

Aus dem Institut für Zell- und Neurobiologie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Molekulare Analyse der Nogo Expression und der Myelinisierung
im Hippocampus während der Entwicklung und nach Läsion**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von
Susan Meier
aus Berlin

Dekan: Prof. Dr. Martin Paul

Gutachter: Prof. Dr. Robert Nitsch
Prof. Dr. Christof Dame
Prof. Dr. Dimitar Angelov

Datum der letzten Prüfung: 30. Januar 2006

Inhaltsverzeichnis

<u>VERÖFFENTLICHUNGEN</u>	4
<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	5
<u>1 ZUSAMMENFASSUNG</u>	7
<u>2 EINLEITUNG</u>	9
2.1 DIE HIPPOCAMPAL FORMATION DER RATTE	9
2.1.1 DIE ANATOMIE DER HIPPOCAMPALEN FORMATION	10
2.1.2 DIE ENTORRHINALE CORTEX LÄSION (ECL)	13
2.2 MYELIN IM ZNS	14
2.3 DIE NOGO GENE UND DEREN REZEPTOR	16
<u>3 AUFGABENSTELLUNG UND VERSUCHSANORDNUNG</u>	17
3.1 FRAGESTELLUNG DER ARBEIT	17
3.2 EXPERIMENTELLE VERSUCHSANORDNUNG	18
3.2.1 MYELINFÄRBUNG	18
3.2.2 EXPRESSIONSANALYSEN DER NOGO FAMILIE	19
<u>4 MATERIAL UND METHODEN</u>	20
4.1 TIERE UND STEREOTAKTISCHE OPERATION	20
4.2 KAINAT BEHANDLUNG	21
4.3 FLUORO-JADE (FJ) FÄRBUNG UND ACETYLCHOLINESTERASE (ACHE)- HISTOCHEMIE	21
4.4 LUXOL FAST BLUE (LFB)- FÄRBUNG UND LIPIDEXTRAKTION	22
4.5 BLACK GOLD (BG)- FÄRBUNG	22
4.6 PROTEIN VERDAU	23
4.7 QUANTIFIZIERUNGEN DER MYELINISIERTEN FASERN	23
4.8 ELEKTRONENMIKROSKOPIE	24
4.9 RADIOAKTIVE <i>IN SITU</i> HYBRIDISIERUNG	24
4.10 QUANTIFIZIERUNG DER AUTORADIOGRAPHIE	26
4.11 NICHT-RADIOAKTIVE <i>IN SITU</i> HYBRIDISIERUNG	26
4.12 PROTEINEXTRAKTION UND IMMUNOBLOTTING	27
4.13 MIKROSKOPISCHE DATENERFASSUNG UND BILDGEBUNGSVERFAHREN	27

5	<u>RESULTATE</u>	28
5.1	MYELINISIERUNG IM HIPPOCAMPUS	28
5.1.1	BLACK GOLD (BG) IST EIN GEEIGNETER FARBSTOFF ZUR DARSTELLUNG VON NORMALEM UND PATHOLOGISCHEM MYELIN	28
5.1.2	DAS VERTEILUNGSMUSTER VON MYELINISIERTEN FASERN WÄHREND DER ENTWICKLUNG DES HIPPOCAMPUS	30
5.1.3	DAS VERTEILUNGSMUSTER VON MYELINISIERTEN FASERN IM ADULTEN HIPPOCAMPUS	32
5.1.4	DAS VERTEILUNGSMUSTER VON MYELIN NACH AXONALER SCHÄDIGUNG	33
5.1.5	PATHOLOGISCHES MYELIN NACH SCHÄDIGUNG	35
5.2	ISOFORM-SPEZIFISCHE EXPRESSION DER NOGO GENE IM HIPPOCAMPUS	36
5.2.1	NOGO-A, -B, -C, -66R UND MBP mRNA EXPRESSION WÄHREND DER HIPPOCAMPALEN ENTWICKLUNG	36
5.2.2	NOGO-A mRNA EXPRESSION IN DEN NEURONEN DER HIPPOCAMPALEN FORMATION	38
5.2.3	NOGO-A, -B, -C UND NG-66R mRNA EXPRESSION NACH ENTORHINALER CORTEX LÄSION	40
5.2.4	NOGO-A mRNA EXPRESSION NACH KAINAT-INDUZIERTEM ANFALL	48
5.2.5	NOGO-A PROTEIN EXPRESSION WÄHREND DER ENTWICKLUNG UND NACH LÄSION.	49
6	<u>DISKUSSION</u>	50
6.1	MYELINISIERUNG IM HIPPOCAMPUS	50
6.1.1	METHODISCHE ÜBERLEGUNGEN	50
6.1.2	DIE MYELINISIERUNG IM HIPPOCAMPUS LÄUFT ZEITLICH GEORDNET AB	51
6.1.3	DIE MYELINISIERUNG IM HIPPOCAMPUS NACH LÄSION	52
6.2	EXPRESSION DER NOGO GENE IM HIPPOCAMPUS	53
6.2.1	DIE NOGO GENE WÄHREND DER ENTWICKLUNG	53
6.2.2	DIE NOGO GENE NACH ENTORHINALER CORTEX LÄSION	54
6.2.3	FUNKTIONELLE KONSEQUENZEN DER NOGO EXPRESSION NACH ECL	55
	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	60
	<u>DANKSAGUNG</u>	73
	<u>LEBENS LAUF</u>	74
	<u>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG</u>	77

Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden publiziert:

Meier, S., Savaskan, N. E, Brauer, A. U., Heimrich, B., Schwab, M. E. and. Nitsch, R., (2002) Nogo genes in the hippocampus: Expression during development and following lesion. International Neuroscience Summit, 2002

Meier, S., Brauer, A. U., Heimrich, B., Schwab, M. E., Nitsch, R., and Savaskan, N. E. (2002) Molecular Analysis of Nogo expression in the hippocampus during development and following lesion. (2002) Soc. Neurosci., abstract.

Meier, S., Brauer, A. U., Heimrich, B., Schwab, M. E., Nitsch, R., and Savaskan, N. E. (2003) Molecular Analysis of Nogo expression in the hippocampus during development and following lesion and seizure. FASEB J. Published online April 8, 2003

Meier, S., Brauer, A. U., Heimrich, B., Nitsch, R., and Savaskan, N. E. Myelination in the hippocampus during development and following lesion. Cell Mol Life Sci, Published May, 2004

Meier, S., Brauer, A. U., Heimrich, B., Nitsch, R., and Savaskan, N. E. Normal and pathological myelin in the mammalian brain: A high resolution morphometric analysis using Black Gold. 2003, (submitted).

Abkürzungsverzeichnis

Sofern es keine deutsche Entsprechung gab, wurde auf die in der Literatur geläufige lateinische und angelsächsische Version zurückgegriffen. In Klammern befindet sich die deutsche Übersetzung.

Abb.	=	Abbildung
AChE	=	Acetylcholinesterase
BG	=	Black Gold
bp	=	Basenpaare
CA	=	Cornu ammonis
C/A	=	kommissurale/ assoziative Fasern
cDNA	=	komplementäre DNA
CSPG	=	chondroitin sulfate proteoglycan
dal	=	days after lesion (Tage nach Läsion)
DG	=	dentate gyrus (Gyrus dentatus)
DNA	=	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonucleinsäure)
dps	=	day(s) post seizure [Tag(e) nach Anfall]
E	=	embryonal
EC	=	entorhinaler Cortex
ECL	=	entorhinale Cortex Läsion
FJ	=	Fluoro- Jade
gcl	=	granule cell layer (Körnerzellschicht)
hi	=	Hilus
iml	=	innere Molekularschicht
ISH	=	<i>in situ</i> Hybridisierung
KO	=	knockout
Lsg.	=	Lösung

MAG	=	Myelin assoziiertes Glycoprotein
MBP	=	Myelin Basic Protein
ml	=	Molekularschicht
mRNA	=	messenger ribonucleic acid (Boten- Ribonucleinsäure)
oml	=	äußere Molekularschicht
P	=	postnatal
PFA	=	Paraformaldehyd
PB	=	phosphate buffer (Phosphat Puffer)
pcl	=	pyramidal cell layer (Pyramidenzellschicht)
PNS	=	Peripheres Nervensystem
PP	=	perforant pathway (Tractus perforans)
RNA	=	ribonucleic acid (Ribonucleinsäure)
slm	=	Stratum lacunosum moleculare
so	=	Stratum oriens
sr	=	Stratum radiatum
wm	=	white matter (weiße Substanz)
ZNS	=	Zentrales Nervensystem

1 Zusammenfassung

Im Gegensatz zum peripheren Nervensystem (PNS) ist die Regenerationsfähigkeit im adulten zentralen Nervensystem (ZNS) von Vertebraten sehr eingeschränkt. Diese eingeschränkte Regenerationsfähigkeit wird im Wesentlichen durch das Vorhandensein von Myelin im adulten ZNS determiniert. Einerseits ist dieses Lipid für die Stabilisierung und Ernährung von Axonen sowie für die schnelle Reizweiterleitung unbedingt notwendig, andererseits stellt es den größten Inhibitor axonaler Regeneration dar. Myelin ist außerdem Zielstruktur diverser ZNS Pathologien, wie z.B. der Multiplen Sklerose.

Für das Verständnis dieser Pathologien sowie der auswachsinhibitorischen Wirkung von Myelin wurde der Hippocampus als eine der plastischsten ZNS Regionen gewählt. Dazu waren genaue Kenntnisse der Myeloarchitektur dieses Gebietes notwendig. Nach Etablierung einer zuverlässigen Detektierung für Myelin konnten in der vorliegenden Arbeit detailliert Myelinisierungsvorgänge im sich entwickelnden, im adulten und im deafferenzierten Hippocampus der Ratte analysiert werden. Während der Entwicklung erreichen die ersten entorhinale Axone den Hippocampus bereits am embryonalen Tag 17 (E17); Myelin kann jedoch erst am postnatalen Tag 17 (P17) lichtmikroskopisch nachgewiesen werden. Die Anzahl myelinisierter Fasern erreicht um den P25 ein Verteilungsmuster, welches dem von adulten Tieren gleicht. Nach Entorhinaler Cortex Läsion (ECL), bei der die Durchtrennung des Tractus perforans (PP) eine Denervation des Hippocampus bewirkt, kommt es zu einem langanhaltenden Verlust von Myelin. Zehn Tage nach Läsion (10 dal), also zum Zeitpunkt maximaler Aussprossung (Sprouting), kommt es zu einem Wiederkehren myelinisierter Fasern.

Mehrere myelin-assoziierte Proteine, mit wachstumshemmenden Eigenschaften sind bekannt, wie z.B. die Familie der Nogo Gene (Nogo; englisch, kein Durchkommen). Diese werden ganz entschieden für den Verlust der Regenerationsfähigkeit des adulten ZNS verantwortlich gemacht. In der vorliegenden Arbeit wird die Expression der drei Nogo Gene (Nogo-A, -B, -C) und deren Rezeptor (Ng66R) während der postnatalen Entwicklung, im adulten ZNS sowie nach Läsion beschrieben. Ein erster überraschender Befund war die neuronale Expression der Nogos, die bisher nur in Oligodendrocyten nachgewiesen worden war. Zu einem Zeitpunkt, an dem entorhinale Fasern bereits in den Hippocampus eingewachsen, aber noch nicht myelinisiert sind (P0), wird Nogo-A, -B und Ng66R mRNA mit Ausnahme der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus in allen Zellschichten des sich entwickelnden Hippocampus detektiert. Nogo-C und myelin basic protein (MBP) mRNA, werden erst am P15 exprimiert, zu einem Zeitpunkt also, an dem myelinisierte Fasern erstmalig im Hippocampus auftreten. MBP wird ausschließlich in glialen, Nogo-C hingegen hauptsächlich in neuronalen Zellen exprimiert.

Nach Deafferenzierung zeigt sich eine dynamische und Isoform- spezifische Regulation aller Nogo Transkripte. So zeigen die als erste von der Deafferenzierung betroffenen Körnerzellen zu Beginn der Waller`schen Degeneration sowie der neuronalen und glialen Antwort, eine starke Erhöhung aller Nogo Transkripte. Zum Zeitpunkt der maximalen Aussprossung kam es zu einem signifikanten Abfall der Nogo-C und Ng66R mRNA Expression, währenddessen Nogo-A und Nogo-B bereits wieder das Kontrollniveau erreicht hatten. Vor allem im contralateralen Hippocampus, dem Hauptquellgebiet sproutender Fasern, imponierte die Runterregulation von Ng66R mRNA und zeigte erst nach Abschluß von axonalen Sproutingprozessen und der Synapsenformation wieder vergleichbare Werte mit den Kontrolltieren. Diese Korrelation der erniedrigten Ng66R Expression im contralateralen Hippocampus und dem axonalen Einwachsen in den deafferenzierten Hippocampus, läßt eine reduzierte axonale Ansprechbarkeit auf den Neuriten-Auswachshemmer Nogo-A vermuten, da bekannt ist, dass Axone, die kein Ng66R exprimieren, nicht durch die Nogo Gene im Wachstum gehemmt werden.

Zusammenfassend kommt es während der Entwicklung und in der Reorganisationsphase zu einer spezifischen und geordneten Myelinisierung im Hippocampus. Die neuronale Expression von Nogo- A, -B und -C in einer so plastischen ZNS- Region unterstützt die Hypothese, dass den Nogo- Genen neben der reinen Hemmung von axonalen Auswachsen weitere Funktionen zuzuordnen sind. So scheinen sie vor allem während der Entwicklung und während der Stabilisierungsphase der hippocampalen Reorganisation eine wichtige Rolle einzunehmen. Die hier dargestellten Daten zeigen auf, dass vor einem therapeutischen Einsatz von Nogo- Antagonisten nach Schädigung deren Verträglichkeit bzw. unerwünschte Nebeneffekte ausgeschlossen werden müssen.

2 Einleitung

2.1 Die hippocampale Formation der Ratte

Der phylogenetisch dem Archipallium abstammende Hippocampus ist die zentrale Struktur und Schaltzentrale des limbischen Systems. Im Gegensatz zum Neocortex ist die Organisation von Neuronen und Fasern im Hippocampus relativ einfach. Nicht nur wegen dieser einfachen trilaminären Organisation und der schichtenspezifischen Innervation, sondern vor allem durch die enorme klinische Relevanz, hat sich die hippocampale Formation als Modellsystem zur Untersuchung für postläsionale Degenerationen und Reorganisationen im Zentralen Nervensystem (ZNS) etabliert (Cabalka et al., 1992; Cotman et al., 1990; Frotscher et al., 1997; Grady et al., 1989). So führt bei der Alzheimer'schen Erkrankung der Untergang entorhinaler Projektionsneurone zu einer Diskonnektion des Hippocampus und damit zu schweren Gedächtnisstörungen (Hyman et al., 1984). Auch die Temporallappenepilepsie sei in diesem Zusammenhang genannt. Mit der stereotaktische Läsion des entorhinalen Cortex (ECL) kann dabei diese Situation experimentell nachgeahmt werden (Lynch et al., 1976, Parnavelas et al., 1974). Die Veränderungen nach der ECL sind intensiv untersucht worden (Kelley & Steward), so dass dieses Modell auch für die Fragestellung der vorliegenden Arbeit verwendet werden soll. Die Durchführung der ECL sowie die postläsionsbedingten physiologischen und morphologischen Veränderungen werden ausführlich im Abschnitt 2.1.2 beschrieben. Da bekannt ist, dass einige Moleküle, die während der Entwicklung stark exprimiert werden, in der Adoleszenz aber nur noch ein basale Expression zeigen, nach einer Schädigung reexprimiert werden können, ist die Kenntnis der ento-hippocampalen Entwicklung für das Verständnis axonaler Regenerationsprozesse von Bedeutung (Bovolenta et al., 1997).

Die Anatomie der hippocampalen Formation sowie das Modell der entorhinalen Cortex Läsion ist deswegen in den folgenden Kapiteln kurz zusammengefasst.

2.1.1 Die Anatomie der hippocampalen Formation

Die hippocampale Formation beinhaltet sechs cytoarchitektonische Regionen: den Gyrus dentatus, das Subiculum, das Präsubiculum, das Parasubiculum, den entorhinalen Cortex sowie den eigentlichen Hippocampus, der sich nochmals in die Cornu ammonis Regionen eins bis drei (CA1-CA3) unterteilt (Abb.1).

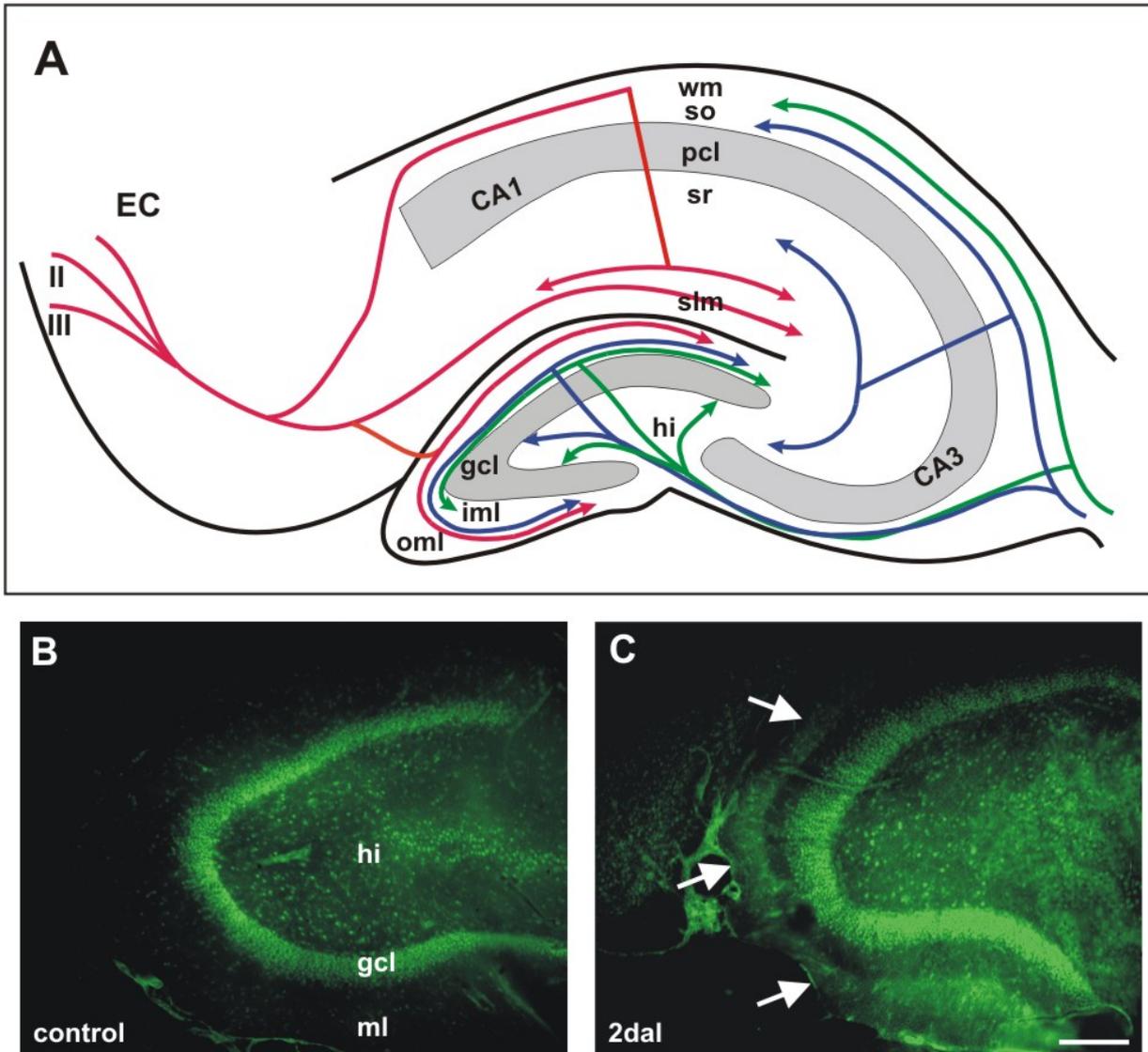


Abbildung 1:

Die hippocampale Formation: (A) zeigt ein Schema der schichtenspezifischen Verschaltungen im entorhino- hippocampalen System der Ratte. Die Neurone der Schicht II des entorhinalen Cortex

(EC) projizieren via Subiculum in die äußere Molekularschicht (oml) des Gyrus dentatus (DG), wo sie terminieren. Fasern aus der Schicht III terminieren in den Strata lacunosa-moleculare (slm) des Cornu ammonis (CA1 bis CA3). Kommissurale, assoziative (C/A) und septale Afferenzen projizieren in den Hippocampus via Fimbria/Fornix und terminieren dort schichtenspezifisch. (B) zeigt den mit dem Neurodegenerations-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff Fluoro-Jade angefärbten DG eines adulten Kontrolltieres. Nach Durchtrennung des Tractus perforans (pp) (C) kommt es zu einer schichtenspezifischen anterograden Degeneration in der oml (Pfeile). iml: innere Molekularschicht, gcl: Körnerzellschicht; hi: Hilus; sr: Stratum radiatum; pcl: Pyramidenzellschicht; so: Stratum oriens; wm: weiße Substanz. Maßstab: 80 µm. (B) und (C) sind bisher unpublizierte Daten; mit freundlicher Genehmigung von Dr. Eyupoglu.

Folgende **Faserverläufe** sind von Bedeutung (Abb.1): Der entorhinale Cortex projiziert über den Tractus perforans in den Gyrus dentatus, die Cornu ammonis Region und das Subiculum. Neurone der Schicht II des entorhinalen Cortex (EC) entsenden ihre Axone in die Molekularschicht des Gyrus dentatus. Dabei projizieren Axone des medialen EC in die mittlere Molekularschicht, Axone des lateralen EC hingegen in äußere Molekularschicht. Axone, die von Neuronen der Schicht III des entorhinalen Cortex ausgehen, projizieren in die Strata lacunosa-moleculare (slm) der CA1 bis CA3 Regionen des Hippocampus. Dabei ziehen die medialen entorhinalen Fasern in den proximalen Teil der CA1 Region, während die lateralen entorhinalen Fasern weiter distal an der Grenze zum Subiculum terminieren (Steward & Scoville, 1976; Amaral & Witter, 1989). In der inneren Molekularschicht des Gyrus dentatus terminieren zusätzlich kommissurale und assoziative Fasern, die direkt an den Dendriten der Körnerzellen enden (Super & Soriano, 1994). Die Axone der Körnerzellen verlaufen als Moosfasertrakt zu den Pyramidenzellen der CA3 Region. Von diesen wiederum entspringen die Schaffer- Kollaterale, die zu den Pyramidenzellen der CA1 Regionen ziehen. Der Alveus, der aus afferenten und vor allem aus efferenten Fasern besteht, verbindet beide Hippocampi über das Fimbria/ Fornix Band (Abb.1).

Zu Erwähnen ist, dass die einzelnen Fasersysteme schon sehr früh in der Entwicklung schichtenspezifisch angelegt werden. Untersuchungen zu der embryonalen Entwicklung im Hippocampus mittels Tracern ergaben, dass die ersten entorhinalen Fasern den Gyrus dentatus bereits am 19. embryonalen Tag (E19) erreichen (Bayer & Altman, 1987; Snyder et al., 1991; Super & Soriano, 1994, Linke et al., 1995;). Die Entwicklung des Tractus perforans ist am fünften postnatalen Tag (P5) abgeschlossen. Die Myelinisierung im Hippocampus hingegen setzt erst später ein. So beginnt die Expression der beiden Myelinproteine Myelin- Associated Glycoprotein (MAG) und Myelin Basic Protein (MBP) im Hippocampus erst um den 10. postnatalen Tag (P10). Abgeschlossen ist die Myelinisierung am P60 (Savaskan et al., 1999). Genauere Daten der Myelinisierung sind bis dato allerdings nicht bekannt.

Der **Gyrus dentatus** besteht aus der Molekularschicht, der Körnerzellschicht und dem Hilus (Abb.1). Die an der hippocampalen Fissur anliegende Molekularschicht (Stratum moleculare) unterteilt sich in eine äußere, mittlere und innere Schicht. Sie ist relativ zellarm und besteht zum größten Teil aus den Dendriten der Körner- und Korbzellen sowie den axonalen Terminierungen, die oben näher beschrieben wurden. Die Körnerzellschicht (Stratum granulosum) ist hauptsächlich aus den Somata der namesgebenen Körnerzellen aufgebaut. Im Hilus befinden sich, neben einer Vielzahl von unterschiedlichen Zelltypen, auch kommissurale/ assoziative Fasern, extrinsische Afferenzen aus dem medialen Septum sowie der Moosfasertrakt (Burwell et al., 1995) (Abb.1).

Das **Cornu ammonis** (Ammonshorn; CA1- CA-3) ist laminär organisiert (Abb.1). Die am weitesten oberflächlich gelegene Region wird von den Strata lacunosa-moleculare gebildet, in welchen auch die Fasern des Tractus perforans aus der Schicht III des entorhinalen Cortex terminieren. Es folgt das Stratum radiatum, welchem sich das Stratum lucidum anschließt. In dieser zellfreien Schicht oberhalb der Pyramidenzellschicht von CA3 verlaufen die Moosfasern. Die Zellschicht ist hauptsächlich aus den Somata der Pyramidenzellen aufgebaut (Stratum pyramidale). Pyramidenzellen der CA3 bilden Kollaterale, die sowohl ipsi- als auch contralateral in die Cornu ammonis Regionen projizieren. Die ipsilateralen Projektionen von CA3 nach CA3 und CA2 bilden die assoziativen Fasern. Die contralateral nach CA1 bis CA3 und den Gyrus dentatus ziehenden Fasern werden als kommissurale Projektionen bezeichnet. Sie terminieren hauptsächlich auf den Fortsätzen der Pyramidenzellen und auf den Dendriten der Interneurone. Die ipsilateralen Projektionen von CA3 nach CA1 werden als Schaffer- Kollateralen bezeichnet. Der Pyramidenzellschicht schließt sich das Stratum oriens an, welches vom Alveus begrenzt wird. In diesem verlaufen myelinisierte afferente und efferente Fasern (Amaral & Witter, 1989) (Abb.1).

Der **entorhinale Cortex** ist wie die übrigen Cortexbereiche in sechs Schichten unterteilt (Abb.1). Nur auf die Schichten II und III soll hier kurz eingegangen werden, da diese für die Projektionen in den Hippocampus wesentlich sind. In der Schicht II des entorhinalen Cortex befinden sich Sternzellen, Pyramidenzellen, multipolare und horizontale Zellen. Axone der Stern- und Pyramidenzellen bilden den Teil des Tractus perforans, der in den äußeren zwei Dritteln der Molekularschicht des Gyrus dentatus terminiert. Aus der Schicht III entstammen die Fasern des Tractus perforans, die in die Strata lacunosa-moleculare projizieren. Aber auch multipolare, fusiforme, horizontale und bipolare Zellen formen mit ihren Axonen den Tractus perforans. (Amaral & Witter, 1989) (Abb.1).

2.1.2 Die Entorhinale Cortex Läsion (ECL)

In der Literatur sind drei Techniken zur Eliminierung des entorhinalen Inputs zum Hippocampus beschrieben worden (Kelley & Steward; 1997):

1. die elektrolytische Läsion des entorhinalen Cortex
2. die Aspiration des entorhinalen Cortex
3. die mechanische Durchtrennung des Tractus perforans

In dieser Arbeit wurde das Modell der mechanischen Durchtrennung des Tractus perforans verwendet. Diese Läsion des ipsilateralen entorhinalen Cortex (EC) führt zu einer partiellen Deafferenzierung der Dendriten in der äußeren Molekularschicht des Gyrus dentatus. Dabei reduziert sich die Synapsendichte im deafferenzierten Gebiet innerhalb der ersten zwei Tage um ca. 90% (Matthews et al., 1976 II). Nach weiteren 8 Tagen kommt es zu einem schichtenspezifischen Einwachsen neu aussprossender Fasern in die geschädigte Region. Dies wird als reaktives axonales Ausprossen (engl., Sprouting) bezeichnet (Raisman, 1969). Im Verlauf der folgenden Wochen kommt es zu einer Neubildung synaptischer Kontakte (Synaptogenese), so dass die Synapsendichte schließlich wieder ca. 80% des Ausgangswertes erreicht (Matthews et al., 1976 I; Steward et al., 1988).

Die physiologischen und morphologischen Veränderungen im Hippocampus nach der ECL sind intensiv untersucht und von Kelly & Steward 1997 in sechs Phasen unterteilt worden:

1. die sofortige Reaktion, die mit der Deafferenzierung beginnt und bis zu 12 Stunden anhält. (Dasheiff & McNamara; 1982; Nitsch & Frotscher, 1992; Phillips & Belardo, 1994).
2. die postoperative Phase, die die ersten 48 Stunden umfasst. Es kommt zur Waller'schen Degeneration und initialer glialer Reaktion (Kelley & Steward, 1996; Savaskan et al., 2000; Steward et al., 1993).
3. 2 bis 8 Tage nach der Läsion erreichen die degenerativen Prozesse und die gliale Phagozytose ihr Maximum (Bechmann & Nitsch, 1997; Gall et al., 1979; Jensen et al., 1994).
4. 6 bis 12 Tage nach der Läsion beginnt das axonale Sprouting und die Synapsenformation und sie erreichen ihr Maximum (Scheff & Cotman, 1977; Matthews et al., 1976 II)
5. 12 bis 30 Tage nach der Läsion ist das axonale Auswachsen und die Synaptogenese größtenteils beendet (Lee et al., 1977; Matthews et al., 1976 a; Steward & Loesche, 1977)

6. im Langzeitstadium (> 30 Tage) kehrt die gliale Aktivität auf das Normalniveau zurück; die dendritischen Veränderungen hingegen dauern weiter an (Steward, 1995; Steward et al., 1993)

Der Prozeß axonaler Reorganisation nach der ECL ist bisher nur mittels indirekter Methoden nachgewiesen worden (Matthew et al., 1976 I/ II; Steward 1989). So wurde der Tracer Phaseolus vulgaris Leucoagglutinin verwendet, um einzelne Fasern und deren ultrastrukturelle Kontakte zu detektieren. Es konnte gezeigt werden, dass die axonale Reorganisation schichtenspezifisch verläuft (Frotscher et al., 1997; Deller et al., 1995). So kommt es nur zum spezifischen Sprouting solcher kommissuraler Fasern, die ohnehin bereits in der Terminationszone des Tractus perforans liegen, nicht jedoch zum Einwachsen anderer Afferenzen. Es wird angenommen, dass schichtenspezifisch exprimierte Faktoren im Bereich der äußeren Molekularschicht des Gyrus dentatus für dieses Phänomen verantwortlich sind. Die genauen molekularen Mechanismen des reaktiven Sproutings und der Synaptogenese sind noch weitgehend unverstanden (Kelley & Steward, 1997). Durch die Erlangung weiterer Erkenntnisse auf diesem Gebiet ist die Hoffnung neuer Therapieansätze in der Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen, der epilepsiebedingten Schädigung und der durch Traumata entstandenen Läsionen im ZNS, verknüpft.

2.2 Myelin im ZNS

Neurone des adulten ZNS` besitzen die Fähigkeit des axonalen Auswachsens, sofern die dazu notwendige Umgebung vorliegt (Richardson et al., 1980). Im Gegensatz zum PNS ist eine posttraumatische Genesung im ZNS aber kaum möglich (David & Aguayo, 1981). Während die Schwann'schen Zellen entscheidend zum Wachstum lädierter Axone des PNS` beitragen, sind die myelinformenden Oligodendrozyten für die fehlende Reorganisationsfähigkeit des ZNS` verantwortlich (Savio & Schwab, 1990; Schnell & Schwab, 1990; Kopffhammer et al., 1992). Es sind dabei mehrere myelin-assoziierte Proteine bekannt, die wesentlich zu der auswachshemmenden Umgebung des ZNS` beitragen. Zu nennen sind dabei vor allem folgende Proteine:

- Myelin-Associated Glycoprotein (MAG); (McKerracher et al., 1994);
- Chondroitin Sulfate Proteoglycan (CSPG); (Dou & Levine, 1994; Niederost et al., 1999)
- und die neu identifizierte Familie der Nogo Gene ; (Chen et al., 2000; GrandPre et al., 2000; Prinjha et al., 2000)

Nicht unerwähnt sollten dabei aber die physiologischen Aufgaben des Myelins bleiben. So umhüllt ein Oligodendrozyt im Durchschnitt 15 Axone mit einer jeweiligen Markscheide und dient somit als Isolator der Nervenfortsätze. Der Energieverbrauch des Axons wird dadurch stark verringert. Ebenso erhöhen die Markscheiden beträchtlich die Weiterleitungsgeschwindigkeit des

Aktionspotentials (Henderson et al., 2001; Coetzee et al., 1996). Die Myelinscheide ist in konzentrischen Lagen angeordnet und besteht aus sich wiederholenden bimolekularen Lipidschichten, die jeweils zwischen Proteinschichten eingelagert sind. Diese ist, ähnlich wie eine Plasmamembran aufgebaut und besteht zu etwa 70% aus Lipiden und ca. 30% aus Myelin-spezifischen Proteinen mit einem hohen Anteil an Cholesterinen und Phospholipiden. Zu nennen ist dabei die Gruppe der sogenannten basischen Myelinproteine (myelin basic proteins, MBP), welche hauptsächlich im kompaktem Myelin anzutreffen sind und das Myelin-Assoziierte Glykoprotein (myelin-associated glycoprotein, MAG), welches, wie Nogo-A, vor allem in der an das Axon angrenzenden Membran der voll entwickelten Myelinscheide lokalisiert ist (O'Connor et al., 2000). MAG wird eine entscheidene Rolle bei der Zellerkennung zugesprochen (de Vries et al., 1997). Die frühe Expression, die Lokalisation in der Zelle und die strukturelle Ähnlichkeit mit anderen Zelloberflächenerkennungsmolekülen lassen vermuten, dass MAG ein für die Einleitung des Myelinisierungsvorganges wichtiges Adhäsionsmoleküle ist. Die heftige Immunantwort auf MBP ist seit längerem bekannt. Injiziert man MBP Peptid i.v. mit Freund'schen Adjuvant in Mäusen kommt es zu der sogenannten experimentell allergischen Enzephalomyelitis (EAE). Sie ist durch lokale Entzündungen und durch Zerstörung der Myelinscheiden im ZNS gekennzeichnet. Die EAE wird daher als Modell der Multiplen Sklerose (Encephalomyelitis disseminata) verwendet. An dieser Stelle sollen daher einige demyelinisierende Erkrankungen kurz zusammengefasst werden. Dabei werden die verheerenden Auswirkungen durch den Zerfall von Myelinscheiden deutlich.

- Multiples Sklerose (MS, Encephalomyelitis disseminata)

Bei dieser schubweise oder chronisch progredient verlaufenden Erkrankung unklarer Genese kommt es zu zentralen spastischen Paresen, Sensibilitätsstörungen und teilweise schweren psychischen Veränderungen. Morphologisch imponieren dabei v.a. periventrikulär gelegene sklerotische Entmarkungsherde sowie lymphoplasmazelluläre Infiltrate.

- Funikuläre Myelose (funikuläre Spinalerkrankung)
Die durch Vitamin B₁₂- Mangel hervorgerufene Entmarkung der Hinterstränge und Pyramidenbahnen führt u.a. zu Hinterstrangataxie, spastischen Lähmungen und psychischen Störungen.
- Zentrale pontine Myelose
Diese Funktionsstörung der Basis pontis tritt gehäuft nach langjährigem Alkohol- und Heroinabusus, aber auch in Folge einer zu schnellen Korrektur der Hyponatriämie auf. Durch die Demyelinisierung kommt es sowohl zu Schluck-, Sprech- und Bewußtseinsstörungen, als auch zu Tetraparesen.
- Tabes dorsalis (Rückenmarksschwindsucht)
Diese fakultativ 10 bis 20 Jahre nach einer Infektion mit *Treponema pallidum* auftretene Form der Neurolyues führt zu massiven Entmarkungen des Hinterstranges und der Hinterwurzeln. Klinisch stehen dabei lanzinierende Schmerzen der Gliedmaßen und eine sensible Gangataxie im Vordergrund.

- Progressive multifokale Leukenzephalopathie (PML)
Bei dieser wahrscheinlich durch Papova-Viren ausgelösten Demyelinisierung leiden die Patienten unter starken Wesensveränderungen, motorischen Störungen, Ataxie und bulbären Symptomen. Morphologisch stehen multiple, konfluierende demyelinisierende Plaques sowie abnorme Oligodendrogliazellen mit intranukleären Einschlusskörperchen im Vordergrund.
- Metachromatische Leukodystrophie (Zerebrosid- Sulfatidose)
Als Folge eines Defektes der Arylsulfatase A kommt es zu einer diffusen Demyelinisierung aller Nervenzellen. Dies äußert sich klinisch u.a. durch Ataxie, Lähmungen, Epilepsien und Demenz.
- Phenylketonurie
Durch den Mangel an Phenylalaninhydroxylase kommt es zu einem Aufstau von Phenylalanin im Gehirn. Die Folgen sind Defekte der Myelinisierung und dadurch schwere geistige Retardierung.

2.3 Die Nogo Gene und deren Rezeptor

Caroni und Schwab zeigten bereits 1988, dass Myelin durch den monoklonalen Antikörper IN-1 an seiner auswachshemmenden Wirkung auf Axonen verliert. So kam es nach Injektion des IN-1 Antikörpers in querschnittsgelähmte Ratten, zu einem Wiederwachsen der corticospinalen Axone, sowie zu einer erstaunlichen Verbesserung in lokomotorischen Verhaltenstests (BBB, Catwalktest, Schwimmtest). Das myelin- assoziierte Antigen von IN-1, das 250 kDa große Protein NI-250, wurde erst 2000 gereinigt, kloniert und in Nogo-A umbenannt (Chen et al., 2000). IN-1 erkennt außerdem das kleinere, ebenfalls inhibitorisch wirkende Protein NI-35, welches später als Nogo-B identifiziert wurde. Bisher sind drei Isoformen der Nogo Familie bekannt, Nogo-A, Nogo-B und Nogo-C, die aus alternativem Promotorgebrauch und/ oder alternativem Splicen derselben DNA- Matritze entstehen (Chen et al., 2000; GrandPre et al., 2000, Prinjha et al., 2000). Ein Rezeptor (Ng66R) mit hoher Affinität zu einer 66 Aminosäuren großen Region, die in allen drei Isoformen gefunden wird, ist wenig später entdeckt worden (Fournier et al., 2001). Die physiologische Rolle der Nogo Gene ist immer noch weitgehend unbekannt. Eine mögliche Funktion könnte die Blockierung übermäßiger neuronaler Plastizität im adulten ZNS darstellen (Buffo et al., 2000; Zagrebelsky et al., 1998). In der vorliegenden Arbeit wurde das Expressionsmuster der drei Nogo Gene und deren Rezeptor während der hippocampalen Entwicklung und in der posttraumatischen Reorganisationsphase untersucht.

3 Aufgabenstellung und Versuchsanordnung

3.1 Fragestellung der Arbeit

Die inhibitorische Wirkung von Myelin auf das Wachstum von Neuronen ist seit längerem bekannt. Obwohl sich viele Studien mit der axonalen Wegfindung und dem Sprouting im Hippocampus beschäftigt haben, sind nur wenige Daten über Myelinisierungsvorgänge im sich entwickelnden Hippocampus bekannt. Auch über Änderungen der Myelinverteilung nach Läsion liegen keine ausreichenden Daten vor. Ein Grund dafür war die schwierige Detektionsmöglichkeit von Myelin. Vor allem dünn myelinisierte Fasern ließen sich kaum darstellen. Für das Verständnis von myelin-assoziierten Wachstumshemmern und deren Verteilung in einer so plastischen Gehirnregion wie dem Hippocampus ist die Kenntnis des regionalen Verteilungsmusters myelinisierter Axone von großer Wichtigkeit. In der vorliegenden Arbeit soll für die Region des Hippocampus folgendes untersucht werden:

1. Etablierung einer geeigneten Myelinfärbemethode für licht- und bestenfalls auch für elektronen mikroskopische Analysen.
2. Wie sieht das Verteilungsmuster von Myelin
 - im sich entwickelnden,
 - im adulten und
 - im deafferenzierten Hippocampus aus?

Die neu identifizierte Genfamilie der Nogos gehört zu den membran-assoziierten Proteinen, die sowohl *in vitro*, aber auch *in vivo* auswachshemmende Eigenschaften auf Axone zeigen. Es kamen folgende Fragen auf, die in dieser Arbeit geklärt werden sollen:

1. Expressieren neben Oligodendrozyten noch andere Zellen des ZNS die Nogo Transkripte?
2. Wie sieht das Verteilungsmuster der Nogo Transkripte
 - im sich entwickelnden,
 - im adulten und
 - im deafferenzierten Hippocampus aus?
3. Gibt es Unterschiede im Expressionsmuster der einzelnen Isoformen und dem Rezeptor?
4. Können darüber eventuell Rückschlüsse auf deren mögliche Funktionen bei De- und Reorganisationsvorgängen geschlossen werden?

3.2 experimentelle Versuchsanordnung

Sowohl bei der Myelinfärbung als auch bei den Nogo- Expressionsanalysen weichen die untersuchten Überlebensstadien nach ECL (1 dal, 2 dal, 3 dal, 5 dal, 10 dal, 15 dal, 21 dal, 28 dal, 60 dal) von den 1997 von Kelly und Steward eingeteilten Stadien ab. So wurde die Phase 1 und 2 nach Kelly und Steward zu einer zusammengefasst (1 dal). Phase 3 wurde nochmals auf Grund der großen Relevanz unterteilt (3 dal, 5 dal, bei der Myelinfärbung zusätzlich 2 dal). Phase 4 wurde in 15 dal, 21 dal und 28 dal unterteilt. Für die Phase 5 wurde bei der Myelinfärbung 60 dal gewählt. Bei der Nogo- Expressionsanalyse wurde auf das Langzeitstadium (> 30 Tage) verzichtet, da bei allen Isoformen bereits am Ende der 5. Phase (28 dal) in allen untersuchten Regionen die Ausgangswerte wieder erreicht waren.

3.2.1 Myelinfärbung

Für die Färbung der myelinisierten Fasern musste eine geeignete Färbetechnik gefunden werden, die folgenden Ansprüchen Rechnung tragen konnte:

- Sensibilität; v.a. sehr dünn myelinisierte Fasern (z.B. die der Molekularschicht des Gyrus dentatus) müssen detektiert werden können
- Erkennung von pathologischem Myelin
- Möglichkeit zur quantitativen Auswertung
- einfache Handhabung (z.B. lichtmikroskopisch auswertbar, Stabilität der Färbung, gute Reproduzierbarkeit, Möglichkeit zu Gegenfärbungen, idealerweise auch für ultrastrukturelle Analysen kompatibel))

Die bereits etablierten Färbemöglichkeiten erwiesen sich für die oben erwähnten Forschungsvorhaben als wenig brauchbar. So ist die Detektierbarkeit von dünn myelinisierten Fasern mit dem histologischen Farbstoff Luxol Fast Blue fast ausgeschlossen. Die Immunhistochemie mit dem kosten- intensiven Myelin Basic Protein Antikörper ist aufgrund der großen Variabilität und der schwierigen Reproduzierbarkeit ebenfalls nicht die geeigneteste Methode. Der zu seiner Zeit neu von unseren Kollaborationspartnern entwickelte Farbstoff Black Gold sollte in Pilotstudien einige der erforderlichen Ansprüche erfüllen (Schmued & Slikker, 1999).

3.2.2 Expressionsanalysen der Nogo Familie

Die *in situ* Hybridisierung erwies sich für die oben genannte Fragestellung als eine geeignete Methode. Mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung ist man in der Lage, die räumliche Verteilung von mRNA lichtmikroskopisch sichtbar zu machen. Dabei hybridisiert das markierte komplementäre Oligonukleotid (cDNA) mit seinem Gegenstück (antisense) auf dem fixiertem Gewebestück. Bei einer radioaktiven Markierung erscheint die so detektierte mRNA als schwarzer Fleck auf dem exponierten Röntgenfilm (Autoradiographie). Bei der nicht-radioaktiven ISH wird der Ort über eine Farbstoffreaktion kenntlich gemacht. Mit der nicht-radioaktiven ISH kann die zelluläre Verteilung der mRNA detaillierter beurteilt werden, als mit der radioaktiven.

4 Material und Methoden

4.1 Tiere und stereotaktische Operation

Alle Tiere und die an ihnen durchgeführten Experimente wurden in Übereinstimmung des europäischen und deutschen Gesetzes zum Gebrauch von Labortieren durchgeführt (Protokoll- Nr. des Tierversuchantrages GO 347/ 98). Die Anzahl wurde auf ein Minimum beschränkt und alle chirurgischen Eingriffe wurden in tiefer Anästhesie durchgeführt, um unnötiges Leiden der Tiere zu vermeiden. Insgesamt wurden 187 Tieren verwendet, 20 wurden nicht in die Auswertung einbezogen, da sie entweder vorzeitig verstorben sind, die ECL nicht vollständig war oder sie bei der Kainatstudie nicht die Stadien 4 und 5 eingeteilt wurden. Abgesehen der Tiere, deren Gewebe für die Black Gold Färbung dienen sollte, wurden die Tiere nicht ausschließlich für diese Dissertationschrift getötet. Andere Organe und Anteile des Gehirnes wurden auch von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe verwendet, so dass die Gesamtzahl der Tiere innerhalb der Gruppe minimiert werden konnte.

Für die stereotaktischen Operationen wurden 200 – 300 g schwere männliche Wistar Ratten mit einer in 0,9%iger NaCl- Lsg. gelöster Mischung aus 25 mg/ml Ketamine (CuraMed, Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland), 1,2 mg/ml Xylazine (Bayer, Leverkusen, Deutschland) und 0,35 mg/ml Acepromazine (Sanofi GmbH, Düsseldorf, Deutschland) anästhesiert. Die Tiere wurden in einem stereotaktischen Kopfhalter (Stoelting, USA) eingespannt, das Schädeldach eröffnet und ein Standard-Elektrokoagulator (mit vier einzelnen Pulsen á 2,5 μ A für je 3 sec) wurde in Form eines Messers für die Läsion verwendet. Die Läsion erfolgte jeweils nur in der linken Hemisphäre. Dabei wurden in Anlehnung an Paximos et al., (1985) folgende Koordinaten ausgehend von lambda verwendet: frontale Inzision: AP +1,2; L +3,1 zu 6,1; V bis auf die Tiefe des Craniums; sagittale Inzision: AP +1,2 zu + 4,2; L +6,1; V bis auf die Tiefe des Craniums. Die Öffnung des Schädeldaches wurde mit einem Gelaspon Schwamm gefüllt und die Wunde vernäht. Die Überlebenszeiten der Tiere nach der Operation betragen 1, 3, 5, 10, 15, 21, 28 und 60 Tage (\pm 0,5 Tage, je 6 Tiere pro Läsionsstadium). 4 adulte, unlädierte Tiere mit identischem Gewicht dienten als Kontrolle.

Tiere, deren Gehirne für die *in situ* Hybridisierung (ISH) oder die Luxol Fast Blue (LFB) -, Fluoro Jade (FJ) - oder Acetylcholinesterase (AChE) - Färbung dienen sollten, wurden mit einer Überdosis des oben genannten Anästhetika betäubt und dekaptiert. Nach Entfernung der Kutis vom Schädeldach wurde die Ossa parietalis vom Foramen magnum aus mit einer Luer- Zange entfernt und das Gehirn entnommen. Dieses wurde in 0,1 M Phosphatpuffer (PB) gewaschen und über flüssigen Stickstoff eingefroren. Die postnatalen Ratten wurden am Tag der Geburt (P0) bzw. 5 (P5), 15 (P15) und 30 (P30) Tage nach der Geburt dekaptiert (n= je 6). Das Gehirn wurde, wie oben beschrieben, entnommen und eingefroren.

Tiere, deren Gewebe für die Black Gold Färbung dienen sollte, wurden in tiefer Anästhesie transcardial mit 200 ml steriler 0,9%iger NaCl- Lsg. und anschließend mit 250 ml 0,1 M PB, welches 4% Paraformaldehyd (PFA) und 2% Glutaraldehyd enthielt, perfundiert. Das Gehirn wurde wie oben beschrieben entnommen und in 30% Sucrose, gelöst in 4% PFA, für zwei Tage nachfixiert und anschließend über flüssigen Stickstoff eingefroren. Bei den Kontrolltieren wurde je eine Niere als Negativkontrolle entnommen. Die postnatalen Ratten wurden 5 (P5), 12 (P12), 17 (P17) und 25 (P25) Tage nach Geburt, wie oben beschrieben, perfundiert, das Gehirn entnommen und eingefroren (n= je 6). Das Gewebe wurden bei – 80°C gelagert.

Zur Überprüfung der Vollständigkeit der entorhinalen Cortex Läsion diente für die frühen Überlebensstadien (1- 10 dal) der Farbstoff Fluoro- Jade (FJ) und für die späten Überlebensstadien (10- 60 dal) Acetylcholinesterase (AChE). Es wurden zwei verschiedene Farbstoffe für die Überprüfung verwendet, da der Fluoreszenzfarbstoff FJ selektiv degenerierte Neurone sowie deren Fortsätze färbt und damit als früher Degenerationsmarker sehr geeignet ist (Schmued et al., 1997; Savaskan et al., 2000). Für spätere Überlebensphasen ist AChE besser geeignet, da es sich dabei um einen Marker für reaktives Auswachsen (Sprouting) handelt. Er ist daher in den frühen Überlebensstadien weniger sensitiv (Deller und Frotscher, 1997; Deller et al., 1996).

4.2 Kainat Behandlung

Je Überlebensstadium (1dps und 5 dps) wurden fünf adulte Wistar Ratten (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) der Stadien 4 und 5 mit einem Gewicht von 200 - 300 g verwendet. Diese Tiere erhielten eine intraperitoneale Injektion der frisch angesetzten Kainatsäure (10 mg/kg Körpergewicht; Ocean Products, Kanada). Die Kontrolltiere (n = 5) erhielten eine intraperitoneale Injektion rein isotoner Kochsalzlsg. gleichen Volumens. Das Verhalten der Tiere wurde anschließend 12 Stunden per Video beobachtet. Die Schwere der Anfälle wurden wie folgt eingeteilt: 1: Frösteln, starrer Blick, Mund-, Gesichtszuckungen; 2: Schütteln des gesamten Körpers; 3: Vorderpfotenklonus und Kopfnicken; 4: Zurückwerfen; 5: Zurückwerfen und Fallen; 6: wildes Rennen, sich im Kreis drehen, Hüpfen. Nur Tiere des Stadium 4 und 5 wurden für weitere Untersuchungen verwendet. Tiere des Stadiums 6 wurden mit einer intraperitonealen Diazepam-Injektion (10mg/kg Körpergewicht; Ratiopharm, Deutschland) getötet. Tiere für die *in situ* Hybridisierung wurden ein bzw. fünf Tage nach Kainat- Injektion wie oben beschrieben dekaptiert.

4.3 Fluoro-Jade (FJ) Färbung und Achetylcholinesterase (AChE)- Histochemie

Für die Fluoro-Jade Färbung wurden die 20µm dicken Schnitte rehydriert, für 15 min in frisch angesetzter 0,06%iger Kaliumpermanganatlsg. inkubiert und 1 min in destilliertem Wasser gewaschen. Gefärbt wurden sie dann für 30 min in 0,001%iger Fluoro- Jade- Lsg. (Histo-Chem.,

Jefferson, AR, USA), die in 0,1%iger Essigsäure gelöst wurde. Die Schnitte wurden anschließend in destilliertem Wasser gewaschen, luftgetrocknet und mit Entellan (Merck, Deutschland) eingedeckelt.

Für den Nachweis von AChE wurde ein modifiziertes Karnovsky-Roots Protokoll angewandt (Mesulam et al., 1987). Die aufgezogenen und luftgetrockneten Schnitte wurden für 2x 4 min in 0,1 M Maleatpuffer (pH 8,0) inkubiert und anschließend für 2 Stunden in folgender Arbeitslg. entwickelt: 0,1 M Maleatpuffer mit 0,47 mM Kupfersulfat, 0,05 mM Kaliumhexazyanoferat, 0,5 mM Natriumcitrat und 0,17 mM Acetylthiocholine- Jodid. Anschließend wurden die Schnitte 2x 4 min in einem 0,1 M Tris- Puffer gespült und für 10 min in 0,5%igen Kobalt- Chlorid/ Tris- Puffer inkubiert. Die Schnitte wurden 4x 4 min in Tris- Puffer gewaschen und dann für 3 min in einer 0,7%igen DAB- Lsg. unter visueller Kontrolle entwickelt. Nach weiteren 3x 3 min Waschen in Tris- Puffer wurden die Schnitte stufenweise dehydriert und mit Entellan eingedeckelt.

4.4 Luxol Fast Blue (LFB)- Färbung und Lipidextraktion

Das frisch eingefrorene Gewebe wurde 2 min mit -20°C kaltem Methanol und 5 min in einer Ethanol/ Essigsäure Mischung (96/ 4%) nachfixiert. Die 20 μm dicken Kryostatschnitte wurden bei 60°C für 3 Stunden in LFB- Lsg. [0,1% Luxol Fast Blue gelöst in einer Ethanol/ Essigsäure Mischung (96/ 4%)] inkubiert und danach in 96%igen Ethanol gewaschen. Anschließend wurden sie mit 0,05% Li_5CO_3 für 1min nachfixiert und für wenige Sekunden mit 70%igen Ethanol gewaschen. Die Schnitte wurden mit Harris Haematoxylin für 1- 2 min gegengefärbt und wie oben beschrieben dehydriert und eingedeckelt.

4.5 Black Gold (BG)- Färbung

Zu 10 ml 0,9%iger NaCl Lsg. wurden 20 mg des Black Gold (BG) Granulates (Histo- Chem., Jefferson; USA; Schmued et al., 1999) gegeben und in einer Mikrowelle kurz aufgekocht, um anschließend in einem 60°C warmen Ofen vollständig in Lösung zu gehen. Horizontale Kryostatschnitte von ca. 20 μm Dicke (Figocut 2800, Reichert Jung) wurden in einer 24er Well Platte gesammelt oder auf SuperFrostPlus Objektträgern (Menzel-Glaeser, Berlin, Deutschland) aufgezogen, mit 0,1 M Phosphat Puffer (PB) gewaschen und anschließend bei 60°C für 15 bis 60 min mit der BG- Lsg. gefärbt. Die Färbedauer ist dabei stark abhängig von der Dicke der Schnitte, der Färbetemperatur und dem Alter der BG- Lsg.. Es sollte daher eine regelmäßige Kontrolle der Färbung stattfinden. Die dünnen Fasern der Molekularschicht des Cortex eignen sich dazu besonders. Zur Intensivierung der Färbung wurden die Schnitte für 10 min bei 60°C in 0,2%iger Kaliumtetrachloroauratlsg. (Sigma-Aldrich, Deutschland) inkubiert. Die Schnitte wurden anschließend mit 2%iger Natriumthiosulfatlsg. (Merck, Darmstadt, Deutschland) für 3 min fixiert. Zwischen jeden Schritt wurden die Schnitte 3x 5 min mit 0,1 M PB gewaschen. Einige Schnitte

wurden für 1,5 min in 0,4%iger Malachitgrünlg. (Sigma-Aldrich, Chemie, Deutschland) gegengefärbt. Die Schnitte wurden anschließend durch destilliertes Wasser und 70%igen Ethanol gezogen, um die Hintergrundfärbung zu minimieren. Die freischwimmenden Schnitte wurden nun aufgezogen, luftgetrocknet, über eine aufsteigende Ethanolreihe dehydriert, mit Xylol gereinigt und mit Entellan eingedeckelt (beides Merck, Deutschland).

Auf dem für die ISH, LFB-, AChE oder FJ- Färbung aufgearbeiteten Gewebe ließe sich ebenfalls eine Back Gold- Färbung durchführen. Die Färbezeit muß dabei stark verlängert werden. Sehr fein myelinisierte Fasern wie die der Molekularschicht, können dabei nur schwer detektiert werden (Meier et al., bisher unpublizierte Daten). Um diese sichtbar zu machen, wurde daher die von Schmued & Slikker (1999) entwickelte Methode optimiert und angewendet. Auf so aufgearbeiteten Gewebe zeigt eine LFB- Färbung keine Färbung (Meier et al., bisher unpublizierte Daten).

4.6 Protein Verdau

Die 20 µm dicken Schnitte wurden bei 37°C für 40 min entweder mit 50 µg/ml Proteinase K (Boehringer, Deutschland; gelöst in 0,01 M Tris, pH 8,0 und 0,1% SDS) oder mit 0,25% Trypsin (gelöst in 0,04% KCl, 0,22% NaHCO₃, 0,68% NaCl, 0,1% Glucose) verdaut. Anschließend wurden die Schnitte wie oben beschrieben mit Black Gold oder Luxol Fast Blue gefärbt.

4.7 Quantifizierungen der myelinisierten Fasern

Pro Läsionsstadium wurden je sechs unterschiedliche Tiere analysiert; vier unlädierte Tiere dienten als Kontrolle. Es wurden sowohl für die LFB-, als auch für die BG- Färbung je zwei unterschiedliche Färbeansätze in die Auswertung miteinbezogen. Zur Bestimmung der Pixel Intensität der abfotografierten Schnitte (Olympus BX-50, Japan) wurde das Computerprogramm Metamorph (Universal Imaging, Downingtown, PA, USA) verwendet. Um den ungelabelten Hintergrund abzuziehen, wurde ein visuell bestimmter Threshold gesetzt. Ein Standardviereck (4,0 mm²) wurde definiert und über die gesamte Molekularschicht des Gyrus dentatus gesetzt. Ein kleineres definiertes Viereck (2,0 mm²) wurde zur Messung der Pixelintensität der äußeren Molekularschicht verwendet. Der Prozentsatz der Faserintensität der äußeren ML zur gesamten ML wurde ermittelt (Ward & Haag, 1999). Anschließend wurde der jeweilige Mittelwert der einzelnen Messungen ins Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle (100%) gesetzt. Die Spezifität wurde über den Mann-Whitney U- Test (StatViewII, Abacus, USA) bestimmt (Signifikanzen: P* < 0,05; P** < 0,01; P*** < 0,001).

4.8 Elektronenmikroskopie

Für die ultrastrukturellen Untersuchungen wurden die frisch BG gefärbten Schnitte osmiert (1% OsO₄ in 6,84% Sucrose für 5 min), in aufsteigender Ethanolreihe dehydriert und in Epon zwischen silikonbeschichteten Objektträgern flacheingebettet. Die an einem Reichert Ultratom angefertigten Schnitte von 70 nm Dicke wurden mit Formvar Film aufgezogen und mit Zitronen- und Harnsäure gefärbt. Für die Untersuchungen diente ein Zeiss EM 900 Elektronenmikroskop. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe der Zeiss Axioplan Kamera (Zeiss, Deutschland) angefertigt.

Je fünf Fotos der 7000x, 12 000x, 20 000x und 30 000x Vergrößerung wurden von je drei geblindeten Untersuchern ausgewertet. Dabei wurden die Körner in einem Viereck von 5,25µm² ausgezählt. Black Gold gefärbtes Nierengewebe der Ratte diente als Negativkontrolle. Die Spezifität wurde über den Mann-Whitney *U*-Test (StatViewII, Abacus, USA) bestimmt (Signifikanzen: P* < 0,05; P** < 0,01; P*** < 0,001).

4.9 radioaktive *in situ* Hybridisierung

Es wurden folgende *antisense*-Oligonukleotide verwendet, die alle von Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) synthetisiert wurden und deren Spezifität durch BLAST GenBank (www.nicmb.gov) bestätigt wurde (siehe auch Abbildung 2):

Nogo-A I (GenBank: AJ242961): 5'- TTC CAC ATT AGC TCT AGC AGC CAG CAC ATC CCT ACT TC - 3', komplementär zu den Basen 1402- 1440

Nogo-A II (GenBank: AJ242961): 5'- GCT CTG GAG CTG TCC TTC ACA GGT TCT GGG GTA CTG GGG AAA GAA GC - 3', komplementär zu den Basen 1521-1568; (Josephson et al., 2001)

Nogo-B (GenBank: AJ242962): 5'- TCT CTC CAG TAG AGG AGG TCA ACA ACC ACT GAG CCG GAG CCC CTG CGC TT -3', komplementär zu den Basen 680- 730

Nogo-C (GenBank: AJ242963): 5'- ACT GCA AAA TTC TCC CTG AGA CAT GAA ACA CCC GCT TCC C- 3'; komplementär zu den Basen 13- 53

Nogo-A/B (GenBank: AJ242961): 5'- TCC AGT TCC TCT AGG TCC TCG TCG TCC TCC TCC T - 3', komplementär zu den Basen 382- 416

Nogo-pan (GenBank: AJ242961): 5'- GGG GAA GAC AAG TGT GAC TAC AAT GAG ATC CAT ACA CAG CAG C - 3', komplementär zu den Basen 3922- 3965

Ng66R (GenBank: AY028438): 5'- TTG TTG GCA AAC AGG TAG AGG GTC ATG AGT - 3'; komplementär zu den Basen 680- 710

MBP (GenBank: NM017026): 5'- ACT ACT GGG TTT TCA TCT TGG GTC CTC TGC GAC TTC T

-3'; komplementär zu den Basen 257- 294

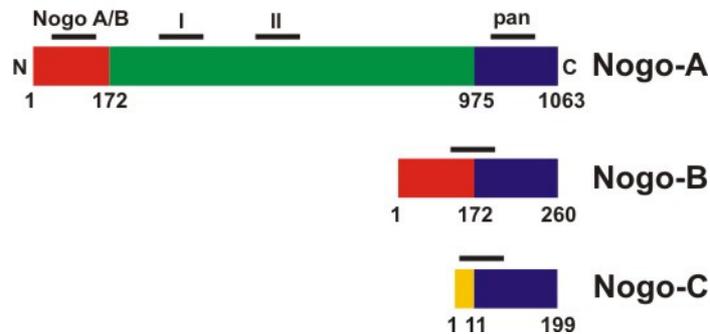


Abbildung 2:

Schema der drei Nogo Transkripte und die Position der verwendeten Sonden: Die drei unterschiedlichen Isoforme, das 4,6 kb lange Nogo-A, das 2,6 kb lange Nogo-B und das 1,7 kb lange Nogo-C Transkript, entstehen durch alternativen Promotor Gebrauch und /oder alternatives Splicen eines einzelnen Genes. Das Oligonukleotid Nogo-A/B ist spezifisch für die beiden Splicevarianten Nogo-A und Nogo-B (rote Region), währenddessen das Oligonukleotid Nogo-pan aufgrund des gemeinsamen 188 Aminosäure langen C-Terminus alle drei Nogo Gene (blaue Region) detektiert. Die Oligonukleotide Nogo-A I, Nogo-A II, Nogo-A/B und Nogo-A pan ergaben das gleiche Expressionsmuster wie das Nogo-A spezifische Oligonukleotid allein. Die Oligonukleotide Nogo-A I, Nogo-A II, Nogo-B und Nogo-C sind spezifisch für das jeweilige Gen. Die rote Region markiert die Nogo-A und Nogo-B spezifische Sequenz, die grüne Region zeigt die allein für Nogo-A spezifische Region und die gelbe Region spiegelt die spezifischen 150 bp der Nogo-C mRNA wieder.

Die Nogo-A I, Nogo-A II, Nogo-A/B, Nogo-pan Oligonukleotide zeigten bei der Auswertung ein nahezu identisches Expressionsmuster. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird daher auf eine genauere Beschreibung der Ergebnisse der ISH der Oligonukleotide Nogo-A II, Nogo-A/B, Nogo-pan verzichtet. Horizontale Kryostatschnitte von ca. 20µm Dicke (Figocut 2800, Reichert Jung) wurden auf SuperFrostPlus Objektträgern (Menzel-Glaeser, Berlin, Deutschland) aufgezogen und in 4% PFA für 10 min fixiert, mit 0,1 M PB (pH 7,4) für 5 min gewaschen, dehydriert und in unvergällten Reinstalkohol bei 4°C gelagert. Die Oligonukleotide (0,3 pmol) wurden gemäß Herstellerangaben unter Verwendung von terminaler Transferase (Boehringer, Mannheim, Deutschland) mit [α -³⁵S]dATP (DuPont NEN, Boston, USA) radioaktiv endmarkiert. Die radioaktiven Proben wurden anschließend über BioSpin6 Chromatography Säulen gereinigt (BioRad). Für die Hybridisierung wurden die markierten Sonden mit dem Hybridisierungsmix gemischt [50%

Formamid, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM PB (pH 7,0), 2x SSC, 5 mM EDTA (pH 8,0), 10% Dextransulfat, 10 mM DTT, 10 mM β -Merkaptoethanol und 200 ng/ μ l tRNA]. Die Hybridisierung erfolgte über 16 Stunden bei 42°C in einer feuchten Kammer. Die Schnitte wurden gewaschen (1x 60 min in 0,1x SSC bei 56°C, 1x 5min in 0,05x SSC bei Raumtemperatur) und in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert. Für die Autoradiographie wurden die Schnitte 5 bis 21 Tage einem Kodak X-OMAT AR Röntgenfilm ausgesetzt. Als Negativkontrolle wurde die *in situ* Hybridisierung unter Zugabe von einem 100-fachen Überschuß an unmarkierten Oligonukleotiden zur radioaktiv markierten Probe durchgeführt und anschließend gleich weiterbehandelt. Die Schnitte wurden anschließend Nissl gegengefärbt. Die *in situ* Schnitte wurden dazu in absteigender Ethanolreihe rehydriert, in PBS gewaschen, mit Nissl (Kresylviolettacetat, Sigma, Deutschland) gefärbt, anschließend dehydriert und mit Hypermount eingedeckelt.

4.10 Quantifizierung der Autoradiographie

Für jedes der sieben Läsionsstadien sowie für die beiden Kainatstadien wurden je sechs unterschiedliche Tiere analysiert, vier unlädierte Tiere dienten als Kontrolle. Für jedes Transkript und jedes Tier wurden mindestens zwei *in situ* Hybridisierungs-Ansätze in die Auswertung miteinbezogen. Zur Bestimmung der Pixel Intensität der eingescannten (Micotek Scan Maker 636) Autoradiographien wurde das Computerprogramm Metamorph (Universal Imaging, Downingtown, PA, USA) verwendet. Um den ungelabelten Hintergrund abzuziehen, wurde ein visuell bestimmter Threshold gesetzt. Ein Standardviereck (1,5 mm²) wurde definiert und in je 15 verschiedenen Positionen der Pyramidenzellschicht der CA1-, der CA2/CA3- Region, der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus, dem Hilus und dem Cortex gesetzt. Der jeweilige Mittelwert der einzelnen Meßwerte jeder untersuchten Region wurde für jedes Überlebensstadiums ermittelt. Die Mittelwerte der unbehandelten Kontrolle wurden für jede Region auf 100% normiert. Die Mittelwerte der Überlebensstadien wurden dann für jede Region ins Verhältnis zur Kontrolle gesetzt und zeigen somit die prozentuale Konzentrationsänderung der mRNA im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Spezifität wurde über den Mann-Whitney *U*-Test (StatViewII, Abacus, USA) bestimmt (Signifikanzen: $P^* < 0,05$; $P^{**} < 0,01$; $P^{***} < 0,001$).

4.11 Nicht-radioaktive *in situ* Hybridisierung

Horizontale, 20 μ m dicke Kryostatschnitte wurden für 10 min in 65°C warmem 1x PBS fixiert, anschließend für je 15 min 2x in aktiven 0,1% DEPC und in 5x SSC gewaschen. Die Schnitte wurden 2 Stunden bei 25°C mit je 200 μ l Hybridisierungspuffer [25% Formamid, 4x SSC, 5x Denhardts, 50 mM NaH₂PO₄/ Na₂HPO₄ (pH 7,0), 0,1 mM EDTA, 1mg/ml Heringssperma und 1mg/ml Hefe t-RNA] prähybridisiert und anschließend 2x 10 min mit 2x SSC gewaschen. Die Hybridisierung erfolgte für 16 Stunden bei 25°C in 200 μ l Hybridisierungspuffer (siehe oben) mit 1 μ g des komplementären (antisense) Dig- gelabelten Oligonukleotids (5' Dig- ACA TTA GCT CTA

GCA GCC AGC ACA TCC CTA-3'), welches komplementär zu den Basen 1406- 1436 der Nogo-A Ratten cDNA ist. Das Oligonukleotid wurde von Tip Molbiol (München, Deutschland) hergestellt; dessen Spezifität wurde in der BLAST Genbank [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST] bestätigt. Das nicht komplementäre (sense) Oligonukleotid diente als Kontrolle. Die Schnitte wurden nach der Hybridisierung 2x 15 min in 2x SSC; 2x 20 min in 1x SSC und 3x 30 min in 0,25x SSC gewaschen. Die Schnitte wurden 2x 5 min in Dig1-Lsg. (100 mM Tris und 150 mM NaCl, pH 7,5) gehalten und anschließend für 30 min mit Dig2-Lsg. [1% Blocking-Lsg. (Roche 1093657) in Dig1 gelöst] geblockt. Für zwei Stunden wurde der Alkaliphosphatase-gekoppelte Anti-Digoxigenin Antikörper (IgG, 1: 1000 gelöst in Dig1) bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte 3x 15 min in Dig1 und 1x 15 min in Dig3 (100 mM Tris-HCl, pH 9,5; 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂) gewaschen. Die Färbung wurde bei 25°C über Nacht in NBT/ BCIP Stocklsg. (DIG Nucleic Acid Detection Kit, Roche; 1 175 041) und 1mM Levamisol entwickelt. Die Reaktion wurde mit Dig4 (10 mM Tris- HCl und 10 mM EDTA, pH 7,5) für 1 min abgestoppt und 30 Sekunden in destillierten Wasser und 30 min in Leitungswasser gewaschen. Die Schnitte wurden mit floureszierendem Nissl-Farbstoff (Moleculare Probe, Niederlande) für 5 min gegengefärbt, in PBS gewaschen und anschließend mit dem Kernfarbstoff HOECHST 33528 (1: 12 000) für 2 min gefärbt. Die Schnitte wurden feucht mit HydroMount eingedeckelt (National Diagnostics, USA).

4.12 Proteinextraktion und Immunoblotting

Gesamtprotein Extrakte wurden auf ein SDS- Polyacrylamid Elektrophoresegel aufgetragen (20µg/ Spur). Nach der Proteintrennung wurden sie auf die Hybond ECL Nitrozellulose Membran (Amersham Pharmacia Biotech, Deutschland) aufgetragen. Es wurde der monoklonale Maus anti-Nogo-A α-RatII-C7 Antikörper (Prof. Martin Schwab, Zürich, Schweiz) verwendet; der monoklonale β-Actin Maus Antikörper (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland) diente als Kontrolle. Der Immunoblot und das Ponceau-gefärbte Gel wurde wie oben beschrieben unter Verwendung von MetaMorph densitometrisch ausgewertet.

4.13 Mikroskopische Datenerfassung und Bildgebungsverfahren

Die Dokumentation der *in situ* Hybridisierungsschnitte erfolgte mittels der Zeiss Axioplan Kamera (Deutschland) für die Cortex- Messung und mittels der Olympus BX-50 (Japan) für die Hippocampusmessungen, während für die Farbaufnahmen der BG Färbung die Olympus IX-70 Kamera (Japan) verwendet wurde. Digitale Bilder oder eingescannte Fotoabzüge wurden in CorelDRAW zusammengefasst und beschriftet. Eine digitale Bildbearbeitung im Sinne von Verstärkung von Kontrast und/oder Intensität fand nicht statt.

5 Resultate

5.1 Myelinisierung im Hippocampus

5.1.1 Black Gold (BG) ist ein geeigneter Farbstoff zur Darstellung von normalem und pathologischem Myelin

Mittels eines einfachen Färbeprotokolls konnte Myelin spezifisch mit Black Gold (BG) innerhalb von drei Stunden angefärbt werden (Abb. 3 - 7). Die Färbung lässt sich sehr gut reproduzieren, sie ist stabil, und Gegenfärbungen sind problemlos möglich und kombinierbar. Sie kann lichtmikroskopisch ausgewertet werden und bietet durch die rotbraune Färbung des Myelins viele Möglichkeiten zur quantitativen Auswertung (Abb. 6). Die hohe Sensivität ließ sich schon lichtmikroskopisch an der Färbung dünn myelinisierter Fasern erkennen, wie z.B. die der Molekularschicht des Gyrus dentatus (Abb. 4, 6). Um die Frage beantworten zu können, welche Komponenten des Myelins Black Gold genau färbt, wurden Schnitte gefärbt, deren Proteingehalt durch Inkubation von Proteinase K und Trypsin stark verringert wurde. Während die Luxol Fast Blue Färbung keinen Unterschied zu den unbehandelten Schnitten zeigte, konnte durch Black Gold kein Myelin mehr detektiert werden. Die Färbung reduzierte sich auf die Hintergrundfärbung (Daten nicht gezeigt). Ultrastrukturellen Analysen zeigten, dass Nuclei und endoplasmatisches Retikulum frei von BG- Partikeln waren (Abb. 3). Die Mehrheit der Partikel befand sich im kompaktem Myelin, aber auch in der äußeren und inneren Schleife der die adulten Axone umgebenden Myelinscheiden. Das Zytoplasma der Axone und die dendritischen Fortsätze zeigten keinen signifikanten Anteil an BG Partikeln (Abb. 3 B, C, D). Eine Färbung der Niere und der Leber, die nach dem heutigen Wissensstand keine Myelinproteine exprimieren, zeigten keine BG- Färbung (Daten nicht gezeigt). Bei der genauen Untersuchung von axotomierten Gewebe konnte pathologisches Myelin eindeutig von physiologischem unterschieden werden, welches in Absatz 5.1.5 genauer beschrieben wird (Abb.7). Mit keinem anderen getesteten Myelin-spezifischen Farbstoff war dies möglich.

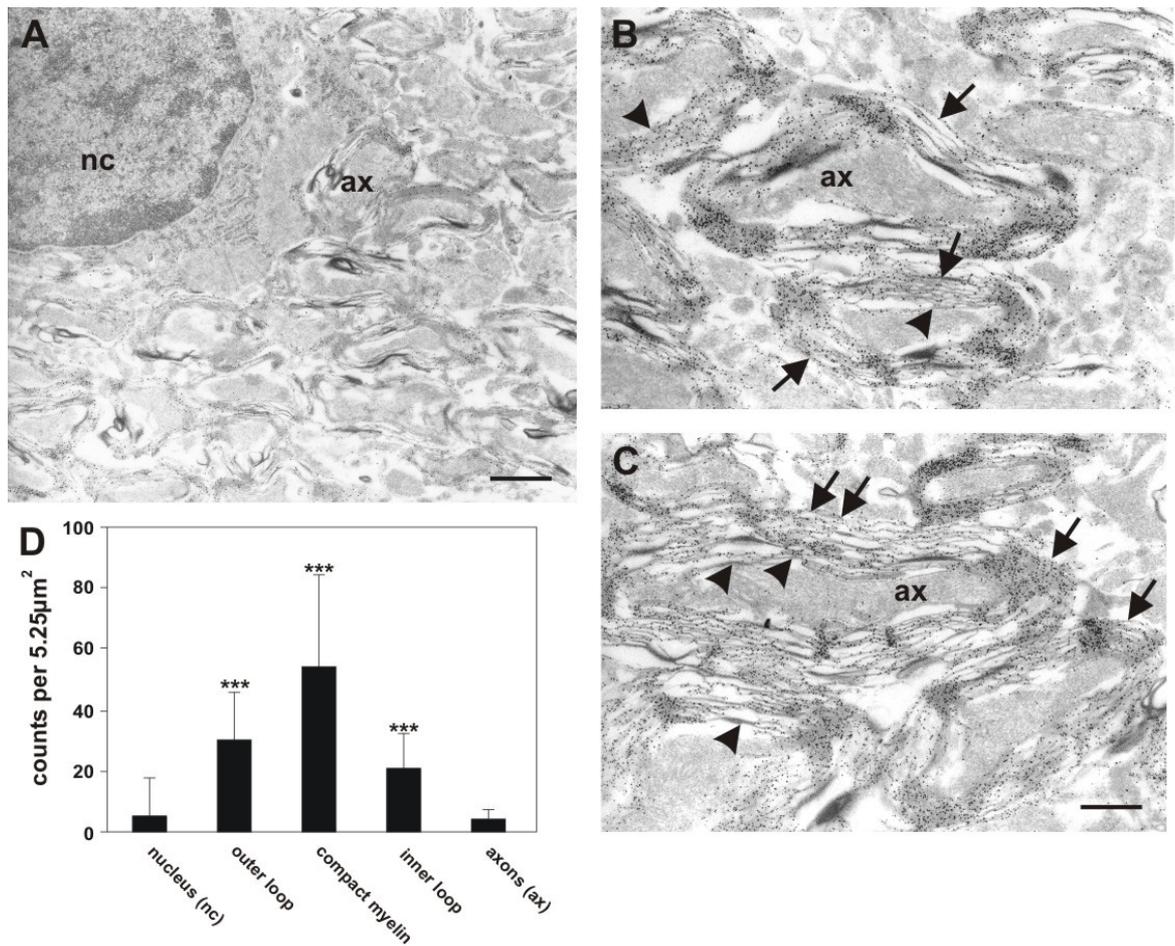


Abbildung 3:

Ultrastrukturelle Lokalisation von Black Gold (BG) im Hippocampus. In (A) ist eine Übersichtsaufnahme aus der Hilus Region dargestellt. Zellkörper (nucleus, nc) weisen kaum BG Partikel (A, D) auf. (B) zeigt eine höhere Vergrößerung aus der Hilus Region; (C) aus dem Stratum lacunosum-moleculare der CA1 Region. BG Partikel sind in allen Schichten der die Axone (ax) umgebenden Myelinscheiden anzutreffen (A - D). Die Pfeile zeigen auf die äußere Schleife (outer loop) der Myelinscheiden; die Pfeilspitzen auf die innere Schleife und die Axonmembran. (D) zeigt die Quantifizierung der BG Partikel in unterschiedlichen Kompartimenten [Nucleus, outer loop (innere Schleife), compact myelin (kompaktes Myelin), inner loop (innere Schleife) und Axon]. Statistische Differenzen sind mit Sternen markiert (\pm S.D. $P^* < 0,05$; $P^{**} < 0,01$; $P^{***} < 0,001$, gemessen mit dem Mann-Whitney *U*-test). Maßstab in A: 20 μ m; in C: 5 μ m.

5.1.2 Das Verteilungsmuster von myelinisierten Fasern während der Entwicklung des Hippocampus

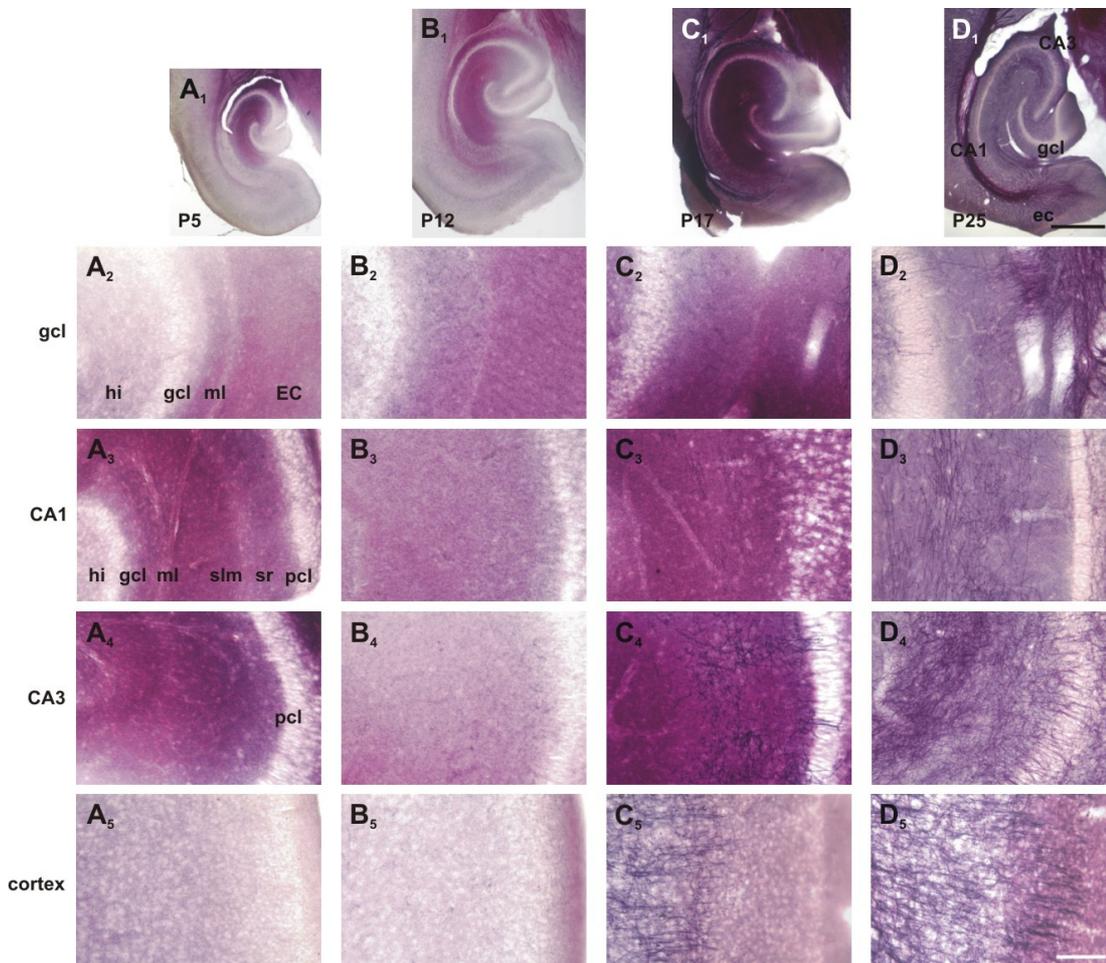


Abbildung 4:

Myelinisierte Axone in der hippocampalen Formation während der postnatalen Entwicklung.

Hippocampale Schnitte verschiedener postnataler Entwicklungsstadien [P5 (A), P12 (B), P17 (C) und P25 (D)] wurden mit Black Gold (BG) gefärbt. Die Übersichtsaufnahmen sind in der ersten Reihe dargestellt (A₁, B₁, C₁, D₁). P5 (A) und P12 (B) zeigen eine diffuse rote Färbung im Hippocampus. Erste BG-positive Fasern sind am P17 (C) in den CA Regionen und im temporalen Cortex sichtbar (C₃-C₅). Keine myelinisierten Fasern werden in der Molekularschicht des Gyrus dentatus gefunden (C₂). Zu beachten ist allerdings, dass entorhinale Fasern zu diesem Zeitpunkt bereits im Gyrus dentatus terminieren. Am P25 (D) sind alle afferenten sowie die intrinsischen Projektionen des Hippocampus deutlich Black Gold positiv. CA: Cornu ammonis; gcl: Körnerzellschicht; ml: Molekularschicht; slm: Stratum lacunosum-moleculare; hi: Hilus; EC: Entorhinaler Cortex, sr: Stratum radiatum; pcl: Pyramidenzellschicht. Maßstab in D₁ für alle Übersichtsaufnahmen: 800 µm; Maßstab in D₅ für alle Vergrößerungen: 30 µm.

In Abbildung 4 ist das Auftreten myelinisierter Fasern im sich entwickelnden Hippocampus mittels des Farbstoffes Black Gold dargestellt. Am postnatalen Tag 5 (P5) konnte man eine diffuse Färbung in der hippocampalen Formation, vor allem in der weißen Substanz, wie dem Alveus und dem Stratum radiatum, erkennen (Abb. 4 A₁, A₄). Der temporale Cortex hingegen zeigte im selben Entwicklungsstadium keine Färbung (Abb. 4 A₅). Auch 12 Tage post partum (P12) waren im Hippocampus und im temporalen Cortex noch keine BG-positive Fasern zu finden (Abb. 4 B₁ bis B₅). Das Corpus callosum hingegen imponierte durch seine bereits stark myelinisierten Fasern (Daten nicht gezeigt). Die ersten myelinisierten Axone im Hippocampus konnten am postnatalen Tag 17 (P17) dargestellt werden (Abb. 4 C). Diese waren vornehmlich in den Strata oriens und radiata der CA Regionen und im Temporallappen zu finden (Abb. 4 C₁, C₃- C₅). Die Molekularschicht des Gyrus dentatus hingegen weist noch keine myelinisierten Fasern auf (Abb. 4 C₂). Die Anzahl BG-positiver Axone stieg im Laufe der Entwicklung weiter und am P25 waren keine Unterschiede zum adulten Hippocampus mehr erkennbar (Abb. 4 D₁ bis D₅; Abb. 5).

5.1.3 Das Verteilungsmuster von myelinisierten Fasern im adulten Hippocampus

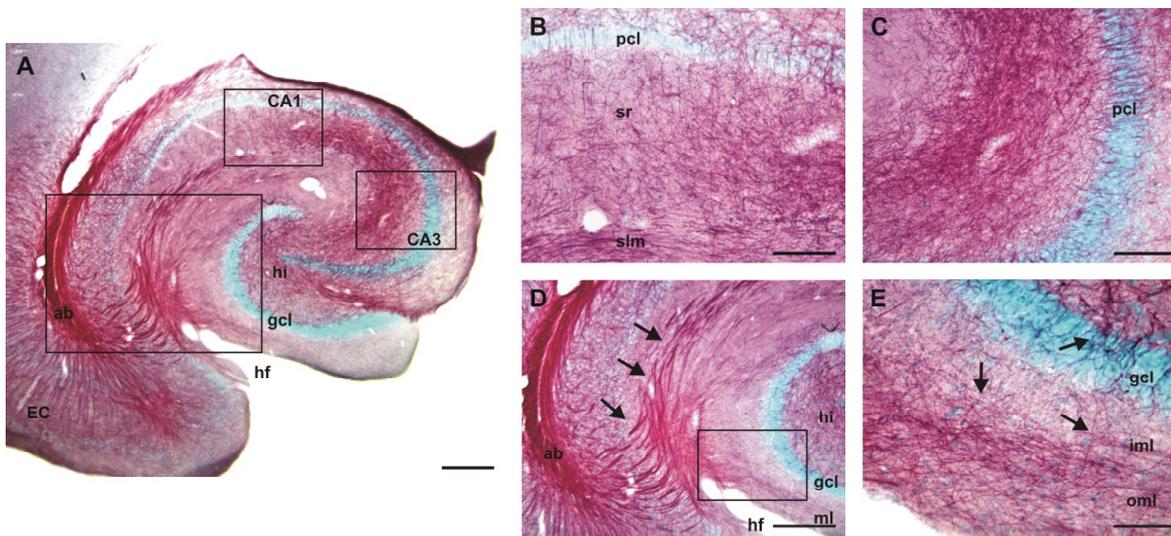


Abbildung 5:

Myelinisierte Fasern im adulten Hippocampus dargestellt mittels der Black Gold (BG) Färbung: BG-positive Fasern imponieren durch eine braun-rote Farbe. Nervenzellkörper sind BG-negativ und wurden mit Malachitgrün gegengefärbt und erscheinen daher in grün. Zu beachten ist die prominente entorhinale Projektion, die im Stratum lacunosum-moleculare des Hippocampus verläuft (A, D). Viele Fasern überkreuzen die hippocampale Fissur, um in der Molekularschicht des Gyrus dentatus zu terminieren (A, D, E). Im Stratum radiatum ist auf die Schaffer- Kollateralen und den Moosfasertrakt mit seinem Ursprung in der Körnerzellschicht zu achten, die ebenfalls eine intensive BG- Färbung aufweisen (A-E). Auch die kommissuralen Fasern in der inneren Molekularschicht sind BG-positiv (E). (B) und (C) sind höhere Vergrößerungen der CA1 bzw. CA3 Region aus der Übersichtsaufnahme (A). (E) ist ein Beispiel der Molekularschicht des Gyrus dentatus. CA: cornu ammonis; hf: hippocampale Fissur; hi: Hilus; gcl: Körnerzellschicht; ml: Molekularschicht; iml: innere ml; oml: äußere ml; pcl: Pyramidenzellschicht. Maßstab in A: 900 µm, B: 60 µm, C: 60 µm, D: 520 µm, E: 35 µm.

Die Verteilung myelinisierter Fasern in der adulten hippocampalen Formation ist in Abbildung 5 dargestellt. Der myelinisierte Tractus perforans ist klar zu erkennen. Er nimmt seinen Ursprung in den Schichten II und III des entorhinalen Cortex (EC). Der Hauptteil terminiert im Stratum lacunosum-moleculare (Abb. 5 A, B, D). Ein weiterer Teil führt vorbei an den Pyramidenzellen des Subiculus, überquert die hippocampale Fissur und endet in der äußeren Molekularschicht des Gyrus dentatus (Abb. 5 A, D, E). Eine weiterer Faserverlauf mit Ursprung im Hilus ist in (C) deutlich dargestellt. Er verläuft im Stratum radiatum der CA3 Region, um an der Grenze von CA2 zu CA3 zu terminieren (Abb. 5 A, C). Dieser Verlauf entspricht exakt der Moosfaserprojektion.

5.1.4 Das Verteilungsmuster von Myelin nach axonaler Schädigung

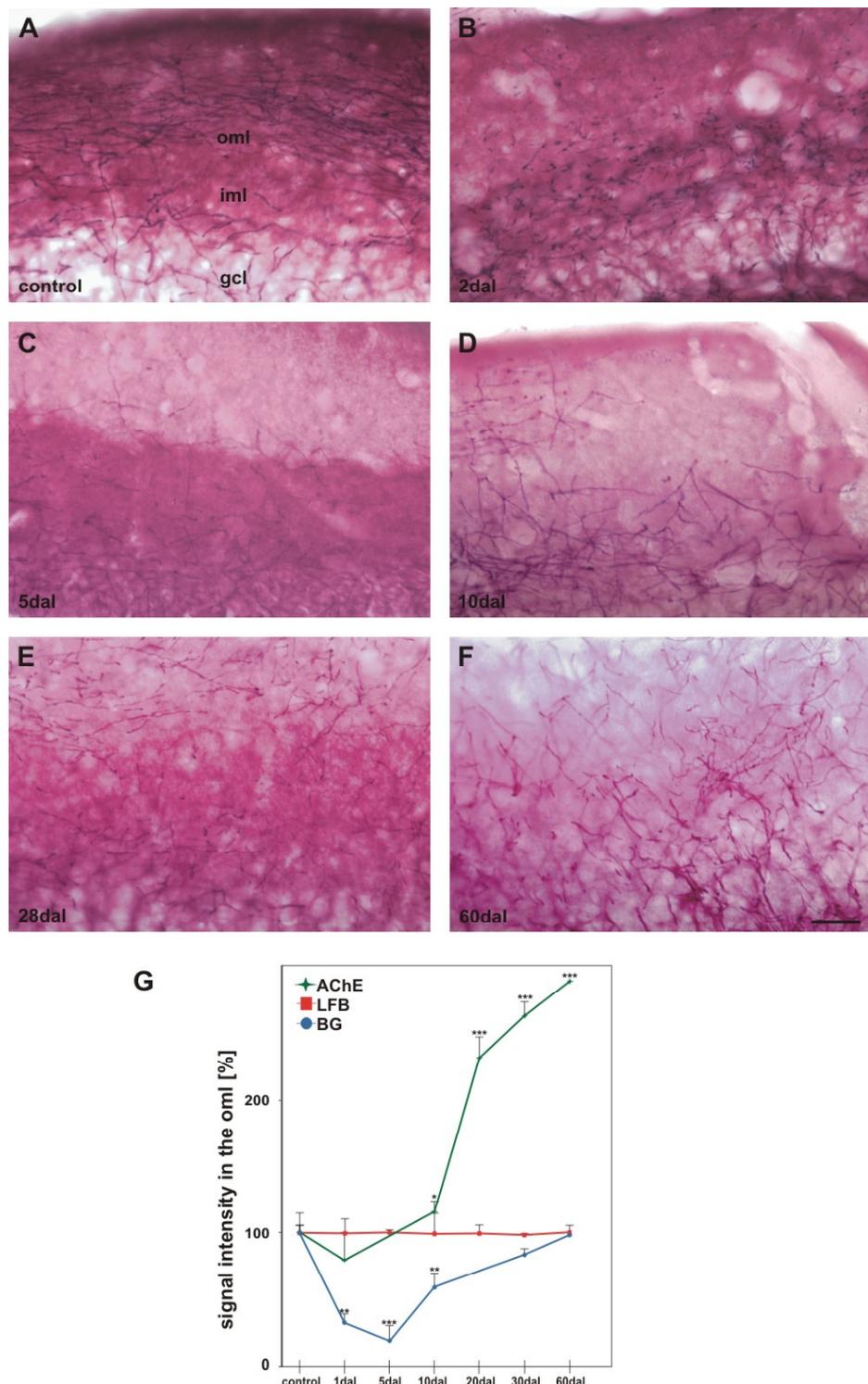


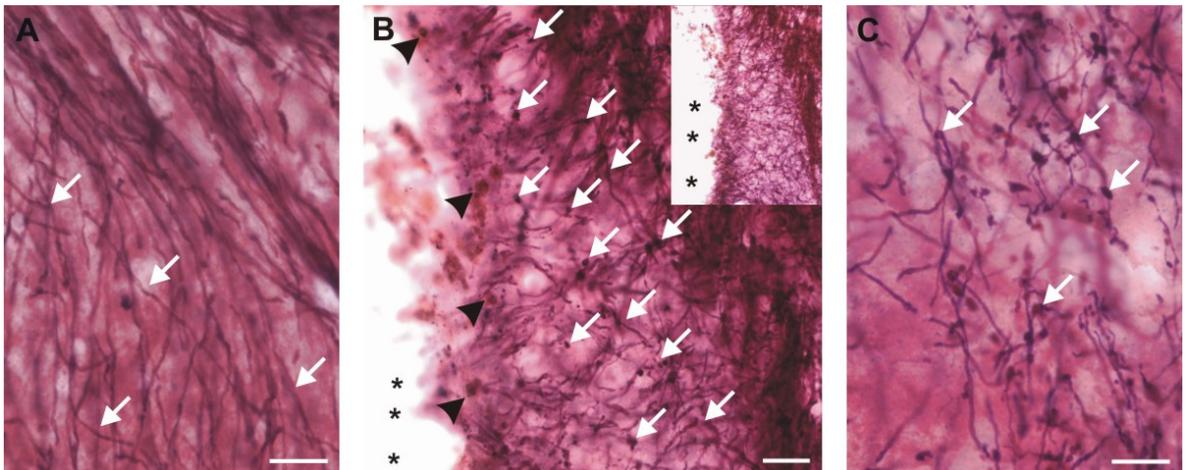
Abbildung 6:

Black Gold (BG)- positive Fasern in der Molekularschicht des Gyrus dentatus nach entorhinaler Cortex Läsion: In den Kontrolltieren sind myelinisierte Fasern in der gesamten

Molekularschicht anzutreffen (A). Zwei Tage nach Durchtrennung des Tractus perforans hat sich die Anzahl BG-positiver Axone extrem verringert, wobei vor allem die normalerweise horizontal verlaufenden Fasern der äußeren Molekularschicht (OML) verschwunden sind (B, G). 5 dal scheint die OML frei von myelinisierten Axonen zu sein (C, G). Zehn Tage nach Läsion (10 dal) kommt es zu einem Wiederkehren BG-positiver Fasern in der Molekularschicht (D, G). Deren Anzahl steigt in den weiteren Überlebenszeiten und erreicht den Kontrollwert 60 Tage nach Läsion (60 dal) (A, E, F G). In (G) ist die Quantifizierung der De- und Reorganisationsvorgänge im Hippocampus nach Läsion mittels Luxol Fast Blue (LFB), Acetylcholinesterase (AChE) und Black Gold (BG) dargestellt. Dabei wird der prozentuale Anteil der Signaldichte der OML zur gesamten ML angezeigt. Die Signifikanzen sind mit Sternen markiert (\pm S.D. $P^* < 0,05$; $P^{**} < 0,01$; $P^{***} < 0,001$, gemessen mit dem Mann-Whitney *U*-test). Mittels LFB Färbung kann nach Läsion keine Änderung der Signaldichte detektiert werden. AChE-positive Fasern verringern sich in den frühen Überlebenszeiten, steigen aber ab 10 dal signifikant an und bleiben auch 60 dal erhöht. gcl: Körnerzellschicht; IML: innere Molekularschicht; OML: äußere Molekularschicht. Maßstab in F: 10 μ m.

Mit dem spezifischen Myelinfarbstoff Black Gold war es möglich, die feinen myelinisierten Fasern der Molekularschicht des Gyrus dentatus zu detektieren (Abb. 6). Zwei Tage nach entorhinaler Cortex Läsion (2 dal) war ein Großteil der vornehmlich horizontal verlaufenden Fasern der äußeren Molekularschicht (OML) verschwunden (Abb. 6 A, B, G). Erste wiederkehrende Fasern waren zehn Tage nach Deafferenzierung (10 dal) in der OML zu beobachten (Abb. 6 D, G). In den späteren Läsionsstadien stieg der Anteil myelinisierter Fasern, so dass 60 dal kein quantitativer Unterschied mehr zu den Kontrolltieren bestand (Abb. 6 E- G). Die Dichte des Sproutingmarkers AChE in der OML nahm in den frühen Überlebenszeiten ab, erreichte 5 dal den Kontrollwert und stieg 10 dal signifikant an (Abb. 6 G). Die Intensität von Acetylcholinesterase (AChE)-positiven Fasern war auch 60 dal noch erhöht. Im Gegensatz dazu konnte mit dem Myelinfarbstoff Luxol Fast Blue (LFB) keine Intensitätsveränderungen festgestellt werden (Abb. 6 G).

5.1.5 Pathologisches Myelin nach Schädigung

**Abbildung 7:**

Pathologisches Myelin nach Schädigung. (A) zeigt eine hohe Vergrößerung eines Ausschnittes aus dem entorhinalen Cortex eines Kontrolltieres. Die Pfeile weisen auf die von scharf begrenztem Myelin umgebenen Axone. (B) zeigt die von der Läsion betroffene Zone zehn Tage nach Läsion. (C) zeigt eine höhere Vergrößerung aus (B). Sternchen markieren die Stelle der Durchtrennung des Tractus perforans. Die Pfeilspitzen deuten auf die eingewanderten Blutzellen hin. Das Myelin wirkt geschwollen, teilweise umgibt es das verbliebene Axon perlschnurartig (B,C). Maßstab in A: 10 μm ; in B: 21 μm ; in C: 7 μm .

Myelinisierte Fasern verschwanden zwar aus der äußeren Molekularschicht des Gyrus dentatus (Abb. 6); in unmittelbarer Nähe der axotomierten Neurone fanden sich aber eindeutig pathologische Myelinstrukturen (Abb. 7 B, C). Am distalen Ende der axotomierten Fasern befanden sich große, BG-positive Schwellungen. Die anterograd degenerierten Fasern zeigten eine verschwommene Skizzierung mit einer perlschnurartigen Aufreihungen von Blasen entlang ihrer distalen Segmente (Abb. 7 B, C). Diese Veränderungen wurden in keinem der Kontrolltiere gefunden (Abb. 5, 7 A).

5.2 Isoform-spezifische Expression der Nogo Gene im Hippocampus

5.2.1 Nogo-A, -B, -C, -66R und MBP mRNA Expression während der hippocampalen Entwicklung

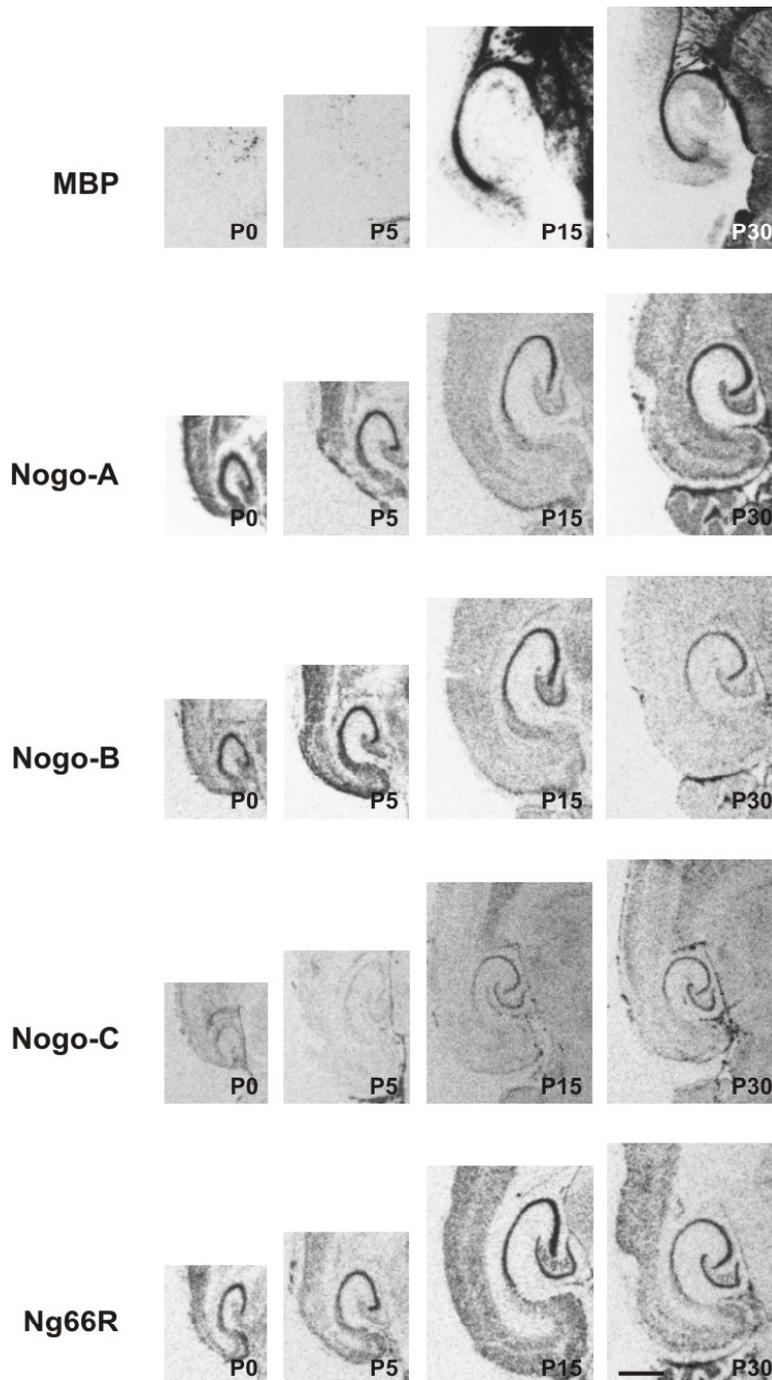


Abbildung 8

Expression der Nogo Gene und von MBP im sich entwickelnden Hippocampus. Dargestellt ist die *in situ* Hybridisierung von horizontalen Schnitten in verschiedenen postnatalen Entwicklungsstadien. Nogo-A, -B und -66R mRNA wird bereits am postnatalen Tag 0 (P0) von den hippocampalen Neuronen exprimiert. Nogo-C mRNA ist erst am P15 signifikant nachweisbar. Am P30 sind alle Nogo Transkripte sowie deren Rezeptor in den neuronalen Zellschichten des Hippocampus nachweisbar, wobei Nogo-A mit dem stärksten Signal imponiert. Im Gegensatz dazu ist die MBP mRNA erstmals am P15 im Neuropil nachweisbar; kein Hybridisierungssignal hingegen zeigt sich in den Neuronen. Am P30 ist MBP in den Strata lacunosa- moleculare, Strata oriens und vor allem in der Fimbria und der vorderen Kommissur nachweisbar. Maßstab: 900 µm.

Nogo-A, -B und -66R mRNA wurde im sich entwickelnden Hippocampus erstmalig am postnatal Tag 0 (P0) detektiert, dem ersten untersuchten Zeitstadium (Abb. 8). Ein deutliches Hybridisierungssignal zeigte sich in den Pyramidenzellen der CA1 bis CA3 Regionen und ein schwächeres im Präsubiculum. In der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus konnte nur eine leichte mRNA Expression entdeckt werden. Kein Hybridisierungssignal fand sich in der Molekularschicht, den Strata lucidum, radiatum, lacunosum- moleculare und oriens. Die mRNA Expression von Nogo-A und Nogo- 66R verblieb von P15 bis zur Adoleszenz unverändert, nur in der Hilus Region verringerte sich die Ng-66R mRNA Konzentration. Nogo-B Transkript wurde bis zur Adoleszenz in allen hippocampalen Neuronen gefunden, seine Konzentration verringerte sich aber vor allem im Cortex und im Subiculum. Eine deutliche Nogo-C mRNA Expression konnte erstmals in den neuronalen Zellschichten des Gyrus dentatus und der CA1 bis CA3 Region am P15 nachgewiesen werden. In der Hilus Region und im Entorhinalen Cortex zeigte sich nur ein sehr schwaches Signal. Dieses Expressionsmuster blieb bis zur Adoleszenz unverändert.

Im Gegensatz zu der neuronalen Expression der Nogo Gene wurde MBP mRNA in keiner Zellschicht des Hippocampus gefunden. Das erste Signal konnte am P15 im hippocampalen Neuropil detektiert werden. Am stärksten imponierte es in den Strata oriens und radiata der CA Regionen (Abb. 8).

5.2.2 Nogo-A mRNA Expression in den Neuronen der hippocampalen Formation

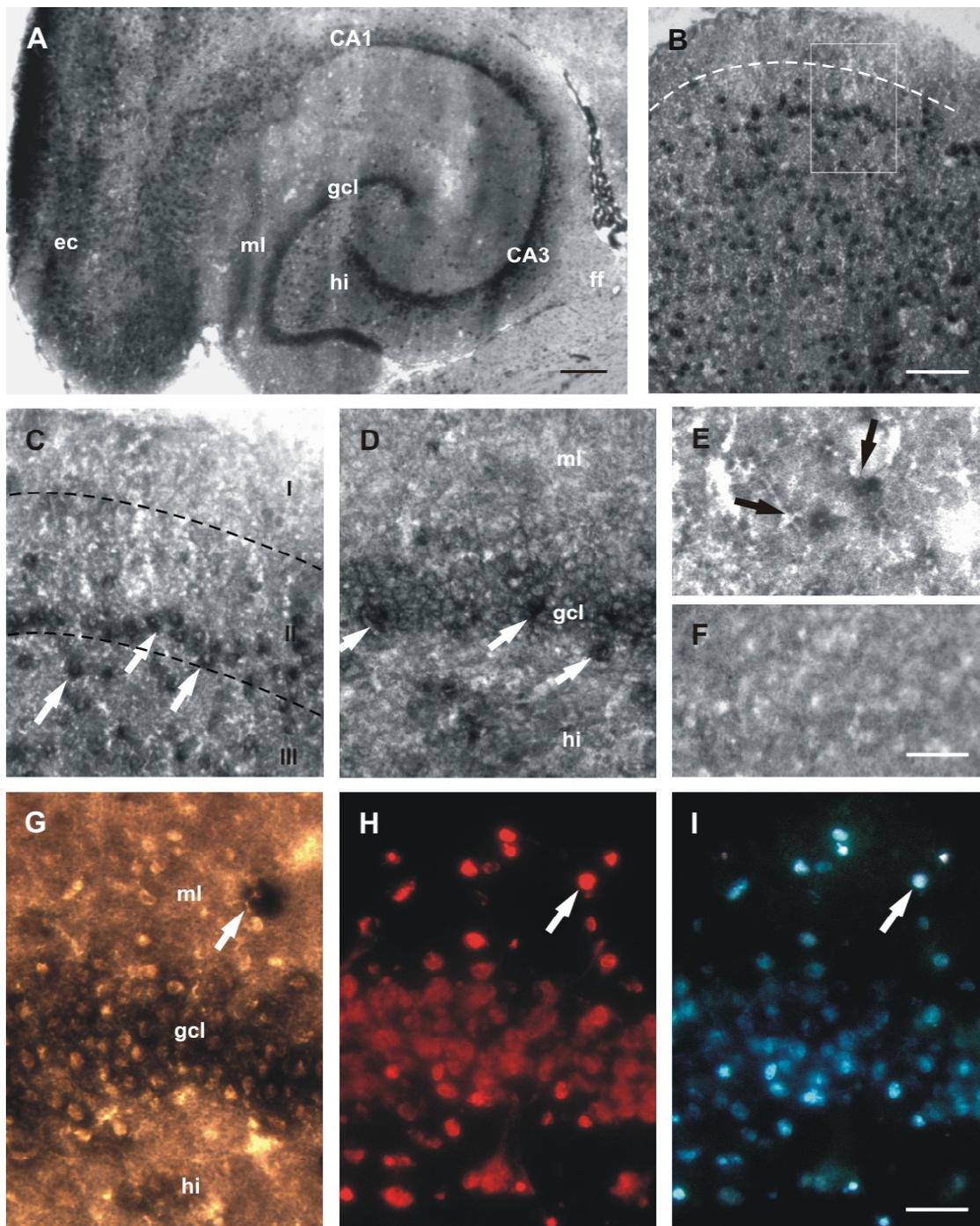


Abbildung 9:

Zelluläres Verteilungsmuster von Nogo-A mRNA im adulten Hippocampus. (A) zeigt in der Übersichtsaufnahme das nicht radioaktive Hybridisierungsmuster von Nogo-A mRNA in der hippocampalen Formation. Nogo-A exprimierende Neurone befinden sich in den Schichten II und III, nicht aber in der Schicht I des Entorhinalen Cortex (B, C). (C) ist eine höhere Vergrößerung aus

(B). Pfeile verweisen auf die stark gefärbten Neurone der Schicht II und III. Nogo-A mRNA positive Neurone finden sich auch in der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus, während die Molekularschicht ausgespart bleibt (D). (E) ist eine Vergrößerung der Fimbria fornix aus (A). In der weißen Schicht kann dort Nogo-A mRNA in Oligodendrozyten gefunden werden (Pfeile). (F) zeigt die sense Probe, auf der kein Hybridisierungssignal gefunden werden kann. Der Pfeil in (G) zeigt eine Nogo-A exprimierende Zelle im Gyrus dentatus, (H) die korrespondierende Nissl Färbung und (I) die Kernfärbung. ec: Entorhinaler Cortex; gcl: Körnerzellschicht; ml: Molekularschicht; hi: Hilus; CA: Cornu ammonis; ff: fimbria fornix. Maßstab in A: 200 µm; in B: 40 µm; in F (für C, D, E, F): 35 µm; in I (für G, H, I): 20 µm.

Mit der radioaktiven *in situ* Hybridisierung konnte gezeigt werden, dass die Nogo Gene und deren Rezeptor in den neuronalen Zellbänden des Hippocampus exprimiert werden. Da mittels der nicht-radioaktiven *in situ* Hybridisierung die zelluläre Verteilung detaillierter untersucht werden kann und zusätzlich die Möglichkeit einer Co-Lokalisation besteht, wurde sie anschließend für Nogo-A durchgeführt (Abb. 9). Nogo-A Transkript wurde in den Pyramiden- und Körnerzellen des Hippocampus, in den entorhinalen Neuronen der Schichten II- IV, aber auch in den Oligodendrozyten der weißen Substanz gefunden (Abb. 9 A, E). Die Nissl- positiven Körnerzellen des Gyrus dentatus gaben ein starkes Hybridisierungssignal, währenddessen im hippocampalen Neuropil nur wenige Nogo-A positive Zellen gefunden wurden (Abb. 9 D).

5.2.3 Nogo-A, -B, -C und Ng-66R mRNA Expression nach Entorhinaler Cortex Läsion

Nogo-A

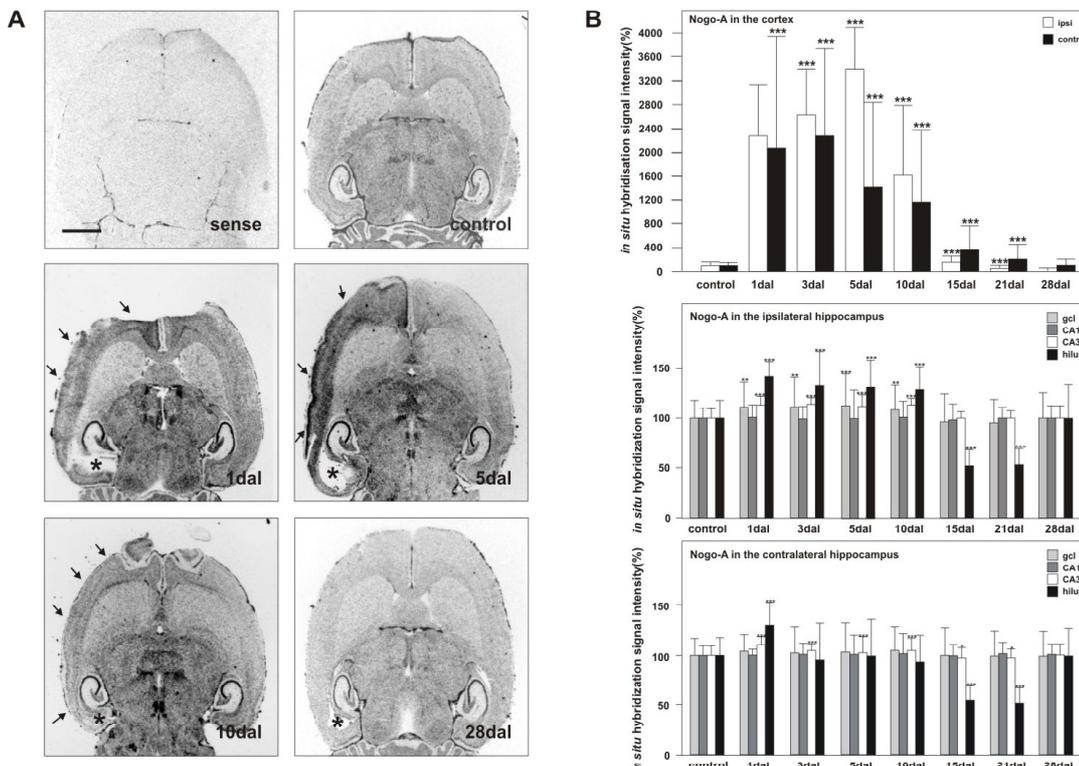


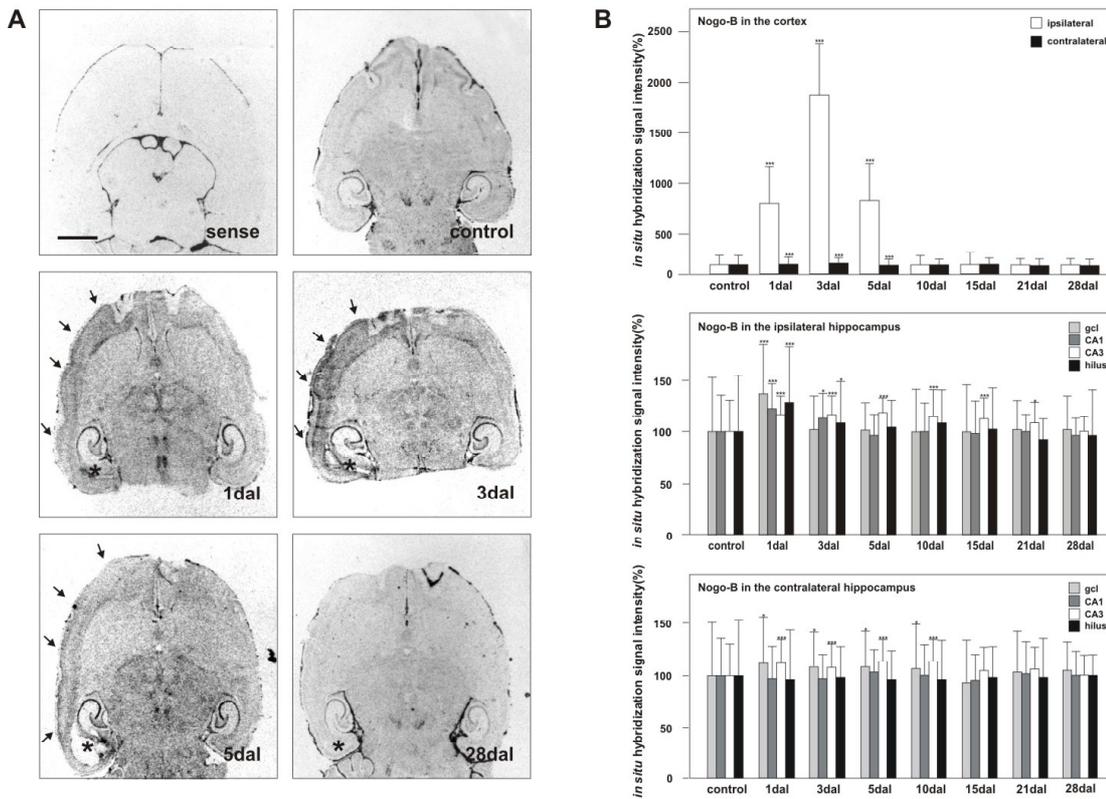
Abbildung 10:

Expressionsmuster und quantitative Auswertung von Nogo-A mRNA im Rattengehirn nach Läsion. (A) zeigt die Expression von Nogo-A Transkripten auf horizontalen Gehirnschnitten einer unlädierten Kontrolle, 1 Tag nach Entorhinaler Cortex Läsion (1 dal), 5 dal, 10 dal und 28 dal, die mit der radioaktiven *in situ* Hybridisierung mit dem Nogo-A I Oligonukleotid detektiert wurde. Pfeile markieren die Expressionsänderungen im ipsilateralen Cortex. Eine starke Hochregulierung in der CA Region, dem DG und Hilus ist bereits 1 dal zu sehen. 10 dal hat die mRNA Konzentration in den CA Regionen bereits die Kontrollwerte erreicht, in den Hilusregionen aber zeigt sich eine signifikante Runterregulation. 28 dal sind in allen Regionen keine Konzentrationsunterschiede zu den Kontrollwerten mehr zu verzeichnen. Die sense Probe wurde mit einem Überschuss an unmarkiertem Oligonukleotid durchgeführt. Die Sterne markieren die Stelle der Läsion. Maßstab: 3,75 mm.

(B) zeigt die quantitative Auswertung der Nogo-A mRNA Expression im ipsi- und contralateralen Cortex und im Hippocampus. Die zeitliche Änderung der mRNA Expression nach ECL wurde mittels *in situ* Hybridisierung und einer anschließenden densitometrischen Messung für folgende Regionen ausgewertet: Cortex, Körnerzellschicht (gcl); Pyramidenzellschicht der CA1 und CA3

Region und Hilus. In jeder Gruppe wurden 6 unterschiedliche Tiere ($n= 12$) gemessen. Der Mittelwert von 15 Messungen wurde ermittelt und dieser zusammen mit der jeweiligen Standardabweichung als Prozentangabe zu der auf 100% normierten Kontrollgruppe dargestellt. Statistische Signifikanzen sind mit Sternen markiert ($P^* < 0,05$; $P^{**} < 0,01$; $P^{***} < 0,001$; Mann-Whitney *U*- Test). Diese zeigen die Signifikanz einer Konzentrationsänderung des jeweiligen Wertes gegenüber der mRNA Konzentration der Kontrollwerte.

In den adulten Kontrolltieren wurde Nogo-A mRNA vornehmlich in den Pyramidenzellen der CA1 bis CA3 Regionen und zu einem geringeren Anteil auch im Gyrus dentatus exprimiert (Abb. 10). Bereits 1 Tag nach Entorhinaler Läsion (1 dal) wurde eine massive Hochregulation der mRNA deutlich. Eine mehr als 20fache Steigerung konnte im ipsi- aber auch im contralateralen Cortex zu diesem Zeitpunkt gemessen werden. Das Maximum wurde auf der contralateralen Seite 3 dal erreicht und auf der ipsilateralen Seite 5 dal, wo die Nogo-A mRNA Konzentration um das 34fache erhöht war (Fig. 10 A, B). 28 dal erreichte die mRNA Konzentration im ipsi- und contralateralen Cortex die Kontrollwerte. Die ipsilaterale Körnerzellschicht zeigte ebenfalls 1 dal eine signifikante Hochregulation der Nogo-A mRNA, die bis 10 dal bestehen blieb und bereits 15 dal die Ausgangswerte wieder erreichte. Die Körnerzellen der contralateralen Seite zeigten keine Veränderungen der Nogo-A mRNA Konzentration. Während es in den Pyramidenzellen der CA1 Region auf keiner Seite der Läsion zu einer Konzentrationsänderung kam, zeigten die Pyramidenzellen der CA3 Region schon 1 dal eine signifikante Hochregulation, die auf der ipsilateralen Seite bis 10 dal und auf der contralateralen Seite sogar bis 21 dal anhielt. Die Hilus Region beider Seiten zeigte bereits 1 dal eine 30fache Erhöhung der Nogo-A mRNA Konzentration, anschließend kam es aber 15 dal und 21 dal zu einer massiven Runterregulation, so dass die Konzentration unter die Kontrollwerte fiel. Diese wurden erst 28 dal erreicht (Abb. 10 A, B).

Nogo-B**Abbildung 11:**

Expressionsmuster und quantitative Auswertung von Nogo-B mRNA im Rattengehirn nach Läsion. (A) zeigt die Expression von Nogo-B Transkripten auf horizontalen Gehirnschnitten einer unlädierten Kontrolle, 1 Tag nach Entorhinaler Cortex Läsion (1 dal), 3 dal, 5 dal und 28 dal, die mit der radioaktiven *in situ* Hybridisierung mit dem Nogo-B Oligonucleotid detektiert wurde. Die sense Probe zeigt einen adulten Gehirnschnitt, der mit einem 100fachen Überschuß an unmarkierten Oligonucleotid durchgeführt wurde. Die Sterne markieren die Stelle der Läsion. Pfeile weisen auf die starke Hochregulation im ipsilateralen Cortex hin. 1 dal kommt es in allen Zellschichten des Hippocampus zu einer signifikanten Erhöhung der Nogo-B mRNA Konzentration, die sich in späteren Überlebensstadien wieder reduziert. Auf eine Abbildung von 10 dal wurde zu Gunsten der früheren Überlebensstadien verzichtet. Maßstab: 3,75 mm.

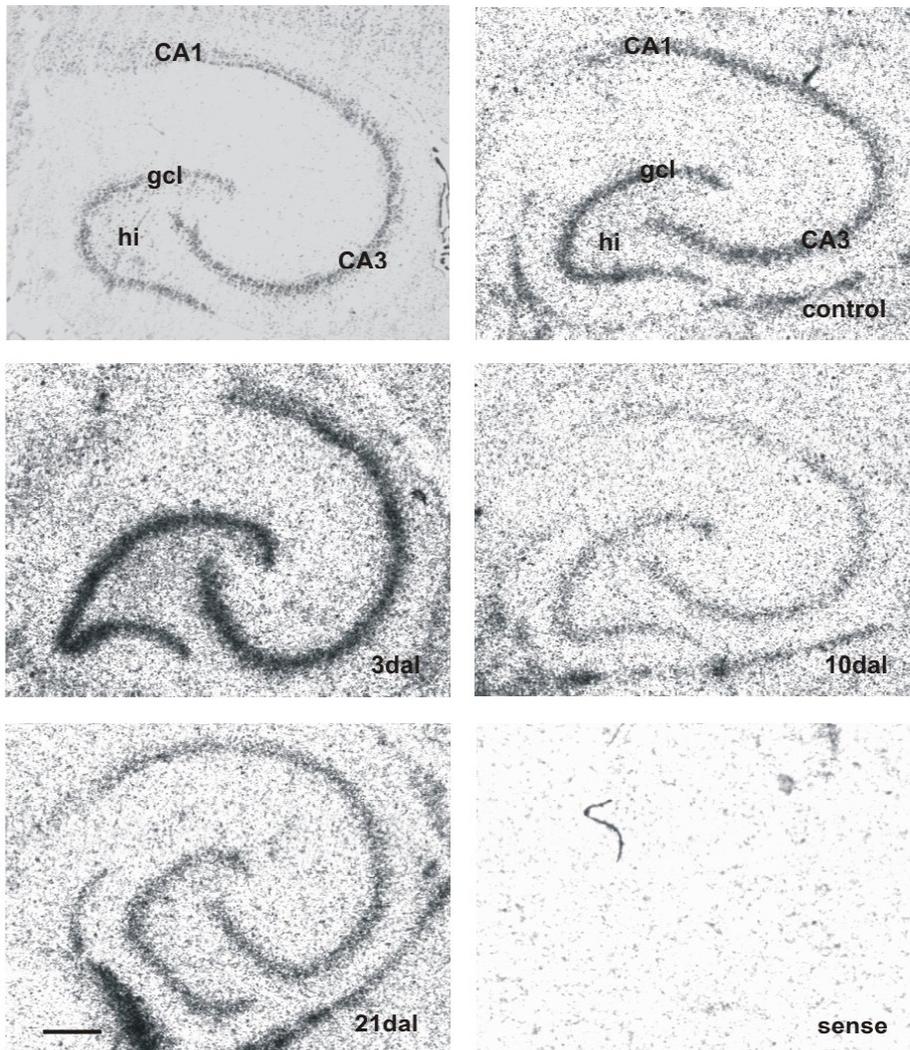
(B) zeigt die quantitative Auswertung der Nogo-B mRNA Expression im ipsi- und contralateralen Cortex und im Hippocampus. Die zeitliche Änderung der mRNA Expression nach ECL wurde mittels *in situ* Hybridisierung und einer anschließenden densitometrischen Messung für folgende Regionen ausgewertet: Cortex, Körnerzellschicht (gcl); Pyramidenzellschicht der CA1 und CA3 Region und Hilus. In jeder Gruppe wurden 6 unterschiedliche Tiere (n= 12) gemessen. Der Mittelwert von 15 Messungen wurde ermittelt und dieser zusammen mit der jeweiligen Standardabweichung als Prozentangabe zu der auf 100% normierten Kontrollgruppe dargestellt.

Statistische Signifikanzen sind mit Sternen markiert ($P^* < 0,05$; $P^{**} < 0,01$; $P^{***} < 0,001$; Mann-Whitney *U*- Test). Diese zeigen die Signifikanz einer Konzentrationsänderung des jeweiligen Wertes gegenüber der mRNA Konzentration der Kontrollwerte.

Das Hybridisierungssignal von Nogo-B war im Vergleich zu Nogo-A weniger prominent (Abb. 10, 11). Die höchste mRNA Konzentration im adulten Kontrolltier konnte in den Pyramidenzellen der CA Regionen detektiert werden. Bereits 1 Tag nach entorhinaler Cortex Läsion (1 dal) kam es im ipsilateralen Cortex zu einer starken Hochregulierung, die ihr Maximum 3 dal mit einer 20fachen Erhöhung gegenüber den Kontrollwerten erreichte. 10 dal waren die Ausgangswerte wieder erreicht. Der contralaterale Cortex zeigte nur eine dezente, aber signifikante Hochregulierung in den frühen Überlebensstadien (Abb. 11 A, B). Eine signifikante Hochregulierung wurde in allen hippocampalen Zellschichten in den frühen Überlebensstadien beobachtet, sie erreichten die Kontrollwerte in der Zeit, in der axonales Auswachsen (Sprouting) sein Maximum erreicht. Die ipsilaterale Körnerzellschicht und die Hilusgegend zeigten 1 dal ihr höchstes Hybridisierungssignal, welches sich 15 dal wieder auf die Ausgangswerte reduziert hatte. Die Pyramidenzellen der CA Regionen derselben Seite zeigten ebenfalls 1 dal ein Maximum an Nogo-B mRNA. Während die mRNA Konzentration der CA1 Region bereits 5 dal die Kontrollwerte erreicht hatte, blieben sie in der CA3 Region bis 21 dal signifikant erhöht. Auf der contralateralen Seite zeigten die Körner- und die Pyramidenzellen der CA3 Region eine signifikante Erhöhung des Nogo-B Transkriptes zwischen 1 und 10 dal. Die anderen untersuchten Regionen blieben unverändert (Abb. 11).

Nogo-C

A



B

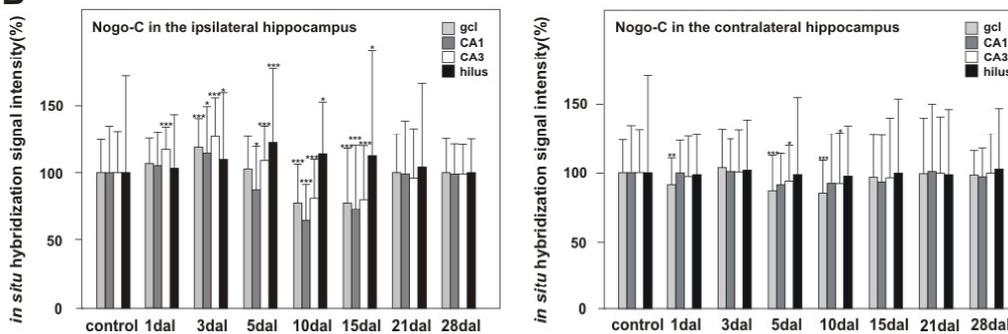


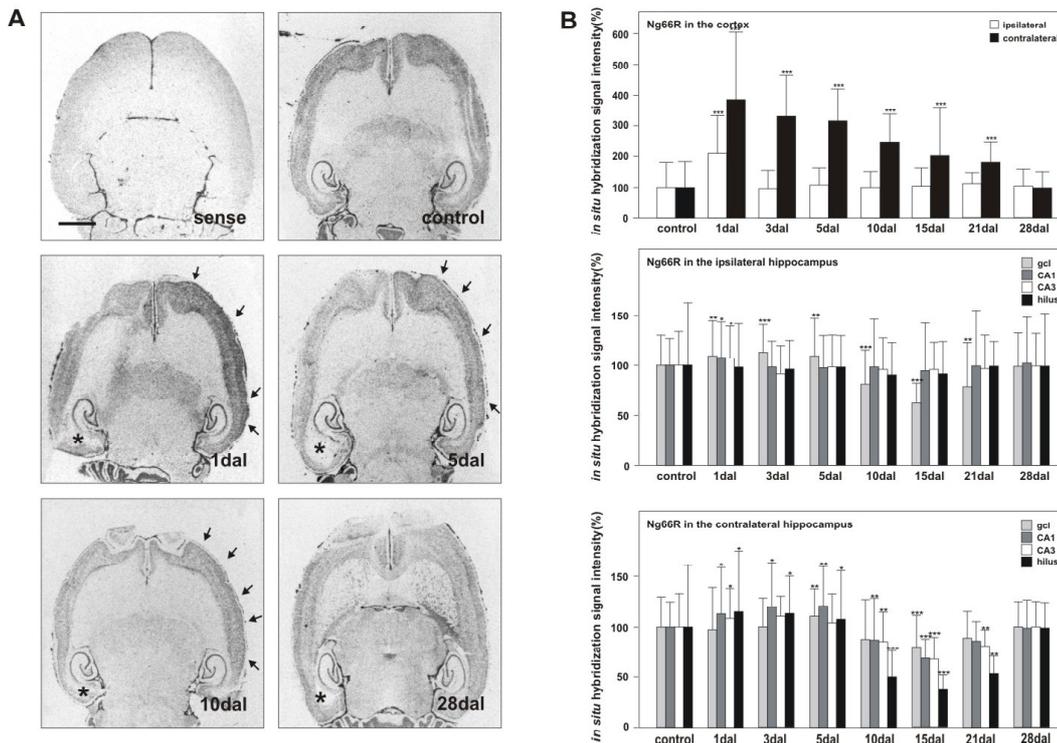
Abbildung 12:

Expressionsmuster und quantitative Auswertung von Nogo-C mRNA im Hippocampus nach Läsion. (A) zeigt die Expression von Nogo-C Transkript horizontal angeschnittener Hippocampi einer unlädierten Kontrolle, 3 Tag nach Entorhinaler Cortex Läsion (3 dal), 10 dal, 21 dal und 28

dal, die mit der radioaktiven *in situ* Hybridisierung mit dem Nogo-C Oligonukleotid detektiert wurde. Die sense Probe wurde mit einem Überschuß an unmarkiertem Oligonukleotid durchgeführt. Die korrespondierende Nissl-Färbung ist ebenfalls dargestellt. Eine starke Erhöhung des Hybridisierungssignals ist in allen Zellregionen des ipsilateralen Hippocampus 3 dal zu sehen. Eine signifikante Runterregulation wird 10 dal deutlich. Die Ausgangswerte werden 21 dal erreicht. Hi: Hilus; gcl: Körnerzellschicht; CA: Cornu ammonis. Maßstab: 400µm.

(B) zeigt die quantitative Auswertung der Nogo-C mRNA Expression im ipsi- und contralateralen Hippocampus. Die zeitliche Änderung der mRNA Expression nach ECL wurde mittels *in situ* Hybridisierung und einer anschließenden densitometrischen Messung für folgende Regionen ausgewertet: Körnerzellschicht (gcl); Pyramidenzellschicht der CA1 und CA3 Region und Hilus. In jeder Gruppe wurden 6 unterschiedliche Tiere (n= 12) gemessen. Der Mittelwert von 15 Messungen wurde ermittelt und dieser zusammen mit der jeweiligen Standardabweichung als Prozentangabe zu der auf 100% normierten Kontrollgruppe dargestellt. Statistische Signifikanzen sind mit Sternen markiert ($P^* < 0,05$; $P^{**} < 0,01$; $P^{***} < 0,001$; Mann-Whitney *U*-Test). Diese zeigen die Signifikanz einer Konzentrationsänderung des jeweiligen Wertes gegenüber der mRNA Konzentration der Kontrollwerte.

Nogo-C mRNA wurde zu keinem Zeitpunkt nach ECL im Cortex der ipsi- oder contralateralen Seite reguliert (Daten nicht gezeigt). Die Nogo-C mRNA Konzentration der ipsilateralen hippocampalen Zellregionen begann während der frühen Überlebensstadien zu steigen und erreichte ihr Maximum 3 dal (Abb. 12 A, B). Mit Ausnahme der Hilus Region sank die Konzentration von Nogo-C Transkript 10 und 15 dal unter die der Kontrollwerte, um diese 28 dal wieder zu erreichen (Abb. 12 A, B).

Ng-66R**Abbildung 13:**

Expressionsmuster und quantitative Auswertung von Ng-66R mRNA im Rattegehirn nach Läsion. (A) zeigt die Expression von Ng-66R Transkripten auf horizontalen Gehirnschnitten einer unlädierten Kontrolle, 1 Tag nach Entorhinaler Cortex Läsion (1 dal), 5 dal, 10 dal und 28 dal, die mit der radioaktiven *in situ* Hybridisierung mit dem Ng-66R Oligonukleotid detektiert wurde. Pfeile markieren die Expressionsänderungen im contralateralen Cortex. Die Sterne markieren die Stelle der Läsion. Die sense Probe wurde mit einem Überschuß an unmarkiertem Oligonukleotid durchgeführt. Maßstab: 3,75 mm.

(B) zeigt die quantitative Auswertung der Ng-66R mRNA Expression im ipsi- und contralateralen Cortex und im Hippocampus. Die zeitliche Änderung der mRNA Expression nach ECL wurde mittels *in situ* Hybridisierung und einer anschließenden densitometrischen Messung für folgende Regionen ausgewertet: Cortex, Körnerzellschicht (gcl); Pyramidenzellschicht der CA1 und CA3 Region und Hilus. In jeder Gruppe wurden 6 unterschiedliche Tiere ($n=12$) gemessen. Der Mittelwert von 15 Messungen wurde ermittelt und dieser zusammen mit der jeweiligen Standardabweichung als Prozentangabe zu der auf 100% normierten Kontrollgruppe dargestellt. Statistische Signifikanzen sind mit Sternen markiert ($P^* < 0,05$; $P^{**} < 0,01$; $P^{***} < 0,001$; Mann-Whitney *U*-Test). Diese zeigen die Signifikanz einer Konzentrationsänderung des jeweiligen Wertes gegenüber der mRNA Konzentration der Kontrollwerte.

Die Ng-66R mRNA wurde nach Läsion im Cortex signifikant hochreguliert (Abb. 13 A, B). Obwohl auf beiden Seiten 1 dal das jeweilige Konzentrationsmaximum erreicht wurde, sank die Konzentration auf der ipsilateralen Seite bereits 3 dal auf Kontrollniveau, während die Werte auf der kontralateralen Läsionsseite bis einschließlich 21 dal signifikant erhöht blieben. Die ipsilaterale Körnerzellschicht und alle kontralateralen Zellschichten zeigten einen biphasischen Konzentrationsverlauf mit einer maximalen Erhöhung 3 dal und einer maximalen Erniedrigung 15 dal. 28 dal wurden die Ausgangswerte wieder erreicht. Die ipsilaterale Hilusregion zeigte zu keinem Zeitpunkt eine Änderung im Gehalt des Ng-66R Transkriptes. Die Pyramidenzellen der ipsilateralen CA1 und CA3 Region zeigten eine dezente Hochregulation 1 dal (Abb. 13 A, B).

5.2.4 Nogo-A mRNA Expression nach Kainat-induziertem Anfall

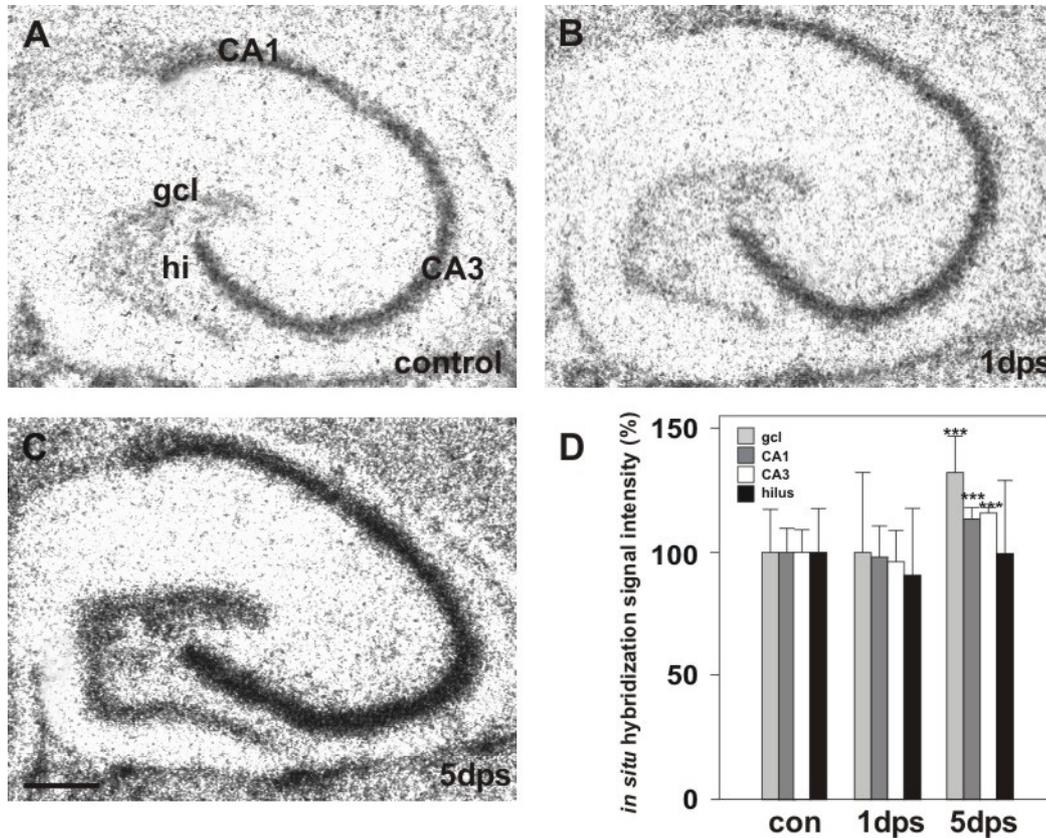


Abbildung 14:

Nogo-A mRNA Expression nach Kainat-induziertem Anfall: (A) zeigt die Nogo-A Expression auf horizontalen Gehirnschnitten der Kontrolltiere (intraperitoneale NaCl- Injektion); (B) ein Tag nach Anfall (1dps), (C) fünf Tage nach Anfall (5dps) und (D) zeigt die quantitative Auswertung der Nogo-A mRNA Expression in den hippocampalen Zellschichten. Eine starke Hochregulation kann in der CA1, CA2 und im DG 5dps beobachtet werden. In jeder Gruppe wurden 5 unterschiedliche Tiere ($n= 10$) gemessen und als Prozentangabe zu der auf 100% normierten Kontrollgruppe dargestellt. Statistische Signifikanzen sind mit Sternen markiert ($P^* < 0,05$; $P^{**} < 0,01$; $P^{***} < 0,001$, Mann-Whitney U - Test). Maßstab: 400 μm .

Die Nogo-A mRNA Expression wurde in einem weiteren Modell der synaptischen Plastizität getestet. Während des ersten Tages nach dem Kainat-induzierten Anfall, in dem neuronale Apoptose und axonale Degeneration dominieren, konnte keine Regulationsänderung gefunden werden (Abb. 14). Aber fünf Tage nach dem Anfall (5dps), also der Zeit, in der es zu einer Reexpression von GAP-43, als Marker für axonales Aussprossen, kommt, wird eine signifikante Hochregulation der Nogo-A mRNA in allen Zellschichten des Hippocampus sichtbar (Abb. 14).

5.2.5 Nogo-A Protein Expression während der Entwicklung und nach Läsion.

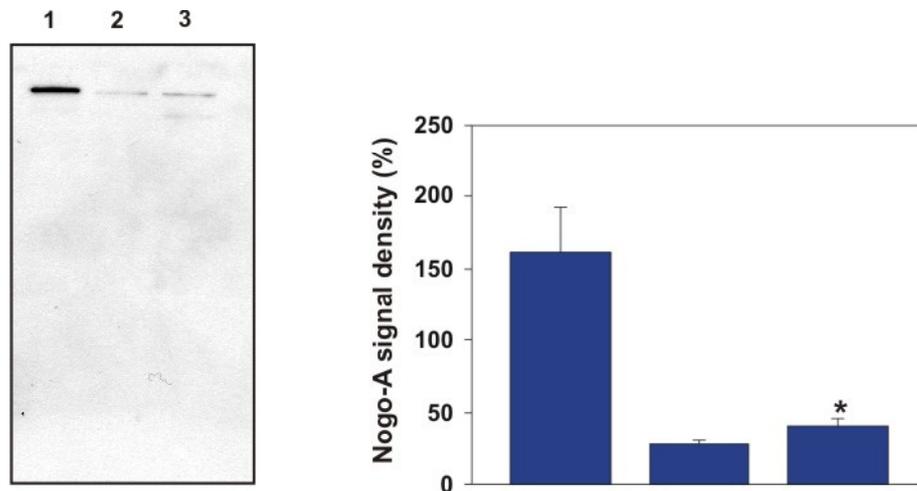


Abbildung 15:

Nogo-A Expression und quantitative Auswertung während der Entwicklung und nach Läsion. Gezeigt wird die Nogo-A Protein Expression und Quantifizierung von Gesamtproteinextrakten aus postnatalem Hippocampus (1), adultem Hippocampus (2) und einem deafferenzierten Hippocampus 5 dal (3). Statistische Signifikanzen sind mit Sternen markiert ($P^* < 0,05$; $P^{**} < 0,01$; $P^{***} < 0,001$; Mann-Whitney U -Test). Als Kontrolle im gleichen Versuchsansatz diente β -Actin (Meier et al., 2003, Fig. 14).

Die starke Hochregulation der Nogo-A mRNA Expression nach ZNS Schädigung führte zu einer signifikanten Erhöhung der Nogo-A Translation im Hippocampus (Abb. 15). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass während der Entwicklung eine gegenüber der Adoleszenz erhöhte Nogo-A Protein Konzentration vorliegt (Abb.15). Der Vergleich der Nogo-A Proteinmenge im sich entwickelnden Hippocampus (P0 vs. A) korreliert gut mit der in der *in situ* Hybridisierung gefundenen Transkription. Die hier gefundenen Befunde deuten also darauf hin, dass eine veränderte Nogo Transkription eine gleichseitig veränderte Nogo Translation nach sich zieht.

6 Diskussion

6.1 Myelinisierung im Hippocampus

Unter der Verwendung mehrerer Myelinmarker wurde das Auftreten myelinisierter Fasern im Hippocampus während der Entwicklung und nach Entorhinaler Cortex Läsion (ECL) untersucht. Während der Entwicklung erreichen die entorhinalen Axone den Hippocampus bereits in der späten embryonalen Phase (Skutella et al., 1999; Stein et al., 1999; Steup et al., 1999); die Myelinisierung hingegen beginnt erst am P5 und ist am P60 abgeschlossen (Savaskan et al., 1999). Nach Axotomie kommt es zu einer spezifischen anterograden Degeneration im Hippocampus, die mit einem Verlust an myelinisierten Fasern und dem Auftreten von pathologischem Myelin einhergeht. Zeitanalysen zeigten, dass die axonale Aussprossantwort nach der ECL mit dem Wiederkehren von myelinisierten Fasern korreliert (Busciglio et al., 1987; Ramirez, 2001; Savaskan & Nitsch, 2001).

6.1.1 Methodische Überlegungen

Myelinstudien, die auf histologischen Techniken basieren, sollten immer mit Vorsicht interpretiert werden, da einzelne Färbungen oft variieren, häufig ein unbekanntes molekulares Substrat gefärbt wird oder komplexe Protokolle mit entsprechend vielen Fehlermöglichkeiten verwendet werden. In dieser Arbeit wurde mit dem modifizierten Gold-Chlorid Farbstoff Black Gold, von Schmued & Slikker 1999 entwickelt, gearbeitet und mit anderen etablierten Techniken verglichen. Mit Hilfe des Proteinase K Verdauung konnte gezeigt werden, dass Black Gold (BG) an Proteinase K-sensitive Myelinproteine bindet. Luxol Fast Blue hingegen zeigt eine hohe Affinität zu nicht löslichen Phospholipiden (Kluver & Barrera; 1957). Die Elektronenmikroskopie zeigte, dass BG-positive Myelinproteine in allen Kompartimenten des Myelins anzutreffen sind. Dies ist von Bedeutung, da Myelinproteine unterschiedliche Verteilungen zeigen. So konzentrieren sich MAG und Nogo-A vor allem in der inneren Schleife, MBP im kompakten Myelin und MOG in der äußeren Schleife. Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass Black Gold-positive Fasern den größten Teil der myelinisierten Fasern repräsentieren. Black Gold stellt daher einen geeigneten Farbstoff zur Detektierung von myelinisierten Fasern im ZNS dar.

6.1.2 Die Myelinisierung im Hippocampus läuft zeitlich geordnet ab

Während der Entwicklung wachsen Axone in den Hippocampus ein und bilden spezifische und schichtengegrenzte Verbindungen (Bayer & Altman, 1990). Diese hippocampale Innervation läuft stark geordnet ab und wird vor allem durch zeitlich spezifisch exprimierte Moleküle reguliert (Frotscher & Heimrich, 1993; Stein et al., 1999; Skutella & Nitsch, 2001). Die stärkste afferente Verbindung des Hippocampus nimmt in den Schichten II und III des entorhinalen Cortex (EC) seinen Ursprung und erreicht schon während der späten embryonalen Entwicklung die äußere Molekularschicht des Gyrus dentatus` sowie die CA Regionen (Super & Soriano, 1994; Skutella et al., 1999; Skutella & Nitsch, 2001). Die kommissuralen und septalen Fasern erreichen die hippocampale Formation perinatal; die assoziativen Fasern hingegen werden erst nach der Geburt gebildet (Super & Soriano, 1994; Fricke & Cowan, 1977; Ribak et al., 1985; Frotscher, 1991). Oligodendrozyten-spezifische Gene, wie Myelin Basic Protein (MBP), Myelin- Associated Glycoprotein (MAG) und Nogo-A mit seinen Isoformen werden im Hippocampus bereits in den frühen postnatalen Tagen exprimiert (Suzuki & Raisman, 1994; Savaskan et al., 1999; Meier et al., 2002). Black Gold- positive Fasern hingegen konnten erstmalig am P17 im Hippocampus detektiert werden. Die Tatsache, dass in anderen Regionen der weißen Substanz bereits zu einem früheren Zeitpunkt (P5) BG- positive Fasern gefunden wurden, zeigt, dass keine fehlerhafte Detektion vorliegt (Abb. 4). Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass neuronale Aktivität die Myelinisierung beeinflusst und es daher zu einer zeitlichen Verzögerung zwischen Expression von myelin-spezifischen Proteinen und dem Auftreten von reifen Myelinstrukturen kommt. Diese Theorie wird durch die Tatsache, dass die Myelinogenese durch neuronales Aktionspotential induziert wird, bestätigt (Demerens et al., 1996). Im adulten Tier können die in der äußeren Molekularschicht terminierenden entorhinalen Axone, welche myelinisiert sind (Nafstad, 1967), klar durch Black Gold angefärbt werden.

Überraschenderweise zeigte nicht nur das Stratum radiatum, in dem myelinisierte kommissurale Fasern verlaufen, sondern auch das Stratum lucidum eine starke Black Gold Färbung. Diese direkt über den Pyramidenzellen der CA3 Region verlaufende Schicht wird vom Moosfasertrakt durchquert. Dieser Moosfasertrakt wurde bisher als nicht-myelinisiert betrachtet (Frotscher et al., 1991, Berger & Frotscher, 1994; Frotscher & Leranthe, 1985). Anzunehmen ist daher nun, dass das Stratum lucidum von einer Anzahl myelinisierter Fasern unterschiedlichstem Ursprungs durchquert wird. Ferner konnten im Hilus mehrere myelinisierte Axone gefunden werden. Zu diesem Zeitpunkt kann noch keine Aussage über die Herkunft dieser myelinisierten Fasern getroffen werden. Weitere Studien, die selektives axonales Tracen mit ultrastrukturellen Analysen kombiniert, sollten für die Klärung dieser neuen Erkenntnisse erfolgen.

6.1.3 Die Myelinisierung im Hippocampus nach Läsion

Der Zeitverlauf myelinisierter Fasern nach Deafferenzierung war zunächst überraschend. Das Verschwinden myelinisierter Fasern korrelierte gut mit der anterograden Degenerationsphase nach Läsion (Savaskan et al., 2000). Die erste Phase ist durch die Waller'sche Degeneration entorhinaler Axone und die spezifische Migration und Aktivität von mikro- und astroglialen Zellen charakterisiert (Savaskan et al., 2000; Kawaja & Gage, 1991; Bechmann & Nitsch, 1997; Eyüpoglu et al., 2003). Die Reduktion Black Gold- positiver Axone im Gyrus dentatus passt zeitlich zu der Herabsetzung des synaptischen Inputes nach Läsion (Bräuer et al., 2001). Die Zahl myelinisierter Fasern erreicht dabei 5 mal ihr Minimum, also genau in der Zeit, wo degenerative Prozesse und die gliale Phagozytoseaktivität ihr Maximum erreicht haben (Gall et al., 1979; Bechmann & Nitsch, 1997; Jensen et al., 1997). In diesem Zusammenhang soll nicht unerwähnt bleiben, dass die MBP Expression sich invers zu der mikroglialen Aktivität nach ECL (Jensen et al., 2000; Meier et al., 2002) und der Cuprizone-induzierten Demyelinisierung (Morell et al., 1998) verhält. In der Phase, in der axonales Sprouting beginnt, wurde in der äußeren Molekularschicht wieder eine erhöhte Anzahl Black Gold- positiver Fasern gefunden (Matthews et al., 1976 a, b; Cotman et al., 1977). Längere Überlebensstadien zeigten im Vergleich zu den Kontrolltieren keinen Unterschied in der BG-positiven Faserdichte. Im Gegensatz zu der Detektierung von Subpopulation auswachsender Fasern, wie z.B. AChE- positive Fasern, die sich für die Demonstration läSIONS-induziertem Sproutings etabliert hat (Mesulam et al., 1987; Kugler et al., 1993), färbt Black Gold reife, myelinisierte Fasern unabhängig von der Transmitterausstattung. Die quantitative Analyse myelinisierter Fasern in längeren Überlebensstadien spiegelt die axonale Dichte und die elektrophysiologische Balance nach Läsion noch einmal wirkungsvoll wieder (Clusmann et al., 1994; Bräuer et al., 2001).

Unter Verwendung des etablierten Myelinfarbstoffes Luxol Fast Blue (LFB) konnten keine läSIONSbedingten Veränderungen detektiert werden. Eine mögliche Ursache dafür ist, dass dünne, einzeln myelinisierte Fasern, wie die in der Molekularschicht des Gyrus dentatus, von LFB nicht angefärbt werden, da sie unter der Nachweisgrenze liegen. Dies mag ein Grund sein, warum quantitative Änderungen des Myelingehtes von LFB in dieser Hirnregion unerkant bleiben.

Diese Daten zeigen, dass in einer plastischen Gehirnregion wie dem Hippocampus, die Myelinisierung während der Entwicklung zeitlich geordnet abläuft. Dabei erscheinen multilamilläre, reife Myelinstrukturen erst nach der Expression von myelin-spezifischen Proteinen. Nach Läsion korreliert das Verschwinden und die Wiederkehr myelinisierter Fasern eng mit der Degenerations- und Reorganisationsphase der betroffenen Region.

6.2 Expression der Nogo Gene im Hippocampus

Die mRNA Expression aller drei Nogo Isoformen und deren Rezeptor wurde mittels der *in situ* Hybridisierung im sich entwickelnden, im adulten und im deafferenzierten Hippocampus untersucht. Das stärkste Expressionssignal zeigten dabei überraschenderweise die neuronalen Zellen des Hippocampus. Mit Ausnahme von Nogo-C waren alle Nogo Gene bereits seit dem Tag der Geburt (P0) im Hippocampus präsent. Nach ZNS Schädigung sind alle Isoformen und auch deren Rezeptor unterschiedlich reguliert. Diese Daten verdeutlichen die wichtige neuronale Funktion der Nogo Gene während der Entwicklung, der Adoleszenz und nach Läsion, jenseits ihrer myelin-assoziierten Hemmung des axonalen Auswachsens.

6.2.1 Die Nogo Gene während der Entwicklung

Während der ZNS Entwicklung formen die Axone der Nervenzellen ein kompliziertes und spezifisches Netz von Verbindungen (Tessier- Lavigne et al., 1996). Die Myelinisierung der entorhinalen Afferenzen beginnt im Hippocampus in der zweiten postnatalen Woche (P17) und ist am Ende des zweiten Monats abgeschlossen (P60) (Suzuki & Raisman; 1994; Savaskan et al., 1999). Die Expression von Nogo-A, -B und Ng66R hingegen trat schon sehr viel früher auf. So konnte das Hybridisierungssignal von Nogo-A, -B und Ng66R bereits am Tag der Geburt (P0) gefunden werden; dem ersten untersuchten Zeitstadium. Nogo-C und MBP wurden erst am P15 signifikant exprimiert, zu dem Zeitpunkt, an dem myelinisierte Fasern erstmalig auftreten. Aber im Gegensatz zu MBP, welches ausschließlich in der weißen Substanz exprimiert wird, befindet sich die Nogo-C mRNA hauptsächlich in den Zellschichten des Hippocampus und nur zu einem geringen Anteil im Neuropil. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre die geringe metabolische Aktivität der Oligodendozyten im Gegensatz zu Neuronen (Rust et al., 1991). Interessant ist ebenso, dass das Nogo-C Transkript im Gyrus dentatus erst zu einem Zeitpunkt auftritt, an dem die Körnerzellen bereits vollständig gereift waren (Blackstad, 1956). Diese maturationsabhängige Expression in Verbindung mit dem Fehlen der axonalen Auswachshemmung von Nogo-C und seiner vermutlich intrazellulären Lokalisation, deutet auf eine Funktion jenseits der Zelloberflächenerkennung hin (Oertel et al., 2000).

Wie mittels nicht- radioaktiver *in situ* Hybridisierung gezeigt wurde, befindet sich Nogo-A mRNA in allen neuronalen Zellschichten der hippocampalen Formation. Diese Beobachtung wurde anschließend durch eine Doppel- Immunofärbung für Nogo-A, Calbindin und Parvalbumin, welche Nogo-A exprimierende Zellen im Gyrus dentatus sowie Interneurone im Hilus zeigten, bestätigt (Huber et al., 2002). Interessanterweise wird auch der Ng66 Rezeptor ab dem Tag der Geburt (P0) bis hin zur Adoleszenz im Entorhinalen Cortex und im Subiculum exprimiert. Zum selben Zeitpunkt wachsen die entorhinalen Axone in den Hippocampus ein, um unter anderem in der äußeren Molekularschicht des Gyrus dentatus zu terminieren (Super & Soriano, 1994). Diese Korrelation

könnte durch ein neues Rezeptor- Liganden System, welches die schichtenspezifische Termination der hippocampalen Afferenzen kontrolliert, begründet sein. In diesem Zusammenhang ist es denkbar, dass Nogo-A sowohl ein repulsives, als auch ein attraktives Zelloberflächensignal auf Neurone, deren Fortsätze und auch auf nicht-neuronale Zellen enthält. Es kann aber auch angenommen werden, dass Nogo-A parallel dazu selbst als Rezeptor wirkt. Dies ist bereits von anderen Auswachsmolekülen bekannt, so z.B. die Ephrine und Eph Rezeptoren, die wesentlich zur entorhinalen Wegfindung und der Schichtenspezifität beitragen (Holder & Klein, 1999; Stein et al., 1999; Gao et al., 1999).

6.2.2 Die Nogo Gene nach Entorhinaler Cortex Läsion

Das adulte ZNS stellt im Gegensatz zum PNS für auswachsende Axone eine undurchlässige Umgebung dar (David & Aguayo, 1981; Witter et al., 1989). Die Axone des Entorhinalen Cortex` bilden den größten corticalen Fasertrakt zum Hippocampus (Bayer & Altman; 1987). Die frühe Degeneration dieses Fasertraktes bei der Alzheimer`schen Erkrankung führt zu einer schichtenspezifischen Denervation des Hippocampus. Dies hat die für diese Erkrankung typischen, schweren Gedächtnisstörungen zur Folge (Hyman et al., 1984). Die ipsilaterale Transektion des Tractus perforans führt zu einer anterograden Degeneration der entorhinalen Axone und Synapsen in der äußeren Molekularschicht des Gyrus dentatus und in den Strata lacunosa-moleculare der CA1 bis CA3 Region. Anschließend kommt es zu einer schnellen Aktivierung von mikro- und astroglialen Zellen (Matthews et al., 1976 I, II), gefolgt von reaktivem Sprouting der verbliebenen Axone, was zu einem Wiederkehren intakter Synapsen führt (Matthews et al., 1976 II; Forster et al., 2001). Die molekularen Mechanismen des schichtenspezifischen axonalen Wachstums sind nur frakmentarisch bekannt. Man weiß aber bereits, dass einige Moleküle, die an der Wegfindung während der Entwicklung beteiligt sind, nach ZNS Läsion eine signifikante Hochregulation zeigen (Bovolenta et al., 1997; Deller et al., 1997; Haas et al., 1999; Thon et al., 2000; Kovacs et al., 2001).

Nach einer Schädigung des EC kam es zu einer dynamischen Regulierung aller Nogo Gene. Nogo-A, -B und Ng66R zeigten eine Hochregulierung im ipsilateralen Cortex; der Region, in der läsionsinduzierter Zelltod und transneuronalen Veränderungen auftreten (Kovac et al., 2004; Steward et al., 1993). Vor allem Ng66R zeigte zusätzlich eine starke Hochregulation im contralateralen Cortex.

Auch im Hippocampus kam es nach ECL zu einer massiven Regulierung der Nogo Gene. Dabei zeigten die Körnerzellen, die als erste von der Deafferenzierung betroffen sind, zu Beginn der Waller`schen Degeneration und der neuronalen sowie glialen Antwort (Cotman et al., 1985), eine starke Erhöhung aller Nogo Transkripte. Zum Zeitpunkt des maximalen Degenerationsprozesses und der glialen Phagozytoseaktivität (2-8 dal), hatte Nogo-B mRNA in den Körnerzellen bereits die Kontrollwerte wieder erreicht, währenddessen Nogo-A weiter hochreguliert blieb. In der Zeit

maximaler Sproutingreaktion (6-12 dal; Deller et al., 1995) kam es zur signifikanten Runterregulation der Nogo-C und Ng66R mRNA. Interessanterweise hatten Nogo-A und -B zu diesem Zeitpunkt bereits Kontrollniveau erreicht. Im Gegensatz dazu blieb die Nogo-C und Ng66R mRNA weiter runterreguliert und zeigte erst nach dem Abschluß des axonalen Sproutingprozesses und der Synapsenformation keinen Konzentrationsunterschied mehr zu den Kontrolltieren. Im contralateralen Hippocampus, dem Hauptursprung aussprossender Fasern (Cadelli et al., 1992; Forster et al., 2001), kam es während der Phase des axonalen Auswachsens zu einer signifikanten Runterregulation von Ng66R mRNA. Diese erniedrigte Ng66R Expression korreliert gut mit der Zeit des axonalen Einwachsens in den deafferenzierten Hippocampus, so dass sich eine reduzierte axonale Ansprechbarkeit auf den Neuriten- Auswachshemmer Nogo-A vermuten läßt. Diese Regulation ist spezifisch, da Nogo-A und Nogo-C mRNA keine Konzentrationsänderungen in diesem Zeitabschnitt zeigen. Wang et al zeigten 2002, dass Ng66R auch den Rezeptor für das Oligodendrocyte-Myelin Glycoprotein (OMgp) darstellt und so großen Einfluss auf dessen auswachs inhibitorische Funktion besitzt. Die Runterregulation von Ng66R ist auszureichend, um die Nogo-vermittelte Auswachs inhibition aufzuheben, da Axone, die kein Ng66R exprimieren, unempfindlich für die Nogo-vermittelte Hemmung des Neuritenwachstums sind (Fournier et al., 2001, Li et al., 2005). Die Aktivitäts-induzierte Runterregulation von Ng66R konnte erst kürzlich bestätigt werden (Josephson et al., 2003). Dass den Nogo Genen bei der strukturellen Plastizität des ZNS eine entscheidene Rolle zukommen zu scheint, zeigt die signifikante Hochregulation im Kainat-induzierten Epilepsiemodell. In diesem Modell erhöhter synaptischer Aktivität konnte eine hochregulierte Nogo-A mRNA Expression in dem Zeitraum axonaler Sproutingreaktion und der GAP-43 Expression im Hippocampus detektiert werden (Bendotti et al., 1997).

6.2.3 Funktionelle Konsequenzen der Nogo Expression nach ECL

Unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers IN-1, der die Myelinkomponenten 250 kDa und 35 kDa erkennt, kommt es auf ZNS Myelin oder Oligodendrozytensubstrat zum Auswachsen von Neuriten und zum Einwachsen derer in Nervus opticus Explantate (Caroni & Schwab, 1988). *In vivo* Applikationen in Gehirn oder Rückenmark resultieren in einer Regeneration der ZNS Axone sowie deren Auswachsen über längere Strecken (Schnell & Schwab, 1990; Schnell et al., 1994; Weibel et al., 1994; Van de Velde et al., 1994). Tiere mit einer Rückenmarksläsion zeigten danach signifikante Verbesserungen in spezifischen lokomotorischen und Reflextests (Bregman et al., 1995).

Die Nogo Gene wurden als neue Mitglieder der Reticulon Familie (Rtn) identifiziert und tragen daher synonym den Namen Reticulon 4 (Chen et al., 2000; GrandPre et al., 2000). Das 188 Aminosäuren große C- Ende der Nogos ist zu ca. 70% mit der Reticulon Familie identisch. Wie auch die anderen Reticulons, ist Nogo-A mit dem Endoplasmatischen Reticulon assoziiert (GrandPre et al., 2000; Van de Velde et al., 1994; Huber AB, van der Haar ME & Schwab ME; unpublizierte Daten). Während Reticulon 1 und 3 gar nicht von Oligodendrocyten exprimiert wird,

wird Nogo-A von den meisten, aber nicht von allen Oligodendrocyten exprimiert (GrandPre et al., 2000). Die hydrophoben Segmente, also die 66- Aminosäure lange extrazelluläre Domäne des C-Terminus und eine Region im N-Terminus von Nogo-A, enthalten die funktionell wichtigen Regionen. Im Gegensatz dazu, bewirkt die 66- Aminosäure lange Region von Reticulon 1, 2 und 3 keine Hemmung der axonalen Regeneration.

Die physiologische Rolle des Nogo Systems ist zum heutigen Zeitpunkt noch nicht vollständig bekannt. Ein Zelloberflächensignal mit attraktiven und repulsiven Funktionen auf andere Neurone, aber auch auf Neuriten und nicht- neuronale Zellen wird angenommen. Weiterhin wird, ähnlich wie bei Netrin-1 und Slit, eine Beteiligung an der Migration der Körnerzellen des Kleinhirns vermutet (Huber et al., 2002; Alcantara et al., 2000; Wu et al., 1999). Eine neue Rolle für Nogo-B konnte in Endothelzellen sowie in glatten Muskelzellen von Gefäßen gezeigt werden (Acevedo et al., 2004). Dabei scheint Nogo eine bisher unbekannt regulatorische Funktion bei der Intimaproliferation und der vaskulären Neumodellierung nach Schädigung zu haben. Aber auch eine intrazelluläre Funktion von Nogo-A, -B und -C in Neuronen, ähnlich der von Reticulon 1, ist denkbar. So könnten sie am Transport von Proteinen sowie an der Regulierung des intrazellulären Calciumspiegels beteiligt sein (Baka et al., 1996; Hens et al., 1998). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass die vermutlich extrazellulär gelegene Domäne des gemeinsamen C-Terminus aller Nogos mit dem neuen Mitochondrialen Preprotein (NIMP) und mit dem Ubiquinolcytochrom C Reduktase Kernprotein 1 und 2 interagiert (Hu et al., 2002). All diese Daten unterstützen die Theorie, dass Nogo, zumindest unter pathologischen Bedingungen, am Proteintransport beteiligt ist. Ob dies für alle Isoformen zutrifft, muß noch gezeigt werden. Auch das Myelin- Assoziierte Glycoprotein (MAG) und das Oligodendrocyte-Myelin Glycoprotein (OMgp) stellen funktionelle Liganden des Ng66-Rezeptors dar (Liu et al., 2002; Wang et al., 2002). Desweiteren interagiert der Neurotrophin Rezeptor p75 als Co- Rezeptor für Nogo, MAG und OMgp mit Ng66R, was vermuten läßt, dass p75 der ausführende Transduktor der Ng66R vermittelten Aktivität im Zellinneren ist (Wang et al., 2002).

Weitere Erkenntnisse über die Funktion der Nogos konnte durch die Knockout (KO) Mäuse gewonnen werden (Simonen et al., 2003; Kim et al., 2003; Zheng et al., 2003). Die Nogo-A KO Maus zeigte sich dabei lebensfähig, fruchtbar und wies keine auffälligen Entwicklungsrückstände oder neuronale Schädigungen auf. Der inhibitorische Effekt auf ausgewachsene Neuriten aber war deutlich herabgesetzt. Nach Rückenmarkschädigung konnten dabei signifikant mehr Fasern gefunden werden als in den Wildtypen nach gleicher Läsion. Diese entstanden einerseits durch Regeneration verletzter Fasern oder waren einsprossende Fasern (Simonen et al., 2003). Die Nogo-A/B KO Maus ist ebenfalls lebensfähig und zeigte keine erkennbaren Unterschiede im unverletzten Tractus corticospinalis gegenüber dem Wildtyp (Kim et al., 2003, Zheng et al., 2003). Bei der KO Maus der Strittmatter-Arbeitsgruppe kam es nach Rückenmarkläsion rostral der Schädigung zu einer erheblichen Sproutingreaktion und distal der Läsion zu einer intensiven Regeneration. Auch klinisch zeigte sich eine intensive Verbesserung der Bewegungsfunktionen.

Bei der Nogo A/B KO Maus der Arbeitsgruppe von M. Tessier-Lavigne zeigten sich keine so intensiven Veränderungen. Auch bei der Nogo- A/B/C KO Maus derselben Arbeitsgruppe waren keine signifikanten Unterschiede in der Regenerations- und Sproutingreaktion, verglichen mit den Wildtypen, erkennbar. Diese Diskrepanz der Daten von drei unabhängigen Arbeitsgruppen konnte bisher nicht genügend experimentell erklärt werden. Zur Erklärung dieser Unterschiede können folgende Diskussionspunkte beitragen:

- 1) unterschiedliche genetische Hintergründe der verwendeten embryonalen Stammzellen, die zur Generierung der KO Mäuse verwendet wurden.
- 2) unterschiedliche transgene Strategien (Random insertion/ homologe Rekombination/ konventionelles Gentergeting).
- 3) Da die Nogo-A/B/C Mutante letal ist, aber die von der Tessier- Lavigne Gruppe verwendete Mauslinie aus einem Escaper generiert wurde, könnte es sich hierbei um eine komplexeres Genrearrangement als allein im Nogolokus handeln.
- 4) Kompensatorische translatorische Regulation anderer Myelin-assozierter Neuriteninhibitoren.
- 5) Chromosomale Rearrangements regulatorischer Einheiten, die sich im getargeten Introndomain des Nogo Gens befinden.

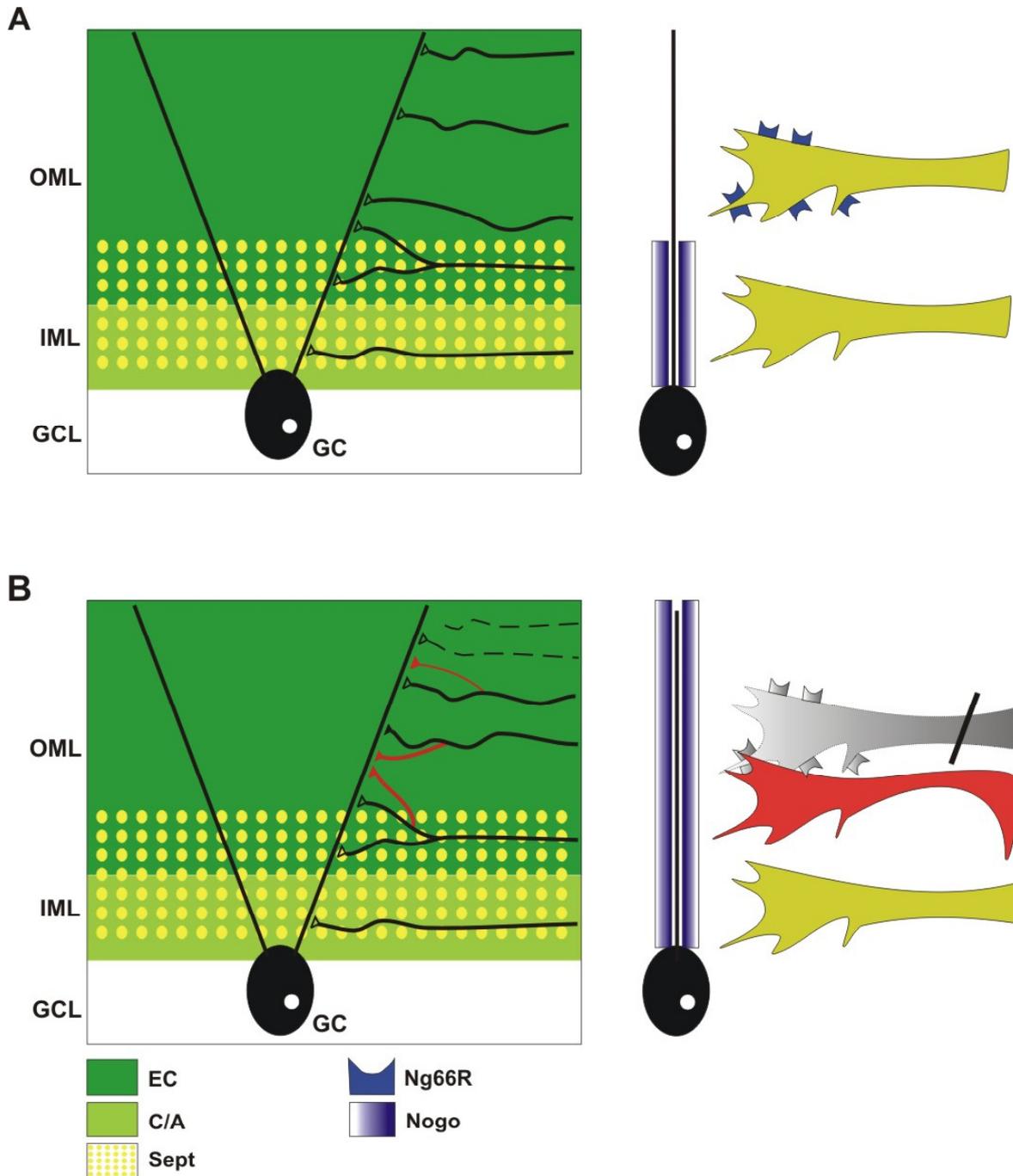


Abbildung 16:

Zusammenfassung der Nogo Expressionsdaten im Hippocampus unter Kontrollbedingungen (A) und nach Läsion (B): Es wird angenommen, dass die Körnerzellen (GC) des Gyrus dentus die Nogo Gene exprimieren. Ng66R exprimierende entorhinale Fasern sind auf die äußere Molekularschicht (OML) beschränkt und nicht in der Nogo-reichen inneren Molekularschicht (IML) zu finden. Nach Läsion können wiedereinwachsende Axone, die den Ng66 Rezeptor nicht tragen, in die Nogo-reiche Zone einwachsen und dadurch die degenerierten

entorhinalen Axone der äußeren Molekularschicht ersetzen. Die erniedrigte Ng66R Expression korreliert gut mit dem Zeitpunkt des Einwachsens der Axone in den deafferenzierten Hippocampus, was eine zeitweise herabgesetzte axonale Ansprechbarkeit auf Nogo-A vermuten lässt. Gestützt wird diese Interpretation durch die Daten der Strittmatter Arbeitsgruppe, die zeigten, dass Axone, die kein Ng66R exprimieren, für die Nogo-A induzierte Auswachshemmung unempfindlich sind. Trotzdem bleibt die physiologische Funktion der neuronalen Nogo Expression weiterhin unklar.

Die frühe mRNA Expression aller Nogo Transkripte während der Entwicklung weist auf ihre wichtige physiologische Rolle hin (Tessier-Lavigne & Goodman, 2000; Brittis & Flanagan; 2001). Interessanterweise wurden alle Nogos sowie deren Rezeptor seit der frühen postnatalen Entwicklung vor allem in den hippocampalen Neuronen gefunden. Es kann angenommen werden, dass sie auf Grund der komplementären Expression der Nogo Liganden und dem Ng66 Rezeptor während der Entwicklung, ein neues Rezeptor- Liganden System bilden, welches wesentlich zu der axonalen Wegfindung und der schichtenspezifischen Terminierung beiträgt (Abb. 16). Dies ist bereits von anderen Faktoren bekannt, so z.B. Sema3A oder Ephrin3A (Stein et al., 1999; Steup et al., 1999; Steup et al., 2000). Weiterhin ist bekannt, dass Nogo-A und Ng66R an der Axon-Myelin Grenze sowie an synaptischen Kontakten lokalisiert sind (Wang et al., 2002). Diese Daten und unsere Entdeckung der aktivitätsabhängigen Regulierung der Nogo Gene deutet auf eine entscheidene Beteiligung des Nogo Systems in der strukturellen neuronalen Plastizität hin.

Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition des Ng66 Rezeptors signifikantes axonales Auswachsen sowie eine verbesserte funktionelle Wiederherstellung nach Rückenmarksläsion zur Folge hat (GrandPre et al., 2002). Neutralisation der Nogo Aktivität führt aber auch zu einer geringeren Plastizität und einem exzessiven Sprouting nicht geschädigter Fasern (Buffo et al., 2000; Zagrebelsky et al., 1998, Z'Graggen et al., 1998, Simonen et al., 2003; Kim et al., 2003; Zheng et al., 2003). Dies und die in dieser Arbeit gezeigte neuronale Expression der Nogo Liganden und deren Rezeptor unter physiologischen Bedingungen, sollten bei der Überlegung Nogo- neutralisierende Antikörper oder Nogo-Rezeptor- Inhibitoren therapeutisch einzusetzen, von allergrößter Bedeutung sein.

Literaturverzeichnis

- Acevedo, L., Yu, J., Erdjument-Bromage, H., Miao, R.Q., Kim, J.E., Fulton, D., Tempst, P., Strittmatter, S.M., Sessa, W.C. (2004) A new role for Nogo as a regulator of vascular remodeling. *Nature Medicine*. 10 (4), 382-8.
- Alcantara, S., Ruiz, M., De Castro, F., Soriano, E., Sotelo, C. (2000) Netrin 1 acts as an attractive or as a repulsive cue for distinct migrating neurons during the development of the cerebellar system. *Development*. 127, 1359-1372.
- Amaral, D.G. (1978) A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *J.Comp Neurol*. 182: 851-914.
- Amaral, D.G., Witter M.P., (1989) The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*. 31(3), 571-91.
- Baka, I. D., Ninkina, N. N., Pinon, L. G., Adu, J., Davies, A. M., Georgiev, G.-P., Buchman, V. L. (1996) Intracellular compartmentalization of two differentially spliced s-rex/NSP mRNAs in neurons. *Mol Cell Neurosci*. 7, 289-303
- Bayer, S.A., Altman J. (1987) Directions in neurogenetic gradients and patterns of anatomical connections in the telencephalon. *Progress in Neurobiology*. 29, 57-106.
- Bayer, S. A., Altman, J. (1990) Development of layer I and the subplate in the rat neocortex. *Exp.Neurol*. 107, 48-62
- Bechmann, I. and Nitsch. R. (1997) Astrocytes and microglial cells incorporate degenerating fibers following entorhinal lesion: a light, confocal, and electron microscopical study using a phagocytosis-dependent labeling technique. *Glia*; 20: 145-154.
- Bendotti, C., Pende, M. and Samanin, R. (1994) Expression of GAP-43 in the granule cells of rat hippocampus after seizure-induced sprouting of mossy fibres: in situ hybridization and immunocytochemical studies. *Eur.J.Neurosci.*; 6: 509-515.
- Bendotti, C., Baldessari, S., Pende, M., Southgate, T., Guglielmetti, F., Samanin, R. (1997) Relationship between GAP-43 expression in the dentate gyrus and synaptic reorganization of hippocampal mossy fibres in rats treated with kainic acid. *Eur J Neurosci*. 9, 93-101.
- Berger, T. and Frotscher, M. (1994) Distribution and morphological characteristics of oligodendrocytes in the rat hippocampus in situ and in vitro: an immunocytochemical study with the monoclonal Rip antibody. *J.Neurocytol.*; 23: 61-74.
- Blackstad, T.W. (1956) Commissural connections of the hippocampal region in the rat, with specific reference to their mode of termination. *J Comp Neurol*. 105: 417-537.

- Bovolenta, P., Fernaud-Espinosa, I., Mendez-Otero, R., Nieto, S. (1997) Neurite outgrowth inhibitor of gliotic brain tissue. Mode of action and cellular localization, studied with specific monoclonal antibodies. *Eur.J.Neurosci.* 9, 977-989
- Bregman, B. S., Kunkel-Bagden, E., Schnell, L., Dai, H. N., Gao, D., and Schwab, M. E. (1995) Recovery from spinal cord injury mediated by antibodies to neurite growth inhibitors. *Nature* 378, 498-501
- Brauer, A. U., Savaskan, N. E., Kole, M. H., Plaschke, M., Monteggia, L. M., Nestler, E. J., Simburger, E., Deisz, R. A., Ninnemann, O., and Nitsch, R. (2001) Molecular and functional analysis of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the hippocampus after entorhinal cortex lesion. *FASEB J.* 15, 2689-2701
- Brittis, P. A., Flanagan, J. G. (2001) Nogo domains and a Nogo receptor: implications for axon regeneration. *Neuron* 30, 11-14
- Brosamle, C., Huber, A. B., Fiedler, M., Skerra, A., and Schwab, M. E. (2000) Regeneration of lesioned corticospinal tract fibers in the adult rat induced by a recombinant, humanized IN-1 antibody fragment. *J.Neurosci.* 20, 8061-8068
- Buffo, A., Zagrebelsky, M., Huber, A. B., Skerra, A., Schwab, M. E., Strata, P., and Rossi, F. (2000) Application of neutralizing antibodies against NI-35/250 myelin-associated neurite growth inhibitory proteins to the adult rat cerebellum induces sprouting of uninjured purkinje cell axons. *J.Neurosci.* 20, 2275-2286
- Burwell, R.D., Witter, M.P., Amaral, D.G. (1995) Perirhinal and postrhinal cortices of the rat: a review of the neuroanatomical literature and comparison with findings from the monkey brain. *Hippocampus.* 5(5), 390-408.
- Busciglio, J., Ferreira, A., Steward, O., Caceres, A. (1987) An immunocytochemical and biochemical study of the microtubule-associated protein Tau during post-lesion afferent reorganization in the hippocampus of adult rats. *Brain Res.* 419(1-2), 244-52.
- Cabalka, L.M., Hyman, B.T., Goodlett, C.R., Ritchie, T.C., Van Hoesen, G.W. (1992) Alteration in the pattern of nerve terminal protein immunoreactivity in the perforant pathway in the Alzheimer's disease and in rats after entorhinal lesions. *Neurobiol Aging.* 13(2), 283-91
- Cadelli, D. S., Bandtlow, C. E., Schwab, M. E. (1992) Oligodendrocyte- and myelin-associated inhibitors of neurite outgrowth: their involvement in the lack of CNS regeneration. *Exp.Neurol.* 115, 189-192
- Cammer W. and Norton W. T. (1976) Disc gel electrophoresis of myelin proteins: new observations on development of the intermediate proteins (DM-20). *Brain Res* 109, 643-648.
- Campagnoni A.T and Macklin W.B. (1988) Cellular and molecular aspects of myelin protein gene

- expression. *Mol Neurobiol.* 1988; 2: 41-89.
- Caroni, P., and Schwab, M. E. (1988) Antibody against myelin-associated inhibitor of neurite growth neutralizes nonpermissive substrate properties of CNS white matter. *Neuron* 1, 85-96
- Caroni, P., and Schwab, M. E. (1988) Two membrane protein fractions from rat central myelin with inhibitory properties for neurite growth and fibroblast spreading. *J.Cell Biol* 106, 1281-1288
- Chapman A.G, Westerberg E, Premachandra M and Meldrum B.S. (1984) Changes in regional neurotransmitter amino acid levels in rat brain during seizures induced by L-allylglycine, bicuculline, and kainic acid. *J.Neurochem.* 1984; 43: 62-70.
- Chen, M. S., Huber, A. B., van der Haar, M. E., Frank, M., Schnell, L., Spillmann, A. A., Christ, F., and Schwab, M. E. (2000) Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature* 403, 434-439
- Clusmann, H., Nitsch, R. and Heinemann, U.. (1994) Long lasting functional alterations in the rat dentate gyrus following entorhinal cortex lesion: a current source density analysis. *Neuroscience*; 61: 805-815.
- Coetzee, T., Fujita, N., Dupree, J., et al. (1996) Myelination in the absence of galactocerebroside and sulfatide: normal structure with abnormal function and regional instability. *Cell*; 86: 209-219.
- Cole A.J., Abu-Shakra S, Saffen D.W., Baraban J.M., Worley P.F. (1990) Rapid rise in transcription factor mRNAs in rat brain after electroshock-induced seizures. *J Neurochem.* 55(6):1920-7.
- Cotman C, Gentry C and Steward O. (1977) Synaptic replacement in the dentate gyrus after unilateral entorhinal lesion: electron microscopic analysis of the extent of replacement of synapses by the remaining entorhinal cortex. *J.Neurocytol.* 6: 455-464.
- Cotman, C. W., Nieto-Sampedro, M. (1985) Progress in facilitating the recovery of function after central nervous system trauma. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 457, 83-104
- Cotman, C.W., Geddes, J.W., Kahle, J.S. (1990) Axon sprouting in the rodent and Alzheimer's disease brain: a reactivation of developmental mechanisms? *Prog Brain Res.* 83, 427-34
- Dasheiff, R.M., McNamara, J.O., (1982) Electrolytic entorhinal lesions cause seizures. *Brain Res.* 231(2), 444-50
- David, S., and Aguayo, A. J. (1981) Axonal elongation into peripheral nervous system „bridges“ after central nervous system injury in adult rats. *Science* 214, 913-933
- Deller, T., Frotscher, M., Nitsch, R. (1995) Morphological evidence for the sprouting of inhibitory commissural fibers in response to the lesion of the excitatory entorhinal input to the rat

- dentate gyrus. *J. Neurosci.* 15, 6868-6878
- Deller, T., Frotscher, M., Nitsch, R. (1996) Sprouting of crossed entorhinodentate fibers after a unilateral entorhinal lesion: anterograde tracing of fiber reorganization with Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin (PHAL). *J Comp Neurol.* 365(1), 42-55.
- Deller, T., and Frotscher, M. (1997) Lesion-induced plasticity of central neurons: sprouting of single fibres in the rat hippocampus after unilateral entorhinal cortex lesion. *Prog. Neurobiol.* 53, 687-727
- Demerens, C., Stankoff, B., Logak, M., et al. (1996) Induction of myelination in the central nervous system by electrical activity. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.*; 93: 9887-9892.
- Dobkin, J. and Marton, M. (1970) A new procedure for the measurement of acid-soluble glutamine of tissue with particular reference to the brain. *J. Neurochem.*; 17: 231-235.
- Dou, C. L., and Levine, J. M. (1994) Inhibition of neurite growth by the NG2 chondroitin sulfate proteoglycan. *J. Neurosci.* 14, 7616-7628
- Duden (2004) Die deutsche Rechtschreibung. 23. Auflage
- Eyüpoglu, I., Bachmann, I., Nitsch, R. (2003) Modification of microglia function protects from lesion-induced neuronal alterations and promotes sprouting in the hippocampus. *FASEB J.*;17(9):1110-1. Epub 2003 Apr 08.
- Eyüpoglu, I.Y., Savaskan, N.E., Brauer, A.U., Nitsch, R., Heimrich, B. (2003) Identification of neuronal cell death in a model of degeneration in the hippocampus. *Brain Res Brain Res Protoc.* Mar;11(1), 1-8.
- Forster, E., Zhao, S., Frotscher, M. (2001) Hyaluronan-associated adhesive cues control fiber segregation in the hippocampus. *Development* 128, 3029-3039
- Fournier, A. E., GrandPre, T., and Strittmatter, S. M. (2001) Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration. *Nature* 409, 341-346
- Fournier, A.E., GrandPre, T., Gould, G., Wang, X., Strittmatter, S.M., (2002) Nogo and the Nogo-66 receptor. *Prog Brain Res.* 137: 361-9
- Fricke, R. and Cowan, W.M. (1977) An autoradiographic study of the development of the entorhinal and commissural afferents to the dentate gyrus of the rat. *J. Comp Neurol.* 173: 231-250.
- Frotscher, M. and Leranath, C. (1985) Cholinergic innervation of the rat hippocampus as revealed by choline acetyltransferase immunocytochemistry: a combined light and electron microscopic study. *J. Comp Neurol.*; 239: 237-246.
- Frotscher, M. (1991) Target cell specificity of synaptic connections in the hippocampus. *Hippocampus* 1991; 1: 123-130.

- Frotscher, M., and Heimrich, B. (1993) Formation of layer-specific fiber projections to the hippocampus in vitro. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90, 10400-10403
- Frotscher, M., Heimrich, B., and Deller, T. (1997) Sprouting in the hippocampus is layer-specific. *Trends Neurosci.* 20, 218-223
- Gallyas, F. (1979) Silver staining of myelin by means of physical development. *Neurol Res* 1, 203-209.
- Gall, C., Rose, G., Lynch, G. (1979) Proliferative and migratory activity of glial cells in the partially deafferented hippocampus. *J Comp Neurol.*;183, 539-549.
- Gao, P. P., Yue, Y., Cerretti, D. P., Dreyfus, C., Zhou, R. (1999) Ephrin-dependent growth and pruning of hippocampal axons. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96, 4073-4077
- Grady, M.S., Jane, J.A., Steward, O. (1989) Synaptic reorganization within the human central nervous system following injury. *J Neurosurg.* 71(4), 534-7.
- GrandPre, T., Nakamura, F., Vartanian, T., and Strittmatter, S. M. (2000) Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein. *Nature* 403, 439-444
- GrandPre, T., and Strittmatter, S. M. (2001) Nogo: a molecular determinant of axonal growth and regeneration. *Neuroscientist.* 7, 377-386
- GrandPre, T., and Strittmatter, S. M. (2002) Nogo-66 receptor antagonist peptide promotes axonal regeneration. *Nature* 417, 547-551
- Haas, C. A., Rauch, U., Thon, N., Merten, T., Deller, T. (1999) Entorhinal cortex lesion in adult rats induces the expression of the neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan in reactive astrocytes. *J.Neurosci.* 19, 9953-9963
- Henderson, Z., Morris, N.P., Grimwood, P., Fiddler, G., Yang, H.W, and Appenteng, K. (2001) Morphology of local axon collaterals of electrophysiologically characterised neurons in the rat medial septal/ diagonal band complex. *J.Comp Neurol.*; 430: 410-432.
- Hens, J., Nuydens, R., Geerts, H., Senden, N. H., Van de Ven, W. J., Roebroek, A. J., van de Velde, H. J., Ramaekers, F. C., Broers, J. L. (1998) Neuronal differentiation is accompanied by NSP-C expression. *Cell Tissue Res.* 292, 229-237
- Horner, P. J., and Gage, F. H. (2000) Regenerating the damaged central nervous system. *Nature* 407, 963-970
- Holder, N., Klein, R. (1999) Eph receptors and ephrins: effectors of morphogenesis. *Development.* 126, 2033-2044.
- Hu, W.H, Hausmann, O.N., Yan, M.S, Walters, W.M., Wong, P.K., Bethea, J.R. (2002) Identification and characterization of a novel Nogo-interacting mitochondrial protein

- (NIMP). *J Neurochem.* 81:36-45.
- Huber, A. B., Weinmann, O., Brosamle, C., Oertle, T., Schwab, M.E. (2002) Patterns of Nogo mRNA and protein expression in the developing and adult rat and after CNS lesions. *J Neurosci.* 22, 3553-3567
- Hyman, B. T., Van Horsen, G.W., Damasio, A.R., Barnes, C.L. (1984) Alzheimer's disease: cell-specific pathology isolates the hippocampal formation. *Science.* 225:1168-1170.
- Jensen, M.B., Gonzalez, B., Castellano, B., Zimmer, J. (1994) Microglial and astroglial reactions to anterograde axonal degeneration: a histochemical and immunocytochemical study of the adult rat fascia dentata after entorhinal perforant path lesions. *Exp Brain Res.* 98(2), 245-60.
- Jensen, J.B. and Mork, A. (1997) Altered protein phosphorylation in the rat brain following chronic lithium and carbamazepine treatments. *Eur.Neuropsychopharmacol.*; 7: 173-179.
- Jensen, M.B., Poulsen, F.R. and Finsen, B. (2000) Axonal sprouting regulates myelin basic protein gene expression in denervated mouse hippocampus. *Int.J.Dev.Neurosci.*; 18: 221-235.
- Josephson, A., Widenfalk, J., Widmer H. W., Olson L., and Spenger (2001) NOGO mRNA expression in adult and fetal human and rat nervous tissue and in weight drop injury. *Exp Neurol.* 169 (2), 319- 328
- Josephson, A., Trifunovski, A., Scheele, C., Widenfalk, J., Wahlestedt, C., Brene, S., Olson L., and Spenger (2003) Activity-induced and developmental downregulation of Nogo receptor. *Cell Tissue Res* 311: 333-342.
- Kapfhammer J.P. and Schwab M.E. (1992) Modulators of neuronal migration and neurite growth. *Curr.Opin.Cell Biol*; 4: 863-868.
- Kawaja M.D. and Gage F.H. (1991) Reactive astrocytes are substrates for the growth of adult CNS axons in the presence of elevated levels of nerve growth factor. *Neuron*; 7: 1019-1030.
- Kawaja M.D. and Gage F.H. (1991) Nerve growth factor receptor immunoreactivity in the rat septohippocampal pathway: a light and electron microscope investigation. *J.Comp Neurol.* 307: 517-529.
- Kelley, M.S., Steward, O., (1997) Injury-induced physiological events that may modulate gene expression in neurons and glia. *Rev Neurosci.* 147-77.
- Kim, J.E., Shuxin, L., GrandPre, T., Qiu, D., Strittmatter, S.M (2003) Axon Regeneration in Young Adult Mice Lacking Nogo-A/B. *Neuron*, 38, 187- 199
- Kovac, A., Kwidzinski, E., Heimrich B., Nitsch, R. (2001) Transneuronal apoptosis following entorhinal cortex lesion in the dentate gyrus. *Soc Neuroscie Abstract* 27: 253.

- Kovac A.C., Kwidzinski, E., Heimrich, B., Bittigau, P., Deller, T., Nitsch, R., Bechmann, I. (2004) Entorhinal cortex lesion in the mouse induces transsynaptic death of perforant path target neurons. *Brain Pathology*, 14(3):249-57
- Kugler, P., Schleicher, A., Zilles, K. and Horvath, E. (1993) Acetylcholinesterase activity and post-lesional plasticity in the hippocampus of young and aged rats. *Neuroscience*; 55: 91-103.
- Kluver, H., and Barrera, E. (1953) Method for combined staining of cells and fibers in the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 12, 400-403
- Kottis V., Thibault P., Mikol D., Xiao Z. C., Zhang R., Derham P., Braun P. E. (2002) Oligodendrocytes-myelin glycoprotein (Omgp) is an inhibitor of neurite outgrowth. *J Neurochem* 82, 1566-1569
- Lee, K.S., Stanford E.J., Cotman, C.W., Lynch G.S. (1977) Ultrastructural evidence for bouton proliferation in the partially deafferented dentate gyrus of the adult rat. *Exp Brain Res.* 29(3-4), 475-85.
- Li, S., Kim, J.E., Budel, S., Hampton, T.G., Strittmatter, S.M. (2005) Transgenic inhibition of Nogo-66-receptor function allows axonal sprouting and improved locomotion after spinal injury. *Mol Cell Neurosci.* 29(1):26-39.
- Li M., Shibata A., Li C., Braun P. E., McKerracher L., Roder J., Kater S. B., and David S. (1996) Myelin-associated glycoprotein inhibits neurite/axon growth and causes growth cone collapse. *J Neurosci Res* 46, 404-414.
- Linke, R., Pabst, T., Frotscher, M., (1995) Development of the hippocamposeptal projection in the rat. *J Comp Neurol.* 351(4), 602-16.
- Liu, B.P., Fournier, A., GrandPre, T., Strittmatter SM. (2002) Myelin-associated glycoprotein as a functional ligand for the Nogo-66 receptor. *Science online* Jun 27.
- Lynch, G., Gall, C., Rose, G., Cotman, C. (1976) Changes in the distribution of the dentate gyrus associational system following unilateral or bilateral entorhinal lesions in the adult rat. *Brain Res.* 110(1), 57-71.
- Masuhr K. F.; Neumann M. (1998) *Neurologie. Hippokrates*
- Matthews, D.A., Cotman, C., Lynch, G., (1976). I An electron microscopic study of lesion-induced synaptogenesis in the dentate gyrus of the adult rat. I. Magnitude and time course of degeneration. *Brain Res.* 115, 1-21.
- Matthews, D. A., Cotman, C., Lynch, G. (1976). II An electron microscopic study of lesion-induced synaptogenesis in the dentate gyrus of the adult rat. II. Reappearance of morphologically normal synaptic contacts. *Brain Res.* 115, 23-41.

- Matute, C., Alberdi, E., Domercq, M., Perez-Cerda, F., Perez-Samartin, A. and Sanchez-Gomez, M.V. (2001) The link between excitotoxic oligodendroglial death and demyelinating diseases. *Trends Neurosci.*; 24: 224-230.
- McKerracher, L., David, S., Jackson, D. L., Kottis, V., Dunn, R. J., and Braun, P. E. (1994) Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth. *Neuron* 13, 805-811
- Meier C. (1976) Some observations on early myelination in the human spinal cord. Light and electron microscope study. *Brain Res* 104, 21-32.
- Meier, S., Brauer, A. U., Heimrich, B., Schwab, M. E., Nitsch, R., and Savaskan, N. E. (2003) Molecular Analysis of Nogo expression in the hippocampus during development and following lesion and seizure. *FASEB J.* Published online April 8, 2003
- Meier, S., Brauer, A. U., Heimrich, B., Nitsch, R., and Savaskan, N. E. (2004) Myelination in the hippocampus during development and following lesion. *Cell Mol Life Sci*
- Mesulam M. M., Asuncion Moran M. (1987) Cholinesterases within neurofibrillary tangles related to age and Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 22, 223-228.
- Mesulam M.M., Mufson E.J. and Rogers J. (1987) Age-related shrinkage of cortically projecting cholinergic neurons: a selective effect. *Ann.Neurol.*; 22: 31-36.
- Morell, P., and Ousley, A.H. (1994) Metabolic turnover of myelin glycerophospholipids. *Neurochem.Res.* 19: 967-974.
- Morell, P., Barrett, C.V., Mason, J.L., et al. (1998) Gene expression in brain during cuprizone-induced demyelination and remyelination. *Mol Cell Neurosci.*; 12: 220-227.
- Morell, P., Quarles, R. H. , and Norton, W. T. (1994) Myelin formation, structure, and biochemistry. In *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects*. G. J. Siegel, B.W. Agranoff, R.W. Albers, and P. B. Molinoff, eds. (New York: Raven Press), pp. 117-143
- Mukhopadhyay, G., Doherty, P., Walsh, F. S., Crocker, P. R., and Filbin, M. T. (1994) A novel role for myelin-associated glycoprotein as an inhibitor of axonal regeneration. *Neuron*. 13, 757-767
- Nafstad P.H. (1967) An electron microscope study on the termination of the perforant path fibres in the hippocampus and the fascia dentata. *Z.Zellforsch.Mikrosk.Anat.*; 76: 532-542.
- Nie, D.Y., Zhou, H.Z., Ang, T.B., Teng, F.Y.H., Xu., G., Xiang, T., Wang, C., Zeng, L., Takeda, Y., Xu, T, Ng, Y, Faivre-Sarrailh, C., Popko, B., Ling, E, Schachner, M., Watanabe, K, Pallen, C.J., Tang, B.L. Xio, Z. (2003) Nogo-A at CNs paranodes is ligand of Caspr: possible regulation of K⁺ channel localization. *EMBO*. 22, 5666-5678

- Niederost, B. P., Zimmermann, D. R., Schwab, M. E., and Bandtlow, C. E. (1999) Bovine CNS myelin contains neurite growth-inhibitory activity associated with chondroitin sulfate proteoglycans. *J. Neurosci.* 19, 8979-8989
- Nitsch, R., Frotscher, M. (1992) Reduction of posttraumatic transneuronal "early gene" activation and dendritic atrophy by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(11), 5197-200.
- O'Connor, L.T., Goetz, B.D., Couve, E., Song, J., Duncan, I.D. (2000) Intracellular distribution of myelin protein gene products is altered in oligodendrocytes of the taiep rat. *Mol Cell Neurosci* 16 (4): 396-407
- Oertel, D., Bal, R., Gardner, S.M., Smith, P.H., Joris, P.X., (2000) Detection of synchrony in the activity of auditory nerve fibers by octopus cells of the mammalian cochlear nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(22), 11773-9.
- Parnavelas, J.G., Lynch, G., Brecha, N., Cotman, C. W., Globus, A. (1974) Spine loss and regrowth in hippocampus following deafferentation. *Nature.* 248 (443), 71-3.
- Paxinos, G., Watson, C., Pennisi, M., and Topple, A. (1985) Bregma, lambda and the interaural midpoint in stereotaxic surgery with rats of different sex, strain and weight. *J Neurosci Methods.* 13, 139-143
- Oertel, T., Bandtlow, C.E., Schwab, M.E. (2000) Characterization of the gene structure and the inhibitory regions of Nogo/RTN4. *Soc Neurosci Abstract* 26: 573.
- Phillips, L.L., Belardo, E.T. (1994) Increase of c-fos and ras oncoproteins in the denervated neuropil of the rat dentate gyrus. *Neuroscience.* 58(3), 503-14.
- Pitt D, Werner P and Raine C.S. (2000) Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis. *Nat.Med.* 6: 67-70.
- Prinjha, R., Moore, S. E., Vinson, M., Blake, S., Morrow, R., Christie, G., Michalovich, D., Simmons, D. L., and Walsh, F. S. (2000) Inhibitor of neurite outgrowth in humans. *Nature* 403, 383-384
- Pschyrembel. (1994) *Klinisches Wörterbuch.* deGruyter, 257. Auflage
- Raineteau, O., Schwab, M. E. (2001) Plasticity of motor systems after incomplete spinal cord injury. *Nat.Rev.Neurosci.* 2, 263-273
- Raisman, G., (1969) Neuronal plasticity in the septal nuclei of the adult rat. *Brain Res.* 25-48.
- Ramirez, J.J. (2001) The role of axonal sprouting in functional reorganization after CNS injury: lessons from the hippocampal formation. *Restor Neurol Neurosci.*;19(3-4), 237-62
- Ribak C.E., Seress L and Amaral D.G. (1985) The development, ultrastructure and synaptic

connections of the mossy cells of the dentate gyrus. *J.Neurocytol.*; 14: 835-857.

Richardson P.M., McGuinness U.M. and Aguayo A.J. (1980) Axons from CNS neurons regenerate into PNS grafts. *Nature* 284: 264-265.

Rust, R.-S. J., Carter, J. G., Martin, D., Nerbonne, J. M., Lampe, P. A., Pusateri, M. E., Lowry, O. H. (1991) Enzyme levels in cultured astrocytes, oligodendrocytes and Schwann cells, and neurons from the cerebral cortex and superior cervical ganglia of the rat. *Neurochem.Res.* 16, 991-999

Savaskan, N. E., Plaschke, M., Ninnemann, O., Spillmann, A. A., Schwab, M. E., Nitsch, R., Skutella, T. (1999) Myelin does not influence the choice behaviour of entorhinal axons but strongly inhibits their outgrowth length in vitro. *Eur.J.Neurosci.* 11, 316-326

Savaskan N.E., Eyupoglu I.Y., Brauer A.U., et al. (2000) I Entorhinal cortex lesion studied with the novel dye fluoro-jade. *Brain Res.* 864: 44-51.

Savaskan, N. E., Skutella, T., Brauer, A. U., Plaschke, M., Ninnemann, O., Nitsch, R. (2000) II Outgrowth-promoting molecules in the adult hippocampus after perforant path lesion. *Eur.J.Neurosci.* 12, 1024-1032

Savaskan, N. E., and Nitsch, R. (2001) Molecules involved in reactive sprouting in the hippocampus. *Rev.Neurosci.* 12, 195-215

Savaskan, N. E., Alvarez-Bolado, G., Glumm, R., Nitsch, R., Skutella T., and Heimrich, B. (2002) Impaired postnatal development of hippocampal neurons and axon projections in the *Emx2*^{-/-} mutants. *J Neurochem* 83, 1196-207

Savio, T. and Schwab, M.E. (1990) Lesioned corticospinal tract axons regenerate in myelin-free rat spinal cord. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87: 4130-4133.

Scheff, S.W., Cotman, C.W., (1977) Recovery of spontaneous alternation following lesions of the entorhinal cortex in adult rats: possible correlation to axon sprouting. *Behav Biol.* 21(2), 286-93.

Schmued, L., Albertson, C., Slikker, W.J. (1997) Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. *Brain Res.* 751(1), 37-46.

Schmued, L. and Slikker, W.J. (1999) Black-gold: a simple, high-resolution histochemical label for normal and pathological myelin in brain tissue sections. *Brain Res.* 837: 289-297.

Schnell, L., and Schwab, M. E. (1990) Axonal regeneration in the rat spinal cord produced by an antibody against myelin-associated neurite growth inhibitors. *Nature* 343, 269-272

Schnell, L., Schneider, R., Kolbeck, R., Barde, Y. A., Schwab, M. E. (1994) Neurotrophin-3

enhances sprouting of corticospinal tract during development and after adult spinal cord lesion. *Nature* 367, 170-173

Schwab, M. E., and Bartholdi, D. (1996) Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Physiol Rev.* 76, 319-370

Scott B.W, Wojtowicz J.M. and Burnham W.M. (2000) Neurogenesis in the dentate gyrus of the rat following electroconvulsive shock seizures. *Exp.Neurol.*; 165: 231-236.

Simonen, M., Pedersen, V., Weinmann, O., Schnell, L., Buss., Ledermann, B., Christ., F., Sansig., G., van der Putten, H., Schwab, ME. (2003) Systemic Deletion of the Myelin-Associated Outgrowth Inhibitor Nogo-A Improves Regenerativ and Plastic Responses after Spinal Cord Injury. *Neuron.* 38., 201-211

Skaper, S.D., Moore. S.E., Walsh FS. (2001) Cell signalling cascades regulating neuronal growth-promoting and inhibitory cues. *Prog Neurobiol.* 65, 593-608

Skutella, T., Savaskan, N. E., Ninnemann, O., Nitsch, R. (1999) Target- and maturation-specific membrane-associated molecules determine the ingrowth of entorhinal fibers into the hippocampus. *Dev.Biol* 211, 277-292

Skutella, T., and Nitsch, R. (2001) New molecules for hippocampal development. *Trends Neurosci.* 24, 107-113

Smith P.M. and Blakemore W.F. (2000) Porcine neural progenitors require commitment to the oligodendrocyte lineage prior to transplantation in order to achieve significant remyelination of demyelinated lesions in the adult CNS. *Eur.J.Neurosci.* 12: 2414-2424.

Smith R. (1992) The basic protein of CNS myelin: its structure and ligand binding. *J Neurochem* 59, 1589-1608.

Snyder, D. C., Coltman, B. W., Muneoka, K., Ide, C. F. (1991) Mapping the early development of projections from the entorhinal cortex in the embryonic mouse using prenatal surgery techniques. *J.Neurobiol.* 22, 897-906

Stein, E., Savaskan, N. E., Ninnemann, O., Nitsch, R., Zhou, R., Skutella, T. (1999) A role for the Eph ligand ephrin-A3 in entorhino-hippocampal axon targeting. *J.Neurosci.* 19, 8885-8893

Steup, A., Ninnemann, O., Savaskan, N. E., Nitsch, R., Puschel, A. W., Skutella, T. (1999) Semaphorin D acts as a repulsive factor for entorhinal and hippocampal neurons. *Eur.J.Neurosci.* 11, 729-734

Steup, A., Lohrum, M., Hamscho, N., Savaskan, N. E., Ninnemann, O., Nitsch, R., Fujisawa, H., Puschel, A. W., Skutella, T. (2000) Sema3C and netrin-1 differentially affect axon growth in the hippocampal formation. *Mol Cell Neurosci.* 15, 141-55.

- Steward, O. (1976) Reinnervation of dentate gyrus by homologous afferents following entorhinal cortical lesions in adult rats. *Science*. 194, 426-428
- Steward, O., Loesche, J. (1977) Quantitative autoradiographic analysis of the time course of proliferation of contralateral entorhinal efferents in the dentate gyrus denervated by ipsilateral entorhinal lesions. *Brain Res*. 125(1), 11-21.
- Steward, O., Scoville, S.A., (1976) Cells of origin of entorhinal cortical afferents to the hippocampus and fascia dentata of the rat. *J Comp Neurol*. 169(3), 347-70.
- Steward, O., Vinsant, S.L., Davis, L., (1988) The process of reinnervation in the dentate gyrus of adult rats: an ultrastructural study of changes in presynaptic terminals as a result of sprouting. *J Comp Neurol*. 267(2), 203-10.
- Steward, O., Kelley, M. S., Torre, E. R. (1993) The process of reinnervation in the dentate gyrus of adult rats: temporal relationship between changes in the levels of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and GFAP mRNA in reactive astrocytes. *Exp.Neurol*. 124, 167-183
- Steward, O., (1995) The process of reinnervation in the dentate gyrus of adult rats: gene expression by neurons during the period of lesion-induced growth. *J Comp Neurol*. 359(3), 391-411.
- Super, H., and Soriano, E. (1994) The organization of the embryonic and early postnatal murine hippocampus. II. Development of entorhinal, commissural, and septal connections studied with the lipophilic tracer Dil. *J.Comp Neurol*. 344, 101-120
- Suzuki, M., Raisman, G. (1994) Multifocal pattern of postnatal development of the macroglial framework of the rat fimbria. *Glia* 12, 294-308
- Tessier-Lavigne, M., and Goodman, C. S. (1996) The molecular biology of axon guidance. *Science* 274, 1123-1133
- Tessier-Lavigne, M., Goodman, C. S. (2000) Perspectives: neurobiology. Regeneration in the Nogo zone. *Science* 287, 813-814
- Thon, N., Haas, C.A., Rauch, U., Merten, T., Fassler, R., Frotscher, M., Deller, T. (2000) The chondroitin sulphate proteoglycan brevican is upregulated by astrocytes after entorhinal cortex lesions in adult rats. *Eur J Neurosci*. 12,2547-2558
- Trapp B. D., Andrews S. B., Wong A., O'Connell M., and Griffin J. W. (1989) Co-localization of the myelin-associated glycoprotein and the microfilament components, F-actin and spectrin, in Schwann cells of myelinated nerve fibres. *J Neurocytol* 18, 47-60.
- de Vries H., de Jonge J.C., Schrage C., van der Haar M.E., Hoekstra D. (1997) Differential and cell development-dependent localization of myelin mRNAs in oligodendrocytes. *J Neurosci Res*. ar 1;47(5):479-88.

- Van de Velde, H. J., Roebroek, A. J., Senden, N. H., Ramaekers, F.C., Van de Ven, W. J. (1994) NSP-encoded reticulons, neuroendocrine proteins of a novel gene family associated with membranes of the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci.* 107, 2403-16.
- Wade J.V., Samson F.E., Nelson S.R. and Pazdernik T.L. (1987). Changes in extracellular amino acids during soman- and kainic acid-induced seizures. *J.Neurochem.* 49: 645-650.
- Wang, K.C., Kim, J.A., Sivasankaran, R., Segal, R., He, Z. (2002) I P75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp. *Nature* 420: 74-8
- Wang, K.C., Koprivica, V., Kim, J.A., Sivasankaran, R., Guo, Y., Neve, R.L., He, Z. (2002) II Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature* 417:941-4.
- Wang, X., Chun, S.J., Treloar, H., Vartanian, T., Greer, C.A., Strittmatter, S.M., (2002) III Localization of Nogo-A and Nogo-66 receptor proteins at sites of axon-myelin and synaptic contact. *J Neurosci.* 22, 5505-15
- Ward, N. L., and Haag, T. (1999) BDNF is needed for postnatal maturation of basal forebrain and neostriatum cholinergic neurons in vivo. *Exp Neurol* 162, 297- 310
- Weibel, D., Cadelli, D., Schwab, M. E. (1994) Regeneration of lesioned rat optic nerve fibers is improved after neutralization of myelin-associated neurite growth inhibitors. *Brain Res.* 642, 259-266
- Weigert C. (1884) Ausfuehrliche Beschreibung der in No. 2 dieser Zeitschrift erwaehten neuen Faerbungsmethode für das Zentralnervensystem, *Fortschritte der Medizin* 2, 190-194
- Witter, M. P., Groenewegen, H. J., Lopes-da-Silva, F. H., Lohman, A. H. (1989) Functional organization of the extrinsic and intrinsic circuitry of the parahippocampal region. *Prog.Neurobiol.* 33, 161-253
- Woolf, C.J. (2003) No Nogo: Now Where to go?. *Neuron*, 38, 153-156
- Wu, W., Wong, K., Chen, J., Jiang, Z., Dupuis, S., Wu, J. Y., Rao, Y. (1999) Directional guidance of neuronal migration in the olfactory system by the protein Slit. *Nature.* 400, 331-6
- Zagrebelsky, M., Buffo, A., Skerra, A., Schwab, M. E., Strata, P., and Rossi, F. (1998) Retrograde regulation of growth-associated gene expression in adult rat Purkinje cells by myelin-associated neurite growth inhibitory proteins. *J.Neurosci.* 18, 7912-7929
- Z'Graggen, W. J., Metz, G. A., Kartje, G. L., Thallmair, M., Schwab, M. E. (1998) Functional recovery and enhanced corticofugal plasticity after unilateral pyramidal tract lesion and blockade of myelin-associated neurite growth inhibitors in adult rats. *J.Neurosci.* 18, 4744-4757

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Robert Nitsch für die Überlassung des Themas sowie für die Arbeitsmöglichkeiten an diesem Institut. Ganz ausdrücklich möchte ich mich bei Dr. Nicolai Savaskan bedanken, der diese Arbeit mit sehr großem Interesse und Engagement betreut hat und viel Zeit und Geduld aufgewendet hat.

Ebenso bedanke ich mich bei Dr. Anja Bräuer für die besonders geduldvolle Einführung in die Molekularbiologie, und für ihre zahlreichen Ideen, mit denen sie diese Arbeit bereichert hat. Ich bedanke mich bei Dr. Olaf Ninnemann für seine Ruhe und vielen Ratschläge; ein großer Dank geht an PD Dr. Berndt Heimrich für seine intensiven Korrekturen und zahlreichen Ratschläge. Prof. Dr. Martin Schwab danke ich für die Überlassung des Antikörpers. Dr. Andrea Huber danke ich für die wissenschaftliche Kommunikation unpublizierter Daten. Frau Sabine Winkler möchte ich für die Hilfe bei der Anfertigung der Kryostatschnitte danken, Frau Dorle Wachenschwanz für die Fotografien, Frau Duwe für die Elektronmikroskopie und Frau Sabine Lewandowski für die Ruhe und Ausdauer bei den graphischen Arbeiten. Frau Trina Irigoien und Frau Kimberly Rosegger möchte ich für das Korrekturlesen der wissenschaftlichen Arbeiten danken. Besonders bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der AG Prof. Nitsch, die mir eine so angenehme Arbeitsatmosphäre geschafft haben, ganz besonders hervorheben möchte ich dabei vor allem Frau Laura Spilker, aber auch Herrn Dennis Lajko, Frau Peggy Thiele, Frau Anna Klötting, Frau Susi Keck, Frau Antje Diestel und Frau Miriam Petzold.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern Doris und Rainer Meier sowie meinen Großeltern Dorothea und Karl Protz, ohne deren Vertrauen und Unterstützung vor allem meine schulische Laufbahn, aber auch meine Ausbildung, mein Studium und natürlich diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Ganz ausdrücklich sei an dieser Stelle meiner Schwester Judith Meier gedankt, die mir durch ihre vielen ermutigenden Worte und ihre Fröhlichkeit die dafür nötige Energie gab. Nicht unerwähnt sollen meine engen Freunde bleiben, die dem Unterfangen zwar meist unverständlich gegenüberstanden, mich doch in allen Bereichen unterstützt haben.

Lebenslauf

PERSÖNLICHE ANGABEN

Name: Susan Meier

Anschrift: Schumpeterstraße 56; D-12309 Berlin

Tel: ++ 49 174 101 56 41

Email: susanmeier@yahoo.com

Geboren: am 02. Juni 1976 in Berlin

Staatsangehörigkeit: deutsch

AUSBILDUNG

12 / 2004 Approbation als Ärztin

4 / 1998 – 12 / 2004 Humboldt-Universität zu Berlin
Studium der Medizin
2004: Drittes Staatsexamen

2 / 1996 – 3 / 1998 Lette-Verein, Berlin
Ausbildung zur:
„Technischen Assistentin für chemische und biologische Laboratorien“
1998: Staatsexamen

9 / 1995 – 1 / 1996 Woolwich-College, London
A- level Kurse Englisch und Humanbiologie
1996: Cambridge First Certificate in English

8 / 1988 – 7 / 1995 Ulrich-von-Hutten-Gymnasium, Berlin
1995: Allgemeine Hochschulreife

ARBEITSERFAHRUNGEN

Ärztliche Tätigkeit:

- seit 8 / 2005 Kantonsspital Luzern, Klinik für Chirurgie, Luzern, Schweiz
Mitarbeit als Assistenzärztin
- 2 / 2005 – 7 / 2005 Universität Rostock, Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin, Rostock
Mitarbeit als Assistenzärztin

Praktisches Jahr:

- 6 / 2004 – 9 / 2004 Universität Bern, Regionalspital Emmental, Emmental, Schweiz
PJ-Tertial Innere Medizin
- 2 / 2004 – 5 / 2004 Universität Zürich, Kantonsspital Winterthur, Winterthur, Schweiz
PJ- Tertial Radiologie
- 10 / 2003 - 1 / 2004 University of Malta, Malta
Erasmusaufenthalt in Malta
PJ-Tertial Chirurgie

Forschungserfahrungen:

- 5 / 2004 Publikation als Erstautorin (Cell Mol Life Sci ; IP 4.765)
- 4 / 2003 Publikation als Erstautorin (FASEB J; IP 7.172)
- 11 / 2002 Society of Neuroscience, Orlando, USA
Posterpräsentation am SfN's 32 Annual Meeting
- 4 / 2000 Beginn der Doktorarbeit:
„Molekulare Analyse der Nogo Expression und der Myelinisierung im Hippocampus während der Entwicklung und nach Läsion“
- Seit 5 / 1998 AG Zell- und Neurobiologie, Institut für Anatomie, Charité, Berlin
Mitarbeit im Projekt „Nicht-neuronale Zellen“

universitäre Praktika:

- 9 / 2002 Dr. R. Schöngarth, Facharzt für Allgemeinmedizin, Berlin
Famulatur in einer Hausarzt-Praxis
- 8 / 2002 Krankenhaus im Friedrichshain, Berlin
Famulatur in der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
- 3 / 2002 Jüdisches Krankenhaus, Berlin
Famulatur in der Klinik für Neurologie
- 9 / 2001 Charité (Campus Virchow-Klinikum), Berlin
Famulatur im Institut für Radiologie
- 3 / 1999 Belfast City Hospital, Belfast, Großbritannien
Pflegepraktikum in der Klinik für Innere Medizin, Abt. Onkologie
- 8 / 1998 St. Mary's Hospital, Dublin, Irland
Pflegepraktikum in der Klinik für Innere Medizin, Abt. Geriatrie

STIPENDIEN

- 2003 / 2004 Erasmusstipendium für ein Auslandsteilstudium an der University of Malta
- 2001 „Studienbegleitende Forschungsförderung“ der Charité

BESONDERE KENNTNISSE

- Sprachen: Deutsch: Muttersprache
- Englisch: fließend in Wort und Schrift sowie Fachenglisch
- Spanisch: Grundkenntnisse
- Computer: Word, Excel, Internet, PowerPoint, CorelDRAW, PhotoPaint, PhotoShop,
 StatView, MetaMorph, MetaView, MegaFire etc.
- Sport: Schwimmen, Rudern
 Betreuung der Erwachsenenegruppe im Ruder-Verein (2001 - 2003)
 Betreuung der Jugendgruppe im Ruder-Verein (1996 – 2000)
- Reisen: Individualreisen durch Europa, Asien, Nord-, Mittel- und Südamerika

Berlin, den 14. Februar 2006

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation „Molekulare Analyse der Nogo Expression und der Myelinisierung im Hippocampus während der Entwicklung und nach Läsion“ selbst und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst habe, dass sie auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, den 14. Februar 2006

Susan Meier