

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Tübingen

Abteilung: Experimentelle Embryologie

Leiter: Professor Dr. U. Drews

Sektion Tissue Engineering

Leiter: Professor Dr. T. Skutella

**Einfluss des „Repulsiven Guidance Moleküls“
(RGM) auf die Proliferation und Differenzierung
intestinaler Stammzellen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Humanwissenschaften

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Marco Metzger
aus
Mannheim

2006

Dekan: Prof. Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. T. Skutella

2. Berichterstatter: Professor Dr. A. Nordheim

*Wer glaubt, etwas zu sein,
hat aufgehört, etwas zu werden.*

Sokrates

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	
1.1 Allgemeiner Aufbau und Funktion des Verdauungsapparates.....	6
1.2 Stammzellen des Magen-Darm-Traktes.....	10
1.2.1 Epitheliale Stammzellen der Darmmukosa	
1.2.2 Stammzellen des enterischen Nervensystems	
1.3 Das „Repulsive Guidance Molekül“ (RGM).....	15
1.4 Aufgabenstellung.....	21
2. Material und Methoden	
2.1 Zell- und Gewebematerial.....	22
2.2 Lösungen, Medien und Puffer.....	22
2.2.1 Zellkultur	
2.2.2 Immunhistochemie	
2.2.3 RNA <i>In Situ</i> Hybridisierung	
2.2.4 RT-PCR	
2.2.5 Western Blot	
2.3 Tötung der Tiere und Organentnahme.....	33
2.4 <i>In vitro</i> Zellkultur.....	33
2.4.1 Zelllinien (Caco-2, Hek-293)	
2.4.2 Primäre enterische Ganglienzellen	
2.4.3 Herstellung RGMa überexprimierender Zellen	
2.4.4 Auswachsversuche mit enterischen Ganglien	
2.4.5 Proliferationsversuche mit Ganglien und Caco-2	
2.4.6 Herstellung von rekombinantem RGMa	
2.4.7 Migrationsversuche mit Caco-2	
2.4.8 Kollapsexperimente mit enterischen Ganglien	
2.5 Immunhistochemie.....	39
2.5.1 Immunhistochemie mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern	
2.5.2 Immunhistochemie mit Substratumsetzung	
2.5.3 Proliferationsuntersuchung durch BrdU-Einbau	
2.5.4 Primär- und Sekundärantikörper	
2.6 RNA <i>In Situ</i> Hybridisierung.....	43
2.6.1 Herstellung von RNA Sonden	
2.6.2 RNA <i>In situ</i> Hybridisierung	
2.7 RT-PCR.....	47
2.7.1 RNA Isolation	

2.7.2 Reverse Transkriptase Reaktion	
2.7.3 Polymerase Kettenreaktion	
2.7.4 Agarose-Gelelektrophorese	
2.7.5 Genotypisierung der Neogenin Knockout Maus	
2.8 Western Blot.....	54
2.8.1 Proteinisolierung	
2.8.2 SDS-Page	
2.8.3 Immunoblot	
2.9 Statistik.....	59
3. Ergebnisse	
3.1 Expressionsanalyse des RGM-Neogenin-Systems <i>in vivo</i>	60
3.2 Expressionsanalyse des RGM-Neogenin-Systems <i>in vitro</i>	68
3.2.1 <i>In vitro</i> Expression in enterischen Ganglien	
3.2.2 <i>In vitro</i> Expression in Caco-2	
3.3 Einfluss von RGMa auf die Proliferation und Migration neuronaler Progenitorzellen <i>in vitro</i>	73
3.4 Einfluss von RGMa auf die Proliferation und Migration epithelialer Caco-2 Zellen <i>in vitro</i>	76
3.5 Analyse der Neogenin Knockout Maus.....	78
4. Diskussion	
4.1 Expression und Funktion des RGM-Neogenin Systems im Darmepithel.....	83
4.2 Expression und Funktion des RGM-Neogenin Systems im ENS.....	85
5. Zusammenfassung	89
6. Literatur	92
7. Anhang	
7.1 Abbildungsverzeichnis.....	101
7.2 Danksagung.....	103
7.3 Lebenslauf.....	104

1. Einleitung

1.1 Allgemeiner Aufbau und Funktion des Verdauungsapparates

Der Verdauungsapparat aller phylogenetisch höherentwickelten Wirbeltiere wird in Kopf- und Rumpfdarm untergliedert. Der Kopfdarm dient der Nahrungsaufnahme und -zerkleinerung und umfasst die Cavitas oris (Mundhöhle) und den Pharynx (Schlundraum) (Die Inhalte aus Kapitel 1.1 wurden aus folgenden Quellen entnommen und modifiziert: Lippert 1995: Kapitel 3, S.210ff.; Kühnel 1999: S.260 ff.; Benninghoff und Drenckhahn 2002, Band 1, Kapitel 7.).

Der Rumpfdarm gliedert sich in den Ösophagus (Speiseröhre) und den Magen-Darm-Kanal bestehend aus Gaster (Magen), Dünn- und Dickdarm. Von proximal nach distal unterteilt sich der Dünndarm weiter in das Duodenum (Zwölffingerdarm), Jejunum (Leerdarm) und Ileum (Krummdarm). Der Dickdarm kann in Caecum (Blinddarm), Kolon (Grimmdarm), Rektum (Mastdarm) und Canalis analis (Analkanal) untergliedert werden (Abb. 1).

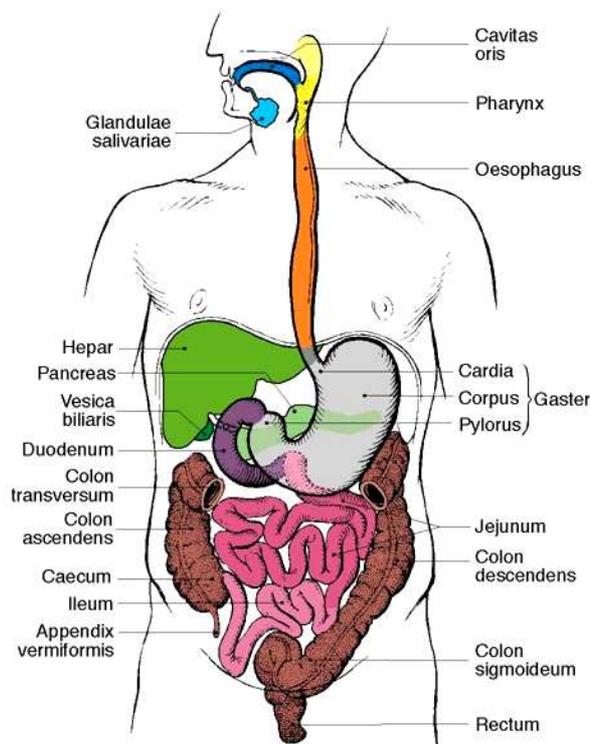


Abb. 1: Schema zur Abfolge der Abschnitte des Magen-Darm-Kanals (entnommen aus: Benninghoff und Drenckhahn 2002).

Die Funktion des Rumpfdarms ist die Digestion (Verdauung) und Resorption (Aufnahme) der Nahrung sowie die mukosale Immunabwehr. Leber und Pankreas sind embryonale Abkömmlinge des Rumpfdarmes und haben durch ihre Ausführungsgänge den Anschluss an das Darmrohr behalten. Das Darmrohr und seine Anhangsorgane sind an der dorsalen und ventralen Leibeswand durch Mesenterien (Aufhängebänder) befestigt. Der Wandaufbau des Rumpfdarmes ist vom Ösophagus bis zum Anus in sehr charakteristischer Weise aufgebaut und besteht von innen nach außen aus vier Hauptschichten, die ihrerseits in mehrere Unterschichten gegliedert werden (Abb. 2):

Hauptschicht	Unterschicht
➤ Tunica mucosa (Schleimhaut)	Epithelium mucosae (hochprismatisches Epithel)
	Lamina propria mucosae (lockeres Bindegewebe mit vielen freien Zellen)
	Lamina muscularis mucosae (glatte Muskelzellschicht)
➤ Tela submucosa (lockeres Bindegewebe, Plexus submucosus, Blut-/Lymphgefäße)	
➤ Tunica muscularis (glatte Muskelzellschichten, Plexus myentericus)	Stratum circulare (Ringmuskelschicht)
	Stratum longitudinale (Längsmuskelschicht)
➤ Tunica adventitia , extraperitoneale Lage bzw. Tunica serosa , bestehend aus Mesothel und Lamina propria, intraperitoneale Lage (lockeres Bindegewebe, Blut- /Lymphgefäße)	

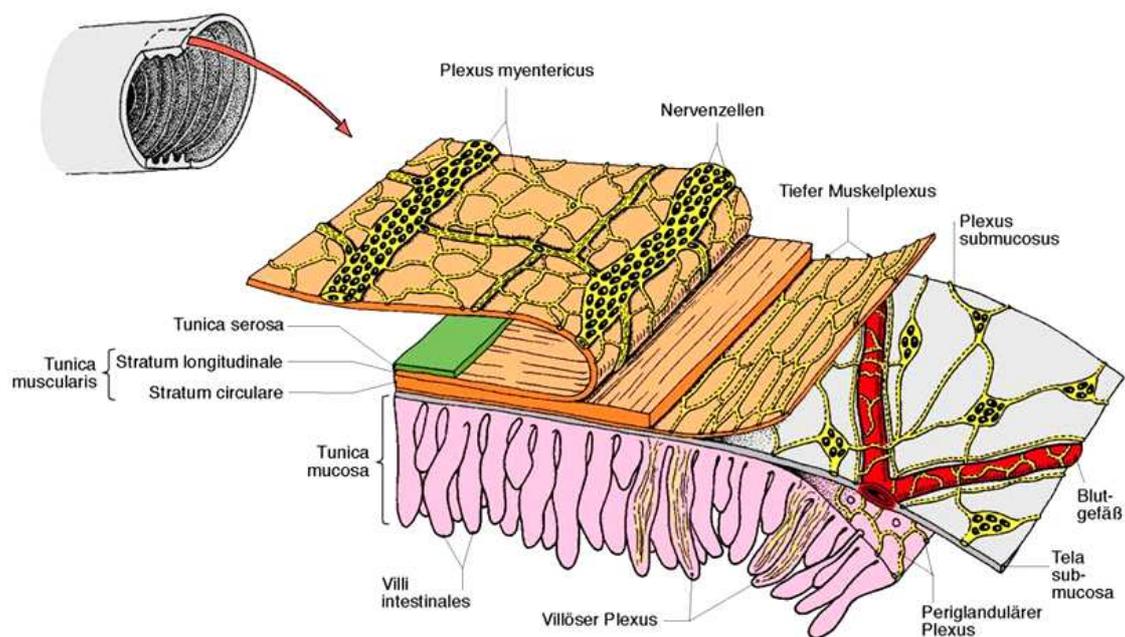
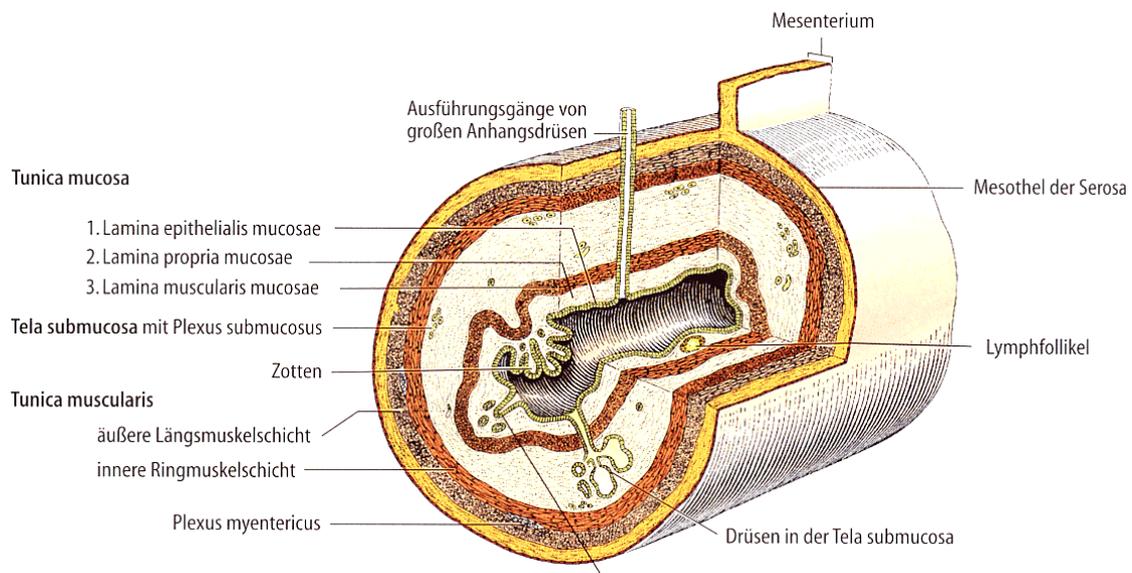


Abb. 2: Schematische Darstellungen zur Schichtung der Dünndarmwand von Säugern (entnommen aus: Thews et al. 1991, Benninghoff und Drenckhahn 2002).

Die epitheliale Auskleidung der Schleimhaut leitet sich vom Entoderm ab. Die Muskel- und Bindegewebsschichten und der peritoneale Überzug stammen von der viszerale Mesodermis ab. In das Darmrohr eingelagert sind zahlreiche über die Mesenterien zu und abführende Blut- und Lymphgefäße sowie

enterische Nervenfasern. Das enterische Nervensystem stammt vom (neuro-)ektodermalen Keimblatt ab und besitzt ein hohes Maß an Autonomie (Grundy und Schemann 2005). Es ist jedoch über extrinsische und intrinsische Verbindungen auch mit dem Parasympathicus und Sympathicus verbunden. Die parasympathischen Steuerungszentren befinden sich dabei im dorsalen Vagus Kern (Rautenhirn) und in sakralen Segmenten des Rückenmarks. Die sympathischen Kerngebiete befinden sich in den Seitenhörnern des thorakalen und lumbalen Rückenmarks. Eine Verbindung zum ZNS besteht in erster Linie über den Nervus vagus (Parasympathicus) und die Nn. splanchnici (Sympathicus). Diese dient der Koordinierung der Motorik und sekretorischen Aktivitäten über größere Distanzen. Innerhalb der Schleimhaut des Magen-Darm-Traktes findet man zahlreiche Lymphfollikel (einzeln oder in Gruppen), die man in ihrer Gesamtheit als darmassoziiertes lymphatisches System bezeichnet (engl.: *GALT*). Es stellt einen Teil des spezifischen Abwehrsystems dar, das sich mit Antigenen im Darm auseinandersetzt. Im Dünndarm (speziell Ileum) liegen die Lymphfollikel dicht gedrängt in Form zusammengesetzter Platten (Peyer-Platten).

Mit der peristaltischen Welle wird der Darminhalt in Richtung (vom Mund zum After) weiterbefördert. Im Dünndarm wird die Nahrung, die im Magen angedaut wurde, in ihre Bestandteile zerlegt (Fette, Eiweiße, Kohlenhydrate). Die Verdauungssäfte werden in der Leber/Galle und in der Bauchspeicheldrüse (Pankreas) produziert und gelangen von diesen Organen in den Zwölffingerdarm. Die hohe Resorptionsleistung des Dünndarms spiegelt sich in einer starken Oberflächenvergrößerung der Schleimhaut durch Schleimhautfalten (Kerckringsche Falten, *Plicae circulares*), fingerförmige Schleimhautausstülpungen (Zotten, *Villi intestinales*) und einem dem Darmlumen zugewandten Bürstensaum (Mikrovilli) wider. Die Einsenkungen zwischen den einzelnen Zotten werden als Krypten (Lieberkühn-Krypten) bezeichnet. Nahrungsbestandteile werden auf der Oberfläche der Darmepithelzellen durch membranständige Enzyme in kleine resorbierbare Einheiten gespalten (Fettsäuren, Aminosäuren, Monosaccharide), in die Epithelzellen aufgenommen und metabolisiert und an die Blutbahn und Lymphe abgegeben. Der Dünndarm

mündet schließlich über den Blinddarm in den Dickdarm. Im Gegensatz zum Dünndarm besitzt dieser eine ausgeprägte Darmflora, die am Verdauungsprozess beteiligt ist. Im Dickdarm wird die Verdauung beendet und der restliche Nahrungsbrei durch Rückgewinnung von Wasser eingedickt. Die Wasserrückresorption erfolgt durch aktive Resorption von etwa 25 % der durch die Nahrung zugeführten Kochsalzmenge. All jene Stoffe, die der Körper nicht verdauen und benötigen kann, gelangen in den Faeces. Äußerlich ist der Dickdarm durch eine charakteristische Anordnung von Längsmuskelstreifen (Taeniae coli), Einschnürungen (Plicae semilunares), Aussackungen (Haustra coli) sowie durch Fettanhängsel (Appendices epiploicae) gekennzeichnet. Die Längsmuskelstreifen entstehen durch eine straffe Bündelung der äußeren Längsmuskelschicht. Die Schleimhaut im Dickdarm ist insgesamt einfacher strukturiert als die im Dünndarm und weist eine wesentlich geringere Oberflächenvergrößerung auf. Die Krypten bleiben erhalten, sind jedoch länger und dichter angeordnet.

1.2 Stammzellen des Magen-Darm-Traktes

Adulte Stammzellen sind im besonderen aus dem Knochenmark, Blut und distinkten Gehirnbereichen (Hippocampus, Subventrikularzone) Gegenstand ausgiebiger Forschungen (Howell et al. 2003; Jackson et al. 1999; Jiang et al. 2002; Goodell et al. 2001). Außer diesen gibt es aber auch in anderen Organsystemen wie in der Haut (Shi et al. 2006), im Knorpel- und Knochengewebe (Aubin 1998), und im Magen-Darm-Trakt Stammzellen, die bei der Erneuerung der jeweiligen Gewebe ständig aktiv sind. Stammzellen des Magen-Darm-Traktes wurden zum einen im enterischen Nervensystem (ENS) (Bondurand et al. 2003) sowie im Darmepithel identifiziert (Potten 1998). Obwohl der Darm zu den regenerativsten Geweben des Organismus gehört, existieren bezüglich der Proliferation und Differenzierung beider Stammzellensysteme und somit über die Mechanismen der Regeneration im Vergleich zu den oben genannten Stammzellensystemen bisher nur wenige Erkenntnisse.

1.2.1 Epitheliale Stammzellen der Darmmukosa

Das Oberflächen- und Drüsenepithel des Darms unterliegt einer ständigen Erneuerung, die für alle Abschnitte des Magen-Darm-Traktes 3-6 Tage beträgt (200-300 g Zellen pro Tag) (Benninghoff und Drenckhahn 2002). Die Lebensdauer der spezifischen epithelialen Zelltypen ist länger (Wochen bis Monate). Differenzierte Epithelzellen degenerieren in der Regel durch Apoptose. Im Dünndarm liegen die Stammzellen in der unteren Hälfte, im Dickdarm in den unteren zwei Dritteln der Darmkrypten (Benninghoff und Drenckhahn 2002). Ein Kolonschleimhautbezirk des Menschen von 500 μm^2 enthält ca. 200 Krypten. Man vermutet zwischen 4-30 Stammzellen pro Krypte, aus denen sich die entsprechenden Zellen des Darmepithels, wie absorptive Enterozyten, immunkompetente M-Zellen, mucinproduzierende Becherzellen und Peptidhormon-sekretierende enteroendokrine Zellen differenzieren (Abb. 3) (Bromley et al. 1996; Potten 1998; Kaeffer 2002).

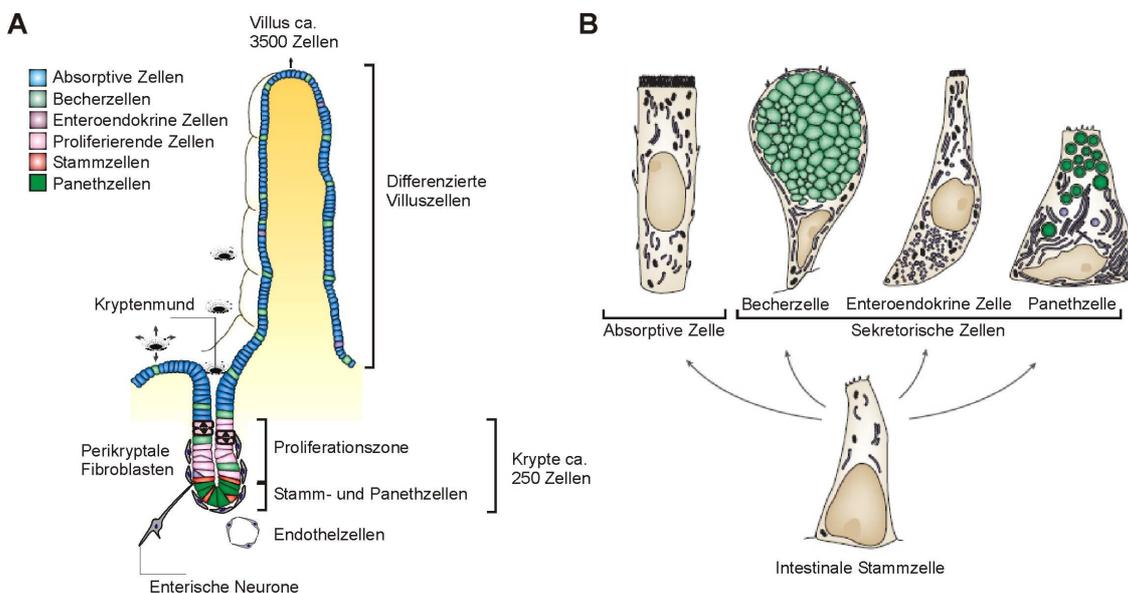


Abb. 3: Verteilung der Epithelzellsubtypen innerhalb der Krypten-Villus-Struktur im Dünndarm **(A)**. Die Stamm- und Progenitorzellen im unteren Kryptenabschnitt bilden alle differenzierten Epithelzelltypen mit ihrer jeweils charakteristischen Morphologie aus **(B)** (entnommen aus: Crosnier et al. 2006, Abbildungen bearbeitet von Timo Schmidt, Universität Tübingen, Anatomisches Institut, 2006).

Im Dünndarm vermutet man 4-5 Stammzellen am Rande der antimikrobiell-wirkenden Paneth-Drüse (in der Maus statistisch die 5. Zellposition vom Scheitelpunkt der Krypte aus gezählt) (Leedham et al. 2005). Die Homeostase des intestinalen Epithels basiert auf einer ausgewogenen Balance zwischen Zellproliferation, -differenzierung und- apoptose. Ist dieses Gleichgewicht gestört, so sind die Proliferationszonen zugleich auch der Ort der Entstehung von epithelialen Tumoren (Karzinomen), meist im kolorektalen Bereich. Eine Dysplasie ist fast immer durch eine erhöhte Proliferationsrate gekennzeichnet, die häufig auch mit verstärkter Apoptose einhergeht, welche die Überproduktion an Epithelzellen aber nicht notwendigerweise kompensiert. Das kolorektale Karzinom gehört in Deutschland, ebenso wie in der gesamten westlichen Welt, zu den häufigsten bösartigen Tumoren (Parkin et al. 1999).

Im gesunden Organismus kann sich das Darmepithel selbst nach toxischen Erkrankungen und Infektionen des Magendarmtraktes (z.B. Ruhr und Cholera) aus den Krypten heraus innerhalb von wenigen Tagen regenerieren. Die Stammzellen durchlaufen dabei eine kritische Mitose, aus der wieder eine Stammzelle und eine Epithelzelle hervorgehen (Jones 1997; Bach et al. 2000; Marshman et al. 2002). Die Hemmung und Aktivierung des Stammzell-kompartiments und die Richtung der Differenzierung (Determination) hängen entscheidend von Faktoren des umgebenden Mesenchyms und der extrazellulären Matrix im Mikro-Kompartiment ab. So werden zahlreiche Wachstums- und Differenzierungsfaktoren im perikryptalen Mesenchym (Gefäßendothelzellen, Myofibrozyten, etc.) produziert, die das Schicksal der Epithelzellen beeinflussen. Hierzu zählen *hepatocyte growth factor* (HGF), *transforming growth factor- β* (TGF- β), *keratinocyte growth factor* (KGF), *platelet-derived growth factor* (PDGF), *sonic hedgehog* (SHH), *bone morphogenic protein* (BMP), *forkhead-6* (Fkh) und Komponenten des Wnt und Notch-Pathways (Jobson et al. 1998; Mills und Gordon 2001; Leeb et al. 2002; Brittan und Wright 2004). Zusätzlich scheinen auch benachbarte intraepitheliale Lymphozyten sowie enterische Neurone der Submukosa eine wichtige Rolle bei der Proliferation und Determination der Stammzellen zu spielen (Abb. 3) (Komano et al. 1995; Bjerknes und Cheng 2001; Toumi et al. 2003). Die

Mechanismen der Determination liegen jedoch noch weitgehend im Dunkeln. Eine generelle Problematik ist zur Zeit das Fehlen von spezifischen Markern, welche eine Charakterisierung und in einem weiteren Schritt die zielgerichtete Isolation von Darmstammzellen ermöglicht. Aufgrund ontogenetischer Gesichtspunkte und ersten experimentellen Vorversuchen ist davon auszugehen, dass intestinale Stammzellen des Epithels sich auch zu anderen Zellen entodermalen Ursprungs ausdifferenzieren lassen. Damit könnte ein unlimitierter und definierter Zellpool generiert werden, der sich für regenerative Anwendungen und Zellersatzsysteme in der Humanmedizin eignen könnte. Voraussetzung ist die reproduzierbare Gewinnung von definierten Stammzellen, deren Expansion und anschließenden zielgerichteten Induktion ihrer Differenzierung *in vitro* und *in vivo*.

1.2.2 Stammzellen des enterischen Nervensystems

Im Gegensatz zu den vom entodermalen Keimblatt abstammenden epithelialen Stammzellen, haben Stammzellen des ENS ihren embryonalen Ursprung im Neuroektoderm aus der Neuralleiste (Newgreen und Young 2002a). Sie können sich im Laufe ihrer Entwicklung entweder zu Neurone oder zu Gliazellen differenzieren. Das ENS als Teil des peripheren Nervensystems ist das bei weitem größte und komplexeste mit einer Neuronenzahl vergleichbar der des kompletten Rückenmarks (ca. 10^8 Zellen) und einer Vielzahl an unterschiedlichen Neurotransmittern (Gershon et al. 1993; Costa et al. 1996; Furness 2000). Bisher konnten 16 phänotypisch unterschiedliche Neurone identifiziert werden (klassifiziert über ihre Morphologie, Transmittergehalt, Elektrophysiologie), die interessanterweise von ihrer biochemischen Ausstattung her eher den Neuronen des ZNS als denen des restlichen peripheren Nervensystems entsprechen (Sympathicus, Parasympathicus) (Grundy und Schemann 2005). So findet man im ENS sensorische Neurone, Interneurone, inhibitorische und exzitatorische Motoneurone. Diese sind konzentrisch in zwei Ganglienplexi in die Darmwand integriert (plexus myentericus, plexus submucosus) und kontrollieren weitgehend unabhängig vom ZNS die

Darmperistaltik, den Wasser- und Elektrolytetransport, Blutfluß und Sekretionen des Darmepithels (Abb. 4).



Abb. 4: Histologische Schnitte des humanen Dickdarms. Enterische Ganglien befinden sich im plexus myentericus und plexus submucosus. In einer Vergrößerung der tunica muscularis sind einzelne Ganglien des plexus myentericus zu sehen (Pfeile) (entnommen aus: Histo Tutor Software, Anatomisches Institut, Universität Tübingen).

Die Generierung von Hühnchen-Wachtel-Chimären erlaubte in der Vergangenheit eine genauere Analyse der embryonalen Neuralleistenzellwanderung und ENS Entwicklung. So stammt der Hauptteil des ENS aus dem rhombencephalen (vagalen) Teil der Neuralleiste, nur eine kleine Subpopulation wandert über den sakralen Bereich in den Dickdarm ein (Burns und Douarin 1998; Burns 2005). Der humane Darm ist nach etwa 6 Wochen, der murine Darm nach etwa 2 Wochen komplett besiedelt (Newgreen und Young 2002b). Störungen während der ENS Entwicklung, wie bei der sogenannten Hirschsprung-Krankheit (Inzidenz: 1/5000) führen in der Folge zum Funktionsverlust des betroffenen Darmabschnittes und in schweren Fällen bei Nichtbehandlung sogar zum Tod (Newgreen und Young 2002a). Patienten mit einer ausgeprägten Aganglionose sind jedoch selbst nach einer chirurgischen Intervention noch nach fünf Jahren zu 82 % inkontinent, 57 % nach 10 Jahren und 33 % nach 15 Jahren (Tsuji et al. 1999). Neue Therapieformen,

beispielsweise durch Transplantation autologer *in vitro* expandierter ENS Vorläuferzellen könnte eine vielversprechende Alternative zur herkömmlichen Operationsmethode darstellen (Burns et al. 2004; Young 2005). Multipotente neurale Stammzellen können bereits aus fötalem und postnatalem Hirn- und Darmgewebe von Säugern und humanem Gewebe isoliert, expandiert und zielgerichtet differenziert werden (Blumcke et al. 2001; Kruger et al. 2002; Bondurand et al. 2003; Rauch et al. 2005). Wie bei den epithelialen Stammzellen sind jedoch auch bei den ENS Stammzellen die Mechanismen der Zelldetermination noch weitgehend unklar. Bei der Hirschsprung-Krankheit hat man bei ca. 50 % aller behandelten Fälle eine genetische Disposition festgestellt (Newgreen and Young 2002a). So konnte eine Reihe von Genen dahingehend charakterisiert werden, dass sie einen Einfluß auf die Proliferation, Migration oder Differenzierung von Neuralleistenzellen haben. Von prinzipiellem Interesse sind hierbei vor allem Komponenten der *glial derived neurotrophic factor* (GDNF) und *endothelin-3* (ET-3) Signalwege. Zusätzlich wurden bislang auch Komponenten der Hedgehog Familie und einige Transkriptionsfaktoren (z.B. Mash1, Phox2a und 2b, Pax3, Sox10, und Hox11L1) mit enterischen Neuropathien in Verbindung gebracht. Allerdings sind die genauen Funktionsmechanismen noch nicht erforscht. Für regenerative Anwendungen enterischer Stammzellen ist wie bei den epithelialen Stammzellen eine reproduzierbare Gewinnung, vor allem aus adultem Gewebe, und deren zielgerichteten Differenzierung Voraussetzung.

1.3 Das „Repulsive Guidance Molekül“ (RGM)

Mittlerweile gibt es Hinweise, dass viele entwicklungsentscheidende Transkriptions- und Regulationsgene in den unterschiedlichen Stammzellpopulationen ein ähnliches Expressionsmuster und damit wahrscheinlich auch die entsprechenden Funktionen in der frühen Determination der Zellen aufweisen. So werden eine Reihe von Genen (Liganden, Rezeptoren, Transkriptionsfaktoren), die für die Entwicklung des Zentralnervensystems (ZNS) von Bedeutung sind, auch in spezifischen Mikrokompartimenten des Darms stark exprimiert, wie z.B. Mitglieder der Hedgehog- und Notch-Familie

oder das GDNF-RET und Endothelin-System (Ramalho-Santos et al. 2000; Schroder and Gossler 2002; Newgreen and Young 2002a).

Das ‚Repulsive Guidance Molekül‘ (RGM) ist ein weiteres interessantes Protein, das erstmals bei der Ausbildung des visuellen System im Hühnerembryo beschrieben wurde (Muller et al. 1990; Stahl et al. 1990). Im Jahr 2002 gelang eine genauere biochemische und funktionale Charakterisierung des Hühner-RGM (Monnier et al. 2002). Es handelt sich um ein GPI-gekoppeltes Glykoprotein von 33 kD Größe, das keine Sequenzhomologien zu anderen bekannten Leitmolekülen aufzeigt. RGM besitzt zwei hydrophobe Domänen, ein Signalpeptid am N-Terminus, das mit dem endoplasmatischen Retikulum interagiert sowie einem C-terminalen GPI-Anker. Zusätzlich konnten eine partielle von Willebrandt-Faktor-Domäne und ein RGD-Anteil identifiziert werden, der in Zelladhäsionsprozessen involviert sein könnte (Abb. 5).

Neben einer biochemischen Analyse konnten in obiger Studie auch erstmals funktionale Eigenschaften von RGM gezeigt werden. Ähnlich wie einige Zeit zuvor für Mitglieder der Ephrine (speziell EphrinA2 und EphrinA5) beschrieben (Drescher et al. 1997; Feldheim et al. 2000), ist auch RGM durch eine repulsive Aktivität auf temporale Axone der Retina an der topographischen, retinotektalen Projektion beteiligt. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass rekombinantes Hühner-RGM in neuronalen Zellen des ZNS neben Effekten auf die neuronale Zellmigration auch eine anti-apoptotische Wirkung aufweist (Matsunaga et al. 2004).

In Säugern wurden bisher drei Homologe beschrieben: RGMa (Chromosom 7), RGMb (Chromosom 17) und RGMc. RGMa zeigt mit 80 % die größte Homologie zum RGM des Huhns, gefolgt von RGMb mit 50 % und RGMc mit 42 % (Niederkofler et al. 2004). Für alle drei RGM-Subtypen wurde die Expression in perinatalen Entwicklungsstadien der Maus untersucht (Oldekamp et al. 2004; Schmidtmer und Engelkamp 2004). Eine starke Expression von RGMa und RGMb wurde dabei vor allem in distinkten Bereichen des ZNS wie z.B. im Telencephalon, Diencephalon, Mittelhirn, Rautenhirn und Rückenmark beobachtet. RGMb wurde zusätzlich stark im peripheren Nervensystem z.B. in kranialen Ganglien, dorsalen Hinterwurzelganglien und Ganglien der Ohranlage

detektiert. Interessanterweise wurden beide Subtypen auch in endodermalen Geweben exprimiert speziell in der Lunge und dem Magen-Darm-Trakt.

Subtyp RGMc wurde ausschließlich in quergestreifter Muskulatur und dem Myokard gefunden (Oldekamp et al. 2004; Schmidtmer und Engelkamp 2004). Auf Basis dieser Expressionsanalysen scheinen sich die Subtypen RGMa und RGMb also funktional sehr von Subtyp RGMc zu unterscheiden. Diese Hypothese wurde in einer anderen molekularbiologischen Analyse dahingehend bestätigt, dass Genlokalisierung und -komposition (z.B. Intron-Exon Verhältnis, etc.) von RGMc signifikant unterschiedlich zu der von RGMa und RGMb ist (Niederkofler et al. 2004).

Eine repulsive, axon-spezifische guidance-Aktivität während der retino-tektalen Projektionsausbildung wie sie im Hühnerembryo beobachtet wurde, konnte bei Säugern nicht nachgewiesen werden. Eine repulsive Aktivität konnte allerdings in anderen Systemen des ZNS beobachtet werden, wie beispielsweise bei der Bildung afferenter Projektionen des enthorhinalen Kortex zum *Gyrus dentatus* (Brinks et al. 2004). Desweiteren konnte eine Beteiligung von RGMa in der frühembryonalen Maus-Entwicklung beim Verschluss des Neuralrohres (Niederkofler et al. 2004) und bezüglich der Adhäsionseigenschaften von Hinterwurzelganglien nachgewiesen werden (Samad et al. 2004). Erste *in vivo* Experimente in der Ratte ergaben nach Verletzungen im ZNS im Läsionsbereich des Hirns bzw. Rückenmarks eine erhöhte RGMa Expression (Schwab et al. 2005a; Schwab et al. 2005b). Von möglicher klinischer Relevanz ist die Tatsache, dass durch eine Antikörpers-Blockierung von RGM eine signifikant bessere Regeneration der Läsion erzielt werden konnte (Hata et al. 2006). Über die zellulären, molekularen Mechanismen, die dabei durch RGM induziert werden, ist bisher nur wenig bekannt. Analog zu verwandten Lenkmolekülen, wie den Ephrinen, konnten allerdings erste Mitglieder des Rho-A-Rho Kinase-Pathways als Effektoren von RGM identifiziert werden (Hata et al. 2006). Von diesen ist bekannt, dass sie die Formation der intrazellulären Aktin-Myosin-Komplexe und damit das Zytoskelett und axonale Auswachsen modulieren (Hall 1998). Die kleinen GTP-bindenden Proteine der Rho-A Subfamilie fungieren dabei als molekulare Schlüsselmoleküle, die zwischen einem inaktiven GDP-

und aktiven GTP-gebundenen Zustand hin und her pendeln. Die Signale der Lenkmoleküle werden im Falle der Neurone über die Wachstumskegel (engl.: *growth cones* = Spitze der auswachsenden Neurite) auf das Zellinnere übermittelt, wo sich dann ein sehr schneller Umbau des Zytoskeletts vollzieht. Bei starken Reaktionen können sich die fingerartigen Zellfortsätze (Filopodien) des Wachstumskegels teilweise oder völlig zurückziehen (kollabieren). Die Stärke der Reaktion wird dabei durch die jeweils vorherrschende Ligand-Rezeptor Konzentration bzw. die Affinität des Liganden zum Rezeptor bestimmt.

Als der für RGM zugehörige Rezeptor konnte bisher ausschließlich Neogenin identifiziert werden (Rajagopalan et al. 2004). Neogenin wurde ursprünglich als Netrin-1 Rezeptor charakterisiert (Livesey 1999) und im Zusammenhang mit der Entwicklung des Nervensystems (Meyerhardt et al. 1997; de Castro 2003; Matsunaga und Chedotal 2004; Mawdsley et al. 2004) und entodermaler Gewebe untersucht (Vielmetter et al. 1994; Keeling et al. 1997; Jiang et al. 2003).

Neogenin besitzt vier hochkonservierte Immunglobulin G (IgG) Domänen, gefolgt von sechs Fibronectin-Einheiten und einer transmembranösen und intrazellulären Domäne. Aufgrund seiner IgG Strukturen zählt man den Neogenin-Rezeptor zu den neuronalen Zelladhäsions-ähnlichen-Molekülen (N-CAM). Die Interaktion mit RGM erfolgt vermutlich über die Fibronectin-Domänen (Abb. 5) (Matsunaga und Chedotal 2004).

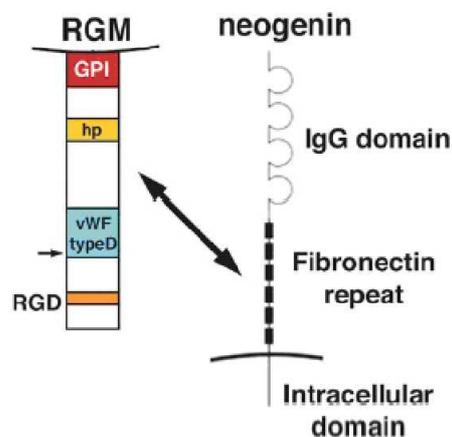


Abb. 5: Struktur und Interaktion des RGM-Liganden und RGM-Rezeptors Neogenin (entnommen aus: Matsunaga und Chedotal 2004).

Das humane Neogenin-Homolog ist etwa 50 % identisch mit dem Protein 'deleted in colorectal cancer' (DCC). DCC ist ebenfalls ein Netrin-1 Rezeptor, der in etwa 70 % aller Kolorektalkarzinome deletiert ist und als Tumorsuppressor beschrieben wurde (Keino-Masu et al. 1996; Gad et al. 1997; Mazelin et al. 2004). Bei der Entwicklung des enterischen Nervensystems ist das Netrin-1-DCC-System zudem bei sekundären (perpendikuläre Migration myenterischer Ganglien zum plexus submucosus) Migrationsprozessen involviert (Jiang et al. 2003). Ähnliche Funktionen für Neogenin im Magen-Darm-Trakt sind bislang nicht beschrieben worden. Im ZNS wurde Neogenin allerdings mit Apoptosevorgängen in Verbindung gebracht (Matsunaga et al. 2004). Es wird vermutet, dass RGM durch Neogenin aktivierte Caspasen hemmt und somit apoptotische Prozesse blockiert.

Neogenin wird bereits zu Beginn der frühen neuronalen Entwicklung (E9) exprimiert. Im Laufe der Entwicklung zeigte sich eine Spezifizierung in unterschiedlichen Organsystemen, interessanterweise in allen drei Keimblättern, einschließlich dem ZNS und endodermaler Gewebe, wie dem Magen-Darm-Trakt und der Lunge. In den sich entwickelnden neuronalen Zellen des ZNS wurde es in wachsenden Neuriten detektiert, jedoch nach terminaler Differenzierung ließ sich eine Expression nicht mehr nachweisen (Gad et al. 1997). Im Embryonalstadium E14 konnte Neogenin in distinkten Gewebeschichten unterschiedlichster Organanlagen nachgewiesen werden. So konnte eine Expression des Rezeptors in der basalen Epithelzellschicht im Darm und Pankreas, in mesenchymalen Zellen der Lunge und Niere und in differenzierenden Skelettmuskelzellen, Knorpelzellen und peripheren Nervenzellen detektiert werden (Fitzgerald et al. 2006).

Eine Netrin-abhängige Funktion von Neogenin bezüglich axonalem Wachstum im ZNS konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Biologische Effekte fand man allerdings in nicht-neuronalen Systemen durch Beeinflussung von Zelladhäsion und -migration. Während der murinen Brustdrüsenentwicklung stabilisiert das Netrin-Neogenin-System das epitheliale Vorläuferzellkompartiment und erhält somit das epitheliale Stammzellreservoir (Srinivasan et al. 2003). Desweiteren wurde durch Stimulation der Adhäsion und Migration von

glatten Muskelzellen eine Beteiligung während angiogenetischen Prozessen beobachtet (Park et al. 2004) sowie eine Mitwirkung an der Myoblastendifferenzierung zusammen mit dem Co-Rezeptor CDO (Kang et al. 2004).

Im Vergleich zu Netrin-1 ist die Bindungsaffinität von RGM zu Neogenin stärker ausgeprägt (K_D von ca. 230 pM). Da Netrin-1 und RGM keinerlei Homologien aufweisen, kann zudem von unterschiedlichen Bindungsstellen ausgegangen werden, die wiederum synergistische oder antagonistische Effekte haben könnten. Ebenfalls zeigen alle anderen bekannten Netrin-1 Rezeptoren (DCC, UNC5H1, UNC5H3) in Bindungsstudien keine Affinität zu RGM (Rajagopalan et al. 2004).

Unabhängig von Neogenin können RGMa und RGMb interessanterweise selbst als Co-Rezeptoren fungieren, indem sie die Liganden BMP-2 oder BMP-4 (TGF β -Familie) und gleichzeitig über ihre extrazelluläre Domäne an den BMP-Typ I-Rezeptor binden, wie in *in vitro* Assays und in *Xenopus* Embryonen *in vivo* gezeigt wurde (Babitt et al. 2005). Nach einer Aktivierung durch RGMa wurden Faktoren der BMP-Signalkaskade, wie Smad 1, 5 und 8 sowie der Differenzierungsinhibitor Id1 hochreguliert. Desweiteren wurde die Aktivität der BMP Signalkaskade speziell in RGM-exprimierenden Neuronen detektiert. BMPs sind während der Embryogenese an zahlreichen morphogenetischen Prozessen beteiligt (Guan und Rao 2003). Hierzu zählen die Hemmung der neuralen Differenzierung, die Spezifizierung des Körperbauplans, die Induktion von Skelettgewebe, die Aufrechterhaltung der Proliferation von Muskelvorläuferzellen und, bei höherer Konzentration, die Auslösung des Apoptose-Programms (Amthor et al. 1998; Amthor et al. 1999). Diese Daten deuten darauf hin, dass BMP-vermittelte Effekte bei der Betrachtung des RGM-Neogenin Systems berücksichtigt werden sollten.

1.4 Aufgabenstellung

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von sogenannten Leitmolekülen (engl.: *guidance molecules*) speziell bei der Ausbildung des Nervensystems untersucht (Song und Poo 2001). Deren Einfluss konnte mittlerweile auch in vielen entwicklungsbiologischen Aspekten außerhalb des ZNS u.a. in entodermalen Organsystemen nachgewiesen werden wie z.B. bei Netrin/DCC, Ephrin/Eph, Semaphorin/Neuropilin, Slit/Robo (Cohen et al. 2001; Batlle et al. 2002; Srinivasan et al. 2003; Young et al. 2004a; Mazelin et al. 2004; Park et al. 2004; Hafner et al. 2005). Biologische Effekte für das RGM-Neogenin-System wurden bislang nur im ZNS und Teilen des peripheren Nervensystems untersucht, bisher jedoch noch nicht im Gastrointestinaltrakt, obwohl hier ein interessantes Verteilungsmuster vorliegt (Gad et al. 1997; Oldekamp et al. 2004; Fitzgerald et al. 2006). Das Expressionsmuster deutet darauf hin, dass das RGM-Neogenin-System eine regulatorische Funktion auf intestinale Proliferations- und Differenzierungsvorgänge besitzen könnte.

Mit der vorliegenden Arbeit sollten folgende Teilziele verfolgt werden:

1. Eine ausführliche entwicklungsabhängige Expressionsanalyse des RGM-Neogenin-Systems im Dünndarm und Dickdarm der Maus.
2. Die Etablierung von neuronalen Primärkulturen aus dem Darm sowie der Darmepithelzelllinie Caco-2 mit anschließender Expressionsanalyse des RGM-Neogenin-Systems *in vitro*.
3. Untersuchungen biologischer Effekte von RGMa auf die Proliferation und Differenzierung enterischer Stamm- und Vorläuferzellen und Caco-2 Epithelzellen *in vitro*.
4. Eine Analyse von Neogenin Knockout Mäusen hinsichtlich möglicher Veränderungen zur Morphologie des Darmgewebes und bezüglich der Proliferations- und Differenzierungsleistung der intestinalen Stammzellen.

2. Material und Methoden

2.1 Zell- und Gewebematerial

Für die Gewinnung von Primärmaterial wurden Embryos, embryonale und postnatale Dünn- und Dickdärme von C57BL/6 Mäusen bzw. Neogenin Knockout Mäusen (zur Verfügung gestellt von: Dr. Strittmatter, Department of Neurology, Yale University School of Medicine, USA) verwendet. Untersucht wurden die embryonalen Stadien E11, E14, E18, die postnatalen Stadien P0, P7, P14, P21 und adulte Tiere. Für die Isolation von primären enterischen Ganglienzellen wurden ausschließlich Därme des Embryonalstadiums E18 präpariert.

Als Zelllinien für *in vitro* Untersuchungen dienten Hek-293 Zellen, eine transformierte humane Nierenepithel-Karzinomzelllinie (Graham et al. 1977) und Caco-2 Zellen, eine humane Kolon-Adenokarzinomzelllinie (Fogh et al. 1979) (DSMZ, Braunschweig). Beide Zelllinien wurden maximal bis zur Passage 40 für die Experimente kultiviert.

Zur Amplifikation von rekombinanter Plasmid-DNA wurden Bakterien des Stammes *Escherichia coli* (*E. coli*), XL1-Blue (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) verwendet.

2.2 Lösungen, Medien und Puffer

2.2.1 Zellkultur

Zelllinien:

Caco-2 und Hek-293

DMEM Medium, high Glucose (PAA, Cölbe):

Zusätze:

10 % Fötale Kälberserum (FCS) (PAA), hitzeinaktiviert für 1 h bei 56°C

1x Penicillin/Streptomycin (PAA, 100x stock)

1x L-Glutamin (Gibco, Karlsruhe; 100x stock)

Lösungen für die Passagierung:

1x PBS (ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) (PAA)

Trypsin/EDTA (0,05 %/0,02 %) in PBS pH 7,2 ohne Ca/Mg (PAA)

Einfriermedium zur Kryokonservierung:

1x DMEM mit 20% FCS und 10% DMSO

Primäre Zellen:

embryonale enterische Ganglienzellen (Neurosphären-Kulturen)

DMEM-F12 (PAA)

Zusätze:

1x N2-Supplement (Gibco, 100x stock)

1x Penicillin/Streptomycin (PAA, 100x stock)

1x L-Glutamin (Gibco, 100x stock)

20 µg/ml bFGF (Roche, Mannheim), täglich frisch zugeben

20 µg/ml EGF (Roche), täglich frisch zugeben

Stock-Lösung basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF):

40 µg/µl bFGF (Roche)

in steril-filtrierter Phosphate-buffered saline (PBS) mit 1 mg/ml bovinem Serumalbumin, Fraktion V (BSA, Sigma, Taufkirchen) und 10 mg/ml Heparin (Euro OTC Pharma, Bönen) lösen
aliquotieren und bei -20°C lagern

Stock-Lösung epidermaler Wachstumsfaktor (EGF):

40 µg/µl EGF (Roche)

in sterilem PBS lösen

aliquotieren und bei -20°C lagern

Zellkulturplattenbeschichtung:

Multiwellplatten (Greiner, Frickenhausen) mit 10 µg/ml Fibronectin / 1 µg/ml Poly-L-ornithin / 20 µg/ml Laminin (Sigma) mindestens 1 h bei RT inkubieren

nach Inkubation 1x mit Hanks-Puffer (PAA) waschen

Enzymlösung zum Verdau des Primärmaterials:

0,05 % Trypsin in PBS pH 7,2 ohne Ca/Mg (PAA)

Enzymaktivität nach Verdau durch Zugabe von 10 % FCS stoppen

Bakterien:

E. coli Bakterien

Luria Bertani (LB)- Medium:

1 % Bakterien Trypton (Roth, Karlsruhe)

0,5 % Hefeextrakt (Roth)

1 % NaCl (Roth)

mit ddH₂O auf 1 l auffüllen,

pH 7,0 mit NaOH (Roth) einstellen und autoklavieren

2.2.2 Immunhistochemie

4 % Paraformaldehyd (PFA):

100 ml PBS (10x)

800 ml H₂O

40 g PFA (Sigma)

auf 60 °C erwärmen

pH 7,4 mit 10 M NaOH (Sigma) einstellen

auf 1L mit ddH₂O auffüllen

filtrieren und bei 4°C lagern (bei -20°C für länger e Lagerung)

Tris-Buffered-Saline (TBS)-Stammlösung (10x):

60,6 g Trizma base (Sigma)

163,6 g NaCl (Roth)

in ca. 1,5 l a.d. lösen, pH 7,5 einstellen ad 2 l ddH₂O

→ vor Gebrauch 1:10 mit a.d. verdünnen

Substratpuffer (10x):

42 g Zitronensäure-Monohydrat (Roth)

68 g Imidazol (Sigma)

58,4 g NaCl (Roth)

in ca. 800 ml ddH₂O lösen, pH 7,0 einstellen ad 1 l ddH₂O

Zitratpuffer (10x):

42 g Zitronensäure-Monohydrat (Roth)

in ca. 1,5 l ddH₂O lösen, pH 6,0 einstellen ad 2 l ddH₂O

→ vor Gebrauch 1:10 mit ddH₂O verdünnen

0,1 % Tris-BSA :

100 ml Tris-Puffer (1x) (Sigma)

+ 100 mg Albumin, Fraktion V aus Rinderserum (=BSA) (Sigma)

→ lösen und bei 4°C lagern

H₂O₂-Blockierlösung:

3 % H₂O₂ (Sigma)

in TBS Gebrauchslösung

→ stets frisch ansetzen

Fast Red-Substratlösung (5 ml):

4 mg Naphtol-AS-MX-Phosphat (Sigma)

100 µl N, N-Dimethylformamid (Merck, Darmstadt)

4,9 ml 0,1 M Tris-HCl, pH 8,2 (Sigma)

1,5 mg Levamisol (Sigma)

5 mg Fast red TR Salz (Sigma)

mit 0,1 M NaOH pH 8,2 einstellen

Lösung vor Gebrauch filtrieren, stets frisch verwenden

β-Galactosidase-Färbung:

Fixierlösung:

1 % Formaldehyd (Sigma)
0,2 % Glutaraldehyd (Sigma)
2 mM MgCl₂ (Roth)
5 mM EGTA (Sigma)
0,02 % NP-40 (Sigma)
in 1x PBS lösen

Waschlösung:

0,02 % NP-40 (Sigma) in 1x PBS

X-Gal-Färbelösung:

5 mM K₃Fe(CN)₆ (Sigma)
5 mM K₄Fe(CN)₆ (Sigma)
2 mM MgCl₂ (Roth)
0,02 % NP-40 (Sigma)
1 ml/ml X-Gal (Sigma)
in 1x PBS lösen

BrdU-Proliferations-Assay :

Ethanol-Fixans :

50 mM Glycin (Merck)
in 70% Ethanol (Merck) lösen
mit 2 M HCl (Roth) pH auf 2,0 einstellen
bei -20°C lagern

BrdU-Kit I (Roche):

BrdU Reagenz (1000x)
Anti-BrdU-Antikörper mit Nukleasen

1x Inkubationspuffer
10x PBS Waschpuffer

2.2.3 RNA *In Situ* Hybridisierung

alle Lösungen werden in RNase-freiem DEPC-ddH₂O hergestellt

DEPC-ddH₂O:

0,1% v/v Diethylpyrocarbonat (DEPC, Roth)
in ddH₂O lösen
für mindestens 3 h bei 37°C inkubieren
autoklavieren

10x PBS:

80 g/l NaCl (Roth)
2,4 g/l KH₂PO₄ (Roth)
35,8 g/l Na₂HPO₄*12H₂O (Roth)
pH 7,4 einstellen, anschließend autoklavieren
für 1x Gebrauchslösung 0,05 % Tween 20 (Sigma) zugeben

4 % Paraformaldehyd (PFA):

100 ml PBS (10x)
800 ml H₂O
40 g PFA (Sigma)
auf 60 °C erwärmen
pH 7,4 mit 10 M NaOH (Sigma) einstellen
ad 1L H₂O
filtrieren und bei 4°C lagern (bei -20°C für längere Lagerung)

Triethanolamin (TEA)-Puffer:

18,56 g/l (= 0,1 M) Triethanolamin-hydrochlorid (Sigma)
pH 8,0 mit 1 M NaOH (Sigma) einstellen

TEA-Essigsäureanhydridlösung (stets frisch ansetzen):

0,25 % (v/v) Essigsäureanhydridlösung (Sigma) in 0,1 M TEA-Puffer

Hybridisierungslösung:

100 mg/ml Dextransulfat (Sigma)

0,3 M NaCl (Roth)

0,02 M Tris-Base (Sigma), pH 8

5 mM EDTA (Roth), pH 8

→ Dextransulfat unter leichtem Erhitzen lösen, danach abkühlen und

Zugabe von:

1x Denhardt's-Lösung (Sigma, 50x)

0,5 mg/ml t-RNA (Roche)

50 % Formamid (Roth, deionisiert)

→ aliquotieren und lagern bei -20°C

→ vor Gebrauch 10 mM DTT (Sigma) zugeben

Silanisierung von Objektträgern:

Objektträger 4 h bei 180°C backen

1x kurz waschen in Aceton

10 min in 2 % 3-aminopropyltriethoxy-silane/Aceton (Sigma) inkubieren

1x kurz in ddH₂O waschen und bei 37°C trocknen

20x Saline-Sodium-Citrat (SSC)-Puffer:

175,3 g/l (= 3 M) NaCl (Roth)

88,2 g/l (= 0,3 M) Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (Sigma)

pH 7,0 mit 1 M HCl (Roth) einstellen, anschließend autoklavieren

10x Maleinsäurepuffer:

116,1 g/l (= 1 M) Maleinsäure (Roth)

87,7 g/l (= 1,5 M) NaCl (Roth)

pH 7,0 mit 10 M NaOH (Roth) einstellen, anschließend autoklavieren

für 1x Gebrauchslösung 0,05 % Tween 20 (Sigma) zugeben

2x Proteinase K (PK)-Puffer:

12,1 g/l (= 100 mM) Tris-HCl

3,72 g/l (= 10 mM) EDTA:

pH 8,0, anschließend autoklavieren

für 1x Gebrauchslösung 0,05 % Tween 20 zugeben

10x Tris-NaCl (TN)-Puffer:

121,1 g/l (= 1 M) Tris-HCl

87,7 g/l (= 1,5 M) NaCl

pH 7,5 mit 10 M NaOH einstellen, anschließend autoklavieren

für 1x Gebrauchslösung 0,05 % Tween 20 zugeben

10x Blockierungslösung:

100 g/l Blockierungs-Reagenz (Roche) 1x Maleinsäurepuffer bei 60°C

lösen (> 1 h), Lösung autoklavieren und bei 4°C aufbewahren

für 1x Gebrauchslösung 1:10 Verdünnung in 1x Maleinsäurepuffer

herstellen

Alkalische Phosphatase (AP)-Substratpuffer:

12,1 g/l (= 0,1 M) Tris/HCl, pH 9,5

5,84 g/l (= 0,1 M) NaCl

pH 9,5 einstellen

10,2 g/l MgCl₂

NBT/BCIP-Substratlösung:

3,5 µl/ml 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat (BCIP)

4,5 µl/ml Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)

in AP-Substratpuffer + 0,5mg/ml Levamisol (1:40 von 20 mg/ml stock)

Dot-Blot-Verdünnungspuffer:

ddH₂O + 20x SSC-Puffer + Formaldehyd (Sigma) im Verhältnis 5+3+2
mischen

2.2.4 Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

10x Tris-Base-Borsäure-EDTA (TBE)-Puffer:

0,9 M Tris-Base (Roth)
0,9 M Borsäure (Roth)
20 mM EDTA (Sigma), pH 8,0
in ddH₂O lösen

1kb DNA-Leiter (Invitrogen)

Agarosegel-Ladepuffer:

40 % w/v Sucrose (Sigma)
0,25 % w/v Bromphenolblau (Serva)
in ddH₂O lösen

Ethidiumbromid-Färbepuffer :

1 µg/ml Ethidiumbromid (Sigma) in ddH₂O
(= 1:1000 Verdünnung von 10 mg/ml stock)

Trizol-Reagenz zur RNA Isolation (Invitrogen)

DNase-Verdau (Invitrogen):

2 µl 10x Puffer
x µl RNA (1-2 µg)
2 µl DNase (1 U/µl)
ad 20 µl ddH₂O
15 min RT inkubieren
1 µl 20 mM EDTA (Sigma)
10 min Hitzeinaktivierung bei 65°C

RT-Reaktion (Invitrogen):

- x µl RNA (10 pg – 5 µg)
- 2 µl Oligo d(pT)₁₈ mRNA Primer (500 µg/ml)
- 2 µl dNTP-Mix (10 mM)
- ad 25 µl ddH₂O
- 5 min 65°C, dann auf Eis
- 1 µl RNaseOUT (40 U/µl)
- 8 µl First-Strand Puffer (5x)
- 4 µl DTT (0,1 M)
- 2 µl Superscript II RT (200 U/µl)
- 50 min 42°C, dann 10 min 70°C

PCR-Mix (Roche):

- x µl cDNA (50 pg - 100 ng)
- 1 µl dNTP-Mix (10 mM)
- 5 µl 10x PCR-Puffer mit MgCl₂
- 1 µl Forward Primer (10 pmol/µl)
- 1 µl Reverse Primer (10 pmol/µl)
- 1 µl Taq DNA Polymerase (5 U/µl)
- ad 25 µl dd-H₂O

2.2.5 Western Blot

SDS-Probenpuffer:

- 10 mg Bromphenol (Sigma)
- 10 ml 1,5 M Tris, pH 6,8 (Sigma)
- 6 ml 20 % SDS (Roth)
- 30 ml Glycerol (Sigma)
- 15 ml β-Mercaptoethanol (Sigma)

Laufpuffer (1x):

- 3,03 g Tris-Base (Roth)
- 14,4 g Glycin (Sigma)

5 ml 20 % SDS (Sigma)
in 1 L ddH₂O lösen

Blot-Puffer (1x):

3,03 g Tris-Base (Roth)
14,4 g Glycin (Roth)
20 % Methanol (Roth)
pH 8,5 einstellen

Trenngel (12 %)

4,8 ml Acrylamid/Bis-Lösung (29:1) = 40 % (Sigma)
3 ml 1 M Tris-HCl, pH 8,8 (Roth)
60 µl 20 % SDS (Sigma)
3 µl TEMED (Sigma)
180 µl 80 mg/ml Ammoniumpersulfat (APS) (Sigma)
3,9 ml ddH₂O

Sammelgel (5 %):

1,66 ml Acrylamid/Bis-Lösung (29:1) = 40% (Sigma)
1,25 ml 1 M Tris-HCl, pH 6,8 (Sigma)
50 µl 20% SDS (Sigma)
3 µl TEMED (Sigma)
150 µl 80 mg/ml Ammoniumpersulfat (APS) (Sigma)
6,88 ml ddH₂O

Coomassie-Färbelösung:

0,05 % Coomassie Brilliant Blue (Merck)
in Eisessig:Methanol:ddH₂O (1:5:5) (Roth)
SDS-Gel ca. 1 h bei RT anfärben

Coomassie-Entfärbelösung:

7,5 % Methanol (Roth)

5 % Eisessig (Roth)

in ddH₂O lösen

SDS-Gel bis zu mehrere Stunden bei RT entfärben

2.3 Tötung der Tiere und Organentnahme

Für die terminliche Verpaarung wurden am Morgen des entsprechenden Tages je 1 männliche C57BL/6 Maus bzw. Neogenin Knockout Maus mit bis zu 4 Weibchen zusammengesetzt. Etwa 10-12 h später erfolgte bei den Weibchen die Überprüfung auf Bildung eines Vaginal-Pfropfes. Der nächste Tag um 12 Uhr entsprach dann dem Embryonalstadium E1.

Alle Tiere wurden gemäß den Vorschriften des deutschen Tierschutzgesetzes gehalten, behandelt und keinem unnötigen Leiden ausgesetzt (BGB1 S.1105, ber. S. 181, Abschnitt 2 (§2+3), 5 (§7-9) und 8 (§119)). Bei adulten Tieren erfolgte die Tötung durch eine verlängerte Inhalationsnarkose mittels CO₂-Begasung. Embryonen und postnatale Tiere bis zu einem Alter von 2 Wochen nach der Geburt wurden fachgerecht dekapitiert.

Die Embryonen bzw. das Darmgewebe wurden unter einer Stereolupe (Zeiss, Jena) in gekühltem Hanks-Puffer herauspräpariert und vorsichtig von umgebendem Fett und Mesenterien befreit. Für histologische Analysen wurde das Gewebe sofort bei -80°C in Tissue-Tek-EinfriermEDIUM (Sakura, Heppenheim) schockgefroren. Für die Zellkultur wurde das Gewebe weiter mechanisch zerkleinert und enzymatisch verdaut.

2.4 *In vitro* Zellkultur

Für Zellkulturexperimente wurden primäre enterische Ganglienzellen sowie zwei verschiedenen Zelllinien (Hek-293, Caco-2) verwendet. Zellkulturexperimente wurden stets unter sterilen Bedingungen in Laboratorien der Sicherheitsstufe 1 durchgeführt. Alle Zellen wurden bei 37°C/5 % CO₂/95 % Feuchtigkeit und in Standardzellkulturgefäßen (Multiwellplatten, T-Flasks; Greiner) kultiviert.

2.4.1 Zelllinien (Caco-2, Hek-293)

Die embryonale, humane Nierenepithelzelllinie Hek-293-Zelllinie wurde für Kokultivierungszwecke verwendet und lag bereits in der mit RGMA bzw. mit einem Leervektor transfizierten Form vor. Die humane Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 wurde für *in vitro* Experimente verwendet. Beide Zelllinien wurden zu Beginn zunächst vermehrt und nach Standardprotokoll in speziellen Einfriergefäßen (Mr. Frosty, neolab, Heidelberg) und Einfriermedium weggefroren, um stets auf junge Passagen zurückgreifen zu können. Die transfizierten Hek-293 Zellen konnten durch einfaches Abspülen von der Plastikgefäßoberfläche abgelöst werden. Caco-2 Zellen hingegen mußten ca. 3 min mit vorgewärmtem Trypsin inkubiert werden, damit die Zellen sich ablösten. Die Trypsinaktivität wurde durch Zugabe von 10 % Serum abgestoppt und durch einen Waschschrift mit Medium entfernt. Beide Zelllinien wurden im Verhältnis 1:5-1:10 mit Medium gesplittet und maximal bis zur Passage 40 kultiviert.

2.4.2 Primäre enterische Ganglienzellen

Primäre enterische Ganglien wurden ausschließlich aus embryonalen Därmen (E18) gewonnen. Die präparierten und gesäuberten Därme wurden gesammelt und vorsichtig versucht, die Muskelschicht vom Rest des Darmes abzutrennen. Für die Kultivierung von enterischen Ganglienzellen konnten bereits erfolgreich Protokolle etabliert werden (Kruger et al. 2002; Bondurand et al. 2003). Demnach wachsen die Zellen in der Zellkultur als kugelförmige, stark proliferierende Organoide, sogenannte Neurosphären, die in Neurone und Gliazellen differenziert werden können. Anlehnend an diese Protokolle wurde für die Kultivierung die Muskelschicht des kompletten Darms verwendet, soweit diese sich abziehen ließ, mechanisch zerkleinert und ca. 15 min in Trypsinlösung bei 37°C verdaut, um das Muskelgewebe vom Nervengeflecht zu trennen. Nach Zugabe von DNase I und 10 % FCS konnte das Gewebe durch mehrmaliges Triturieren mit einer abgeflamten 1 ml Pipettenspitze homogenisiert werden. Die Suspension wurde 2x bei 200 g in einer Tischzentrifuge (Modell 5810R, Eppendorf, Hamburg) abzentrifugiert und jeweils in

Basalmedium resuspendiert. Größere nichtverdaute Muskelstücke wurden vor der Zentrifugation entfernt. Das Zellpellet wurde in ca. 4 ml N2-Proliferationsmedium (incl. Wachstumsfaktoren) aufgenommen und auf die wells einer Laminin/Fibronectin/Poly-L-Ornithin beschichteten 12-well Platte gleichmäßig verteilt. Der erste Mediumwechsel erfolgte bereits am nächsten Tag, um nicht adhärentes Zellmaterial zu entfernen. Danach wurde das Medium alle 3 Tage gewechselt, wobei an jedem Tag frische Wachstumsfaktoren zur Aufrechterhaltung der Zellproliferation zugegeben wurden.

2.4.3 Herstellung RGMa überexprimierender Zellen

Zur Untersuchung von möglichen RGMa Effekten auf die Proliferation und Differenzierung intestinaler Ganglien und Epithelzellen wurden Kokultivierungsexperimente mit den transfizierten Hek-293 Zellen durchgeführt. Diese lagen bereits in ihrer mit der kodierenden Sequenz für das murine RGMa (Schmidtmer and Engelkamp 2004) transfizierten Form vor und wurden bereits erfolgreich in Kokultivierungsversuchen mit Explantaten des entorhinalen Kortex eingesetzt (Brinks et al. 2004). Die Hek-293 Zellen wurden durch ein für diese Zelllinie optimiertes Protokoll elektroporiert (Amaxa). Als Vektor diente der pSec2TagA-Vektor, der einen CMV-Promotor und Zeocinresistenz enthält (Invitrogen). Durch Zugabe von Zeocin (0,3 mg/ml) in das Kulturmedium konnte somit eine Selektion der transfizierten Zellen erreicht werden. Eine Überprüfung der RGMa Expression im Vergleich zu den Kontrollzellen, die nur den Leervektor enthielten, erfolgte über eine Western Blot Analyse mit RGMa-Antikörpern (Monnier et al. 2002).

2.4.4 Auswachsversuche mit enterischen Ganglien

Expandierte Neurosphärenkulturen wurden für 3 Tage auf nahezu konfluenten Hek-293 Monolayern (ca. 5×10^4 Zellen/cm² RGMa bzw. Kontrollzellen) kultiviert. Zur Induktion der Differenzierung wurde das Proliferationsmedium ohne Wachstumsfaktoren und Zugabe von 2 % FCS und 200 μ M Ascorbat-2-phosphat verwendet. Das Medium wurde vorsichtig jeden Tag gewechselt. Nach 3 Tagen wurde der Versuch gestoppt d.h. die differenzierten Zellen mit 4% PFA fixiert,

immunohistochemisch mit β -Tubulin III gefärbt und ausgewertet. Insgesamt wurden in drei unabhängigen Experimenten jeweils 40 Neurosphären quantitativ erfasst. Hierzu wurden mit Hilfe der AxioVision LE 4.3 Software (Zeiss) alle ausgewachsenen Neurite, die die Grenze von 30 μm überschritten haben, ausgezählt. Einzelne Neurosphären, die keinerlei Auswachsverhalten zeigten bzw. abgestorben waren, wurden nicht berücksichtigt.

Um zusätzlich zu zeigen, dass es sich bei den Versuchen wirklich um direkt vermittelte RGMa-Effekte handelt, wurden die Feederzellen abgetötet (Zellen 1x mit ddH₂O waschen und mindestens 15 min bei Raumtemperatur eintrocknen lassen). Zum anderen wurden die Sphären für 15 min mit einem Neogenin-Antikörper (1:50; N19, Santa Cruz), der gegen die extrazelluläre Domäne gerichtet ist, vorinkubiert, um den Neogenin-Rezeptor zu blockieren. Der Antikörper blieb zudem während des kompletten Versuchs im Medium. Zelltoxische Substanzen der Original-Antikörperlösung (z.B. Natriumazid) wurden durch Dialyse gegen Hanks-Puffer über Nacht bei 4°C entfernt. Die Analyse des Neuriten-Auswachsverhaltens wurde bei diesem Kontrollversuch auf bis zu 90 μm (= starkes Auswachsverhalten) ausgeweitet.

2.4.5 Proliferationsversuche mit enterischen Ganglien und Caco-2

Zusätzlich zum Auswachsverhalten wurde das Proliferationsverhalten der Neurosphären untersucht. Hierzu wurden die Sphären 2 Tage auf toten Feederzellen unter Proliferationsbedingungen ko-kultiviert und anschließend für 2 h mit dem Nukleosidanaloga 5-bromo-2-deoxyuridin (BrdU) aufgeladen, immunzytochemisch aufgearbeitet und jeweils 15 Sphären ausgewertet d.h. es wurde der prozentuale Anteil BrdU positiver Zellen gegenüber den DAPI-gefärbten Zellen ermittelt.

Analog wurden auch Experimente mit Caco-2 Epithelzellen durchgeführt. Die Aussaatdichte der Caco-2 Zellen betrug 3×10^5 Zellen/cm². Die Analyse erfolgte ebenso nach 2 Tagen in Kultur. Als Positivkontrolle wurde EGF, das die Proliferation von Epithelzellen steigert, verwendet (40 ng/ml). Bezüglich der Zellzahl wurden insgesamt jeweils 8 mikroskopische Felder (ca. 0,5 mm²; 10x

Objektiv) ausgewertet. Zur Analyse des epithelialen Migrationsverhaltens wurde die Boyden-Kammer gewählt.

2.4.6 Herstellung von rekombinantem RGMA-Fc-Fusionsprotein

Die kodierende Sequenz von RGMA ohne das Signalpeptid und den GPI-Anker wurden in den plg-plus-Tail Vektor (Novagen) mit den Restriktionsschnittstellen für Hind III und Xba I einkloniert und über PCR amplifiziert. Der GPI-Anker wurde durch den Fc-Teil eines humanen IgG-Antikörpers ersetzt und damit löslich gemacht. Der Fc-Teil alleine diente als Kontrolle.

Als Expressionssystem wurde die Hek-293 Zelllinie verwendet, die die Fusionsproteine (RGMA-Fc und Fc) in den Zellkulturüberstand abgaben. Dieser wurde gesammelt und über eine Membransäule (Pall, Dreieich) mit einem cut off von 40 kD im Verhältnis 1:5 aufkonzentriert (ca. 5 min bei 13000 upm, minispin (Eppendorf)) und 1 h bei 37°C, 600 upm in einem Thermomixer (Eppendorf) mit einem humanen IgG1 Antikörper (1:200; Calbiochem, Darmstadt) geclustered, um die Proteinaktivität zu maximieren. Für die Experimente wurden jeweils 80 µl/ml geclusterter Überstand eingesetzt.

2.4.7 Migrationsversuche mit Caco-2 (Boyden-Kammer)

Die von Boyden im Jahre 1962 entwickelte Methode basierte auf einer Plexiglaskammer, bei der zwei Kompartimente durch eine Zellulose-Ester-Membran getrennt wurden. Unter dieser membranösen Barriere befand sich die zu untersuchende chemoattraktive Substanz, darüber im zweiten Kammerbereich die Zellsuspension. Nach einer dreistündigen Inkubation wurden die Flüssigkeiten entfernt, die Filteroberflächen abgewaschen und der Filter und die darin befindlichen Zellen fixiert und gefärbt. Die ursprüngliche Methode von Boyden ist vom Prinzip her unverändert, mit dem Unterschied, dass heute kommerzielle Membraneinsätze aus Polycarbonat mit einer definierten Porengröße von 8 µm und 32 cm² Wachstumsfläche zur Verfügung stehen. Die Einsätze können in 24-well-Platten eingesetzt werden und bilden im unteren Bereich ein Kompartiment, das mit dem Chemotaktikum beladen werden kann. Die Zellsuspension wird in die Kammer gegeben und ca. 6-8 h bei 37°C

inkubiert. Während dieser Zeit wandern einige Zellen durch die Poren und können nach der Inkubationszeit fixiert und angefärbt werden. Die auf der Oberseite verbliebenen Zellen werden vorsichtig mit einem Q-Tip entfernt. Die Auswertung erfolgt durch Auszählen der Zellen unter dem Mikroskop.

Es wurden jeweils 3 unabhängige Migrations-Versuche durchgeführt mit RGMa-Fc, Fc-Überstand als Negativkontrolle, EGF+ Fc (40 ng/ml) als Positivkontrolle und einer Kontrolle mit RGMa-Fc + Neogenin-Antikörper-Blockierung (1:50), um zu zeigen, dass mögliche Effekte tatsächlich RGMa vermittelt sind. Die Auswertung erfolgte aus jeweils 8 mikroskopischen Feldern (ca. 0,25 mm²; 20x Obj.) pro Einsatz. In jedem Versuch wurden drei Einsätze pro Gruppe verwendet.

Die Experimente wurden wie folgt durchgeführt:

- Caco-2 Zellen über Nacht serumfrei kultivieren
- Zellen 1x mit 5 ml PBS waschen und mit 3 ml Trypsin/EDTA abtrypsinieren
- Trypsinaktivität mit DMEM + 10 % FCS abstoppen und Zellen abzentrifugieren (200 g, 5 min)
- 2x mit DMEM-Basalmedium waschen
- Pellet in 5 ml Basalmedium aufnehmen und Zellzahl bestimmen
- Zellkonzentration auf 1×10^5 Zellen/ml mit Basalmedium einstellen
- 24 well Platte mit je 600 μ l Basalmedium und rekombinanten Proteinen befüllen
- Membraneinsätze in wells einsetzen, mit 500 μ l Zellsuspension befüllen und ca. 6-8 h bei 37°C inkubieren
- Membraneinsätze entnehmen und Medium entfernen
- 2x vorsichtig mit Q-Tip adhärenente Zellen auf der Membranoberseite entfernen, dazwischen 1x mit PBS waschen
- Zellen 10 min in 4% PFA fixieren
- 3x mit PBS waschen
- 10 min DAPI-Färbung (1 μ g/ml)

- Membran so auf einer Zählkammer platzieren, dass die gewanderten und gefärbten Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt werden können (20x Objektiv)

2.4.8 Kollapsexperimente mit enterischen Ganglien

Im Kollapstest wird das Verhalten von Neuriten vor und nach Zugabe eines löslichen, im Medium homogen verteilten Proteins oder einer Lösung suspendierter Membranpartikel in Zeitrafferaufnahmen untersucht. Die Methode wurde von Cox et al. (1990) und Raper und Kapfhammer (1990) etabliert (Cox et al. 1990; Raper and Kapfhammer 1990). Ein Neurit wird als „kollabiert“ gewertet, wenn die beweglichen Strukturen (Lamellipodium und Filopodien) teilweise oder komplett rückgebildet sind.

Analog zu diesen initial im ZNS durchgeführten Versuchen und in Ergänzung zu den beschriebenen Auswachsversuchen enterischer Ganglien sollte dieser Versuchsaufbau zeigen, inwieweit rekombinantes RGMa repulsiv auf enterische Neuriten wirken kann. Hierzu wurden Neurosphären auf Laminin/Fibronectin-/Poly-L-Ornithin beschichtete 12-well Platten gegeben und unter Differenzierungsbedingungen 5 Tage bei 37°C kultiviert. Für Kollapsexperimente wurden die gleichen Überstände verwendet wie zuvor im Boyden-Kammern-Versuch beschrieben. Die Zellen wurden zunächst 30 min in einer am Mikroskop installierten Wärmekammer vorinkubiert und anschließend die Time-lapse Aufnahme gestartet. Nach weiteren 5 min wurden die Überstände mit den rekombinanten Proteinen (RGMa-Fc und Fc) dem Medium zugegeben (80 µl/ml) und für weitere 30 min inkubiert. Die Reaktion wurde in Echtzeit am Mikroskop verfolgt und mit Hilfe der AxioVision LE 4.3 Software (Zeiss) aufgezeichnet (20x Objektiv). Es wurden jeweils 3 unabhängige Experimente mit RGMa und Kontrollüberständen durchgeführt und alle einzeln liegenden Zellen auf ihr Kollapsverhalten hin analysiert.

2.5 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie erlaubt die spezifische Darstellung von Proteinexpressionen innerhalb eines Zell- oder Gewebeverbundes mit Hilfe von

spezifischen (monoklonalen oder polyklonalen) Antikörpern. Die Visualisierung erfolgt entweder durch eine sekundär nachgeschaltete Substratumsetzung (z.B. brauner Niederschlag durch DAB-Substrat) oder durch ein Fluorochrom (z.B. Carbocyanin 3, Cy3), das prinzipiell an den Primär- oder Sekundärantikörper gekoppelt sein kann. Je nach Fragestellung wurden beide Darstellungsmethoden verwendet. Immunhistochemische Färbungen wurden auf Zellkulturen sowie auf Kryostatschnitten durchgeführt. Zellen wurden direkt mit PFA fixiert, während primäre Gewebe zunächst in einer kryoprotektiven Matrix, Tissue-Tek (Sakura), auf Trockeneis eingefroren, am Kryostat geschnitten (12 µm), auf Silan-beschichtete Objektträger aufgebracht, mindestens 1 h getrocknet und erst dann fixiert wurden. In einigen Fällen wurde die Teilungsrate im Gewebe bzw. in der Zellkultur durch Einbau des Nukleosid-Analogas BrdU während Synthesephase des Zellzyklus bestimmt. Hierfür wurde BrdU für 2 h in den Zellkulturüberstand gegeben (10 µM Endkonzentration) oder den Tieren 2 h vor der Tötung intraperitoneal appliziert (1-2 ml stock/100 g Körpergewicht) (*in vivo*).

2.5.1 Immunhistochemie mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern

- Schnitte 20 min mit 4 % PFA fixieren; für BrdU-Assay mit eiskaltem 70 % Ethanol/Glycin fixieren (siehe 2.5.3)
- 3x 5 min in Tris-Puffer/0,05 % Tween, pH 7,4 waschen
- Schweineserum 1:10 in Tris-BSA/0,3 % TritonX 100 verdünnen und mindestens 30 min bei RT inkubieren (Blockierung unspezifischer Bindungen)
- Serum auf Papiertuch abklopfen und sofort Primär-AK in Tris-BSA/0,1 % Triton/4 % Schweineserum auftragen, Inkubation ü.N. in feuchter Kammer bei 4°C, für die Negativ-Kontrolle Primär-AK weglassen
- Primär-AK abklopfen und Schnitte 3x 15 min in Tris-Puffer/0,05 % Tween waschen
- Sekundär-AK 1:400 in Tris-BSA verdünnen und mind. 30 min bei RT inkubieren

- DAPI-Kernfärbung: DAPI stock (1mg/ml) 1:1000 in Tris-BSA verdünnen und ca. 5 min bei RT auf den Schnitten inkubieren
- Schnitte 3x in ddH₂O waschen, trocknen lassen und mit Kaiser-Gelatine eindeckeln

2.5.2 Immunhistochemie mit Substratumsetzung

- Schnitte 20 min mit 4 % PFA fixieren
- 3x 5min in Tris-Puffer/0,05 % Tween, pH 7,4 waschen
- 1x 10 min Inkubation mit 3 % H₂O₂/Tris-Puffer unter stetigem Schütteln (Blockierung endogener Peroxidasen)
- 3x 5 min in Tris-Puffer/0,05 % Tween, pH 7,4 waschen
- Schweineserum 1:10 in Tris-BSA/0,3 % TritonX 100 verdünnen und mind. 30 min bei RT inkubieren (Blockierung unspezifischer Bindungen)
- Serum auf Papiertuch abklopfen und sofort Primär-AK in Tris-BSA/0,1 % Triton/4 % Schweineserum auftragen; Inkubation ü.N. in feuchter Kammer bei 4°C; für Negativ-Kontrolle Primär-AK weglassen
- Primär-AK abklopfen und Schnitte 3x 15 min in Tris-Puffer/0,05 % Tween waschen
- Sekundär-AK (biotinyliert) 1:400 in Tris-BSA verdünnen und mind. 30 min bei RT inkubieren, parallel Streptavidin-Peroxidase-Komplex (DAKO, Hamburg) herstellen
- Sekundär-AK abklopfen und Schnitte 3x 5 min in Tris-Puffer/0,05 % Tween waschen
- Streptavidin-Peroxidase-Komplex 30 min bei RT inkubieren
- Streptavidin-Peroxidase-Komplex abklopfen und Schnitte 3x 15 min in Tris-Puffer/0,05 % Tween waschen
- Entwicklung mit DAB: 1 ml DAB-stock (100 mg/ml, Sigma) in 200 ml Substratpuffer lösen, anschließend filtrieren und 66,6 µl H₂O₂ dazu geben; Schnitte schrittweise in DAB-Lösung entwickeln (im Dunkeln); mit Leitungswasser Reaktion abstoppen
- Schnitte 3x in ddH₂O waschen, trocknen lassen und mit Kaiser-Gelatine (Merck) eindeckeln

2.5.3 Proliferationsuntersuchung durch BrdU-Einbau

Für die Analyse der Zellproliferation wurde gemäß den Herstellerangaben verfahren (BrdU Labeling and Detection Kit I, Roche):

- BrdU-Zugabe in den Zellkulturüberstand (1:1000, Endkonzentration: 10 µM) oder i.p. (1-2 ml stock/100 g Körpergewicht) für 2 h
- Zellen bzw. präpariertes Gewebe 1x in PBS waschen
- mindestens 20 min bei -20°C mit Ethanol/Glycin fixieren
- 3x in PBS waschen
- 30 min bei 37°C mit Anti-BrdU-AK (1:40 in Labeling- solution) inkubieren
- 3x waschen in PBS
- 30 min bei 37°C mit anti-mouse Sekundär-AK inkubieren
- 3x in PBS waschen
- DAPI-Kernfärbung: DAPI stock (1mg/ml) 1:1000 in PBS-BSA verdünnen und ca. 5 min bei RT inkubieren
- 3x 5 min mit ddH₂O waschen, trocknen lassen und mit Kaiser-Gelatine eindeckeln

2.5.4 Primär- und Sekundärantikörper

Antikörper	hergestellt in	Verdünnung	Hersteller
GFAP	Kaninchen	1:600	Dako
GFAP	Maus	1:200	Chemicon
β-Tub III (Tuj1)	Kaninchen	1:2000	Santa Cruz
β-Tub III (Tuj1)	Maus	1:500	Santa Cruz
Lysozym	Kaninchen	1:400	Dako
Neurofilament	Maus	1:100	Dako
Ki-67	Kaninchen	1:1000	Novocastra
BrdU	Maus	1:40	Roche
Nestin	Maus	1:10	Hybridoma Bank, Iowa City, USA
Neogenin, N-175	Kaninchen	1:100	Santa Cruz
Neogenin, N-19	Kaninchen	1:50	Santa Cruz

RGMa	Kaninchen	1:100	Monnier et al. 2002
Anti-Kaninchen- Cy3	Ziege	1:400	Molecular Probes
Anti-Maus-Cy3	Ziege	1:400	Molecular Probes
Anti-Kaninchen- Alexa488	Ziege	1:400	Molecular Probes
Anti-Maus- Alexa488	Ziege	1:400	Molecular Probes
Anti-Maus- biotinyliert	Ziege	1:400	Dako
Streptavidin- Peroxidase	-	1:200	Dako

2.6 RNA *In Situ* Hybridisierung

2.6.1 Herstellung von RNA Sonden

Die RNA *In Situ* Hybridisierung erlaubt die spezifische, histologische Darstellung von mRNA Transkripten innerhalb des komplexen Gewebeverbundes. Für die einzelnen RGM Subtypen wurden RNA Sonden (Riboproben) durch *in vitro* Transkription hergestellt, die die entsprechenden RGM mRNAs spezifisch erkennen. Als Kontrolle diente eine Riboprobe, die identisch mit der mRNA Sequenz ist (sense Kontrolle). Die für die Herstellung der Sonden notwendige Menge an entsprechender cDNA wurde durch Amplifikation von Plasmid-Konstrukten in Bakterien erreicht. Die jeweilige cDNA wurde zuvor mittels RT-PCR aus mRNA von E14.5 Embryos generiert und mit den Restriktionsenzymen EcoR I und Not I in die „multiple cloning sites“ (MCSs) der Vektoren inkloniert. Diese enthalten SP6 (ATTTAGGTGACACTATAG) bzw. T7 (TAATACGACTCACTATAGGG) Promotoren, die bei der *in vitro* Transkription durch die entsprechende Polymerase als Bindungsstelle erkannt wird. Nach Amplifikation in E.coli wurden die Plasmide über ein Plasmid-isolationskit (Sigma) gemäß Herstelleranleitung aus den Bakterien aufgereinigt und durch Restriktionsverdau linearisiert. Die geschnittene cDNA wurde dann

auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen, die gewünschte Gelbande vorsichtig ausgeschnitten und mit einem Gelextraktionskit (Qiagen) aufgereinigt, um Puffer und Enzymbestandteile zu entfernen, die die nachfolgende *in vitro* Transkription stören könnten. Bei der *in vitro* Transkription bindet die RNA Polymerase an jeweils spezifische Promotoren (SP6 bzw. T7) und generiert „run off“ cRNA Transkripte, die mit Digoxigenin (DIG) markiert sind. Digoxigenin kann schließlich durch einen Antikörper sehr spezifisch erkannt und immunhistochemisch sichtbar gemacht werden. Durch Kombination mit immunhistochemischen Markern kann die mRNA Expression zusätzlich speziellen Zellpopulationen zugeordnet werden.

Verwendete Riboproben:

Riboprobe	Plasmid-Vektor (Invitrogen)	Restriktionsenzym (Roche)	Polymerase
mRGMa Antisense	pcDNA 3.1	Hinc II	SP6
mRGMa Sense	pcDNA 3.1	Xho I	T7
mRGMb Antisense	pCMV Sport6	Sma I	T7
mRGMb Sense	pCMV Sport6	Sma I	SP6

Restriktionsverdau der amplifizierten Plasmid-DNA:

x µl Plasmid-DNA (ca. 10 µg DNA)

1 µl Restriktionsenzym (Roche)

2,5 µl 10x Puffer (Roche)

x µl H₂O

4 h Inkubation bei 37°C (Xho I, Hinc II), 4 h bei 25°C (Sma I)

In vitro Transkription mit DIG-Labeling (DIG RNA Labeling Kit, Roche):

2 µl 10x NTP labeling mixture

2 µl 10x Transkriptionspuffer

1 µl RNase Inhibitor

2 µl Polymerase (T7 oder SP6)

x µl Template DNA (1 µg Plasmid-DNA)

ad 20 µl ddH₂O

2 h Inkubation bei 37°C

Reaktion mit 2 µl 0,2 M EDTA pH 8,0 stoppen

Sonden bei -20°C lagern, für längere Lagerzeiten bei -80°C

(Anmerkung: Bei einem scale-up Ansatz bleibt die Plasmidmenge unverändert und nur die restlichen Komponenten werden entsprechend erhöht)

Die Konzentration der hergestellten Riboprobe konnte über eine Dot-Blot-Analyse bestimmt werden, bei der eine DIG-markierte RNA-Sonde bekannter Konzentration (Roche) parallel auf eine Nitrozellulosemembran aufgetragen, visualisiert und über die Färbeintensität verglichen wird. In der Regel lag die Sondenkonzentration zwischen 25 – 100 ng/µl.

Dot-Blot-Analyse:

➤ Verdünnungsreihe von Sonde und Standard (Roche) herstellen:

Tube	RNA-Lsg.	aus Tube	Puffer (µl)	Verdünnung	Endkonz.
1	1	stock	9	1:10	10 ng/µl
2	2	1	18	1:10	1 ng/µl
3	3	2	97	1:330	30 pg/µl
4	2	2	198	1:1000	10 pg/µl
5	15	4	35	1:3300	3 pg/µl

➤ je 1 µl auf Nitrocellulosemembran pipettieren und kurz antrocknen lassen

➤ Membran 30 min bei 120°C backen

➤ Membran kurz in Maleinsäurepuffer waschen

➤ 10 min in 1x Blockierungslösung + 4 % Schafserum blockieren

➤ 1 h Inkubation mit Schaf Anti-DIG-Alkalische Phosphatase Antikörper
(1:5000 in 1x Blockierungslösung; Roche)

➤ 4x 15 min in Maleinsäurepuffer waschen

- 1x 5 min in AP-Puffer waschen
- Farbentwicklung mit NBT/BCIP-Substratlösung, ca. 2 h bei RT
- Reaktion durch Überführen der Membran in ddH₂O stoppen

2.6.2 RNA *In situ* Hybridisierung

Die RNA *In situ* Hybridisierung erfolgte auf histologischen Schnitten von Primärgewebe als auch auf Zellkulturen und wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

- Kryoschnitte auf silanisierte Objektträger aufbringen (12 µm Schnittdicke)
- Schnitte auf Wärmeplatte ca. 10 sec bei 50°C trocknen, Lagerung getrockneter Schnitte ist über mehrere Wochen bei –80°C möglich
- 20 min mit 4 % PFA fixieren
- 3x mit PBS/Tween waschen
- 15 min bei RT mit 2 µg/ml Proteinase K in PK-Puffer inkubieren
- 3x mit PBS/Tween waschen
- 2x 5 min Acetylierung mit frisch angesetzter TEA-Essigsäureanhydridlösung; Inkubation unter stetigem Schütteln
- 3x mit PBS/Tween waschen
- 1 h Pre-Hybridisierung mit Hybridisierungspuffer bei Hybridisierungstemperatur (z.B. 63°C für RGMa und RGMb) in feuchter Kammer
- Hybridisierung ü.N. mit Hybridisierungspuffer und 200 ng/ml DIG-gelabelter RNA-Sonde bei Hybridisierungstemperatur in feuchter Kammer
- nach Hybridisierung slides kurz mit 1x SSC-Puffer waschen
- mindestens 3x 15 min mit 0,1x SSC-Puffer bei Hybridisierungstemperatur waschen
- 5 min mit TNT-Puffer waschen
- 30 min mit 4 % Sheep-Serum in TNB-Blockierungslösung blockieren
- 1 h Inkubation mit Anti-DIG-Fab-AP Antikörperlösung (1:2000 in TNB)
- mindestens 3x 15 min mit Maleatpuffer waschen
- Objektträger kurz mit AP-Substratpuffer waschen

- Farbentwicklung mit frischer NBT/BCIP-Substratlösung in AP-Substratpuffer + 0,5mg/ml Levamisol (vor Gebrauch Puffer filtrieren); Farbreaktion bei RT stetig kontrollieren, evtl. Inkubation ü.N. bei 4°C in feuchter Kammer
- 3x 15 min mit PBS waschen
- 1x 5 min mit ddH₂O waschen
- Schnitte trocknen und mit Kaisers-Gelatine eindeckeln

2.7 RT-PCR

Die Nukleinsäureanalytik soll Aufschluss über die Genexpression auf Transkriptionsebene geben. Für die Analyse sind hierfür im wesentlichen 3 Schritte durchzuführen: Isolierung und Quantifizierung der RNA, Amplifizierung durch RT-PCR und Visualisierung durch Agarose-Gelelektrophorese. Während der RNA-Isolation ist es wichtig, eine RNA-Degradation vor allem durch Nukleasen zu verhindern. Alle zum Einsatz kommenden Lösungen müssen daher RNase-frei sein.

2.7.1 RNA-Isolation

Die Gesamt-RNA aus den entsprechenden Geweben wurde mittels der Trizol-Methode (Invitrogen) isoliert. Hierfür wurde das Gewebe in einem 2 ml Eppendorf-Tube in 1 ml Trizol pro 50 mg Gewebe homogenisiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 200 µl Chloroform (Sigma) pro ml Trizol hinzugegeben, 15 sek geschüttelt, 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und 15 min bei 4°C und 12.000 g zentrifugiert. Anschließend wurde die obere, wässrige Phase vorsichtig in ein neues Tube pipettiert und 500 µl kalter Isopropylalkohol (Sigma) sowie 1 µl Glykogen (Sigma) pro ml eingesetztem Trizol hinzugegeben. Nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 10 min bei 4°C und 12000 g. Der Überstand wurde abpipettiert und das verbliebene Pellet mit 500 µl 75 %igem – 20°C kaltem Ethanol gewaschen und nochmals 5 min bei 4°C und 12.000 g zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde luftgetrocknet und schließlich in 20 µl H₂O resuspendiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -80°C gelagert.

Die Konzentration und „Reinheit“ der isolierten RNA kann durch eine spektrophotometrische Messung bei 260 nm bzw. 280 nm ermittelt werden. Die Absorption bei 260 nm ergibt dabei den RNA-Gehalt, das Verhältnis von 260 nm zu 280 nm gibt Aufschluß über die Verunreinigung z.B. mit Proteinen (Sollwert: 1,7 - 2,1). Eine Einheit bei $A_{260 \text{ nm}}$ entspricht bei 10 mm Schichtdicke 40 μg RNA/ml bzw. 50 μg DNA/ml; die Probe sollte dabei aus Gründen der Messgenauigkeit so verdünnt werden, dass der Messwert etwa zwischen 0,15 und 1,0 Einheiten liegt.

$$[\text{RNA}] = 40 \times A_{260 \text{ nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} [\mu\text{g/ml}]$$

$$\text{Gesamt-RNA} = [\text{RNA}] \times \text{Probenvolumen in ml} [\mu\text{g}]$$

$$\text{Reinheit} = A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}} \text{ (Soll } \approx 1,7 - 2,3)$$

Trotz einer hohen Reinheit kann die isolierte DNA Verunreinigungen von genomischer DNA beinhalten. Dies würde bei der anschließenden RT-PCR mitunter zu Falschaussagen führen. Deshalb wurde zusätzlich ein DNase-Verdau wie folgt durchgeführt:

DNase-Verdauansatz (Invitrogen):

2 μl DNase (1U/ μl)

2 μl 10x Puffer

x μl RNA (ca. 1-2 μg)

ad 20 μl H_2O

→ 15 min. RT, dann Zugabe von 1 μl 25 mM EDTA und 10 min Hitzeinaktivierung bei 65°C

2.7.2 Reverse Transkriptase Reaktion (RT-Reaktion)

Nach dem DNase-Verdau wurde die RNA durch das Enzym Superscript II RNase H⁻ Reverse Transkriptase in komplementäre cDNA umgeschrieben. Superscript II ist eine Punktmutante (Inaktivierung der RNase H Domäne) aus dem Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) und erreicht höhere Ausbeuten als vergleichbare Enzyme. Als mRNA Primer wurden Oligo d(pT)₁₈ Primer

verwendet, die spezifisch an die 3'-poly A tails der mRNA binden und somit eine hohe Selektivität aufweisen. Durch eine kurzzeitige Inkubation der RNA vor der eigentlichen RT-Reaktion für 5 Minuten bei 65°C sollen mögliche Sekundärstrukturen zerstört werden, die Ursache fehlerhafter cDNA Fragmente sein könnten. Die RT-Reaktion findet bei konstanter Temperatur von 42°C für 60 Minuten statt. Das Ergebnis der RT-Reaktion sind mRNA-ssDNA-Hybride (kurz: cDNA = copyDNA), die nun zur Amplifikation durch die PCR eingesetzt werden können.

RT-Ansatz (Invitrogen):

1 µg RNA

2 µl Oligo d(pT)₁₈ mRNA Primer (500 µg/ml)

2 µl dNTP-Mix (10 mM)

11 µl H₂O

→ 5 min 65°C, dann auf Eis

1 µl RNaseOUT (40 U/µl)

8 µl First-Strand Puffer (5x)

4 µl DTT (0,1 M)

1 µl Superscript II RT (200 U/µl)

→ 60 min 42°C, 10 min 70°C

2.7.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Durch die PCR können kleinste DNA- oder cDNA-Mengen innerhalb kürzester Zeit millionenfach amplifiziert werden. Eine PCR umfasst im allgemeinen 20 - 40 Zyklen, die wie folgt aufgebaut sind: Template-Denaturierung (95°C), Primer-Anlagerung (50-65°C) und Primer-Elongation (72°C). Die Annealing-Temperatur wird durch die Schmelztemperatur (T_m Wert) der Primer bestimmt. Diese ist wiederum abhängig von der Primerlänge und dem G-C-Gehalt. Essentiell ist eine thermostabile DNA-Polymerase und zwei 20 - 30 Nukleotide-lange Primer, die spezifisch an die Enden der zu amplifizierenden Zielsequenz binden. Die vier dNTPs als Grundbausteine der DNA sowie Mg-Ionen als Co-Faktor und geeignete Pufferbedingungen komplettieren das Reaktionsgemisch.

Zur Kontrolle der Integrität und Qualität der cDNA wird ein in allen eukaryotischen Zellen etwa gleich stark synthetisiertes „housekeeping“ Gen mit spezifischen Primern in der Kettenreaktion mitgeführt, in unserem Fall das Homotetramer Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH).

PCR-Ansatz:

2,5 µl 10x Puffer (mit MgCl₂)
1 µl dNTP (10 mM)
0,5 µl Amplitaq DNA-Polymerase
1 µl Primer forward (10 µM)
1 µl Primer reverse (10 µM)
5 µl Template DNA
ad 25 µl H₂O

PCR-Profil:

Vordenaturierung:	94°C 5 min	
Denaturierung:	94°C 30 sec	} 35x
Primer-Annealing:	T _{An} °C 40 sec	
Elongation:	72°C 40 sec	
Elongation:	72°C 10 min	
Lagerung:	4°C	

Sequenzen der Primer und erwartete Bandenlänge:

für mRGMa (455 bp):

5'-TCAGCTGCCCCCAACTACTACT-3' und

5'-TCCTCCACGGCGTTGACTACC-3';

für hRGMa (520 bp):

5'-CCGCCACACGCACGCACAC-3' und

5'-GGACCGGGCTGGGGGCTCTT-3';

für mRGMb (460 bp):

5'-CAGCCACGGGGGAGTCAGAG-3' und

5'-CATCCGGATAGCGAGGGTTAG-3';

für hRGMB (389 bp):

5'-CTGCGTATCGTGGAAAGGGAGAGT-3'

5'-GCGGCAGTAAAGTTGGCATCAC-3'

für mRGMc (506 bp):

5'-GGGCAGTCTCCTTCTCCATC-3' und

5'-CTCCTGTCCCCGCTGTTTCCTT-3';

für mNeogenin (536 bp):

5'-TTCTCCAGCCCGCAGTCATCT-3' und

5'-CTTCCAGGTGGGCCATCTCTT-3';

für hNeogenin (480 bp):

5'-ACCCCAGCCTGTGATTAGTG-3'

5'-TGTGATGGTTCAGAGCTTGC-3'

für GAPDH (452 bp):

5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' und

5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'.

Annealing-Temperaturen (T_{An}):

mRGMa, hRGMB, mRGMc, mNeogenin: 60°C

hRGMa: 63°C

mRGMb: 66°C

hNeogenin, GAPDH: 58°C

2.7.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist die Standardmethode für die Trennung, Identifizierung und Reinigung von DNA-Fragmenten (Borst 2005). Agarose ist ein Polysaccharid und wird aus roten Meeresalgen gewonnen. Agarose wird durch Aufkochen in 1x TBE-Pufferlösung gelöst und geliert beim Abkühlen. Dabei bilden sich aus dem Polysaccharid-Sol Doppelhelices aus, die sich in Gruppen seitlich zu relativ dicken Fäden zusammenlagern. Die negativ geladenen DNA-Fragmente wandern dann im elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe unterschiedlich schnell durch das enge Maschenwerk des Gels und können nach Anfärbung mit dem DNA-Interkalator Ethidiumbromid im UV-

Transilluminator sichtbar gemacht (Ex 300 nm, Em 590 nm) sowie mit einem DNA-Größenstandard (DNA-Leiter) verglichen und charakterisiert werden. Die Zeit für eine optimale Laufweite der DNA-Fragmente kann während der Gelelektrophorese über mitaufgetragene Farbstoffmarker bestimmt werden, die eine vergleichbare Wanderungsgeschwindigkeit wie bestimmte lineare, doppelsträngige DNA-Fragmente besitzen. Hierzu wurde der Farbstoff Bromphenolblau (\approx 300 bp Fragment) zusammen mit der hochviskosen Sucrose, die ein Herausdiffundieren der Proben aus den Probentaschen verhindern soll, verwendet.

Vorgehen für die Gelherstellung:

- 1 % Agarose (Roth) in 1x TBE aufkochen und lösen
- Agaroselösung möglichst luftblasenfrei in vorbereitete Gelkammer gießen
- Käbme in entsprechende Halterung einsetzen und Gel erstarren lassen, ca. 30 min
- Käbme vorsichtig entfernen und Gel in Gelkammer setzen
- Kammer soweit mit 1x TBE Puffer befüllen, dass Gel ausreichend bedeckt ist
- 1-10 μ l PCR-Ansatz mit 2 μ l 6x Auftragspuffer und ddH₂O auf 12 μ l Gesamtvolumen auffüllen, mischen und vorsichtig in Probentaschen einbringen (als erste und letzte Probe DNA-Leiter Mix auftragen)
- Verbindung zur Spannungsquelle herstellen und Elektrophorese 1 h bei 100 V laufen lassen (Kontrolle über Farbstoff-Front)
- Gel 10 min in Ethidiumbromidbad (1 μ g/ μ l) färben, danach in H₂O waschen
- Banden in UV-Transilluminator visualisieren und mit Kamera aufnehmen

2.7.5 Genotypisierung der Neogenin Knockout Maus mittels PCR

Für die Genotypisierung, d.h. die Feststellung, ob es sich bei Mäusen um einen Wildtyp (WT) oder ein transgenes Neogenin Tier handelt, wurde über eine PCR überprüft, ob das Reporter-gen β -Galactosidase detektiert werden kann. Hierzu wurde den Tieren unter Narkose ein Stück ihres Schwanzes entfernt, diesen in 200 μ l PCR Lysis Reagenz (Viagen, Los Angeles, USA) mit Proteinase K

(Roche, 1:90 verdünnt) aufgenommen, bei 55°C/500 up m über Nacht, dann bei 85°C für 45 min im Thermomixer (Eppendorf) inkubiert, sofort auf Eis heruntergekühlt und einmal kurz zentrifugiert. Die aus den Schwanzspitzen gewonnene genomische DNA wurde dann aus dem Überstand in folgenden PCR-Ansatz gegeben:

PCR-Ansatz:

2 µl 10x Puffer (mit MgCl₂)
0,5 µl 10 mM dNTP
0,5 µl Amplitaq DNA-Polymerase
2 µl 10 µM Primer β-Galactosidase
2 µl 10 µM Primer β-Galactosidase
1 µl Template DNA (ca. 300 ng)
ad 25 µl H₂O

Sequenzen der Primer und erwartete Bandenlänge:

5'-TTATCGATGAGCGTGGTGGTTATGC-3'

5'-GCGCGTACATCGGGCAAATAATATC-3'

Bande bei 680 bp

PCR-Profil:

Vordenaturierung:	94°C 4 min	
Denaturierung:	94°C 40 sec	} 35x
Primer-Annealing:	61°C 40 sec	
Elongation:	72°C 40 sec	
Elongation:	72°C 10 min	
Lagerung:	4°C	

Zur Kontrolle der PCR und Unterscheidung von heterozygoten und homozygoten Tieren wurde zusätzlich eine X-Gal Färbung durchgeführt.

2.8 Western Blot

Die Proteinanalytik soll Aufschluss über die Expression auf Translationsebene geben. Hierfür sind im wesentlichen drei Schritte durchzuführen: Proteinisolierung und -quantifizierung, Trennung durch SDS-Page und Visualisierung durch die Immunoblot-Technik.

2.8.1 Proteinisolierung

Die Proteinisolierung erfolgte aus der organischen Phase nach der RNA-Separation durch das Trizol-Reagenz. Diese enthält zusätzlich noch DNA-Reste, die zunächst entfernt werden mussten. Dies geschah durch Zugabe von 300 µl Ethanol pro ml eingesetztem Trizol und mehrmaligem schwenken bei Raumtemperatur. Nach 3 minütiger Inkubation konnte die ausgefällte DNA bei 2000 g, 5 min und 4°C abzentrifugiert werden. Die Proteine befanden sich im Phenol-Ethanol-Überstand und konnten durch Zugabe von 1,5 ml Isopropylalkohol pro ml Trizol sedimentiert und nach 10 min. Inkubation bei 12000 g, 10 min, 4°C abzentrifugiert werden. Das Pellet wurde je 3x für 20 min in 0,3 M Guanidiniumhydrochlorid in 95 % Ethanol gewaschen und dazwischen jeweils 5 min bei 7500 g, 4°C abzentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet in 2 ml Ethanol durch vortexen resuspendiert, 20 min. inkubiert und erneut abzentrifugiert. Nach Vakuumtrocknung wurde das Proteinpellet in 1 % SDS-Lösung bei 50°C resuspendiert. Unlösliche Reste wurden bei 10000 g für 10 min. bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand für die SDS-Gelelektrophorese eingesetzt. Vor dem Auftragen wurde zunächst die Proteinmenge der extrahierten Proben quantifiziert. Hierfür wurde das Bio-Rad DC Protein Kit (BioRad, München) verwendet, das nach dem von Lowry 1951 entwickelten Assay arbeitet. Es handelt sich hierbei um ein kolorimetrisches Verfahren, bei dem die gelösten Proteine alkalisches Kupfertartrat und das gelbe Folin Reagens (Phosphomolybdat und Phosphotungstat) in eine reduzierte, blaue Form umwandeln, die proportional zur Proteinkonzentration ist und spektrophotometrisch bei einem Absorptionsmaximum um 750 nm erfasst werden kann. Verantwortlich für die Reduktion sind vor allem die aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan, aber auch zu einem geringeren Anteil Cystein

und Histidin. Der Lowry-Assay ist über einen weiten Bereich sehr sensitiv, kann relativ schnell und bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Als Proteinstandard wurde Rinderserumalbumin verwendet.

Proteinbestimmung (BioRad):

- 0,2 – 2,0 mg/ml Albuminstandard in 1% SDS -Puffer herstellen
- 20 µl Reagens S pro ml Reagens A (alkalische Kupfertartratlösung) geben = Lösung A' (Lösung A' stabil für mindestens 1 Woche)
- je 100 µl Probe bzw. Standard mit 500 µl Lösung A' mischen
- je 4 ml Lösung B (Folin-Reagens) zugeben und vortexen
- 15 min. Inkubation bei RT (Lösung stabil für mindestens 1 h)
- photometrische Bestimmung bei 750 nm
- Proteinkonzentration der Proben durch Vergleich mit Albuminstandard bestimmen und anschließend mit SDS-Page Proben Pufferzusatz weiterverdünnen (Endkonzentration 1 µg/µl)
- Denaturierung der Proben für 3 min bei 95°C im Ther moblock
- Proben bis zur SDS-Page auf Eis stellen, für längere Lagerung bei -20°C einfrieren

2.8.2 SDS-Page

Mit der SDS-Gelelektrophorese können schließlich auf einfache Art Proteine über ihr Molekulargewicht charakterisiert werden. Diese von Shapiro 1967 (Shapiro et al. 1967) eingeführte Methode basiert auf dem Prinzip der Molekularsiebung. Durch die Beladung mit dem anionischen Detergens SDS (Sodiumdodecylsulfat) werden die Eigenladungen der Proteine so überdeckt, dass Anionen mit konstanter Nettoladung pro Masseneinheit entstehen (ca. 1,4 g SDS pro g Protein). Zudem werden die unterschiedlichen Molekularformen ausgeglichen, indem die Tertiär- und Sekundärstrukturen durch Aufspalten der Wasserstoffbrücken und durch Streckung der Moleküle aufgelöst werden. Unterstützt wird dieser Denaturierungs-Prozess durch das kurzzeitige Aufkochen der Proben bei 95°C. Schwefelbrücken werden durch die reduzierende Thiolverbindung β -Mercaptoethanol aufgespalten.

Insgesamt ergibt sich eine lineare Beziehung zwischen den relativen Wanderungstrecken der SDS-Polypeptid-Mizellen im elektrischen Feld und dem Logarithmus der jeweiligen Molekulargewichte. Mit Hilfe der Wanderungstrecken von parallel aufgetrennten Markerproteinen lassen sich später über eine Eichkurve die Molekulargewichte der Probenproteine ermitteln. Die Elektrophorese erfolgte in einem von Laemmli (Laemmli 1970) eingeführten diskontinuierlichem Tris-HCl/Tris-Glycin Puffersystem. Als Trägermatrix wird Polyacrylamid verwendet. Polyacrylamidgele sind chemisch inert und besonders stabil. Durch chemische Kopolymerisation von Acrylamidmonomeren mit einem Vernetzer (N,N'-Methylenbisacrylamid) erhält man ein klares, durchsichtiges Gel mit sehr geringer Elektroendosmose. Die Vernetzung der beiden Monomere wird durch die Katalysatoren TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin) und Ammoniumpersulfat (APS) ausgelöst. Die Porengröße wird durch die Totalacrylamidkonzentration (%T) und den Vernetzungsgrad (%C, „crosslinking“) definiert. Ein weitporiges Sammelgel (Tris-Glycin-Puffer pH 6,8; 5 % Acrylamid) überschichtet ein engmaschiges Trenngel (Tris-Glycin-Puffer pH 8,8, 12,5 % Acrylamid). Im Sammelgel erfolgt eine Vortrennung und Aufkonzentrierung der einzelnen Proteinklassen beim Start. Im Trenngel wirkt auf alle Proteine die gleiche Feldstärke und ausschließlich die Größe ist für die Wandergeschwindigkeit ausschlaggebend.

Vorgehen SDS-Page:

- Glasplatten und Spacer (Abstandhalter) sorgfältig reinigen
- Zusammenbau der Slabgel-Sandwich gemäß Hersteller-Anleitung (Bio-Rad)
- Trenngel-Lösung 12,5%/40 % gemäß Tabelle in kleinem Becherglas ansetzen, vorsichtig mischen (ohne Rührfisch) und dabei möglichst keine Luft einarbeiten
- Lösung sofort in das Slabgel-Sandwich Trenngel luftblasenfrei bis ca. 2 cm unter den Glasrand einfüllen, mit Isopropanol überschichten (ca. 50 µl) und auspolymerisieren lassen (ca. 30 min.)
- Isopropanolschicht mit Papierfilter aufsaugen und entfernen

- Sammelgel-Lösung 5 %/40 % gemäß Tabelle in kleinem Becherglas ansetzen, vorsichtig mischen (ohne Rührfisch) und dabei möglichst keine Luft einarbeiten
- in das Slabgel-Sandwich Sammelgel luftblasenfrei bis ca. 0,5 cm unter den Glasrand einfüllen
- Kamm langsam einführen und auf den Spacern aufsetzen
- Sammelgel auspolymerisieren lassen (ca. 30 min.)
- Kamm vorsichtig entfernen und Taschen mit ddH₂O spülen
- je 2 Gele werden mit dem „SDS-Modul“ zusammengebaut und in die Elektrophoresekammer gestellt
- Kathoden- und Anodenkammer vollständig mit Laufpuffer befüllen
- ca. 20 µl Probe pro Tasche (≈ 20 µg Protein) und 10 µl Proteinstandard (Biorad) auftragen, äußere Taschen frei lassen
- Stromversorgung herstellen, ca. 10 min. bei 80 V/300 mA, dann ca. 60 min. bei 200 V/300 mA Elektrophorese starten (Kontrolle über Farbstoff-Front)
- Block entnehmen, unter fließendem Leitungswasser spülen und mit ddH₂O nachspülen
- Block öffnen, Glasplatten herausschieben, voneinander trennen und mit Immunoblot fortfahren

2.8.3 Immunoblot

Beim Immunoblot werden die durch die SDS-Page aufgetrennten Proteine auf eine immobilisierende Nitrocellulose-Membran überführt und dort einer immunologischen Nachweisreaktion mit DAB als Substrat unterzogen; das SDS verbleibt dabei weitgehend im Polyacrylamidgel. Die Membran besitzt eine Porenweite von 0,45 µm und eine Proteinbindekapazität von bis zu 180 µg/cm². Der elektrophoretische Transfer erfolgte in eiskaltem Blot-Puffer („Wet-Tank-Blot“-Verfahren, (Towbin et al. 1979)) und mußte senkrecht zur Trennrichtung erfolgen, damit das Muster der getrennten Proteine auf der Membran exakt dem Trennungsmuster des Geles entspricht. Der Blotpuffer hatte einen Methanolgehalt von 20 %, was die Benetzung der Membran erleichtert, die Bindung der Proteine an SDS lockert und damit insgesamt höhere Transferraten liefert

(Jacobson und Karsnas 1990). Da sich das System während des einstündigen Blotvorgangs stark erwärmt, mußte für eine ausreichende Kühlung des Puffers gesorgt werden. Die Effizienz des Blotvorgangs wurde mit Hilfe einer irreversiblen Coomassie-Färbung des SDS-Gels überprüft. RGM-Proteine sollten über einen Antikörper-Overlay spezifisch nachgewiesen werden. Hierfür mußten zunächst unspezifische Bindungstellen auf der Membran mit Lactalbumin/Serum über Nacht abgeblockt werden. Erst danach konnte sich die Inkubation mit dem RGMa-spezifischen Primärantikörper anschließen. Hierbei hatte sich der Zusatz des nichtionischen Detergenses Tween 20 als vorteilhaft erwiesen. Die Visualisierung erfolgte schließlich durch das Streptavidin-Biotin gekoppelte DAB System.

Protein-Blotting:

- Sammelgel mit Skalpell abtrennen, Gel an Ecke markieren, Gel vorsichtig von Glasplatte ablösen und in Blotpuffer überführen
- Schwamm, Filterpapier und Nitrocellulosemembran in Blotpuffer tränken
- Membran an gleicher Stelle wie Gel markieren
- Sandwich wie folgt packen: auf schwarze Seite der Klemmmappe einen Schwamm legen, dann Filterpapier, Gel, Blotfolie, Filterpapier, Schwamm; Luftblasen müssen jeweils vorsichtig entfernt werden
- Sandwich in einen mit Blotpuffer befüllten Tank stellen
- Stromverbindung herstellen und Gel über Nacht bei 10 V, 4°C blotten
- danach Sandwich öffnen und Membran/Gel entnehmen
- Gel: Coomassie-Färbung (irreversibel), für anschließenden Immunoblot Membran in PBS feucht halten oder für längere Lagerzeiten mit PBS in Plastikfolie einschweißen (4°C)
- Membran 1 h in 5 % Milchpulver/PBS (ohne Fett) vorinkubieren
- Membran 3x 5 min. mit PBS/0,1% Tween 20 waschen
- Membran entweder in Plastikfolie oder in Quadripermschalen unter ständiger Schüttelbewegung für 4 h bei RT mit 1:1000 verdünnter RGMa-Primärantikörperlösung/PBS/0,1% Tween 20 inkubieren, für Negativkontrolle Primärantikörper weglassen

- Membranen 3x 5 min. mit PBS/0,1% Tween 20 waschen
- 1 - 2 h Inkubation aller Membranstreifen mit entsprechender Sekundärantikörperlösung (biotinyliert, 1:500)
- Membranen 3x 5 min. mit PBS/0,1% Tween 20 waschen
- A/B-Reagenz (Dako) zunächst je 9 µl/ml PBS für 30 min. bei RT vorinkubieren und dann 1:50 in PBS weiterverdünnen. Inkubation aller Membranstreifen mit Streptavidin-Peroxidase-Konjugat für 1 - 2 h
- Membranen 3x 5 min. mit PBS/0,1% Tween 20 waschen
- ca. 10 min. Farbreaktion mit DAB-Substratlösung (siehe 2.5.2) bei RT (Reaktion rechtzeitig mit H₂O abstoppen)
- Membranen 3x 5 min. mit PBS/0,1% Tween 20 waschen
- Membranen einscannen und Bandenhöhe über Proteinstandard ermitteln

2.9 Statistik

Alle quantifizierten Daten sind als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwertes (+/- SEM) angegeben. Die statistische Signifikanz wurde durch den ANOVA und *post hoc* Fisher's PLSD (Protected Least Significant Difference) Test ermittelt. Ein p-Wert weniger als 0,05 ($p < 0,05$) wurde als statistisch signifikant festgelegt.

3. Ergebnisse

Das Ziel der Doktorarbeit bestand in einer ausführlichen Analyse des entwicklungsabhängigen Expressionsprofils der drei bisher identifizierten RGM-Subtypen sowie des Rezeptors Neogenin im murinen Darm. Desweiteren sollte ein möglicher Einfluss des RGM-Neogenin Systems auf Proliferations- und Differenzierungsvorgänge epithelialer und enterischer Stamm- bzw. Vorläuferzellen *in vitro* und in im Neogenin Knockout Modell *in vivo* untersucht werden.

3.1 Expressionsanalyse des RGM-Neogenin-Systems *in vivo*

Über eine RT-PCR Analyse wurde zunächst die mRNA Expression der drei RGM Subtypen und des RGM Rezeptors Neogenin in embryonalen und postnatalen Dünndarm- und Dickdarmgeweben (E14, E18, P0, P7, P14, P21 und adulter Darm) untersucht (Abb. 6). Während RGMa, RGMb und Neogenin in allen untersuchten Entwicklungsstadien detektiert werden konnte, wurde Subtyp RGMc in keinem Stadium exprimiert. Die Expression von RGMa im Stadium E14 war sehr schwach und konnte nur durch eine sensitive quantitative RT-PCR Analyse nachgewiesen werden. Zum Stadium E18 hin nahm diese signifikant zu (3,5-fach).

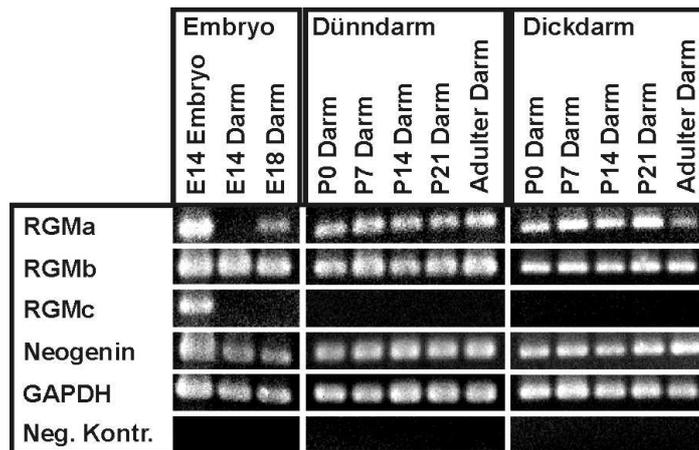


Abb. 6: Entwicklungsabhängige RT-PCR Analyse des RGM-Neogenin-Systems. Negativ-Kontrolle: PCR von DNase-behandelten RNA-Proben ohne RT-Schritt. Positiv-Kontrolle: PCR von cDNA eines E14 Embryos. Alle Gene wurden in ihrer entsprechenden Molekulargröße detektiert. Eine 100 bp Leiter diente zur Bestimmung der Größe der amplifizierten Produkte.

Um die gezeigte Expression bestimmten Zellpopulationen innerhalb des Darmgewebes zuordnen zu können, wurden zusätzlich zur RT-PCR Analyse RNA *In Situ* Hybridisierungen und immunhistochemische Nachweise durchgeführt. Im Maus-Embryo (E14) konnten RGMa und RGMb neben distinkten Bereichen im ZNS (z.B. Cortex, Mittelhirn) in Zellen der äußeren Darmwand im Bereich des sich entwickelnden plexus myentericus detektiert werden (Abb. 7).

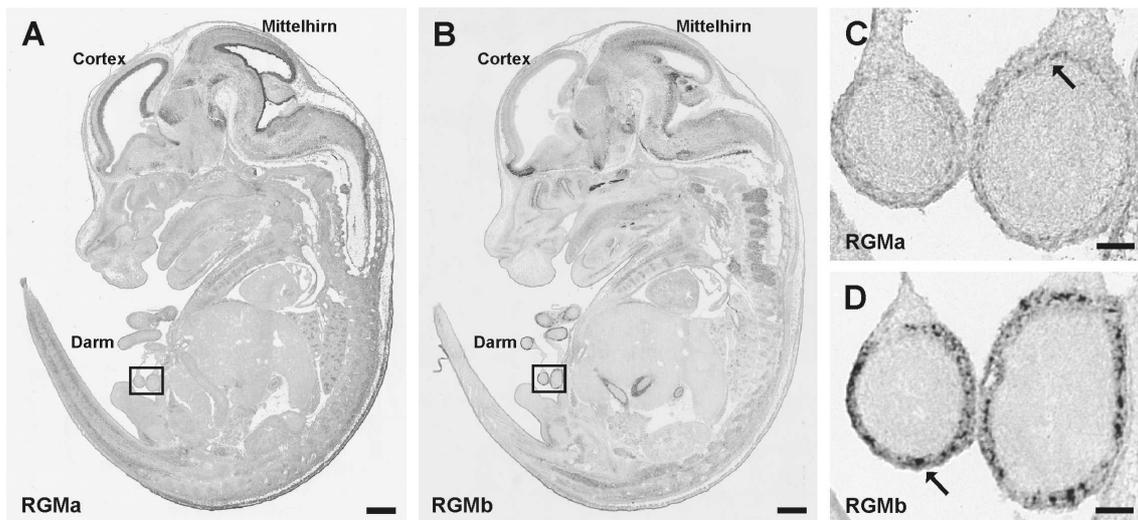


Abb. 7: *In Situ* Hybridisierung von RGMa (**A, C**) und RGMb (**B, D**) im Embryonalstadium E14. Vergrößerungen des markierten Darmbereiches in A, B (**C, D**). Die Pfeile deuten auf die Expressionsbereiche von RGMa und RGMb innerhalb der Darmwand. Größenbalken: 400 μ m (**A, B**), 50 μ m (**C, D**).

Auch im neonatalen Gewebe blieb dieses Expressionsmuster erhalten, was exemplarisch für Subtyp RGMb im Dünndarm (Abb. 8A) und im Kolon (Abb. 8B) gezeigt ist. Eine Veränderung konnte ab dem postnatalen Stadium P7 beobachtet werden. Außer der vorhandenen Expression im Bereich der Ganglienzellen des äußeren Nervenplexus konnten nun auch RGM-positive Zellen im plexus submucosus des Dün- und Dickdarms nachgewiesen werden (Abb. 8C-F). Eine mitgeführte RGM Sense-Kontrolle diente als Negativkontrolle und zeigte nur wenige unspezifische Färbungen (Abb. 8G, H). Dass es sich bei den RGM-markierten Zellen tatsächlich um neuronale und gliale Zellen des enterischen Nervensystems handelte, konnte durch eine Kombination von RGMa *In Situ* Hybridisierung und Immunhistochemie gegen

den neuronalen Marker Neurofilament und den glialen Marker GFAP gezeigt werden (Abb. 9C-F).

Zusätzlich zu den Ganglienzellen wurde RGMa und RGMb ab dem Stadium P7 auch im epithelialen Kryptenepithel nachgewiesen (Abb. 8C-F). In diesem Bereich liegen die epithelialen Stamm- und Vorläuferzellen, die sich zu den verschiedenen Epithelsubtypen ausdifferenzieren können, wie Becherzellen, Enterozyten, enteroendokrine Zellen, M-Zellen und zusätzlich Panethsche Körnerzellen im Dünndarm. Die proliferierenden Kryptenzellen konnten durch den Proliferationsmarker Ki-67 im adulten Dünndarm (Abb. 10A, B) und Dickdarm (Abb. 10C, D) dargestellt werden. Sie liegen jeweils im unteren Drittel der Krypten, wobei der Kryptengrund des Dünndarms Ki-67 negativ ist, da dort die differenzierten Panethzellen lokalisiert sind. Die Subtypen RGMa und RGMb wurden somit nicht nur in proliferierenden Epithelzellen, sondern auch in differenzierten Panethzellen beobachtet. Die Koexpression mit dem in Panethzellen stark exprimierten Antibakterizid Lysozym ist am Beispiel von RGMa gezeigt (Abb. 9 A, B).

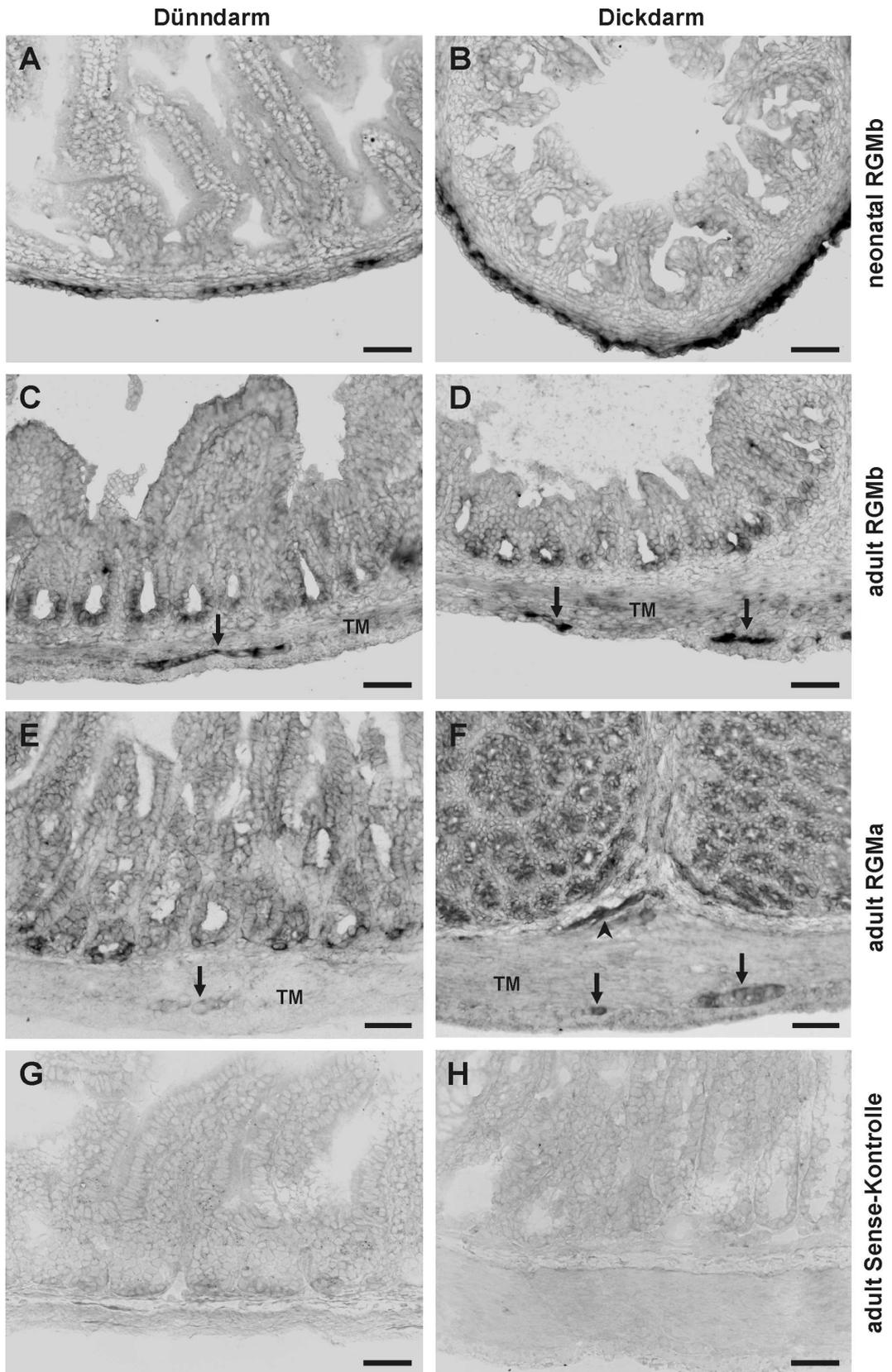


Abb. 8: *In Situ* Hybridisierung von RGMa und RGMB während der postnatalen Entwicklung des Dün- und Dickdarms. Im neonatalen Darm tritt eine Expression

ausschließlich in enterischen Ganglien auf **(A, B)**, im adulten Darm ließ sich RGMa und RGMB zusätzlich im epithelialen Kryptenepithel nachweisen **(C-F)**. Die Pfeile deuten auf positive Zellen des plexus myentericus, der Pfeilkopf auf Zellen des plexus submucosus. Die RGMa Sense-Kontrolle zeigt nur eine schwache Hintergrundfärbung **(G, H)**. Abkürzung: TM = tunica muscularis. Größenbalken: 50 µm.

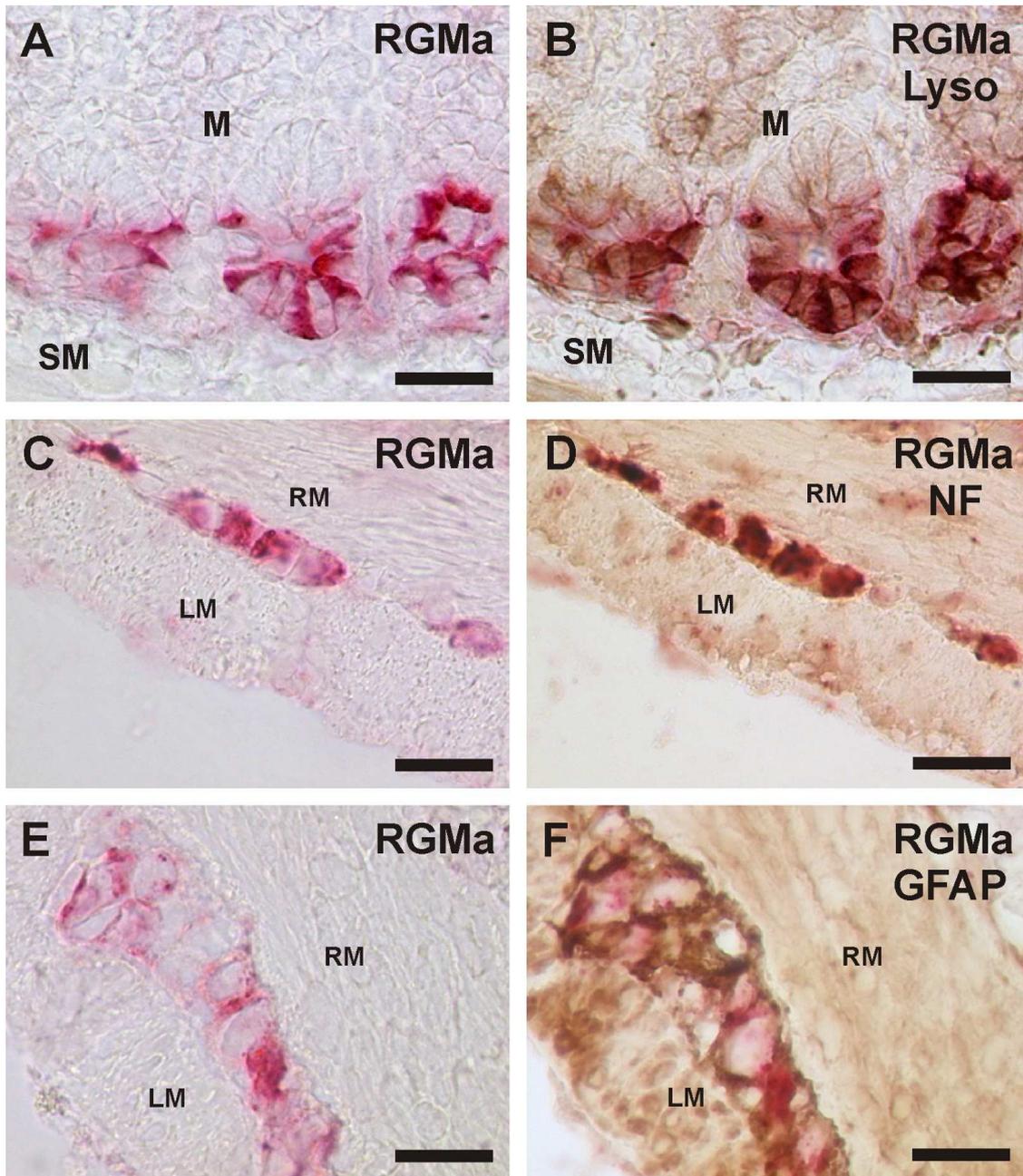


Abb. 9: Kombination von RGMa *In Situ* Hybridisierung und immunhistochemischer Färbung *in vivo*. Identifizierung von RGMa mRNA in Lysozym-positiven Panethzellen des adulten Dünndarms **(A, B)**, in Neurofilament-positiven enterischen Neuronen **(C, D)** und GFAP-positiven Gliazellen **(E, F)**. Abkürzungen: M = Mukosa, SM = Submukosa, RM = Ringmuskulatur, LM = Längsmuskulatur. Größenbalken: 10 µm.

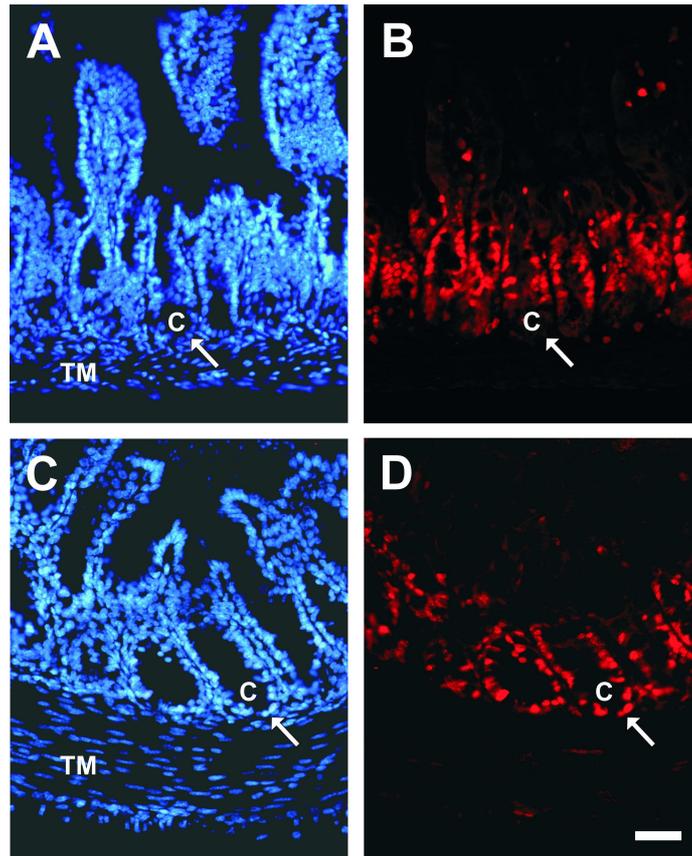


Abb. 10: Darstellung der proliferierenden epithelialen Kryptenzellen des Dünndarms (**B**) und Dickdarms (**D**) durch den Proliferationsmarker Ki-67. DAPI-Fluoreszenz des gleichen Ausschnitts wie in B, D (**A**, **C**). Die Pfeile deuten auf den unteren Kryptenbereich. Abkürzungen: C = Krypte, TM = tunica muscularis. Größenbalken: 50 μm .

Zusätzlich zur mRNA Analyse wurde auch die RGMa-Proteinexpression in adulten Geweben analysiert (Abb. 11A, B). Unter Verwendung eines polyklonalen Antikörpers gegen RGMa (Monnier et al. 2002) konnten die Ergebnisse der *In situ* Hybridisierung bestätigt werden. RGMa wurde immunhistochemisch im Kryptenepithel und in enterischen Ganglien detektiert. Allerdings zeigte die Antikörperfärbung auch einzelne unspezifische Färbungen in apikal liegenden Epithelzellen, glatten Muskelzellen der äußeren Längsmuskelschicht und in Zellen der Serosa.

Eine höhere Spezifität bezüglich der Proteindetektion gelang in der Western Blot Analyse (Abb. 11C). Analog zur RT-PCR Analyse ergaben alle Zellhomogenate der Stadien E18 bis zum adulten Darm ein klares Signal bei 42

kDa. Dieses Molekulargewicht ist in Übereinstimmung mit bereits publizierten Daten für das murine RGMa-Protein (Niederkofler et al. 2004).

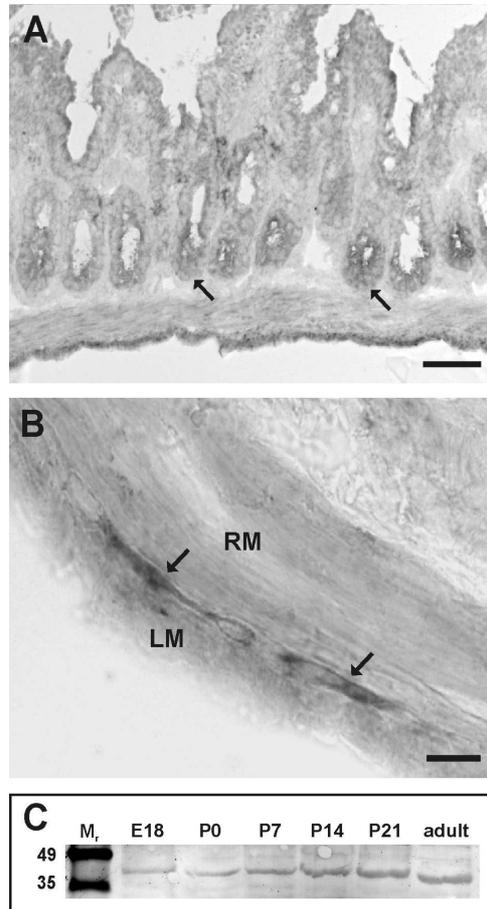


Abb. 11: RGMa-Proteinanalyse im adulten Darm. Die Pfeile deuten auf die immunhistochemische Färbung des RGMa-Antikörpers im epithelialen Kryptenbereich **(A)** und in enterischen Ganglienzellen **(B)**. In einer entwicklungsabhängigen Western Blot Analyse des Darms erkennt er in allen untersuchten Entwicklungsstadien eine Bande bei 42 kDa **(C)**. Abkürzungen: RM = Ringmuskulatur, LM = Längsmuskulatur. Größenbalken: 50 μ m **(A)**, 10 μ m **(B)**.

Die Lokalisation des RGM-Rezeptors Neogenin wurde ausschließlich immunhistochemisch untersucht. So konnte gezeigt werden, dass der Rezeptor in den gleichen Zellkompartimenten wie die RGM Liganden exprimiert wird. Im Gegensatz zu RGM konnte Neogenin allerdings embryonal wie auch adult in enterischen Ganglien und im Kryptenepithel gefunden werden (Abb. 12).

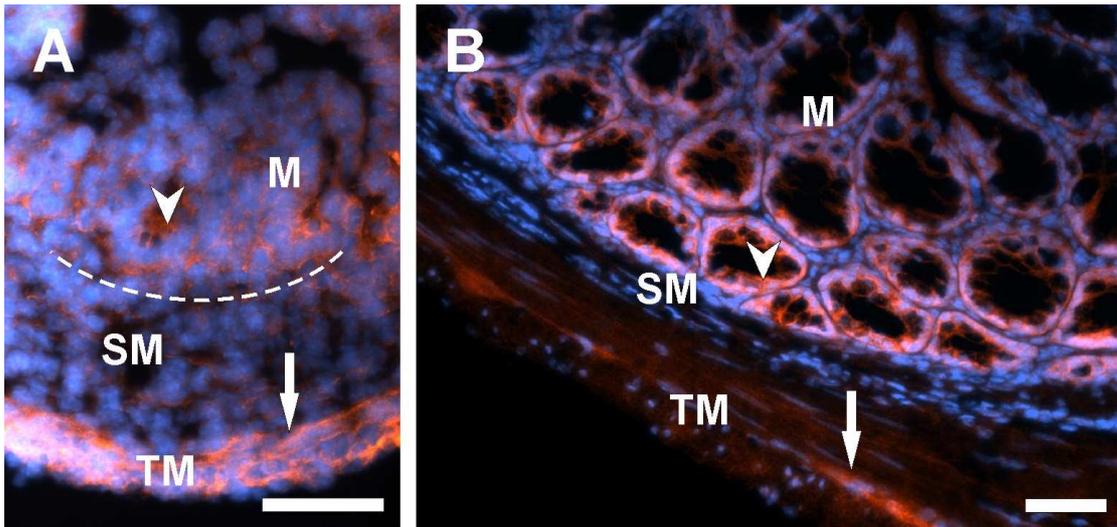


Abb. 12: Immunhistochemischer Nachweis des RGM-Rezeptors Neogenin im embryonalen Stadium E18 **(A)** und im adulten Darm **(B)**. Die Pfeile zeigen auf die Expression in enterischen Ganglien, die Pfeilköpfe auf die Expression im epithelialen Kryptenkompartiment. Abkürzungen: M = Mukosa, SM = Submukosa, TM = tunica muscularis. Größenbalken: 50 μ m.

Durch immunhistochemische Koexpression mit β -Tubulin III und GFAP konnte Neogenin schließlich spezifisch in enterischen Neuronen bzw. in Gliazellen nachgewiesen werden (Abb. 13).

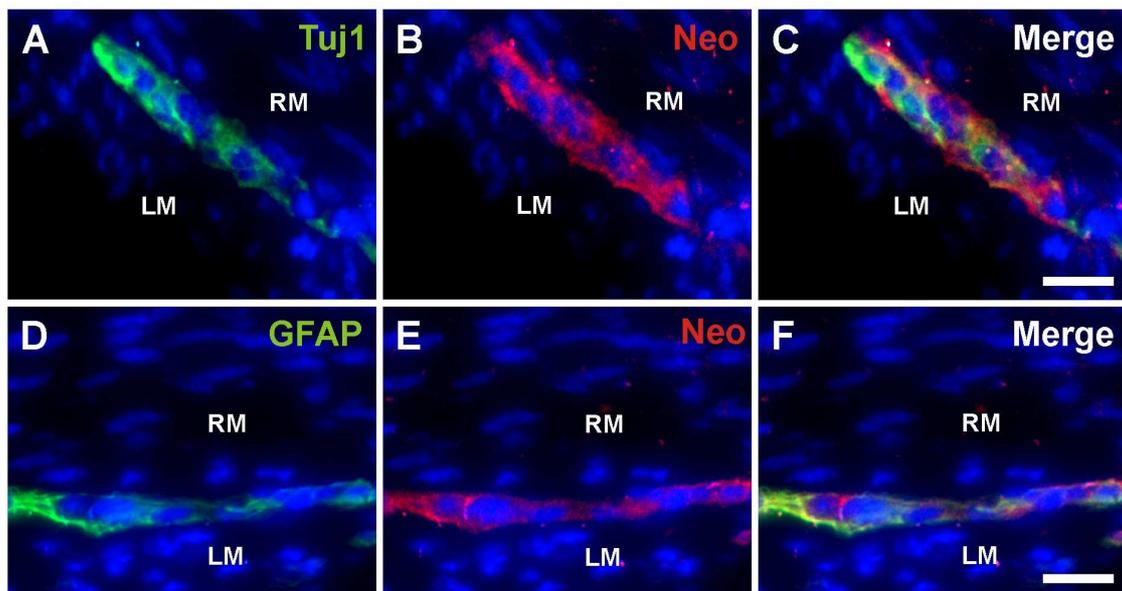


Abb. 13: Immunhistochemische Doppelfärbung zur Identifizierung von Neogenin in β -Tubulin III/Tuj1-positiven enterischen Neuronen **(A-C)** und GFAP-markierten Gliazellen

(D-F) *in vivo*. Abkürzungen: RM = Ringmuskulatur, LM = Längsmuskulatur. Größenbalken: 10 µm.

Die Beobachtung mittels *In Situ* Hybridisierung und Immunhistochemie, dass RGMa, RGMb und Neogenin sowohl in enterischen Ganglien als auch im Kryptenepithel des postnatalen Darms exprimiert wurden, konnte zusätzlich durch eine RT-PCR Analyse bestätigt werden. Hierzu wurden die Kryptenzellen von der Muskularis getrennt und die mRNA beider Gewebe separat untersucht (Abb. 14, vgl. Abb. 6).

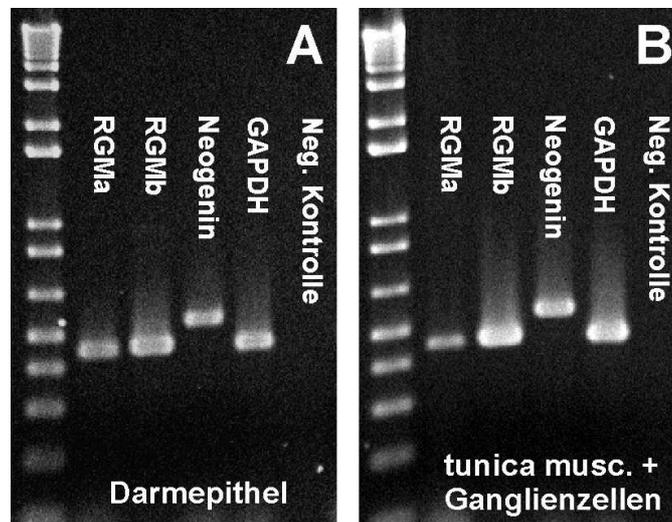


Abb. 14: Nachweis der RGMa, RGMb und Neogenin Expression durch eine getrennte RT-PCR Analyse von adultem Darmepithel (A) und der Muskelschicht mit den enterischen Ganglien (B).

3.2 Expressionsanalyse des RGM-Neogenin Systems *in vitro*

3.2.1 *In vitro* Expression in enterischen Ganglien

Für *in vitro* Untersuchungen mit enterischen Ganglien wurden Neurosphärenkulturen aus E18 Därmen der Maus generiert. Etwa 3 Tage nach der Aussaat bildeten die proliferierenden Ganglienzellen erste Zellcluster, die sich nach ca. 1 Woche zu primären Neurosphären weiterentwickelten (Abb. 15A, B). Auch einige adhärente Zellen mesenchymalen Ursprungs wurden in der Kultur

beobachtet, deren Anzahl im Verlauf der Kultivierung allerdings abnahm. Zur Bestimmung der Teilungsrate wurde der Kultur für 2 h das Nucleosid-Analoga BrdU zugesetzt, welches von proliferierenden Zellen während der Synthesephase des Zellzyklus in das Genom eingebaut wird und anschließend durch einen Antikörper immunhistochemisch detektiert werden kann (Abb. 15D-F). 23 +/- 2 % (Mittelwert +/- SEM; n = 15) aller Zellen inkorporierten BrdU. Zur weiteren Charakterisierung wurde eine Immunfärbung gegen den neuronalen Stamm- und Vorläuferzellmarker Nestin (Zimmerman et al. 1994) auf Kryostatschnitten der Neurosphären durchgeführt (Abb. 15G). 35.2 +/- 2.1 % (Mittelwert +/- SEM; n = 4) aller Zellen waren positiv für Nestin. Ähnlich der *in vivo* Situation wurde auch *in vitro* eine starke RGMA und Neogenin Expression in proliferierenden Neurosphären beobachtet. Dies konnte durch *In situ* Hybridisierung und immunhistochemisch gezeigt werden (Abb. 15C, H). Neogenin wurde in etwa der Hälfte aller Zellen exprimiert (51 +/- 5 %; Mittelwert +/- SEM; n = 7). Interessanterweise waren wiederum etwa die Hälfte dieser Neogenin-positiven Zellen (51 +/- 14 %; Mittelwert +/- SEM; n = 4) ko-gefärbt mit dem Stammzell- und Vorläuferzellmarker Nestin (Abb. 15G-I).

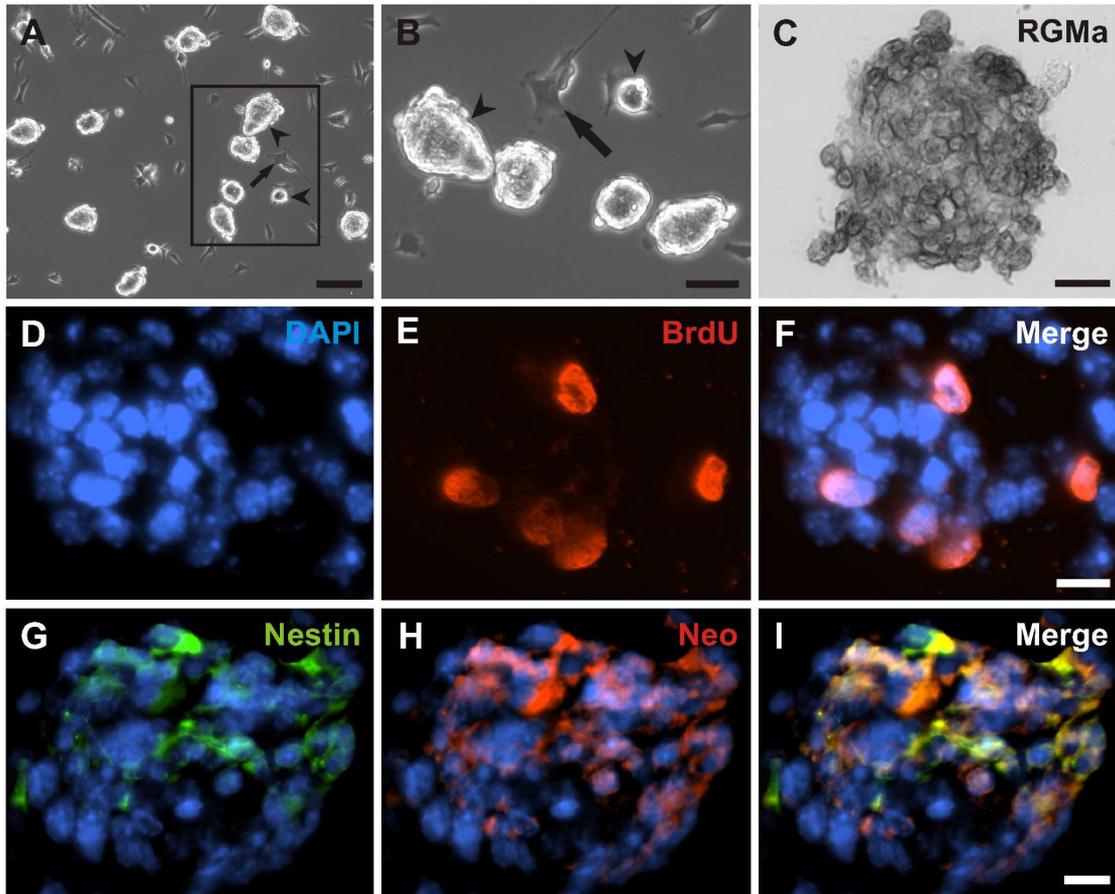


Abb.15: Primäre Neurosphären nach 7 Tagen in Kultur **(A)**. Vergrößerung einiger Sphären der Darstellung in A **(B)**. Die Pfeilköpfe zeigen unterschiedlich große Neurosphären. Der Pfeil deutet auf eine adhärenzte Zelle mesenchymalen Ursprungs hin. Die Kombination von BrdU und DAPI-Kernfärbung demonstriert die Proliferationskapazität der Sphären **(D-F)**. RGMa **(C)** und Neogenin **(H)** zeigen eine starke Expression. In ca. 50 % der Zellen findet man eine Ko-Expression von Neogenin mit dem neuronalen Stamm- und Vorläuferzellmarker Nestin **(G-I)**.

Zur Untersuchung der RGM-Neogenin Expression nach der Zelldifferenzierung wurden die Neurosphären für 5 Tage unter Differenzierungsbedingungen kultiviert d.h. unter Entzug der Wachstumsfaktoren und Zugabe von 2 % fötalem Kälberserum. Schon nach wenigen Stunden adhärten die Sphären an der Laminin/Fibronectin/Poly-L-Ornithin beschichteten Plastikoberfläche und begannen erste Ausläufer zu bilden. Nach 5 Tagen entwickelte sich um die Sphäre herum schließlich ein nahezu konfluenter Monolayer aus unterschiedlich ausdifferenzierten Zelltypen. 42 +/- 5 % (Mittelwert +/- SEM; n = 4) aller Zellen differenzierten sich zu Neuronen und 53 +/- 7 % (Mittelwert +/-

SEM; n = 5) zu Gliazellen. Neogenin wurde ausschließlich in diesen beiden Zelltypen detektiert, jedoch nicht in Zellen mesenchymalen Ursprungs, wie z.B. in glatten Muskelzellen (Abb. 16).

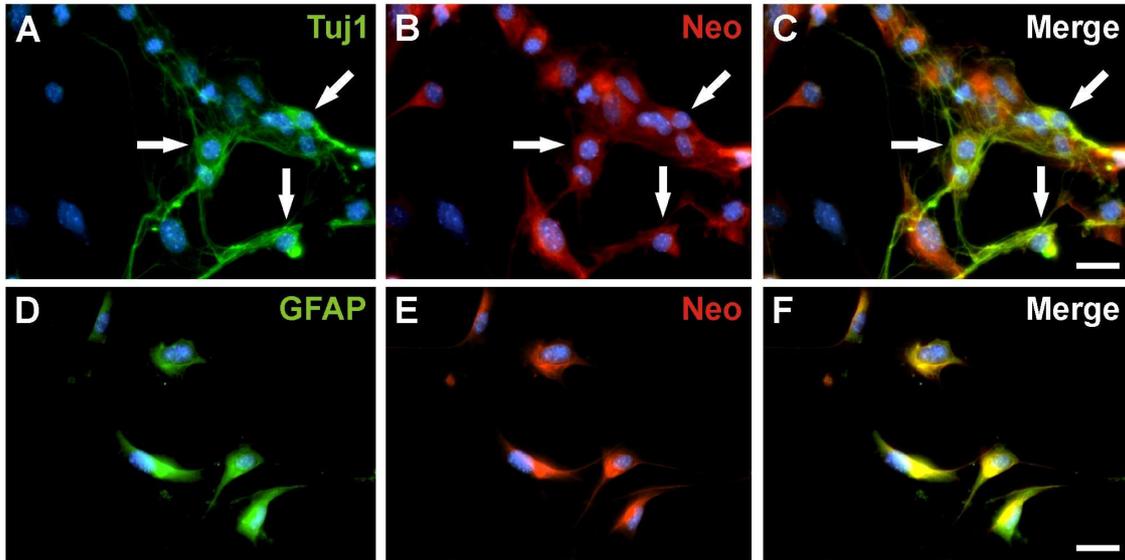


Abb. 16: Immunhistochemische Doppelfärbung zur Identifizierung von Neogenin in β -Tubulin III/Tuj1-positiven enterischen Neuronen (A-C) und GFAP-markierten Gliazellen (D-F) *in vitro*. Größenbalken: 50 μ m.

Eine RT-PCR Analyse konnte die starke RGMa und Neogenin Expression während der Proliferations- und Differenzierungsphase bestätigen (Abb. 17).

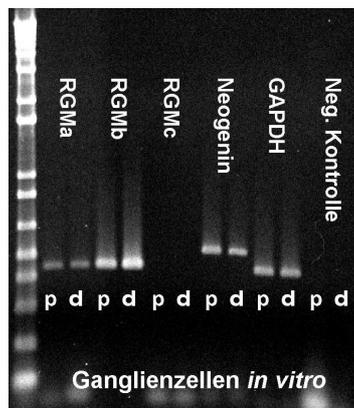


Abb. 17: RT-PCR Analyse von proliferierenden (p) und ausdifferenzierten (d) Neurosphären. Die Expression von RGMa, RGMb und Neogenin bleibt in beiden Kultivierungsphasen erhalten.

Um zu beweisen, dass die differenzierten Neurone und Glia ursprünglich von sich teilenden Neurosphärenzellen abstammen, wurden die proliferierenden Sphären für 2 h mit BrdU aufgeladen und anschließend ausdifferenziert. Nach der Differenzierung konnten BrdU-positive Neurone und Glia in der Kultur beobachtet werden (Abb. 18).

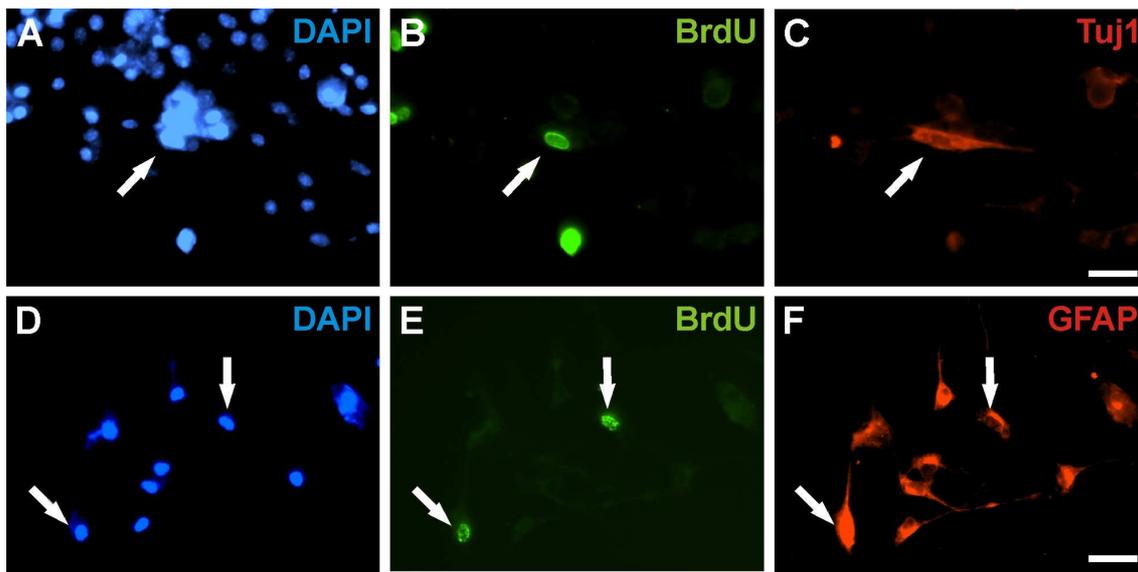


Abb. 18: Immunzytochemische Doppelfärbung von BrdU mit β -Tubulin III/Tuj1 (B, C) und GFAP (E, F) in ausdifferenzierten Neurosphären. Eine DAPI-Kernfärbung zeigt jeweils den gleichen Bildausschnitt (A, D). Die Pfeile deuten jeweils auf die gleichen Zellen. Größenbalken: 50 μ m.

3.2.2 *In vitro* Expression in der epithelialen Darmzelllinie Caco-2

Die Isolation und Expansion reiner primärer Epithelzellkulturen gestaltete sich schwieriger als bei enterischen Ganglien. Deshalb wurde für diese Arbeit auf die tumorogene Kolonzelllinie Caco-2 zurückgegriffen. Hierbei handelt es sich um eine leicht zu kultivierende homogene Zellpopulation, die ursprünglich aus einem Kolorektalkarzinom isoliert wurde und häufig für *in vitro* Untersuchungen verwendet wird. Über eine RT-PCR Analyse bzw. immunzytochemisch konnte in Caco-2 Zellen die Expression von RGMb und des Rezeptors Neogenin wie im epithelialen Kryptenkompartiment *in vivo* nachgewiesen werden (Abb. 19).

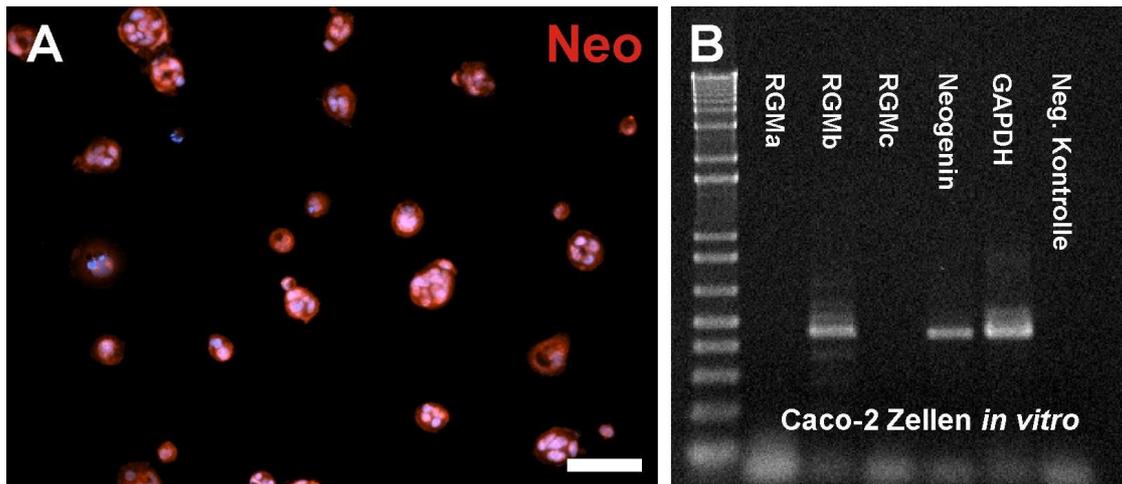


Abb. 19: Nachweis des RGM-Neogenin Systems in Caco-2 Zellen. Immunzytochemische Färbung für Neogenin **(A)**; Größenbalken: 50 μ m. Eine RT-PCR Analyse zeigt die Expression von Subtyp RGMb und Neogenin **(B)**.

3.3 Einfluss von RGMa auf die Proliferation und Migration neuronaler Progenitorzellen *in vitro*

Die Expression von RGMa in enterischen Progenitoren warf die Frage auf, ob RGMa einen Einfluß auf das Proliferationsverhalten der Zellen hat. Um dies zu untersuchen, wurden expandierte Neurosphären auf einem mit RGMa transfizierten Hek-293 Monolayer für 2 Tage kultiviert und anschließend mit BrdU aufgeladen. Die Auswertung ergab, dass im Vergleich zur Kontrolle keine signifikanten Effekte auf das Zellteilungsverhalten nachzuweisen waren. Die Proliferationsrate blieb konstant bei etwa 20 % (Abb. 21A).

Im nächsten Schritt wurden daher mögliche Effekte auf sich in der Differenzierung befindende Zellen untersucht. Mit Hilfe des Neuriten-Auswachsassays konnte gezeigt werden, dass RGMa einen inhibitorischen Einfluß auf auswachsende Neuriten hat (Abb. 20). Im Vergleich zur Mock Kontrolle war das Neuritenwachstum signifikant um 52 \pm 6 % (Mittelwert \pm SEM; n = 40) reduziert (Abb. 21B). Um auszuschließen, dass die Beobachtung auf metabolische Sekundäreffekte der lebenden Feederzellen zurückzuführen ist, wurden diese vor der Kokultivierung abgetötet. Auch unter diesen Bedingungen war der Effekt mit 26 \pm 1 % (Mittelwert \pm SEM; n = 3) deutlich zu sehen (Abb. 21C). Die schwächere Ausprägung der Hemmung könnte darin

begründet sein, dass im Gegensatz zu den Lebendfeederzellen in diesem experimentellen Ansatz keine RGMA Proteine nachproduziert werden. Zusätzlich sollte über eine Neogenin-Antikörperbehandlung der Sphären die extrazellulär liegende RGMA Bindungsstelle blockiert werden. Die repulsive Wirkung von RGMA konnte durch die Antikörper-Blockierung nahezu aufgehoben werden. Dies deutete darauf hin, dass der RGMA-Effekt über den Neogenin-Rezeptor vermittelt wurde. Die Inkubation mit einer Isotyp-Kontrolle zeigte keine signifikante Änderung der RGMA-Hemmung. Die Neuriteninhibition wurde in drei unterschiedlichen Abständen ausgewertet (30 μm , 60 μm und 90 μm) und überall ergab sich der gleiche Effekt (Abb. 21C). Die Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass RGMA an der Regulation von Differenzierungsprozessen des ENS aktiv beteiligt sein könnte.

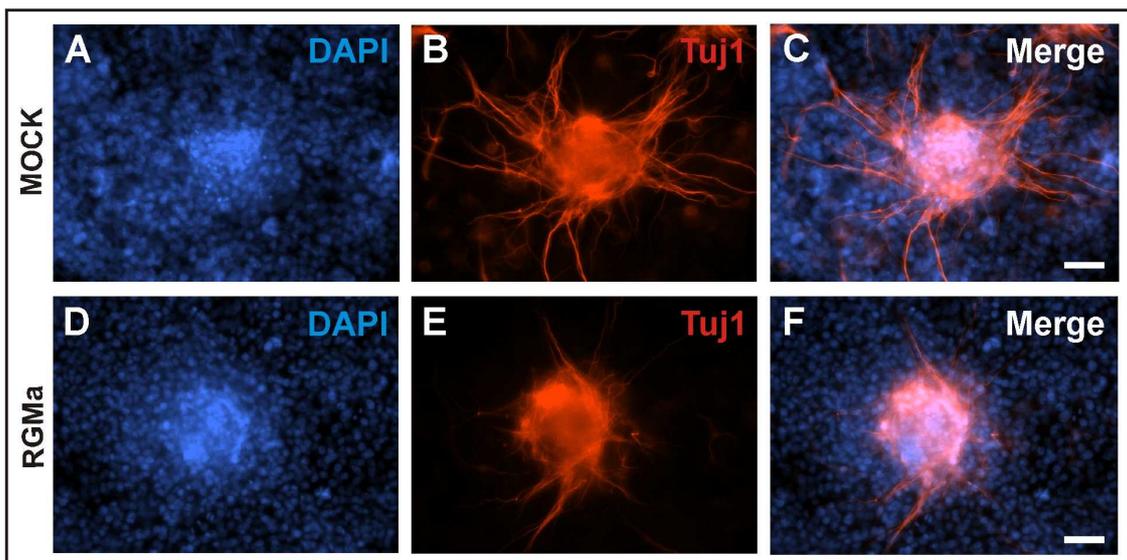


Abb. 20: Auswuchsversuche mit enterischen Ganglienzellen. RGMA transfizierte Hek-293 Zellen (**D-F**) zeigen im Vergleich zur Kontrolle (**A-C**) einen deutlichen repulsiven Effekt auf das Neuritenauswachsverhalten. Größenbalken: 50 μm .

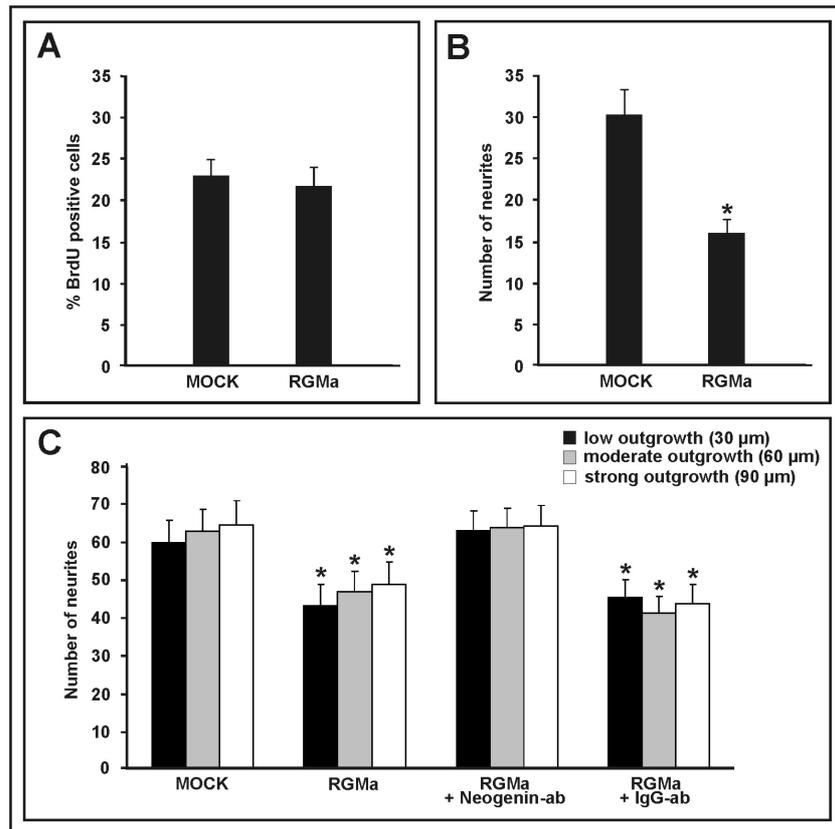


Abb. 21: Quantitative Auswertung der Proliferations- und Auswachsversuche mit enterischen Ganglien. RGMa hat keinen Effekt auf die Zellproliferation (**A**), wirkt jedoch inhibitorisch auf auswachsende Neuriten (**B, C**).

Die Frage drängte sich auf, ob RGMa auch einen Einfluß auf vollständig ausdifferenzierte Zellen ausüben würde. Um dies zu untersuchen, wurde ein Kollaps-Assay durchgeführt. Hierzu wurden Neurosphären für 5 Tage ausdifferenziert und mit rekombinantem RGMa-Fc Fusionsprotein behandelt. RGMa löste nach ca. 5-10 min. eine signifikante Retention der Zellausläufer bei 51 +/- 5 % (Mittelwert +/- SEM; n = 4) aller analysierten, einzeln liegenden Zellen aus (n = 74). Dieser Effekt erreichte nach etwa 30 min. sein Maximum und blieb danach konstant (Abb. 22). Im Gegensatz dazu traten nur kleine morphologische Veränderungen nach Zugabe des Fc-Kontrollproteins auf.

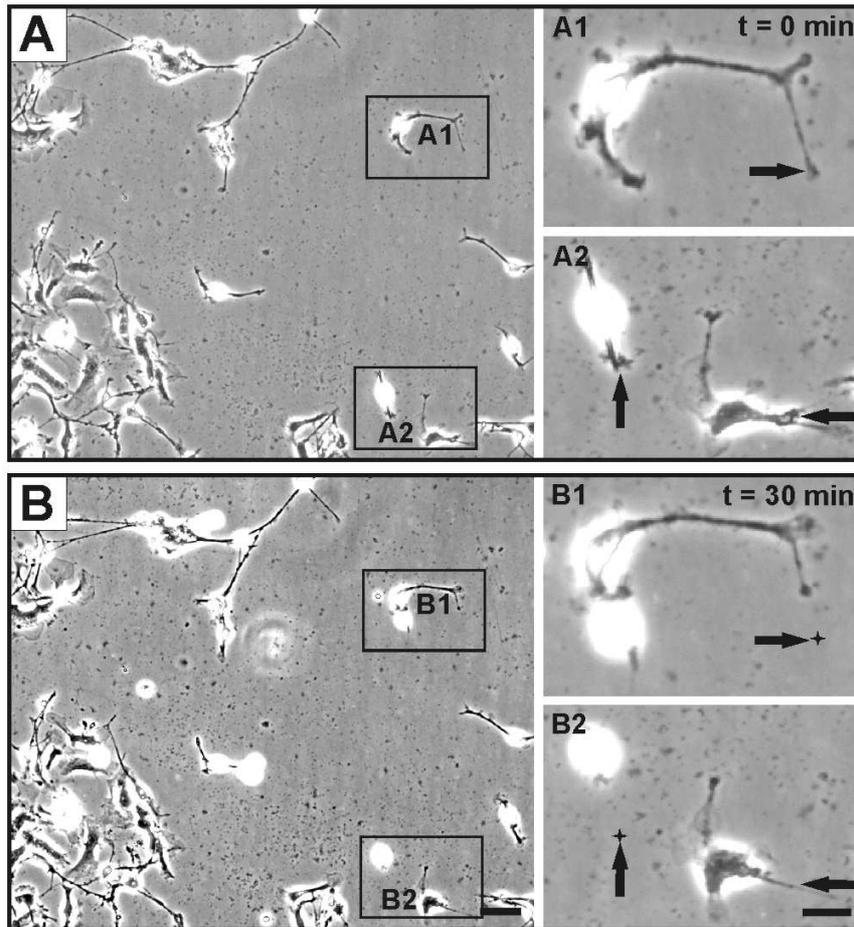


Abb. 22: Nach Zugabe von RGMA (**A**) wird innerhalb von 30 min. ein Kollaps von enterischen Zellausläufern induziert (**B**). Die Pfeile zeigen jeweils auf gleiche Zellausläufer vor und nach der Stimulation. **A1-B2** sind Vergrößerungen der markierten Zellen aus den Übersichtsaufnahmen. Größenbalken: 50 µm (**A, B**), 10 µm (**A1-B2**).

3.4 Einfluss von RGMA auf die Proliferation und Migration epithelialer Caco-2 Zellen *in vitro*

Analog zu den Untersuchungen bei enterischen Ganglienzellen wurden Caco-2 Zellen mit RGMA transfizierten Hek-293 für 2 Tage kokultiviert und anschließend mit BrdU aufgeladen. Auch hier hatte RGMA, ebenso wie Subtyp RGMb, im Vergleich zur Kontrolle keinen signifikanten Effekt auf die Zellproliferation (Abb. 23A). Die normale Proliferationsrate der Caco-2 Zellen lag bei 42 +/- 4 %, die von RGMA bei 43 +/- 1 % (Mittelwert +/- SEM; n = 8). Als Positivkontrolle diente EGF, das die Proliferation signifikant um 34 +/- 3 % (Mittelwert +/- SEM; n = 8) im Vergleich zur Kontrolle steigern konnte.

Um mögliche Effekte auf das Migrationsverhalten der Zellen zu untersuchen, wurde der Boydenkammern-Assay durchgeführt, bei dem die Zellen innerhalb eines Zeitraumes von 6-8 h durch eine poröse Membran hindurch migrieren und anschließend nach einer Dapi-Kernfärbung ausgezählt werden können. Nach Zugabe des RGMa-Fc Fusionsproteins migrierten 35 +/- 4 % (Mittelwert +/- SEM; n = 3) weniger Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Dieser repulsive Effekt konnte nach Blockierung der Neogenin Bindungsstelle durch Zugabe des Neogenin Antikörpers nahezu aufgehoben werden. Die Zugabe des Isotyp-Kontrollantikörpers zeigte keine Wirkung. Als Positivkontrolle diente wiederum EGF, dass die Migration der Caco-2 Zellen um 40 +/-3 % (Mittelwert +/- SEM; n = 3) steigern konnte (Abb. 23B).

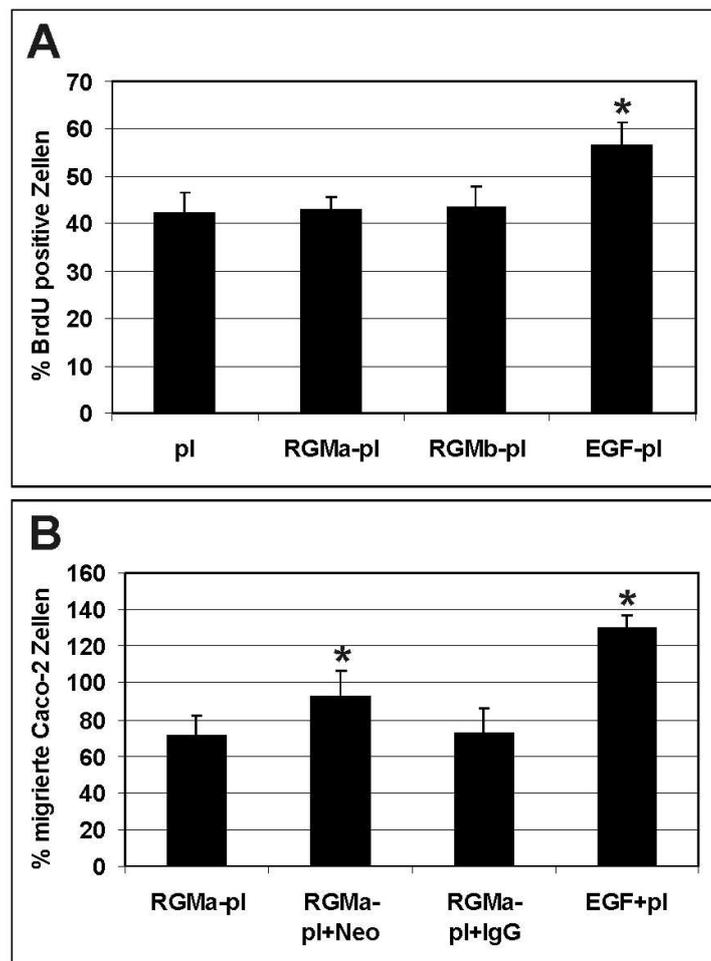


Abb. 23: Quantitative Auswertung der Proliferations- und Migrationsversuche mit Caco-2 Zellen. RGMa hat keinen Effekt auf die Zellproliferation (**A**), wirkt jedoch inhibitorisch auf die Migration der Zellen in der Boyden-Kammer (**B**).

3.5 Analyse der Neogenin Knockout Maus

Da Neogenin als bisher einziger RGM Rezeptor identifiziert wurde, stellte sich die Frage, wie sich das Fehlen des Rezeptorproteins auf enterische Ganglienzellen und Kryptenepithelzellen auswirken würde. Hierzu wurden das Embryonalstadium E11.5 und adulte Tiere untersucht. Im Stadium E11.5 konnte in früheren Studien für Neogenin eine starke Expression gezeigt werden, die im Laufe der Embryonalentwicklung abnimmt (Jiang et al. 2003). Enterische Vorläuferzellen, die aus der Neuralleiste in das Darmrohr eingewandert sind, erreichen in E11.5 die Blinddarmanlage. Der Dickdarm ist zu diesem Zeitpunkt noch aneural, also völlig frei von Nervenzellen. Liegen Störungen in der aktiven Zellmigration bei der Entstehung des enterischen Nervensystems vor, so kann dies im Stadium E11.5 sehr gut beobachtet werden.

Die immunhistochemische Anfärbung mit β -Tubulin III ergab, dass in den Neogenin Knock-out-Därmen eine Verzögerung der Darmbesiedelung zu beobachten war (Abb. 24, n = 3). Die Migrationsfront war im Knock-out weiter vom Blinddarm entfernt, was die Vermutung nahe legt, dass Neogenin in der Regulation der frühembryonalen Zellmigration mit involviert zu sein.

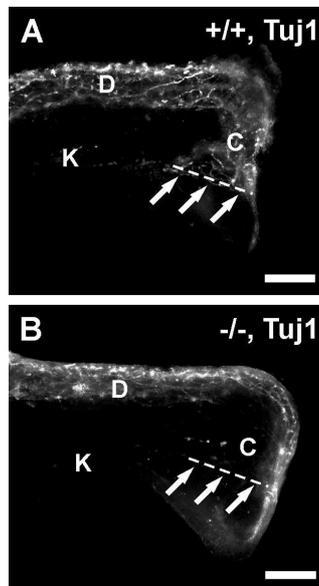


Abb. 24: Die Analyse des Neogenin Knockout im Stadium E11,5 zeigt eine gestörte Einwanderung von enterischen Vorläuferzellen (B) im Vergleich zum Wildtyp-Darm (A). Die Pfeile deuten die normale Zellmigrationsfront im Bereich des Caecums (Blinddarm) an. Abkürzungen: D = Dünndarm, C = Caecum, K = Kolon. Größenbalken: 50 μ m.

Das Fehlen des Neogenin-Rezeptors machte sich erstaunlicherweise auch im adulten Darm bemerkbar. Durch die Analyse von ca. 3 cm langen Stücken des distalen Kolons konnte eine ausreichend große Anzahl an Neurone und Gliazellen immunhistochemisch erfasst und analysiert werden (Abb. 25). Im Vergleich zu Wildtyp-Tieren war die Anzahl β -tubulin III positiver Neurone um 29 +/- 3 % (Mittelwert +/- SEM; n = 3) und GFAP-positiver Gliazellen sogar um 43 +/- 3 % (Mittelwert +/- SEM; n = 3) reduziert (Abb. 26). Allerdings traf dies nur für den plexus myentericus zu, während im *plexus submucosus* keine signifikanten Veränderungen beobachtet werden konnten. Die reduzierte Zellzahl im plexus myentericus machte sich vor allem durch die verringerte Anzahl größerer Zellcluster bemerkbar. β -Tubulin III-positive Cluster mit mehr als 5 benachbarten Zellen waren um 40 +/- 4 % (Mittelwert +/- SEM; n = 3), GFAP-positive Cluster um 43 +/- 6 % (Mittelwert +/- SEM; n = 3) reduziert. Interessanterweise war auch zu beobachten, dass im Mittel die tunica muscularis um 49 +/- 5 % (Mittelwert +/- SEM; n = 3) dünner ausgeprägt war im Vergleich zu den Kontrolldärmen, bei gleichzeitiger normaler Dicke der anderen Darmschichten (Submukosa, Mukosa). Dies könnte möglicherweise ein sekundärer Effekt sein, bedingt durch eine verringere Innervation aufgrund der reduzierten Anzahl an Neurone.

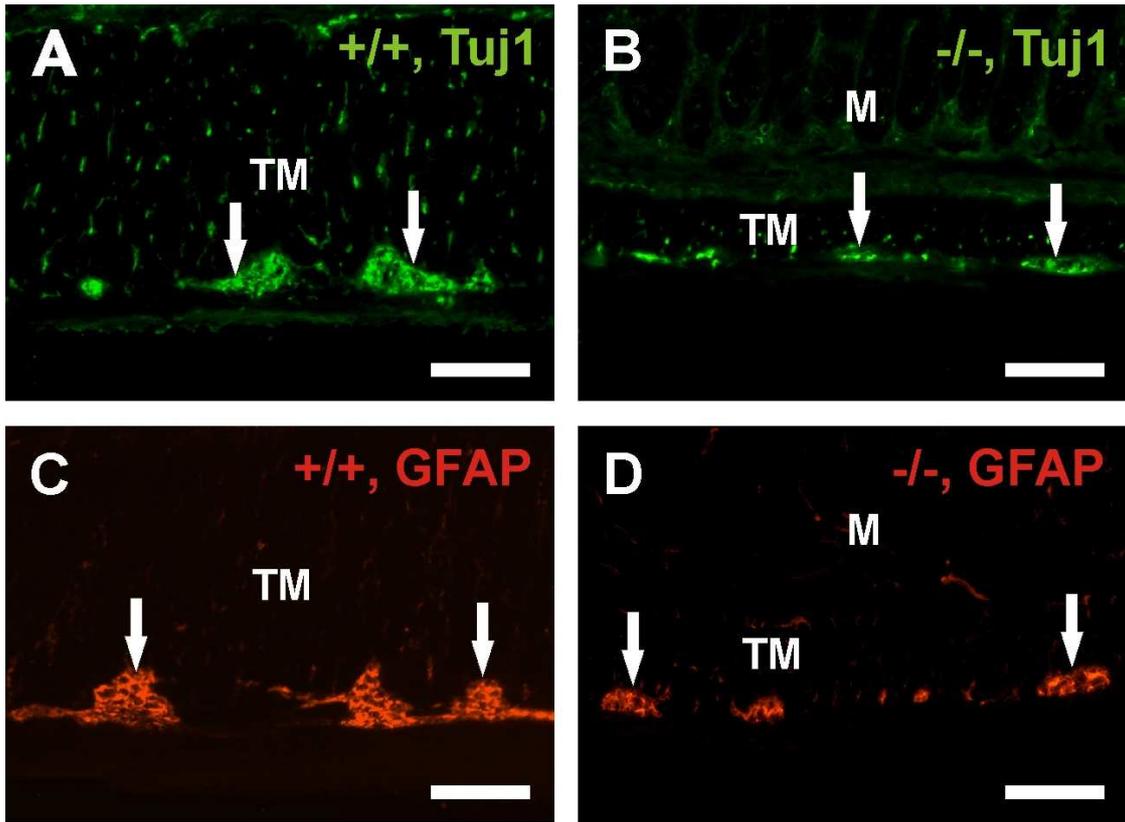


Abb. 25: Immunohistochemische Analyse enterischer Ganglien in der adulten Neogenin Knockout Maus. Die Pfeile deuten auf β -Tubulin III/Tuj1-positive Neurone (**A, B**) und GFAP-positive Gliazellen (**C, D**). Im Knockout (**B, D**) ist im Vergleich zum Wildtyp (**A, C**) eine deutliche Reduktion an Neurone und Gliazellen zu beobachten. Abkürzungen: M = Mukosa, TM = tunica muscularis. Größenbalken = 100 μ m.

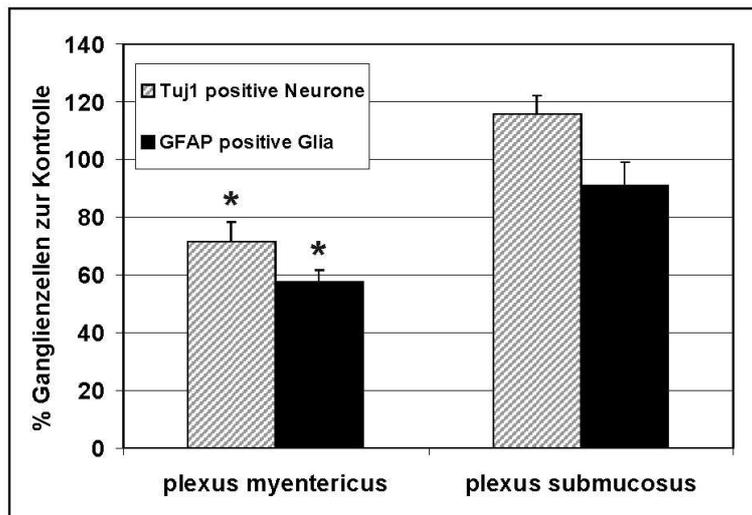


Abb. 26: Quantitative Auswertung der Neuronen und Gliazell-Anzahl in der Neogenin Knockout Maus im Vergleich zum Wildtyp (n = 3). Eine signifikante Reduktion ist für beide Zellpopulationen nur im plexus myentericus zu beobachten.

Da Neogenin auch im Kryptenepithel stark exprimiert wird, stellte sich die Frage, wie sich das auf die proliferierenden Kryptenzellen auswirken würde. Zur Klärung dieser Frage wurde den Tieren für 2 h BrdU appliziert und das distale Kolongewebe immunhistochemisch aufgearbeitet. Analog zu den ENS Zellen war auch hier eine signifikante Reduktion der sich teilenden Zellen pro Krypte zu beobachten (Abb. 27). Die Anzahl BrdU-positiver Zellen war im Vergleich zu den Kontrolltieren um $24 \pm 4 \%$ (Mittelwert \pm SEM; $n = 3$) verringert (Abb. 28). Wie sich das auf die Differenzierungsleistung und Physiologie der Epithelzellen auswirkt sind Gegenstand weiterer Untersuchungen. Ebenso muss geklärt werden, ob sich die Beobachtungen auch in anderen Stadien der Darmentwicklung reproduzieren lassen.

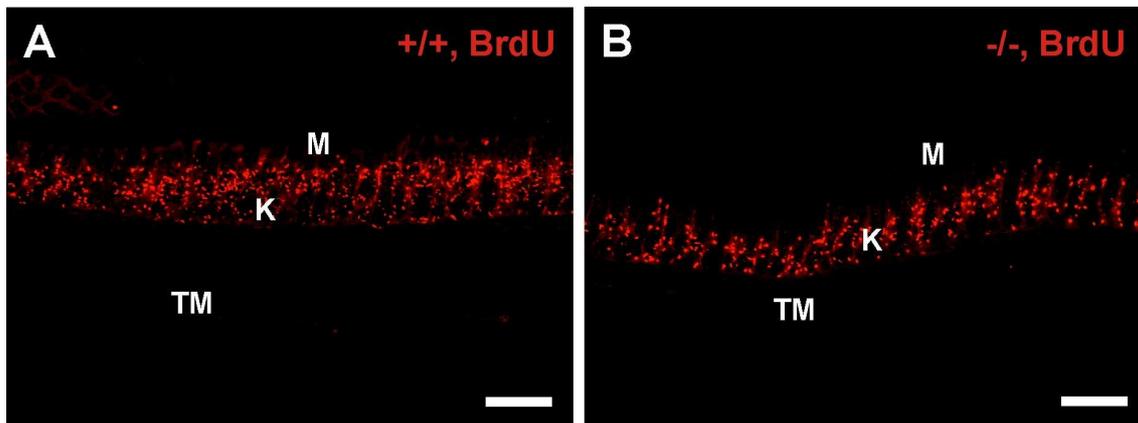


Abb. 27: Immunhistochemische Proliferationsanalyse des Epithels im adulten Neogenin Knockout. Im Vergleich zum Wildtyp (**A**) ist eine deutliche Reduktion an BrdU-positiven Zellen im Kryptenepithel zu beobachten (**B**). Abkürzungen: M = Mukosa, K = Krypte, TM = tunica muscularis. Größenbalken = 50 μ m.

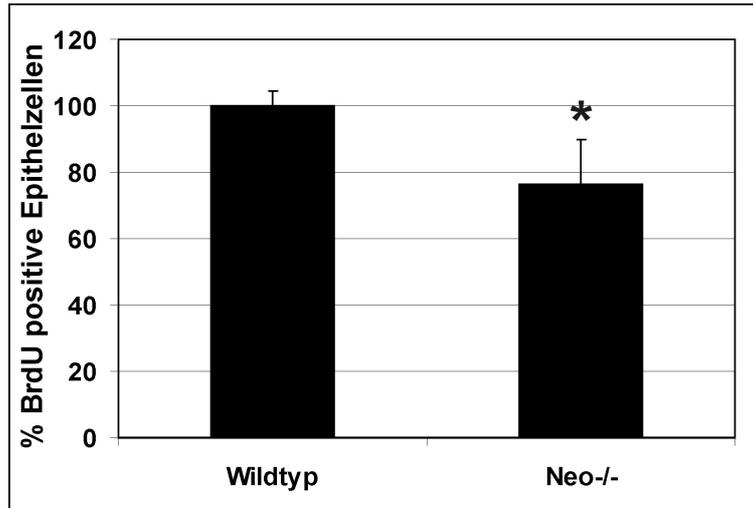


Abb.: 28: Quantitative Auswertung der BrdU-positiven Zellen im adulten Neogenin Knockout im Vergleich zum Wildtyp. Eine signifikante Reduktion der Proliferationsleistung im Kryptenepithel ist zu beobachten.

4. Diskussion

Mit der vorliegenden Arbeit wurde die entwicklungsabhängige Expression von RGM und Neogenin im murinen Darm beschrieben sowie erstmals biologische Effekte von RGMa auf Darmzellen *in vitro* gezeigt. Zusätzlich wurde die Neogenin Knockout Mutante auf Veränderungen der Proliferations- und Differenzierungsleistung untersucht.

In den letzten Jahren wurde das RGM-Neogenin System bereits bei verschiedenen neuronalen Entwicklungsprozessen identifiziert und charakterisiert (Matsunaga and Chedotal 2004). Dabei konnte gezeigt werden, dass RGM und Neogenin an neuronalen Zellmigrations- und Apoptosevorgängen des ZNS beteiligt ist.

Das Expressionsmusters von RGM und Neogenin wurde während der Embryonalentwicklung nicht nur im ZNS, sondern auch in distinkten Bereichen des peripheren Nervensystems und entodermaler Gewebe beschrieben (Vielmetter et al. 1994; Jiang et al. 2003; Oldekamp et al. 2004; Schmidtmer and Engelkamp 2004; Fitzgerald et al. 2006).

Betrachtet man unterschiedliche Stammzell- und Entwicklungssysteme, so gibt es Hinweise, dass viele entwicklungsrelevante Transkriptions- und Regulationsgene oft ähnliche Expressionsmuster und analoge Funktionen in der frühen Zelldetermination aufweisen. Dies konnte auch für einige Guidance-Moleküle, bekannt aus der Entwicklung des ZNS, bei der Entwicklung entodermaler Gewebe gezeigt werden, wie z.B. bei Netrin/DCC, Ephrin/Eph, Semaphorin/Neuropilin, Slit/Robo (Cohen et al. 2001; Batlle et al. 2002; Srinivasan et al. 2003; Young et al. 2004a; Mazelin et al. 2004; Park et al. 2004; Hafner et al. 2005).

4.1 Expression und Funktion des RGM-Neogenin Systems im Darmepithel

Das intestinale Darmepithel ist eines der regenerativsten Gewebe des Körpers. Die Aufrechterhaltung dieser hohen Regenerationskapazität basiert auf einer ausgewogenen Balance zwischen Zellproliferation, -differenzierung und-apoptose. Bei Störungen dieses Gleichgewichtes kann es zu bösartigen

Veränderungen (Karzinomen) kommen, meist ausgehend von der Proliferationszone. Diese liegt im murinen Darm in der unteren Hälfte der Darmkrypten und beinhaltet die epithelialen Stamm- und Vorläuferzellen, die das Potenzial besitzen, sich in die verschiedenen Epithelzellen differenzieren zu können (Potten 1998). Die Bildung der Kryptenstruktur erfährt im Fall des Dünndarms bei der Maus bereits innerhalb der ersten 5 postnatalen Tage ihre wesentliche Prägung (Clatworthy und Subramanian 2001).

Die Subtypen RGMa und RGMb wurden von allen untersuchten Entwicklungsstadien erstmals 1 Woche nach Geburt detektiert. Die *in vitro* Experimente mit Caco-2 Epithelzellen konnten zeigen, dass RGMa keinen Einfluß auf deren Proliferation hat, jedoch die Zellmigration signifikant inhibiert. Im Gegensatz zu RGM wird der Neogenin Rezeptor bereits embryonal kontinuierlich im Kryptenepithel exprimiert. Im Neogenin Knockout Modell konnte eine Reduktion der mitotischen Aktivität im Kryptenkompartiment beobachtet werden. Bezüglich des differenzierten Epithels z.B. Anzahl von Becherzellen oder alkalische Phosphatase-Aktivität in Enterozyten, wurden keine signifikanten Veränderungen festgestellt. Zur Zeit wird untersucht, ob die reduzierte Proliferationsrate einen Einfluß auf physiologische Parameter des Darms hat.

Betrachtet man andere bereits untersuchte nicht-neuronale Organsysteme, so zeigte sich, dass während der murinen Brustdrüsenentwicklung das epitheliale Vorläuferzellkompartiment durch Neogenin stabilisiert wird, wobei hierbei nur die Wechselwirkung mit dem Netrin-1 Liganden untersucht wurde (Srinivasan et al. 2003). Netrin-1 wird analog zu RGM auch im Kryptenepithel exprimiert und ist mit dem Rezeptor DCC (50 % homolog zu Neogenin) bei der Entstehung von Kolorektaltumoren durch Beeinflussung apoptotischer Prozesse involviert (Mazelin et al. 2004). Aufgrund dieser Analogien ist es denkbar, dass auch das RGM-Neogenin System, möglicherweise in Kombination mit Netrin-1, aktiv an Zelldifferenzierungsprozessen oder an der Aufrechterhaltung des Stammzellkompartiments im Darmepithel beteiligt ist. Da Liganden und Rezeptor im gleichen Zellkompartiment exprimiert werden, kann man annehmen, dass mögliche Effekte über autokrine oder parakrine Mechanismen initiiert werden.

Interessanterweise ist auch von anderen Guidance-Molekülen bereits bekannt, dass sie morphogenetische Prozesse in unterschiedlichen epithelialen Systemen beeinflussen können (Batlle et al. 2002; Srinivasan et al. 2003; Yebra et al. 2003; Liu et al. 2004). Ephrine besitzen beispielsweise eine ähnliche *in vitro* Aktivität wie RGMa und sind an der Entstehung von Darmtumoren beteiligt. Bei EphB2/EphB3 Knockout Mäusen geht die klare Gliederung von Proliferations- und Differenzierungszone verloren. Im adulten Dünndarm des EphB3 Knockout differenzieren zudem Panethzellen nicht mehr wie üblich im Kryptengrund, sondern sind über die komplette Villus-Krypten-Achse verteilt (Batlle et al. 2002).

4.2 Expression und Funktion des RGM-Neogenin Systems im ENS

Im Gegensatz zum Darmepithel konnte das RGM-Neogenin System kontinuierlich in den untersuchten Stadien der Darmentwicklung im enterischen Nervensystem detektiert werden. Im ZNS wird RGM mit neuronalen Migrations- und Apoptoseprozessen in Verbindung gebracht (Matsunaga und Chedotal 2004). Mit der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass RGMa auch auf Zellen des ENS einen repulsiven Effekt ausübt.

Mittlerweile wurde für eine ganze Reihe von Guidance-Molekülen eine grundlegende Beteiligung bei neuronalen Verschaltungsprozessen im ZNS (Dickson 2002; de Castro 2003), im peripheren (Young et al. 2004) und speziell enterischen Nervensystem (Seaman et al. 2001; Natarajan et al. 2002; De Bellard et al. 2003; Jiang et al. 2003) nachgewiesen. Unterschiede im jeweiligen Genexpressionsmuster veranlassen die Nervenzellen, sich in verschiedene Subtypen zu differenzieren und Verbindungen mit unterschiedlichen Partnern einzugehen. Von besonderer Bedeutung für die neuronale Navigation ist dabei der charakteristische Wachstumskegel an der Spitze jedes wachsenden Neuriten. Eine Vielzahl von Rezeptorkmolekülen liegen in der Membran des Wachstumskegels und kontrollieren intrazelluläre Regulatormoleküle, wie die monomeren GTPasen Rho und Rac. Diese beeinflussen die Zusammenlagerung und Zerlegung von Aktinfilamenten und anderen Komponenten des Zytoskeletts und steuern somit die aktive Zellbewegung (Hall 1998). An ihrem

Zielgebiet angelangt, beginnen Neurone mit anderen Zellen zu kommunizieren und erhalten oft überlebenswichtige Faktoren vom Zielgebiet wie z.B. den bisher am besten charakterisierten Nerven-Wachstumsfaktor (NGF) aus der Neurotrophin-Signalproteinfamilie. Mittlerweile gibt es erste Hinweise, dass auch das RGM-Neogenin System Komponenten der kleinen GTP-bindenden Proteine in neuronalen Zellen des ZNS moduliert (Hata et al. 2006).

Auf Basis des Expressionsmusters und erster *in vitro* Experimente kann über mögliche Funktionen des RGM-Neogenin Systems im ENS zum jetzigen Zeitpunkt nur spekuliert werden. Im Vergleich zum ZNS ist bis heute wenig darüber bekannt, wie die Verschaltungen im sich entwickelnden ENS gesteuert werden und wie ein differenziertes Neuron die Polarität des Darms erkennt. In einer im Jahre 2003 veröffentlichten Studie konnte zum ersten mal gezeigt werden, dass das Guidance-Molekülsystem Netrin-1-DCC (deleted in colorectal cancer) an der zentripetalen (sekundären) Migration der Neuralleistenzellen vom plexus myentericus zum plexus submucosus, beteiligt ist. Netrin-1 wird im dem sich entwickelnden Darmepithel und im plexus myentericus exprimiert und wirkt chemoattraktiv auf einwandernde Neuralleistenzellen, die den DCC-Rezeptor tragen (Jiang et al. 2003). Nicht geklärt ist allerdings die Frage, warum die Zellen nicht gemäß vorliegendem Gradienten bis in die Mukosa einwandern, sondern in der Submukosa verharren. Man geht davon aus, dass hierbei über kurze Distanzen wirkende, repulsive Signale eine Rolle spielen. Diskutiert werden u.a. das in der Mukosa exprimierte, repulsiv wirkende Slit-Robo System und das Matrixprotein Laminin, das von der Mukosa sekretiert wird und attraktive Netrin-Signale blockieren kann (Chalazonitis et al. 1997; Simon-Assmann et al. 1998; Hopker et al. 1999; Stein et al. 2001; Jiang et al. 2003).

RGM und Neogenin werden kontinuierlich im ENS exprimiert. Durch den Auswachs- und Kollaps-Assay konnte im Rahmen der Doktorarbeit eine repulsive Eigenschaft von RGM auf enterische Vorläuferzellen des ENS nachgewiesen werden. Analog zur Steuerung der embryonalen retino-tektalen und hippocampalen Projektionen im ZNS (Monnier et al. 2002; Brinks et al. 2004) könnte die zusätzliche Expression von Neogenin im embryonalen Epithel

möglicherweise eine Repulsion von zentripetal migrierenden Ganglienzellen, die den Liganden RGM tragen, bewirken und somit dem chemoattraktiven Effekt von Netrin-1 entgegenwirken.

Für eine wechselseitige Beeinflussung der beiden Guidance-Molekülsysteme Netrin-1/DCC und RGM-Neogenin sprechen neben den hohen Sequenz-homologien der Rezeptoren auch entwicklungsabhängige Parallelen in der Expression und Funktion (Vielmetter et al. 1997; Keeling et al. 1997). So wurden beide Systeme häufig in gleichen Geweben detektiert und mit Differenzierungsprozessen bestimmter Zelltypen in Verbindung gebracht.

Enterische Neurone bilden im Laufe der postnatalen Darmentwicklung zahlreiche, axonale Projektionen, die auch bis in den Bereich des proliferativen Kryptenepithels gelangen können. Dort setzen sie bisher weitgehend unbekannte Faktoren frei, die das epitheliale Stammzellkompartiment bezüglich Proliferation und Differenzierung beeinflussen können (Holle 1991; Bjerknes und Cheng 2001; Toumi et al. 2003). Im Gegensatz zu Neogenin (Gad et al. 1997; Jiang et al. 2003; Fitzgerald et al. 2006) konnte mit der Doktorarbeit gezeigt werden, dass RGM erst postnatal zusätzlich im Epithel auftritt (Metzger et al. 2005). Eine Modulation der axonalen Projektionen durch RGM im Bereich des postnatalen Epithels und damit der epithelialen Proliferation und Differenzierung ist daher denkbar.

Das RGM-Neogenin System könnte aber auch während der sehr frühen Embryonalentwicklung des ENS eine wichtige Rolle spielen. Studien haben gezeigt, dass die Mehrzahl der einwandernden Neuralleistenzellen aus dem vagen Bereich des Neuralrohrs stammen. Mittlerweile wurde allerdings auch eine kleine Subpopulation identifiziert, die aus dem sacralen Bereich einwandern und ausschließlich den Dickdarm besiedeln (Burns und Douarin 1998; Burns 2005).

Interessanterweise beginnt dieser Prozess erst dann, wenn der komplette Darm durch vagale Zellen besiedelt wurde. Für diese Verzögerung gibt es bisher keine plausible Erklärung. Man geht davon aus, dass vorübergehend inhibitorisch wirkende Guidance-Moleküle aktiv sind wie z.B. Sema3A (Shepherd und Raper 1999). Es wäre durchaus denkbar, dass hierbei auch

RGM eine Rolle spielen könnte. Hierfür spricht zum einen die Beobachtung, dass RGM und Neogenin im frühembryonalen Stadium stark exprimiert werden (Vielmetter et al. 1994; Jiang et al. 2003; Oldekamp et al. 2004) und repulsiv auf embryonale Ganglienzellen wirkt. Zum anderen konnten wir im Neogenin Knockout zeigen, dass die Einwanderung vagaler Neuralleistenzellen verzögert ist. Liegt die gezeigte Neogenin-Expression im frühembryonalen Dickdarm möglicherweise als Gradient vor (distal>proximal), so könnte dies die verzögerte Einwanderung sacraler Neuralleistenzellen erklären.

Natürlich sind diese Annahmen zur Zeit noch hypothetisch und müssen erst durch weiterführende Untersuchungen z.B. an RGM Knockout Tieren bestätigt werden. Das Expressionsprofil, erste funktionale *in vitro* Studien sowie die Untersuchung des Neogenin Knockout Modells geben allerdings erste Hinweise, dass das RGM-Neogenin System für Zellmigrations- und differenzierungsprozesse von Bedeutung sein könnte. Das System liefert somit einen weiteren Baustein zum Verständnis der Darmentwicklung und komplexen Architektur und Biologie des intestinalen Gewebes.

5. Zusammenfassung

Das ‚repulsive guidance molecule‘ (RGM) ist ein erst vor kurzem analysiertes Protein aus dem ZNS, welches mittlerweile auch in endodermalen Geweben des Mausembryo identifiziert wurde. Es handelt sich hierbei um ein über einen GPI-Anker membranassoziiertes Protein von 33 kDa Größe und hat keine Sequenzhomologien zu anderen bekannten Leitmolekülen. Bisher wurden in der Maus die drei Subtypen RGMa, RGMb und RGMc identifiziert. In neuronalen Zellen des ZNS wirkt RGM anti-apoptotisch, zeigt repulsive, axon-spezifische guidance-Aktivität und wirkt in der frühembryonalen Entwicklung beim Verschluss des Neuralrohres mit. Der entsprechende RGM Rezeptor ist Neogenin, das eine 50%ige Homologie mit dem Tumorsuppressorgen DCC (deleted in colorectal cancer) aufweist. Über biologische Funktionen von RGM ausserhalb des ZNS gibt es bislang wenig Erkenntnisse.

Das Ziel der Doktorarbeit bestand in einer ausführlichen Analyse des entwicklungsabhängigen Expressionsprofils der drei bisher identifizierten RGM-Subtypen sowie des Rezeptors Neogenin im murinen Darm. Desweiteren sollte ein möglicher Einfluss des RGM-Neogenin Systems auf Proliferations- und Differenzierungsvorgänge epithelialer und enterischer Stamm- bzw. Vorläuferzellen untersucht werden. In der Expressionsanalyse konnte sowohl für den Dünn- als auch für den Dickdarm gezeigt werden, dass die Subtypen RGMa und RGMb in den embryonalen (E14, E18) und früh postnatalen Stadien (P0-P7) im enterischen Nervensystem exprimiert werden. Eine Woche nach der Geburt (P7) wurden beide Subtypen zusätzlich auch im unteren epithelialen Kryptenkompartiment d.h. im epithelialen Progenitor- und Stammzellkompartiment identifiziert. RGMc konnte während der gesamten Darmentwicklung nicht detektiert werden. Im Gegensatz zu RGMa und RGMb wurde der Rezeptor Neogenin kontinuierlich in enterischen Ganglien und im epithelialen Kryptenkompartiment exprimiert. Die entsprechende Analyse wurde sowohl auf mRNA (*In situ* Hybridisierung, RT-PCR) als auch auf Proteinebene (Immunhistochemie, Western Blot) durchgeführt. Durch Doppelfärbungen mit zelltypspezifischen Antikörpern wurde die RGM und

Neogenin Expression in den verschiedenen Zelltypen charakterisiert. Dabei ließ sich der Ligand als auch der Rezeptor in differenzierten enterischen Neuronen und Glia, Panethzellen des Dünndarmepithels und undifferenzierten Stamm- und Vorläuferzellen des Kryptenepithels nachweisen. Das entwicklungsabhängige Expressionsprofil des RGM-Neogenin Systems deutete darauf hin, dass diese Moleküle an der intestinalen Stammzell determination beteiligt sind. Um dies näher zu untersuchen, wurden zunächst Protokolle zur Isolation von enterischen Ganglienzellen aus fötalem Darm der Maus (E18) etabliert. Zusätzlich stand die epitheliale Kolon-Karzinomzelllinie Caco-2 für *in vitro* Experimente zur Verfügung. Sowohl in den kultivierten epithelialen als auch neuronalen Zellen ließ sich RGM und Neogenin detektieren. Unter Verwendung eines Migrations-Assays (Boyden-Kammer) wurde der Einfluss von RGM auf die Migration der epithelialen Zellen untersucht. Bei diesen Versuchen konnte eine signifikante Hemmung von RGMa auf die Zellwanderung von Caco-2 Zellen gezeigt werden. Für Migrations-Auswuchsversuche mit enterischen Ganglienzellen wurden kultivierte Neurosphären verwendet, die zuvor aus neuronalen Vorläuferzellen des fötalen Darms generiert wurden. Die Zellmigration und das Auswachsen der Neuriten konnte signifikant inhibiert werden, wenn die Ganglienzellen mit RGMa produzierenden Hek-293 Zellen ko-kultiviert wurden. Umgekehrt ließ sich durch Zugabe von rekombinantem RGMa ein Kollaps der Neuriten ausdifferenzierter Ganglien induzieren. Der Effekt von RGMa konnte sowohl bei den Caco-2 Zellen als auch bei den enterischen Ganglienzellen durch Blockierung des Neogenin-Rezeptors aufgehoben werden. Diese Versuche bestätigten, in Analogie zum ZNS, die repulsiven Eigenschaften von RGMa auch außerhalb des ZNS. Ein Effekt von RGMa auf die Proliferation von Epithelzellen sowie enterischer Ganglienzellen konnte nicht nachgewiesen werden.

Zusätzlich zu den *in vitro* Versuchen wurde ein Neogenin Knockout Mausmodell hinsichtlich der Einflüsse auf Proliferation und Differenzierung analysiert. Im embryonalen Darm konnte eine Verzögerung der Darm-besiedelung mit enterischen Vorläuferzellen beobachtet werden. Im adulten Darm konnte im Vergleich zum Wildtyp eine signifikante Reduktion der

epithelialen Proliferation und eine Reduktion enterischer Ganglien im plexus myentericus beobachtet werden. Die Abnahme der Proliferation im Epithel hatte keinen signifikanten Einfluß auf die differenzierte Epithelpopulation. Die Reduktion enterischer Ganglien bewirkte hingegen eine signifikante Verminderung der Darmmuskelschicht.

Zusammen mit der Expressionsanalyse, den *in vitro* Befunden zur Migration sowie der Untersuchung der Neogenin Knockout Maus, deuten die Ergebnisse stark darauf hin, dass Neogenin zusammen mit seinen Liganden an der Regulation des epithelialen und enterischen Stammzellkompartiments beteiligt ist.

6. Literatur

Amthor H, Christ B, Patel K. 1999. A molecular mechanism enabling continuous embryonic muscle growth - a balance between proliferation and differentiation. *Development* 126:1041-1053.

Amthor H, Christ B, Weil M, Patel K. 1998. The importance of timing differentiation during limb muscle development. *Curr Biol* 8:642-652.

Aubin JE. 1998. Bone stem cells. *J Cell Biochem Suppl* 30-31:73-82.

Babitt JL, Zhang Y, Samad TA, Xia Y, Tang J, Campagna JA, Schneyer AL, Woolf CJ, Lin HY. 2005. Repulsive guidance molecule (RGMa), a DRAGON homologue, is a bone morphogenetic protein co-receptor. *J Biol Chem* 280:29820-29827.

Bach SP, Renehan AG, Potten CS. 2000. Stem cells: the intestinal stem cell as a paradigm. *Carcinogenesis* 21:469-476.

Batlle E, Henderson JT, Beghtel H, van den Born MM, Sancho E, Huls G, Meeldijk J, Robertson J, van de WM, Pawson T, Clevers H. 2002. Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell* 111:251-263.

Benninghof A, Drenckhahn D. 2002. *Anatomie: Band 1, 16. Auflage, Urban & Fischer Verlag München.*

Bjerknes M, Cheng H. 2001. Modulation of specific intestinal epithelial progenitors by enteric neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12497-12502.

Blumcke I, Schewe JC, Normann S, Brustle O, Schramm J, Elger CE, Wiestler OD. 2001. Increase of nestin-immunoreactive neural precursor cells in the dentate gyrus of pediatric patients with early-onset temporal lobe epilepsy. *Hippocampus* 11:311-321.

Bondurand N, Natarajan D, Thapar N, Atkins C, Pachnis V. 2003. Neuron and glia generating progenitors of the mammalian enteric nervous system isolated from foetal and postnatal gut cultures. *Development* 130:6387-6400.

Borst P. 2005. Ethidium DNA agarose gel electrophoresis: how it started. *IUBMB Life* 57:745-747.

Brinks H, Conrad S, Vogt J, Oldekamp J, Sierra A, Deitinghoff L, Bechmann I, Alvarez-Bolado G, Heimrich B, Monnier PP, Mueller BK, Skutella T. 2004. The repulsive guidance molecule RGMa is involved in the formation of afferent connections in the dentate gyrus. *J Neurosci* 24:3862-3869.

Brittan M, Wright NA. 2004. Stem cell in gastrointestinal structure and neoplastic development. *Gut* 53:899-910.

Bromley M, Rew D, Becciolini A, Balzi M, Chadwick C, Hewitt D, Li YQ, Potten CS. 1996. A comparison of proliferation markers (BrdUrd, Ki-67, PCNA) determined at each cell position in the crypts of normal human colonic mucosa. *Eur J Histochem* 40:89-100.

Burns AJ. 2005. Migration of neural crest-derived enteric nervous system precursor cells to and within the gastrointestinal tract. *Int J Dev Biol* 49:143-150.

Burns AJ, Douarin NM. 1998. The sacral neural crest contributes neurons and glia to the post-umbilical gut: spatiotemporal analysis of the development of the enteric nervous system. *Development* 125:4335-4347.

Burns AJ, Pasricha PJ, Young HM. 2004. Enteric neural crest-derived cells and neural stem cells: biology and therapeutic potential. *Neurogastroenterol Motil* 16 Suppl 1:3-7.

Chalazonitis A, Tennyson VM, Kibbey MC, Rothman TP, Gershon MD. 1997. The alpha1 subunit of laminin-1 promotes the development of neurons by interacting with LBP110 expressed by neural crest-derived cells immunoselected from the fetal mouse gut. *J Neurobiol* 33:118-138.

Clatworthy JP, Subramanian V. 2001. Stem cells and the regulation of proliferation, differentiation and patterning in the intestinal epithelium: emerging insights from gene expression patterns, transgenic and gene ablation studies. *Mech Dev* 101:3-9.

Cohen T, Gluzman-Poltorak Z, Brodzky A, Meytal V, Sabo E, Misselevich I, Hassoun M, Boss JH, Resnick M, Shneyvas D, Eldar S, Neufeld G. 2001. Neuroendocrine cells along the digestive tract express neuropilin-2. *Biochem Biophys Res Commun* 284:395-403.

Costa M, Brookes SJ, Steele PA, Gibbins I, Burcher E, Kandiah CJ. 1996. Neurochemical classification of myenteric neurons in the guinea-pig ileum. *Neuroscience* 75:949-967.

Cox EC, Muller B, Bonhoeffer F. 1990. Axonal guidance in the chick visual system: posterior tectal membranes induce collapse of growth cones from the temporal retina. *Neuron* 4:31-37.

Crosnier C, Stamatakis D, Lewis J. 2006. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat Rev Genet* 7:349-359.

De Bellard ME, Rao Y, Bronner-Fraser M. 2003. Dual function of Slit2 in repulsion and enhanced migration of trunk, but not vagal, neural crest cells. *J Cell Biol* 2003 162:269-279.

de Castro F. 2003. Chemotropic molecules: guides for axonal pathfinding and cell migration during CNS development. *News Physiol Sci* 18:130-136.

Dickson BJ. 2002. Molecular mechanisms of axon guidance. *Science* 298:1959-1964.

Drescher U, Bonhoeffer F, Muller BK. 1997. The Eph family in retinal axon guidance. *Curr Opin Neurobiol* 7:75-80.

Feldheim DA, Kim YI, Bergemann AD, Frisen J, Barbacid M, Flanagan JG. 2000. Genetic analysis of ephrin-A2 and ephrin-A5 shows their requirement in multiple aspects of retinocollicular mapping. *Neuron* 25:563-574.

Fitzgerald DP, Seaman C, Cooper HM. 2006. Localization of Neogenin protein during morphogenesis in the mouse embryo. *Dev Dyn* 235(6):1720-5.

Fogh J, Orfeo T, Tiso J, Sharkey FE. 1979. Establishment of human colon carcinoma lines in nude mice. *Exp Cell Biol* 47:136-144.

Furness JB. 2000. Types of neurons in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst* 81:87-96.

Gad JM, Keeling SL, Wilks AF, Tan SS, Cooper HM. 1997a. The expression patterns of guidance receptors, DCC and Neogenin, are spatially and temporally distinct throughout mouse embryogenesis. *Dev Biol* 192:258-273.

Gershon MD, Chalazonitis A, Rothman TP. 1993. From neural crest to bowel: development of the enteric nervous system. *J Neurobiol* 24:199-214.

Goodell MA, Jackson KA, Majka SM, Mi T, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK. 2001. Stem cell plasticity in muscle and bone marrow. *Ann N Y Acad Sci* 938:208-218.

Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36:59-74.

Grundy D, Schemann M. 2005. Enteric nervous system. *Curr Opin Gastroenterol* 21:176-182.

Guan KL, Rao Y. 2003. Signalling mechanisms mediating neuronal responses to guidance cues. *Nat Rev Neurosci* 4:941-956.

Hafner C, Meyer S, Langmann T, Schmitz G, Bataille F, Hagen I, Becker B, Roesch A, Rogler G, Landthaler M, Vogt T. 2005. Ephrin-B2 is differentially expressed in the intestinal epithelium in Crohn's disease and contributes to accelerated epithelial wound healing in vitro. *World J Gastroenterol* 11:4024-4031.

Hall A. 1998. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279:509-514.

Hata K, Fujitani M, Yasuda Y, Doya H, Saito T, Yamagishi S, Mueller BK, Yamashita T. 2006. RGMA inhibition promotes axonal growth and recovery after spinal cord injury. *J Cell Biol* 173:47-58.

Holle GE. 1991. Changes in the structure and regeneration mode of the rat small intestinal mucosa following benzalkonium chloride treatment. *Gastroenterology* 101:1264-1273.

Hopker VH, Shewan D, Tessier-Lavigne M, Poo M, Holt C. 1999. Growth-cone attraction to netrin-1 is converted to repulsion by laminin-1. *Nature* 401:69-73.

Howell JC, Lee WH, Morrison P, Zhong J, Yoder MC, Srour EF. 2003. Pluripotent stem cells identified in multiple murine tissues. *Ann N Y Acad Sci* 996:158-173.

Jackson KA, Mi T, Goodell MA. 1999. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:14482-14486.

Jiang Y, Liu MT, Gershon MD. 2003. Netrins and DCC in the guidance of migrating neural crest-derived cells in the developing bowel and pancreas. *Dev Biol* 2003 Jun 15 ;258 (2):364 -84 258:364-384.

Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM. 2002. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol* 30:896-904.

Jobson TM, Billington CK, Hall IP. 1998. Regulation of proliferation of human colonic subepithelial myofibroblasts by mediators important in intestinal inflammation. *J Clin Invest* 101:2650-2657.

Jones PH. 1997. Epithelial stem cells. *Bioessays* 19:683-690.

Kaeffer B. 2002. Mammalian intestinal epithelial cells in primary culture: a mini-review. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 38:123-134.

Kang JS, Yi MJ, Zhang W, Feinleib JL, Cole F, Krauss RS. 2004. Netrins and neogenin promote myotube formation. *J Cell Biol* 167:493-504.

Keeling SL, Gad JM, Cooper HM. 1997. Mouse Neogenin, a DCC-like molecule, has four splice variants and is expressed widely in the adult mouse and during embryogenesis. *Oncogene* 15:691-700.

Keino-Masu K, Masu M, Hinck L, Leonardo ED, Chan SS, Culotti JG, Tessier-Lavigne M. 1996. Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor. *Cell* 87:175-185.

Komano H, Fujiura Y, Kawaguchi M, Matsumoto S, Hashimoto Y, Obana S, Mombaerts P, Tonegawa S, Yamamoto H, Itohara S, . 1995. Homeostatic

regulation of intestinal epithelia by intraepithelial gamma delta T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:6147-6151.

Kruger GM, Mosher JT, Bixby S, Joseph N, Iwashita T, Morrison SJ. 2002. Neural crest stem cells persist in the adult gut but undergo changes in self-renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness. *Neuron* 35:657-669.

Kühnel W. 1999. *Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie*: 10. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

Leeb SN, Vogl D, Falk W, Scholmerich J, Rogler G, Gelbmann CM. 2002. Regulation of migration of human colonic myofibroblasts. *Growth Factors* 20:81-91.

Leedham SJ, Brittan M, McDonald SA, Wright NA. 2005. Intestinal stem cells. *J Cell Mol Med* 9:11-24.

Lippert H. 1995. *Anatomie*: 6. Auflage, Urban&Schwarzenberg Verlag München.

Liu Y, Stein E, Oliver T, Li Y, Brunken WJ, Koch M, Tessier-Lavigne M, Hogan BL. 2004. Novel role for Netrins in regulating epithelial behavior during lung branching morphogenesis. *Curr Biol* 14:897-905.

Livesey FJ. 1999. Netrins and netrin receptors. *Cell Mol Life Sci* 56:62-68.

Marshman E, Booth C, Potten CS. 2002. The intestinal epithelial stem cell. *Bioessays* 24:91-98.

Matsunaga E, Chedotal A. 2004. Repulsive guidance molecule/neogenin: a novel ligand-receptor system playing multiple roles in neural development. *Dev Growth Differ* 46:481-486.

Matsunaga E, Tauszig-Delamasure S, Monnier PP, Mueller BK, Strittmatter SM, Mehlen P, Chedotal A. 2004. RGM and its receptor neogenin regulate neuronal survival. *Nat Cell Biol* 6:749-755.

Mawdsley DJ, Cooper HM, Hogan BM, Cody SH, Lieschke GJ, Heath JK. 2004. The Netrin receptor Neogenin is required for neural tube formation and somitogenesis in zebrafish. *Dev Biol* 269:302-315.

Mazelin L, Bernet A, Bonod-Bidaud C, Pays L, Arnaud S, Gespach C, Bredesen DE, Scoazec JY, Mehlen P. 2004. Netrin-1 controls colorectal tumorigenesis by regulating apoptosis. *Nature* 431:80-84.

- Metzger M, Conrad S, Alvarez-Bolado G, Skutella T, Just L. 2005. Gene expression of the repulsive guidance molecules during development of the mouse intestine. *Dev Dyn* 234:169-175.
- Meyerhardt JA, Look AT, Bigner SH, Fearon ER. 1997. Identification and characterization of neogenin, a DCC-related gene. *Oncogene* 14:1129-1136.
- Mills JC, Gordon JI. 2001. The intestinal stem cell niche: there grows the neighborhood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12334-12336.
- Monnier PP, Sierra A, Macchi P, Deitinghoff L, Andersen JS, Mann M, Flad M, Hornberger MR, Stahl B, Bonhoeffer F, Mueller BK. 2002. RGM is a repulsive guidance molecule for retinal axons. *Nature* 419:392-395.
- Muller B, Stahl B, Bonhoeffer F. 1990. In vitro experiments on axonal guidance and growth-cone collapse. *J Exp Biol* 153:29-46.
- Natarajan D, Marcos-Gutierrez C, Pachnis V, de Graaff E. 2002. Requirement of signalling by receptor tyrosine kinase RET for the directed migration of enteric nervous system progenitor cells during mammalian embryogenesis. *Development* 129:5151-5160.
- Newgreen D, Young HM. 2002a. Enteric nervous system: development and developmental disturbances--part 1. *Pediatr Dev Pathol* 5:224-247.
- Newgreen D, Young HM. 2002b. Enteric nervous system: development and developmental disturbances--part 2. *Pediatr Dev Pathol* 5:329-349.
- Niederkofler V, Salie R, Sigrist M, Arber S. 2004. Repulsive guidance molecule (RGM) gene function is required for neural tube closure but not retinal topography in the mouse visual system. *J Neurosci* 24:808-818.
- Oldekamp J, Kramer N, Alvarez-Bolado G, Skutella T. 2004. Expression pattern of the repulsive guidance molecules RGM A, B and C during mouse development. *Gene Expr Patterns* 4:283-288.
- Park KW, Crouse D, Lee M, Karnik SK, Sorensen LK, Murphy KJ, Kuo CJ, Li DY. 2004. The axonal attractant Netrin-1 is an angiogenic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:16210-16215.
- Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. 1999. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 49:33-64, 1.
- Potten CS. 1998. Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353:821-830.
- Rajagopalan S, Deitinghoff L, Davis D, Conrad S, Skutella T, Chedotal A, Mueller BK, Strittmatter SM. 2004. Neogenin mediates the action of repulsive guidance molecule. *Nat Cell Biol* 6:756-762.

Ramalho-Santos M, Melton DA, McMahon AP. 2000. Hedgehog signals regulate multiple aspects of gastrointestinal development. *Development* 127:2763-2772.

Raper JA, Kapfhammer JP. 1990. The enrichment of a neuronal growth cone collapsing activity from embryonic chick brain. *Neuron* 4:21-29.

Rauch U, Hansgen A, Hagl C, Holland-Cunz S, Schafer KH. 2005. Isolation and cultivation of neuronal precursor cells from the developing human enteric nervous system as a tool for cell therapy in dysganglionosis. *Int J Colorectal Dis* 1-6.

Samad TA, Srinivasan A, Karchewski LA, Jeong SJ, Campagna JA, Ji RR, Fabrizio DA, Zhang Y, Lin HY, Bell E, Woolf CJ. 2004. DRAGON: a member of the repulsive guidance molecule-related family of neuronal- and muscle-expressed membrane proteins is regulated by DRG11 and has neuronal adhesive properties. *J Neurosci* 24:2027-2036.

Schmidtmer J, Engelkamp D. 2004. Isolation and expression pattern of three mouse homologues of chick Rgm. *Gene Expr Patterns* 4:105-110.

Schroder N, Gossler A. 2002. Expression of Notch pathway components in fetal and adult mouse small intestine. *Gene Expr Patterns* 2:247-250.

Schwab JM, Conrad S, Monnier PP, Julien S, Mueller BK, Schluesener HJ. 2005a. Spinal cord injury-induced lesional expression of the repulsive guidance molecule (RGM). *Eur J Neurosci* 21:1569-1576.

Schwab JM, Monnier PP, Schluesener HJ, Conrad S, Beschorner R, Chen L, Meyermann R, Mueller BK. 2005b. Central nervous system injury-induced repulsive guidance molecule expression in the adult human brain. *Arch Neurol* 62:1561-1568.

Seaman C, Anderson R, Emery B, Cooper HM. 2001. Localization of the netrin guidance receptor, DCC, in the developing peripheral and enteric nervous systems. *Mech Dev* 103:173-175.

Shapiro AL, Vinuela E, Maizel JV, Jr. 1967. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun* 28:815-820.

Shepherd IT, Raper JA. 1999. Collapsin-1/semaphorin D is a repellent for chick ganglion of Remak axons. *Dev Biol* 212:42-53.

Shi C, Zhu Y, Su Y, Cheng T. 2006. Stem cells and their applications in skin-cell therapy. *Trends Biotechnol* 24:48-52.

Simon-Assmann P, Lefebvre O, Bellissent-Waydelich A, Olsen J, Orian-Rousseau V, De Arcangelis A. 1998. The laminins: role in intestinal morphogenesis and differentiation. *Ann N Y Acad Sci* 859:46-64.

Song H, Poo M. 2001. The cell biology of neuronal navigation. *Nat Cell Biol* 3:E81-E88.

Srinivasan K, Strickland P, Valdes A, Shin GC, Hinck L. 2003. Netrin-1/neogenin interaction stabilizes multipotent progenitor cap cells during mammary gland morphogenesis. *Dev Cell* 4:371-382.

Stahl B, Muller B, von Boxberg Y, Cox EC, Bonhoeffer F. 1990. Biochemical characterization of a putative axonal guidance molecule of the chick visual system. *Neuron* 5:735-743.

Stein E, Zou Y, Poo M, Tessier-Lavigne M. 2001. Binding of DCC by netrin-1 to mediate axon guidance independent of adenosine A2B receptor activation. *Science* 291:1976-1982.

Thews G, Mutschler E, Vaupel P. 1991. *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen: 4. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.*

Toumi F, Neunlist M, Cassagnau E, Parois S, Laboisie CL, Galmiche JP, Jarry A. 2003. Human submucosal neurones regulate intestinal epithelial cell proliferation: evidence from a novel co-culture model. *Neurogastroenterol Motil* 15:239-242.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:4350-4354.

Tsuji H, Spitz L, Kiely EM, Drake DP, Pierro A. 1999. Management and long-term follow-up of infants with total colonic aganglionosis. *J Pediatr Surg* 34:158-161.

Vielmetter J, Chen XN, Miskevich F, Lane RP, Yamakawa K, Korenberg JR, Dreyer WJ. 1997. Molecular characterization of human neogenin, a DCC-related protein, and the mapping of its gene (NEO1) to chromosomal position 15q22.3-q23. *Genomics* 41:414-421.

Vielmetter J, Kayyem JF, Roman JM, Dreyer WJ. 1994. Neogenin, an avian cell surface protein expressed during terminal neuronal differentiation, is closely related to the human tumor suppressor molecule deleted in colorectal cancer. *J Cell Biol* 127:2009-2020.

Yebra M, Montgomery AM, Diaferia GR, Kaido T, Silletti S, Perez B, Just ML, Hildbrand S, Hurford R, Florkiewicz E, Tessier-Lavigne M, Cirulli V. 2003. Recognition of the neural chemoattractant Netrin-1 by integrins alpha6beta4 and alpha3beta1 regulates epithelial cell adhesion and migration. *Dev Cell* 5:695-707.

Young HM. 2005. Neural stem cell therapy and gastrointestinal biology. *Gastroenterology* 129:2092-2095.

Young HM, Anderson RB, Anderson CR. 2004a. Guidance cues involved in the development of the peripheral autonomic nervous system. *Auton Neurosci* 112:1-14.

Zimmerman L, Parr B, Lendahl U, Cunningham M, McKay R, Gavin B, Mann J, Vassileva G, McMahon A. 1994. Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgene expression to neural stem cells or muscle precursors. *Neuron* 12:11-24.

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb.	Titel	Seite
1	Schema zur Abfolge der Abschnitte des Magen-Darm-Kanals	6
2	Schematische Darstellungen zur Schichtung der Dünndarmwand von Säugern	8
3	Verteilung der Epithelzellsubtypen innerhalb der Krypten-Villus-Struktur im Dünndarm	11
4	Histologische Schnitte des humanen Dickdarms	14
5	Struktur und Interaktion des RGM-Liganden und RGM-Rezeptors Neogenin	18
6	Entwicklungsabhängige RT-PCR Analyse des RGM-Neogenin-Systems	60
7	<i>In Situ</i> Hybridisierung von RGMa und RGMb im Embryonalstadium E14	61
8	<i>In Situ</i> Hybridisierung von RGMa und RGMb während der postnatalen Entwicklung des Dünn- und Dickdarms	63
9	Kombination von RGMa <i>In Situ</i> Hybridisierung und immunhistochemischer Färbung <i>in vivo</i>	64
10	Darstellung der proliferierenden epithelialen Kryptenzellen des Dünndarms und Dickdarms	65
11	RGMa Protein-Analyse im adulten Darm	66
12	Immunhistochemischer Nachweis des RGM-Rezeptors Neogenin im embryonalen Stadium E18 und im adulten Darm	67
13	Immunhistochemische Doppelfärbung zur Identifizierung von Neogenin in β -Tubulin III-positiven enterischen Neuronen (A-C) und GFAP-markierten Gliazellen (D-F) <i>in vivo</i>	67
14	Nachweis der RGMa, RGMb und Neogenin Expression durch eine getrennte RT-PCR Analyse von adultem Darmepithel (A) und der Muskelschicht mit den enterischen Ganglien	68

15	Primäre Neurosphären nach 7 Tagen in Kultur	70
16	Immunhistochemische Doppelfärbung zur Identifizierung von Neogenin in β -Tubulin III-positiven enterischen Neuronen (A-C) und GFAP-markierten Gliazellen <i>in vitro</i>	71
17	RT-PCR Analyse von proliferierenden und ausdifferenzierten Neurosphären	71
18	Immunzytochemische Doppelfärbung von BrdU mit β -Tubulin III und GFAP in ausdifferenzierten Neurosphären	72
19	Nachweis des RGM-Neogenin Systems in Caco-2 Zellen	73
20	Auswachsversuche mit enterischen Ganglienzellen	74
21	Quantitative Auswertung der Proliferations- und Auswachsversuche	75
22	Nach Zugabe von RGMa wird innerhalb von 30 min. ein Kollaps von enterischen Zellausläufern induziert	76
23	Quantitative Auswertung der Proliferations- und Migrationsversuche mit Caco-2 Zellen	77
24	Die Analyse des Neogenin Knockout im Stadium E11,5	78
25	Immunhistochemische Analyse enterischer Ganglien im adulten Neogenin Knockout	80
26	Quantitative Auswertung der Neuronen und Gliazell-Anzahl im Neogenin Knockout im Vergleich zum Wildtyp	80
27	Immunhistochemische Proliferationsanalyse des Epithels im adulten Neogenin Knockout	81
28	Quantitative Auswertung der BrdU-positiven Zellen im adulten Neogenin Knockout	82

7.2 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich gerne die Gelegenheit nutzen, denen zu danken, die zum Gelingen dieser Arbeit ihren Beitrag geleistet haben.

An erster Stelle sei Prof. Dr. Thomas Skutella genannt für die Stellung des Promotionsthemas und das stete Interesse am erfolgreichen Fortgang und Abschluss der Arbeit sowie der sehr hilfreichen Unterstützung bei meinen Bemühungen um eine Post-doc Stelle.

Bei Prof. Dr. Drews möchte ich mich für die fachliche und finanzielle Förderung während der Zeit als Doktorand bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Lothar Just, der mit einem intensiven persönlichen Einsatz meine Arbeit begleitet und mich uneingeschränkt in allen Belangen gefördert hat. Ich weiß diese Unterstützung sehr zu schätzen und bedanke mich für die vorbildliche Betreuung und erfolgreiche Zusammenarbeit.

Des weiteren danke ich allen, die mit mir zusammen täglich viel Zeit im Labor verbracht haben und ohne deren Hilfe die Arbeit sicher nicht erfolgreich hätte abgeschlossen werden können. Stellvertretend für alle Kollegen möchte ich unsere MTAs Sabine Conrad, Christiane Hallwachs und Tina Wiesner nennen.

Nicht vergessen möchte ich natürlich meine ganze Familie, insbesondere meine Eltern, die mich bis heute vorbehaltlos unterstützt haben und natürlich Nicole, die gerade in der Endphase der Promotion häufig verzichten musste und mich dennoch stets ermuntert hat, das Ziel nicht aus den Augen zu verlieren.

7.3 Lebenslauf

Persönliche Daten :

Name: Marco Metzger
geboren am: 01.09.1976 in Mannheim
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

Ausbildung:

08/83 - 07/87	Grundschule Goetheschule, Viernheim
08/87 - 06/96	Gymnasium Albertus-Magnus-Schule, Viernheim
07/96 - 04/97	Grundwehrdienst Fernmelderegiment 920, Kastellaun
10/97 - 02/98	Studium der Biotechnologie Fachhochschule Weihenstephan
03/98 - 09/02	Studium der Biotechnologie Fachhochschule Mannheim Thema der Diplomarbeit: „Charakterisierung des cholinergen muskarinischen Rezeptors in der humanen Keratinozytenzelllinie HaCaT“, durchgeführt am Anatomischen Institut/Abteilung Experimentelle Embryologie der Universität Tübingen
seit 10/02	Promotion Universität Tübingen, Anatomisches Institut/ Abteilung Tissue Engineering Thema der Dissertation: „Einfluss des ‚Repulsiven Guidance Moleküls‘ (RGM) auf die Proliferation und Differenzierung intestinaler Stammzellen“