

Aus der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik
Klinik für Hand-, Plastische, Rekonstruktive und
Verbrennungschirurgie an der Universität Tübingen

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H.-E. Schaller

Die Rolle des Repulsive Guidance Moleküles A während der peripheren Nervenregeneration

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

Vorgelegt von:

Schäufele, Martin Antonio

aus

Ulm

2013

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. H.-E. Schaller

2. Berichterstatter: Professor Dr. P. Mailänder

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1. Einleitung	9
1.1 Anatomischer Aufbau des peripheren Nerven.....	11
1.1.1 Das Neuron	11
1.1.2 Das Perikaryon.....	12
1.1.3 Der Dendrit	13
1.1.4 Das Axon.....	13
1.1.5 Die Gliazellen	14
1.1.6 Das Bindegewebe	16
1.2 Verletzungen peripherer Nerven	18
1.3 Klassifikation nach Seddon:	19
1.3.1 Neurapraxie.....	19
1.3.2 Axonotmesis.....	19
1.3.3 Neurotmesis	19
1.4 Klassifikation nach Sunderland	20
1.5 Nervendegeneration.....	21

1.5.1 Wallersche Degeneration	21
1.5.2 Proximale Degeneration	23
1.6 Regeneration	23
1.7 Neurotrophe Faktoren	25
1.7.1 Neuronale Guidance Molecules des zentralen Nervensystems	27
1.7.2 Neogenin	27
1.7.3 Netrin-1	28
1.7.4 RGMa	28
1.8 Therapie peripherer Nervenverletzungen	30
1.8.1 Nervenkoaptation	31
1.8.2 Autologe Nerventransplantation	32
1.8.3 Andere Therapiemöglichkeiten	32
1.9 Medianus-Maus-Modell	33
1.10 Intention der Studie	34
2. Material und Methoden	35
2.1. Versuchsaufbau	35
2.1.2 Narkose	37
2.1.3 Nervendurchtrennung und Koaptation	37

2.2. Western Blot Analyse	39
2.2.1 Versuchsdurchführung	39
2.3. Transkriptionsanalyse.....	41
2.4. Der Greiftest	42
2.5. Histomorphometrie	44
2.6. Statistische Untersuchung.....	45
3. Ergebnisse	46
3.1. Westen Blot Analyse der zeitlichen RGMa Expression	46
3.2 Real Time RT-PCR	48
3.3 Auswertung der postoperativen Greifkraft	49
3.4 Histomorphometrische Ergebnisse.....	50
3.4.1 Gesamtanzahl myelinisierter Fasern	50
3.4.2 Faserdichte.....	52
3.4.3 Fasergröße.....	54
3.4.3 Nervenquerschnittsfläche	53
3.4.4 Histomorphologische Schnittbilder	56

4. Diskussion	59
4.1 mRNA- und Proteinexpression	60
4.2 Histomorphometrie und Greiftest.....	62
4.3 Abhängiger Rezeptor	65
4.4 Schlussfolgerung.....	66
5. Zusammenfassung	68
6. Literaturverzeichnis	70
Danksagung	77

Abkürzungsverzeichnis

ANCOVA	Analysis of Covariance
ANOVA	Analysis of Variance
BDNF	Brain derived neurotrophic Factor
cDNA	Komplementäre DNA
CSPGs	Chondroitin sulfate proteoglycan
DAPK	Death Associated Protein Kinase
DCC	Deleted in colorectal cancer
FN	Fibronektin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDNF	Glia Cell line derived neurotrophic Factor
HRP	Horseradish peroxidase
IGF 1	Insulin like Growth Factor 1
IGF 2	Insulin like Grothw Factor 2
LN	Laminin
MAG	Myelin assoziiertes Glykoprotein
MBP	Myelin basic Protein
mRNA	Messenger RNA
NGF	Nerve Groth Factor
NT4	Neurotrophin 4
NT5	Neurotrophin 5
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNS	Peripheres Nervensystem
PKC	Proteinkinase C

PVDF	Polyvinylidenfluorid
RGMa	Repulsive Guidance Molecule a
RGM HZ	Heterozygote $RGMa^{+/-}$ Mäuse
RGM HZ NOT NM	Heterozygote $RGMa^{+/-}$ Mäuse ohne Neurotmesis (<i>sham</i> Tiere)
RGM HZ NM	Heterozygote $RGMa^{+/-}$ Mäuse mit Neurotmesis
RIPA	Modified radioimmunoprecipitation
RT-PCR	Realtime Polymerase Chainreaction
SDS	Natriumdodecylsulfat
UNC5b	Uncoordinate 5b
ZNS	Zentrales Nervensystem
WT NOT NM	Wildtyp Mäuse ohne Neurotmesis (<i>sham</i> Tiere)
WT NM	Wildtyp Mäuse mit Neurotmesis

1. Einleitung

Periphere Nervenverletzungen zählen trotz enormer Fortschritte in der Mikrochirurgie und im Bereich des Tissue Engineering zu den komplexesten und schwierigsten Aufgabenfeldern des plastischen Chirurgen. Obwohl das periphere Nervensystem zu einer Regeneration im Stande ist (Matejčík and Penzesová 2006), kommt es nach einer Nervendurchtrennung ohne operative Versorgung nur in einer geringen Anzahl der Fälle zu befriedigenden Langzeitergebnissen (Brushart, Gerber et al. 1998) (Witzel, Rohde et al. 2005). Für den Patienten bedeutet dies eine hohe sozio-ökonomische Beeinträchtigung im Beruf sowie im alltäglichen Leben, da vor allem junge berufstätige Patienten betroffen sind. Die operative Therapie stößt trotz maximalen Einsatzes technischer Hilfsmittel nicht selten an ihre Grenzen. Um das Outcome für den Patienten langfristig zu verbessern gilt es deshalb, die bisherigen Therapiestrategien zu optimieren und gleichzeitig nach neuen Therapiemöglichkeiten zu suchen.

Zum einen sollte die Behandlung peripherer Nervenverletzungen durch Spezialisten erfolgen. Hierfür ist eine Abteilung mit erfahrenen Mikrochirurgen notwendig, die über die dazugehörige Ausstattung (Operationsmikroskop, Mikroinstrumente und entsprechendes Nahtmaterial) verfügt. Bestandteil dieses Teams sind aber auch spezialisierte Physio- und Ergotherapeuten, welche die Patienten während des postoperativen Verlaufs intensiv betreuen (Schaller 2006).

Elementare Grundlage für jede neue Therapiestrategie ist die Erforschung der molekularbiologischen Vorgänge während der peripheren Nervenregeneration. Dieser Vorgang ist ein höchst komplexes Zusammenspiel von interzellulären Mechanismen, wachstumsfördernden und wachstumshemmenden Substanzen sowie ihren dazugehörigen Rezeptoren. Die neu erlangten Erkenntnisse

können komplett neue Therapiemöglichkeiten eröffnen, wie zum Beispiel der Zugabe von wachstumsregulierenden Substanzen in den Bereich der Verletzung.

Des Weiteren können die Ergebnisse auch in die aktuelle Forschung des Tissue Engineerings einfließen. Dies ist eine wichtige Entwicklung, auf der momentan große Hoffnungen ruhen. Hier werden bereits verschiedenste Tubulationsverfahren zur Überbrückung von Nervendefekten genutzt, die mit Zellen und wachstumsregulierenden Substanzen bestückt werden können. (Battiston, Geuna et al. 2005). Das Ziel ist, in naher Zukunft speziell präparierte Leitschienen zu produzieren, die eine präzise Nervenwanderung über längere Strecken ermöglichen. Denn gerade langstreckige Nervendefekte stellen die behandelnden Ärzte vor große Herausforderungen.

Die Intention dieser Arbeit ist es, den Einfluss des Repulsive Guidance Molecule a (RGMa) während der peripheren Nervenregeneration zu untersuchen, um so neue Erkenntnisse über die komplexen Vorgänge während der peripheren Nervenregeneration zu gewinnen. Nur mit diesem Wissen wird es langfristig möglich sein, den Therapieerfolg für den Patienten zu verbessern.

1.1 Anatomischer Aufbau des peripheren Nerven

Der mikroskopische Aufbau peripherer Nerven ist die Basis für die Klassifizierung und Prognosestellung einer Nervenverletzung. Des Weiteren sind die einzelnen Bestandteile eines peripheren Nerven jeweils durch verschiedene Prozesse am Vorgang der Nervenregeneration beteiligt. Zu diesen Bestandteilen des peripheren Nerven zählen die Neurone, die Gliazellen und das umliegende Bindegewebe.

1.1.1 Das Neuron

Neurone sind Zellen, welche durch Stimulierung zu einer Erregungsbildung und Erregungsweiterleitung im Stande sind. Das Prinzip der Erregungsausbreitung beruht auf der Depolarisation eines Membranpotentials über Natrium-Kanäle. Die Depolarisation breitet sich konzentrisch entlang der Zellmembran aus, und ist so im Stande elektrische Impulse von einem Ende der Nervenzelle zum anderen zu leiten. Diese Erregung kann von Sinneszellen oder vorgeschalteten Neuronen aufgenommen werden und an ein Erfolgsorgan oder eine nachgeschaltete Nervenzelle weiter gegeben werden. Die interzelluläre Erregungsweiterleitung erfolgt an den Synapsen (interzelluläre Verbindungsstellen) in der Regel mit chemischen Überträgerstoffen, den Neurotransmittern. Das Neuron kann in den Nervenzellkörper und die Fortsätze, die Dendriten und das Axon, untergliedert werden (Schiebler 2002).

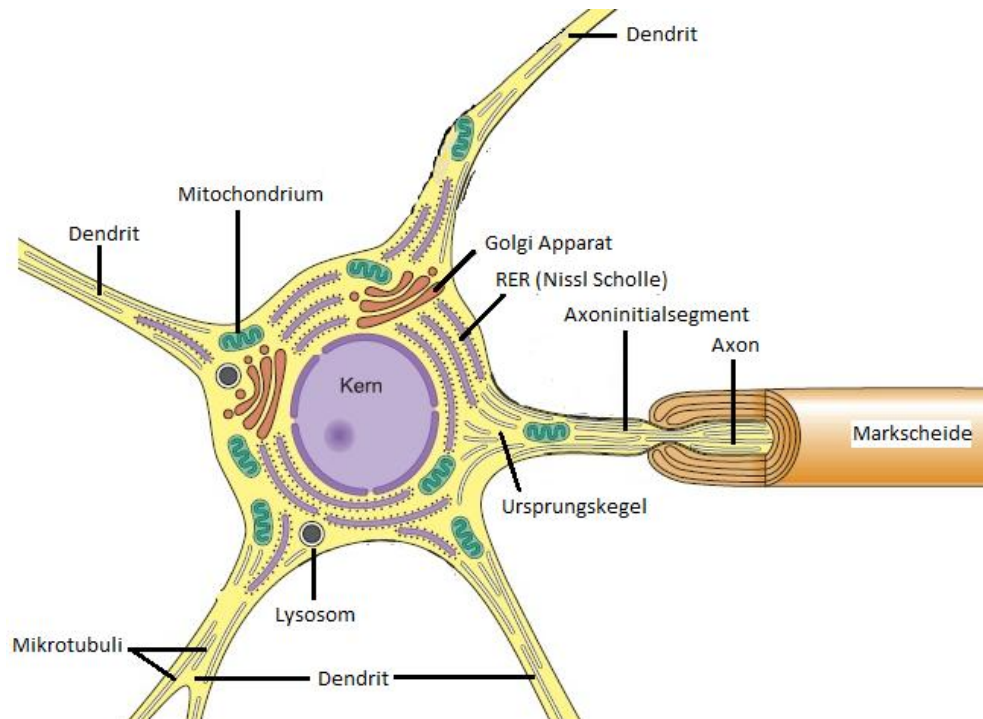


Abb.1) Schematischer Aufbau einer Nervenzelle. In der Mitte liegt das Perikaryon in dem die wichtigsten Stoffwechselforgänge ablaufen. Dazu zählen vor allem der Golgi Apparat und die Nissl Schollen die an der Proteinproduktion beteiligt sind. Der hohe Energiebedarf wird durch eine hohe Anzahl an Mitochondrien gedeckt. Des weiteren sind mehrere Dendriten zu sehen welche für die Erregungsaufnahme zuständig sind. Die Erregungsweiterleitung erfolgt über ein Axon welches hier im Initialsegment angeschnitten ist. Modifiziert nach (Welsch U. 2010)

1.1.2 Das Perikaryon

Das Perikaryon ist der Nervenzellkörper, in dem sich die wichtigsten Stoffwechselforgänge der Zelle abspielen. Zu diesen Vorgängen gehören unter anderem die Herstellung der Neurofilamente (Bestandteile des Zellskeletts) und der Neurotransmitter. Nervenzellen haben im Allgemeinen einen hohen Stoffwechselumsatz. Dies macht sich unter anderem durch einen, aufgrund einer erhöhten Transkriptionsrate, großen zentral liegenden Zellkern bemerkbar. Die Proteinsynthese findet im rauen endoplasmatischen Retikulum statt, welcher in den Nervenzellkörpern häufig durch Neurofilamente mit freien

Ribosomen zusammengefasst ist. Das daraus entstehende Lamellensystem wird als Nissl-Scholle bezeichnet, da es durch einen basischen Farbstoff nach der Nissl Methode dargestellt werden kann. Der Energiebedarf wird durch eine hohe Anzahl an Mitochondrien, welche vor allem für oxidative Energiegewinnung zuständig sind, kompensiert (Schiebler 2002).

1.1.3 Der Dendrit

Die Dendriten sind kurze Fortsätze des Perikaryons, welche für die Erregungsaufnahme zuständig sind. Im Gegensatz zum Axon besitzen Neurone unzählige viele Dendriten. Der elektronische Impuls wird vom Dendrit über das Perikaryon an das Axon weitergeleitet.

1.1.4 Das Axon

Im Gegensatz zu den Dendriten besitzt eine Nervenzelle nur ein Axon. Es entspringt aus dem Perikaryon als Axonhügel, und geht in ein kurzes Initialsegment über. Erst unterhalb dieser Abschnitte beginnt die Myelinscheide. Dem langen Axonstamm folgt am Ende das Telodendron und die Synapse. Hier verzweigt sich meist das Axon und bildet in seinen Ästen sogenannte Endkolben. In diesen Kolben sind die Neurotransmitter in Vesikeln gespeichert und werden bei Bedarf in die Synapse ausgeschüttet. Im Axoplasma sind keine Nissl-Schollen lokalisiert, so dass die Nervenzelle einen aufwendigen Transport zwischen Perikaryon und der Axonperipherie betreiben muss. Dies erfolgt mit Hilfe von Neurofilamenten und Mikrotubuli (Schiebler 2002). Man kann zwischen einem anterograden und retrograden Transport unterscheiden. Anterograd werden Transmittervesikel und andere Proteine über das schnelle Mikrotubuli-System mit einer Geschwindigkeit von ca. 400 mm/Tag transportiert (Hirokawa 1993). Bestandteile des Zytoskelettes werden über das langsame Mikrotubuli-unabhängige System transportiert. Der retrograde Transport dient vor allem zur Beseitigung von unbrauchbaren Membranbestandteilen oder auch

zur Aufnahme neurotropher Substanzen (Terenghi 1999). Dies erfolgt mit einer Geschwindigkeit von ca. 200mm/Tag (Hirokawa 1993).

1.1.5 Die Gliazellen

Glia-Zellen gehören zu einer weiteren Zellart die am Aufbau des peripheren Nerven beteiligt sind. Zu ihren Aufgaben gehören unter anderem die elektrische Isolierung der Axone, mechanischer Schutz, Narbenbildung und die Produktion von neuronalen Guidance Molekülen, die im Rahmen dieser Dissertationsschrift noch näher behandelt werden. Zu den Gliazellen des peripheren Nervensystems zählen die Schwann- und die Mantelzellen. Während die Mantelzellen sich um die Perikaryen der Spinalganglienzellen lagern, sind die Schwannzellen im Bereich der Axone des peripheren Nerven zu finden. Die Schwannzellen liegen eng nebeneinander um das Axon und werden von einer Basalmembran umfasst. Dieses Gebilde aus Axon, Schwannzelle und Basalmembran wird als Nervenfasern bezeichnet. Je nach Schwannzellenanordnung kann man zwischen marklosen und markhaltigen Nervenfasern unterscheiden. Bei den peripheren marklosen Fasern werden die Axone nur vom Zytoplasma der Schwannzellen umgeben. Um die peripheren markhaltigen Nerven wickeln sie sich hingegen mehrfach herum und bilden eine Myelinscheide (Quarles 2002). Diese besteht aus eingelagerten Proteinen, wie zum Beispiel dem Myelin-basic-Protein (MAP) oder dem Myelin assoziierten Glykoprotein (MAG), sowie Lipiden, wie zum Beispiel Cholesterin oder Phospholipiden (Quarles 2002) (Goodrum, Earnhardt et al. 1994). Zwischen den einzelnen Schwannzellen entstehen Kontinuitätsunterbrechungen, die sogenannten Ranvierschen Schnürringe. An diesen Stellen ist das Axon nicht von der Myelinscheide umgeben, sondern nur von der Basalmembran. Der Abstand zwischen zwei Ranvierschen Schnürringen wird als Internodium bezeichnet. Im Bereich des Ranvierschen Schnürrings besitzt das Axon im Gegensatz zum isolierten Internodium eine Vielzahl von Natrium-Kanälen, so dass es im Falle einer Erregungsausbreitung zu einer sprunghaften Ausbreitung, die sogenannte saltatorische Erregungsleitung, zwischen zwei

Schnürringen kommt. Somit sind um ein vielfaches höhere Leitungsgeschwindigkeiten möglich (Scherer and Arroyo 2002). Die Leitungsgeschwindigkeit ist unter anderem von der Länge der Internodien, der Dicke der Myelinscheiden und der Dicke der Nervenfasern abhängig.

Die Schwannzellen können zwei unterschiedliche Funktionen einnehmen. In gesunden intakten Nerven sind sie vor allem an der Myelinbildung beteiligt. Nach einer Nervenverletzung können sie in die nicht myelinbildende Funktion übergehen. In diesem Fall bilden sie vermehrt neurotrophe Faktoren und schaffen so günstige Bedingungen für die Nervenregeneration (Madduri and Gander 2010). Die genauen Abläufe der nicht myelinbildenden Funktion werden im Kapitel 1.3.1 Wallersche Degeneration beschrieben.

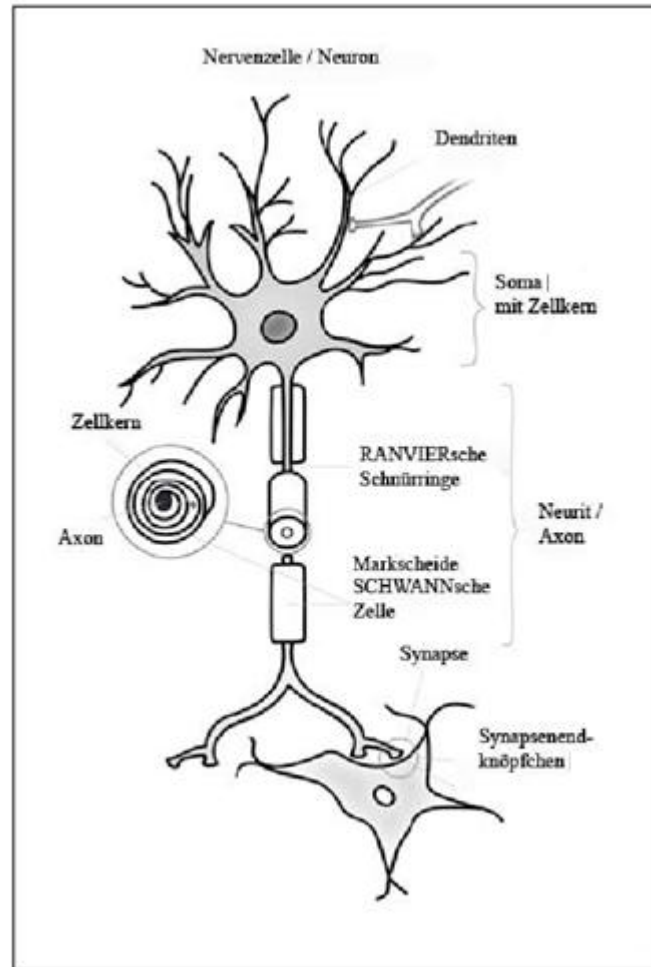


Abb. 2) Schematische Darstellung eines peripheren Nervs im Längs- und Querschnitt. Oben sind mehrere Dendrite zu erkennen die in das Perikaryon übergehen. Aus dem Perikaryon entspringt das Axon, welches von mehreren Schwannzellen umlagert wird. Zwischen zwei Schwannzellen entsteht eine Einkerbung, der sogenannte Ranvier'sche Schnürring. Das Axon endet mit den Endkolben an den Synapsen. Anschließend folgt das Endorgan oder ein weiteres Neuron. (Kreyenborg 2008)

1.1.6 Das Bindegewebe

Der periphere Nerv kann aufgrund seines umliegenden Bindegewebes in mehrere mikroskopische Schichten unterteilt werden. Die kleinste Einheit des

Nervs ist die Nervenfasern. Sie besteht lediglich aus einem Axon, den umhüllenden Schwannzellen und der darüber liegenden Basalmembran. Die Basalmembran wird durch die Basallamina der Schwannzellen und durch Retikulinfasern gebildet (Pina-Oviedo and Ortiz-Hidalgo 2008) (Scherer and Arroyo 2002).

Zwischen mehreren Nervenfasern liegt lockeres Bindegewebe mit Kapillaren, Mastzellen und Histozyten. Dieser Teil wird als Endoneurium bezeichnet (Pina-Oviedo and Ortiz-Hidalgo 2008).

Das Perineurium besteht aus straffem Bindegewebe welches bis zu 100 Nervenfasern mit dem dazugehörigen Endoneurium umspannt und zu einem Nervenfaszikel zusammenfasst. Auf der Innenseite des Perineuriums liegt eine Schicht platter epithelartiger Perineuralzellen. Sie bilden eine Barriere für hydrophile Substanzen und setzen sich im zentralen Nervensystem als Duraneurothel fort (Pina-Oviedo and Ortiz-Hidalgo 2008). Die Einheit der einzelnen Faszikel ist jedoch nicht über den gesamten Verlauf des Nerven gleich. So gibt es einen regen Austausch zwischen Fasergruppen einzelner Faszikel. Dieser Vorgang scheint jedoch willkürlich zu sein und dient vor allem der Kompensation mechanischer Kräfte auf den Nerv (Berger 2002). So lässt sich ein exaktes Querschnittsbild eines Nervs nur im Verlauf von ca. 6 mm bestimmen (Berger 2002).

Alle Nervenfaserbündel werden schließlich vom Epineurium umfasst. Es besteht aus lockerem bis straffem Bindegewebe und bettet den Nerven in die Umgebung ein. Aufgrund der Eigenelastizität des lockeren Bindegewebes kommt es nach Durchtrennung eines Nerven häufig zu einem Zurückziehen der Nervenfasern. So können große Lücken zwischen den beiden Teilen entstehen (Pina-Oviedo and Ortiz-Hidalgo 2008) (Berger 2002).

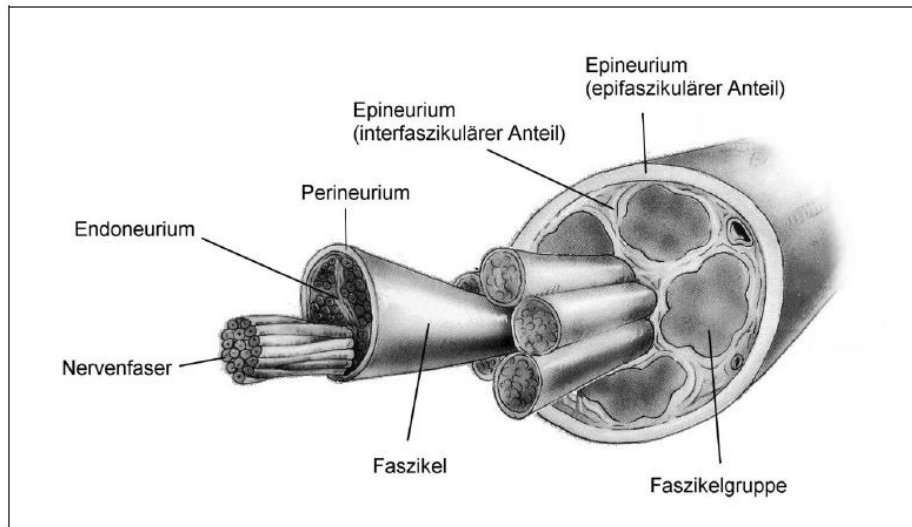


Abb. 3) Darstellung des Aufbaus eines peripheren Nerven. Die einzelnen Nervenfasern werden vom Endoneurium umgeben. Das Perineurium fasst mehrere 100 Fasern zu einem Nervenfaszikel zusammen. Der gesamte Nerv wird vom Epineurium umhüllt, der den Nerv in die Umgebung einbettet. (Fojuth 2011)

1.2 Verletzungen peripherer Nerven

Nach einer Verletzung mit Durchtrennung eines peripheren Nerven, bzw. Axons, kommt es immer zur Denervierung des Endorganes. Je nach Funktion kann es zu Sensibilitätsstörungen, autonomen Funktionsstörungen oder zu motorischen Ausfällen mit anschließender Muskelatrophie kommen (Allodi, Udina et al. 2012). Die Einteilung peripherer Nervenverletzungen erfolgt anhand der Kontinuität der einzelnen mikroskopischen Schichten, und wird nach Seddon oder Sunderland klassifiziert. Die Klassifikation nach Sunderland ist genauer und erlaubt eine Prognosestellung sowie eine Therapieempfehlung.

1.3 Klassifikation nach Seddon

1.3.1 Neurapraxie

Bei der Neurapraxie kommt es zu keiner Durchtrennung von Endo-, Peri- oder Epineurium. Der Verletzungsvorgang ist vergleichbar mit dem einer Quetschung. Zwar kommt es zu Beginn zu einem Funktionsverlust, da jedoch die Kontinuität im eigentlichen Sinne nicht unterbrochen ist, tritt in den meisten Fällen keine Degeneration der Nerven ein. Die Prognose ist für diese Verletzung sehr gut und eine schnelle vollständige Funktionsfähigkeit ist in fast allen Fällen zu erwarten (Burnett and Zager 2004).

1.3.2 Axonotmesis

Bei der Axonotmesis kommt es zu einer traumatischen Durchtrennung des Axons, jedoch ohne Verletzung von Epi- oder Perineurium. Distal der Läsion kommt es zu einer Wallerschen Degeneration. Die intakte Kontinuität der Leitstrukturen lässt jedoch häufig eine Reinnervation der Endorgane zu (Burnett and Zager 2004).

1.3.3 Neurotmesis

Eine vollständige Durchtrennung aller Schichten wird als Neurotmesis bezeichnet. Anfangs unterscheidet sich die Klinik nicht von der einer Axonotmesis. Aufgrund der Zerstörung des mesenchymalen Gewebes ist eine Regeneration jedoch nur durch die operative Therapie möglich (Burnett and Zager 2004). Ansonsten ist die Prognose sehr schlecht.

1.4 Klassifikation nach Sunderland

Die Klassifikation nach Sunderland erfolgt unter genauester Betrachtung der mikroskopischen Schichten des Nervs. So ist die Sunderland I Verletzung mit der Neurapraxie nach Seddon gleichzusetzen. Die Axonotmesis wird bei Sunderland hingegen genauer differenziert:

- nur das Axon ist unterbrochen
- das Axon mitsamt dem Endoneurium ist unterbrochen
- das Axon, das Endoneurium und das Epineurium sind unterbrochen

Der komplette Kontinuitätsverlust wird als Sunderland V klassifiziert.

Sunderland	Seddon	Verletzung	Spontane Regeneration
I	Neurapraxie	Kontinuität der Axone erhalten	Sehr gut
II	Axonotmesis	Axonolyse, Endoneurium intakt	Gut
III	Axonotmesis	Axonolyse, Endoneurium zerstört, Perineurium intakt	Regeneration möglich
IV	Axonotmesis	Nur Epineurium intakt	Schlecht
V	Neurotmesis	Kontinuität verloren	Keine

Tabelle 1) Sunderland und Seddon Klassifikation (Sunderland 1951)

1.5 Nervendegeneration

Nach einer Nervenverletzung kommt es zunächst zu einer Degeneration der vorhandenen Strukturen des Nervs. Erst nach zahlreichen Abbauvorgängen und Funktionsänderungen entsteht ein für die zielgerichtete Auswanderung geeignetes Milieu. Die Umbauvorgänge proximal und distal der Läsion laufen grundsätzlich verschieden ab und werden hier im einzelnen erläutert.

1.5.1 Die Wallersche Degeneration

Die Wallersche Degeneration, auch als anterograde Degeneration bezeichnet, findet im distalen abgetrennten Teil des Nerven statt. Innerhalb der ersten Stunden nach Verletzung beginnt der histologische Umbau der Schwannzellen und die Fragmentierung des Axons. Es zeigt sich dass ein zügiger Myelinabbau der wichtigste Faktor für die Nervenregeneration ist, da myelinisierte Schwannzellen als potente Hemmer des peripheren Nervenwachstums bekannt sind (Barrette, Hebert et al. 2008).

Die Unterbrechung des axonalen Transports ist der Auslöser der axonalen Degeneration. Es kommt zu einer intrazellulären Ca^{2+} Erhöhung die Proteasen, wie zum Beispiel Calpain, aktiviert (Dubovy 2011). Diese sind an der Auflösung der Mikrotubuli- und Neurofilamentordnung beteiligt und führen zu einer ödematösen Schwellung und Fragmentierung des Axons (Dubovy 2011).

Die Schwannzellen beginnen ihre Umbauvorgänge nach Kontaktverlust mit dem degenerierenden Axon. So ändert sich ihre Funktion grundlegend von einer differenzierten myelinisierten Zelle zu einer undifferenzierten wachstumsfördernden Zelle. Zunächst fragmentieren sie ihr Myelin und lagern die unbrauchbaren Bestandteile in sogenannten Oviden ab (Stoll, Griffin et al. 1989). Der weitere Abbau findet mit Hilfe von einwandernden Makrophagen

statt. Innerhalb der ersten 24 Stunden kommt es außerdem zu einer Hypertrophie und Proliferation der Schwannzellen (Burnett and Zager 2004). Diese reihen sich in Säulen an und bilden innerhalb der Basalmembran die so genannten Büngner-Bänder (Fawcett and Keynes 1990). Die Bänder sind wichtige Leitstrukturen für die gezielte Axoneinwanderung, da sie als Hauptquelle neurotropher Faktoren gelten (Gordon 2010). Auf molekularer Ebene regulieren die Schwannzellen die Produktion für myelinassoziierte Proteine, wie beispielsweise für das Myelin-Basic-Protein, stark herunter, da diese hemmend auf das Axonwachstum wirken. Statt dessen beginnen die Zellen mit der Bildung von neurotrophen Stoffen wie dem Nerve Growth Factor (NGF), Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) und dem Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) (Stoll and Muller 1999). Außerdem bilden die Schwannzellen vermehrt Zytokine und Chemokine (Dubovy 2011).

Ab dem zweiten Tag beginnt die Einwanderung der Makrophagen aus dem Blutkreislauf und findet ihren Höhepunkt am vierzehnten Tag (Dubovy 2011). Die Makrophagen werden vor allem durch die Myelinfragmente sowie die Zytokine und Chemokine der Schwannzellen chemotaktisch gelockt. Die Überquerung der Blut-Nervenschranke wird durch die Histamin- und Serotoninausschüttung der endoneurialen Mastzellen erleichtert (Naidu 2009). Nach Erreichen des Wirkungsortes beginnen sie mit der Resorption der Ovoide sowie des bereits fragmentierten Axons (Burnett and Zager 2004). Eine weitere wichtige Aufgabe ist die Sezernierung mitogener Faktoren. Diese Substanzen fördern die Proliferation der Schwannzellen und die Bildung der Büngner-Bänder (Perry and Brown 1992).

Nach ca. 5-8 Wochen ist die Resorption des Axons vollendet, so dass nur noch eine leere Schwannzell-Hülle übrig bleibt. Ohne ein einwanderndes Axon kommt es nach 3-4 Monaten zu einem Schrumpfen der Hülle und einem bindegewebigen Umbau des Endoneuriums. Falls die Hülle im Verlauf kein einwachsendes Axon empfängt, kommt es schlussendlich zu einer vollständigen Obliteration (Burnett and Zager 2004).

1.5.2 Proximale Degeneration

Auch proximal der Läsion kommt es zu Umbauvorgängen und Veränderungen. Das Ausmaß ist abhängig von der Schwere der Verletzung und der Entfernung zum Perikaryon. So kann eine schwere Verletzung oder eine Verletzung in Nähe des Nervenzellkörpers zu einem kompletten Zelluntergang führen. In Studien konnte gezeigt werden, dass zwischen 20 und 40 Prozent der Nervenzellen nach einer peripheren Nervenverletzung absterben (Terenghi 1999). In der unmittelbaren Nähe der Verletzung kommt es zu einer Degeneration der Schwannzellen sowie Schrumpfung des Axons meist bis zum nächstgelegenen Ranvierschen Schnürring, von wo später die erneute Axonregeneration ausgeht (Schaller 1990) (Morris, Hudson et al. 1972) (Morris, Hudson et al. 1972) (Wong and Mattox 1991). Im Perikaryon kommt es ebenfalls zu typischen Veränderungen. Innerhalb der ersten sechs Stunden verlagert sich der geschwollene Zellkern vom Zentrum zum Rand der Zelle (Burnett and Zager 2004). Des Weiteren kommt es zu einem Zerfall der Nissl-Schollen, was als Chromatolyse bezeichnet wird (Burnett and Zager 2004).

1.6 Regeneration

Der Zeitpunkt der Regeneration ist abhängig vom Grad der Verletzung. So kommt es bei leichten Verletzungen zu einer schnelleren Regeneration als bei schweren. Die Schritte der Regeneration laufen teilweise zeitgleich mit denen der Degeneration ab, so dass beide Prozesse Hand in Hand gehen.

Im Perikaryon werden die Schritte der Degeneration zunächst rückgängig gemacht. Der Zellkern rückt zurück in die Mitte der Zelle und vergrößert sich als Zeichen der wieder beginnenden Proteinsynthese. Die dazu notwendigen Nissl-Schollen werden neu angelagert und die Chromatolyse gestoppt (Burnett and

Zager 2004). Innerhalb weniger Stunden beginnt die Regeneration des Axons aus dem letzten Ranvierschen Schnürring (Friede and Bischhausen 1980).

Die zielgerichtete Regeneration des Axons ist von mindestens vier verschiedenen Mechanismen abhängig: Anziehung durch Zellkontakt und chemoattraktive Substanzen, sowie Wachstumshemmung durch Zellkontakt und chemorepulsive Substanzen (Tessier-Lavigne and Goodman 1996). Der proximale Axonstumpf erweitert sich durch eine vermehrte Einlagerung von Molekülen und zytoplasmatischen Materialien zu einem Wachstumskegel (Zochodne 2012). An der Spitze des wachsenden Axons stülpen sich mehrere kleine Fortsätze aus, welche für das gezielte Wachstum und die Erkennung von Zielstrukturen zuständig sind. Die Fortsätze sind reichlich mit Rezeptoren für chemoattraktive und chemorepulsive Signale sowie mit Adhäsionsmolekülen ausgestattet (McCormick and Leipzig 2012) (Hong and Nishiyama 2010). Zu den chemotaktischen Signalen gehören unter anderem Semaphorine, Ephrine, Neupiline, Plexine, Nerve Growth Factor (NGF), Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF) und Neurotrophin-4 (NT4) (Patodia and Raivich 2012) (Bosse 2012). In den regenerierenden Nervenzellen wird die Transkription für bestimmte Adhäsionsmoleküle stark hoch reguliert. Zu ihnen gehören Integrine, Laminin, Fibronectin und Paxillin. Diese Moleküle dienen teilweise auch als Rezeptoren für die chemotaktischen Signale und sind vor allem am regen Zell-Zell Kontakt zwischen Neuron und Schwannzellen beteiligt (Patodia and Raivich 2012). Mit einer Geschwindigkeit von 1 mm/Tag wächst der Fortsatz entlang der leeren Schwannzell Hülle und bildet nach Erreichen des Endorgans eine neue Synapse (Buchthal and Kuhl 1979; Giger, Hollis et al. 2010).

1.7 Neurotrophe Faktoren

Wie bereits beschrieben, ist das Auswandern des geschädigten Axons kein willkürlicher Vorgang. Ein komplexes System von wachstumshemmenden und wachstumsfördernden Substanzen versucht eine möglichst exakte Regeneration zu erzielen. Alle Substanzen die am Wachstum, an der Differenzierung und am Erhalt von Nervenzellen beteiligt sind, werden unter dem Sammelbegriff „neurotrophe Faktoren“ zusammengefasst (Apfel 2000). Die neurotrophen Faktoren werden von mehreren Zellen sezerniert oder präsentiert, wie beispielsweise durch das Endorgan, Schwannzellen, Makrophagen, der extrazellulären Matrix und der Nervenzelle selbst (Burnett and Zager 2004). Diese Substanzen können aufgrund ihres Aufbaus oder Wirkung in mehrere Gruppen unterteilt werden. So gelten beispielsweise die Gruppen der Neurotrophine (mit den Substanzen NGF, BDNF, NT-4 und NT-5), die GDNF-Familie, neuropoetische Zytokine und Faktoren aus der Insulinfamilie (IGF-I, IGF-II) zu den wachstumsfördernden Substanzen (Terenghi 1999) (Boyd and Gordon 2003) (English 2003). Extrazelluläre Matrixmoleküle, wie das Fibronectin und Laminin fördern das Axonwachstum durch direkten Zellkontakt (McCormick and Leipzig 2012). Des Weiteren haben diese neurotrophen Substanzen eine wichtige neuroprotektive Funktion. Nach einem Trauma im zentralen Nervensystem schützen beispielsweise BDNF (Koeberle and Ball 2002), IGF-1 (Kermer, Klocker et al. 2000) oder GDNF (Koeberle and Ball 2002) die Nervenzellen vor der Apoptose.

Zur Gruppe der hemmenden Substanzen gehören unter anderem das myelinassoziierte Glykoprotein (MAG) mit seinem Rezeptor Nogo 66, Ephrine, Semaphorine und Slits (McCormick and Leipzig 2012) (Gordon, Chan et al. 2009) (Wong, Henley et al. 2002). Des Weiteren können die Schwannzellen ein Proteoglykan (CSPGs) präsentieren welches das Axonwachstum hemmt (Kuffler, Sosa et al. 2009).

Während der embryonalen Entwicklung des zentralen Nervensystems spielen die neuronalen Guidance Moleküle, wie beispielsweise RGMa (Repulsive Guidance Molekül) oder Neogenin, eine wichtige Rolle für die axonale Auswanderung. Sie bilden eine weitere Gruppe von neurotrophen Substanzen, deren Wirkung im peripheren Nervensystem zum jetzigen Zeitpunkt kaum erforscht ist.

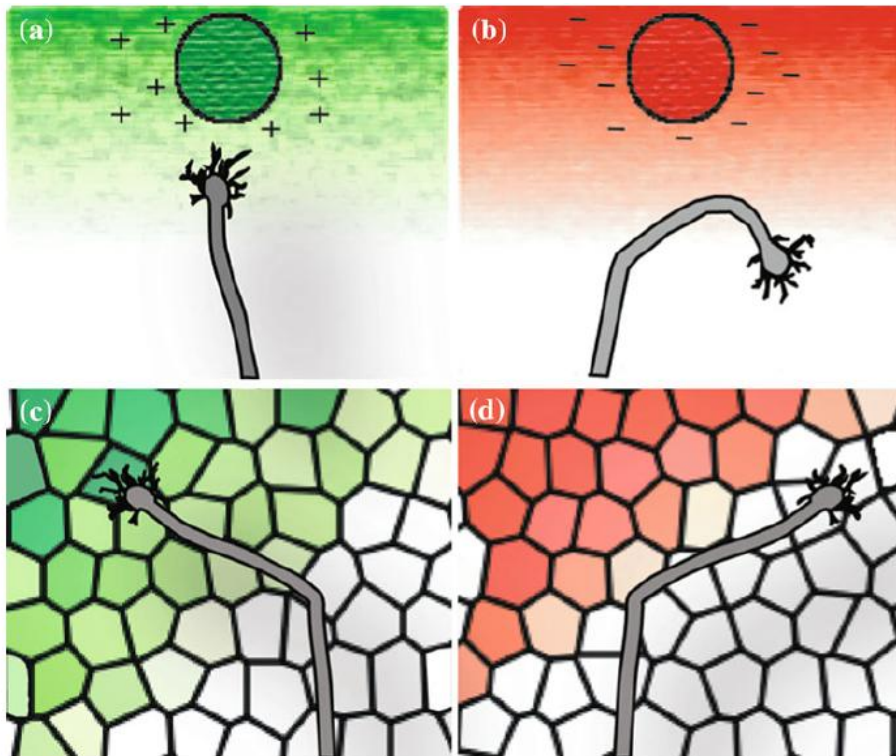


Abb. 4) Mechanismen der Nervenwanderung. (a) Axone werden durch chemoattraktive Substanzen wie Neurotrophine oder Netrine angezogen. (b) Axone werden von chemorepulsiven Substanzen wie Semaphorinen, Slits abgestoßen. (c) Extrazelluläre Matrixmoleküle wie Kollagen, Laminin und Fibronectin ziehen Axone über direkten Kontakt an. (d) Extrazelluläre Matrixmoleküle wie CSPGs stoßen durch den direkten Kontakt das wachsende Axon ab. (McCormick and Leipzig 2012)

1.7.1 Neuronale Guidance Moleküle des zentralen Nervensystems

Die Rolle der neuronalen Guidance Moleküle wurde bisher vor allem im zentralen Nervensystem untersucht. Interessant ist ihre Wirkung vor allem während der embryologischen Entwicklung des Gehirns und nach einer Verletzung des zentralen Nervensystems, da diese Phasen durch eine hohe Plastizität und eine vermehrte Nervenwanderung gekennzeichnet sind. Mit Hilfe der Ausschaltung bestimmter Gene konnte die verminderte Wirkung der Guidance Moleküle an der zentralen Nervenaustrittsstelle erforscht werden. Eine der untersuchten Substanzen ist der Rezeptor Neogenin mit seinen dazugehörigen Liganden RGMA (repulsive guidance molecule) und Netrin-1 (Fitzgerald, Bradford et al. 2007).

1.7.2 Neogenin

Neogenin ist ein multifunktionseller Rezeptor für RGMA und Netrin-1. In der embryonalen Phase des zentralen Nervensystems spielt er eine wichtige Rolle für die Entwicklung des Nervensystems, da er unter anderem die Axonbahnung, Nervenwanderung und Neuronendifferenzierung reguliert (Fitzgerald, Bradford et al. 2007). Neogenin gehört außerdem zur Gruppe der „Dependent Receptors“ (abhängige Rezeptoren), welche die besondere Eigenschaft haben, bei Abwesenheit ihrer Liganden, lytische Prozesse zu aktivieren und dadurch die Zelle zur Apoptose zu führen (Yamashita, Mueller et al. 2007). Diese Prozesse werden im Fall von Neogenin nur durch die Abwesenheit von RGMA, und nicht von Netrin-1, induziert (Goldschneider and Mehlen 2010) (Matsunaga and Chedotal 2004). Auch im Bindungsverhalten zwischen RGMA-Neogenin und Netrin-Neogenin zeigt RGMA eine 10-fach höhere Affinität zu Neogenin (Yamashita, Mueller et al. 2007) (Wilson and Key 2007). Neuere Arbeiten konnten zeigen, dass im ZNS des Krallenfrosches eine Interaktion von Neogenin mit Netrin-1 das Axonwachstum fördert, wohingegen eine Interaktion mit RGMA eher zu einer Hemmung führt. (Wilson and Key 2006).

1.7.3 Netrin-1

Netrin-1 ist ein Protein welches als Ligand an verschiedenen Rezeptoren wie zum Beispiel an UNC5b- (Uncoordinated 5b), DCC- (Deleted in colorectal cancer) und Neogenin-Rezeptoren binden kann. Je nach Rezeptor kann die Antwort zwischen Chemoattraktion und Chemorepulsion des Axons variieren. (McCormick and Leipzig 2012). Während der embryonalen Entwicklung des zentralen Nervensystems ist Netrin-1 für die zielgerichtete Auswanderung der Axone, vor allem aber für die Nervenverbindungen zwischen den beiden Gehirnhälften, zuständig (Chilton 2006). Bei Fehlen von Netrin-1 kommt es beispielsweise zu Störungen der Entwicklung des Corpus Callosum, der Kommissurenfasern oder auch des Hippocampus (Serafini, Colamarino et al. 1996).

1.7.4 RGMa

Das Repulsive Guidance Molecule a ist ein membrangebundenes Glykoprotein mit hemmenden Eigenschaften auf das Axonwachstum (Yamashita, Mueller et al. 2007). Es gehört zur Familie der RGM, wovon noch zwei weitere Subtypen bekannt sind. Während die Wirkung von RGMb im ZNS noch unbekannt ist, wird das dritte Molekül, RGMc, vor allem in Muskelzellen und im Myokard exprimiert (Oldekamp, Kramer et al. 2004). Das Gen für RGMa liegt auf dem 15. Chromosom und ist in der GenBank, No. AY128507, des National Center for Biotechnology Information zu finden (Schwab, Conrad et al. 2005).

Über die Expression und Lokalisation von RGMa im peripheren Nervensystem gibt es im Gegensatz zum ZNS aktuell keine Daten.

Im reifen ZNS wird RGMa nur vereinzelt in den Perikaria der Nervenzellen, der glatten Muskelzellen und des Plexus Choroideus exprimiert (Schwab, Conrad et al. 2005). Des Weiteren ist RGMa vermehrt neben dem Myelin-Basic-Protein der Oligodendrozyten anzufinden, wo es an den Kontaktstellen zwischen der Myelinscheide und den Axonen interagiert. Durch seine chemorepulsiven

Eigenschaften wird das Axon so in seiner Lage konserviert und die Neubildung von Kollateralen verhindert (Schwab, Conrad et al. 2005).

In der embryonalen Entwicklungsphase des ZNS führt RGMA im retinotectalen System von Hühnerembryos zu einem Kollaps der Wachstumskegel (Stahl, Muller et al. 1990). Die Hemmung des Axonwachstums erfolgt über die Aktivierung der kleinen GTPase RhoA und der nachfolgenden Kaskade Rho Kinase und der Proteinkinase C. Diese Aktivierung führt letztendlich zu einer Neustrukturierung des Zytoskelettes. Der exakte intrazelluläre Aktivierungsweg konnte für RGMA im Zusammenspiel mit Neogenin noch nicht geklärt werden (Conrad, Genth et al. 2007).

Des Weiteren gibt es Studien über die Rolle von RGMA bei Verletzung des zentralen Nervensystems.

Nach einem Trauma des zentralen Nervensystems kommt es typischerweise zu einem Heilungsvorgang bei dem zunächst eine Trennung von gesundem und verletztem Gewebe vollzogen wird. Die strikte Trennung verhindert ein Fortschreiten der Verletzung und minimiert das Ausmaß sekundärer Schäden (Schwab, Monnier et al. 2005). Dies geschieht durch Einwanderung verschiedenster Zelltypen, vor allem aber durch Gliazellen, die eine mechanische und molekulare Barriere erschaffen (Fawcett and Asher 1999). Wichtiger Bestandteil der molekularen Barriere ist das RGMA. Es zeigt sich, dass nach einer Schädigung des Rückenmarks bereits am ersten Tag ein Maximum von RGMA immunopositiven Zellen erreicht wird, während es bei einer Schädigung des Gehirns bis zu 2,5 Tage nach Schädigung dauert. Die erhöhten RGMA positiven Zellen bleiben über Monate bestehen und akkumulieren im Bereich der Glianarbe. Zu den RGMA immunopositiven Zellen zählen unter anderem Neurone, Fibroblasten, Makrophagen und reaktive Astrozyten. Diese mechanische und molekulare Barriere wirkt sich im Verlauf negativ auf die zentrale Nervenregeneration aus, da mit Hilfe von potenten Wachstumshemmern wie RGMA eine neue Nervenwanderung durch das

verletzte Gewebe verhindert wird (Schwab, Conrad et al. 2005) (Schwab and Bartholdi 1996) (Schwab, Monnier et al. 2005).

Diese Ergebnisse wurden durch die Forschergruppe um Hata und Fujitani weiter untersucht. Sie konnten an Tieren mit Rückenmarksverletzungen im Western Blot eine erhöhte RGMA Protein Expression nach 7 Tagen nachweisen. Des Weiteren führten sie über intrathekale Katheter Anti-RGMA Antikörper in die Nähe der Rückenmarksverletzungen zu. Erstaunlicherweise zeigte sich nach dieser Behandlung eine verstärkte lokomotorische Regeneration an den Tieren. Zudem beobachteten sie ein massives Nervenfasernwachstum im Gegensatz zu den nicht behandelten Tieren, welche kaum Aktivität aufzeigten (Hata, Fujitani et al. 2006).

1.8 Therapie peripherer Nervenverletzungen

Die Verletzung eines peripheren Nervs birgt zwar keine Lebensgefahr, kann aber im weiteren Verlauf zu erheblichen Einschränkungen im Alltags- und Berufsleben führen, so dass je nach Verletzung und klinischem Erscheinungsbild eine operative Revision immer diskutiert werden sollte.

Aufgrund der Klinik kann zunächst zwischen einer kompletten und inkompletten Läsion des Nervs unterschieden werden. Bei der inkompletten Läsion ist distal der Verletzung noch eine Residualfunktion der zu innervierenden Endorgane erhalten, welche auch elektrophysiologisch nachweisbar ist. In solchen Fällen sollte primär eher konservativ behandelt werden (Holland 2011). Bei ausbleibender Regeneration ist jedoch frühzeitig die operative Revision zu planen.

Komplette Nervenläsionen führen in der Regel zu einem vollständigen Verlust der Funktion des Endorgans. Geht man von einer neurapraxischen Ursache aus, sollte zunächst konservativ behandelt werden und der Verlauf

elektrophysiologisch und klinisch kontrolliert werden. Bestandteil der klinischen Verlaufsuntersuchung ist das Hoffmann-Tinel Zeichen. Hierbei wird durch Beklopfen eines geschädigten peripheren Nervs ein elektrisierendes Gefühl am Läsionsort ausgelöst. Die Lokalisation der Missempfindungen verschiebt sich mit den auswandernden Nervenkonni, so dass anhand der Schmerzlokalisierung der Ort der aktuellen Nervenwanderung ermittelt werden kann. Im günstigsten Falle wandert dieser Schmerzpunkt nach distal in Richtung des Endorganes. Falls nach 3-6 Monaten keine Regeneration eintreten sollte, wird eine operative Revision im Sinne einer Neurolyse angestrebt. Falls der intraoperative Befund eine höhergradige Verletzung zeigt, muss eine Nerven transplantation in Erwägung gezogen werden (Schaller 2006) (Holland 2011). Alle anderen Verletzungstypen, wie die Axonotmesis und Neurotmesis, sollten initial operativ behandelt werden.

1.8.1 Nervenkoaptation

Bei jeder Kontinuitätsunterbrechung eines Nervs sollte eine primäre mikrochirurgische Koaptation erfolgen. Als Grundvoraussetzung für den operativen Eingriff gelten saubere Wundverhältnisse, ausreichende vaskuläre Versorgung, gute Knochenstabilität und eine adäquate Weichteildeckung (Yegiyants, Dayicioglu et al. 2010). Handelt es sich um eine einfache Nervendurchtrennung können beide Nervenenden ohne Spannung wieder zusammengefügt werden (Battiston, Geuna et al. 2005) (Schaller 2006). Bei kleinen Nervenquerschnitten wird nach sparsamem Débridement die Koaptation epiperineural mit einem monofilen 10-0 Faden durchgeführt (Berger 2002). Bei großen Querschnitten wird eine interfaszikuläre Rekonstruktion angestrebt, indem die einzelnen Faszikel perineural und die äußeren Schichten epiperineural koaptiert werden.

Leider ist die direkte Koaptation nur bei kleinstreckigen Defekten möglich, da nur in diesen Fällen eine spannungsfreie Nervenadaptation gewährleistet werden kann. In allen anderen Situationen muss man von einer direkten

Koaptation absehen und andere Therapieoptionen in Betracht ziehen (Schaller 2006) (Pabari, Yang et al.2010).

1.8.2 Autologe Nerven transplantation

Für langstreckige Verletzungen, bei denen eine direkte Koaptation nicht möglich ist, ist die autologe Nerven transplantation der Goldstandard (Sinis, Kraus et al. 2009) (Pabari, Yang et al. 2010). Für die Transplantation sind sensible Nerven wie zum Beispiel der Nervus suralis geeignet, da sie einfach zu entnehmen sind und die sensiblen Ausfallerscheinungen für den Patienten meist vertretbar sind (Pabari, Yang et al. 2010). Nach Entnahme des Spendernervs wird er nach 180° Wendung in die Defektstelle eingesetzt (Berger 2002).

Die Nerven transplantation weist andere nicht zu vernachlässigende Nachteile auf. So muss zuerst ein in der Länge und Dicke geeigneter Nerv gefunden werden, wobei sensible Nerven meist mehr Bindegewebe besitzen. Deshalb ist eine Erhöhung des Nervenquerschnitts durch mehrere Transplantate notwendig. Als weitere Komplikation besteht die Möglichkeit einer Neurombildung. Dies kann zu chronischen Schmerzen und zu einer langfristigen Schmerztherapie für den Patienten führen (Sinis, Schaller et al. 2007).

1.8.3 Andere Therapiemöglichkeiten

Sollte kein geeigneter Spendernerv verfügbar sein, besteht zudem die Möglichkeit der Implantation einer Nervenleitschiene. Aktuell sind auf dem Markt eine Vielzahl von künstlichen Nerven-Conduits erhältlich. Eine Regeneration über längere Defektstrecken konnte bisher leider nicht erreicht werden (Sinis, Schaller et al. 2007) (Schlosshauer, Dreesmann et al. 2006). Neu ist der Einsatz von Muskel Venen Transplantaten. Die Regenerationsergebnisse, welche in der aktuellen Literatur präsentiert werden,

sind sehr vielversprechend (Battiston, Geuna et al. 2005) (Battiston, Tos et al. 2000) (Tos, Battiston et al. 2000) (Manoli, Schulz et al. 2013).

Bei ausbleibender Nervenregeneration oder länger zurückliegendem Trauma besteht weiterhin die Möglichkeit einer motorischen Ersatzplastik um die verloren gegangene Funktion wieder herzustellen (Schaller H.-E. 1998) (Berger, Flory et al. 1990) (Berger, Schaller et al. 1991) (Pabari, Yang et al. 2010).

1.9 Das Nervus medianus Maus Modell

Für die Erforschung der molekularbiologischen Vorgänge während der peripheren Nervenregeneration sind Tierversuche von enormer Bedeutung. Zu den gängigsten Modellen zählen das Nervus ischiadicus sowie das Nervus medianus Modell der Ratte (Galtrey and Fawcett 2007) (Luis, Amado et al. 2007). Dem Tier wird in einer Operation der Nerv durchtrennt und anschließend mikrochirurgisch wieder koaptiert. Im postoperativen Verlauf wird die Nervenregeneration anhand von Kraftmessungen, Ganganalysen, elektrophysiologischen oder molekularbiologischen Messungen untersucht (Bertelli and Mira 1995).

Das Nervus medianus Modell besitzt gegenüber dem Nervus ischiadicus Modell viele Vorteile. Zum einem kommt es zu weniger Selbstverstümmelungen. Des Weiteren werden an der oberen Extremität der Kleintiere die Flexoren nur vom Nervus medianus innerviert, so dass man den simplen Greiftest nach Bertelli anwenden kann (Bertelli and Mira 1995). Dieser Test untersucht die Kraftzunahme der Vorderpfote und spiegelt so die Nervenregeneration, beziehungsweise die Reinnervation des Endorganes wieder.

Durch den Einsatz von Mäusen anstelle von Ratten, besteht zusätzlich die Möglichkeit, die periphere Nervenregeneration an genetisch veränderten Tieren zu erforschen (Jaminet, Schaufele et al. 2012). Hierdurch kann man die

Nervenregeneration nach verminderter Produktion eines bestimmten Proteins untersuchen und so Rückschlüsse auf dessen Funktion schließen.

1.10 Intention der Studie

Das Verständnis der molekularen Vorgänge während der peripheren Nervenregeneration ist grundlegend für neue Therapiestrategien in der Behandlung peripherer Nervenverletzungen. Mit Hilfe von Tierversuchen besteht die Möglichkeit die komplexen Vorgänge und die Rolle bestimmter Proteine während der peripheren Nervenregeneration zu erforschen.

In dieser Arbeit wurde nach einer peripheren Nervenverletzung des N. medianus mit anschließender Koaptation im ersten Schritt das zeitliche Expressionsmuster von RGMa mRNA und RGMa Protein untersucht. Anschließend erfolgte die Verlaufskontrolle der Regeneration anhand funktioneller Tests. Hierzu diente der bewährte Greiftest nach Bertelli. Als letztes erfolgte die histomorphometrische Analyse der regenerierten Axone.

Die Ergebnisse dieser Studie tragen dazu bei, die Rolle von RGMa während der peripheren Nervenregeneration näher zu beleuchten um so die Grundlage für weitere Untersuchungen zu schaffen.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchsaufbau

Für diese Studie wurden insgesamt 72 Mäuse (jeweils ca. 30g Körpergewicht) operiert, welche in 3 Gruppen aufgeteilt wurden.

Zur ersten Gruppe zählten 24 Wildtyp-Mäuse (C57BL/6 Hintergrund), welche für die Western Blot Untersuchungen sowie für die Transkriptionsanalyse herangezogen wurden. Bei Ihnen erfolgte die Neurotmesis des rechten N. medianus mit anschließender Koaptation. An Tag 0, 7, 14 und 21 wurden jeweils 6 Tiere für die Untersuchungszwecke getötet.

Die zweite Gruppe bestand ebenfalls aus 24 Wildtyp-Mäusen (C57BL/6 Hintergrund). Bei zwölf dieser Tiere erfolgte die Neurotmesis mit anschließender Koaptation des rechten N. medianus (WT NM). Als Kontrollgruppe (WT NOT NM, *sham* Tiere) erhielten die verbleibenden zwölf Tiere nur eine Eröffnung der rechten Axilla mit Darstellung der Nerven und anschließend einen direkten Wundverschluss. Der N. medianus wurde hier nicht verletzt. Bei allen Tieren erfolgte auf der linken Seite die Durchtrennung des N. medianus mit Einnaht in den M. pectoralis. So können Ergebnisverfälschungen im Greiftest sicher ausgeschlossen werden. Bei diesen Tieren wurde der Greiftest (alle 5 Tage bis Tag 50) sowie an Tag 50 die histomorphometrische Untersuchung durchgeführt.

Das gleiche Prozedere erfolgte in der 3. Gruppe mit 24 heterozygoten *RGMa^{+/-}* Mäusen (ebenfalls C57BL/6 Hintergrund). An 12 Tieren erfolgte die Neurotmesis mit Nervenkoaptation (RGM HZ NM) und 12 Tiere dienten zur Kontrolle ohne Neurotmesis (RGM HZ NOT NM, *sham* Tiere). Bei allen Tieren dieser Gruppe erfolgte ebenfalls auf der linken Seite die Durchtrennung des N.

medianus mit Einnah in den M. pectoralis. Bei diesen Tieren wurde ebenfalls der Greiftest (alle 5 Tage bis Tag 50) sowie an Tag 50 die histomorphometrische Untersuchung durchgeführt.

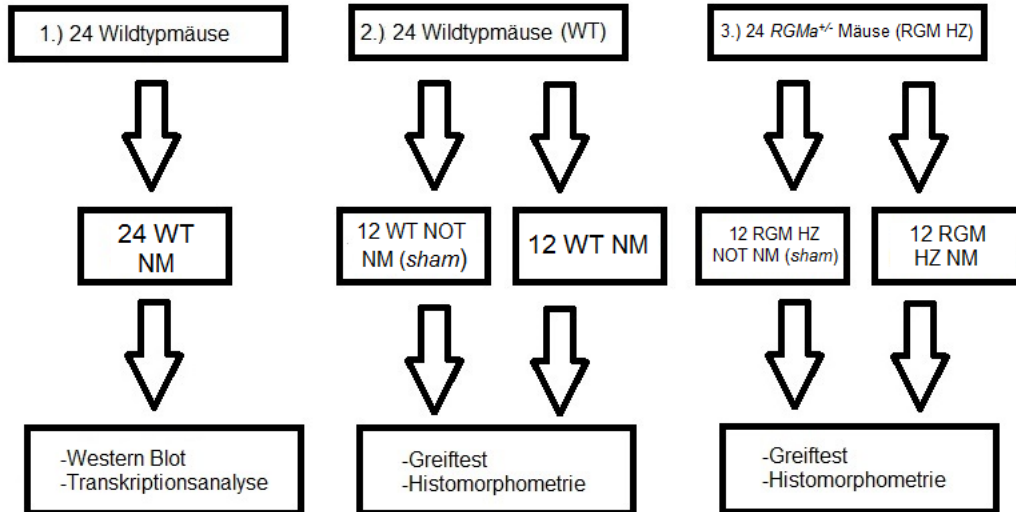


Abb. 5) Schematischer Versuchsaufbau. Gruppe 1 diente ausschließlich für die Westernblot- und die Transkriptionsanalyse. Die Tiere der Gruppe 2 und 3 erhielten jeweils zur Hälfte eine Neurotmesis oder eine Eröffnung der Axilla ohne Neurotmesis (*sham* Tiere). Anschließend wurde alle Tiere der 2. und 3. Gruppe miteinander im funktionellen Greiftest sowie der Histomorphometrie verglichen.

Die Haltung aller Tiere erfolgte unter kontrolliert pathogenfreien Bedingungen mit 12-stündigem Licht-Dunkel-Zyklus bei Futter und Wasser ad libitum. Sämtliche Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit den deutschen und europäischen Bestimmungen zur Tierhaltung und Durchführung von Tierversuchen unternommen (genehmigter Tierantrag A3/09, Regierungspräsidium Tübingen). Das Wohlbefinden der Versuchstiere wurde durch Tierpfleger täglich überprüft und sichergestellt.

2.1.1 Narkose

Die Narkose erfolgte intraperitoneal mit Fentanyl (0,05 mg/kg), Midazolam (5 mg/kg) und Medetomidin (0,5 mg/kg). Nach Eintreten der Wirkung wurden die Tiere auf dem Operationstisch in Rückenlage fixiert und die Axilla ausrasiert.



Abb. 6) Fixierung des Versuchstieres auf dem Operationstisch

2.1.2 Nervendurchtrennung und Koaptation

Mit dem Operationsmikroskop Olympus SZX12 wurde unter starker Vergrößerung (40-fach) die Axilla eröffnet und der Nervus medianus aufgesucht. Nach der Freipräparation vom umliegenden Gewebe, hier musste vor allem auf die Arteria brachialis, den Nervus radialis und den Nervus ulnaris geachtet werden, wurde der N. medianus direkt nach Abgang des sensiblen Hautnerven scharf durchtrennt und umgehend mit einem 12/0 Ethilon Faden koaptiert. Für die Nervenankoaptation wurden zwei epineurale Einzelknopfnähte gesetzt. Bei der Operation wurde streng darauf geachtet, das Epineurium nicht mit der Mikropinzette zu berühren oder zu verletzen.

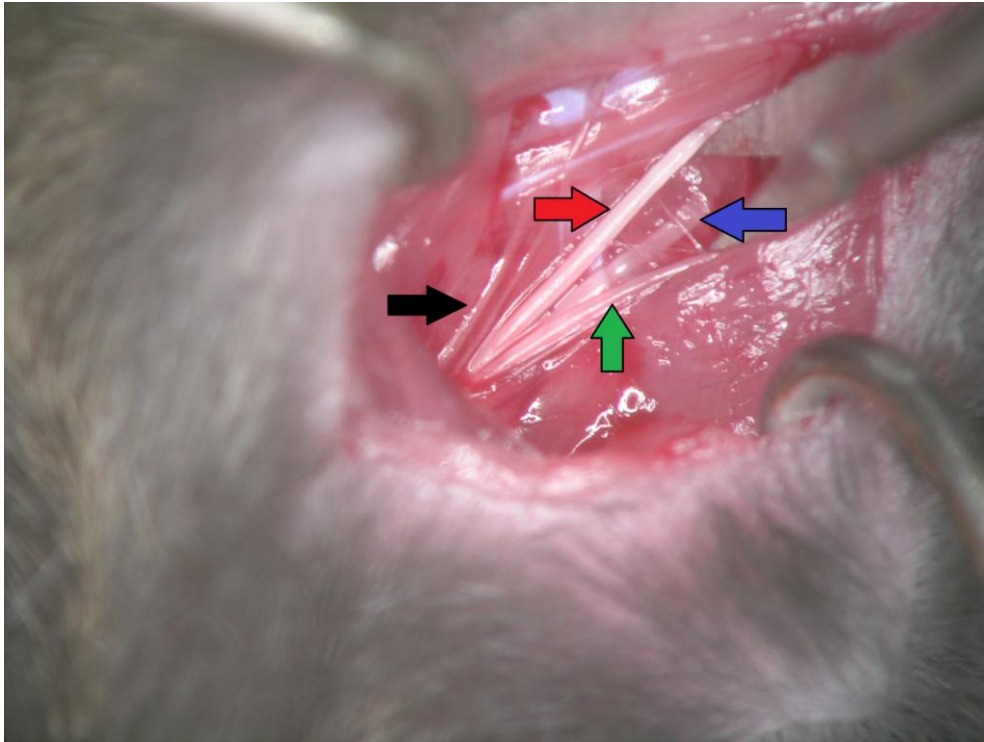


Abb. 7) OP-Sichtfeld nach Eröffnung der Axilla (40 fache Vergrößerung). Zentral liegen die Hauptabgänge des Plexus brachialis. Roter Pfeil: Nervus medianus. Dieser wurde in unserer Versuchsreihe durchtrennt und wieder koaptiert. Blauer Pfeil: Nervus radialis. Grüner Pfeil: Nervus ulnaris. Schwarzer Pfeil: konstant vorhandener sensibler Hautnerv.

Um die Greiffunktion im Greiftest der rechten oberen Extremität unabhängig von der linken Seite untersuchen zu können, wurde auf der Gegenseite der N. medianus ebenfalls dargestellt und auf einer Länge von 1 cm reseziert. Der proximale Nervenstumpf wurde in den M. pectoralis eingenäht um eine mögliche Reinnervation zu vermeiden.

Die Tiere der bereits oben genannten Kontrollgruppen (*sham* Tiere der Wildtyp-Mäuse und *RGMa^{+/-}* Mäuse) erhielten keine Neurotmesis. Bei Ihnen wurde lediglich die Axilla eröffnet und die Abgänge des Plexus brachialis dargestellt. Anschließend wurde die Wunde direkt verschlossen. Auf der Gegenseite wurde bei den *sham* Tieren ebenfalls der N. medianus über die Strecke von 1 cm reseziert und in den M. pectoralis eingenäht.

2.2. Western Blot Analyse

Die Western Blot Analyse dient dem Nachweis eines spezifischen Proteins aus einer komplexen Proteinmischlösung. Mithilfe eines horizontalen Stromfelds (Elektrophorese) wird die zu untersuchende Proteinlösung auf einer Polyacrylamid-Gel Membran in ihre einzelnen Bestandteile aufgeteilt. Die Aufteilung erfolgt aufgrund von Größe, Ladung und weiteren Beschaffenheiten der einzelnen Substanzen und Proteine. Anschließend werden die Proteine durch ein vertikales Stromfeld auf eine tiefer liegenden PVDF- oder eine Nitrocellulose-Membran übertragen, wo die nun festgebundenen Proteinbanden mit Antikörpern nachgewiesen werden können. Hierzu werden zunächst alle möglichen unspezifischen Bindungsstellen mit einer Lösung (zum Beispiel Milchpulverlösung) blockiert. Anschließend folgt die Zugabe von einem Primärantikörper der spezifisch an dem gesuchten Protein bindet. Durch mehrmaliges Waschen werden alle nicht spezifisch gebundenen Antikörper entfernt. Als letztes wird ein Sekundärantikörper hinzugefügt, welcher spezifisch am Primärantikörper bindet. Dieser Antikörperkomplex kann nun durch bestimmte Enzyme mithilfe einer Farbreaktion nachgewiesen werden. Die Intensität der Farbreaktion korreliert weitgehend mit dem Antikörpertiter.

2.2.1 Versuchsdurchführung

Die RGMa Protein Konzentration wurde mit Hilfe einer Western Blot Analyse an den Tagen 0, 7, 14 und 21 bestimmt. Hierfür wurden jeweils 6 Tiere aus der ersten Versuchsgruppe an den jeweiligen Untersuchungstagen getötet. Die Nervenentnahme eines 10 mm langen Segments erfolgte ca. 8 mm distal der Nervenverletzung. Anschließend wurden die Proben lysiert und homogenisiert. Die homogenisierten Nerven wurden in RIPA Puffer, bestehend aus

-50 mM Tris-HCl [pH 7,4]

-150 mM NaCl

-0,5% Deoxycholsäure

-0,5% Triton X-100

-1 mM PMSF,

-1 mM Natrium Orthovanadate,

-1 x Proteaseinhibitor (Roche Molecular Biochemicals)

eluiert. Gleiche Mengen an Proteinlösung wurden auf ein 10 % SDS Polyacrylamid Gel aufgetragen und auf eine PVDF Membran (Bio-Rad, Hercules, U.S.) übertragen. Die Membran wurde mit einer Tris Puffer Lösung mit 5% Milchpulver und 0,05% Tween 20 für eine Stunde geblockt und im Folgenden mit RGMa - Antikörper (Abcam, Cambridge, United Kingdom) für 12 Stunden bei 4 °C inkubiert. Nach drei Waschschrritten wurde die Membran mit HRP gekoppeltem Sekundärantikörper für 1 Stunde inkubiert. Nach drei weiteren Waschschrritten wurden die Proteinbanden mit einer Chemilumineszenzreaktion sichtbar gemacht (ECL Detection system, Fluka-Luminol 09253, p-Coumeric acid; Sigma-Aldrich, Munich, Germany).

Des Weiteren führten wir einen Western Blot zum Nachweis des ubiquitären Proteins GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) durch. Diese Kontrolluntersuchung dient zur Sicherstellung, dass an allen Versuchstagen eine äquivalente Menge an Proteinlösung untersucht wurde. Für diese Versuchsreihe wurde ein GAPDH-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, U.S.A.) benutzt. Ansonsten folgen wird dem oben aufgeführten Protokoll.

Die relative Intensität der Banden wurde mit der ImageJ V.1.43 Software quantifiziert.

2.3. Transkriptionsanalyse

Zur Quantifizierung der Expression von RGMa mRNA benutzten wir die Methode der quantitativen realtime RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion). Diese Untersuchung basiert auf dem Prinzip einer herkömmlichen reversen Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (PCR), bei der RNA-Fragmente in cDNA umgeschrieben und vervielfältigt werden. Der Vorteil der realtime RT-PCR besteht darin, dass während des Prozesses eine Quantifizierung der Produktmenge möglich ist. Unter Beimischung von Einzelstrang-DNA bindenden Fluoreszenzfarbstoffen werden kontinuierlich die Fluoreszenzintensitäten während der PCR-Zyklen gemessen und ausgewertet, da die Fluoreszenzintensität proportional mit der Menge der PCR-Produkte zunimmt. Zur Berechnung der mRNA-Menge benutzten wir die Methode der relativen Quantifizierung. Hier wird die Expression des Zielgens, in unserem Fall RGMa, auf die eines homogenen ubiquitären Gens, wie zum Beispiel GAPDH, bezogen (Holzapfel 2007). Dieser Vorgang wird auch als Normalisierung bezeichnet (Pfaffl 2004).

Die gesamte RNA wurde in dieser Studie aus einem 10 mm langen N. medianus Segment 8 mm distal der Nervenverletzung gewonnen. Die RNA Isolierung erfolgte mithilfe eines Kits (peqGOLD TriFast, PEQLAB, Erlangen, Germany) nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski and Sacchi 1987). Im Anschluss wurde die reverse Transkriptase in cDNA in einem 20 µl Ansatz durchgeführt (iScript™ cDNA Synthesis Kit, BioRad), gefolgt von der RT PCR zur Quantifizierung der gewonnenen DNA (iCycler; Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA). Somit konnten an den Tagen 0, 7, 14 und 21 nach der Nervenverletzung und Koaptation die RGMa mRNA Spiegel bestimmt werden. Folgende Primer wurden zu jeweils 10 pM eingesetzt:

RGMa Primer:

5'-cag caa gct cac cat cat ct-3'

5'-ccc gac acc ttc tct gtg at-3'

Housekeeping Primer (GAPDH):

5'-cgg cct cac ccc att tg-3'

5'-cga gaa tgg gaa gct tgt cat c-3'

2.4. Der Greiftest

Um die funktionelle Rolle von RGMa im Rahmen der peripheren Nervenregeneration zu untersuchen, wurden die operierten Wildtyp Mäuse (WT NM) und heterozygoten *RGMa*^{+/-} Mäuse (RGM HZ NM) (beide C57BL/6 Hintergrund) miteinander im Greiftest alle 5 Tage bis zum 50. postoperativen Tag verglichen. Zur Kontrolle dienten die nicht operierten *sham* Tiere (WT NOT NM, RGM HZ NOT NM) bei welchen der N. medianus lediglich freigelegt wurde (*sham*, ebenfalls C57BL/6 Hintergrund).

Im Rahmen des Greiftestes wurden die Mäuse am Schwanz gehalten und senkrecht über eine quere Haltestange geführt. Diese Haltestange war auf der Messplatte einer Präzisionswaage fixiert und führte unter Zug zu einem Ausschlag der negativ tarierten Waage. Sobald die Maus die Stange erkennt oder sie berührt, kommt es zu einem reflektorischen Greifakt. Durch Zug am Schwanz löst sich der Griff an der Stange sobald die Maximalkraft der Pfote überschritten ist. Im Verlauf der Zeit und der zunehmenden Regeneration des Nerven nimmt die Greifkraft der Vorderpfote zu und führt zu höheren Ausschlägen an der Waage. Der Greiftest wurde alle 5 Tage bis zum 50. postoperativen Tag durchgeführt und war für die Tiere eine willkommene

Abwechslung. An jedem Versuchstag erfolgten 3 Messungen, aus welchen der durchschnittliche Zugwert berechnet wurde. Der Untersucher führte den Versuch unter verblindeten Bedingungen durch.



Abb. 8) Greiftest. Durch vertikalen Zug am Schwanz der Maus wird die maximale Kraft der Vorderpfote an einer negativ tarierten Waage gemessen.

2.5. Histomorphometrie

Die Histomorphometrie dient zur Beurteilung und Charakterisierung der Nervenregeneration anhand verschiedener morphologischer Parameter. Zu den gängigen Parametern zählen die Anzahl myelinisierter Fasern, die Nervenfaserdichte und der Durchmesser des Nervenquerschnitts. Gute histologische Nervenproben erlauben zudem eine hochauflösende Untersuchung verschiedener Axonparameter, wie zum Beispiel des Axondurchmessers, des Nervenfaserdurchmessers und der Dicke der Myelinscheide (Geuna, Tos et al. 2001). Die Auswertung der regenerierten Nerven erfolgte am Tag 50 (Endpunkt der Studie). Hierzu wurden die operierten Wildtyp Mäuse (C57BL/6 Hintergrund), die transgenen heterozygoten *RGMa^{+/-}* Mäuse (C57BL/6 Hintergrund) sowie die dazugehörigen Kontrolltiere (*sham*, ebenfalls C57BL/6 Hintergrund) getötet (jeweils n=5), und ein 10 mm langes Nervensegment 8 mm distal der Nervenverletzung entnommen. Das proximale Ende wurde zur späteren Wiedererkennung im Labor mit einer 4/0 Einzelknopfnahm versehen.

Das entnommene Nervensegment wurde umgehend nach der Entnahme in einer Lösung mit 2,5 % Glutaraldehyd und 0,5% Saccharose in 0,1M Soerensen Phosphatpuffer (pH 7,2) für 3 Stunden fixiert. Anschließend erfolgte eine Waschung mit 1,5% Saccharose in 0,1M Soerensen Phosphatpuffer (pH 7,2) über 6-12 Stunden. Die Nachfixierung wurde mit 1% Osmiumtetroxid durchgeführt. Nach der Dehydrierung erfolgte die Einbettung in Alardit welche aus gleichen Anteilen von Alardit M und Alardit Härter, HY 964 (Merck, Darmstadt Deutschland) besteht. In die Einbettung wurden dazu noch 1-2% vom Beschleuniger 964, DY 064 (Merck) und 0,5% von Dibutyl Phthalate gegeben. Mit dem UCT Ultramikrotom (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) wurden 2 µm dicke Schnitte angefertigt und mit Toluidinblau gefärbt. Im Anschluss wurde die Histomorphometrie entsprechend dem Protokoll von Geuna und Mitarbeitern durchgeführt (Geuna 2005) (Geuna, Tos et al. 2000) (Geuna, Gigo-Benato et al. 2004)

2.6. Statistische Untersuchung

Die statistische Untersuchung erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie (Institut der Universitätsklinik Tübingen). Die statistische Auswertung der Histomorphometrie und der Transkriptionsanalyse erfolgte mittels univariater Varianzanalyse (ANOVA). Die Auswertung des Greiftestes erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit der Kovarianzanalyse (ANCOVA). Signifikante Unterschiede wurden mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ angegeben.

3. Ergebnisse

3.1. Westen Blot Analyse der zeitlichen RGMA Expression

Das zeitliche Expressionsmuster von RGMA wurde im Western Blot bestimmt. Die Untersuchungen zeigen einen starken postoperativen Anstieg der RGMA Proteinkonzentration an Tag 14 im entnommenen Nervensegment distal der Nervenkoaptation. An Tag 7 und 21 lagen deutlich erniedrigte Konzentrationen von RGMA im untersuchten Bereich vor.

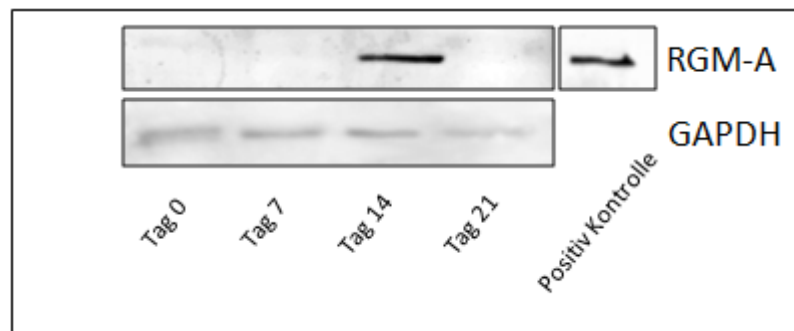


Abb. 9) Western Blot des RGMA Expressionsmusters. An Tag 14 kommt es zu einer deutlich erhöhten RGMA-Expression, sichtbar durch den Farbausschlag. An allen weiteren Versuchstagen liegt die Konzentration auf Niveau des unverletzten Nervs. In der unteren Leiste sind die homogenen Ergebnisse der Kontrolluntersuchung zu sehen (GAPDH).

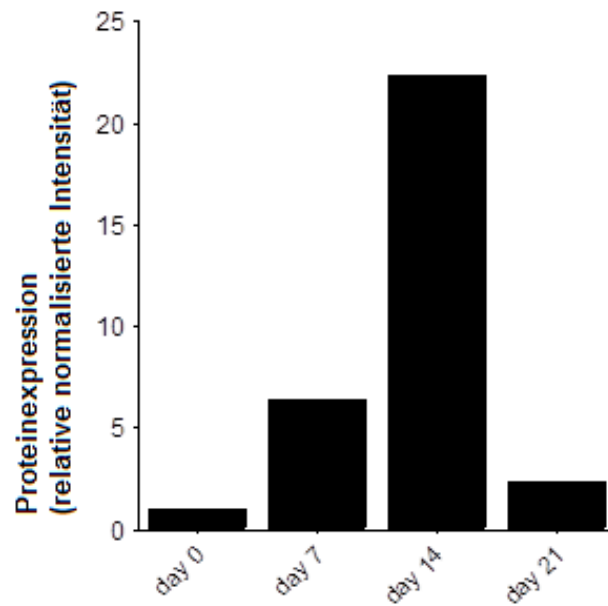


Abb. 10) RGMa Protein Expression (relative normalisierte Intensität) im Western Blot. An Tag 14 kommt es zu einem deutlichen Anstieg der RGMa Protein Expression im Vergleich zu den anderen Untersuchungstagen.

Tag	RGMa Intensität in %	GAPDH Intensität in %	Normalisierung auf 1
0	13.960	36.428	1
7	16.496	20.526	6,343414877
14	62.153	40.542	22,37950181
21	7.390	2.504	2,348525954

Tabelle 2) Messwerte der Intensität in % von RGMa, GAPDH und die dazugehörige Normalisierung auf 1.

3.2 Real Time RT-PCR

Die Auswertung der real time RT-PCR erfolgte zu vier verschiedenen Zeitpunkten. Als Kontrollparameter wurde die Intensität von GAPDH bestimmt und zur Normalisierung hinzugezogen. Zunächst wurde die mRNA Expression von RGMa bestimmt. Hier zeigte sich ein deutlicher Anstieg ab Tag 14 mit dem Maximum an Tag 21.

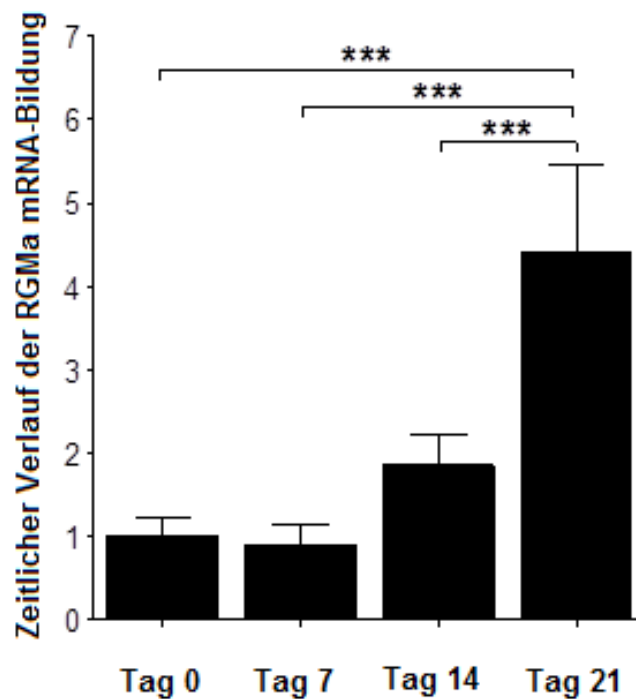


Abb. 11) Zeitlicher Verlauf der RGMa mRNA Bildung. Zwischen Tag 21 und den restlichen Tagen zeigt sich ein signifikant erhöhte RGMa mRNA Bildung (***) $P < 0,01$)

	Tag 0	Tag 7	Tag 14	Tag 21
Messwerte auf 1 normalisiert	1,002	0,895	1,858	4,396
Standardabweichung	0,303	0,343	0,493	1,290

Tabelle 3) Auf 1 normalisierte Messwerte des zeitlichen Verlaufs der RGMa mRNA Bildung und die Standardabweichung.

3.3 Auswertung der postoperativen Greifkraft

Die funktionelle Auswertung der Nervenregeneration erfolgte über den Greiftest. Die Resultate zeigen einen eindeutigen Kraftverlust der operierten heterozygoten *RGMa^{+/-}* Mäuse (RGM HZ NM) im Vergleich zu den operierten Wildtyp Tieren (WT NM). Die Kraftzunahme der transgenen Tiere (RGM HZ NM) verlief deutlich flacher, und erreichte nach 50 Tagen nur 55 % des Kraftwertes ihrer *sham* Tiere, während die operierten Wildtypmäuse (WT NM) nahezu vollständig regenerieren. Bei den respektiven Kontrolltieren zeigten sich keine Unterschiede hinsichtlich des Kraftverlaufs.

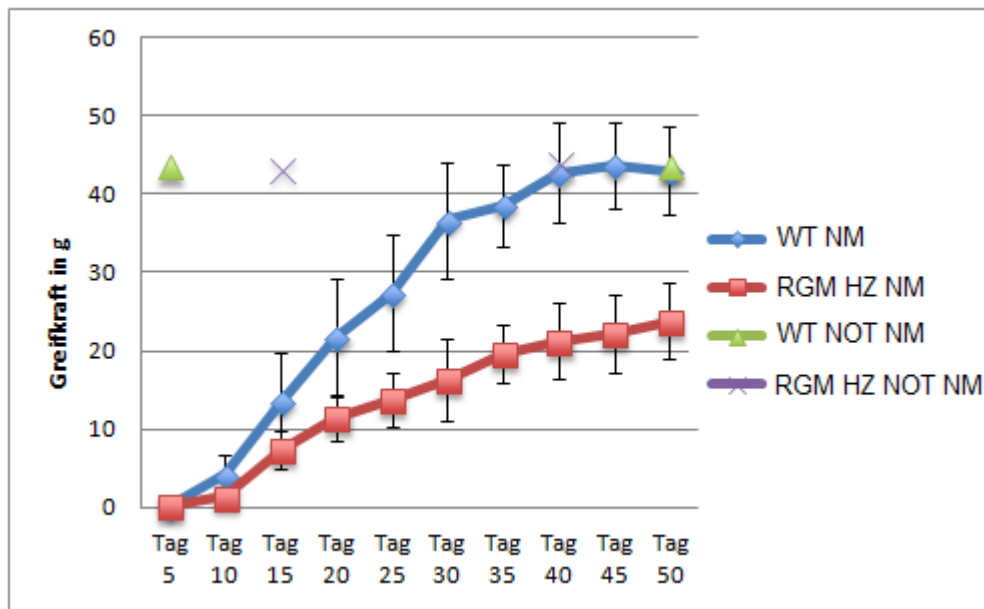


Abb. 12) Zeitlicher Verlauf der Greifkraft der WT-Mäuse und der *RGMa^{+/-}* Mäuse. Die blaue Kurve zeigt den Kraftanstieg der WT NM Mäuse. Diese geht nach der OP von fast 0 Gramm auf ihren Ursprungswert von ca. 43 Gramm wieder zurück. Bei den RGM HZ NM Mäusen kommt es stattdessen zu einem viel flacheren Kurvenverlauf. Sie erreichen eine Maximalkraft von ca. 24 Gramm. Das sind nur 55% ihrer ursprünglichen Kraft. Bei den respektiven *sham* Tieren kommt es zu keinem Kraftverlust.

	Tag 5	Tag 10	Tag 15	Tag 20	Tag 25	Tag 30	Tag 35	Tag 40	Tag 45	Tag 50
WT NM	0,08	4,17	13,4	21,7	27,42	36,67	38,58	42,75	43,75	43
WT Standardabweichung	0,29	2,59	6,3	7,52	7,35	7,52	5,3	6,38	5,55	5,58
RGM HZ NM	0,17	1,33	7,33	11,5	13,75	16,25	19,67	21,25	22,25	23,75
RGM Standardabweichung	0,39	0,65	2,42	2,94	3,55	5,29	3,73	4,82	5,01	4,88
WT NOT NM (<i>sham</i>)	43,6									43,58
RGM HZ NOT NM (<i>sham</i>)			43,1					44		

Tabelle 4) Messwerte der postoperativen Greifkraft der Wildtypmäuse und Heterozygoten Mäuse mit den dazugehörigen Standardabweichungen und den respektiven *sham* Tieren.

3.4 Histomorphometrische Ergebnisse

Die koaptierten Nerven der WT NM Mäuse und RGM HZ NM Mäuse sowie deren *sham* Kontrollen wurden am Tag 50 histomorphometrisch untersucht. Zu den Untersuchungsparametern gehörten die Anzahl der myelinisierten Fasern, die Faserdichte, der Durchmesser des Nervenquerschnitts und die Fasergröße. Die Fasergröße wird aus folgenden Parametern gebildet: Axondurchmesser, Nervenfaserdurchmesser und die Dicke der Myelinscheide.

3.4.1 Gesamtanzahl myelinisierter Fasern

Die RGM HZ NM Mäuse erreichten die höchste Anzahl an myelinisierten Fasern. Im Vergleich zu den WT NM Mäusen und den respektiven *sham* Tieren war der Unterschied signifikant. Zwischen den Gruppen der *sham* Tiere und den WT NM Mäusen gibt es keinen signifikanten Unterschied.

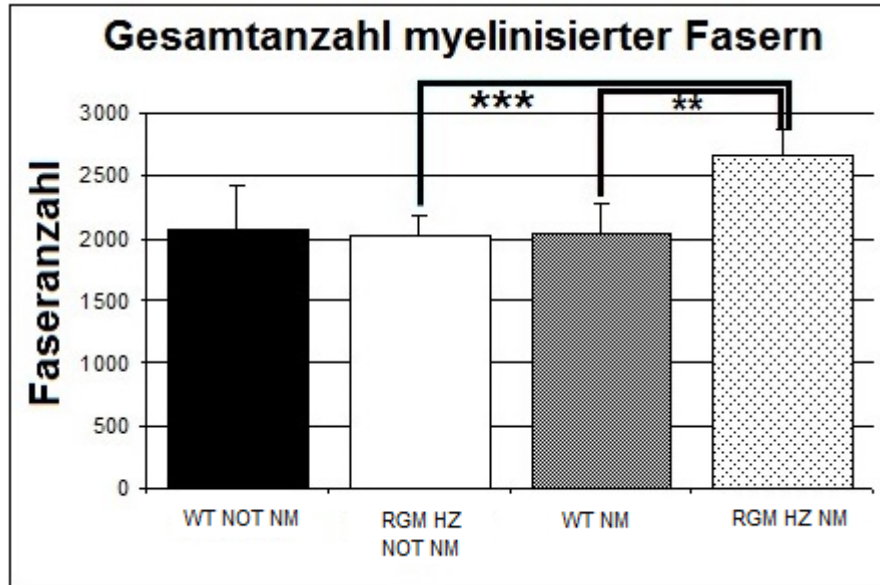


Abb. 13) Gesamtanzahl der myelinisierten Fasern. WT NOT NM ist die Gruppe der Wildtyp Mäuse ohne Neurotmesis (*sham* Tiere). RGM HZ NOT NM ist die Gruppe der *RGMa*^{+/-} Mäuse ohne Neurotmesis (*sham* Tiere). WT NM ist die Gruppe der Wildtypmäuse mit Neurotmesis. RGM HZ NM ist die Gruppe der *RGMa*^{+/-} Mäuse mit Neurotmesis. Die *RGMa*^{+/-} Mäusen erreichen eine signifikant erhöhte Zahl an myelinisierten Fasern im Vergleich zu den respektiven *sham* Tieren (***) und zu den operierten Wildtyp-Mäusen (** = P<0,05)

	WT NOT NM	RGM HZ NOT NM	WT NM	RGM HZ NM
Mittelwert	2078,29	2031,26	2043,24	2655,89
Standardabweichung	331,46	156,80	230,76	200,77

Tabelle 5) Messwerte der Gesamtanzahl myelinisierter Nervenfasern. WT NOT NM ist die Gruppe der Wildtyp Mäuse ohne Neurotmesis (*sham* Tiere). RGM HZ NOT NM ist die Gruppe der *RGMa*^{+/-} Mäuse ohne Neurotmesis (*sham* Tiere). WT NM ist die Gruppe der Wildtypmäuse mit Neurotmesis. RGM HZ NM ist die Gruppe der *RGMa*^{+/-} Mäuse mit Neurotmesis.

3.4.2 Faserdichte

Die Wildtyp Mäuse zeigen im Vergleich zu den $RGMa^{+/-}$ -Mäuse sowohl bei den Tieren mit und ohne Neurotmesis eine erhöhte Nervenfaserdichte. Auch zwischen den operierten Tieren mit Neurotmesis und ihren respektiven *sham* Tieren kommt es zu einer erhöhten Nervenfaserdichte. Eine signifikanter Unterschied konnte jedoch nicht berechnet werden.

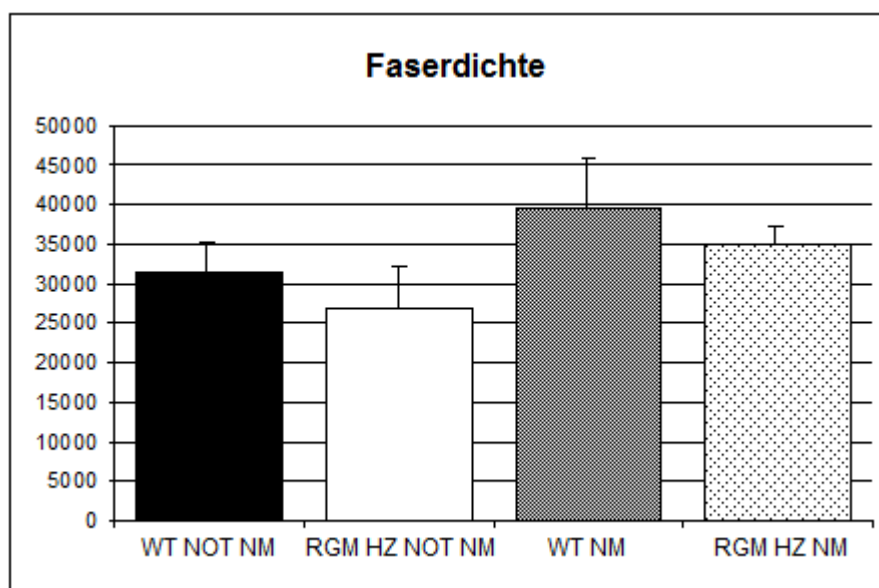


Abb. 14) Auswertung der Faserdichte (Anzahl der Nervenfasern pro mm²). WT NOT NM ist die Gruppe der Wildtyp Mäuse ohne Neurotmesis (*sham* Tiere). RGM HZ NOT NM ist die Gruppe der $RGMa^{+/-}$ Mäuse ohne Neurotmesis (*sham* Tiere). WT NM ist die Gruppe der Wildtypmäuse mit Neurotmesis. RGM HZ NM ist die Gruppe der $RGMa^{+/-}$ Mäuse mit Neurotmesis. In dieser Untersuchung gab es zwischen den relevanten Gruppen keine signifikanten Unterschiede.

	WT NOT NM	RGM HZ NOT NM	WT NM	RGM HZ NM
Mittelwert	31371,56	26953,08	39331,62	34903,73
Standardabweichung	3737,70	5140,65	6505,12	2375,18

Tabelle 6) Messwerte der Faserdichte. WT NOT NM ist die Gruppe der Wildtyp Mäuse ohne Neurotmesis (*sham* Tiere). RGM HZ NOT NM ist die Gruppe der $RGMa^{+/-}$ Mäuse ohne Neurotmesis (*sham* Tiere). WT NM ist die Gruppe der Wildtypmäuse mit Neurotmesis. RGM HZ NM ist die Gruppe der $RGMa^{+/-}$ Mäuse mit Neurotmesis.

3.4.3 Nervenquerschnittsfläche

Bezüglich der Nervenquerschnittsfläche wiesen die RGM HZ NM Mäuse ebenfalls höhere Werte als die WT NM Mäuse auf. Dieses Ergebnis kommt jedoch eher durch eine Nervenquerschnittsreduktion der WT NM Mäuse zu stande, als durch ein Nervenquerschnittsvergrößerung der RGM HZ NM Mäuse. Unsere Berechnungen zeigen dass es bei den WT NM Mäusen im Vergleich zu den *sham* Tieren eher zu einer Reduktion des Nervenquerschnitts kommt. Statt dessen bleibt der Nervenquerschnitt der RGM HZ NM im Vergleich zu seinen *sham* Tieren auf gleichem Niveau.

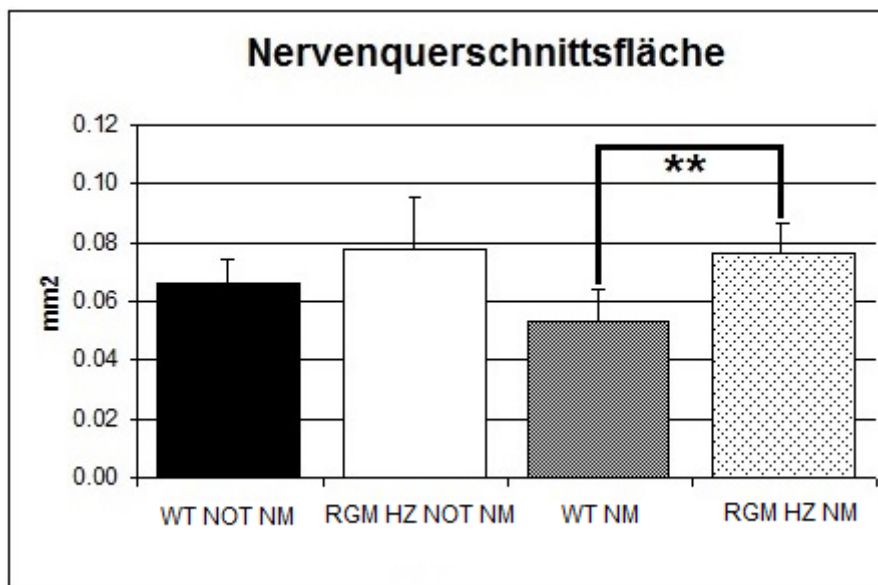


Abb. 15) Nervenquerschnittsfläche in mm². WT NOT NM ist die Gruppe der Wildtyp Mäuse ohne Neurotmesis (*sham* Tiere). RGM HZ NOT NM ist die Gruppe der *RGMa*^{+/-} Mäuse ohne Neurotmesis (*sham* Tiere). WT NM ist die Gruppe der Wildtypmäuse mit Neurotmesis. RGM HZ NM ist die Gruppe der *RGMa*^{+/-} Mäuse mit Neurotmesis. Im Vergleich zu den WT NM Mäusen erreichen die RGM HZ NM Mäuse einen signifikant erhöhten Nervenquerschnitt (** = P<0,05)

	WT NOT NM	RGM HZ NOT NM	WT NM	RGM HZ NM
Mittelwert in mm ²	0,066	0,078	0,05	0,08
Standardabweichung	0,008	0,018	0,01	0,01

Tabelle 7) Messwerte der Nervenquerschnittsfläche in mm². WT NOT NM ist die Gruppe der Wildtyp Mäuse ohne Neurotmesis (*sham* Tiere). RGM HZ NOT NM ist die Gruppe der *RGMa*^{+/-} Mäuse ohne Neurotmesis (*sham* Tiere). WT NM ist die Gruppe der Wildtypmäuse mit Neurotmesis. RGM HZ NM ist die Gruppe der *RGMa*^{+/-} Mäuse mit Neurotmesis.

3.4.3 Fasergröße

Die operierten *RGMa*^{+/-}-Mäuse und die WT-Mäuse mit Neurotmesis zeigten in allen Parametern der Fasergröße reduzierte Werte im Vergleich zu ihren *sham* Tieren. Unterschiede zwischen den beiden Gruppen mit Neurotmesis bestanden hier nicht.

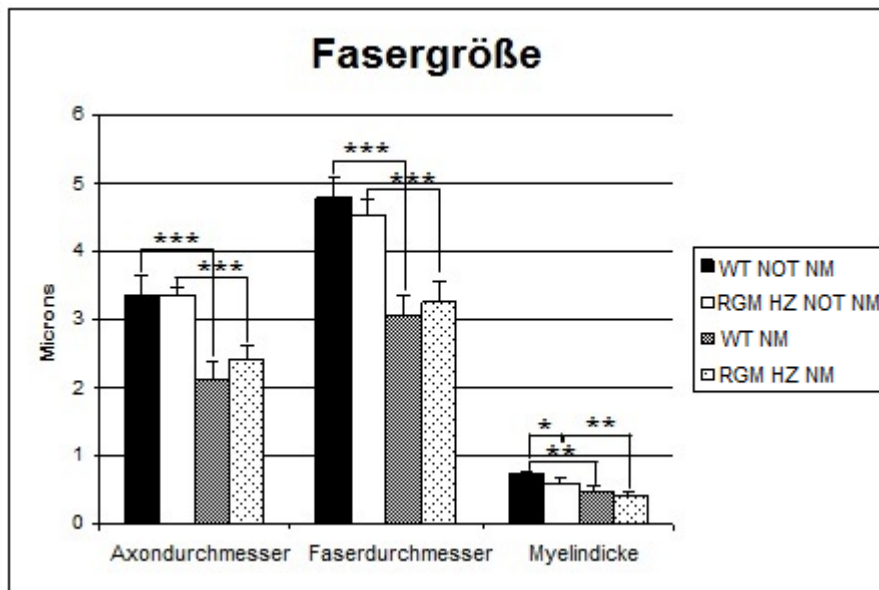


Abb. 16) Fasergröße mit Axondurchmesser, Faserdurchmesser und Myelindicke. WT NOT NM ist die Gruppe der Wildtyp Mäuse ohne Neurotmesis (*sham* Tiere). RGM HZ NOT NM ist die Gruppe der *RGMa*^{+/-} Mäuse ohne Neurotmesis (*sham* Tiere). WT NM ist die Gruppe der Wildtypmäuse mit Neurotmesis. RGM HZ NM ist die Gruppe der *RGMa*^{+/-} Mäuse mit Neurotmesis. Im Axondurchmesser haben die WT NM Mäuse und RGM HZ NM Mäuse zu ihren respektiven *sham* Tieren signifikant erniedrigte Werte (jeweils *** P < 0,01). Im Faserdurchmesser haben die WT NM Mäuse und RGM HZ NM Mäuse ebenfalls zu ihren

respektiven *sham* Tieren signifikant erniedrigte Werte (jeweils *** P <0,01). Im Vergleich zu den respektiven *sham* Tieren, erreichen die RGM HZ NM Mäuse eine signifikant erniedrigte Myelindicke (** P <0,05). Dasselbe gilt für die WT NM Mäuse und ihre *sham* Tiere (** P <0,05)

	WT NOT NM	RGM HZ NOT NM	WT NM	RGM HZ NM
Mittelwert	3,37	3,36	2,13	2,41
Standardabweichung	0,26	0,13	0,27	0,19

Tabelle 8) Messwerte des Axondurchmessers in μm . WT NOT NM ist die Gruppe der Wildtyp Mäuse ohne Neurotmesis (*sham* Tiere). RGM HZ NOT NM ist die Gruppe der *RGMa*^{+/-} Mäuse ohne Neurotmesis (*sham* Tiere). WT NM ist die Gruppe der Wildtypmäuse mit Neurotmesis. RGM HZ NM ist die Gruppe der *RGMa*^{+/-} Mäuse mit Neurotmesis.

	WT NOT NM	RGM HZ NOT NM	WT NM	RGM HZ NM
Mittelwert	4,81	4,54	3,07	3,27
Standardabweichung	0,31	0,22	0,28	0,29

Tabelle 9) Messwerte des Faserdurchmessers in μm . WT NOT NM ist die Gruppe der Wildtyp Mäuse ohne Neurotmesis (*sham* Tiere). RGM HZ NOT NM ist die Gruppe der *RGMa*^{+/-} Mäuse ohne Neurotmesis (*sham* Tiere). WT NM ist die Gruppe der Wildtypmäuse mit Neurotmesis. RGM HZ NM ist die Gruppe der *RGMa*^{+/-} Mäuse mit Neurotmesis.

	WT NOT NM	RGM HZ NOT NM	WT NM	RGM HZ NM
Mittelwert	0,066	0,078	0,05	0,08
Standardabweichung	0,008	0,018	0,01	0,01

Tabelle 10) Messwerte der Myelindicke in μm . WT NOT NM ist die Gruppe der Wildtyp Mäuse ohne Neurotmesis (*sham* Tiere). RGM HZ NOT NM ist die Gruppe der *RGMa*^{+/-} Mäuse ohne Neurotmesis (*sham* Tiere). WT NM ist die Gruppe der Wildtypmäuse mit Neurotmesis. RGM HZ NM ist die Gruppe der *RGMa*^{+/-} Mäuse mit Neurotmesis.

3.4.4 Histomorphologische Schnittbilder

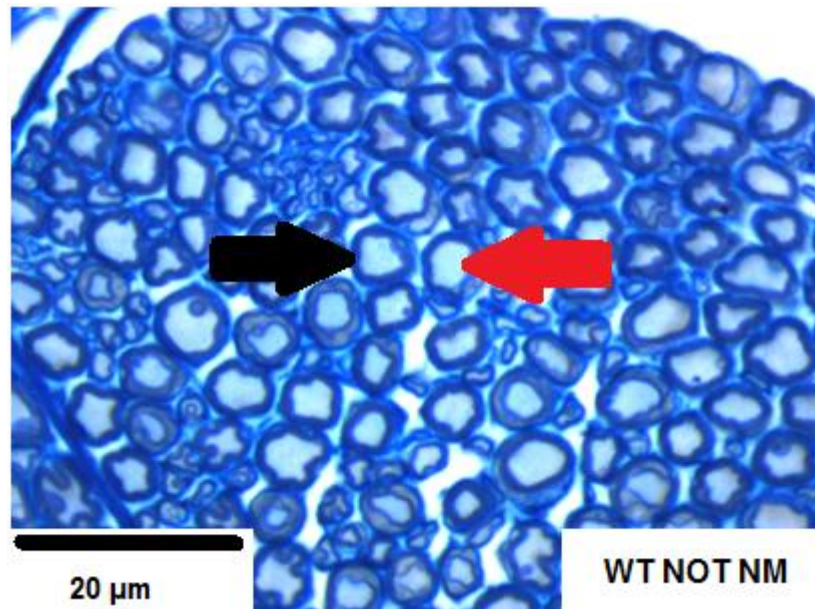


Abb. 17) Mikroskopischer Nervenquerschnitt einer Wildtypmaus ohne Neurotmesis (*sham* Tier) nach Toluidinblaufärbung. Schwarzer Pfeil: die Myelinscheide erscheint in dieser Färbung dunkelblau. Roter Pfeil: das Axon erscheint in dieser Färbung hellblau. Dieses Bild zeigt einen in der Morphologie gesunden Nerven, mit zahlreichen gut myelinisierten und regelmäßig großen Axonen im gesamten Blickfeld.

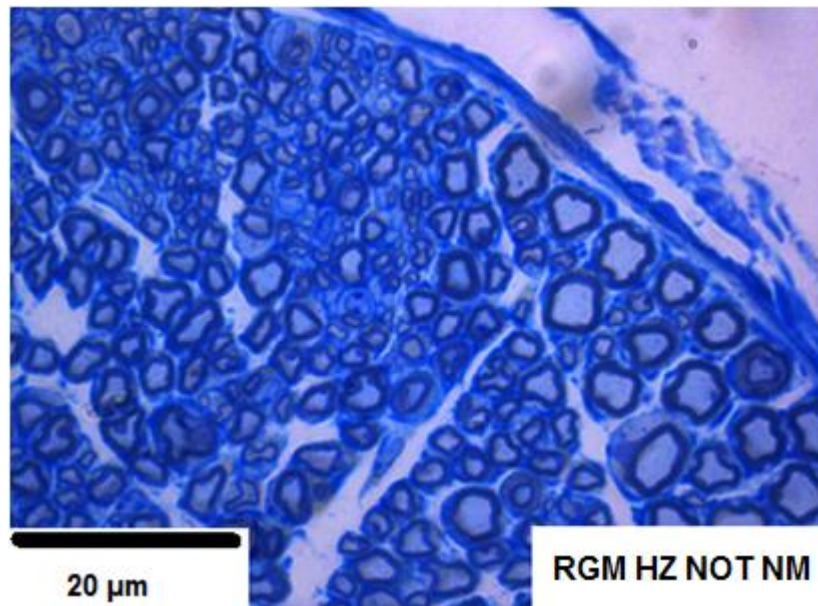


Abb. 18) Mikroskopischer Nervenquerschnitt einer *RGMa*^{+/-} Maus ohne Neurotmesis (*sham* Tier) nach Toluidinblaufärbung. Im Vergleich zur Abb. 17 sind die myelinisierten Axone nicht gleichmäßig geformt. Des Weiteren ist eine Rissbildung im Nerv zu beobachten, welcher auf die Fragilität des Nerven hindeuten kann. Ansonsten weist dieser Nerv kaum Unterschiede zur WT NOT NM Maus auf.

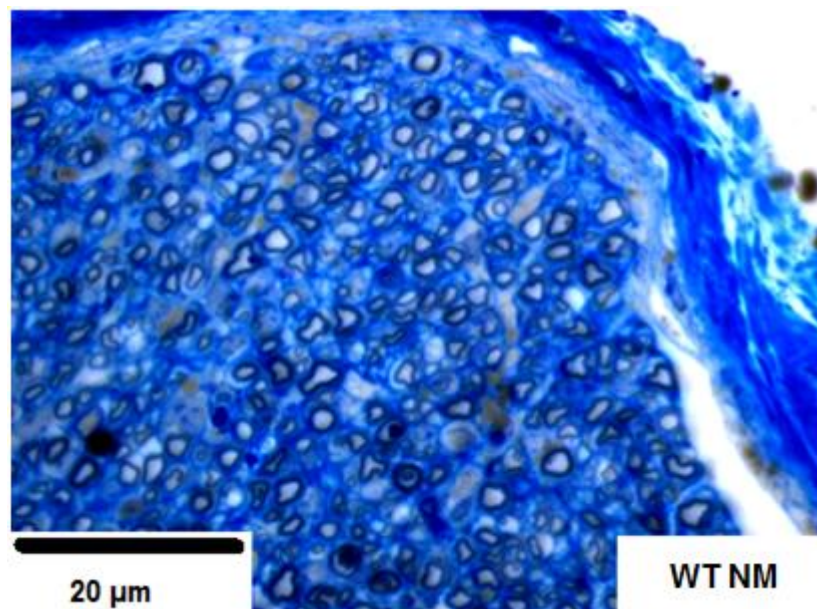


Abb. 19) Mikroskopischer Nervenquerschnitt einer Wildtypmaus mit Neurotmesis nach Toluidinblaufärbung. Im Vergleich zu den respektiven Sham-Tieren sind die Nervenfasern deutlich verkleinert. Dennoch weist dieser Schnitt die höchste Nervenfaserdichte auf.

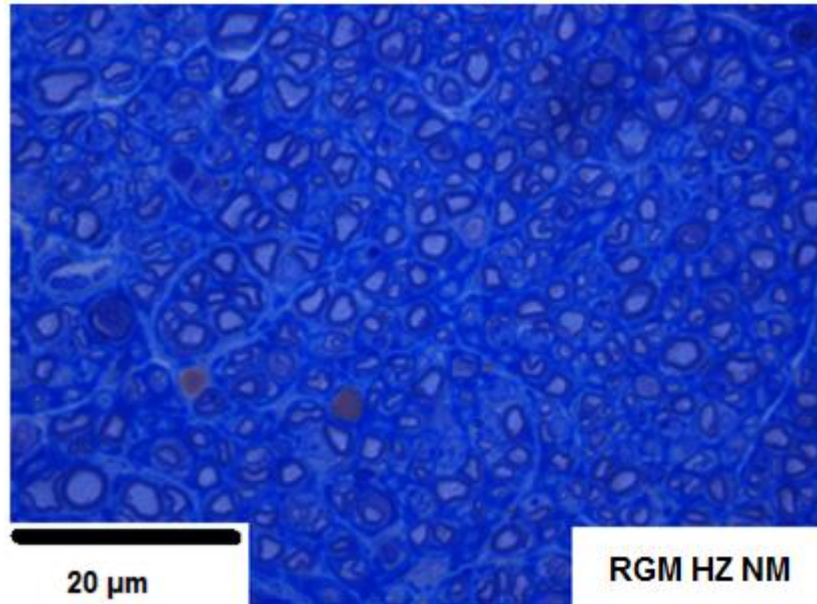


Abb. 20) Mikroskopischer Nervenquerschnitt einer *RGMa^{+/-}* Maus mit Neurotmesis nach Toluidinblaufärbung. Man erkennt eine erhöhte Anzahl an kleinen Nervenfasern. Insgesamt weisen diese Mäuse die höchste Anzahl myelinisierter Nervenfasern auf.

4. Diskussion

Die Versorgung peripherer Nervenverletzungen gehört zu den komplexesten Aufgaben des plastischen Chirurgen und sind trotz des Fortschrittes in der Mikrochirurgie und exzellent ausgebildeter Chirurgen mit einer ungünstigen Prognose für den Patienten assoziiert (Witzel, Rohde et al. 2005). Vor allem die Erforschung der komplizierten Zusammenhänge während der peripheren Nervenregeneration birgt die Hoffnung, das Outcome in naher Zukunft zu verbessern. Von besonderem Interesse ist die Rolle der neuronalen Guidance Moleküle in der Nervenregeneration, welche im ZNS bereits hoffnungsvolle Ergebnisse aufweisen. Wir beobachteten das Verhalten der peripheren Nervenregeneration an gendefizienten *RGMa^{+/-}* Mäusen, bei welchen die RGMA Produktion auf circa die Hälfte einer Wildtypmaus reduziert ist. Hierfür wurde die zeitliche RGMA-mRNA Expression, die Proteinexpression, die Histomorphometrie sowie die funktionelle Regeneration mit dem Greiftest untersucht. Die Ergebnisse unserer Untersuchungen erscheinen unter Betrachtung der bisher bekannten Funktionen von RGMA zunächst widersprüchlich zu sein. Bei verminderter Präsenz eines bekannten chemorepulsiven Faktors der Nervenregeneration und des Axonwachstums, erwartet man ein verstärktes Auswandern der Axone mit einer verbesserten Reinnervation der Endorgane. Dies scheint jedoch nicht der Fall zu sein, und so stellt sich die Frage, welche Ursachen für dieses unerwartete Ergebnis in Betracht gezogen werden müssen.

4.1 mRNA- und Proteinexpression

Unsere Untersuchungen zeigen, dass es distal der Nervenkoaptation an Tag 14 zu einer erhöhten Produktion von RGMa-mRNA bis zu ihrem Maximum an Tag 21 kommt. Der Höhepunkt der Translation dieser mRNA in Proteine wird jedoch bereits an Tag 14 erreicht. Die erhöhten RGMa-mRNA Werte von Tag 21 werden als überschüssige freie mRNA gesehen, die nicht zu Proteinen translatiert wird und somit keinen Einfluss auf die Proteinsynthese hat. Der Höhepunkt der RGMa Proteinexpression korreliert somit zeitlich mit mehreren wichtigen Ereignissen der peripheren Nervenregeneration.

- Bei einer Geschwindigkeit von ca. 1mm/Tag durchwandert das Axon das von uns untersuchte Nervensegment nach ca. 10-14 Tagen.
- Neben RGMa werden weitere Proteine in diesem Zeitraum verstärkt exprimiert. In fortführenden Untersuchungen konnten wir zeigen, dass es zu einer gesteigerten Produktion anderer neuronalen Guidance Molekülen kommt, wie Netrin-1 und UNC5b (Jaminet, Kohler et al. 2013) (Jaminet, Kohler et al. 2013). Des Weiteren kommt es zu einer vermehrten Bildung wachstumsfördernden Substanzen, wie z.B. NGF, IGF1 und BDNF (McCormick and Leipzig 2012) (Fu and Gordon 1997).
- An Tag 14 kommt es nach einer Nervenverletzung zum Höhepunkt der Makrophageneinwanderung (Dubovy 2011).

Die RGMa-Expression korreliert also eher mit dem Muster wachstumsfördernder Substanzen, da andere wachstumshemmende Proteine, wie zum Beispiel das Myelin Basic Protein, stark herunterreguliert werden (Stoll and Muller 1999). Des Weiteren zeigt das RGMa auch Unterschiede im Verhalten zwischen der peripheren und zentralen Nervenregeneration. Vergleicht man unsere Ergebnisse mit den Forschungsarbeiten von Schwab oder Hata (Hata, Fujitani et al. 2006) (Schwab, Monnier et al. 2005) (Schwab, Conrad et al. 2005), die die Rolle von RGMa in spinalen und zerebralen

Verletzungen untersucht haben, zeigt sich, dass auch im zentralen Nervensystem eine erhöhte RGMA-Protein-Expression nach einem Trauma erfolgt. Dort wird die maximale Einwanderung von RGMA präsentierenden Zellen (Neurone, Fibroblasten, Makrophagen und reaktive Astrozyten) schon nach 1-3 Tagen erreicht (Schwab, Monnier et al. 2005) (Schwab, Conrad et al. 2005). Im Western Blot zeigt sich am 7. posttraumatischen Tag ein signifikant erhöhte RGMA Proteinexpression (Hata, Fujitani et al. 2006). Im Verlauf kann das RGMA im zentralen Nervensystem vor allem im Bereich der Glia-Narbe über immunohistochemische Untersuchungen nachgewiesen werden. Diese Narbe dient vor allem der Trennung und somit dem Schutz zwischen gesundem und verletztem Gewebe. Als negativen Begleiteffekt hemmt sie jedoch auch die zentrale Nervenwanderung und -regeneration (Schwab, Monnier et al. 2005) (Schwab, Conrad et al. 2005).

Eine Ausweitung des verletzten Areal hat im zentralen Nervensystem viel gravierendere Auswirkungen auf den Gesamtorganismus als im peripheren Nervensystem, weshalb die starke chemorepulsive Wirkung von RGMA dort im Vordergrund steht. Im peripheren Nervensystem kommt es jedoch im Bereich der Nervenverletzung nicht sofort zu einer Glianarbenbildung (Giger, Hollis et al. 2010). Erst wenn eine Axoneinwanderung ausbleibt, kommt es nach mehreren Wochen zur Okklusion der distalen Nervenscheide (Burnett and Zager 2004). Die fehlende Glianarbenbildung und die deutlich spätere Expression von RGMA könnten Zeichen dafür sein, dass RGMA peripher eine andere Funktion als im zentralen Nervensystem übernimmt. Peripher scheint es vor allem an der Feinabstimmung zwischen chemorepulsiven und chemoattraktiven Substanzen am wandernden Nerven beteiligt zu sein, während die potente Axonwachstumshemmung im Hintergrund steht.

Interessanterweise korreliert auch der Zeitpunkt der maximalen RGMA Expression mit dem Höhepunkt der Makrophageneinwanderung in das distale Nervensegment (Dubovy 2011). Diese sind ebenfalls fähig, neurotrophe Substanzen zu exprimieren (Schwab, Monnier et al. 2005) (Schwab, Conrad et al. 2005). In unserer Studie führten wir hierfür jedoch keine immunohistochemischen Untersuchungen durch, so dass keine Aussagen über den Typ der RGMA präsentierenden Zellen gemacht werden können.

4.2 Histomorphometrie und Greiftest

Die Ergebnisse unserer histomorphometrischen Untersuchungen zeigen eine signifikant erhöhte Anzahl an myelinisierten Nervenfasern sowie ein größeren Nervenquerschnitt der RGM HZ NM Mäuse im Vergleich zu den WT NM Mäusen. Dennoch werden die funktionellen Defizite der *RGMa^{+/-}*-Mäusen in den eindeutigen Ergebnissen des Greiftests deutlich. Sie erreichten nur knapp über die Hälfte ihrer ursprünglichen Kraft, während die WT-Mäuse nach 50 Tagen nahezu keinen Kraftverlust mehr aufwiesen.

Somit kommt es bei den *RGMa^{+/-}*-Mäusen zu einem vermehrten Auswandern von Axonen im Bereich des untersuchten Segments, ohne dass jedoch eine zufriedenstellende Reinnervation des Endorgans erfolgt. Im Gegensatz dazu erlangen die WT-Mäuse mit einer geringeren Anzahl myelinisierter Fasern eine deutlich bessere Reinnervation. Dieses erstaunliche Ergebnis könnte vor allem durch ein ungerichtetes Axonwachstum und Axonverzweigung erklärbar sein, dem sogenannten Axonal sprouting, bei der zwar eine erhöhte Anzahl an Fortsätzen auswandert, aber in unserem Fall schlussendlich nicht das Zielorgan erreicht.

Diese Erklärung würde mit den bekannten Eigenschaften des RGMA als Hemmer des Axonwachstums, Synapsenbildung und Axonverzweigung im ZNS zusammenpassen (Yoshida, Kubo et al. 2008) (Yamashita, Mueller et al. 2007). Das Axonwachstum sowie die Kollateralenbildung sind Teil eines konstanten plastischen Prozesses, welcher im embryonalen Nervensystem und auch im ausgereiften Nervensystem abläuft. Das ausgereifte Nervensystem muss jedoch eine gewisse Stabilität aufweisen, und darf nicht ständigen Änderungen unterliegen (Mueller, Yamashita et al. 2006). Deshalb kommen gewisse Kontrollmechanismen zum Einsatz, wie zum Beispiel das RGMA und das Myelin-Basic-Protein, die als potente Wachstumshemmer im ZNS an wichtigen Kontaktstellen zwischen der Myelinscheide und dem Axon interagieren, und dadurch ein ungerichtetes Axonwachstum oder eine neue Kollateralbildung verhindern (Schwab, Conrad et al. 2005). Ähnlich könnte es sich auch im peripheren Nervensystem abspielen, wo Schwannzellen, chemorepulsive und chemoattraktive Faktoren eine Leitschiene bilden, welche die Grundvoraussetzung eines gerichteten und kontrollierten Wachstums ist.

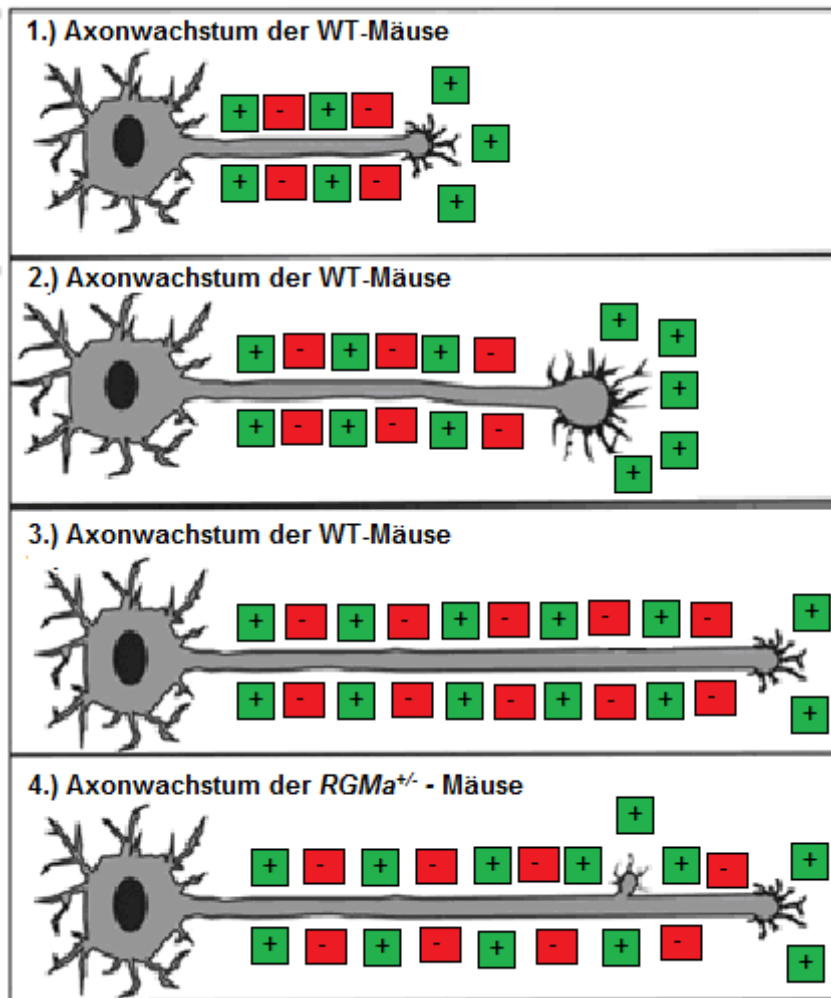


Abb. 21) Schematische Darstellung eines auswandernden Axons in Richtung eines chemoattraktiven Signals bei Wildtypmäusen in Zeile 1-3. Das Axon benötigt eine Wachstumsleitschiene welche aus chemoattraktiven (grüne Kästchen) und chemorepulsiven (rote Kästchen) Substanzen besteht. Kommt es zu einer Störung der repulsiven Substanzen, wie beispielsweise bei den $RGMa^{+/-}$ - Mäusen in der 4. Zeile, wird dieses System aus dem Gleichgewicht gebracht. Dies führt umgehend zu einer unkontrollierten Axonkollateralbildung. Modifiziert nach (McCormick and Leipzig 2012).

Doch gerade dieses filigrane Gleichgewicht zwischen chemorepulsiven und chemoattraktiven Substanzen ist durch die Gendeffizienz der $RGMa$ -Mäuse entscheidend beeinträchtigt. Die hohe Anzahl der auswandernden Kollateralen ist nicht in der Lage das Endorgan zu erreichen, sondern verirrt sich durch ein

ungeregeltes und unkontrolliertes Wachstum im Verlauf. Schuld daran sind vor allem die fehlerhaften Leitstrukturen, die genau diesen Prozess verhindern sollen.

In unseren Untersuchungen wurde jedoch nicht der gesamte Nerv histomorphometrisch untersucht, was das mengemäßige Verhältnis der myelinisierten Fasern im weiteren distalen Verlauf klären würde. Des Weiteren könnten auch mögliche Störungen im Bereich der motorischen Endplatte entstanden sein, da auch Fehler in der Synapsenbildung das schlechte Abschneiden der *RGMa^{+/-}* - Mäuse im Greiftest erklären könnten. Beide Punkte wurden in dieser Studie nicht näher betrachtet.

4.3 Dependent Receptors (abhängige Rezeptoren)

In der embryonalen Entwicklung des Nervensystems spielt das RGMA eine wichtige Rolle als Regulierer des neuronalen Überlebens (Matsunaga and Chedotal 2004). Sein Rezeptor Neogenin gehört zur Gruppe der abhängigen Rezeptoren, welche bei Abwesenheit oder Überexpression ihrer Liganden zur Apoptose der jeweiligen Zelle führen. Dies erfolgt über die Spaltung des Neogenin-Rezeptors, wobei dessen Spaltprodukte die Kaspase-3 aktivieren, welche wiederum die Apoptose induziert. Bei Abwesenheit des Liganden kann Neogenin auch direkt über das Death Associated Protein Kinase (DAPK) die Apoptose induzieren (Koeberle, Tura et al. 2010). Im Fall von Neogenin ist das RGMA als entscheidender Ligand bekannt, während dem Netrin-1 eine untergeordnete Rolle zuzuweisen ist (Matsunaga, Tauszig-Delamasure et al. 2004). Die Unterdrückung apoptotischer Vorgänge ist auch im ausgereiften Nervensystem von enormer Wichtigkeit. Die Forschergruppe um Koeberle untersuchte zum Beispiel das Überleben von retinalen Ganglionzellen nach einer Verletzung. Posttraumatisch wurde intraokulär RGMA injiziert, wodurch es zu einer verminderten Kaspase-3 Aktivität und eine um das vierfach erhöhte

Überlebensrate dieser Zellen kam (Koeberle, Tura et al. 2010). Die neuroprotektive Wirkung von RGMa ist somit mit der antiapoptotischen Wirkung bekannter neurotrophischer Faktoren wie dem BDNF (Koeberle and Ball 2002), IGF-1 (Kermer, Klocker et al. 2000), oder GDNF (Koeberle and Ball 2002) vergleichbar.

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen wiesen bei den *RGMa^{+/-}* - Mäusen zunächst nicht auf einen vermehrten Zelluntergang hin. Statt dessen kommt es bei den operierten *RGMa^{+/-}* - Mäusen, im Vergleich zu den respektiven *sham* Tieren, zu einer signifikant erhöhten Anzahl an auswandernden Nervenfasern. Da jedoch eine Zellteilung bei Neuronen im ausgereiften Nervensystem nicht möglich ist, können diese Ergebnisse nur durch das bereits oben beschriebene Axonal Sprouting erklärt werden. In den histomorphometrischen Untersuchungen ist es nicht möglich, zwischen Axonen und Axonkollateralen zu unterscheiden, so dass eine stark erhöhte Kollateralbildung einen Neuronenuntergang in den mikroskopischen Bildern kaschieren kann. Wie bereits oben beschrieben, neigen die *RGMa^{+/-}* - Mäuse zu einer vermehrten Axonverzweigung nach einem Trauma. Somit ist eine erhöhte Apoptoserate der Neurone nicht auszuschließen, vor allem da das schlechte Abschneiden im Greiftest für einen Zelluntergang sprechen würde. Um diese Frage genau beantworten zu können, müsste die Kaspase-3 Aktivität in den jeweiligen Neuronen untersucht werden und eine histomorphometrische Untersuchung des Vorderhorns im Rückenmark erfolgen.

4.4 Schlussfolgerung

Das Repulsive Guidance Molecule a ist ein neuronales Guidance Molekül, welches im zentralen Nervensystem vor allem als chemorepulsive Substanz und als Regulierer der Apoptose bekannt ist. In unseren Untersuchungen konnten wir zeigen, dass diese Substanz unabdingbar für die periphere

Nervenregeneration ist, da sie ein wichtiger Bestandteil des filigranen Gleichgewichts zwischen chemorepulsiven und -attraktiven Substanzen ist. Die Betrachtung von RGMA als reinen Wachstumshemmer ist somit nicht vollständig, da es weitere wichtige Funktionen in der Nervenregeneration übernimmt. So gehören zu seinen komplexen Aufgaben unter anderem die Bildung einer essentiellen Wachstumsleitschiene, Wachstumsregulierung sowie die Unterdrückung der Apoptose. Bereits kleinste Manipulationen an der RGMA-Produktion reichen aus, um massive Störungen der peripheren Nervenregeneration zu provozieren.

5. Zusammenfassung

Verletzungen des peripheren Nervensystems sind ein häufiges Krankheitsbild in der plastischen Chirurgie. Die dadurch resultierenden Folgen, wie z.B. motorische oder sensible Ausfälle, können zu gravierenden sozialen Beeinträchtigungen und ökonomischen Kosten führen. Bedauerlicherweise zählen diese Verletzungen, trotz großer technischer Fortschritte, immer noch zu den schwierigsten und komplexesten Aufgaben des plastischen Chirurgen und Neurochirurgen. Vor allem langstreckige Nervendefekte bringen ein schlechtes Outcome mit sich. Die Grundlagenforschung der peripheren Nervenregeneration ist deshalb von enormer Bedeutung, da sie neue Lösungsansätze zu finden vermag. Im zentralen Nervensystem konnten bereits mehrere Substanzgruppen und ihre Funktionen identifiziert werden. Im Mittelpunkt der aktuellen Forschung steht unter anderem die Gruppe der neuronalen Guidance Moleküle. Zu ihnen zählt das Repulsive Guidance Molecule A, welches als potenter Axonwachstumshemmer und Regulierer der Apoptose im ZNS bekannt ist. RGMA führt beispielsweise bei Hühnerembryos zu einem Kollaps der Wachstumskegel und wird vermehrt in Glianarben nach einem Trauma im ZNS gefunden. Über seinen Rezeptor Neogenin unterdrückt es zudem apoptotische Vorgänge in den Neuronen. Über dessen Einfluss auf die periphere Nervenregeneration gibt es bisher keine Studien, so dass sich die Frage stellt, ob die Eigenschaften des RGMA im zentralen Nervensystem auch auf das periphere Nervensystem übertragbar sind. In dieser Studie wurde deshalb die Rolle des RGMA in der peripheren Nervenregeneration untersucht. Hierfür wurde der Nervus medianus an gendefizienten *RGMA^{+/-}* - Mäusen und WT-Mäusen durchtrennt und anschließend koaptiert. Der Regenerationsverlauf wurde anhand verschiedener Untersuchungen zwischen den beiden Gruppen verglichen. Es erfolgten Messungen der zeitlichen RGMA-mRNA Expression und der RGMA Protein Expression, sowie histomorphometrische Untersuchungen und die funktionelle Kraftmessung.

An Tag 14 nach der Nervendurchtrennung zeigt sich eine erhöhte RGMA-mRNA und RGMA Proteinexpression im distal der Verletzung gelegenen

Nervensegment. Dieses Ereignis korreliert zeitlich mit dem Einwandern der durchtrennten Axone und spricht für einen direkten Einfluss von RGMA auf Höhe der auswandernden Nervenfasern. In den histomorphometrischen Untersuchungen ist ein vermehrtes Axonwachstum bei vergrößertem Nervenquerschnitt der RGM HZ NM Mäuse im Vergleich zu ihren Kontroll-Tieren und WT-Mäusen zu sehen. Im funktionellen Greiftest schneiden die RGM HZ NM Mäuse am schlechtesten ab. Sie erreichen nur knapp die Hälfte ihrer ursprünglichen Kraft, während die WT NM Mäuse nahezu vollständig regenerieren. Insgesamt gesehen ist die Nervenregeneration der *RGMa^{+/-}* - Mäuse derjenigen der Wildtyp-Regeneration deutlich unterlegen. Dieses Ergebnis ist durch mehrere Modelle erklärbar. Durch das Wegfallen einer wichtigen chemorepulsiven Substanz kommt es zunächst zu einem verstärkten Auswandern von Axonen und ihren Kollateralen. Chemorepulsive Faktoren scheinen jedoch eine wichtige Funktion für die gezielte Nervenregeneration zu haben. Ohne sie kommt es zu einem ungerichteten Nervenwachstum, was zu einer nicht zufriedenstellenden Reinnervation des Endorgans führt. Des Weiteren kann es durch die Störung im Bereich der Apoptose-Hemmung zu einem vermehrten Absterben der Neurone kommen. Dies würde sich ebenfalls in Form einer schlechten Reinnervation zeigen. Das RGMA ist somit nicht nur als potenter Axonwachstumshemmer, sondern auch als Wachstumsführer und Apoptosehemmer an der Nervenregeneration beteiligt. Zusammenfassend zeigt sich, dass der Erfolg der peripheren Nervenregeneration von einem intakten Gleichgewicht verschiedener Faktoren abhängig ist. Hierzu gehören direkte Zellkontakte sowie chemorepulsive und chemoattraktive Substanzen. An diesem Gleichgewicht sind alle Substanzen gleichermaßen beteiligt, so dass bereits kleinste Manipulationen zu einem Kollaps des Systems führen.

6. Literaturverzeichnis

Allodi, I., E. Udina, et al. (2012). "Specificity of peripheral nerve regeneration: Interactions at the axon level." *Prog Neurobiol* 98(1): 16-37.

Apfel, S. C. (2000). "Neurotrophic factors and pain." *Clin J Pain* 16(2 Suppl): S7-11.

Barrette, B., M. A. Hebert, et al. (2008). "Requirement of myeloid cells for axon regeneration." *J Neurosci* 28(38): 9363-9376.

Battiston, B., S. Geuna, et al. (2005). "Nerve repair by means of tubulization: literature review and personal clinical experience comparing biological and synthetic conduits for sensory nerve repair." *Microsurgery* 25(4): 258-267.

Battiston, B., P. Tos, et al. (2000). "Nerve repair by means of vein filled with muscle grafts I. Clinical results." *Microsurgery* 20(1): 32-36.

Berger, A. (2002). *Plastische Chirurgie: Grundlagen, Prinzipien, Techniken: Bd 1*.

Berger, A., P. J. Flory, et al. (1990). "Muscle transfers in brachial plexus lesions." *J Reconstr Microsurg* 6(2): 113-116.

Berger, A., E. Schaller, et al. (1991). "Brachial plexus injuries: an integrated treatment concept." *Ann Plast Surg* 26(1): 70-76.

Bertelli, J. A. and J. C. Mira (1995). "The grasping test: a simple behavioral method for objective quantitative assessment of peripheral nerve regeneration in the rat." *J Neurosci Methods* 58(1-2): 151-155.

Bosse, F. (2012). "Extrinsic cellular and molecular mediators of peripheral axonal regeneration." *Cell Tissue Res* 349(1): 5-14.

Boyd, J. G. and T. Gordon (2003). "Glial cell line-derived neurotrophic factor and brain-derived neurotrophic factor sustain the axonal regeneration of chronically axotomized motoneurons in vivo." *Exp Neurol* 183(2): 610-619.

Brushart, T. M., J. Gerber, et al. (1998). "Contributions of pathway and neuron to preferential motor reinnervation." *J Neurosci* 18(21): 8674-8681.

Buchthal, F. and V. Kuhl (1979). "Nerve conduction, tactile sensibility, and the electromyogram after suture or compression of peripheral nerve: a longitudinal study in man." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 42(5): 436-451.

Burnett, M. G. and E. L. Zager (2004). "Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review." *Neurosurg Focus* 16(5): E1.

Chilton, J. K. (2006). "Molecular mechanisms of axon guidance." *Dev Biol* 292(1): 13-24.

Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Anal Biochem* 162(1): 156-159.

Conrad, S., H. Genth, et al. (2007). "Neogenin-RGMA signaling at the growth cone is bone morphogenetic protein-independent and involves RhoA, ROCK, and PKC." *J Biol Chem* 282(22): 16423-16433.

Dubovy, P. (2011). "Wallerian degeneration and peripheral nerve conditions for both axonal regeneration and neuropathic pain induction." *Ann Anat* 193(4): 267-275.

English, A. W. (2003). "Cytokines, growth factors and sprouting at the neuromuscular junction." *J Neurocytol* 32(5-8): 943-960.

Fawcett, J. W. and R. A. Asher (1999). "The glial scar and central nervous system repair." *Brain Res Bull* 49(6): 377-391.

Fawcett, J. W. and R. J. Keynes (1990). "Peripheral nerve regeneration." *Annu Rev Neurosci* 13: 43-60.

Fitzgerald, D. P., D. Bradford, et al. (2007). "Neogenin is expressed on neurogenic and gliogenic progenitors in the embryonic and adult central nervous system." *Gene Expr Patterns* 7(7): 784-792.

Fojuth, F. (2011). *Zur Morphologie der peripheren Nervenregeneration und zur Beeinflussung des axonalen Regenerationsverhaltens durch elektrische Nervenstimulation.* Medizinische Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin, Berlin.

Friede, R. L. and R. Bischhausen (1980). "The fine structure of stumps of transected nerve fibers in subserial sections." *J Neurol Sci* 44(2-3): 181-203.

Fu, S. Y. and T. Gordon (1997). "The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration." *Mol Neurobiol* 14(1-2): 67-116.

Galtrey, C. M. and J. W. Fawcett (2007). "Characterization of tests of functional recovery after median and ulnar nerve injury and repair in the rat forelimb." *J Peripher Nerv Syst* 12(1): 11-27.

Geuna, S. (2005). "The revolution of counting "tops": two decades of the disector principle in morphological research." *Microsc Res Tech* 66(5): 270-274.

Geuna, S., D. Gigo-Benato, et al. (2004). "On sampling and sampling errors in histomorphometry of peripheral nerve fibers." *Microsurgery* 24(1): 72-76.

Geuna, S., P. Tos, et al. (2000). "Verification of the two-dimensional disector, a method for the unbiased estimation of density and number of myelinated nerve fibers in peripheral nerves." *Ann Anat* 182(1): 23-34.

Geuna, S., P. Tos, et al. (2001). "Methodological issues in size estimation of myelinated nerve fibers in peripheral nerves." *Anat Embryol (Berl)* 204(1): 1-10.

Giger, R. J., E. R. Hollis, 2nd, et al. (2010). "Guidance molecules in axon regeneration." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(7): a001867.

Goldschneider, D. and P. Mehlen (2010). "Dependence receptors: a new paradigm in cell signaling and cancer therapy." *Oncogene* 29(13): 1865-1882.

Goodrum, J. F., T. Earnhardt, et al. (1994). "Fate of myelin lipids during degeneration and regeneration of peripheral nerve: an autoradiographic study." *J Neurosci* 14(1): 357-367.

Gordon, T. (2010). "The physiology of neural injury and regeneration: The role of neurotrophic factors." *J Commun Disord* 43(4): 265-273.

Gordon, T., K. M. Chan, et al. (2009). "Accelerating axon growth to overcome limitations in functional recovery after peripheral nerve injury." *Neurosurgery* 65(4 Suppl): A132-144.

Hata, K., M. Fujitani, et al. (2006). "RGMA inhibition promotes axonal growth and recovery after spinal cord injury." *J Cell Biol* 173(1): 47-58.

Hirokawa, N. (1993). "Mechanism of axonal transport. Identification of new molecular motors and regulations of transports." *Neurosci Res* 18(1): 1-9.

Holland, N. (2011) Traumatic peripheral nerve lesions and management.

Holzapfel, B. W., L (2007). "Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete." *Biologie in unserer Zeit* 37(2).

Hong, K. and M. Nishiyama (2010). "From guidance signals to movement: signaling molecules governing growth cone turning." *Neuroscientist* 16(1): 65-78.

Jaminet, P., D. Kohler, et al. (2013). "Expression patterns and functional evaluation of the UNC5b receptor during the early phase of peripheral nerve regeneration using the mouse median nerve model." *Microsurgery* 33(3): 216-222.

Jaminet, P., D. Kohler, et al. (2013). "Evaluating the role of Netrin-1 during the early phase of peripheral nerve regeneration using the mouse median nerve model." *Restor Neurol Neurosci* 31(3): 337-345.

Jaminet, P., M. Schaufele, et al. (2012). "[Scope and limitations of the median nerve mouse model in research on peripheral nerve regeneration]." *Handchir Mikrochir Plast Chir* 44(4): 204-208.

Kermer, P., N. Klocker, et al. (2000). "Insulin-like growth factor-I protects axotomized rat retinal ganglion cells from secondary death via PI3-K-dependent Akt phosphorylation and inhibition of caspase-3 In vivo." *J Neurosci* 20(2): 2-8.

Koeberle, P. D. and A. K. Ball (2002). "Neurturin enhances the survival of axotomized retinal ganglion cells in vivo: combined effects with glial cell line-derived neurotrophic factor and brain-derived neurotrophic factor." *Neuroscience* 110(3): 555-567.

Koeberle, P. D., A. Tura, et al. (2010). "The repulsive guidance molecule, RGMa, promotes retinal ganglion cell survival in vitro and in vivo." *Neuroscience* 169(1): 495-504.

Kreyenborg, M. (2008). *Automatisierung der morphometrischen Analyse des Neokortex von Tau-transgenen Mäusen*. GRIN, Verlag für akademische Texte.

Kuffler, D. P., I. J. Sosa, et al. (2009). "Schwann cell chondroitin sulfate proteoglycan inhibits dorsal root ganglion neuron neurite outgrowth and substrate specificity via a soma and not a growth cone mechanism." *J Neurosci Res* 87(13): 2863-2871.

Luis, A. L., S. Amado, et al. (2007). "Long-term functional and morphological assessment of a standardized rat sciatic nerve crush injury with a non-serrated clamp." *J Neurosci Methods* 163(1): 92-104.

Madduri, S. and B. Gander (2010). "Schwann cell delivery of neurotrophic factors for peripheral nerve regeneration." *J Peripher Nerv Syst* 15(2): 93-103.

Manoli, T., L. Schulz, Stahl, S., Jaminet, P., Schaller, H.-E. (2013). "Evaluation of sensory recovery after reconstruction of digital nerves of the hand using muscle-in-vein conduits in comparison to nerve suture or nerve transplantation." Submitted to *Plastic and Reconstructive Surgery* 2013.

Matejcik, V. and G. Penzesova (2006). "Surgery of the peripheral nerves." *Bratisl Lek Listy* 107(3): 89-92.

Matsunaga, E. and A. Chedotal (2004). "Repulsive guidance molecule/neogenin: a novel ligand-receptor system playing multiple roles in neural development." *Dev Growth Differ* 46(6): 481-486.

Matsunaga, E., S. Tauszig-Delamasure, et al. (2004). "RGM and its receptor neogenin regulate neuronal survival." *Nat Cell Biol* 6(8): 749-755.

McCormick, A. M. and N. D. Leipzig (2012). "Neural regenerative strategies incorporating biomolecular axon guidance signals." *Ann Biomed Eng* 40(3): 578-597.

Morris, J. H., A. R. Hudson, et al. (1972). "A study of degeneration and regeneration in the divided rat sciatic nerve based on electron microscopy. 3. Changes in the axons of the proximal stump." *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 124(2): 131-164.

Morris, J. H., A. R. Hudson, et al. (1972). "A study of degeneration and regeneration in the divided rat sciatic nerve based on electron microscopy. II. The development of the "regenerating unit". " *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 124(1): 103-130.

Mueller, B. K., T. Yamashita, et al. (2006). "The role of repulsive guidance molecules in the embryonic and adult vertebrate central nervous system." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361(1473): 1513-1529.

Naidu, M. (2009). "The role of cells, neurotrophins, extracellular matrix and cell surface molecules in peripheral nerve regeneration." *Malays J Med Sci* 16(2): 10-14.

Oldekamp, J., N. Kramer, et al. (2004). "Expression pattern of the repulsive guidance molecules RGM A, B and C during mouse development." *Gene Expr Patterns* 4(3): 283-288.

Pabari, A., S. Y. Yang, et al. (2010). "Modern surgical management of peripheral nerve gap." *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 63(12): 1941-1948.

Patodia, S. and G. Raivich (2012). "Downstream effector molecules in successful peripheral nerve regeneration." *Cell Tissue Res* 349(1): 15-26.

Perry, V. H. and M. C. Brown (1992). "Macrophages and nerve regeneration." *Curr Opin Neurobiol* 2(5): 679-682.

Pfaffl, M.-W. (2004). "Real Time PCR: neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung." *BIOspektrum* 1/04 10. Jahrgang.

Pina-Oviedo, S. and C. Ortiz-Hidalgo (2008). "The normal and neoplastic perineurium: a review." *Adv Anat Pathol* 15(3): 147-164.

Quarles, R. H. (2002). "Myelin sheaths: glycoproteins involved in their formation, maintenance and degeneration." *Cell Mol Life Sci* 59(11): 1851-1871.

Schaller, H.-E. (1990). "Die Bedeutung des MHC und non MHC für das allogene periphere Nerven-Transplantat im Tiermodell an der Ratte." Habilitationsschrift.

Schaller H.-E., B. A. (1998). "Muskuläre Ersatzoperationen bei der Plexus brachialis-Lähmung." Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbericht: 554-555.

Schaller, H. E. (2006). "Nervenrekonstruktion und Nervenersatzoperation." Trauma und Berufskrankheit 8(1).

Scherer, S. S. and E. J. Arroyo (2002). "Recent progress on the molecular organization of myelinated axons." J Peripher Nerv Syst 7(1): 1-12.

Schiebler, T. H. S., W.; (2002). Anatomie, Springer-Verlag.

Schlosshauer, B., L. Dreesmann, et al. (2006). "Synthetic nerve guide implants in humans: a comprehensive survey." Neurosurgery 59(4): 740-747; discussion 747-748.

Schwab, J. M., S. Conrad, et al. (2005). "Spinal cord injury-induced lesional expression of the repulsive guidance molecule (RGM)." Eur J Neurosci 21(6): 1569-1576.

Schwab, J. M., P. P. Monnier, et al. (2005). "Central nervous system injury-induced repulsive guidance molecule expression in the adult human brain." Arch Neurol 62(10): 1561-1568.

Schwab, M. E. and D. Bartholdi (1996). "Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord." Physiol Rev 76(2): 319-370.

Serafini, T., S. A. Colamarino, et al. (1996). "Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system." Cell 87(6): 1001-1014.

Sinis, N., A. Kraus, et al. (2009). "Concepts and developments in peripheral nerve surgery." Clin Neuropathol 28(4): 247-262.

Sinis, N., H. E. Schaller, et al. (2007). "Comparative neuro tissue engineering using different nerve guide implants." Acta Neurochir Suppl 100: 61-64.

Stahl, B., B. Müller, et al. (1990). "Biochemical characterization of a putative axonal guidance molecule of the chick visual system." Neuron 5(5): 735-743.

Stoll, G., J. W. Griffin, et al. (1989). "Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation." J Neurocytol 18(5): 671-683.

Stoll, G. and H. W. Müller (1999). "Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights." Brain Pathol 9(2): 313-325.

Sunderland, S. (1951). "A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function." *Brain* 74(4): 491-516.

Terenghi, G. (1999). "Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors." *J Anat* 194 (Pt 1): 1-14.

Tessier-Lavigne, M. and C. S. Goodman (1996). "The molecular biology of axon guidance." *Science* 274(5290): 1123-1133.

Tos, P., B. Battiston, et al. (2000). "Tissue specificity in rat peripheral nerve regeneration through combined skeletal muscle and vein conduit grafts." *Microsurgery* 20(2): 65-71.

Welsch U., D. T. (2010). *Sobotta Lehrbuch Histologie: Unter Mitarbeit von Thomas Deller*. München, Elsevier Urban und Fischer.

Wilson, N. H. and B. Key (2007). "Neogenin: one receptor, many functions." *Int J Biochem Cell Biol* 39(5): 874-878.

Witzel, C., C. Rohde, et al. (2005). "Pathway sampling by regenerating peripheral axons." *J Comp Neurol* 485(3): 183-190.

Wong, B. J. and D. E. Mattox (1991). "Experimental nerve regeneration. A review." *Otolaryngol Clin North Am* 24(3): 739-752.

Wong, S. T., J. R. Henley, et al. (2002). "A p75(NTR) and Nogo receptor complex mediates repulsive signaling by myelin-associated glycoprotein." *Nat Neurosci* 5(12): 1302-1308.

Yamashita, T., B. K. Mueller, et al. (2007). "Neogenin and repulsive guidance molecule signaling in the central nervous system." *Curr Opin Neurobiol* 17(1): 29-34.

Yegiyants, S., D. Dayicioglu, et al. (2010). "Traumatic peripheral nerve injury: a wartime review." *J Craniofac Surg* 21(4): 998-1001.

Yoshida, J., T. Kubo, et al. (2008). "Inhibition of branching and spine maturation by repulsive guidance molecule in cultured cortical neurons." *Biochem Biophys Res Commun* 372(4): 725-729.

Zochodne, D. W. (2012). "The challenges and beauty of peripheral nerve regrowth." *J Peripher Nerv Syst* 17(1): 1-18.

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Schaller für die Überlassung dieses interessanten Themas, sowie für die Betreuung und Begutachtung meiner Dissertation bedanken. Dank Ihrer wissenschaftlichen Hilfestellungen war es möglich diese Arbeit abzuschließen.

Mein herzlicher Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Rosenberger der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin für die Bereitstellung des Labors und Unterstützung in der Ergebnisauswertung.

Des Weiteren möchte ich Herrn Dr. David Köhler für die stete geduldige Zusammenarbeit danken.

Ein einfaches Dankeschön reicht für meinen Betreuer Herrn Dr. Jaminet nicht aus. Ich habe die Zeit die wir zusammen verbracht haben sehr genossen und mich immer darauf gefreut. Ich bin mir sicher dass mir etwas besseres nicht hätte passieren können. Vielen vielen Dank für alles, wissenschaftlich wie menschlich!

Natürlich möchte ich mich auch bei meinen Eltern bedanken, porque sin ustedes nunca estaria donde estoy ahora.