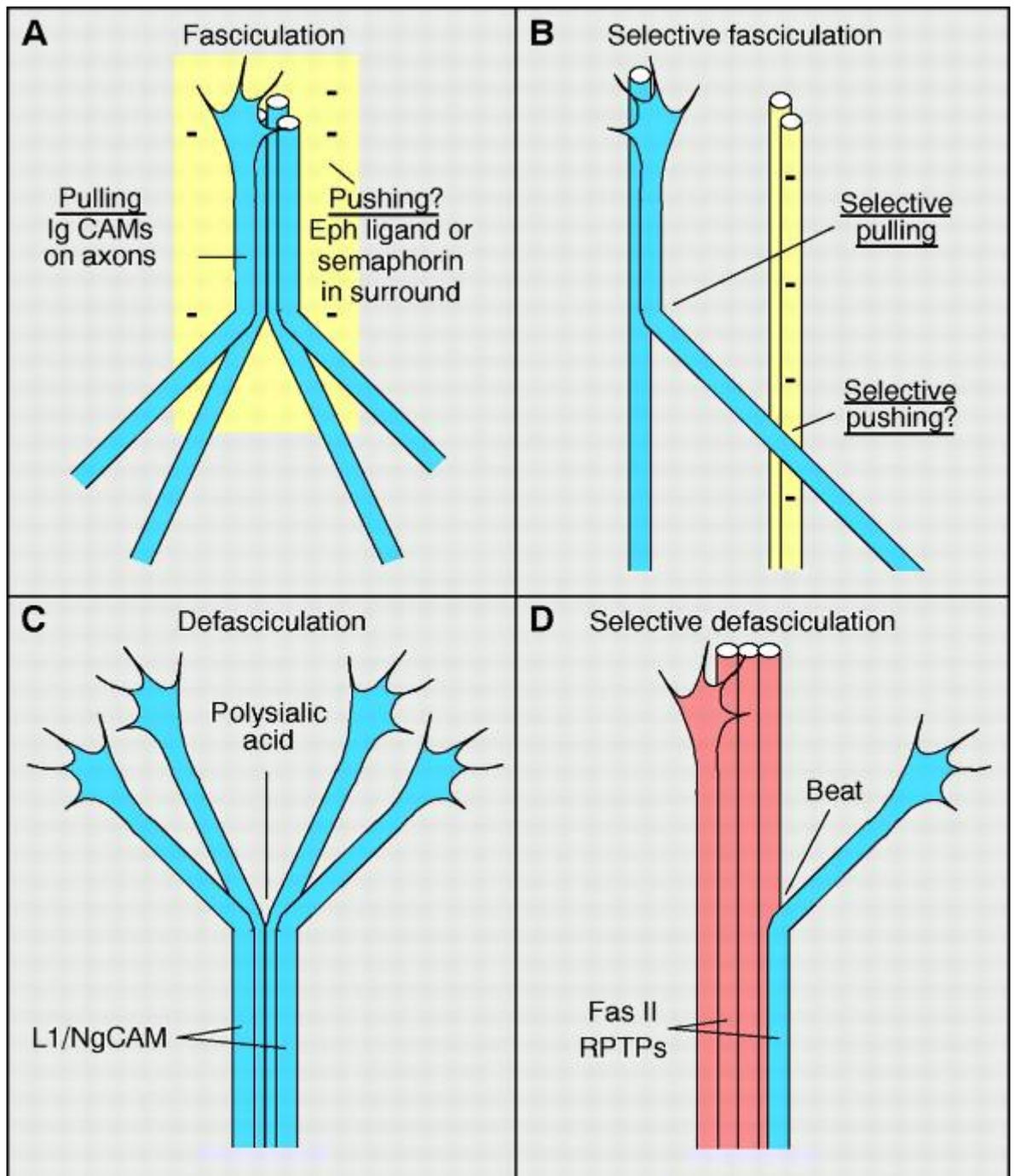


Abbildung 2: Die Wirkungen verschiedener Leitmoleküle auf selektive Faszikulation und Defaszikulation von Axonen aus Tessier-Lavigne & Goodman, *The Molecular Biology of Axon Guidance*, 1996 in Science Magazine. Faszikulation und Defaszikulation basieren auf einem Gleichgewicht von einflussnehmenden Faktoren in der Umgebung und auf der Expression ihrer Rezeptoren auf dem auswachsenden Axon.

Die axonale Faszikulation basiert auf einer Balance zwischen Attraktion und Repulsion: Zelladhäsionsmoleküle wie Fasziklin II oder L1/NgCAM können Axone zu Faszikeln zusammenziehen (Harrelson and Goodman, 1988; Grenningloh et al., 1991). Gleichermäßen können andere Faktoren, wie Sema I und AL-1, ein Ligand von Eph-Rezeptoren, das Faszikulieren durch repulsive Funktion

herbeiführen. Wenn diese blockiert wird, defaszikulieren die Axone (Kolodkin et al., 1992; Meima et al., 1996). Motorische Axone defaszikulieren unter dem Einfluss von PSA, welches die Axon-Axon Adhäsion unterbrechen kann. Auch RPTK-Moleküle beeinflussen die selektive Defaszikulation. Das Fehlen des RPTK-Moleküls *derailed* führt in *Drosophila* dazu, dass Neurone während der Entwicklung die richtigen Faszikel nicht erkennen (Callahan et al., 1995).

### **1.3 Leitmoleküle und ihre Rezeptoren**

Im Folgenden werden die verschiedenen Gruppen von Wegweisern im sich entwickelnden und regenerierenden Hirn vorgestellt. Dabei soll besonders auf die Signaltransduktion und relevante Regulationsmöglichkeiten der einzelnen Faktoren eingegangen werden, sowie auf ihre Funktion bei der Entwicklung und Regeneration afferenter Projektionen im Hippocampus. Generell wurde für alle an der embryonalen und postnatalen Entwicklung beteiligten axonalen Leitmoleküle eine mehr oder weniger wichtige Funktion auch in der Regeneration beschrieben. Hier existieren jedoch vorwiegend lückenhafte und vorläufige Erkenntnisse der genauen Mechanismen.

#### **1.3.1 Semaphorine/Neuropiline/Plexine**

Die größte Gruppe von Leitmolekülen bilden die Semaphorine mit ihren Rezeptormolekülen, den Neuropilinen und Plexinen. Von den Mitgliedern der großen Gruppe der Semaphorine, bestehend aus bisher mindestens 30 verschiedenen strukturierten Proteinen mit einer gemeinsamen, kennzeichnenden Domäne, fungieren in Vertebraten und Invertebraten die meisten als abstoßende Leitmoleküle (Messersmith et al., 1995, Shepherd et al., 1997, Varela-Echavarría, 1997). Das erste gefundene Semaphorin der Gruppe III, deren Mitglieder alle sekretiert werden, Collapsin-1, zeigte auf Wachstumskolben von sensorischen Neuronen schon in sehr geringen Konzentrationen einen starken inhibitorischen Effekt (Fan & Raper, 1995). Einige haben erwiesenermaßen jedoch auch attraktive Wirkung auf Neurone (Inagaki et al, 1995, Püschel et al, 1995, Kolodkin, 1996, Mark et al., 1997, Wong et al., 1997), wobei dieser Effekt von dem jeweiligen Aktivierungsstatus der Wachstumskolben abhängig zu sein scheint (Huber et al., 2003). Somit verliert die einfache Einteilung in repulsive und attraktive Leitmoleküle ihre Allgemeingültigkeit, da dies zumindest nicht für alle Faktoren gilt. Für SemIIIa zum Beispiel, ein sezerniertes Protein der Klasse III,

ist eine Proteinkinase G-aktivitätsabhängige Konversion der repulsiven in eine attraktive Wirkung beschrieben (Song, 1998, Ming, 1999).

Den Semaphorinen stehen als Rezeptoren die Gruppe der Neuropiline und Plexine gegenüber (Fujisawa et al., 1997). Mindestens vier Mitglieder der Semaphorin III-Familie, Collapsin-1, -2, -3 und -5, binden mit gleicher Affinität an Neuropilin-1 (Feiner et al., 1997) und bilden einen Rezeptorkomplex mit einem bisher noch unbekanntem weiteren Molekül. Neuropilin-2 ist als Rezeptor für SemaE bzw. Collapsin-3 und SemaIV bekannt, nicht jedoch für SemaIII (Chen et al., 1997). Es konnte gezeigt werden, daß Neuropilin-1 in vitro das Auswachsen von Neuriten fördert und zu einer Aggregation von Zellen führt (Hirata et al., 1993) und weiterhin wichtig für die Verzweigung und Faszikulation von Axonen ist (Kitsukawa et al., 1995). Neuropilin-2, der Rezeptor für SemaIIIC und SemaIIIF, vermittelt die repulsive Wirkung dieser Leitmoleküle, indem es Multimere mit NP-1 oder Homooligomere bildet, welche die intrazelluläre Signaltransduktion durch ein NP-1-interagierendes Protein (NIP) vermitteln (Cai & Reed, 1999).

Weiterhin binden Plexine zwar nicht direkt an Semaphorine, bilden jedoch mit Neuropilinen einen Komplex, der dann eine höhere Affinität zu SemaIIIA aufweist als Neuropilin-1 allein (Tamagnone et al., 1999; Takahashi et al., 1999). Ein weiterer Baustein dieses Rezeptorkomplexes ist das Glycoprotein L1, ein Zelladhäsionsmolekül, das für die Weiterleitung des repulsiven Effekts von SemaIIIA essentiell ist, während andere Semaphorine diesen Faktor nicht benötigen (Castellani, 2000). Plexin-A3 ist ein Mediator der repulsiven, wegweisenden Wirkung von Sema3A bei der Entwicklung von hippocampalen Projektionen aus dem Septum und Cortex (Cheng et al., 2001).

Im Hippocampus spielen die Semaphorine der Klasse III als auf septale Fasern abstossend wirkende Moleküle eine Rolle (Steup et al., 2000), indem sie sowohl GABAerge als auch cholinerge septohippocampale Fasern perinatal von der unkorrekten Zielzone fernhalten und sie dadurch in ihr Zielgebiet dirigieren. Es wurde gezeigt, daß die Axone ab dem perinatalen Stadium E16 bis P5 in hohem Maße Neuropilin-1 und -2 exprimieren, während in den Zielgebieten auf Interneuronen SemaIIIC und in Pyramiden- und Körnerzellen SemaIIIA und SemaIIIE sekretiert wird (Pascual et al., 2005). Es konnte gezeigt werden, daß SemaIIIC nur auf einwachsende, septale Fasern, nicht aber auf Neuriten von

entorhinalen und hilären Neuronen, sowie auf Pyramidenzellen der CA3-Region abstossend wirkt (Skutella & Nitsch, 2001). Es müssen jedoch auch andere Faktoren noch eine Rolle spielen, da die Sema3C-defiziente Maus eine intakte septale Projektion zeigt (Steup et al., 2000). Sema3F wird auf Neuronen im entorhinalen Cortex und im Hippocampus exprimiert, während der Rezeptor, Neuropilin-2, nur im Hippocampus exprimiert wird. Die Deletion des Rezeptorgens führt zu einer defekten Ausbildung des Moosfaserbündels, das sich zu weit in die CA1-Region erstreckt. Die Effekte dieses Defekts in vivo auf das Lernverhalten von Mäusen sind ein Ziel weiterführender Forschung (Schwegler & Crusio, 1995).

### **1.3.2 Netrine und ihre Rezeptoren**

Schon in den siebziger Jahren des letzten Jahrhunderts wurden in *Caenorhabditis elegans* drei Gene gefunden, deren Deletion bei Nullmutanten zu einem unkoordinierten Wachstum führten und deshalb *unc(oordinated)*-5, *unc-6* und *unc-40* genannt wurden (Brenner, 1974). Es stellte sich heraus, daß *unc-6* (später Netrin-1) als sezerniertes Leitmolekül wirkt, das an der Leitung und Migration von Zellen und Axonen beteiligt ist, während *unc-5* und *unc-40* seine Rezeptoren darstellen (Hedgecock et al., 1990, Ishii et al., 1992, Wadsworth et al., 1996, Hedgecock & Norris, 1997). Netrin kann eine attraktive Wirkung möglicherweise über eine zu Laminin, einem wachstumsstimulierenden Protein der Zellmembran (Tessier-Lavigne & Goodman, 1996), homologe Domäne mit Molekülen der extrazellulären Matrix, mit der Zelloberfläche oder mit Laminin selber interagieren (Serafini et al., 1994). Auch die Netrine haben gleichermaßen attraktive wie auch repulsive Wirkung, die beispielsweise für kommissurale Axone, die im Rückenmark die Mittellinie überqueren, erwiesen wurde. Sowohl in Vertebraten als auch in Invertebraten führen die entlang der Mittellinie exprimierten Netrine als attraktive Signale zunächst zum Überqueren der Mittellinie, sorgen jedoch danach als repulsive Signalgeber dafür, daß die Mittellinie nicht wieder rücküberquert werden kann (Kennedy et al., 1994; Colamarino & Tessier, 1995; Shirasaki et al., 1995).

Die Rezeptoren der Netrine werden in zwei Familien eingeteilt: Zur ersten gehören die *Unc-40/DCC*-Proteine, zur zweiten die Rezeptoren der *unc-5*-Gruppe. Die *DCC*-Gruppe umfaßt *unc-40* in *C.elegans*, *frazzled* in *Drosophila*, sowie *DCC* und *Neogenin* in Vertebraten, bei denen eine Deletion des *DCC*-Gens oder eine

Blockierung der Neogeninwirkung zu einem ähnlichen Phänotyp wie dem der Netrin-1-defizienten Maus mit schweren Defekten in Hirn und Rückenmark führt. Es fehlen die Fasern der hippocampalen Kommissur, sowie der Balken, und ferner ist die Anzahl der kommissuralen Axone, die die Bodenplatte im Rückenmark erreichen, stark reduziert (Serafini et al., 1996; Fazeli et al., 1997). Auch für die Steuerung der Wirkung von Netrin existiert möglicherweise ein molekularer Schalter, die Proteinkinase A (PKA), die die zytosolische cAMP-Konzentration und den Calciumspiegel beeinflusst. Inhibition der PKA konvertiert den attraktiven Effekt von Netrin-1, aber auch von BDNF, NGF und ACh in eine Hemmung des Wachstums, hingegen kann der wachstumshemmende Effekt von Myelin-assoziiertem Glycoprotein (MAG) durch Aktivierung der PKA in eine positive Beeinflussung des Auswachsverhaltens von Neuriten umgekehrt werden (Song & Poo, 1999). Die Modulationsfähigkeit des Netrin-Rezeptors DCC durch Aktivität von Metalloproteasen (Galko & Tessier-Lavigne, 2000) und unterschiedlich hohe Expression auf den auswachsenden Axonen (Hiramoto et al., 2000), sowie eine Regulation der Attraktivität durch die repulsiven Slit-Proteine und ihre Rezeptoren Robo (roundabout) als Gegenspieler von Netrinen bewirken ein feines Gleichgewicht bei der Bildung von Projektionen.

Zwischen den Entwicklungstagen E19 und P8 ist Netrin-1 auf commissuralen Fasern des Hippocampus gefunden worden (Steup et al., 2000), während der Rezeptor DCC in der Zielregion dieser Fasern exprimiert wird. Funktionelle Studien lassen eine attraktive Wirkung von Netrin-1 auf die commissuralen, hilären und die Neuriten der CA3-Region vermuten. Netrin-1 defiziente Tiere zeigen eine defekte hippocampale Formation, was diese Hypothese weiter unterstreicht (Serafini et al., 1996).

### **1.3.3 Slits and Robo**

Die Mitglieder der Slit-Familie, Slit-1, -2 und -3, beeinflussen alle wichtigen physiologischen Prozesse in der Entwicklung des Nervensystems, wie axonale Wegfindung (Bagri et al., 2002; Fricke et al., 2001; Plump et al., 2002), Verzweigung der Nervenfortsätze (Wang et al., 1999; Whitford et al., 2002) und neuronale Zellmigration (Hu, 1999; Kramer et al., 2001; Wu et al., 2001). In *Drosophila melanogaster* wurden Slits als Navigatoren der commissuralen Fasern des Rückenmarks bei der Kreuzung der Mittellinie und insbesondere als

Verhinderer des ungeordneten Rückkreuzens beschrieben (Kidd et al., 1999; Rajagopalan et al., 2000; Simpson et al., 2000), kürzlich auch die Rolle bei der Kompartimentierung des visuellen Systems (Tayler et al., 2004). In Vertebraten konnte die teilweise überlappende Funktion der Slit-Moleküle am Beispiel einer Slit-defizienten Maus, deren kommissurale Fasern die Mittellinie nicht überquerten oder wieder zurückkreuzten (Long et al., 2004), sowie anhand von Mäusen, denen jeweils nur ein Slit-Protein fehlte und die eine stark alterierte Organisation der optischen Projektion, sowie des Corpus callosum und der thalamocortikalen Bahnen aufwiesen (Bagri et al., 2002; Nguyen-Ba-Charvet et al., 2002), näher charakterisiert werden (Plump et al., 2002).

Die Rezeptoren der Slit-Proteine, transmembranäre Robo-Rezeptoren (Robo-1, -2, -3 und -4), vermitteln neueren Studien zufolge nicht nur deren repulsiven Effekt, sondern interagieren auch mit Teilen der Netrin-Rezeptor-Komplexe (Yu et al., 2002). Dies stellt ein Beispiel für die Beeinflussung der Wachstumskolben durch heteromultimere Komplexe dar (Huber et al., 2003). Slit und Robo können gemeinsam mit den Rezeptoren hinsichtlich der attraktiven Netrinwirkung interagieren und so die wachstumsstimulierende Wirkung der Netrine verhindern (Stein & Tessier-Lavigne, 2001). Auch die Signaltransduktion der Slit/Robo-Gruppe funktioniert vermittelt Rho-GTPasen (Wong et al., 2002) und beinhaltet eine "downregulation" von Cdc42. An Hinterwurzelganglienzellen von Vertebraten konnte *in vitro* eine Regulierung der Slit-Wirkung durch die Konzentration zyklischen GMPs gezeigt werden (Nguyen-Ba-Charvet et al., 1999), wodurch sich eine weitere Gemeinsamkeit in der Modulation der Slit-Signale mit der von anderen Leitmolekülen ergibt.

Slit-1 und -2 werden auf Neuronen des entorhinalen Cortex exprimiert, während eine Lokalisation der Rezeptoren Robo-1 und -2 im Hippocampus auf Cajal-Retzius-Zellen gezeigt werden konnte (Nguyen-Ba-Charvet et al., 2002). Diese Konstellation spricht für eine Mitwirkung dieser Leitmoleküle an der Organisation, bzw. der Zielfindung, Innervation und Synapsenbildung in den Molekularschichten des Gyrus dentatus.

#### **1.3.4 Ephrine**

Ephrine und ihre Rezeptoren, die Eph-Tyrosinkinase, werden in zwei Subklassen durch ihre unterschiedliche Verankerung in der Zellmembran unterteilt: Die ephA-

Rezeptoren (EphA1-EphA8) gehören zur Ephrin-A Gruppe (ephrinA1-EphrinA5), in der alle mit einem GPI-Anker an der Membran befestigt sind, während die transmembranäre Ephrin-B Gruppe (ephrinB1-ephrinB3) an ephB-Rezeptoren EphB1-EphB6 bindet (Cuthford & Harrison, 2002). Ephrine spielen nicht nur in der Entwicklung von axonalen Verbindungen, sondern auch bei der Gefäßbildung, Formation von Gewebegrenzen und vor allem in der Regeneration (Knoll & Drescher, 2002) eine Rolle.

Im Hippocampus wird EphA5 eine Funktion beim Einwachsen der hippocampalen Fasern in das laterale septale Gebiet durch Interaktion mit ephrin-A1, -A3 und -A5 zugeschrieben (Mori et al., 1995; Zhang et al., 1997; Stein et al., 1999). Funktionelle Studien konnten für ephrin-A3 einen repulsiven Effekt auf entorhinale Neuriten in vitro zeigen, der bei der spezifischen Termination der Axone des Tractus perforans auf Fasern der äußeren Molekularschicht beteiligt sein könnte.

Den durchweg membranständigen Ephrinen ist gemeinsam, daß ihr Effekt kontaktabhängig vermittelt wird, jedoch sowohl auf die Rezeptor- als auch auf die Liganden-exprimierende Zelle wirkt, was als vorwärts- und rückwärts-Signalgebung bezeichnet wird (Kullander & Klein, 2002). Auch die Ephrine bedienen sich bei ihrer Signaltransduktion der Rho-GTPasen: Über einen neuartigen und Ephrin-spezifischen guanine nukleotide-exchanging-factor (GEF), Ephexin (Eph-interacting exchange factor), kommt es zu einer Aktivierung von RhoA und dessen Effektor ROCK. Gleichzeitig kommt es zu einer Inaktivierung von Rac (Wahl et al., 2000) und damit zur Wirkung auf das Zytoskelett des Wachstumskolbens. Ein zweiter Effektorweg der Ephrine, der zur Retraktion des Neuriten führt, ist die Hemmung der GTPase Ras durch EphrinB2 und darüber eine Inaktivierung des MAPK-Signalwegs (Elowe et al., 2001; Miao et al., 2001).

### **1.3.5 Rezeptor-Protein-Tyrosinphosphatasen (RPTPs)**

Tyrosinphosphatasen wirken bei einer Vielzahl wichtiger Entwicklungsschritte des Immun- und Nervensystems, der Zelladhäsion und Zellmigration von Invertebraten und Vertebraten mit: Der verantwortliche Mechanismus der Interaktion zwischen Liganden und Rezeptoren ist jedoch bisher weitgehend ungeklärt. Es wird angenommen, daß die in Säugetieren gefundenen Proteine RTPT $\delta$ , RTPT $\kappa$  und RTPT $\mu$  (Burden-Gulley et al., 2002, Drosopoulos et al., 1999; Sun et al., 2000; Wang & Bixby, 1999) sowohl über den membrangebundenen Liganden Contactin

(Peles et al., 1998; Zeng et al., 1999), als auch über die Zytokine Midkine und Pleiotrophin (Maeda et al., 1999; Maeda & Noda, 1998) diverse Neuronenpopulationen während der Entwicklung beeinflussen. In *C. elegans* wurde das Zusammenspiel von attraktivem Netrin-1 und repulsivem Slit-1 bei der Überkreuzung der Mittellinie von commissuralen Neuriten mit einer Wirkung von RPTPs in Zusammenhang gebracht (Chang et al., 2004), und es konnte gezeigt werden, daß hier Tyrosinkinasen und -phosphatasen einen antagonisierenden Effekt ausüben. Für *Drosophila melanogaster* konnte ein relevantes RPTP-Gen für die Faszikulation und Defaszikulation von Axonen gefunden werden (67 T-L+G).

### **1.3.6 Neurotrophine**

Die Funktion der Neurotrophine (NGF, BDNF, NT-3 und NT-4) *in vivo* als Modulatoren von neuronalem Überleben, Wachsen und Regenerieren ist ausführlich untersucht worden (Huang & Reichardt, 2001; Sofroniew et al., 2001). Auch konnte *in vitro* ein spezifischer attraktiver und wachstumsfördernder Effekt von NGF auf Wachstumskolben von sensorischen Neuronen im Huhn bewiesen werden (Gallo et al., 1997). Die wichtigsten Neurotrophinrezeptoren gehören zur Familie der Tyrosinkinasen (TrkA), die typischerweise ligandenabhängig dimerisiert werden und deren intrazelluläre Domäne dann durch Rekrutierung von SH2- und PTB-enhaltenden Effektor- und Adapterproteinen das Actinskelett der Zelle beeinflusst. Die Aktivierung des MAPK-Wegs und des P13K-Wegs vermittelt die wachstums- und überlebensfördernde Wirkung der Neurotrophine, beeinflusst jedoch offenbar über eine Aktivierung von Rac und Inaktivierung von RhoA auch das Zytoskelett (Nusser et al., 2002). Letztlich konnte auch für die Neurotrophine gezeigt werden, daß durch eine verminderte Konzentration von zyklischen Nukleotiden die attraktive Wirkung in eine repulsive konvertiert wird (Song et al., 1997). Zusätzlich modulieren die Neurotrophine das Verhalten von Neuriten gegenüber anderen Leitmolekülen, wie Semaphorin Sema3A, durch höhere Resistenz gegenüber dessen hemmender Wirkung unter Einfluß von NGF (Dontchev & Letourneau, 2002), während BDNF die Sensibilität gegenüber Sema3A erhöht (Tuttle & O'Leary, 1998).

### **1.3.7 Zelladhäsions-Rezeptoren**

Rezeptormoleküle, die die Adhäsion von Zellen via Liganden auf deren Oberfläche oder in der extrazellulären Matrix vermitteln, gehören zur Superfamilie der

Immunglobuline und lassen sich aufgrund der enthaltenen Ig-Domänen in die Gruppe der neuronalen Zelladhäsionsmoleküle (NCAMs, neural cell-adhesion molecules), der Cadherine (calcium dependent adherent receptors) und Integrine unterscheiden (Brummendorf & Rathjen, 1995; Ranscht, 2000; Stevens & Jacobs, 2002). Den Zelladhäsionsmolekülen ist gemein, daß sie intrazellulär zu einer Aktivierung des MAPK-Signalwegs führen. Es zeigt sich jedoch auch eine Signaltransduktion über Rho-GTPasen (Huber et al., 2003). Eine Besonderheit der Cadherine stellt ihre direkte Verbindung zum Actinskelett über bestimmte intrazelluläre Proteine, die Catenine, dar, mit denen sie einen Komplex bilden (Gumbiner, 2000) und auf diese Weise die Stärke der Adhäsion beeinflussen. Auch die Wirkung der Zelladhäsionsrezeptoren wird über bestimmte, zum Teil von anderen Leitmolekülen bekannte Wirkmechanismen gesteuert: GTPasen der Ras-Familie regulieren beispielsweise die Affinität der Rezeptoren hinsichtlich ihrer Liganden (Parise et al., 2000). Die Anzahl der Ligandenmoleküle auf der Zelloberfläche kann an der Spitze des Wachstumskolbens hochreguliert werden, was in einer asymmetrischen Distribution entlang des sich vorschiebenden Neuriten resultiert, wodurch die Vorwärtsbewegung kontrolliert wird (Kamiguchi & Lemmon, 2000).

### **1.3.8 ECM-Moleküle und Metalloproteasen**

Viele der extrazellulären Matrix Moleküle (ECM, extracellular matrix molecules), wie zum Beispiel die Familien der Laminine, Tenascine, Collagene und Thrombospondine, sowie der Fibronectine, Vitronectine und einige Proteoglycane, können axonales Wachstum sowohl fördern als auch hemmen (Lander, 1987; Bixby & Harris, 1991; Hynes & Lander, 1992). Ihre Rezeptoren sind vorwiegend Integrine, Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie (Grumet et al., 1993; Pesheva et al., 1993; Reichardt & Tomaselli, 1991). Die aus all diesen Faktoren bestehende extrazelluläre Matrix macht ungefähr 20% der Gehirnmasse des erwachsenen Gehirns aus und ca. doppelt soviel im sich entwickelnden Gehirn (Nicholson & Sykova, 1998). Sie stellt damit eine essentielle Basis für das Auswachsen von Neuriten, die synaptische Übertragung und Diffusion von Ionen dar, die gleichzeitig durch Änderungen der Komposition der ECM beeinflusst werden können (Min et al, 1998; Kullmann et al, 1999). Die physikalischen Parameter des extrazellulären Raums werden auch in pathologischen Zuständen des Hirns und nach traumatischen Ereignissen geändert, wie zum Beispiel bei der

Alzheimerschen Erkrankung und nach Läsion (Sykova et al., 2000). Eine Hochregulation der Chondroitinsulfat-Proteoglykane bewirkt eine Restriktion der neuronalen Regeneration nach axonaler Läsion und glialer Narbenbildung (Zuo et al., 1998; Morgenstern et al., 2002; Properzi et al., 2003). Folglich kommt den Molekülen der extrazellulären Matrix eine Bedeutung in der aktivitätsgesteuerten Regulation physiologischer Prozesse zu, die nicht nur die Entwicklung, sondern auch die Regeneration betreffen.

Eine Regulationsmöglichkeit der Komposition der ECM ist die Degradierung der Moleküle durch Matrix-Metalloproteasen (MMPs). Diese fördern durch Steigerung der Durchlässigkeit des Extrazellulärraums die neurale Migration, Wachstum und Reparationsvorgänge (Shapiro, 1998). Den Metalloproteasen wird im hippocampalen System eine Bedeutung vor allem bei der Veränderung von Regenerationsvorgängen, wie etwa dem sogenannten "sprouting" nach axonaler Läsion, zugesprochen, die durch eine Inhibition der Proteasen positiv beeinflusst werden können (Reeves et al., 2003). Die molekularen Mechanismen dieser Vorgänge sind weitgehend noch unbekannt.

Im Hippocampus spielt das von den Cajal-Retzius-Zellen in die extrazelluläre Matrix sekretierte Protein Reelin eine wichtige Rolle, ist aber nicht allein entscheidend für die korrekte laminäre Anordnung der Schichten im Gyrus dentatus (Del Rio et al., 1997; Borrell et al., 1999; Deller et al., 1999). Es konnte gezeigt werden, daß Hyaluronsäure in der ECM eine Rolle bei der schichtenspezifischen Anordnung der entorhinalen Fasern im Gyrus dentatus spielt. Wird ihre Wirkung durch Hyaluronidase-Behandlung aufgehoben, führt dies zu einer falschen Ausprägung der entorhinalen Projektion, nicht aber der commissuralen Fasern in vitro (Förster et al., 2001; Zhao et al., 2003). Weitere Moleküle der extrazellulären Matrix, wie zum Beispiel das Chondroitinsulfat-Proteoglykan Te 38, bewirken auch über den Rho/ROCK Signalweg die Retraktion des Zytoskeletts in Wachstumskolben und können so zu einem verminderten Auswachsen von Neuriten in Narbengewebe nach Läsionen des ZNS führen (Monnier et al., 2003).

### **1.3.9 Myelin-assoziierte Inhibitoren**

Wachstumsinhibitorische Signale verhindern das ungerichtete Auswachsen von Neuriten in der Entwicklung und während erneutem Aussprossen von Axonen

nach Verletzung und Zerstörung von Nervenfasern. Diese mit Myelin aus Nervenscheiden und Oligodendrozyten assoziierten Faktoren üben sowohl während der Entwicklung als auch im reifen Nervensystem ihre Wirkung über spezifische Rezeptoren aus. Bisher sind für MAG (myelin-associated glycoprotein), NogoA und OMgp (oligodendrocyte-myelin glycoprotein) Rezeptoren und Mechanismus der inhibitorischen Wirkung als auch Hinweise auf ihre Rolle als Wegweiser und Wachstumsfaktoren von Neuriten in der Entwicklung bekannt. MAG ist ein bifunktionelles Molekül, das während der Entwicklung das Auswachsen von Neuriten fördert. Postnatal kehrt sich dieser Einfluß in Korrelation mit vermindertem cAMP-Spiegel in der Zelle (Cai et al., 2001) in einen wachstumshemmenden Effekt um (McKerracher et al., 1994; Mukhopadhyay et al., 1994; DeBellard et al., 1996). Erhöht man die cAMP-Konzentration mittels Neurotrophinen oder elektrischer Stimulation, kann dieser inhibitorische Effekt eingeschränkt werden, und es kommt zu einem verbesserten Aussprossen von Fasern nach einer Verletzung des zentralen Nervensystems (Cai et al., 1999; Ming et al., 2001; Neumann et al., 2002). Die Nogo-Wirkung wird über den Nogo-Rezeptor (NgR) vermittelt, an den jedoch auch die beiden anderen Myelin-assoziierten Proteine binden, so daß sich hier ein möglicher gemeinsamer Signaltransduktionsweg aufbaut (Domeniconi et al., 2002; Liu et al., 2002; Wang et al., 2002c). Wang et al. konnten mit p75 eine intrazelluläre Komponente identifizieren, die die inhibitorischen Effekte vermittelt, und zeigen, daß auswachsende Fasern in p75-defizienten Mäusen nicht auf die inhibitorischen Signale der Myelin-assoziierten Moleküle reagieren (Wang et al., 2002b). p75 scheint also als Teil des Rezeptorkomplexes sowohl der Neurotrophine als auch von inhibitorischen Liganden ein wichtiger Schaltmechanismus zwischen wachstumsfördernden und hemmenden Prozessen zu sein, je nachdem, ob es allein oder NgR-gebunden vorliegt. Auch hier spielt als Endstrecke die RhoA-Aktivität eine entscheidende Rolle, denn durch ihre medikamentöse Inaktivierung kann der Myelin-assoziierte inhibitorische Effekt ebenfalls unterbunden werden (Bandtlow & Schwab, 2000; Lehmann et al., 1999).

Zusammenfassend erscheint es in Zukunft wichtig, weitere Leitmoleküle und ihre Rezeptoren zu identifizieren und zu charakterisieren, da die neuronale Wegfindung offenbar meist gleichzeitig von unterschiedlichen Molekülen gelenkt wird. Diese Redundanz führt dazu, daß die Ausschaltung einzelner Faktoren oft

nicht zum Ausfall oder Defekt in der Entwicklung führt. Im Hinblick auf die Wichtigkeit richtiger neuronaler Konnektionen für das Funktionieren eines Organismus scheint dies ein sinnvoller Mechanismus. Die Expression vieler Leitmoleküle auch im adulten Hirn und ihre Hochregulation nach Läsion während der Regenerationsphase verdeutlichen den Zusammenhang beider Vorgänge.

#### 1.4 Die zeitliche und örtliche Entwicklung des Hippocampus

Der Hippocampus ist im Großhirn des Menschen eine komplex vernetzte Struktur durch seine Verbindung mit Kerngebieten aus dem entorhinalen Cortex, dem contralateralen Hippocampus und dem Septum, deren afferente Fasertrakte in charakteristischen Laminae im Cornu ammonis und dem Gyrus dentatus enden. Extrinsische und intrinsische Projektionen terminieren im Hippocampus in einer nicht überlappenden Art und Weise in spezifischen Schichten.

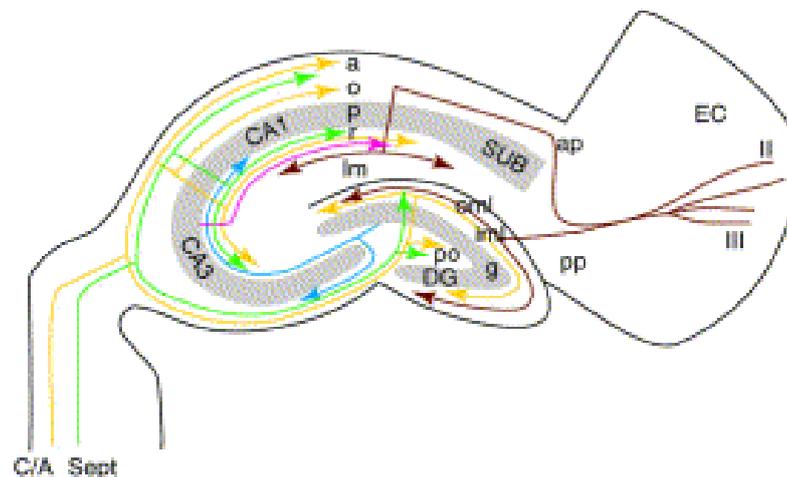


Abb. 3: Die intrinsischen und extrinsischen afferenten Konnektionen nach Skutella & Nitsch, *New Molecules for hippocampal development*, 2001 in Trends Neuroscience. C/A: commissurale/assoziative Fasern, Sept: septale Projektion, CA1, CA3: Cornu ammonis Region 1, bzw. 3, DG: Gyrus dentatus, EC II, III: entorhinaler Cortex Region II, bzw. III, SUB: Subikulum, pp: Tractus perforans, ap: Tractus alveus, g: Körnerzellschicht, iml: innere Molekularschicht, oml: äußere Molekularschicht, a: Alveus, o: Stratum oriens, p: Stratum pyramidale, r: Stratum radiatum, Im: Stratum lacunosum moleculare, po: polymorphe Schicht des Hilus.

Die wichtigsten Afferenzen des Hippocampus stellen die Projektionen des entorhinalen Cortex dar: Dieser verbindet benachbarte Strukturen vermittels des sogenannten Tractus alveus und des Tractus perforans. Es handelt sich bei letzterem um ein Bündel von Axonen der Neurone aus der Region II des entorhinalen Cortex, die in der äußeren Molekularschicht des Gyrus dentatus auf den distalen Dendriten der Körnerzellen Synapsen bilden. Fasern aus der Region III projizieren als Tractus alveus auf die proximalen Dendriten ihrer Zielneurone im

Stratum lacunosum moleculare der Region 1 des Cornu ammonis des Hippocampus (Amaral & Witter, 1989). Diese ersten Projektionen beginnen sich relativ früh zu entwickeln und zwar ab dem Tag 16 der embryonalen Entwicklung in Maus und Ratte. Zwischen dem 19. Entwicklungstag und dem postnatalen Stadium P2 verdichtet sich die Terminationszone der entorhinalen Fasern zunehmend, während sich die Axone aus der Region II im Hilus und Subiculum verzweigen. Zwischen P1 und P5 bildet sich die entorhinale Projektion in die äußere Molekularschicht endgültig aus. Ihre ersten, sich schon vorher bildenden Zielzellen im Gyrus dentatus sind die Cajal-Retzius-Zellen, die etwa ab dem embryonalen Entwicklungstag 17 vorhanden sind und sich später wieder zurückbilden. Ihre Ablation verhindert das Einwachsen der entorhinalen Fasern in die äußere Molekularschicht und führt zu einem Fehlen der entorhinalen Projektion in Mäusen, bei denen die Cajal-Retzius-Zellen blockiert wurden (Borrell et al., 1999). Die Cajal-Retzius-Zellen wirken jedoch nicht nur als primäre Zielneurone für die entorhinalen Fasern, sie sekretieren auch den Faktor Reelin in die extrazelluläre Matrix. Reelin hat auf die entorhinalen Fasern eine attraktive Wirkung, der der Verbleib der Axone in ihrer korrekten Terminierungsschicht zugeschrieben wird. Allerdings führt ein Fehlen von Reelin, wie in der Reeler-Maus, nicht zu einer gestörten Projektion des Tractus perforans (Förster et al., 1999), so daß hier weitere Faktoren eine Rolle spielen müssen.

Eine weitere Afferenz des Hippocampus besteht aus den GABAergen und cholinergen Fasern aus dem medialen Septum und dem diagonalen Band (Freund & Antal, 1988; Szeide mann et al., 1995), die ab dem 16. Entwicklungstag in den Hippocampus einwachsen. Die cholinergen Fasern terminieren hier speziell auf den Pyramidenzellen der CA1-Region und den Körnerzellen des Gyrus dentatus, die GABAergen auf Interneuronen im Stratum oriens des Hippocampus (Frotscher & Leranth, 1985, 1986). Die wichtige Rolle der Semaphorine hier wird durch eine starke Expression ihrer Rezeptoren Neuropilin-1 und Neuropilin-2 auf den septohippocampalen Fasern, sowie durch die Sekretion der entsprechenden Semaphorine auf den jeweiligen Zielzellen bestätigt (Pascual et al., 2005).

Die dritte extrinsische Afferenz des Hippocampus stellen die commissuralen Fasern, häufig als commissurale/assoziative Projektion bezeichnet, die dem contralateralen Hippocampus entspringen, dar. Diese Fasern legen unter

Kreuzung der Mittellinie einen komplizierten Weg zurück, bevor sie letztlich ihr Ziel, die innere Molekularschicht des Gyrus dentatus, erreichen. Auch Axone von Neuronen aus der Region II des entorhinalen Cortex wachsen in die innere Molekularschicht oberhalb der Pyramiden- und Körnerzellschicht des contralateralen Hippocampus ein, wo sie auf deren proximalen Dendriten terminieren. 1993 konnte von Heimrich und Frotscher an einem Modell zur in vitro-Nachstellung der Vorgänge in der Entwicklung, den entorhino-hippocampalen Co- oder sogar Triplet-Kulturen, nachgewiesen werden, daß das richtige Einwachsen commissuraler und entorhinaler Fasern in die Molekularschichten nicht abhängig von einer korrekten zeitlichen Sequenz ist, sondern auch funktioniert, wenn sich die entorhinale Projektion beispielsweise schon gebildet hat. Dies spricht für die Existenz von zeitunabhängigen oder auch zu späteren Entwicklungsstadien exprimierten Leitmolekülen (Heimrich und Frotscher, 1993).

Intrahippocampale Projektionen existieren jeweils zwischen der CA3-Region und den Körnerzellen als assoziative Fasern, zwischen CA3 und CA1 als Schaffer-Kollateralen und zwischen hilären Neuronen des Gyrus dentatus und der CA3-Region als Moosfasern (Amaral & Witter, 1989).

### **1.5 Regeneration im entorhino-hippocampalen System**

Das Verständnis der Entwicklung des Gehirns ist ein wichtiges Ziel der Grundlagenforschung. Es beinhaltet ein Streben nach Verständnis für die Mechanismen, die zur Regeneration und Wiederherstellung einer durch pathologische Prozesse verloren gegangenen Funktion führen. Eine enge Korrelation und das Mitwirken gleicher Strukturen wird angenommen, da beide Prozesse auf der Bildung von funktionellen Verbindungen durch Auswachsen von Nervenfasern sowie Bildung und Aktivität von Synapsen beruhen. Das medizinische Interesse am therapeutischen Nutzen, der durch ein vollständigeres Verständnis der Regeneration, von fördernden und hemmenden Einflüssen und wiederum deren selektiver Beeinflussbarkeit gewonnen werden könnte, ist hoch. Experimentelle Strategien zur Behandlung von akuten Rückenmarksverletzungen beispielsweise basieren auf diversen Angriffspunkten, von denen einer die selektive Hemmung wachstumsinhibierender Proteine ist (Schwab et al., 2004).

Nach einer Verletzung von Hirngewebe und Durchtrennung der afferenten Verbindungen des Hippocampus, die Deafferenzierung und nachfolgend Zelltod

zur Folge hat, versuchen die überlebenden Neurone durch reaktives Sprouting und vermehrte Synaptogenese, verloren gegangene Konnektionen wieder aufzunehmen (Deller & Frotscher, 1997). Der Gyrus dentatus ist eine gut geeignete Formation, um diese Vorgänge genauer zu beleuchten, da eine seiner Hauptafferenzen, der Tractus perforans aus dem entorhinalen Cortex, stereotaktisch selektiv lädiert werden kann und weil seine laminäre Schichtung eine relativ genaue Beobachtung der Folgevorgänge zulässt: Die entorhinale Cortexläsion führt zu einer Degeneration entorhinaler Fasern in deren Terminationszonen, dem Stratum lacunosum-moleculare der CA1-Region und der äußeren Molekularschicht des Gyrus dentatus (Lynch et al., 1972), während andere Regionen nicht davon betroffen sind (Kwidzinski et al., 2003). Extensive Studien über die Vorgänge an Synapsen nicht nur in der deafferenzierten Zone, sondern auch auf Dendriten nicht direkt betroffener Zellen und im contralateralen Hippocampus, beschreiben transneuronalen Zelltod (Kovac et al., 2003), den Abbau und Ersatz von Synapsen und schließlich ein erneutes Aussprossen von Fasern in der Phase der Regeneration (Kelley & Steward, 1997; Frotscher et al., 1997).

Es wurde gezeigt, dass Neurotrophine (Fagan et al., 1997; Lee et al., 1997), Zytokine (Nichols et al., 1991), Zelladhäsionsmoleküle (Cremer et al., 1997; Aubert et al., 1998) und neuronale Wachstums-assoziierte Faktoren (Maslah et al., 1991) an diesen Vorgängen beteiligt sind, wobei die Gewichtung noch Gegenstand der Forschung bleibt, während sich immer stärker herauskristallisiert, dass vergleichbare Mechanismen wie während der Entwicklung aktiv sind (Savaskan et al., 2000). Die Tatsache, dass die wiederaussprossenden Fasern im deafferenzierten Gyrus dentatus ihre strenge Schichtenspezifität im Co-Kultur-Modell und in vivo beibehalten (Deller et al., 1995; Frotscher & Heimrich, 1993), spricht für die Existenz von spezifischeren Faktoren als den oben genannten.

Eine Reihe von Leitmolekülen wird auch im adulten Hirn weiter in geringerem Maße exprimiert, wie zum Beispiel Sema3A und dessen Rezeptor Neuropilin-1: Im intakten Bulbus olfactorius werden weiterhin beide Moleküle in zueinander passender Weise gebildet und bewirken möglicherweise eine Restriktion der auswachsenden Fasern auf das richtige Terminierungsfeld, bzw. den Bulbus olfactorius (Gavazzi, 2001). Auch die Schwannschen Zellen regenerierender

Motoneurone im peripheren Nervensystem exprimieren nach einer Läsion wieder vermehrt Sema3A (De Winter et al., 2002), was als ein Stop-Signal für das überschießende Wiederaussprossen interpretiert werden kann.

Erstaunlich an der Regeneration im Hippocampus ist die Beibehaltung der schichtenspezifischen Endigung der Fasern: Die intakten Fasern aus dem entorhinalen Cortex bilden neue Synapsen und sprießen vermehrt in der äußeren Molekularschicht, weiterhin auch einige commissurale/assoziative Fasern, sowie wenige Axone aus dem contralateralen entorhinalen Cortex, die dort enden. Die hauptsächliche commissurale/assoziative Projektion bildet im Zuge der Anpassungs- und Regenerationsprozesse mehr Synapsen und die innere Molekularschicht verbreitert sich, wobei die Axone jedoch weiterhin sehr genau nur in ihrer Schicht terminieren. Moleküle der extrazellulären Matrix, die an dieser Ordnung auch während der frühen Entwicklung beteiligt sind, sollen für eine Retention der commissuralen/assoziativen Fasern in ihrer Terminationszone verantwortlich sein (Deller et al., 2000). Es fragt sich jedoch, ob auch die anderen an der Bildung der entorhinalen und commissuralen Projektion beteiligten Leitmoleküle eine Rolle spielen und ob eine Hierarchie von wichtigen und zunächst zusätzlichen Faktoren existiert.

## 1.6 Das Repulsive Guidance Molecule RGM

Erstmals beschrieben als ein Protein von 33kD Größe (Müller et a., 1996), das auf temporale, retinale Axone im Huhn abstoßend wirkt, konnten die Eigenschaften und Effekte von RGM im Jahr 2002 ausführlicher dargelegt werden (Monnier et al., 2002): Es handelt sich um ein GPI-geankertes Protein ohne Sequenzhomologie zu anderen bekannten Leitmolekülen.

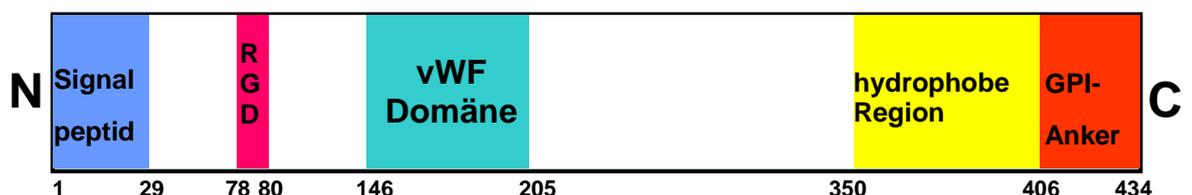


Abb. 4: Schema des Aufbaus von RGMa. N: N-Terminus, C: C-Terminus

Mit einem N-terminalen Signalpeptid und dem C-terminalen GPI-Anker besitzt es zwei hydrophobe Domänen. Zusätzlich gibt es eine partiell von Willebrandt-Faktor-ähnliche Domäne und einen RGD-Anteil, der für Zelladhäsion verantwortlich sein könnte (Abb. 4). Es leitet nur temporale, nicht aber nasale retinale Axone aus dem

Hühnertectum in vitro als ein repulsiver Faktor, der das Einwachsen von temporalen Fasern in das posteriore optische Tectum verhindert. In Mäusen zeigen sich drei unterschiedliche Formen von RGM: RGMa, RGMb und RGMc, von denen Maus-RGMa zu 80% identisch mit Huhn-RGM ist, während die beiden anderen Proteine dazu 41 - 49%ig gleiche und 55 - 61%ig ähnliche Aminosäuresequenzen aufweisen (Schmidtmer & Engelkamp, 2004).

Für alle drei RGMs wurde die Expression in perinatalen Entwicklungsstadien der Maus auf Unterschiede in Distributionsmustern und exprimierenden Geweben untersucht (Oldekamp et al., 2004). Nervale Strukturen in Gehirn und Rückenmark, aber auch Lungengewebe zeigten RGMa-mRNA. Die genauere Lokalisation gelang hier im Hippocampus auf Neuronen des Cornu ammonis, im Hilus und Gyrus dentatus, sowie im Septum, dem ventrikulären Neuroepithel und den Bulbi olfactorii. Dahingegen zeigte RGMb ein anderes Expressionsmuster und war ubiquitär im Cortex lokalisiert, die stärksten Signale fanden sich jedoch im ventralen Thalamus und im Striatum, weiterhin im Septum und im Rückenmark. Die ventrikuläre Zone, von wo aus neuroepitheliales Wachstum ausgeht, war hingegen frei von RGMb-mRNA. Postnatal änderte sich die Expression dahingehend, dass jetzt RGMb-Expression vorwiegend in den Schichten 1 und 5 des Cortex zu finden war. Genauer betrachtet fand sich auch ein Signal in der CA3-Region des Hippocampus, im Stratum oriens und Hilus, nicht jedoch im Gyrus dentatus. Die Expression von RGMc-mRNA, das 55% der Aminosäuren mit RGMa gemein hat, beschränkte sich exklusiv auf alle gestreiften Muskelzellen inklusive dem Myokard (Oldekamp et al., 2004).

Als ein Rezeptor von RGM im retino-tectalen System des Huhns wurde Neogenin, einer der Rezeptoren von Netrinen, beschrieben (Rajagopalan et al., 2004). Die Bindung des Liganden an Neogenin induziert Apoptose. Bindungsstudien mit einem cRGM-AP Fusionsprotein ergaben unter 480 000 getesteten Klonen nur die hohe Affinität ( $K_d$  von ca. 230pM) des Proteins mit Maus-Neogenin. Gereinigtes Neogenin kann die Funktion von RGM in vitro aufheben, was für eine funktionelle, weil blockierende, Bindung von Ligand und Rezeptor spricht. Da Netrin und RGM keinerlei Homologien der Proteine oder des Aufbaus zeigen, wird eine Bindung an unterschiedlichen Stellen des Rezeptors angenommen, die mutmaßlich entweder synergistische oder antagonistische Effekte haben könnte. Andere Rezeptoren für

Netrine, wie DCC, UNC5H1 oder UNC5H3, zeigten keine Affinität zu dem RGM-Fusionsprotein (Rajagopalan et al, 2004).

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass RGMA außerdem eine Wirkung auf den Zellzyklus von Neuronen hat, indem es durch Bindung an Neogenin dessen Apoptose-induzierende Wirkung verhindert (Matsunaga et al., 2004). Die durch Neogenin ausgelöste Kaskade könnte aufgrund einer hemmenden Wirkung von RGM auf bestimmte Caspasen unterbrochen werden. Die Expression sowohl von RGMA als auch von Neogenin während der frühen Entwicklung in der ventrikulären Zone, bzw. der luminären Seite des Neuralrohrs, spricht für eine Rolle von RGMA als einer der Faktoren, die das Überleben von Neuronen in dieser Formation positiv beeinflusst. Dies erklärt auch, warum RGMA defiziente Mäuse einen defekten Verschluss des Neuralrohrs in der Entwicklung zeigen. Es gibt jedoch keine offensichtlichen, morphologischen Störungen des axonalen Wachstums und der retino-tektalen Projektion in der transgenen Maus (Niederkofler et al., 2004).

## 1.7 Aufgabenstellung

Das Repulsive Guidance Molecule RGM wurde im visuellen, tectalen System von Hühnern als ein repulsiver und wachstumshemmender Faktor charakterisiert. Aufgrund des Distributionsmusters von RGM lag eine weitreichendere Funktion des Moleküls auch in anderen Systemen nahe. Die Existenz des Proteins auch im ZNS von Nagetieren bestätigte die Annahme, dass es sich um ein in der Ontogenese weitergegebenes Molekül handelt, welches auch in menschlichen Geweben vorhanden sein sollte. Eine genaue Kenntnis der Expression und Funktion von Leitmolekülen ist im vorher genannten Kontext der zukünftig möglichen Einflussnahme und therapeutischen Nutzung sinnvoll.

Der vorliegenden Arbeit sind folgende Aufgaben zu Grunde gelegt:

1. Die Expression und das Distributionsmuster von RGMa im entorhino-hippocampalen System in den Entwicklungsstadien und während regenerativer Prozesse zu erarbeiten.
2. Den Nachweis der Funktion von RGMa als repulsives Leitmolekül auch im zentralen Nervensystem von Nagetieren zu erbringen.
3. Die Rolle von Wachstumsinhibition und repulsiver Aktivität durch RGMa in der Entwicklung von afferenten Konnektionen in den Hippocampus und entorhinalen Cortex zu verdeutlichen.
4. Eine mögliche Mitwirkung von RGMa im adulten ZNS an regenerativen Prozessen nach entorhinaler Cortexläsion nachzuweisen.