

## **4 DISKUSSION**

Viele verschiedene Leitmoleküle kontrollieren die Entwicklung des Hippocampus. In dieser Studie konnte gezeigt werden, daß als neuer Faktor das Repulsive Guidance Molecule (RGMa) eine Rolle bei der Zielfindung von afferenten Projektionen in den Gyrus dentatus spielt und möglicherweise auch an regenerativen Prozessen nach Läsion des Tractus perforans beteiligt ist. Um diese Rolle im Zusammenhang mit den bisher gefundenen Leitmolekülen im Hippocampus näher zu betrachten und zu charakterisieren, sollen die folgenden Fragen diskutiert werden:

1. Welche Funktion hat RGMa während der Entwicklung?
2. Welche Rolle hat RGMa im Zusammenspiel mit anderen Leitmolekülen?
3. Hat RGMa eine Bedeutung für Regenerationsprozesse im ZNS?

### **4.1 Welche Funktion hat RGMa während der Entwicklung?**

Die Funktion von RGMa als abstossendes Wegweiser-molekül auf entorhinale Axone, die in den Gyrus dentatus projizieren, kann aufgrund der in dieser Arbeit gefundenen zeitlichen und örtlichen Distribution, der Funktion in vitro und der Befunde bei Ausfall dieser Funktion durch Blockierung dargelegt werden:

#### **4.1.1 Distribution von RGMa im Gyrus dentatus**

In einer Phase, in der sich die entorhinale Projektion in den Gyrus dentatus zum Teil schon gebildet hat – am Tag E17 der Entwicklung - wird RGMa zuerst in der hippocampalen Formation präsentiert. Die starke Expression von RGMa-mRNA auf Hilusneuronen und in der Pyramidenzellschicht ab dem 18. Entwicklungstag und in der inneren Molekularschicht des Gyrus dentatus in postnatalen Entwicklungsstadien spricht für eine Mitwirkung dieses repulsiven Leitmoleküls an der Zielfindung von entorhinalen und commissuralen/assoziativen Fasern, die den Hippocampus jeweils mit dem entorhinalen Cortex und dem contralateralen Hippocampus verbinden. Das Distributionsmuster von RGMa-mRNA beweist eine Expression auf den Fortsätzen der hilären Neurone, den Moosfasern und auf den commissuralen/assoziativen Fasern, aus denen sich die innere Molekularschicht hauptsächlich zusammensetzt.

Die Immunhistochemie belegt diese Lokalisation durch den Nachweis einer

spezifischen Färbung auf den commissuralen/assoziativen Fasern in der inneren Molekularschicht im postnatalen Stadium P1 bis mindestens P7. Zu diesem Zeitpunkt sind die von den hilären Neuronen der Gegenseite ausgehenden commissuralen Fasern in der inneren Molekularschicht angekommen, wobei die entorhinale Projektion schon früher ihr Zielgebiet, die äußere Molekularschicht, erreicht hat. Die perinatale RGMA-Expression auf den Fasern der inneren Molekularschicht kann man also als Barriere für das zu weite Auswachsen der entorhinalen Axone interpretieren.

Auch während der frühen postnatalen Periode waren die hilären Neurone weiter angefärbt, was zusätzlich für eine Mitwirkung des RGMA-Effekts an der Ausbildung der commissuralen Projektion aus dem contralateralen Hippocampus spricht. Auf diese Fasern dürfte RGMA folglich nicht repulsiv wirken, sondern lediglich auf solche, die nicht mit Hilusneuronen verbunden werden sollen. Ein weiterer Ansatz, die Distribution auf hilären Neuronen zu erklären, wäre die Tatsache, daß die Dendriten der Hilusneurone, die Moosfasern, auch in die innere Molekularschicht des Gyrus dentatus projizieren. Eine Distribution von RGMA auf diesen Fortsätzen könnte das Vorhandensein der mRNA auch in den Zellkörpern erklären. Weiterhin zeigte sich eine spezifische Färbung der Pyramidenzellen der Region 1 des Cornu ammonis im Hippocampus, woraus sich schließen läßt, daß RGMA eine repulsive Wirkung möglicherweise auf Fasern der commissuralen oder septalen Projektion entfaltet, die hier ihr Terminierungsgebiet haben. Diese beiden Projektionen haben im Gegensatz zum Tractus perforans kein ebenso streng schichtenspezifisch angeordnetes Gebiet, in dem sie ihre Konnektionen bilden, sondern sie terminieren selektiv auf bestimmten Neuronengruppen, für die bisher nur bewiesen wurde, daß sie durch Sezernieren attraktiver Leitmoleküle die richtige Verbindungsbildung steuern können (Steup et al., 2000).

Im Hippocampus existiert nicht nur eine örtliche Anordnung der Projektionen, sondern auch die zeitliche Aufeinanderfolge der Bildung von afferenten und efferenten Verbindungen erfolgt in einer strukturierten Sequenz: Zunächst wachsen die entorhinalen Axone über die hippocampale Fissur hinweg in den Gyrus dentatus hinein und bilden dort Synapsen auf den Cajal-Retzius-Zellen, die in der Molekularschicht ihre ersten Zielzellen darstellen. Erst in den ersten postnatalen Tagen folgt das Einwachsen der commissuralen und assoziativen

Fasern aus dem contralateralen Hippocampus in die innere Molekularschicht. Da RGMA auf diesen Fasern exprimiert wird und einen repulsiven Effekt auf die entorhinalen Fasern ausübt, läßt sich also sagen, daß die Wirkung von RGMA nicht bei der initialen Bildung der Konnektionen, sondern vielmehr bei der Beibehaltung und korrekten Schichtung der entorhinalen Projektion in ihrem Zielgebiet wahrscheinlich ist. Dies erscheint umso wichtiger, als die Cajal-Retzius-Zellen, die zunächst das Ziel der entorhinalen Fasern darstellen und deren Ablation zu einer fehlerhaften Projektion führt, postnatal verschwinden und es also andere Faktoren sein müssen, die zu Kontinuität und einer Stabilisierung der Verbindungen in diesem Gebiet führen.

Für eine Funktion von RGMA als repulsives Signal für einwachsende entorhinale Axone spricht das in den Rezeptorbindungsstudien gefundene Distributionsmuster: Das Fusionsprotein wird am stärksten in der äußeren Molekularschicht des Gyrus dentatus gebunden. Das bedeutet, daß sich hier auf Fasern der entorhinalen Projektion, die in dieser Schicht terminiert, ein möglicher Wirkort für RGMA befindet. Hinsichtlich des Effekts kann man annehmen, daß Fasern, die einen Rezeptor für RGMA auf ihrer Oberfläche besitzen, von Fasern, die das Protein exprimieren, abgestossen werden. In diesem Fall spricht das Distributionsmuster für eine Wirkung von RGMA auf die entorhinale Projektion in der Weise, daß ein Einwachsen der Fasern in die innere Molekularschicht und durch die Körnerzellschicht hindurch in den Hilus verhindert wird. Die Bindung von Fusionsprotein in leicht geringerem Maße im Stratum lucidum und Stratum radiatum des Hippocampus befürwortet einen Effekt von RGMA auf die dort auch terminierenden entorhinalen Fasern aus der Region II und auf commissurale/assoziative Fasern aus dem contralateralen Hippocampus.

Zusammenfassend kann RGMA nicht für die initiale Ausbildung der entorhinalen Projektion verantwortlich sein, sondern übt vielmehr eine stabilisierende Wirkung auf die Beibehaltung der richtigen Terminationszone entorhinaler Axone in der äußeren Molekularschicht aus. Diese Schlußfolgerung ergibt sich aus der zeitlichen Abfolge und örtlichen Verteilung des RGMA-Proteins im Gyrus dentatus.

#### **4.1.2 RGMA-Effekt auf entorhinale und hippocampale Neuriten**

Im Streifenassay, das als ein gutes Untersuchungsmodell für die Funktion von wegweisenden attraktiven und repulsiven Molekülen bekannt ist (Vielmetter et al.,

1990), stellt sich die repulsive Eigenschaft von RGMa auf entorhinale und leicht vermindert auch auf eine Population hippocampaler Neuriten dar. Die Axone der entorhinalen Cortexexplantate wurden aber nicht nur von RGMa abgestossen, was zu einem Sistieren des Wachstums an der Grenze zwischen RGMa-beschichtetem und RGM-freiem Untergrund und Kollaps von Wachstumskolben führte. Die entorhinalen Explantate zeigten in den Auswachsassays auch ein generell vermindertes Wachstum, sowohl was die Anzahl als auch was die Länge der auswachsenden Axone anbetraf. Dieser Effekt konnte selektiv für entorhinale Explantate nachgewiesen werden und betraf Kontrollexplantate aus anderen Cortexregionen nicht. Dies spricht für eine Wirkung von RGMa nicht nur als Leitmolekül, sondern auch als generell wachstumsinhibierender Faktor, wobei diese beiden Funktionen auch in der Literatur für andere Leitmoleküle (Müller, 1999; Huber et al., 2003) als eng miteinander verbunden und die Wirkungen auf den Wachstumskolben als schwer voneinander zu trennen beschrieben sind.

Ein weiteres Merkmal der RGMa-Wirkung ist die Induktion von Faszikelbildung bei auswachsenden Fasern. Es zeigte sich in den Streifenassays ein entsprechendes Bild mit Faszikulation in den "lanes" ohne RGM, während in den Kontrollen keine Faszikel, sondern vielmehr ein dichter, ungeordneter Rasen von Neuriten zu erkennen war. Da die Ausbildung von Faszikeln als ein wichtiger Mechanismus neuronaler Wegfindung, der vor allem durch repulsive Eigenschaften der Umgebung herbeigeführt werden kann, beschrieben wurde (Tessier-Lavigne & Goodman, 1996), ist hier eine Mitwirkung von RGMa als wichtiges Element der Wirkung anzusehen. Die Analyse der intrazellulären Wirkmechanismen anderer Leitmoleküle ergab in vielen Fällen einen auf gleiche Effektoren, nämlich Signaltransduktion über Rho/ROCK, für die verschiedenen Wirkungen (Huber et al., 2003), so daß dies auch im Fall von RGMa denkbar ist. Beweisgebend wäre eine Aufklärung der Signaltransduktion von RGMa, die jedoch noch aussteht.

#### **4.1.3 Konsequenzen eines RGMa-Wirkverlusts**

Eine funktionelle Unterbrechung und damit der Verlust von RGMa-Wirkung führt *in vitro* zur Ausbildung einer falschen entorhinalen Projektion, die nämlich über ihr eigentliches Zielgebiet hinaus in die innere Molekularschicht oder sogar in den Hilus des Hippocampus einwächst. In zwei Versuchsansätzen konnte sowohl durch Ablösen aller GPI-geankerten Moleküle aus der Zellmembran durch PI-PLC,

was zu einem Verlust von RGMa führt, als auch durch das Blockieren der Wirkung mit einem funktionellen Antikörper gegen RGMa, die Inhibition des Auswachsens von entorhinalen Neuriten, aber auch der repulsive Effekt im Co-Kulturassay unterbunden werden. Die Ergebnisse nach PI-PLC-Behandlung lassen sich also zu einem beträchtlichen Teil auf die Unterbrechung der RGMa-Wirkung zurückführen, da sich unter beiden Behandlungsschemata ein gleiches Bild des überschießenden Auswachsens ergibt. Es zeigt sich in den Co-Kulturen zwar ein Erkennen der richtigen Terminierungszone an einer teilweise korrekten Anordnung der Fasern in der äußeren Molekularschicht, was wohl auf die Wirkung anderer repulsiver oder attraktiver Faktoren zurückgeführt werden kann. Aberrante Fasern werden jedoch nach Behandlung mit RGMa-Antagonisten nicht in ihrer Zielzone retiniert, bzw. nicht mehr von der benachbarten inneren Molekularschicht abgestossen und wachsen durch ihre eigentliche Barriere hindurch. Es ergibt sich hieraus eine Aufgabe von RGMa während der Entwicklung der entorhinalen Projektion im Zusammenspiel mit anderen Leitmolekülen.

Eine Wirkung von RGMa auf die Bildung der septalen oder commissuralen Afferenzen des Hippocampus konnte durch die Blockierung nicht festgestellt werden, allerdings wurden auch noch keine entsprechenden hippocampo-hippocampalen Kokulturen untersucht. Die Distribution des RGMa-Proteins auf hilären Neuronen und in der CA1-Region läßt jedoch auch Rückschlüsse auf eine mögliche Mitwirkung an der Verbindung zwischen beiden Hippocampi zu. Die Deletion des RGMa-Gens und Untersuchung des Phänotyps solcher Tiere zum Beispiel kann Aufschluß über eine Teilhabe von RGMa an der Bildung dieser Projektionen geben.

Aus diesen Ergebnissen läßt sich schließen, daß die Beibehaltung der richtigen Termination von entorhinalen Fasern in der äußeren Molekularschicht auf einem Effekt von RGMa beruht, wobei sich die Projektion zu einem Zeitpunkt bilden kann, zu dem die Molekularschicht noch frei vom repulsiven Leitmolekül ist. Postnatal jedoch zeigt sich für RGMa eine stabilisierende und konsolidierende Funktion, ohne die es zu einer defekten Projektion bzw. zur zerstörten Ordnung in der hippocampalen Formation kommt. Da diese gemeinhin als Modell für die Konnektionsbildung im gesamten Cortex des Großhirns angesehen wird, in dem auch eine RGMa-Expression nachgewiesen werden konnte, kann angenommen

werden, daß RGMA als ubiquitär vorhandenes Molekül mit seinen repulsiven Eigenschaften auch an der Formierung anderer Verbindungen während der Entwicklung beteiligt ist.

## **4.2 RGMA im Zusammenspiel mit anderen Leitmolekülen**

Gerade in der Vielfalt der Möglichkeiten, das Wachstum von Neuriten während der Entwicklung zu beeinflussen und in der Redundanz der Signale, die zur Bildung einer bestimmten Projektion führen, liegt die Besonderheit und Schwierigkeit der Aufgabe, ein Modell zu skizzieren, das verallgemeinert die axonale Wegfindung beschreiben kann. Einen Zusammenhang zwischen der Funktion von RGMA im Hippocampus und den anderen bisher gefundenen Leitmolekülen zu finden, ist daher wichtig und aufschlussreich.

Die in der hippocampalen Formation am Besten charakterisierten Leitmoleküle sind wahrscheinlich die sekretierten Semaphorine der Klasse 3, deren Mitglieder Sema3A und Sema3F in der Körnerzellschicht und in der CA1-Region exprimiert werden und dort auf entorhinale Axone beispielsweise abstoßend wirken (Steup et al., 2000; Chedotal et al., 1998). Pascual et al. konnten kürzlich zeigen, dass eine komplexe spatio-temporale Distribution der Klasse 3 Semaphorine und ihrer Rezeptoren perinatal die Ausbildung des septohippocampalen Wegs unter Ausnutzung der unterschiedlichen benutzten Transmittersubstanzen leitet (Pascual et al., 2005). Die Semaphorine verhindern durch Repulsion das Einwachsen entorhinaler Axone in die Körnerzellschicht und auch in die Pyramidenzellschicht der CA1-Region, haben jedoch mit der schichtenspezifischen Anordnung der Termination dieser Fasern im Gyrus dentatus nichts zu tun. Ferner hat sich gezeigt, dass Sema3A defiziente Tiere eine korrekte entorhinale Formation und einen intakten Moosfasertrakt bilden, so dass der Bildung dieser beiden Projektionen eine kompensatorische Einflussnahme weiterer Leitmoleküle zugrunde liegen muss (Pozas et al., 2001). Hingegen kommt es zu einer Fehlbildung des Moosfasertraktes, wenn man einen Verlust der Rezeptoren Neuropilin-2 und PlexinA3 induziert (Chen et al., 1998; Cheng et al., 2001). Eine Distribution von Semaphorinen oder ihren Rezeptoren auf Fasern der Molekularschichten des Gyrus dentatus ist bisher nicht bekannt, folglich kann man zwar von einer Beeinflussung von entorhinalen Axonen durch Sema3A, -C und -F ausgehen, jedoch verhindern diese eher das Einwachsen in die Körnerzellschicht

und die CA1-Region. Als weitere Vertreter der Semaphorine werden auch die membranständigen Sema4B, Sema5A und -B schon frühzeitig im Neuroepithel exprimiert und zeigen distinkte, zum Teil überlappende Expressionsmuster (Mark et al., 1997; Skaliara et al., 1998) Die zeitgleiche Expression mit RGMA spricht für ein Zusammenwirken bei der Leitung der Projektionen aus dem entorhinalen Cortex.

Netrin-1 wird während der Ausbildung commissuraler Fasern im gesamten zentralen Nervensystem benötigt und ist in perinatalen Entwicklungsstadien in der Fornix und im Hippocampus auf Neuronen der CA1 und CA3-Region, den Körnerzellen sowie den Zielregionen commissuraler Axone, d.h. dem Stratum oriens und radiatum, als attraktives Leitmolekül maßgeblich an der Bildung von Konnektionen beteiligt. Passend dazu wird der Rezeptor DCC auf Ursprungszellen der kreuzenden Fasertrakte gebildet (Steup et al., 2000). Studien an Netrin-1 und DCC-defizienten Mäusen belegen schwere Defekte in der Ausbildung aller commissuralen Strukturen des Hirns, wie das Fehlen des Corpus callosum, der hippocampalen und der anterioren Kommissur (Serafini et al., 1996; Fazeli et al., 1997).

Die sich zum Teil überschneidenden Distributionsmuster von Netrinen und RGMA, beispielsweise auf Neuronen der CA1-Region, könnte ein Hinweis dafür sein, dass hier gegenseitig auf dieselben Fasern Einfluß genommen wird. Allerdings kann generell die Wirkung der Netrine - abhängig von weiteren einflußnehmenden Faktoren - von einer attraktiven in eine repulsive moduliert werden, was für RGMA bisher nicht gezeigt wurde. Hochinteressant ist in diesem Zusammenhang die Tatsache, dass beide Moleküle an einem Rezeptor, nämlich Neogenin, wirken (Rajagopalan et al., 2004). Co-Kultur-Experimente mit Hippocampi von Netrin-defizienten Mäusen zeigen trotz einer normalen Anzahl und Morphologie der hilären Mooszellen eine eindeutige Reduktion von commissuralen Projektionsfasern in der inneren Molekularschicht, vereinbar mit der anzunehmenden fehlerhaften Kreuzung der Fasern an der Mittellinie und einem Fehlen der attraktiven Wirkung von Netrin-1 im Hippocampus. Bemerkenswerterweise kommt es weiterhin noch zu einer leicht alterierten entorhinalen Projektion mit teilweise aberrierenden Fasern in die innere Molekularschicht hinein. Es wäre denkbar, dass dieser Befund entweder mit einer Funktion von Netrin-1 in diesem System zu tun hat

oder auf einer verminderten Konzentration der Leitmoleküle, die wie RGMA auf den Fasern der inneren Molekularschicht exprimiert werden, basiert.

Die Rolle der generell abstoßend und hemmend auf Neurone wirkenden Slit- und Robo-Proteine ist im sich entwickelnden Hippocampus noch nicht abschließend geklärt. Die Distribution von Slit-1 und -2 in Entwicklungsstadien ab Tag 18 beschränkt sich auf Pyramidenzellen und Neuronen des entorhinalen Cortex, nicht jedoch solche im Gyrus dentatus. Die dazu komplementäre Expression von Robo-1 und Robo-2 wird durch die Anwesenheit von Robo-1 auf Körnerzellen des Gyrus dentatus ergänzt (Kidd et al., 1999). Slit-2 soll einen blockierenden Einfluss auf die Invasion von Moosfasern aus dem Hilus in die oberen Segmente der Dendriten in den Molekularschichten des Gyrus dentatus haben. Robo-2 wird außerdem auf Cajal-Retzius Zellen in der äußeren Molekularschicht stark exprimiert, was eine Funktion bei der Formation der entorhinalen Projektion vermuten lässt. Im entorhinalen Cortex sezerniertes Slit-1 kann einwachsende Dendriten der Cajal-Retzius Zellen jedoch nicht davon abhalten, axonale Kollaterale mit den oberflächlichen Schichten des entorhinalen Cortex zu bilden (Ceranik et al., 1999). Erklärbar wäre diese Diskrepanz durch eine kürzlich gefundene Regulationsmöglichkeit der Wirkung von Slits durch Integrine (Stevens & Jacobs, 2002). Die Expression der Slits und Robos hält bis in postnatale und adulte Stadien an, entsprechend wird ihnen auch bei axonaler Verzweigung und Bildung von Synapsen eine mögliche Rolle zugesprochen (Kidd et al., 1999).

Ephrine und die Mitglieder der Familie der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, unter anderem die Eph-Rezeptoren, sind bei der initialen Wegfindung von Neuriten und ihrer Selektion bei fehlerhafter Zielfindung involviert (Gao et al., 1999). Stein et al. konnten zeigen, dass der Rezeptor Eph-A5 im entorhinalen Cortex, sowie dessen Ligand ephrin-A3 ab dem 17. Embryonaltag in der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus exprimiert wird und auf entorhinale Axone aus den Schichten II und III repulsive Wirkung hat, anders als Ephrin-A5, welches diesen Effekt nicht vermittelt. Somit kann für Ephrin-A3 von einer Mitwirkung an der spezifischen laminären Anordnung und Zielfindung von entorhinalen Axonen in der äußeren Molekularschicht ausgegangen werden (Stein et al., 1999). Aufgrund der eindeutigen Distribution in der Pyramidenzellschicht des Hippocampus kann auch eine Rolle in der Entwicklung weiterer extrinsischer oder intrinsischer Projektionen



nicht ausgeschlossen werden. Die Wertigkeit der Ephrin-A3 Wirkung auf die entorhinale Projektion ist bislang nicht durch Funktionsverluststudien eindeutig charakterisiert und gegen andere Moleküle abgegrenzt worden. Vieles spricht also auch hier für ein multifaktorielles Geschehen, welches zudem durch noch nicht identifizierte attraktive Faktoren ergänzt wird.

Moleküle der extrazellulären Matrix spielen bei der Wegfindung der hippocampalen Projektionen eine wichtige Rolle: Nicht nur für entorhinale Fasern, sondern auch für die septalen und commissuralen Konnektionen wurden in diversen Studien verschiedene Proteoglykane, Bestandteile von Hyaluronsäure und nicht zuletzt das von den Cajal-Retzius Zellen sezernierte Reelin identifiziert (Förster et al., 2001; Zhao et al., 2004). Dieses kontrolliert die neuronale Migration beispielsweise der Körnerzellen und ihre korrekte Positionierung im Gyrus dentatus, wobei diese Funktion übertragbar auf den gesamten Neocortex und das Cerebellum zu sein scheint (D'Arcangelo et al., 1995 und 1997; del Rio et al., 1997). Neuerdings wird ein in Reelin-defizienten Mäusen fehlendes Signalprotein, *disabled-1*, das in der radialen Glia exprimiert wird, als Ursprung dieser Wirkung angesehen (Förster et al., 2001; Frotscher et al., 2003; Weiss et al., 2003). Demzufolge wird Reelin zusätzlich eine Rolle als Differenzierungsfaktor für radiale Glia zugesprochen. Hierbei kommt die Tatsache, daß es sich um ein in die extrazelluläre Matrix sezerniertes Molekül handelt, in der Hinsicht zur Geltung, daß die Defekte in Schnittkulturen von Reeler-Hippocampi durch Zufuhr von rekombinantem Reelin teilweise behoben werden (Jossin et al., 2004). Die Entwicklung der entorhinalen Projektion basiert auf der attraktiven Wirkung von Cajal-Retzius Zellen, ohne die sie sich nicht vollständig entwickelt, und auch auf dem Vorhandensein von Reelin als attraktivem Molekül in der extrazellulären Matrix, das allerdings verzichtbar erscheint, da die Fasern auch in der Reeler Maus korrekt terminieren. Reelin kann also als einer der für die Lamination möglicherweise redundanten Faktoren angesehen werden, ist jedoch für die korrekte Positionierung der Körnerzellen im Gyrus dentatus in postnatalen Stadien P0 bis P2 unverzichtbar (Zhao et al., 2004). Förster et al. konnten mittels eines schichtenspezifischen Zell-Adhäsionsassays, bei dem Mikrosphären mit Zellmembranbestandteilen von entorhinalen Neuronen bezogen wurden und dann deren Adhäsion auf hippocampalen Kulturen beobachtet wurde, zeigen, daß auch in Reelin-defizienten Hippocampuschnitten die äußere Molekularschicht für

entorhinale Membranbestandteile attraktive Wirkung hatte. Es müssen also neben den repulsiven Bestandteilen der inneren Molekularschicht auch noch weitere attraktive Moleküle in der äußeren Molekularschicht die Termination von entorhinalen Fasern in diese Zone leiten. Neuronale Zelladhäsionsmoleküle sind in diesem Kontext sicherlich auch von Bedeutung, können jedoch aufgrund ihrer ubiquitären Expression und unspezifischen Bindung vieler auch nicht-neuronaler Zelltypen nicht gut qualitativ eingeschätzt werden. In den Schichten des Gyrus dentatus spielen hochspezifische Moleküle eine Rolle, erkennbar an der fehlenden Adhäsion von retrograd gekennzeichneten hippocampalen Neuronen, von denen die commissurale Projektion ausgeht (Förster et al., 1998).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß trotz der Entdeckung vieler Faktoren, die die Entwicklung axonaler Verbindungen im zentralen Nervensystem steuern, bisher kein integrierendes Modell ihres Zusammenwirkens gebildet werden konnte. Vielmehr kann man anhand der entorhinalen Projektion darstellen, in welcher komplexer Weise und von wie unterschiedlich wirkenden Leitmolekülen die einzelnen Verbindungen beeinflusst werden.

Umso schwieriger wird eine Analyse von RGMA und allen anderen wegweisenden Faktoren die axonale Regeneration und synaptische Plastizität betreffend, da hier nicht nur entwicklungspezifische Moleküle wieder hochreguliert, sondern auch ganz andere Faktoren und Wirkmechanismen zusätzlich in Betracht gezogen werden müssen.

### **4.3 Hat RGMA eine Bedeutung für Regenerationsprozesse im ZNS?**

Einige der an der Formation von Projektionen während der Entwicklung beteiligten Leitmoleküle, wie etwa Semaphorine, nehmen offenbar ihre Funktion nach einer ihr Wirkungsgebiet betreffenden Läsion im ZNS wieder auf und beeinflussen die regenerativen Prozesse, die zu einer Wiederherstellung verlorengangener Konnektionen führen sollen (Pasterkamp und Verhaagen, 2001; Moreau-Fauvarque et al., 2003). Eine mögliche Rolle von RGMA nach entorhinaler Cortexläsion kann anhand des Expressionsmusters vermutet werden.

#### **4.3.1 Distribution von RGMA im adulten Hirn und nach ECL**

Auch im adulten Hirn von Ratte und Maus, und hier insbesondere in der hippocampalen Formation, ist das RGMA-Protein auf hilären Neuronen, in der

inneren Molekularschicht und ubiquitär auf cortexnahen Neuronen immunhistochemisch nachweisbar. Es zeigt sich eine Basisexpression im adulten Hirn in den Zellkernen und auf der Zellmembran der Neurone im Hilus, die commissurale/assoziative Fasern an den contralateralen Hippocampus schickt, auf denen während der Entwicklungsstadien das RGMA-Protein seine repulsive Wirkung entfaltet. Die genaue Zuordnung auf den Fasern war im adulten Hirn nicht nachzuweisen, kann aber insbesondere aufgrund der sich verstärkenden Färbung der inneren Molekularschicht mit RGMA-Antikörper nach entorhinaler Cortexläsion als wahrscheinlich gelten. Gerade die Verstärkung dieser Färbung in den frühen Läsionsstadien spricht dafür, daß RGMA dann einen repulsiven Effekt auf die erneut einwachsenden Fasern der entorhinalen Projektion vermittelt. Die spätere Verlagerung der RGMA-Expression auf reaktive Astrozyten im Bereich der Läsion ab dem 7. postläsionalen Tag ist genauso auch nach Rückenmarksläsion beschrieben worden (Schwab et al., 2005).

Weiterhin konnten die Zelltypen, die RGMA im besonderen exprimieren, in selektiven Zellkulturen als hippocampale Neurone und reaktive Astrozyten charakterisiert werden. Die Co-Lokalisation von RGMA-Protein und spezifischen Markern für Neurone und Astrozyten im Zellkern und auf den Zellmembranen ist ein grundlegender Beweis für die Existenz von RGMA in diesen Zellen. Dieser Fund wird durch die Co-Expression von RGM und RhoA auf reaktiven Astrozyten und auf ballonierten - d.h. absterbenden - Neuronen in Narbengewebe nach Rückenmarksläsion unterstützt (Schwab et al., 2004).

#### **4.3.2 Gemeinsamkeiten von Entwicklung und Regenerationsprozessen**

Proteine, die während der Entwicklung des ZNS axonale Verbindungen hemmend beeinflussen, sollen dafür verantwortlich sein, dass sich im adulten Organismus neuronalen Verbindungen nicht regenerieren (Cramer & Chopp, 2000; Wizenmann et al., 1993). Die Expression chemorepulsiver Semaphorine und Ephrine korreliert beispielsweise erwiesenermaßen mit der Regenerationsfähigkeit lädierter Axone (Pasterkamp & Verhaagen, 2001; Knoll & Drescher, 2002). Daraus, daß die RGMA Expression nach dem postnatalen Tag 15 im ZNS auf eine Art Basisexpression, die jedoch leicht höher als Hintergrundniveau bleibt, zurückgeht (Oldekamp et al., 2003), kann man auf eine fortgesetzte Wirkung im adulten Hirn schließen. Denkbar ist ein Basiseffekt auf die Fasern der entorhinalen Projektion, die ja

weiterhin in ihrem Terminationsgebiet auf Dendriten der äußeren Molekularschicht retiniert werden müssen, da sie dort funktionelle Synapsen bilden, die auch nach einer Läsion zum Teil wiederhergestellt werden können. Eine Rolle von RGMA als inhibitorisch wirkendes Molekül bei der Regulation von Axon-Glia-Interaktionen und synaptischer Plastizität ist also durchaus anzunehmen.

Die in Zellkulturen auf Neuronen und Astrozyten gefundene Expression legt eine Wirkung von RGMA bei der Regeneration nahe, da im ZNS von den sogenannten Stützzellen, den Astrozyten und Gliazellen, ausgeschütteten oder exprimierten Faktoren eine Bedeutung beispielsweise als Verhinderer von überschießendem Wachstum zukommt (Horner & Gage, 2000; Haas et al., 1999). Nicht nur die Myelin-assoziierten Faktoren MAG (McKerracher et al., 1994), Nogo (Chen et al., 2000) und OMgp (Wang et al., 2002), sondern auch andere in zentralnervösem Narbengewebe spezifisch vorkommende Faktoren wie Tenascin R (Becker et al., 2000), Arretin (Xiao et al., 1997) und Chondroitinsulfat-Proteoglykane (Fawcett & Asher, 1999; McKeon et al., 1999), unter anderen auch das Te38 (Monnier et al., 2003), spielen hier eine auf das Aussprossen und Auswachsen der durchtrennten Neuriten hemmende Rolle. Eine solche Funktion wäre aufgrund der repulsiven und wachstumshemmenden Eigenschaften von RGMA in der Entwicklung auf entorhinale Axone auch in der Phase erneuten Aussprossens nach einer Deafferenzierung gut möglich.

Es konnte für die entorhinale Projektion ein spätes Wiederaussprossen nach ECL gezeigt werden (Deller & Frotscher, 1997). Nachdem durch die entorhinale Cortexläsion über 80% der afferenten Fasern der äußeren Molekularschicht des Gyrus dentatus zerstört werden, kommt es zum "sprouting" intaktgebliebener Fasern und zur erneuten Synapsenbildung im deafferenzierten Gebiet (Matthews et al, 1976; Steward, 1991). Auch die - normalerweise eher schwach ausgeprägte - kreuzende entorhino-dentale Projektion zeigt nach ECL eine 6 bis 10-fach erhöhte Faserdichte und zwischen dem 8. und 12. Tag nach der Läsion das meiste Wachstum (Steward et al., 1976). Diese commissuralen Axone reagieren mittels reaktiver Verlängerung der Axone und der Ausbildung von Kollateralen und neuen synaptischen Verbindungen auf den distalen Dendriten in der äußeren Molekularschicht (Deller & Frotscher, 1997). Diese zu den zerstörten Fasern homologen Axone aus dem contralateralen entorhinalen Cortex reagieren

mutmaßlich auch auf die wegweisenden Moleküle gleich und sollten somit einem repulsiven Effekt von RGMA zugänglich sein. Gleichzeitig expandiert die innere Molekularschicht nach Denervation ihrer angrenzenden Zone, es kommt jedoch eher zu einem Wachstum und vermehrter Verästelung der proximalen Dendritenbäume der Körnerzellen als zu einem Einwachsen von den hier ansässigen commissuralen Fasern in das Gebiet der äußeren Molekularschicht. Dies kann auch ein Grund für die verstärkte Expression der auf den commissuralen Fasern vorhandenen Leitmoleküle wie RGMA sein. Ein hemmender Effekt auf die intaktgebliebenen Fasern, die aus dem entorhinalen Cortex nach Läsion erneut in die äußere Molekularschicht einwachsen, ist für die schichtenspezifische, richtige Termination zwingend notwendig. Ergänzend spielen auch die Signale der Cajal-Retzius-Zellen in der äußeren Molekularschicht eine Rolle, da auf ihnen Fasern der entorhinalen Projektion terminieren und sie mit Reelin einen attraktiven Faktor in die umgebende extrazelluläre Matrix sekretieren. Die Ablation von Cajal-Retzius Zellen in hippocampalen slice-Kulturen verminderte deren regeneratives Potential (del Rio et al., 2002).

#### **4.3.3 Mögliche weitere Funktionen von RGMA**

Die Entwicklung und die regenerativen Prozesse im Hippocampus werden als ein gutes Modell für das Aussprossen, die Wegfindung und Zielerkennung von Neuronen und ihrer Fortsätze im Hirn seit ca. 10 Jahren extensiv erforscht. Besonders für die laminäre Anordnung im Gyrus dentatus, in dem Projektionen peinlich genau eine Terminierungszone einhalten, sind Faktoren gefunden worden, die hier eine Rolle spielen, welche sich auf andere cortikale Regionen des zentralen Nervensystems übertragen läßt (Skutella und Nitsch, 2001). In den Expressionsstudien konnte gezeigt werden, daß im gesamten Cortex und in der septalen Region auf Pyramidenzellen RGMA-Protein vorliegt. Die Rolle von RGMA scheint sich also nicht nur auf die Beeinflussung der entorhinalen Projektion zu beschränken.

Da in Co-Kulturen gezeigt wurde, daß die korrekte Terminierung der entorhinalen Fasern weder auf dem sequenziellen Einwachsen erst der entorhinalen und dann der commissuralen Fasern, noch auf einzelnen Faktoren, wie etwa Reelin, beruht, muss man auch hier von einem multifaktoriell beeinflussten Geschehen ausgehen (Frotscher et al., 1997). Ob die Faktoren einer hierarchischen Ordnung unterliegen

und inwiefern sie auch in einer gemeinsamen Endstrecke münden, wie es für Leitmoleküle, die auf die Wachstumskolben während der Entwicklung wirken, erwiesen wurde, bleibt in weiten Teilen noch zu untersuchen. Eine Klärung des oder der intrazellulären Signalwege von RGMa ist auch noch nicht abgeschlossen, da vieles dafür spricht, daß sich der Übertragungsweg des Effekts durch Neogenin von demjenigen der Netrine grundlegend unterscheidet (Rajagopalan et al., 2004).

Da Schwab et al. zeigen konnten, daß das Auswachsen zentralnervöser Axone nach Inhibition eines der wachstumshemmenden Faktoren, Nogo-A, zunimmt und möglicherweise die Regeneration axonaler Verbindungen so positiv beeinflussbar ist, ergibt sich ein Ansatzpunkt therapeutischer Möglichkeiten (GrandPre et al., 2002). Mit dem RGMa-Protein konnte ein weiterer potenter hemmender Faktor auf neuronales Wachstum gefunden werden, dessen weitere Charakterisierung vielversprechend ist. Gegebenenfalls wird es in Zukunft möglich sein, das Unvermögen im ZNS, verlorengegangene Konnektionen durch End-zu-End Wiederanschluß zu regenerieren, durch eine gezielte Einflussnahme auf die hierfür verantwortlichen Mechanismen zu überwinden (Schwab et al., 2004).