

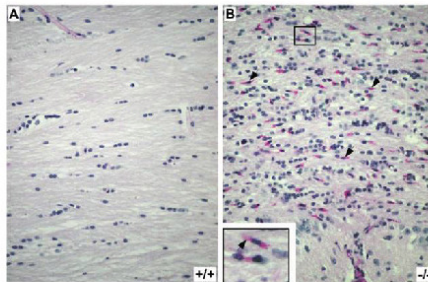



Corinna Lappe-Siefke (Autor)

# **Inaktivierung des CNP-Gens in der Maus und Expression der Cre-Rekombinase in myelinisierenden Gliazellen**

Corinna Lappe-Siefke

**Inaktivierung des CNP-Gens in der Maus und  
Expression der Cre-Rekombinase in  
myelinisierenden Gliazellen**



 Cuvillier Verlag Göttingen

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/3608>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,  
Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: [info@cuvillier.de](mailto:info@cuvillier.de), Website: <https://cuvillier.de>

## I Einleitung

### **1. Das Nervensystem und seine Entstehung**

Auf zellulärer Ebene setzt sich das Nervensystem im wesentlichen aus zwei zentralen Bausteinen zusammen, den Neuronen und der Neuroglia. Im menschlichen Nervensystem gibt es ca.  $10^{12}$  Neuronen, die über synaptische Kontaktstellen miteinander verknüpft sind (KANDEL ET AL., 2000). Die Aufgabe von Neuronen besteht im Empfang, in der Verarbeitung und der Weiterleitung von Signalen. Morphologisch bestehen sie aus dem Zellkörper oder Perikaryon, den Signal empfangenden Dendriten sowie dem Signal weiterleitenden Axon und stellen eine funktionelle Einheit dar. Die Axone sind in bestimmten Abständen von einer Markscheide (Myelin) umhüllt, um eine schnelle (saltatorische) Reizweiterleitung zu gewährleisten. Die Markscheiden werden immer wieder durch nicht-myelinisierte Bereiche unterbrochen, den sogenannten Ranvierschen Schnürringen. Am Ende eines Axons befinden sich Synapsen, die der Signalweiterleitung von einem Neuron auf das nächste oder auf einen Muskel dienen. Zur Neuroglia, die, verglichen mit Neuronen, ca. das 10-50fache an Zellen umfaßt, gehören verschiedene Zelltypen: die Myelin-bildenden Oligodendrozyten (ZNS) und Schwannzellen (PNS), die Astrozyten und die Mikroglia. Auf einige dieser Zelltypen wird im einzelnen noch genauer eingegangen (2.1 und 2.2).

Die Neurogenese, also die Entwicklung des Nervensystems auf zellulärer Ebene, vollzieht sich in mehreren, zeitlich überlappenden Schritten, wie neuronale Proliferation, Migration, Differenzierung, Zellreifung und Zelltod. Sie erstreckt sich von der Proliferation bestimmter Stammzellen über diverse Zellteilungen von Vorläuferzellen bis hin zu den verschiedenen differenzierten Zelltypen des Nervensystems (KANDEL ET AL., 2000).

Das Neuralrohr besteht zunächst aus einer einzigen Schicht von Neuroepithelzellen, wird aber im Laufe der Entwicklung mehrschichtig. Aus der einschichtigen Ventrikularzone, welche die neuralen Stammzellen enthält, wird im ausgewachsenen Gehirn die Ventrikel auskleidende Ependymschicht (JOHANSSON ET AL., 1999). Die Subventrikularzone umgibt im Neuralrohr die Ventrikularzone. In diese Schicht wandern frühe Vorläuferzellen, welche die Ventrikularzone verlassen haben, aus. Auch die Subventrikularzone ist im ventrikulären System des bereits entwickelten Gehirns vorhanden und schließt sich an die einzellige Ependymschicht an (JOHANSSON ET AL., 1999). Das Neuralrohr wird im Laufe der Entwicklung entlang der dorso-ventralen bzw. anterior-posterioren Achse regionalisiert (JESSELL & SANES, 2000). Die entstehenden Regionen werden durch sezernierte Faktoren etabliert. Entlang der dorso-ventralen Achse scheinen die entscheidenden zwei Faktoren zur „hedgehog“- bzw. zur BMP- („bone morphogenetic protein“) Familie zu gehören.

Vereinfacht dargestellt, markieren die Mitglieder der „hedgehog“-Familie die ventrale und die der BMP-Familie die dorsale Grenze der Achse. Das Schicksal der Neuroepithelzellen hängt also maßgeblich von ihrer Interaktion mit Signalen aus ihrer Umgebung ab (JESSELL & SANES, 2000). Da Neuroepithelzellen multipotent sind, können sie prinzipiell unabhängig von ihrem dorsalen oder ventralen Ursprung zu Oligodendrozyten, Astrozyten und Neuronen werden (CHANDRAN ET AL., 1998). Im Prinzip findet die Entwicklung der Gliazellen nach der der Neuronen statt, jedoch überlappt die Gliogenese in einigen Bereichen des Gehirns die Neurogenese (LEE ET AL., 2000).

## **2. Neuroglia**

Die Neuroglia oder kurz Glia des Nervensystems, die sich überwiegend vom Ektoderm ableitet, übernimmt innerhalb des Nervensystem sehr unterschiedliche Aufgaben. Neben Stützfunktionen haben Gliazellen auch Einfluß auf physiologische Prozesse der Neuronen. Darüber hinaus nehmen sie eine bedeutende Rolle bei pathologischen Prozessen des Nervensystems ein. Der Neuroglia des ZNS sind verschiedene Typen von Zellen zuzuordnen, die Oligodendrozyten, die Mikroglia und die Astrozyten. Der hauptsächlich vorkommende Gliazelltyp im PNS sind die Schwannzellen, welche die Aufgabe der Myelinisierung von peripheren Neuronen übernehmen. Die Charakteristika und Funktionen der für die vorliegende Arbeit relevanten Zelltypen werden nachstehend genauer beschrieben.

### **2.1 Oligodendrozyten und Schwannzellen**

Oligodendrozyten stammen von migratorischen, proliferierenden Vorläuferzellen ab und differenzieren zu postmitotischen myelin-produzierenden Zellen. Die Oligodendrozyten-Vorläuferzellen selbst entwickeln sich aus neuroepithelialen Vorläufern des ventralen Neuralrohrs (ORENTAS & MILLER, 1998; RICHARDSON, 2000). Im Rückenmark stammen sie aus einer Subdomäne des ventralen Neuroepithels (MILLER, 1996) und somit aus der gleichen Region, aus der vorher Motoneuronen entstehen (SOULA ET AL., 2001; KESSARIS ET AL., 2001). An der Regulierung der Umstellung zwischen der Differenzierung von Vorläuferzellen zu Motoneuronen oder zu Oligodendrozyten sind diverse Transkriptionsfaktoren beteiligt. Dazu gehören z.B. Olig2, Neurogenin1/2 sowie Pax6 und Nkx2.2 (MIZUGUCHI ET AL., 2001; NOVITCH ET AL., 2001; ZHOU ET AL., 2001), deren kombinatorische Expression die Differenzierungsrichtung von Vorläuferzellen innerhalb des Neuralrohrs bestimmt.

Oligodendrozyten bilden die Myelinscheide um die Axone von Neuronen in der weißen Substanz des ZNS. Auch in der grauen Substanz sind Oligodendrozyten als sogenannte Satellitenzellen vorhanden. Oligodendrozyten besitzen nur wenige kaum verzweigte Fortsätze. Ein Oligodendrozyt kann mehrere Axone mit seinen Fortsätzen bis zu 160 mal umwickeln (PANNESSE, 1994).

Die Entwicklung von Oligodendrozyten ausgehend von Vorläufern hin zu myelinisierenden Gliazellen unterliegt unterschiedlichen Einflüssen, zu denen frühe regionale und späte axonale Signale gehören. Als ein entscheidendes Signalmolekül für die frühe Spezifizierung von Oligodendrozyten-Vorläufern wird SHH („sonic hedgehog“) angesehen. Die Mitglieder der „hedgehog“-Familie markieren die ventrale Grenze der dorso-ventralen Achse im embryonalen Neuralrohr (JESSELL & SANES, 2000). Das ventrale Neuralrohr, aus dem Oligodendrozyten vermutlich stammen, weist einen SHH-Gradienten auf (ECHELARD ET AL., 1993). Dieses Signalprotein ist notwendig für die Differenzierung von Oligodendrozyten (TROUSSE ET AL., 1995; PONCET ET AL., 1996; PRINGLE ET AL., 1996). Ein Ablocken der Signalwirkung von SHH kann *in vivo* und *in vitro* die Induktion von Oligodendrozyten des ventralen Rückenmarkes unterbinden (ORENTAS ET AL., 1999; NERY ET AL., 2001).

Während der Entwicklung von Oligodendrozyten sind ihre einzelnen Stadien anhand der Expression spezifischer Marker zu identifizieren. Die Entwicklungsstadien von Oligodendrozyten unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Teilungskapazität, Migrationsfähigkeit und ihrer Morphologie (PFEIFFER ET AL., 1993).

Die sehr frühen Vorläuferzellen sind monopolare, proliferative Zellen, welche die embryonale Form des neuronalen Zelladhäsions-Molekül (E-NCAM) exprimieren (HARDY & REYNOLDS, 1991). Diese frühen Vorläufer differenzieren zu migrierenden bipolaren Vorläufern, die immer noch teilungsfähig sind. Sie proliferieren in der Gegenwart verschiedener Wachstumsfaktoren wie PDGF und FGF (PFEIFFER ET AL., 1993). Charakteristisch für dieses Entwicklungsstadium ist die Anwesenheit eines spezifischen Zelloberflächenantigens, welches mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers A2B5 nachgewiesen werden kann. Es wurde gezeigt, daß die Expression von PDGFR- $\alpha$  (Blutplättchen-Wachstumsfaktor-Rezeptor- $\alpha$ ) in Verbindung mit A2B5-Immunreaktivität Oligodendrozyten-Vorläufer definiert (HALL ET AL., 1996). *In vitro* gelten die A2B5<sup>+</sup> Vorläufer als bipotente Zellen (O-2A), die auf der einen Seite zu einer bestimmten Subpopulation von Astrozyten (Typ2 Astrozyten) und auf der anderen zu Oligodendrozyten differenzieren können (RAFF ET AL., 1983). Die Richtung der Differenzierung hängt von den Zellkulturbedingungen ab (RAFF, 1989). Die Existenz der O-2A Zelle *in vivo* ist jedoch bis heute umstritten (FULTON ET AL., 1992; PFEIFFER ET AL., 1993; MILLER, 1996). A2B5<sup>+</sup> Zellen reifen zu multipolaren Pro-Oligodendroblasten heran, die weniger oder gar nicht mehr migrieren (WARRINGTON ET AL.,

1993) und anhand der Expression des Glykolipides Galaktosulfatid (nachweisbar durch O4 Antikörper) zu identifizieren sind (SOMMER & SCHACHNER, 1991; BANSAL ET AL., 1992). Des weiteren verlieren sie die Eigenschaft, in Gegenwart von PDGF zu proliferieren (FOK-SEANG & MILLER, 1994). Der Beginn der terminalen Differenzierung geht einher mit dem Austritt aus dem Zellzyklus (HART ET AL., 1989; GARD & PFEIFFER ET AL., 1990) und der Expression des Hauptmyelinglykolipides Galaktocerebrosid (nachweisbar durch O1-Antikörper) sowie der Expression von Sulfatid und der 2'3'-zyklische Nukleotid 3'-Phosphodiesterase (CNP) (RAFF ET AL., 1978, SOMMER & SCHACHNER, 1981; PFEIFFER ET AL., 1993). Die Reifung der Oligodendrozyten ist mit der Expression der Hauptmyelogene MBP (STERNBERGER ET AL., 1978) und PLP sowie der Myelinisierung der Axone abgeschlossen (LEMKE, 1988). Dabei durchlaufen sie die bis heute nur teilweise verstandene Umwandlung von premyelinisierenden Zellen zu myelinisierenden Oligodendrozyten, die mit der Remodellierung der Fortsätze zur Myelinmembran einhergeht (HARDY & FRIEDRICH, 1996). Bei diesem Vorgang scheint die Neuron-Glia Interaktion von besonderer Bedeutung zu sein (Übersicht in BARRES & RAFF, 1999). So werden für die Ausbildung des Myelins Faktoren, die von Axonen stammen, benötigt. Dazu zählt z.B. das Signal-Molekül Neuregulin (ADLKOEFER & LAI, 2000).

Der Hauptgliazelltyp des PNS, die Schwannzelle, leitet sich von pluripotenten Vorläufern der Neuralleiste ab (LE DOUARIN ET AL., 1991; JESSEN & MIRSKY 1992; JESSEN & MIRSKY 1998). Schwannzellen sind für die Myelinisierung der Neuronen des PNS zuständig und stellen somit das peripher nervöse Äquivalent zu den Oligodendrozyten des ZNS dar. Die Entwicklung bzw. Differenzierung von Schwannzellen hängt unter anderem von der Interaktion mit Axonen ab und wird durch die Anwesenheit von extrinsischen Signalen beeinflusst (SHAH ET AL., 1994; JESSEN & MIRSKY, 1998). In Zellkulturexperimenten konnte gezeigt werden, daß z.B.  $\beta$ -Neureguline (NRG- $\beta$ ) Neuralleistenzellen daran hindern, eine neuronale Entwicklungs-Richtung einzuschlagen und sie stattdessen in Richtung Glia-Differenzierung beeinflussen (SHAH ET AL., 1994). Im letzten Schritt der Differenzierung entstehen aus den unreifen Schwannzellen die nicht-myelinisierenden und die myelinisierenden Schwannzellen. Dieser letzte Entwicklungsschritt findet in Nagern postnatal statt und ist reversibel (JESSEN & MIRSKY 1991, 1998). Die nicht-myelinisierenden Schwannzellen umgeben meistens gebündelte kleinkalibrige Axone. Jede myelinisierende Schwannzelle umwickelt mit ihren Fortsätzen im Gegensatz zu den Oligodendrozyten im ZNS nur ein Axon (ARROYO & SCHERER, 2000).