

Aus dem Institut für Tierpathologie
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie
Vorstand: Prof. Dr. Wolfgang Schmahl

Angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. Wolfgang Schmahl

**Die Wechselbeziehungen zwischen der Myelinbildung
und dem Phänotyp der Axone
im Zentralen und im Peripheren Nervensystem der Säugetiere**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Michaela Jüstel
aus
Gräfelfing

München 2004

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle

Referent: Univ.-Prof. Dr. W. Schmahl

Korreferentin: Univ.-Prof. Dr. C. Poulsen Nautrup

Tag der Promotion: 13. Februar 2004

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Das Neuron	2
2.1	Allgemeiner Aufbau einer Nervenzelle.....	2
2.2	Das Neuronenzytoskelett.....	4
2.2.1	Neurofilamente	4
2.2.2	Mikrotubuli	6
2.2.3	Mikrofilamente	9
2.2.4	Variationen des Zytoskeletts innerhalb des Axons	10
3.	Die Myelinscheide	13
3.1	Anatomischer Aufbau.....	13
3.2	Biochemischer Aufbau	16
3.2.1	Lipide.....	16
3.2.2	Proteine.....	17
3.2.2.1	Myelinproteine des ZNS.....	17
3.2.2.2	Myelinproteine des PNS	18
3.3	Bildung der Myelinscheide.....	20
3.4	Faktoren mit Einfluss auf die Myelinbildung	22
3.4.1	Axonaler Kontakt.....	23
3.4.2	Axonkaliber	24
3.4.3	Expressionsmuster verschiedener Proteine	24
3.4.3.1	P0-Protein	24
3.4.3.2	Krox-20.....	25
3.4.3.3	Myelin-assoziiertes Glycoprotein	26
3.4.4	Neuronale Impulsfrequenz.....	27

3.4.5	Wachstumsfaktoren im ZNS.....	28
3.4.6	Wachstumsfaktoren im PNS.....	28
4.	Einfluss der myelinbildenden Zellen auf das Neuron	30
<hr/>		
4.1	Das Zytoskelett des Axons	30
4.1.1	Neurofilament-Akkumulation.....	31
4.1.2	Neurofilament-Organisation	32
4.1.3	Neurofilament-Phosphorylierung.....	34
4.1.4	Axonaler Transport	35
4.1.5	Spezielle Rolle von MAG.....	36
4.1.6	Mikrotubuli-Anzahl und –Dichte.....	37
4.2	Entwicklung, Wachstum und Regeneration des Neurons	38
4.2.1	Embryonale und neonatale Entwicklung	38
4.2.2	Wachstum und Stabilisierung	40
4.2.3	Regeneration verletzter Axone	42
4.2.4	Spezielle Rolle von P0	44
5.	Das Axon-Kaliber	46
<hr/>		
5.1	Bedeutung der Neurofilamente	48
5.1.1	Neurofilament-Anzahl und –Anordnung.....	49
5.1.2	Neurofilament-Phosphorylierung.....	50
5.1.3	Bedeutung der Zusammensetzung der Neurofilamente aus den Untereinheiten NF-L, NF-M und NF-H	52
5.2	Bedeutung der Mikrotubuli.....	57
5.3	Bedeutung der elektrischen Aktivität des Neurons	62
5.4	Bedeutung des peripheren Innervationsgebietes.....	66
6.	Wechselseitige Beziehungen zwischen Axon und Myelinhülle	69
<hr/>		
7.	Zusammenfassung	74
<hr/>		

INHALTSVERZEICHNIS

8.	Summary	76
9.	Abkürzungsverzeichnis	78
10.	Literaturverzeichnis	81

1. Einleitung

Die Neurobiologie ist eines der am stärksten wachsenden Wissensgebiete unserer Zeit. Insbesondere durch die Entdeckung pluripotenter neuronaler Stammzellen im adulten zentralen Nervensystem stellen sich Fragen nach deren Differenzierungspotential. Während man früher der Annahme war, dass die Bildung von Nervenzellen mit der Geburt endgültig abgeschlossen sei, werden heute Überlegungen angestrengt, ob und inwieweit die Möglichkeit besteht, dass sich diese Stammzellen zu reifen Nervenzellen differenzieren und in die histologische Architektur des Nervensystems eingebaut werden könnten. Im Mittelpunkt des Interesses steht dabei sowohl die Funktion der neonatal ausgebildeten, aber auch der im Rahmen einer möglichen Regeneration verletzten Nervengewebes neu hinzutretenden Neuronen, ebenso die Verknüpfung zwischen Neuronen und Rezeptoren, sowie von Neuronen untereinander. Auch die Beziehungen zwischen Neuronen und ihren Gliazellen werden intensiv erforscht. Seit der Entstehung der Neurowissenschaften wird beobachtet, dass Axone und Dendriten nicht nur in der Länge, sondern auch in Kaliber und Myelinisierungsgrad stark variieren. Hieraus ergibt sich die Frage, in welcher Weise diese Parameter untereinander kausal verknüpft sind. Ziel dieser Arbeit ist es, Literaturhinweise zu dieser Fragestellung bezüglich des Axons zu sammeln, inhaltlich zu sortieren, zueinander in Beziehung zu setzen und so zu interpretieren, dass sich daraus logische Verknüpfungen der verschiedenen Hinweise wie Bausteine in einem Mosaik ergeben. Dadurch soll aufgezeigt werden, inwiefern zwei verschiedene Zellsysteme, also Neuronen und Neuroglia, funktionell interagieren und sich infolgedessen bezüglich Kaliber und Myelinisierungsgrad phänotypisch unterschiedliche Axone gegenüberstehen. Die Bedingungen und Gesetzmäßigkeiten dieser Wechselbeziehungen bilden eine der Grundlagen für die weitere Forschung auf dem Gebiet der Neurologie, insbesondere aber auch der Neuropathologie, da sie Erklärungsansätze für eine Vielzahl neurologischer Erkrankungen liefern können.

2. Das Neuron

Das Nervensystem ist wohl eines der am weitesten spezialisierten Organsysteme des tierischen Organismus. Zwar gehört die Erregbarkeit zu den Grundeigenschaften lebender Zellen, jedoch findet sich diese nirgends sonst so ausgeprägt wie in den Nervenzellen, die so durch Aufnahme, Weiterleitung und Übertragung bioelektrischer Impulse die Funktion anderer Organe und somit letztendlich die eines ganzen Organismus steuern.⁽¹⁾⁽²⁾ Zwar wird der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit besonders auf dem langen, impulsleitenden Fortsatz der Nervenzellen, dem Axon, und seiner unmittelbaren Umgebung liegen, dennoch soll im Folgenden zum allgemeinen Verständnis eine kurze Beschreibung des histologischen Aufbaus eines Neurons gegeben werden.

2.1 Allgemeiner Aufbau einer Nervenzelle

Obwohl den Neuronen zweifelsohne mit der Informationsübertragung von Zelle zu Zelle eine wichtige und hochspezialisierte Aufgabe obliegt, unterscheiden sie sich in ihrer Grundstruktur kaum von anderen Zellen des Körpers. So ist jede Nervenzelle von einer doppelagigen Phospholipid-Membran umgeben, der besonders bei der Signalübertragung des Neurons eine entscheidende Rolle zukommt, da sie sowohl elektrisch isolierend wirkt, als auch für einen geregelten Ionen-Austausch zwischen Intra- und Extrazellulärraum sorgt.⁽³⁾ Auch die Ausstattung des Perikaryons, dem kernhaltigen Teil der Nervenzelle, mit Organellen ist im Wesentlichen identisch mit der anderer Zellen. Einzig die große dort anzutreffende Anzahl an Mitochondrien ist auffällig. Sie erklärt sich durch den hohen Energiebedarf, der durch die Aufrechterhaltung der für die Signalübertragung notwendigen Ionengradienten an der Zellmembran entsteht.⁽³⁾

Ein deutlicher Unterschied im Vergleich zu den meisten anderen Zellen des Körpers zeigt sich jedoch in der äußeren Form des Neurons. So besitzt beinahe jede Nervenzelle mindestens einen, meist jedoch mehrere Fortsätze, die dem Zellkörper entspringen und der Erregungsleitung dienen.⁽¹⁾ Hierbei handelt es sich zum einen um die zentripetal, d.h. zum Zellkörper hin leitenden Dendriten, die sich vor allem durch einen hohen Verzweigungsgrad auszeichnen, zum anderen um die meist längeren, dünneren und mit Ausnahme bei Neuronen der Spinalganglien unter Umständen kaum oder gar nicht verzweigten Axone, welche auch zentrifugal, also vom Zellkörper weg leiten.⁽¹⁾⁽³⁾ Um diese äußerst filigranen Strukturen aufrechtzuerhalten, ist die Art der Ausbildung des Zytoskeletts des Neurons von großer Wichtigkeit.⁽³⁾ Hierbei gibt es einige Unterschiede zwischen Perikaryon, Dendrit und Axon. Da das Axon das zentrale Thema dieser Arbeit darstellt, soll im Folgenden nun sein Aufbau etwas genauer erläutert werden.

Das Axon entspringt am Perikaryon aus dem so genannten Axonhügel, auch Ursprungs- oder Neuritenkegel genannt.⁽²⁾ Die Axonlänge variiert von wenigen Mikrometern bis hin zu einem Meter und mehr. Der Durchmesser des Axons bleibt über die gesamte Länge nahezu konstant⁽³⁾ und liegt je nach Nervenzelle etwa zwischen 0,5 und 20 μm .⁽¹⁾ Das Zytoplasma der Nervenzelle bezeichnet man im Axon als Axoplasma, welches Mitochondrien, Lysosomen, glattes endoplasmatisches Retikulum, einige Vesikel und verschiedene zytoskelettale Bestandteile enthält⁽¹⁾ und von einer Oberflächenmembran, dem so genannten Axolemm, umgeben ist.⁽²⁾ Manche Axone geben Seitenäste ab, die rechtwinklig oder sogar rückläufig zu ihnen verlaufen können und als Kollateralen bezeichnet werden.⁽¹⁾⁽²⁾ Die meisten Axone zweigen sich an ihrem Ende in viele kleine Äste auf und bilden so das so genannte Telodendron, durch welches eine Nervenzelle Kontakt zu vielen anderen Neuronen, Effektoren und Rezeptoren gleichzeitig erhält.⁽¹⁾

2.2 Das Neuronenzytoskelett

Im Inneren einer jeden Zelle findet sich neben den Organellen eine Art „Grundgerüst“, welches in erster Linie für die Stabilität und Formerhaltung der Zelle verantwortlich ist, das so genannte Zytoskelett. Als Hauptbestandteile des Zytoskeletts reifer Neuronen, sowohl im Perikaryon als auch in den Fortsätzen der Zelle, sind drei filamentöse Strukturen zu finden, nämlich Neurofilamente, Mikrofilamente und Mikrotubuli (auch Neurotubuli genannt). Die Einteilung in diese Gruppen erfolgt auf der Grundlage ihrer Durchmesser, wobei die Mikrofilamente mit einem Durchmesser von ca. 5-7 nm die kleinsten Strukturen darstellen, gefolgt von den Neurofilamenten mit ca. 10 nm Durchmesser und den Mikrotubuli mit ca. 25 nm Durchmesser.⁽⁴⁾

2.2.1 Neurofilamente

Die Neurofilamente gehören zur Gruppe der Intermediärfilamente, einer Gruppe von Zytoskelettfasern der eukaryotischen Zellen. Ihr werden insgesamt sechs verschiedene Typen von Fasern zugeordnet,⁽⁵⁾ die in ihrer Größe alle zwischen den anderen beiden Gruppen, also den Mikrofilamenten und den Mikrotubuli liegen.⁽³⁾ Hierzu zählen somit neben den Neurofilamenten der Nervenzellen auch die sauren und basischen Keratine der Epithelzellen, ebenso die Proteine Vimentin, welches besonders in Zellmembranen eine stützende Funktion hat, Desmin, welches in den Sarkomeren der Muskelzellen zu finden ist, GFAP (glial fibrillary acidic protein), dessen Filamente in Gliazellen vorkommen, und Peripherin, ein Bestandteil der Neuronen des PNS. Auch Lamine, die ausschließlich im Zellkern auftreten, und eine weitere sehr spezielle Gruppe kugeligter Filamente gehören zu den Intermediärfilamenten.⁽⁵⁾

Im Gegensatz zu den Dendriten oder dem Perikaryon ist im Axon die Dichte an Neurofilamenten deutlich höher, wo sie vor allem zur Stabilität des axonalen Zytoskeletts beitragen.⁽⁶⁾ Außerdem ist ihre Anzahl im Vergleich zu den Mikrofilamenten und Mikrotubuli innerhalb des Axons etwa zehnmal größer.⁽⁵⁾

Die Neurofilamente sind in dichten Reihen angeordnet, die longitudinal ausgerichtet sind. Sie werden durch dünne Seitenarme von 4-6 nm Durchmesser miteinander verbunden, deren Länge zwischen 20 und 50 nm liegt und durch die der Abstand der einzelnen Filamente zueinander bestimmt wird.⁽⁷⁾ Indem sie einen großen Teil des Axoplasmas ausfüllen,⁽⁷⁾ legen sie so auch den Durchmesser des Axons fest und beeinflussen das zirkuläre Wachstum.⁽⁵⁾⁽⁶⁾

Innerhalb dieses dreidimensionalen Netzwerkes kann man drei verschiedene Neurofilament-Polypeptide als Bausteine eines Neurofilaments unterscheiden,⁽⁸⁾ weshalb man auch vom so genannten Neurofilament-Triplett spricht.⁽⁹⁾ Das NF-L-Polypeptid (68-73 kd) ist Bestandteil des zentralen Gerüsts der Neurofilamente, wohingegen NF-M (145-150 kd) und NF-H (195-200 kd) Komponenten der Seitenarme zwischen den einzelnen Filamenten sind.⁽⁷⁾⁽¹⁰⁾ Während bei der Bildung der meisten Intermediärfilamente nun zuerst aus je zwei verschiedenen Proteinen so genannte Heterodimere entstehen, aus denen dann im weiteren Verlauf das reife Filament zusammengesetzt wird, kommt es bei der Entstehung eines Neurofilaments sowohl durch Verwicklung von zwei NF-L-Monomeren miteinander als auch von zwei verschiedenen NF-Monomeren zur Bildung von Homo- und Heterodimeren. Diese Dimere lagern sich in entgegengesetzter Richtung paarweise seitlich aneinander und bilden so Tetramere, welche im Gegensatz zu den Mikrotubuli keine Polarität besitzen. Durch End-zu-End-Aneinanderreihung dieser Tetramere entstehen nun Protofilamente, von denen jeweils zwei durch laterale Anlagerung eine Protofibrille bilden, von welchen wiederum vier durch seilartige Verschlingung miteinander das eigentliche Neurofilament darstellen (Abb.1).⁽⁵⁾⁽¹¹⁾ Auf die spezielle Bedeutung der einzelnen Neurofilament-Untereinheiten für den Phänotyp des Axons soll weiter unten noch genauer eingegangen werden.

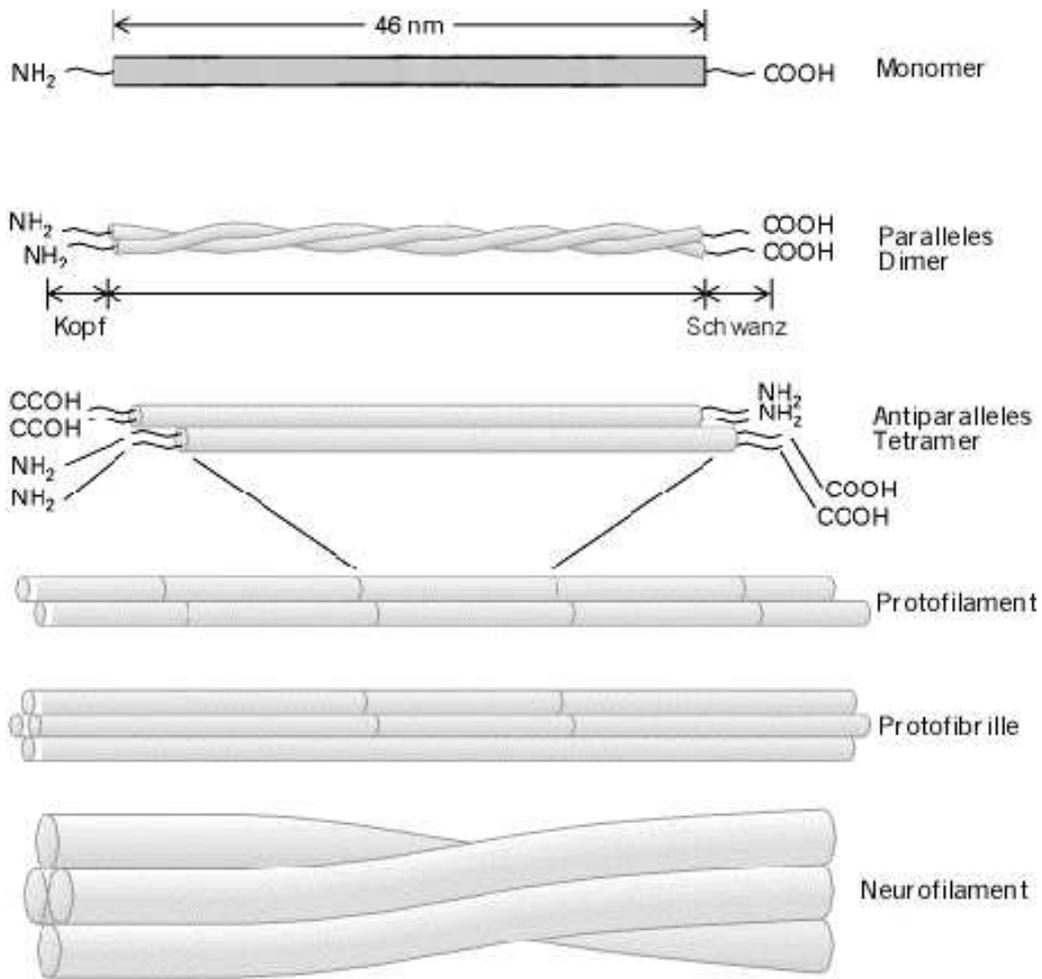


Abb.1: Schematische Darstellung der einzelnen Stadien der Entstehung eines Neurofilaments.
(modifiziert nach Lodish *et al.*⁽⁵⁾)

2.2.2 Mikrotubuli

Mit ihren etwa 25 nm Durchmesser sind die Mikrotubuli die größten der drei Komponenten des Zytoskeletts.⁽⁴⁾ Ihre zahlreichen Aufgaben in der allgemeinen Zellbiologie liegen vor allem im Bereich der Zellbewegungen, beispielsweise dem Zilien- oder Flagellenschlag oder dem Transport membranöser Vesikel innerhalb des Zytoplasmas.⁽⁵⁾ Außerdem sind sie der Hauptbestandteil der mitotischen Spindel.⁽³⁾

Die Mikrotubuli bestehen aus vielen globulären Tubulin-Untereinheiten, die ihrerseits wiederum Heterodimere aus α - und β -Tubulin, auch α - und β -Tubulin genannt, darstellen (Abb.2). Sie bilden lineare Protofilamente, die sich seitlich aneinander lagern. So entsteht der Mikrotubulus, ein Polymer, das in seiner Länge zwischen einem und mehreren hundert Mikrometern variieren kann und durch seine zylindrische Form sehr viel stabiler als andere Filamente des Zytoskeletts ist. Durch die strikte Kopf-zu-Schwanz-Ausrichtung der beiden Tubulinarten und die gleichartige Ausrichtung der Protofilamente erhält der Mikrotubulus eine Polarität mit einem (+)- und einem (-)-Ende.⁽⁵⁾

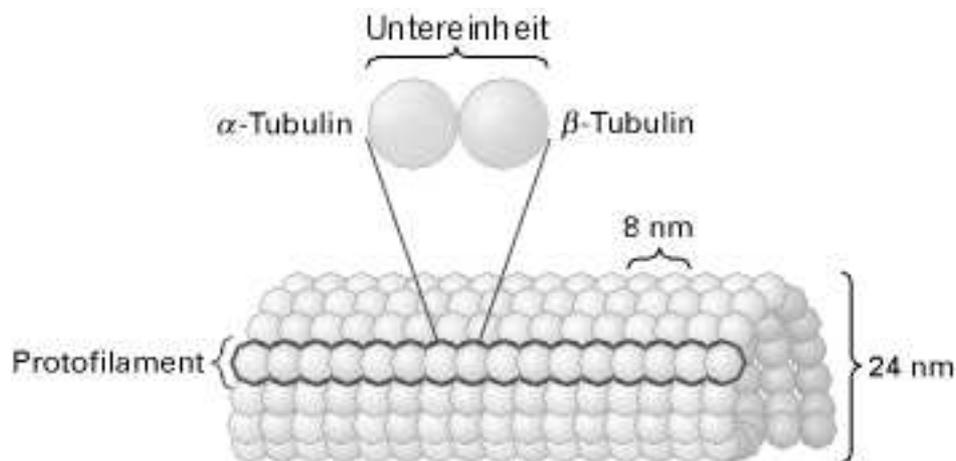


Abb.2: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Mikrotubulus aus seinen Untereinheiten.
(modifiziert nach Lodish *et al.*⁽⁵⁾)

Im Axon liegen die Mikrotubuli in Gruppen vor, bilden kleine Bündel⁽⁷⁾ und stellen so den zur Erhaltung dieses langen Zellfortsatzes stabilen Kern, ohne den sich das Axon zusammenziehen würde.⁽⁵⁾ Dabei sind diese polaren Filamente alle in der gleichen Richtung orientiert, nämlich mit ihren (+)-Enden zur Peripherie hin und ausgehend vom Zentrosom, dem Hauptorganisationszentrum der Mikrotubuli.⁽⁵⁾⁽¹²⁾ Diese Ausrichtung spielt eine entscheidende Rolle beim

axonalen Transport verschiedener Stoffe, für den die Mikrotubuli als Bahnen fungieren. Durch den ständigen Verlust an Proteinen und Membranbestandteilen an der Synapse, der sich bei der Impulsweiterleitung der Nervenzelle durch die Ausschüttung von Neurotransmittern ergibt, besteht laufend Bedarf an Nachschub des entsprechenden Materials.⁽⁵⁾ Hierbei dienen die Mikrotubuli-abhängigen Motorproteine Kinesin und zytoplasmatisches Dynein als Transporter, wobei Kinesin strikt anterograd, also vom Zellkörper zum (+)-Ende des Mikrotubulus hin transportiert, während Dynein retrograd, also in die entgegengesetzte Richtung auf das mit dem Zentrosom verbundene (-)-Ende hin arbeitet.⁽⁵⁾⁽¹²⁾ Beide Proteine binden jeweils mit einer ATP-Bindungsstelle an den Mikrotubulus, während ihre zusammengesetzten Endstücke ganz bestimmte Vesikel zum Transport anlagern.⁽¹²⁾

Neben diesen Transportproteinen findet man an die Mikrotubuli gebunden außerdem eine Vielzahl von so genannten Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAPs) und Tau-Proteinen, die zum einen der Strukturhaltung der Tubuli selbst,⁽¹²⁾ zum anderen beide der Brückenbildung zwischen Mikrotubuli und anderen Zytoskelettbestandteilen oder Zellorganellen dienen.⁽⁴⁾ Die Tau-Proteine unterscheiden sich durch ihr geringes Molekulargewicht von nur ca. 60000 deutlich von den MAPs mit einem Gewicht von bis zu 300000 und mehr. Beide Proteinarten sind aus zwei Untereinheiten aufgebaut, von denen eine an den Mikrotubulus, die andere an die jeweilige Zellkomponente bindet.⁽¹²⁾ Nach Hirokawa⁽⁷⁾ gelten MAP1A und MAP1B, beides lange filamentöse Proteine, als Hauptbestandteile der Mikrotubuli-Seitenarme im Axon. MAP2 hingegen findet sich zwar im Perikaryon und in den Dendriten, fehlt jedoch im Axon völlig.⁽¹²⁾ Die Tau-Proteine bestehen aus kugeligen Molekülen und fördern wohl die Polymerisation der Tubulin-Untereinheiten. Außerdem sind sie ebenfalls Komponenten kurzer Verbindungsstücke zwischen axonalen Mikrotubuli, wodurch sie zur Bildung von Mikrotubulibündeln beitragen.⁽⁷⁾ Scheinbar können sie aber, je nach Phosphorylierungszustand, auch als elastische kristallähnliche Gebilde in Erscheinung treten (Lichtenberg *et al.*, 1988, und Hagestedt *et al.*, 1989, zitiert nach Hirokawa⁽⁷⁾).

2.2.3 Mikrofilamente

Die kleinsten Strukturen des Zytoskeletts, die Mikrofilamente, sind am besten aus ihrem Vorkommen in den Muskelzellen der quergestreiften Muskulatur bekannt, wo sie in Form der Proteine Aktin und Myosin vorliegen⁽³⁾ und für die Kontraktilität des Muskels verantwortlich sind. Doch auch in Zellen, die nicht verwandt mit den Muskelzellen sind, macht der Anteil des Aktins am zellulären Protein bis zu 5% aus,⁽¹³⁾ im Nervensystem sind es sogar 15%.⁽¹⁴⁾

Aktin kommt sowohl als globuläres Monomer, genannt G-Aktin, als auch als filamentöses Polymer, das so genannte F-Aktin, vor, welches aus G-Aktin-Untereinheiten besteht und elektronenmikroskopisch als Mikrofilamente der Zelle sichtbar gemacht werden kann (Abb.3-A). Das Aktin stellt sich als aus Kugeln bestehende verdrehte Fasern dar (Abb.3-B). Für diese Polymerisation sind Magnesium-, Natrium- oder Kalium-Ionen nötig. Die Aktinfilamente liegen, verbunden durch Bindungsproteine, gebündelt an der Zellmembran. Ausgehend von diesen Bündeln fächern sich diese Filamente im Inneren der Zelle auf, wodurch sie ein netzartiges Gerüst bilden und so zur Stabilisierung der Membran beitragen. Damit ist das Aktin auch an der Formerhaltung der Zelle beteiligt.⁽¹³⁾

Im Axon findet man Aktin besonders in den so genannten Wachstumskegeln, den wachsenden Spitzen. Vermutlich trägt es hier zur Regulation der Membranbewegungen bei.⁽³⁾ In diesen Wachstumskegeln und auch an Aufzweigungspunkten von Axonen, z.B. bei Kortikalneuronen, findet man neben gebogenen oder gebündelten Mikrotubuli Ansammlungen von F-Aktin. Zum Wachstum und zur Aufzweigung von Axonen scheinen hier Wechselbeziehungen zwischen Mikrotubuli und Aktinfilamenten notwendig zu sein.⁽¹⁵⁾ Auch am Transport axoplasmatischer Organellen scheinen Aktinfilamente beteiligt zu sein. Die hierzu nötigen Bahnen aus longitudinal verlaufenden Mikrotubuli-Bündeln sind von langen Aktinfilamenten durchwoben, die den Transport unterstützen oder diesen möglicherweise auch außerhalb der Mikrotubuli-Bündel aufrechterhalten. Auch scheinen sie eine Rolle bei der Strukturierung dieser Bündel zu spielen.⁽¹⁶⁾

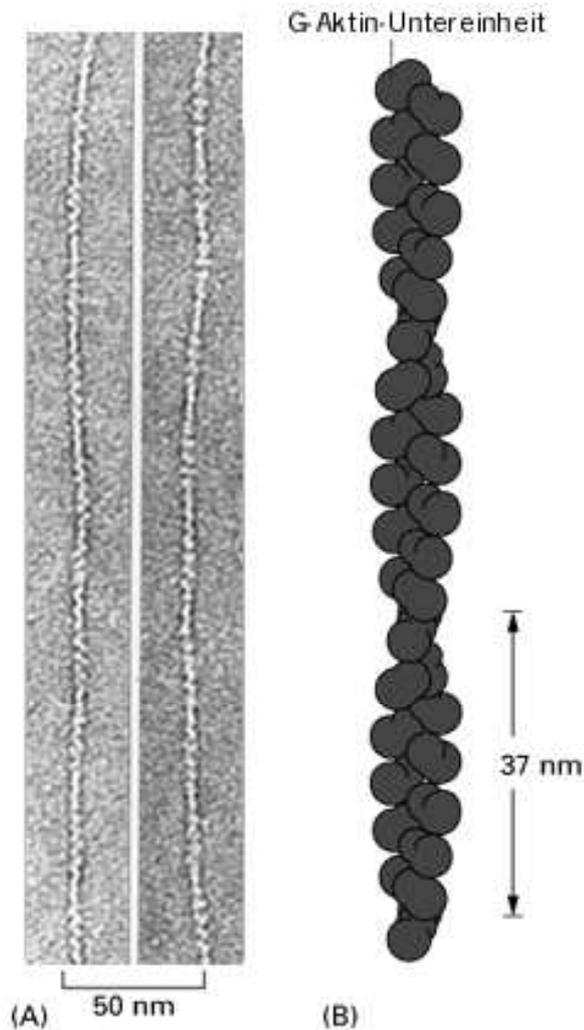


Abb.3: Aktin-Filamente.
 (A) Elektronenmikroskopische Darstellung von Aktin-Filamenten.⁽¹²⁾
 (B) Schematische Darstellung der Anordnung der G-Aktin-Untereinheiten in einem Aktin-Filament. (modifiziert nach Alberts *et al.*⁽¹²⁾)

2.2.4 Variationen des Zytoskeletts innerhalb des Axons

Auch wenn man geneigt sein mag, das Zytoskelett als formgebende Struktur der Zelle und somit als starres gleichförmiges Gebilde zu betrachten, so zeigt es doch in seiner Ausbildung deutliche regionale Unterschiede, sowohl zwischen Perikaryon und Axon,⁽¹⁷⁾ als auch innerhalb des Axons selbst.⁽¹⁸⁾ Die lokale Regulation der Zytoskelett-Zusammensetzung geschieht durch proteinvermittelte Interaktionen der einzelnen Komponenten, die durch ein System aus Protein-Kinasen und Phosphatasen gesteuert werden, welche ihrerseits sowohl intra- als auch extrazellulärer Beeinflussung unterliegen. Da der Großteil des neuronalen

Zytoskeletts im Axon lokalisiert ist, die Proteinsynthese aber im Perikaryon stattfindet, müssen die benötigten Proteine von dort an ihren Bestimmungsort transportiert werden. Daher betrachtet man das axonale Zytoskelett als ein stationäres Netzwerk im dynamischen Gleichgewicht.⁽¹⁸⁾ Nixon *et al.*⁽¹⁹⁾ beschreiben Untersuchungen an Neuronen der Retinalganglien von Mäusen, also an Nervenzellen des ZNS, in deren Axonen sie zwischen proximalen und distalen Regionen große Unterschiede sowohl in der Neurofilament-Anzahl als auch in den durchschnittlichen lateralen Abständen der Neurofilamente zueinander fanden. Während diese Filamente nach ihrem Eintritt in die Axone in deren sehr kurzem, nicht myelinisierten Anfangsteil unphosphoryliert und in nur geringer Anzahl vorliegen, verdoppelt sich ihre Zahl, sobald sie den Status der Phosphorylierung erreichen, und ist im distalen Bereich des Axons sogar dreimal so hoch wie proximal. Gleichzeitig mit der Phosphorylierung und der Neurofilamentakkumulation nehmen auch die Abstände zwischen den einzelnen Filamenten und das Axon-Kaliber zu. Die Anzahl an Mikrotubuli verändert sich ebenfalls, die Zunahme beträgt hier jedoch nur etwa 30%.

Genau umgekehrt verhält es sich nach Hernández *et al.*⁽²⁰⁾ bzw. Schlaepfer und Bruce⁽²¹⁾ bei peripheren Säugetiernerven. Bei ihnen nimmt die Anzahl an Neurofilamenten im Verlauf des Axons von proximal nach distal ab, während die Mikrotubulizahl wächst. Hsieh *et al.*⁽²²⁾ fanden zudem heraus, dass es sich bei der Anordnung der Neurofilamente in den Axonen myelinisierter Neuronen des PNS weder um eine rein zufällige, noch um eine geregelte Verteilung handelt, sondern vielmehr um eine Mischform aus beidem.

Zusätzlich zu den drei genannten filamentösen Strukturen des neuronalen Zytoskeletts finden sich in diesem Gerüst so genannte *cross-linker*. Hierbei handelt es sich um verschiedene Proteine, welche die einzelnen Filamente des Zytoskeletts untereinander und mit anderen Bestandteilen der Zelle vernetzen und als IFAPs (intermediate filament-associated proteins) bezeichnet werden. Eines der wichtigsten IFAPs ist das Plektin mit einem Molekulargewicht von 500000.⁽⁵⁾ Es gehört zur Familie der Plakine und bindet sowohl an Intermediärfilamente als auch an Mikrotubuli und Mikrofilamente. Vermutlich ist es dadurch in nicht

unerheblichem Maße an der Stabilisierung der Zelle beteiligt.⁽¹¹⁾ Ähnliche *cross-links* werden auch zwischen den Neurofilamenten und Mikrotubuli des Axons vermutet, wobei die hier beteiligten IFAPs noch nicht restlos identifiziert sind. Allerdings spielen hier wohl zusätzlich die NF-H-Seitenarme der Neurofilamente eine Rolle, welche ebenfalls in der Lage sind, an Mikrotubuli zu binden.⁽⁵⁾

3. Die Myelinscheide

Als hochspezialisiertes Organ ist das Nervensystem mit einem eigenen Bindegewebe ausgestattet, welches von den so genannten Gliazellen gebildet wird. Dieses Gliagewebe erfüllt eine Reihe von Aufgaben, denen die Neuronen selbst aufgrund ihres hohen Spezialisierungsgrades nicht gewachsen sind. Neben der strukturerhaltenden Funktion, die in anderen Teilen des Körpers das allgemeine Bindegewebe innehat, gehören hierzu die Ernährung der Nervenzellen, die Aufnahme und Verstoffwechslung von Neurotransmittern, das Abpuffern von Ionen aus dem Extrazellularraum, die Abtrennung des Nervengewebes vom umliegenden Gewebe sowie die elektrische Isolation der einzelnen Nervenfasern zueinander mittels der so genannten Myelinscheide.⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾

3.1 Anatomischer Aufbau

Jedes einzelne Axon ist von einer eigenen Hülle umgeben. Während es sich hier bei marklosen Nervenfasern nur um die Hüllzellen selbst handelt, in die das Axon unter Einstülpung der Gliazellmembran sozusagen soweit einsinkt, bis es von Zellmembran und Zytoplasma umschlossen ist, sind markhaltige Fasern von einer multilamellaren Markscheide umgeben, die elektrisch isolierende Eigenschaften besitzt und von großer Bedeutung bei der schnellen Erregungsleitung im Axon ist. Diese Markscheide wird von den Schwannzellen des PNS (Abb.4 und 5) bzw. den Oligodendrozyten des ZNS (Abb.6) gebildet.⁽²³⁾ Sie besteht aus Myelin, einem Lipoproteid, das durch Differenzierung der Plasmamembran dieser Hüllzellen entsteht.⁽²⁴⁾ Den Abschnitt eines Axons, der von einer Zelle umgeben wird, bezeichnet man als Internodium.⁽²³⁾ Zwischen den einzelnen Internodien liegen die Ranvierschen Knoten, bei denen es sich um nicht-isolierte Segmente handelt, an denen die Bildung des Aktionspotentials durch die axonalen Natrium-Kanäle

genauso ungehindert stattfinden kann, wie es bei unmyelinisierten Fasern über die gesamte Länge des Axons möglich ist.⁽²⁴⁾

Betrachtet man den Quer- oder Längsschnitt eines Axons und seiner Myelinscheide unter dem Elektronenmikroskop, so erkennt man, dass das Myelin sowohl dunkle als auch helle Färbung der Membranlagen aufweist. Die im Querschnitt erkennbaren dunklen Ringe entstehen durch das aneinander Lagern der intrazellulären Membranseiten der markbildenden Zelle, man bezeichnet sie als dichte Hauptlinie. Die hellen Ringe des Axonquerschnitts, die je nach Erhaltungszustand des Präparats einfach oder doppelt sichtbar sein können, werden von der extrazellulären Seite der Zellmembran gebildet und werden intermediäre Linie genannt.⁽²³⁾⁽²⁴⁾

Während der Entstehung der Myelinscheide, die weiter unten noch genauer erläutert werden soll, kommt es anfangs zuerst zur Bildung von so genanntem nicht-kompaktiertem Myelin. Nachdem die myelinisierende Zelle Kontakt zum Axon aufgenommen und dieses soweit umschlossen hat, dass sich ihre gegenüberliegenden Zytoplasmamembranen aneinander lagern können, kommt es zur Umwicklung des Axons mit mehreren Lagen lockerer Membranschichten. Dann erst wird das Zytoplasma aus dieser lockeren Hülle nach und nach verdrängt, die Membranlagen der myelinisierenden Zelle können sich so ganz dicht aneinander lagern und es entsteht das reife kompaktierte Myelin.⁽²⁵⁾ Zwar ist es für die möglichst gute Isolation des Axons notwendig, soviel Zytoplasma wie möglich aus der Markscheide fernzuhalten, dennoch bleibt in den Myelinhüllen des PNS ein kleiner Rest zurück. Dieser findet sich in den Schmidt-Lantermannschen Inzisuren, feinen Zytoplasma-gefüllten Kanälen, die sich spiralig vom inneren bis zum äußeren Mesaxon, also vom Anfang bis zum Ende der Membranduplikatur, durch die Myelinscheide ziehen (Abb.4).⁽²⁴⁾ Vermutlich dient diese Einrichtung dem mechanischen Schutz des Axons durch Abfangen von Biegebeanspruchung der peripheren Nerven. Hieraus könnte sich auch das Fehlen dieser Inzisuren im ZNS erklären, wo solche mechanischen Beanspruchungen nicht vorkommen.⁽¹⁾ Außer in den Schmidt-Lantermannschen Inzisuren sammelt sich Zytoplasma in der paranodalen Region seitlich des Ranvierschen Knotens an,

wo sich die Lamellen des kompakten Myelins öffnen, um hierfür Raum zu lassen und so den für das Überleben der Zelle notwendigen Organellen Platz bieten.⁽²⁴⁾

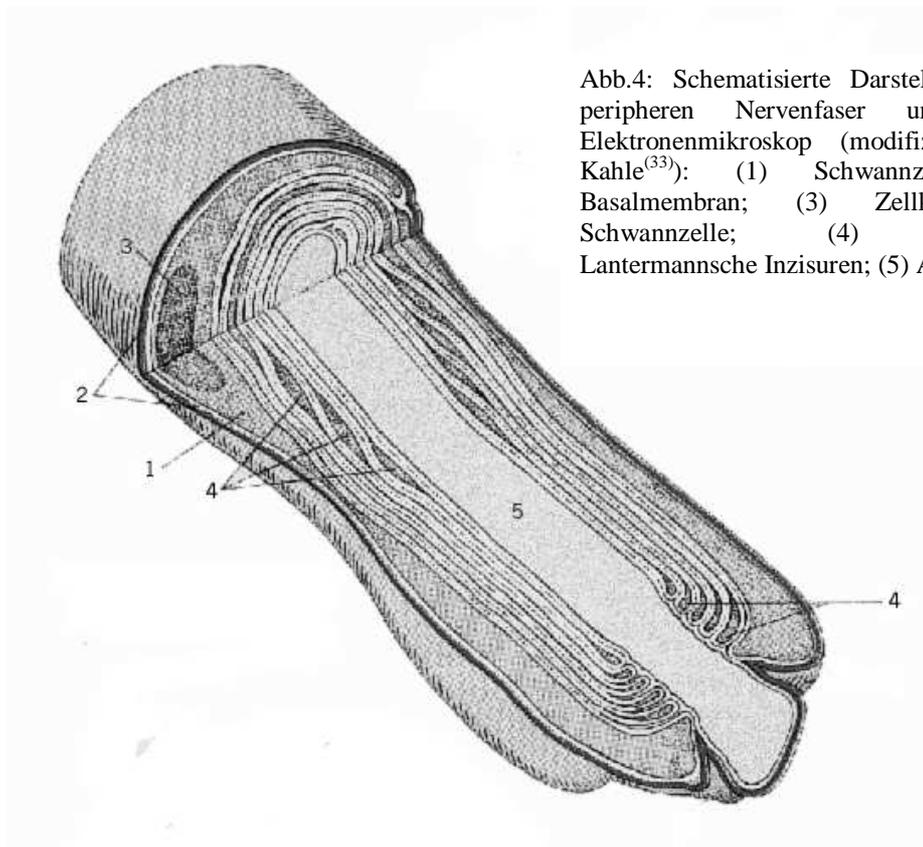


Abb.4: Schematisierte Darstellung einer peripheren Nervenfaserscheitelunterseite unter dem Elektronenmikroskop (modifiziert nach Kahle⁽³³⁾): (1) Schwannzelle; (2) Basalmembran; (3) Zellkern der Schwannzelle; (4) Schmidt-Lantermannsche Inzisuren; (5) Axon.

Vergleicht man Myelin des ZNS mit dem des PNS, so fällt auf, dass die Lamellen im ZNS deutlich dichter gelagert sind als im PNS. Misst man die Abstände zwischen den dichten Hauptlinien, ergibt sich für das PNS ein durchschnittlicher Wert von 119\AA , für das ZNS von 107\AA ⁽²⁶⁾ ($1\text{\AA}=0,1\text{nm}$). Außerdem findet sich im ZNS eine Spezialisierung des kompakten Myelins, die so genannte radiale Komponente. Hierbei handelt es sich um ein Netzwerk interlamellarer Verbindungen, die parallel zur Achse der Nervenfaserscheitelunterseite und gleichzeitig strahlenförmig durch die verbundenen Membranen verlaufen.⁽²³⁾ Als weiterer Unterschied sei noch erwähnt, dass die einzelnen Myelinscheiden des ZNS direkt aneinandergrenzen, während im PNS jede einzelne Nervenfaserscheitelunterseite, also das Axon mit seiner Myelinhülle, von einer Basalmembran (Abb.4) sowie lockerem,

feinfaserigem Bindegewebe, dem Endoneurium, umgeben ist. Basalmembran und Endoneurium bilden die so genannte Endoneuralscheide.⁽²⁾ Mehrere so umschlossene Fasern werden durch das Perineurium umgeben, konzentrisch verlaufenden Epithelzelllamellen, die ihrerseits wiederum beidseits eine Basallamina tragen und als Diffusionsbarriere zwischen Nervenfasern und umgebendem Bindegewebe die Blut-Nerven-Schranke darstellen.⁽¹⁾ Mehrere solcher Faserbündel wiederum werden vom so genannten Epineurium zum eigentlichen Nerv zusammengefasst, einer Hülle aus lockerem Bindegewebe und kollagenen Fasern, der nach außen hin noch das Paraneurium als verschiebbliche Bindegewebsschicht folgt.⁽¹⁾ Im ZNS fehlt ein derartiges bindegewebiges Interstitium, und das Parenchym wird hier einzig durch eine innige filzartige Verflechtung der neuroektodermalen Zellfortsätze gebildet. Man bezeichnet dieses Gewebe als Neuropil, welches mit seinen Astrozytenfortsätzen direkten Kontakt zur Kapillaraußenfläche hat und so die Blut-Hirn-Schranke bildet.⁽²⁷⁾

3.2 Biochemischer Aufbau

Eines der Hauptmerkmale des Myelins ist sein hohes Lipid-Protein-Verhältnis. Im Gegensatz zu biologischen Membranen enthält die Myelinscheide bis zu 80% Lipide und nur zu etwa 20% Proteine. Dieser hohe Lipidanteil ist wichtig für die elektrische Isolation des Axons, die zur saltatorischen Erregungsleitung erforderlich ist. Sowohl in der Lipid- als auch der Proteinzusammensetzung des Myelins lassen sich zwischen ZNS und PNS geringe Unterschiede erkennen.

3.2.1 Lipide

Zwar sind im Myelin alle größeren Lipidklassen vertreten und man kann keine myelinspezifischen Lipide bestimmen,⁽²⁴⁾ dennoch kann man die Zerebroside aus der Gruppe der Glycosphingolipide, und ihre Schwefelsäureester, die Sulfatide,

als am meisten typisch für das Myelin bezeichnen.⁽²⁶⁾ Diese Lipide finden sich in erster Linie im Bereich der intermediären Linie, also auf der extrazellulären Seite der Membran. Weitere wichtige Lipide sind Cholesterol, ebenfalls Bestandteil der intermediären Linie, Ethanolamin-haltige Plasmalogene als Teil der zytoplasmatischen Membranseite, außerdem noch Lecithin und mit etwas geringerer Bedeutung Sphingomyelin. Zwischen ZNS und PNS finden sich bezüglich der im Myelin enthaltenen Lipide keine qualitativen, lediglich quantitative Unterschiede. Als auffälligstes Merkmal sei hier erwähnt, dass das Myelin des PNS etwas weniger Zerebroside und Sulfatide enthält, aber dafür mehr Sphingomyelin als das des ZNS.⁽²⁶⁾

3.2.2 Proteine

Die Proteine des Myelins lassen sich in drei Hauptklassen unterteilen, nämlich Glycoproteine, basische Proteine und eine kleinere Gruppen von Proteinen unterschiedlicher Kategorien.⁽²⁴⁾ Im Gegensatz zu den Lipiden können bei den Proteinen einige als spezifisch für Myelin eingestuft werden, außerdem lassen sich sowohl einige qualitative als auch quantitative Unterschiede in der Proteinzusammensetzung zwischen ZNS- und PNS-Myelin feststellen.⁽²⁶⁾

3.2.2.1 Myelinproteine des ZNS

Die wichtigsten Proteine des ZNS-Myelins sind das Proteolipid-Protein (PLP) sowie die basischen Proteine, hier insbesondere MBP (myelin basic protein). Diese Proteine kommen mengenmäßig in etwa zu gleichen Teilen vor und stellen gemeinsam zwischen 60 und 80% des Gesamtmyelinproteins im ZNS dar.⁽²⁴⁾⁽²⁶⁾ Zusätzlich finden sich im ZNS geringere Mengen eines PLP-verwandten Proteins, DM-20, benannt nach seinem Molekulargewicht von 20000. Beide, PLP und DM-20 finden sich hauptsächlich in der Intermediärlinie des kompaktierten Myelins und scheinen für die Stabilisation dieser notwendig zu sein, während MBP

offenbar eine ähnliche Aufgabe im Bereich der dichten Hauptlinie erfüllt. In nicht-kompaktierten Bereichen des ZNS-Myelins hingegen, also in Bereichen, in denen die Myelinscheide Kontakt zum Zytoplasma der Hüllzelle besitzt, finden sich geringe Mengen von CNP (2':3'-Cyclic nucleotide-3'-phosphodiesterase), einem Enzym, dessen Aufgabe noch nicht restlos geklärt ist, die aber wahrscheinlich an der Regulation früher Ereignisse der Myelinisierung beteiligt ist. Aus der Gruppe der Glycoproteine liegt auch das Myelin-assoziierte Glycoprotein (MAG) keineswegs im vielschichtigen kompaktierten Myelin, sondern ist vielmehr direkt am Axon auf der periaxonalen Oligodendrozytenmembran lokalisiert. Auf seine Bedeutung soll weiter unten noch mehrfach genauer eingegangen werden. Auf der Oberfläche der Myelinscheide findet sich ebenfalls ein Glycoprotein, das Myelin-Oligodendrozyten Glycoprotein (MOG), welches vermutlich an der Übertragung extrazellulärer Informationen in das Innere des Oligodendrozyten beteiligt ist. Neben den genannten finden sich noch geringe Mengen weiterer Glycoproteine, welche jedoch zum Großteil noch nicht genauer charakterisiert sind.⁽²⁶⁾

3.2.2.2 Myelinproteine des PNS

Als Hauptprotein des PNS-Myelins kann man mit einem Anteil von mehr als 50% am Gesamtprotein zweifelsohne das P0-Protein („P-Null“) aus der Gruppe der Glycoproteine bezeichnen. Seine Aufgabe liegt offenbar, ähnlich wie bei PLP im ZNS, in der Stabilisierung der Intermediärlinie des kompaktierten Myelins, indem es die Zellmembran der myelinisierenden Zelle quer durchzieht und an extrazelluläre Bereiche oder auch angrenzende Membranlagen bindet.⁽²⁴⁾⁽²⁶⁾ Vermutlich kommt so auch die etwas lockerere Lagerung der Myelinlamellen des PNS verglichen mit denen des ZNS zustande (siehe Punkt 3.1), da die extrazelluläre Komponente von P0 deutlich größer ist als die von PLP. Gleichzeitig scheint die zytoplasmatische Komponente von P0 zur Stabilisation der dichten Hauptlinie beizutragen, wodurch die Bedeutung von MBP, welches diese Aufgabe im ZNS erfüllt, vermindert wird. MBP findet sich im PNS mit

einem geringen Anteil von nur 5-18% am Gesamtprotein. Ein mit MBP verwandtes basisches Protein des PNS-Myelins ist P2, von dem man annimmt, dass es am Lipid-Umsatz innerhalb der Myelinscheide beteiligt ist. Es ist in ähnlicher Menge wie MBP vor allem in der dichten Hauptlinie lokalisiert, wo es vermutlich auch strukturelle Funktion besitzt. Weitere Glycoproteine des PNS-Myelins sind das periphere Myelin-Protein-22 (PMP-22), sowie MAG, das Schwannzellmembran-Glycoprotein (SAG) und epitheliales Cadherin (E-Cadherin).⁽²⁴⁾ PMP-22 kommt nur in sehr geringen Mengen von weniger als 5% des Gesamtproteins vor und ist wohl nur von untergeordneter struktureller Bedeutung. MAG ist wie im ZNS periaxonal lokalisiert, ist jedoch zusätzlich auch in den Membranen im Bereich der Schmidt-Lantermann-Inzisuren, dem äußeren Mesaxon und den paranodalen Bereichen zu finden. Bei E-Cadherin handelt es sich um eines der wichtigsten Kalzium-abhängigen Zelladhäsionsmoleküle der myelinbildenden Schwannzellen. Es findet sich ausschließlich in den nicht-kompaktierten Bereichen der Myelinscheide und dient vermutlich der Stabilisierung des Zytoplasma-Netzwerkes in der Schwannzelle.⁽²⁴⁾⁽²⁸⁾⁽²⁹⁾ SAG schließlich wird abseits von kompaktiertem Myelin sowohl von myelinisierenden als auch nicht-myelinisierenden Schwannzellen gebildet. Über seine Struktur und Funktion ist bisher noch relativ wenig bekannt.⁽²⁶⁾

Ein weiteres PNS-spezifisches Protein ist Periaxin. Bei diesem an den periaxonalen Membranen myelinisierender Schwannzellen lokalisierten Protein handelt es sich nicht um ein integrales Membranprotein und somit folglich um kein Myelinprotein im eigentlichen Sinne. Allerdings ist es Bestandteil eines Protein-Komplexes, welcher das Schwannzellzytoskelett mit der extrazellulären Matrix verbindet und ist somit von nicht unerheblicher Bedeutung für die stabile Aufrechterhaltung der Myelinscheide.⁽²⁴⁾⁽³⁰⁾⁽³¹⁾

3.3 Bildung der Myelinscheide

Zu Beginn der Entwicklung des Nervensystems liegen die Axone in größeren Bündeln vor, denen sich im PNS Schwann-Vorläuferzellen, im ZNS Oligodendrozyten von außen anlagern (Peters und Muir, 1959, zitiert nach Gould *et al.*⁽³²⁾). Diese Zellen bilden fingerartige Fortsätze aus, mit denen sie zwischen die Axone eindringen. Auf diese Weise werden die Axone voneinander getrennt, bis schließlich zu Beginn der eigentlichen Myelinisierung jede Schwann-Zelle nur noch ein einziges Axon umgibt.⁽³²⁾ Dieses sinkt soweit in die Zelle ein, bis sich die gegenüberliegenden Zellmembranen aneinanderlagern und das Mesaxon bilden können (Abb.5).⁽²⁾

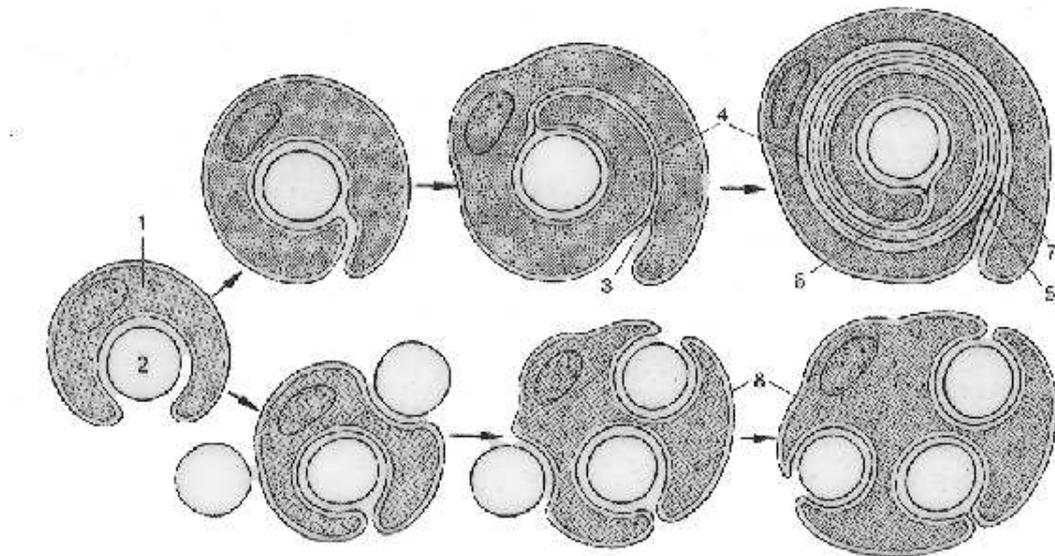
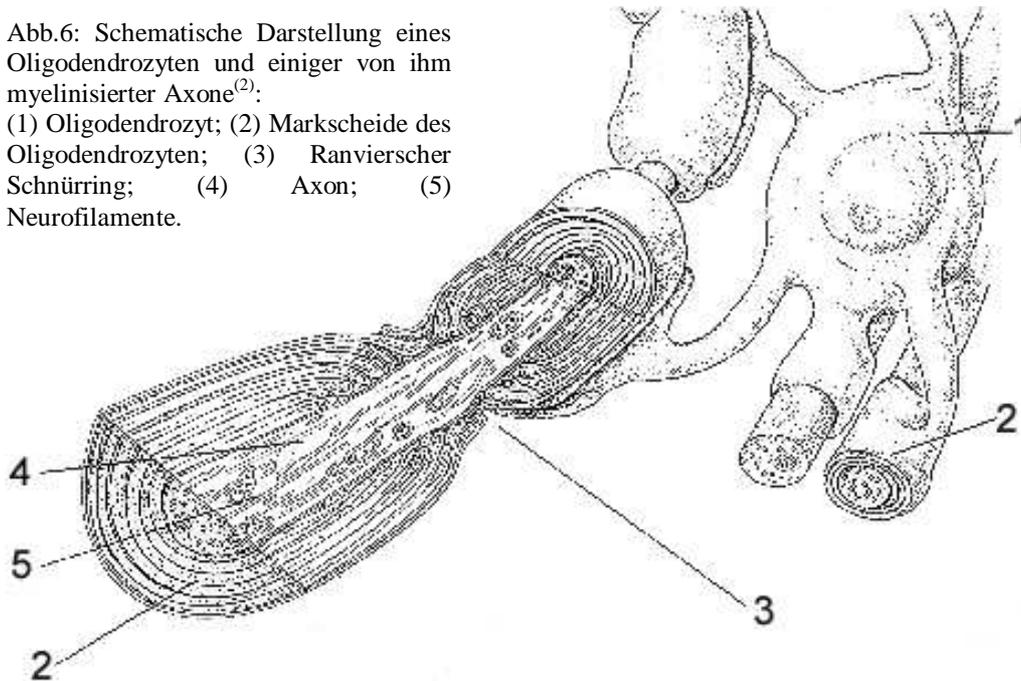


Abb.5: Schematische Darstellung der Entwicklung der Myelinscheide im PNS (oben) und der Umhüllung markloser Nervenfasern (unten). (1) Schwannzelle; (2) Axon; (3) Mesaxon; (4) Intermediäre Linie; (5) Dichte Hauptlinie; (6) Inneres Mesaxon; (7) Äußeres Mesaxon; (8) Marklose Nervenfasern: Eine Hüllzelle umschließt mehrere Axone.⁽³³⁾

Über den Fortgang der nun folgenden Myelinbildung gibt es unterschiedliche Theorien.⁽²⁴⁾ Es besteht die Möglichkeit, dass die vielen Lamellenlagen durch Rotation der Schwannzelle um das Axon entstehen. Nach Webster (1971, zitiert nach Garbay *et al.*⁽²⁴⁾) könnte jedoch auch die Rotation des inneren Mesaxons um das Axon die Entstehung der Myelinlamellen bewirken. Hees⁽¹⁾ vermutet hingegen, dass das Axon selbst um seine Längsachse rotiert, nachdem das Axolemm an mehreren Stellen mit dem Mesaxon verklebt ist.

Während im PNS eine Schwannzelle grundsätzlich nur ein einziges Axon myelinisiert, versieht ein Oligodendrozyt im ZNS gleichzeitig mehrere Axone mit einer Markscheide.⁽²⁾⁽²⁵⁾ Dazu bildet er zahlreiche breite Ausläufer, mit denen er Kontakt zu verschiedenen Axonen aufnimmt, welche dann von ihm mit Myelinlamellen umgeben werden (Abb.6).⁽²⁾ Während nach Aussage von Lubetzki *et al.*⁽³⁴⁾ in früheren Berichten hierbei noch von etwa 30 bis hin zu sogar 60 einzelnen Myelinsegmenten, die ein einzelner Oligodendrozyt bilden soll, die Rede war, ergaben die *in vitro*-Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe an Kulturen aus den Großhirnhemisphären von Mäuseembryonen eine durchschnittliche Anzahl von 4-5 Myelinsegmenten, die ein Oligodendrozyt bildet. Die maximale Spanne lag zwischen einem und 10 Segmenten pro Oligodendrozyt. Dieses Ergebnis stimmt in etwa auch mit den Schilderungen von Remahl und Hildebrand⁽³⁵⁾ überein, welche für das Rückenmark der Katze ein Verhältnis von Oligodendrozyten zu Myelinsegmenten von 1:1 *in vivo* angeben, während im Gehirn das Corpus callosum ein solches von 1:9 aufweist. Lubetzki *et al.*⁽³⁴⁾ vermuten, dass die Anzahl an Axonen, die ein einzelner Oligodendrozyt myelinisiert, auf irgendeine Art vorherbestimmt sein muss. Dies schließen sie aus der Tatsache, dass diese Zellen, sobald sie mit der Myelinisierung beginnen, sofort die endgültige maximale Anzahl an Fasern umhüllen. Hat ein Oligodendrozyt keine ausreichende Menge an Axonen in seiner Umgebung, formt er mit seinen Ausläufern, die keine Faser erreichen können, trotzdem myelinartige Gebilde.

Abb.6: Schematische Darstellung eines Oligodendrozyten und einiger von ihm myelinisierter Axone⁽²⁾:
 (1) Oligodendrozyt; (2) Markscheide des Oligodendrozyten; (3) Ranvierscher Schnürring; (4) Axon; (5) Neurofilamente.



3.4 Faktoren mit Einfluss auf die Myelinbildung

Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei den myelinbildenden Zellen im PNS und im ZNS um verschiedene Zelltypen. Die Vorläufer der Schwannzellen des PNS entwickeln sich in der Neuralleiste, während die Vorläufer der Oligodendrozyten des ZNS aus der subventrikulären Keimzone, also der Weiterentwicklung des Neuralrohrs, stammen. Beide Arten von Vorläuferzellen wandern bereits in einem sehr frühen Stadium von ihrem Ursprungsort weg, um Kontakt zu Axonen aufzunehmen.⁽²⁵⁾ Ob es hier dann in der weiteren Entwicklung des Nervensystems zur Myelinisierung oder aber nur zur Umhüllung der einzelnen Axone kommt, hängt von einer Vielzahl von Faktoren ab, die sowohl bei der Initiierung als auch bei der Weiterführung der Myelinbildung, sowie bei der Erhaltung der fertigen Myelinscheide eine große Rolle spielen.

3.4.1 Axonaler Kontakt

Der erste Kontakt der Glia-Vorläuferzellen mit einem Axon stimuliert sowohl Schwannzellen als auch Oligodendrozyten zur Proliferation.⁽²⁵⁾ Schwannzellen beginnen sich zu teilen und sich später zu myelinbildenden Zellen zu differenzieren.⁽³⁶⁾ In den proliferierenden Zellen werden bestimmte Myelin-spezifische Proteine gebildet, deren Konzentration anfangs jedoch noch relativ gering ist. Um eine deutliche Expressionssteigerung der entsprechenden Gene zu erreichen, die mit der Bildung der Myelinscheide einhergeht, scheint zumindest für die Schwannzelle ein stabiler Kontakt zum Axon unbedingt notwendig.⁽²⁴⁾⁽²⁵⁾ Bei der Vermittlung dieses Kontaktes spielen membranassoziierte Moleküle eine wichtige Rolle. Hier sind offenbar sowohl N-Cadherin als auch L1 in der frühen Phase der Myelinisierung beteiligt, wobei N-Cadherin vermutlich den ersten Kontakt zwischen Axon und Schwannzelle vermittelt, während L1 verantwortlich für die Initiierung des Myelinisierungsprogramms der Zelle zu sein scheint.⁽²⁵⁾⁽³⁷⁾⁽³⁸⁾ Wood *et al.*⁽³⁸⁾ konnten an Axonen des Dorsalwurzelganglions von Ratten zeigen, dass Antikörper gegen L1 den Beginn der Myelinbildung durch Schwannzellen hemmen können. Takeda *et al.*⁽³⁹⁾ vermuten außerdem, dass im PNS auch das neurale Zelladhäsionsmolekül N-CAM wichtig für den Kontakt wie auch für die Erkennung zwischen Axon und Schwannzelle ist.

Im Bezug auf die Oligodendrozyten des ZNS haben Mirsky *et al.*⁽⁴⁰⁾ festgestellt, dass diese in der Lage sind, auch ohne Kontakt zu Neuronen messbare Mengen an Myelin-spezifischen Glycolipiden und Proteinen zu exprimieren. Schwannzellen im gleichen Experiment ohne Kontakt zu Neuronen stellten die Produktion dieser Myelinbestandteile ein.

3.4.2 Axonkaliber

Nach Webster (1971, zitiert nach Garbay *et al.*⁽²⁴⁾) sowie nach Windebank *et al.*⁽⁴¹⁾ weisen Axone des PNS, die später myelinisiert werden, einen Durchmesser von mindestens 0,7 µm auf. Auch Voyvodic⁽⁴²⁾ berichtet von einem offensichtlichen Schwellenwert in der Axondicke, welcher erreicht werden muss, bevor ein Axon myelinisiert wird. Allerdings spricht er in diesem Zusammenhang von Werten um 1,6 µm, also deutlich mehr als die beiden oben zitierten Autoren. Was jedoch die Dicke der Myelinschicht betrifft, haben Elder *et al.*⁽⁴³⁾ festgestellt, dass eine genetisch induzierte Verminderung des Axonkalibers im PNS keine Verminderung der Myelindicke nach sich zieht. Anders verhält es sich im ZNS. Hier scheint der Durchmesser des Axons die Dicke der Myelinschicht direkt zu beeinflussen. Eine Verkleinerung des Axonkalibers hat somit auch eine Verringerung der Myelindicke zur Folge. Schwannzellen und Oligodendrozyten orientieren sich also in diesem Zusammenhang offenbar an unterschiedlichen Signalen.

3.4.3 Expressionsmuster verschiedener Proteine

3.4.3.1 P0-Protein

Unabhängig davon, ob eine Schwann-Vorläuferzelle sich später zur myelinisierenden Zelle entwickelt oder nicht, wird das Hauptgen des PNS-Myelins, das so genannte P0, bereits lange vor Beginn der Myelinisierung als wesentliches Merkmal der Schwannzelllinie exprimiert. Dieses Myelin-unabhängige Auftreten von sowohl P0-mRNA als auch P0-Protein spricht für die Wahrscheinlichkeit, dass P0 in einer frühen Entwicklungsphase eine Rolle bei den Wechselbeziehungen zwischen Schwann- und Nervenzelle spielt.⁽⁴⁴⁾ Takeda *et al.*⁽³⁹⁾ nehmen auch an, dass P0 wichtig für die Umhüllung des Axons wie auch für die Verfestigung der Myelinschicht ist. Postnatal kann in den myelinisierenden

Zellen ein extremer Anstieg an P0-mRNA und P0-Protein festgestellt werden, während nicht-myelinisierende Zellen auch weiterhin eine geringe Expression aufweisen.⁽⁴⁴⁾ Was die Höhe der P0-Expression betrifft, so konnten Lee *et al.*⁽⁴⁴⁾ wie auch schon Griffiths *et al.*⁽⁴⁵⁾ eine positive Korrelation zur Dicke der Myelinschicht erkennen. Da die P0-mRNA-Konzentration in reifen nicht-myelinisierenden Zellen schließlich stark absinkt, vermuten Lee *et al.*⁽⁴⁴⁾ das Vorhandensein eines Hemmsignals. Desweiteren zeigen sie, dass das grundsätzliche Vorkommen von P0 in den Schwann-Vorläuferzellen Neuron-unabhängig ist, während deren weitere Entwicklung zum myelinisierenden oder nicht-myelinisierenden Typ abhängig von axonal beeinflusster Steigerung oder Unterdrückung der P0-Expression ist.

3.4.3.2 Krox-20

Die Expression des Krox-20-Gens, welche neben den olfaktorischen Hüllzellen⁽¹⁴⁾ auch besonders charakteristisch für reife Schwannzellen im Gegensatz zu ihren Vorläufern zu sein scheint, ist ein weiterer für die Myelinisierung peripherer Nervenfasern notwendiger Faktor. Voraussetzung hierfür sind kontinuierliche neuronale Signale, für die wiederum der direkte Kontakt zwischen Axon und Hüllzelle vorhanden sein muss. Nach Chavrier *et al.*⁽⁴⁶⁾ handelt es sich bei Krox-20 um ein Protein mit drei „Zink-Fingern“, welches als Transkriptions-Kontrollfaktor vermutlich an der Regulation von Zellproliferationen beteiligt ist. Murphy *et al.*⁽⁴⁷⁾ nehmen an, dass eine der Aufgaben von Krox-20 darin besteht, ein axonales Signal innerhalb der Schwannzelle auf den Zellkern zu übertragen, welches ununterbrochen für die Aufrechterhaltung des Myelinisierungsprogramms notwendig ist. Nach Guennoun *et al.*⁽⁴⁸⁾ spielt in diesem Zusammenhang das Progesteron eine wichtige Rolle als Botenstoff, da es durch Bindung an einen intrazellulären Rezeptor die Expression der Krox-20-mRNA, sowie von P0, PMP22 und anderen myelinspezifischen Proteinen,⁽¹⁴⁾ induziert. Andere Steroide zeigen hier keine Wirkung.

3.4.3.3 Myelin-assoziiertes Glycoprotein

Das Myelin-assoziierte Glycoprotein (MAG) findet sich in Schwannzellen und Oligodendrozyten gleichermaßen und liegt vor allem in den periaxonalen Bereichen.⁽²⁵⁾ Früher vermutete man, dass es generell wichtig für die frühe Trennung und Umhüllung der einzelnen Axone ist⁽²⁵⁾ und insgesamt eine entscheidende Rolle während der Myelinbildung spielt.⁽⁴⁹⁾ Bezüglich der Bedeutung von MAG im PNS hat man inzwischen jedoch festgestellt, dass auch MAG-defiziente Schwannzellen normale Myelinscheiden bilden können und die Myelin-spezifischen Proteine PO und MBP exprimieren.⁽⁴⁹⁾ Li *et al.*⁽⁵⁰⁾ wie auch Fruttiger *et al.*⁽⁵¹⁾ schreiben MAG aber eine entscheidende Rolle in der Erhaltung sowohl der Myelinschicht als auch des myelinisierten Axons selbst zu. Carenini *et al.*⁽⁵²⁾ fanden heraus, dass MAG-defiziente Mäuse zwar unverändertes Myelin im PNS bilden, dass sie aber nach acht Monaten Degenerationen an Axonen und Myelin aufweisen. Das neurale Zelladhäsionsmolekül N-CAM kann diesen MAG-Mangel zur Erhaltung des Axon-Schwannzell-Komplexes zum Teil kompensieren, aber nicht vollständig ausgleichen.

Etwas anders stellt sich die Wirkung von MAG im ZNS dar. So berichten Montag *et al.*⁽⁵³⁾ von Untersuchungen an MAG-defizienten Mäusen, bei denen im ZNS schon der Beginn der Myelinisierung verspätet war und die außerdem geringe Veränderungen in der Morphologie des ZNS-Myelins aufwiesen, wie beispielsweise einen verringerten Zytoplasmagehalt der Oligodendrozyten oder mehrere Myelinschichten um ein einziges Axon. Nach Marcus *et al.*⁽⁵⁴⁾ scheint außerdem die Reifung des Axon-Glia-Komplexes bei MAG-Mangel im ZNS verzögert zu sein, was jedoch nicht bedeutet, dass dieser nicht letztendlich normal ausgebildet wird. Allerdings zeigt sich auch hier ein ähnliches Phänomen, wie es bereits bei den Verhältnissen im PNS angesprochen wurde, nämlich eine deutliche Degeneration des Axon-Glia-Komplexes, hier sogar schon im Alter von zwei bis drei Wochen. Insgesamt scheint MAG also im ZNS eine etwas bedeutendere Rolle als im PNS zuzuspielen, da es hier neben der Erhaltung der myelinisierten

Axone bereits Einfluss auf den Beginn und den Verlauf der Myelinisierung zu nehmen scheint.

3.4.4 Neuronale Impulsfrequenz

Sowohl Schwannzellen⁽⁵⁵⁾ als auch Oligodendrozyten⁽⁵⁶⁾ werden bei der Myelinisierung durch die elektrische Aktivität des Neurons beeinflusst. Wie bereits beschrieben, sind Oligodendrozyten in der Lage, auch ohne Kontakt zu Axonen Myelin-Komponenten zu bilden.⁽⁴⁰⁾ Sie können sogar myelinähnliche Gebilde formen, brauchen jedoch nach Demerens *et al.*⁽⁵⁶⁾ zur Bildung vollständiger Myelinscheiden neuronale Aktivität in ihrer direkten Umgebung. Durch Hemmung der Aktionspotentiale benachbarter Axone kann die Myelinisierung unterdrückt werden, im Gegenzug bewirkt ein Erhöhen der elektrischen Aktivität dieser Axone auch eine Steigerung der Myelinbildung.

Während also im ZNS offenbar sowohl Steigerung als auch Verminderung der Aktionspotentialfrequenz einen direkten Einfluss auf die Bildung der Myelinscheiden nehmen, fanden Stevens *et al.*⁽⁵⁵⁾ im PNS etwas andere Verhältnisse. Schwannzellen beginnen mit der Myelinisierung erst in einer bestimmten pränatalen Phase, in der sich die bis dahin niedrige Aktionspotentialfrequenz des Axons erhöht (Fitzgerald und Fulton, 1992, zitiert nach Stevens *et al.*⁽⁵⁵⁾). Stevens *et al.*⁽⁵⁵⁾ stellten fest, dass Stimulation von Axon-Schwannzell-Kulturen mit einer niedrigen Frequenz (0,1 Hz) die Myelinisierung um mehr als das Dreifache reduzierte, verglichen mit Kulturen, die mit Frequenzen von 1,0 Hz oder auch gar nicht stimuliert wurden. Im Gegensatz zur Situation im ZNS hat hier also nur die geringe elektrische Aktivität Einfluss auf die Myelinbildung, während eine Steigerung derselben ohne Wirkung bleibt. Aller Wahrscheinlichkeit wirkt eine niedrige Aktionspotentialfrequenz direkt hemmend auf die Expression Kalzium-unabhängiger Zelladhäsionsmoleküle, besonders L1, welche, wie bereits erwähnt, notwendig für die Initiierung der Myelinisierung sind.

3.4.5 Wachstumsfaktoren im ZNS

Der Wachstumsfaktor „Oligodendroglial Growth Factor“ (OGF) wird von neuronalen Zelllinien gebildet und stimuliert selektiv das Wachstum von Oligodendrozyten im ZNS. Giulian *et al.*⁽⁵⁷⁾ haben außerdem festgestellt, dass OGF auch die Aktivität von CNP, einem Myelin-Enzym, steigert und die Bildung von MBP sowie von PLP-RNA erhöht. Giulian *et al.*⁽⁵⁷⁾ vermuten deshalb, dass speziell OGF an der Regulation der Myelinbildung im ZNS beteiligt ist, während andere Wachstumsfaktoren keinerlei Effekt auf die genannten Proteine bzw. die Enzymaktivität hatten.

Ähnlich wie OGF scheint auch der „Insulin-like Growth Factor I“ (IGF-I) Einfluss auf die Myelinisierung im ZNS zu haben. Carson *et al.*⁽⁵⁸⁾ fanden bei ihrer Arbeit mit transgenen Mäusen, die IGF-I überproduzieren, heraus, dass deren Gehirne 130% mehr Myelin enthielten als die der Kontrollgruppen. Die Zahl der Oligodendrozyten selbst war nicht erhöht, allerdings waren die Gehirne der Versuchsmäuse durch Zunahme von Zellgröße und -anzahl um ca. 55% größer als die normaler Tiere. Insgesamt zeigten die transgenen Mäuse also einen etwa um das Zweifache höheren Myelingeht als die Kontrollmäuse. Außerdem konnte auch bei dieser Versuchsreihe eine erhöhte Aktivität von CNP gemessen werden.

3.4.6 Wachstumsfaktoren im PNS

Die Vorläufer der Schwannschen Zellen differenzieren sich während ihrer Entwicklung entweder zum myelinisierenden oder nicht-myelinisierenden reifen Phänotyp. An der Regulation dieser Differenzierung scheint unter anderem der „Transforming Growth Factor- β “ (TGF- β) beteiligt zu sein. Guénard *et al.*⁽⁵⁹⁾ stellten bei *in vitro*-Versuchen fest, dass TGF- β sowohl die Myelinisierung von Axonen durch Schwannzellen hemmt, als auch die Expression von Myelinbestandteilen wie P0, MAG und MBP. Im Gegensatz dazu steigert TGF- β

die Bildung von Molekülen, die charakteristisch für reife nicht-myelinisierende Schwannzellen sind, und scheint auf diese Weise die Entwicklung dieses Phänotyps zu fördern.

Ähnlich verhält es sich mit dem „Glial Growth Factor“ (GGF), der die Myelinisierung durch Verhinderung der Abtrennung und Umhüllung einzelner Axone hemmt.⁽⁶⁰⁾ Anders als TGF- β bewirkt er zusätzlich die Demyelinisierung bereits myelinisierter Kulturen und die Dedifferenzierung myelinisierender Schwannzellen in eine Vorform.

4. Einfluss der myelinbildenden Zellen auf das Neuron

Die potentiell myelinbildenden Gliazellen des Nervengewebes, also die Oligodendrozyten im ZNS sowie die Schwannzellen im PNS, unterliegen dem Einfluss verschiedener Faktoren, durch welche sich entscheidet, ob diese Zellen sich bis zum myelinhaltigen Typ ausdifferenzieren oder ob sie lediglich als einfache Hüllzellen eines Axons fungieren, wie im vorhergehenden Kapitel beschrieben. Gleichzeitig aber üben diese Gliazellen ihrerseits wiederum sehr bedeutenden Einfluss auf das Neuron und hierbei in besonderem Maße auf das mit ihnen in Kontakt stehende Axon aus. Dies spiegelt sich insbesondere in Aufbau und Größe des Axons, aber auch in Entwicklung und Wachstum, ja sogar in der Regeneration von Neuronen wieder.

4.1 Das Zytoskelett des Axons

Wie bereits erwähnt, finden sich im Aufbau des axonalen Zytoskeletts deutliche regionale Unterschiede.⁽¹⁸⁾ Die daraus resultierende Annahme, dass das Zytoskelett einer lokalen Regulation unterworfen ist,⁽²⁰⁾ bestätigt sich bei der vergleichenden Betrachtung myelinisierter und nicht-myelinisierter Axone sowie vor allem myelinisierter und nicht-myelinisierter Abschnitte ein und desselben Axons. Hierzu wird bei Fragestellungen bezüglich des PNS besonders häufig mit so genannten Trembler-Mäusen gearbeitet, einem Mutantenstamm mit einer Punktmutation im PMP22-Gen. Diese Tiere leiden Zeit ihres Lebens an einer dysmyelinisierenden peripheren Neuropathie, die sich bereits bald nach der Geburt in schwerfälligen Bewegungen, Tremor und vorübergehenden Krampfanfällen äußert.⁽⁶¹⁾ Dabei zeigen sie sowohl Störungen des axonalen Transports und lebenslange Schwannzellproliferation, als auch deutliche

Veränderungen im Axonkaliber und der Anordnung der Neurofilamente, sowie eine schwere Hypomyelinisierung.⁽⁶¹⁾⁽⁶²⁾⁽⁶³⁾

Um die Wechselwirkungen zwischen der Myelinumhüllung und den Axonen des ZNS untersuchen zu können, werden diese ebenfalls an verschiedenen Mäusemutantenstämmen erforscht. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Trembler-Mäusen, welche keine Störungen in der ZNS-Myelinisierung aufweisen, werden so genannte Shiverer-Mäuse bei Fragen zur Neurobiologie des ZNS verwendet.⁽⁶⁴⁾ Diese Tiere zeigen starken Tremor und Krampfanfälle sowie eine verkürzte Lebensdauer von nur etwa 100 Tagen, hervorgerufen durch eine autosomal rezessive Mutation im MBP-Gen, aus der ein Mangel an kompaktem Myelin im ZNS resultiert.⁽⁶⁵⁾⁽⁶⁶⁾⁽⁶⁷⁾ Trotz dieser Mutation ist jedoch die Myelinisierung in den peripheren Nerven nahezu unverändert, vermutlich aufgrund der Kompensation des MBP-Mangels durch andere Myelinkomponenten wie P0 und P2.⁽⁶⁸⁾

4.1.1 Neurofilament-Akkumulation

Bei der Untersuchung normaler Axone kann man feststellen, dass die Anzahl an Neurofilamenten in den myelinisierten Bereichen dreimal höher ist als in den nicht-myelinisierten Teilen.⁽⁶⁹⁾ Diese Tatsache scheint zumindest im PNS in engem Zusammenhang mit der Phosphorylierung der Neurofilamente zu stehen.⁽¹⁹⁾ Die Ansammlung von Neurofilamenten beginnt nämlich, sobald die Neurofilament-Untereinheiten die Form reifer Neurofilamente erlangen. Dies geschieht in direkter Verbindung mit ihrer Phosphorylierung, welche ihrerseits wiederum mit Eintritt in den myelinhaltigen Bereich des Axons stattfindet.⁽⁷⁰⁾ Mit diesem Vorgang sinkt auch die Transportrate der Neurofilamente innerhalb des myelinisierten Teils des Axons,⁽⁷¹⁾⁽⁷²⁾ vermutlich um so ihre Integration in das stationäre und gleichzeitig dynamische Netzwerk des axonalen Zytoskeletts zu gewährleisten.⁽¹⁹⁾⁽⁷⁰⁾ Dieser Rückgang des Neurofilament-Transports im reifen Axon darf jedoch nicht mit dem weiter unten beschriebenen Rückgang des

axonalen Transports von Neurofilament-Proteinen aufgrund mangelnder Myelinisierung gleichgesetzt werden.

Dass es sich bei der Steuerung der Neurofilament-Akkumulation im ZNS um den direkten Einfluss der Oligodendrozyten selbst, unabhängig von einer Myelinisierung handelt, schließen Sánchez *et al.*⁽⁷³⁾ aus ihren Studien an Neuronen des Retinalganglions. Sie konnten feststellen, dass anscheinend einzig die Umhüllung eines Axons durch Oligodendrozyten ohne Bildung von Myelin ausreicht, um das zirkuläre Wachstum und so unter anderem die Ansammlung von Neurofilamenten zu induzieren. So zeigte sich bei der Untersuchung verschiedener Mäusemutantenstämme, die zwar nicht in der Lage waren, Myelin zu bilden, deren Axone aber von Oligodendrozyten umhüllt wurden, dass allein durch diesen Kontakt zu den Oligodendrozyten normale Axonkaliber und Anordnungen von Neurofilamenten erreicht wurde.

4.1.2 Neurofilament-Organisation

Entlang eines normalen myelinisierten Axons finden sich wenige Stellen, die nicht von der Myelinschicht bedeckt sind. Dazu gehören das Initialsegment, die Ranvier-Schnürringe und die Enden, welche sich meist mehrfach verzweigen. Vergleicht man diese Bereiche mit den von Myelin umgebenen Internodien, findet man signifikante Unterschiede in der Anordnung der Neurofilamente des Axons. So ist in den myelinisierten Abschnitten nicht nur die Anzahl an Neurofilamenten erhöht, wie im vorhergehenden Absatz bereits angesprochen, sondern es sind auch gleichzeitig die Abstände zwischen den einzelnen Filamenten deutlich größer, nach Hsieh *et al.*⁽⁶⁹⁾ um 25-50%.

Untersucht man im Vergleich zu normalen Axonen die hypomyelinisierten Axone von Trembler-Mäusen, kann man erkennen, dass hier mit dem Mangel an Myelin eine deutlich dichtere Neurofilamentanordnung einhergeht,⁽⁷⁴⁾ also ähnlich den Verhältnissen in den nicht-myelinisierten Bereichen normaler Axone. Dabei zeigen die Nervenfasern von Trembler-Mäusen eine mehr als doppelt so hohe

Neurofilamentdichte wie die myelinisierten Fasern von Mäusen ohne Mutation.⁽⁷⁵⁾ In Transplantationsversuchen, bei denen jeweils ein Stück eines Trembler-Ischiasnervs in den Ischiasnerv einer normalen Maus eingesetzt wurde, konnten de Waegh und Brady⁽⁶²⁾ nachweisen, dass Schwannzellen einen direkten und lokalen Einfluss auf die Anordnung der Neurofilamente innerhalb der Nervenfasern haben. So zeigte ein und derselbe Nerv ober- und unterhalb des Transplantates, also in den normal myelinisierten Teilen, eine deutlich geringere Dichte in der Neurofilamentanordnung als innerhalb des Transplantates, also dem hypomyelinisierten Teil selbst. Um sicherzugehen, dass hier keine Beeinträchtigung des Nerven durch die Transplantation an sich vorliegt, wurden zum Vergleich auch Nerven normaler Mäuse mit Transplantaten ebenfalls normaler Mäuse untersucht. Hier konnten keine Unterschiede in der Neurofilamentanordnung zwischen transplantierten und ursprünglichen Nervenabschnitten festgestellt werden. Offensichtlich wirken sich also Störungen in der Myelinbildung durch die Schwann'schen Zellen direkt auf die angrenzenden Teile des Axons aus und beeinflussen die Neurofilamentorganisation nicht unerheblich.

Ähnliche Auswirkungen von Myelinbildung und Störungen der Myelinisierung durch die Gliazellen finden sich auch im ZNS. Betrachtet man das Neurofilament-Zytoskelett der unmyelinisierten Axone von Shiverer-Mäusen, so ist auch hier eine deutliche Zunahme der Neurofilamentdichte, verglichen mit den Verhältnissen bei normalen Mäusen, erkennbar. Zusätzlich konnten Brady *et al.*⁽⁶⁴⁾ bei Untersuchungen an Mäuse-Mutanten, die zwar im Gegensatz zu den Shiverer-Mäusen in der Lage sind, Myelin im ZNS zu bilden, jedoch nur in geringen Mengen, feststellen, dass mit zunehmender Myelinmenge die Dichte der Neurofilamentanordnung abnimmt. Auch hier ist also deutlich der Einfluss der myelinbildenden Zellen, in diesem Fall der Oligodendrozyten, auf das axonale Zytoskelett erkennbar.

4.1.3 Neurofilament-Phosphorylierung

In engem Zusammenhang mit der Anordnung der Neurofilamente innerhalb eines Axons steht offensichtlich der Grad ihrer Phosphorylierung, insbesondere des NF-H-, teilweise auch des NF-M-Polypeptids.⁽⁶⁹⁾⁽⁷⁰⁾ Während der normalen neuronalen Entwicklung werden diese beiden Neurofilament-Untereinheiten bereits in einem frühen postnatalen Stadium phosphoryliert, und zwar jeweils an den COOH-Enden innerhalb einer so genannten MPR-Region (multiphosphorylation repeat region), welche die Aminosäuresequenz Lys-Ser-Pro in mehrfacher Wiederholung beinhaltet.⁽⁷⁶⁾⁽⁷⁷⁾

In den myelinisierten Internodien normaler Tiere lässt sich eine deutlich höhere Phosphorylierungsrate dieser Neurofilament-Untereinheiten feststellen als beispielsweise an den Ranvierschen Knoten.⁽⁶⁹⁾ De Waegh *et al.*⁽⁷⁵⁾ sowie Kirkpatrick und Brady⁽⁷⁴⁾ stellten in ihren Studien mit Trembler-Mäusen fest, dass mit der Demyelinisierung neben der Zunahme der Neurofilament-Dichte auch eine Abnahme der Neurofilament-Phosphorylierung einhergeht. Ähnliches konnten auch Cole *et al.*⁽⁷⁸⁾ bei Versuchen mit transgenen Mäusen beobachten, deren mangelnde Myelinisierung, anders als bei Trembler-Mäusen, durch die Kombination des P0-Gens mit entweder einem Diphtherie-Toxin-Gen oder einem SV40 (simian virus 40)-Gen zustande kommt. Hsieh *et al.*⁽⁶⁹⁾ vermuten, dass die Wirkung der Myelinisierung auf die Streuung der Neurofilamente dadurch entsteht, dass durch die gesteigerte Phosphorylierung die Größe der negativen Ladung⁽⁷⁹⁾ der Neurofilament-Seitenarme erhöht wird. Außerdem nehmen Nixon *et al.*⁽¹⁹⁾ an, dass sich zusätzlich zur Größe der Ladung mit der Phosphorylierung die Ausdehnung dieser Seitenarme erhöht. Beide Theorien könnten erklären, wodurch die größeren Abstände zwischen den einzelnen Filamenten im Normalfall zustande kommen.

Der Beeinflussung der Neurofilament-Phosphorylierung liegt vermutlich ein System aus Kinasen und Phosphatasen zugrunde, welches durch den engen interzellulären Kontakt zwischen Axon und myelinisierender Schwannzelle reguliert wird.⁽⁷⁵⁾⁽⁸⁰⁾ Dafür könnte ein transmembranöses Signal verantwortlich

sein, welches von der normalen Myelinbildung abhängig ist und daher bei einer Störung der Myelinisierung das Axon nicht erreicht.⁽⁷⁸⁾

Einen ähnlichen Mechanismus, der für die Veränderungen der Neurofilament-Phosphorylierung im ZNS von Shiverer-Mäusen verantwortlich sein könnte, vermuten auch Brady *et al.*⁽⁶⁴⁾ Auch sie stellten in ihren Studien mit Shiverer- und Wild-Typ-Mäusen fest, dass die Phosphorylierungsrate der Neurofilamente einer direkten lokalen Beeinflussung unterliegen muss. So war die Phosphorylierung in den ZNS-Axonon des Corpus callosum der Mutanten deutlich reduziert gegenüber der Kontrollgruppe, während in den Axonen des Nervus ischiadicus, also Axonen des PNS, deren Myelinisierung bei Shiverer-Mäusen ja, wie beschrieben, ungestört ist, keinerlei Veränderungen festgestellt werden konnten.

4.1.4 Axonaler Transport

Der Syntheseort der einzelnen Zytoskelettbestandteile ist der Zellkörper der Nervenzelle, das Perikaryon. Deshalb müssen die im Axon benötigten Strukturen vom Ort ihrer Entstehung erst ins Axon transportiert und dort verteilt werden. Dies geschieht mittels des so genannten axonalen Transports. Auch dieser Vorgang scheint dem direkten Einfluss der myelinbildenden Zellen zu unterliegen. So stellten de Waegh und Brady⁽⁶²⁾⁽⁶³⁾⁽⁷⁵⁾ bei ihrer Arbeit mit Trembler- und Kontroll-Mäusen signifikante Unterschiede in der Transportrate verschiedener Proteine im PNS fest. Der Transport von Neurofilament-Proteinen bei Trembler-Mäusen erwies sich gegenüber dem bei normalen Mäusen als deutlich vermindert, während der Transport von Tubulin stark erhöht war. Die Abhängigkeit des axonalen Transportes vom Typ der umgebenden Schwannzellen konnte besonders bei den im Zusammenhang mit der Neurofilament-Anordnung bereits beschriebenen Transplantationsversuchen an Ischiasnerven normaler Mäuse mit Implantaten von Trembler-Mäusen gezeigt werden. Hier war der axonale Transport in den Teilen proximal des Transplantats kaum verändert gegenüber den Kontrollgruppen. Bei Eintritt in das Trembler-Transplantat sank

die Transportrate der Neurofilament-Proteine jedoch deutlich ab, gleichzeitig schien der Tubulin-Transport innerhalb des Transplantats anzusteigen.

Abweichend von der obigen Darstellung des Einflusses der Schwann'schen Zellen auf die allgemeine axonale Transportkapazität im PNS konnten Brady *et al.*⁽⁶⁴⁾ bei Messungen an Nerven von Shiverer-Mäusen eine höhere Transportrate markierter Neurofilament-Untereinheiten feststellen als bei Kontrollnerven. Bei Vergleichen mit transgenen Mäusen, die zwar kompaktes Myelin im ZNS bilden, dessen Dicke jedoch nur 25% dessen bei normalen Mäusen entspricht, konnte dieselbe Transportrate wie bei Kontrolltieren ohne Mutation gemessen werden. Brady *et al.* vermuten daher, dass für die Reifung des neuronalen Zytoskeletts im ZNS die Bildung von kompaktem Myelin unbedingt notwendig ist, wenngleich auch die Dicke dieser Myelinschicht in diesem Zusammenhang keine Rolle zu spielen scheint.

Auch Kirkpatrick *et al.*⁽⁸¹⁾ stellten in einer ähnlichen Studie signifikant erhöhte Transportraten verschiedener markierter Proteine in Axonen des Nervus opticus von Shiverer-Mäusen fest. Auch diese Arbeitsgruppe führte zum Vergleich Studien an Wildtyp-Mäusen sowie an transgenen Mäusen, die im Bezug auf die Myelinbildung eine Zwischenstufe zwischen den anderen beiden darstellten, durch. Zwar konnten hier noch ganz geringe Unterschiede im axonalen Transport zwischen diesen transgenen Mäusen und dem Wildtyp gemessen werden, trotzdem kommen auch Kirkpatrick *et al.*⁽⁸¹⁾ zu dem Schluss, dass eine unvollständige Bildung von unverändertem kompaktem Myelin zum Erreichen normaler Transportraten in den Axonen des ZNS genügt.

4.1.5 Spezielle Rolle von MAG

Myelin besteht zu etwa 80% aus Lipiden und nur zu etwa 20% aus Proteinen. Eines der wichtigsten Myelinproteine aus der Gruppe der Glycoproteine ist das Myelin-assoziierte Glycoprotein MAG.⁽²⁴⁾ Was die Wirkung des Myelins auf das axonale Neurofilament-Zytoskelett betrifft, vermuten Yin *et al.*⁽⁸²⁾ eine direkte

Beteiligung dieses Proteins. Während der Verlust der wichtigsten Strukturproteine des PNS-Myelins, P0 und MBP (myelin basic protein) keinerlei Einfluss auf den Aufbau des Axons zu haben scheint, konnten sie in ihren Studien an Mäusen mit einer Null/Null-Mutation des MAG-Gens feststellen, dass mit dem Fehlen von MAG sowohl eine geringere Neurofilament-Phosphorylierung als auch eine dichtere Neurofilament-Anordnung einhergingen. Gleichzeitig zeigten sich deutliche axonale Atrophie und Wallersche Degeneration. Im Gegensatz zu den Verhältnissen bei Trembler-Mäusen, deren Myelinisierungsstörung ja, wie beschrieben, auf einer Punktmutation im PMP-22-Gen beruht,⁽⁶¹⁾ zeigten die hier untersuchten Tiere trotz dieser axonalen Veränderungen keinerlei Anzeichen von Entzündung, Hypomyelinisierung, erheblicher De- und Remyelinisierung oder eine Zunahme funktioneller Veränderungen. Sánchez et al.⁽⁷³⁾ stellten außerdem fest, dass zumindest im ZNS die Umhüllung eines Axons durch eine potentiell myelinbildende Zelle ohne Myelinisierung ausreicht, um wenigstens annähernd normale Axonkaliber zu erreichen. Offenbar scheinen diese Zellen über ein Membranmolekül, möglicherweise MAG, Einfluss auf das Axon zu nehmen. Wahrscheinlich spielt MAG also eine besondere Rolle bei der Reifung und Erhaltung myelinisierter Axone.⁽⁵¹⁾⁽⁵²⁾⁽⁸²⁾

4.1.6 Mikrotubuli-Anzahl und -Dichte

Neben dem Einfluss myelinisierender Zellen auf das axonale Neurofilament-Zytoskelett können auch am Mikrotubuliskelett des Axons myelinabhängige Veränderungen festgestellt werden. Kirkpatrick und Brady⁽⁷⁴⁾ berichten, dass die anhand der Menge von unlöslichem Tubulin⁽⁸³⁾ gemessene Stabilität des axonalen Mikrotubuli-Zytoskeletts bei Trembler-Mäusen vermindert ist. Außerdem finden sich im Vergleich zu normalen Axonen Unterschiede in der Zusammensetzung und Phosphorylierung der axonalen Mikrotubuli-assoziierten Proteine. Nach de Waegh und Brady⁽⁶²⁾⁽⁶³⁾ ist, wie bereits im Zusammenhang mit dem axonalen Transport erwähnt, die Rate an sich bewegendem Tubulin im Axon bei Trembler-

Mäusen erhöht. Die Anzahl der Mikrotubuli an sich scheint jedoch zumindest im PNS unabhängig vom Grad der Myelinisierung zu sein.⁽⁶⁹⁾

Im Gegensatz hierzu stellten Brady *et al.*⁽⁶⁴⁾ bei ihren Untersuchungen an Shiverer-Mäusen fest, dass deren Axone etwa doppelt so viele Mikrotubuli enthielten wie die der Vergleichsgruppe, nämlich im Durchschnitt 20-21, während bei Mäusen des Wildtyps durchschnittlich nur 10-11 Mikrotubuli pro Axon vorhanden waren. Ähnliche Beobachtungen machten auch Kirkpatrick *et al.*⁽⁸¹⁾, die sowohl eine höhere Dichte der axonalen Mikrotubuli in Shiverer-Axonen, erhöhte Tubulin-Expression, als auch eine deutlich geringere Stabilität dieser Tubuli feststellen konnten. Bei Messungen der Mikrotubuli-Dichte an Querschnitten von Axonen von Shiverer-, Wildtyp- und transgenen Mäusen mit verminderter Myelinbildung im ZNS zeigte sich eine mehr als zweifache Zunahme der Mikrotubuli-Dichte und auch der Mikrotubuli-Anzahl bei Shiverer- und transgenen Mäusen gegenüber den Kontrolltieren. Auch Messungen von radioaktiv markiertem Tubulin in den Axonen dieser drei Tiergruppen ergaben einen deutlichen Anstieg bei Shiverer- und transgenen gegenüber den Wildtyp-Mäusen.

4.2 Entwicklung, Wachstum und Regeneration des Neurons

4.2.1 Embryonale und neonatale Entwicklung

Nicht nur bei der Ausbildung des Phänotyps reifer Axone spielen die umgebenden myelinbildenden Zellen eine entscheidende Rolle. Bereits in der embryonalen und neonatalen Entwicklung sind sie wichtige Signalgeber für das Überleben, die Reifung und die Differenzierung des Nervens. Wurden beispielsweise die Schwann'schen Zellen früher häufig als passive Ziele axonaler und anderer extrinsischer Signale gesehen, so weiß man heute, dass sie und ihre Vorläufer die Nervenentwicklung sowie die Entwicklung angrenzender Gewebe und auch ihre

eigene über autokrine Kreisläufe regulieren.⁽⁸⁴⁾ Riethmacher *et al.*⁽⁸⁵⁾ stellten bei Studien mit Mäuse-Mutanten, denen Schwannzellen und deren Vorläufer fehlten, fest, dass diese Tiere in der zweiten Hälfte ihrer Embryonalentwicklung einen Großteil ihrer sensorischen und motorischen Neurone verloren. Während am Tag 12 der Embryonalentwicklung dieser Tiere die Anzahl an Neuronen im Dorsalwurzelganglion noch nahezu normal war, so war sie bereits zwei Tage später um fast 80 % reduziert. Dasselbe Phänomen zeigte sich nur wenige Tage darauf auch bei den Motorneuronen. Dies legt die Vermutung nahe, dass zum Überleben dieser Neuronen Signale der Schwann-Vorläuferzellen oder auch junger Schwannzellen notwendig sind, also von den Zellen, die den hier untersuchten Tieren fehlten. Vermutlich schütten Schwannzellen und ihre Vorläufer eine Mischung verschiedener neurotropher Faktoren aus, um das Überleben von Neuronen zu sichern. Möglicherweise gibt es dabei sogar unterschiedliche Faktoren für motorische und sensorische Neuronen.⁽⁸⁶⁾

Innerhalb der neuronalen Entwicklung wird auch die Ausbildung der Ranvierschen Knoten durch die Schwannzellen gesteuert. Hierbei scheinen ihre Signale vor allem eine Rolle bei der molekularen Spezialisierung der Membran des Knotens, ganz besonders bei der Ausbildung der für das myelinisierte Axon lebensnotwendigen Natrium-Kanäle, zu spielen. Diese Annahme stützt sich insbesondere auf die Tatsache, dass bei ultrastrukturellen Untersuchungen immer eine räumliche Beziehung zwischen Schwannzelle und Natrium-Kanälen zu erkennen ist, sowohl während der Nervenentwicklung als auch während der Regeneration nach chemischer Zerstörung der Myelinschicht. Dasselbe ist sogar nach Zugabe von Schwannzellen zu Axonen *in vitro* zu beobachten.⁽⁸⁴⁾ Auch die Verteilung bestimmter für die Ranvierschen Knoten typischer intramembranöser Partikel zeigt eine entsprechende Beziehung auf (Wiley-Livingston und Ellisman, 1980, zitiert nach Jessen und Mirsky⁽⁸⁴⁾).

4.2.2 Wachstum und Stabilisierung

Colello und Schwab⁽⁸⁷⁾ berichten, dass die Anzahl der Fasern eines Nerven offenbar direkt mit seiner Myelinisierung in Zusammenhang steht. Sie führten Studien am Nervus opticus bei Ratten durch, wobei sie sowohl die Fasern normaler Nerven quantifizierten, als auch die von Nerven, deren Myelinisierung durch Zerstörung der Oligodendrozyten mittels Röntgenbestrahlung verhindert wurde. Dabei zeigte sich, dass die Anzahl an Fasern in myelinfreien Nerven um 10-30 % höher lag als in den myelinisierten Nerven. Außerdem fiel auf, dass die Faserzahl bei Fehlen von Myelin über die Gesamtlänge des Nerven um bis zu 20 % variierte, während sie bei myelinisierten Nerven weitgehend konstant blieb. Um sicher zu gehen, dass die erhöhte Faserzahl in den myelinfreien Sehnerven nicht aus einer Erhöhung der Anzahl der retinalen Ganglienzellen herrührte, wurden zum Vergleich Zählungen an beiden Augen, also dem bestrahlten und dem unbehandelten, durchgeführt. Dabei ergaben sich zwischen beiden Seiten keinerlei Unterschiede.

Bereits Ende der achtziger Jahre erkannten Caroni und Schwab,⁽⁸⁸⁾⁽⁸⁹⁾⁽⁹⁰⁾ dass ausdifferenzierte Oligodendrozyten Proteine mit hemmender Wirkung auf das Nervenwachstum exprimieren, sobald sie mit der Myelinisierung frisch gebildeter Faserwege beginnen. Die Autoren beschreiben diese Proteine als membrangebundene Proteine der weißen Substanz des ZNS mit einer Größe von 35 bzw. 250 kd. Da diese also direkt nach Fertigstellung der Nervenfasern exprimiert werden,⁽⁹⁰⁾ vermuten auch Colello und Schwab,⁽⁸⁷⁾ dass so mit dem Myelinisierungsprozess das Faserwachstum gestoppt und die Faserzahl stabilisiert wird. So berichten Sefton und Lam⁽⁹¹⁾ sowie Crespo *et al.*⁽⁹²⁾, dass die endgültige Faserzahl des Nervus opticus der adulten Ratte bereits gegen Ende der ersten postnatalen Woche feststeht, also in etwa zu Beginn der Myelinisierung. Versuche, dies durch Injektionen von FGF (fibroblast growth factor) in den myelinisierten Nerv zu beeinflussen, blieben erfolglos, wogegen die infolge Bestrahlung myelindefekten Nerven auf FGF enorm ansprachen und schließlich eine Faserzahl von mehr als 40 % über dem Normalwert zeigten. Colello und

Schwab⁽⁸⁷⁾ nehmen daher an, dass die Myelinbildung eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung der Faserzahl des adulten Nerven spielt, wobei sie als entscheidendes Merkmal die Expressierung nervenwachstumshemmender Proteine durch myelinbildende Oligodendrozyten sehen. Sie räumen jedoch ein, dass auch andere Mechanismen wie Wechselwirkungen zwischen Oligodendrozyten und Astrozyten in diesem Zusammenhang nicht ausgeschlossen werden können.

Inzwischen ist die Neurologie auf diesem Gebiet weiter fortgeschritten und man weiß heute, dass unter anderem das myelinassoziierte Glykoprotein (MAG) als nervenwachstumshemmendes Protein fungiert. Während es zwar bei jungen Neuronen noch das axonale Wachstum fördert, liegt seine Bedeutung im Bezug auf reife Neuronen neben der bereits beschriebenen Erhaltung und Stabilisierung des Axon-Glia-Komplexes vor allem in der Hemmung des Neuronenwachstums.⁽⁹³⁾ Dies könnte unter anderem auch eine Erklärung dafür sein, dass Neuronen des ZNS nach einer Verletzung nicht in der Lage sind, zu regenerieren, während Neuronen des PNS diese Fähigkeit unter Einfluss von Schwannzellen besitzen (siehe Punkt 4.2.3). Wong *et al.*⁽⁹⁴⁾ konnten beispielsweise durch Eliminierung der Funktion von MAG mittels CALI (chromophore-assisted laser inactivation) die Regeneration von Neuronen des Nervus opticus bei Hühnerembryonen bewirken. Auch Tang *et al.*⁽⁹⁵⁾ vermuten, dass aus verletzter weißer Substanz ein lösliches Fragment von MAG, das so genannte dMAG, freigesetzt wird, welches das Neuronenwachstum hemmt und somit die Regeneration verhindert. Durch den Einsatz monoklonaler Antikörper gegen MAG kann diese hemmende Wirkung aufgehoben werden.

Ähnlich wie MAG gehört auch OMgp (oligodendrocyte-myelin glycoprotein) zu den nervenwachstumshemmenden Faktoren des ZNS, und ebenso Nogo, ein weiteres wichtiges Protein mit dieser Funktion. Nogo existiert in drei verschiedenen Varianten, von denen NogoB und NogoC auch außerhalb des ZNS vorkommen, während NogoA rein ZNS-spezifisch auf der Oberfläche von Oligodendrozyten exprimiert wird. Alle drei Isoformen von Nogo besitzen als funktionellen Bereich die Nogo-66-Region, NogoA weist zusätzlich noch die N-terminale Region Amino-Nogo auf.⁽⁹³⁾ Interessanterweise kommt nun die

wachstumshemmende Wirkung der genannten Proteine dadurch zustande, dass alle drei, also MAG, NogoA und OMgp, an den selben Rezeptor, den so genannten Nogo-66-Rezeptor NgR, binden.⁽⁹³⁾⁽⁹⁶⁾ Dieser liegt auf der extrazellulären Oberfläche und im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums von Oligodendrozyten.⁽⁹⁷⁾ Kommt es nun also zur Interaktion eines der drei genannten Proteine mit NgR, bindet NgR wiederum die extrazelluläre Komponente von p75^{NTR}, einem transmembranen Rezeptorprotein für neurotrophe Wachstumsfaktoren. Dies führt im weiteren Verlauf zur Aktivierung der GTPase Rho, welche vermutlich letztendlich für die neuronale Wachstumshemmung verantwortlich ist.⁽⁹³⁾ Li und Strittmatter⁽⁹⁶⁾ berichten, dass sowohl lokale als auch systemische Gaben von NgR-Antagonisten ein bemerkenswertes Potential zur Regeneration von ZNS-Verletzungen besitzen.

4.2.3 Regeneration verletzter Axone

Einen deutlichen Einfluss scheinen Schwanzzellen auch auf reife verletzte Axone zu nehmen, wie Li und Raisman⁽⁹⁸⁾ bei ihren Versuchen am Rückenmark adulter Ratten feststellen konnten. Sie setzten umschriebene Läsionen, wobei sie sowohl aufsteigende als auch absteigende Axone durchtrennten und deren Reaktionen in den darauffolgenden Tagen anhand des Transportes von Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase, HRP) oder Biocytin beobachteten. Während andere Autoren berichten, dass zerschnittene Axone degenerieren und sich vom Ort der Läsion zurückziehen,⁽⁹⁹⁾⁽¹⁰⁰⁾⁽¹⁰¹⁾ zeigte sich bei den Studien von Li und Raisman⁽⁹⁸⁾, dass die verletzten Axone bereits nach zwei Tagen geschwollene Stümpfe aufwiesen und selbst die der Läsion angrenzenden unbeschädigten Axone deutliche Auftreibungen gebildet hatten. Auch nach mehreren Wochen blieb die Anzahl der durchtrennten Axone in der Region der Verletzung relativ konstant und es zeigten sich verschiedene Formen von Auftreibung und Verästelung.

Interessanterweise konnte im weiteren Verlauf dieser Versuche festgestellt werden, dass entgegen aller Erwartungen Axone des Rückenmarks auch auf den Kontakt zu Schwannzellen reagieren können. Li und Raisman⁽⁹⁸⁾ injizierten dazu mittels einer minimal-traumatischen Mikroinjektionstechnik eine Schwannzell-Suspension in den Bereich der Läsionen. Sowohl die verletzten als auch die angrenzenden intakten Axone zeigten deutliche Reaktionen auf dieses Schwannzell-Implantat. Diese Reaktion verlief außerdem merklich schneller als nach alleiniger Durchtrennung der Axone. Schon zwei Tage nach der Transplantation hatten sich an den Axonenden Aufzweigungen gebildet, die sich in die ursprüngliche Richtung des Axons orientierten, außerdem bildeten sich Auftreibungen und Windungen. Segmente der unverletzten Axone machten sogar Biegungen in das Schwannzell-Transplantat hinein und wieder zurück, um ihre eigentliche Richtung beizubehalten. Offenbar können Schwannzellen also einen nicht unerheblichen Einfluss auf das Wachstum und die Regeneration von Axonen haben. Li und Raisman⁽⁹⁸⁾ vermuten hier einen Zusammenhang mit von den Schwannzellen produzierten Wachstumsfaktoren mit neurotropher Wirkung, die ein Aussprossen der Axone unterstützen. Als bedeutungsvollste sind hier FGF (fibroblast growth factor) sowie NGF (nerve growth factor) und BDNF (brain-derived neurotrophic factor) zu nennen. Die beiden letzteren werden sowohl von nicht-neuronalen Zellen des Nervengewebes gebildet, BDNF in erster Linie im ZNS, als auch von Schwannzellen selbst.⁽¹⁰²⁾⁽¹⁰³⁾⁽¹⁰⁴⁾⁽¹⁰⁵⁾ Bemerkenswert ist, dass hierbei sowohl Axone der aufsteigenden sensorischen Nervenbahnen reagieren, welche dem Dorsalwurzelganglion entstammen, dessen Zellen im Normalfall von Schwannzellen umgeben sind, als auch Axone der Pyramidenbahn, die innerhalb des ZNS nicht im Kontakt mit Schwannzellen stehen.

Auch Olby und Blakemore⁽¹⁰⁶⁾ beobachteten die Folgen von Verletzungen der aufsteigenden Axone im Dorsalstrang des Rückenmarks von Ratten, in diesem Fall nach photochemisch induzierter Ischämie. Diese Autoren kommen zu dem Schluss, dass die unter der Pia mater gelegenen Axone im Zentrum der Läsion zwischen dem 4. und 7. Tag nach der Verletzung demyelinisiert werden und daraufhin von Schwannzellen wieder myelinisiert werden. Axone am caudalen

Ende der Läsion regenerieren im gleichen Zeitraum und werden von Schwannzellen oder Oligodendrozyten remyelinisiert. Bereits 1976 zeigte Blakemore (Blakemore, 1976, zitiert nach Olby und Blakemore⁽¹⁰⁶⁾), dass Schwannzellen aus den Dorsalwurzeln oder aus den Nerven der Blutgefäße in demyelinisierte Gebiete des ZNS eindringen und diese remyelinisieren können. Vermutlich ist dieses Phänomen abhängig von der Anwesenheit unmyelinisierter Axone und gleichzeitig dem Fehlen von Gliazellen sowie der Zerstörung der Gliagrenzmembran (Blakemore, 1976, 1983, zitiert nach Olby und Blakemore⁽¹⁰⁶⁾).⁽¹⁰⁷⁾⁽¹⁰⁸⁾⁽¹⁰⁹⁾ Nach Olby und Blakemore⁽¹⁰⁶⁾ könnte sich hieraus die Ansammlung von Schwannzellen im Zentrum der Läsion, also in dem Bereich, in dem auch die Meningen und die Gliagrenzmembran zerstört wurden, erklären. Die Schwannzellen im kaudalen Bereich der Läsion hingegen könnten ursprünglich von Nerven der Blutgefäße in dieser Region stammen.

4.2.4 Spezielle Rolle von P0

Wie Yazaki *et al.*⁽¹¹⁰⁾ berichten, könnte die oben beschriebene unterstützende Wirkung von Schwannzellen bei der Regeneration von Nervenläsionen auf der Bildung des P0-Proteins beruhen. Sowohl Schneider-Schaulies *et al.*⁽¹¹¹⁾ als auch Yazaki *et al.* (1991, zitiert nach Yazaki *et al.*⁽¹¹⁰⁾) konnten bereits nachweisen, dass P0 *in vitro* das Wachstum von Neuriten des Dorsalwurzelganglions fördert. Nach Kultivierung von Kortikalneuronen mit P0-produzierenden Zellen und zum Vergleich auch mit solchen ohne P0-Expression maßen Yazaki *et al.*⁽¹¹⁰⁾ die Längen der einzelnen Neuriten aus. Dabei konnte ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen festgestellt werden, wobei die Neuriten aus den P0-enthaltenden Kulturen ein deutlich stärkeres Längenwachstum gezeigt hatten. Wurden monoklonale Antikörper gegen P0 diesen Kulturen beigelegt, so wurde das Wachstum eindeutig gehemmt. Um die Wirkung von P0 auf Kortikalneuronen auch *in vivo* zu testen, wurden Läsionen im Rückenmark adulter Ratten gesetzt, an denen dann P0-produzierende Zellen implantiert wurden, sowie bei einer

Vergleichsgruppe Zellen ohne P0-Produktion. Auch hier konnte bei den Tieren mit P0-exprimierenden Zellimplantaten eine deutliche Längenzunahme der Axone im Vergleich zu den Tieren ohne P0 gemessen werden. Aufgrund dieser Beobachtungen sprechen Yazaki *et al.*⁽¹¹⁰⁾ P0 eine eindeutige Wirkung auf die Förderung des Wachstums von Neuriten nicht nur im PNS, sondern darüber hinaus auch im ZNS zu. Wie Takei und Uyemura⁽¹¹²⁾ berichten, wird im ZNS niedriger Vertebraten, welches die Fähigkeit nahezu uneingeschränkter Regeneration besitzt, P0 exprimiert, wohingegen bei höheren Vertebraten, die kein P0 im ZNS exprimieren, diese Fähigkeit fehlt. Auch hieraus kann man schließen, dass P0 direkt mit der Regenerationsfähigkeit von Neuronen in Verbindung steht. Yazaki *et al.*⁽¹¹⁰⁾ weisen deshalb auf einen möglichen therapeutischen Nutzen von P0 zur ZNS-Regeneration hin.

5. Das Axon-Kaliber

Bereits in den achtziger Jahren vermuteten Hoffman *et al.*⁽¹¹³⁾⁽¹¹⁴⁾⁽¹¹⁵⁾, dass der Durchmesser eines Axons in keiner Weise eine speziesspezifisch festgelegte Größe ist, sondern vielmehr aufgrund des axonalen Transports von Neurofilament-Proteinen variiert. Diese Parameter können einerseits die Menge der transportierten Proteine darstellen, andererseits aber auch deren Transportgeschwindigkeit. Ihre Annahme stützten die Autoren auf Beobachtungen sowohl an Neuronen während der Entwicklung als auch während der Regeneration nach experimenteller Axotomie, bei denen sich zeigte, dass das radiale Wachstum eines Axons ebenso wie die Abnahme seines Durchmessers nach Verletzung mit den Transportraten der Neurofilament-Proteine korrelierten. So kamen Hoffman *et al.*⁽¹¹³⁾⁽¹¹⁴⁾⁽¹¹⁵⁾ schon damals zu dem Schluß, dass die Neurofilamente bei der Bestimmung des Axonkalibers wohl die Hauptrolle spielen.

Wie sich aus den bisherigen Ausführungen erkennen läßt, weiß man heute, dass bei der Ausbildung des Phänotyps reifer Axone eine Vielzahl von Faktoren eine Rolle spielen. Besonders der direkte Einfluss der umhüllenden und meist auch myelinbildenden Zellen auf die einzelnen Komponenten des Neurons ist unumstritten und zeigt in beeindruckender Weise, wie komplex die Zusammenhänge der Entwicklung auf dem Wege zu einem reifen Neuron sind.

Aus der Gruppe der Hauptbestandteile des neuronalen Zytoskeletts, bestehend aus Neurofilamenten, Mikrotubuli und Mikrofilamenten, haben die Neurofilamente den größten Anteil am Axonzytoskelett inne, wo sie in etwa zehnmal so großer Menge anzutreffen sind wie die beiden anderen genannten filamentösen Strukturen.⁽⁵⁾ Was den Einfluss myelinisierender Zellen auf die Neurofilamente einer Nervenzelle betrifft, kann man feststellen, dass sich unter der Einwirkung Myelin-bildender Schwannzellen des PNS die Transportrate der einzelnen Neurofilament-Untereinheiten vom Perikaryon ins Axon erhöht, was sich schließlich in einer Steigerung der Neurofilament-Anzahl gegenüber nicht-

myelinisierten Axonen widerspiegelt.⁽⁶²⁾⁽⁶³⁾⁽⁷⁵⁾ Ebenso ist der Grad der Phosphorylierung der Neurofilamente erhöht, was sich wiederum auf ihre Anordnung innerhalb des Zytoskeletts auswirkt. Vermutlich durch die Zunahme der negativen Ladung und die so gesteigerten Abstoßungskräfte wie auch durch eine größere Ausdehnung der Filament-Seitenarme werden die Abstände zwischen den einzelnen Filamenten vergrößert.⁽¹⁹⁾⁽⁷⁹⁾

Aber nicht nur die axonalen Neurofilamente werden durch die umgebenden myelinisierenden Zellen in ihrem Erscheinungsbild verändert, auch die weit weniger häufig vertretenen Mikrotubuli scheinen diesem Mechanismus unterworfen zu sein. So wird berichtet, dass für die Stabilisierung des axonalen Mikrotubuli-Skeletts im PNS eine normale Myelinbildung der Schwannzellen ebenso nötig ist wie für die physiologische Zusammensetzung und Phosphorylierung der axonalen Mikrotubuli-assoziierten Proteine.⁽⁶²⁾⁽⁶³⁾⁽⁷⁴⁾ Auch die Transportrate von Tubulin innerhalb des Axons wird durch myelinisierende Zellen beeinflusst. Auffallend ist, dass es sich hierbei genau umgekehrt verhält wie bei den Neurofilamenten und sich der Tubulin-Transport durch Myelinmangel bei Axonen im PNS erhöht.⁽⁶²⁾⁽⁶³⁾⁽⁷⁵⁾ Die Anzahl der Mikrotubuli im Axon peripherer Nerven bleibt aber anscheinend unbeeinflusst.⁽⁶⁹⁾

Bemerkenswert ist, dass sich im ZNS einige Unterschiede zu den hier beschriebenen Verhältnissen des peripheren Nervensystems finden. So scheint für die Ansammlung einer ausreichenden Anzahl von Neurofilamenten bereits die Umhüllung des Axons mit Oligodendrozyten ohne Myelinbildung auszureichen,⁽⁷³⁾ bei pathologischem Myelinmangel ist die Transportrate der Neurofilament-Untereinheiten erstaunlicherweise sogar erhöht. Auffallend ist ebenfalls, dass sich die Mikrotubuli-Anzahl pro Axon nahezu verdoppelt, wenn ein Myelinmangel im ZNS vorliegt.⁽⁶⁴⁾

Welche Bedeutung aber haben die Zytoskelettbestandteile nun letztendlich für das Erscheinungsbild des reifen Axons? Das Zustandekommen des Kalibers von Axonen reifer Neuronen in Abhängigkeit von ihrem inneren Aufbau und auch von äußeren Faktoren wird in der Literatur häufig und vielfältig diskutiert.

5.1 Bedeutung der Neurofilamente

Die wohl wichtigste Rolle aller Zytoskelettbestandteile bei der Ausprägung und Erhaltung des Axonkalibers spielen die Neurofilamente.⁽¹¹⁶⁾ Eyer und Peterson⁽¹¹⁷⁾ führten Studien an transgenen Mäusen durch, die in Neuronen der Projektionsbahn des Hypothalamus ein Verschmelzungsprotein exprimierten, bei dem das Carboxyl-Ende der NF-H-Untereinheit durch β -Galactosidase ersetzt war. β -Galactosidase-Monomere können sehr stabile Tetramere bilden (Langley und Zabin, 1976, zitiert nach Eyer und Peterson⁽¹¹⁷⁾). Vermutlich aufgrund der hohen Affinität der β -Galactosidase-Anteile der einzelnen Proteine zueinander bildeten sich im Perikaryon große Filament-Ansammlungen, während gleichzeitig die Axone von diesen Neurofilamenten frei blieben. Infolgedessen entwickelte sich ein nur geringer Axon-Durchmesser von etwa 50% der Normalgröße. Interessanterweise zeigten die betroffenen Tiere trotzdem kaum Anzeichen einer Erkrankung und konnten in fortgeschrittenem Alter weder aufgrund ihrer Fortpflanzung noch wegen ihres allgemeinen Verhaltens eindeutig von ihren normalen Artgenossen unterschieden werden. Auch zeigten die fehlerhaften Neuronen nur selten Anzeichen von Degeneration. Eyer und Peterson⁽¹¹⁷⁾ sowie auch andere Autoren, die mit Mäusen mit verschiedensten Neurofilamentmutationen gearbeitet haben,⁽¹¹⁸⁾⁽¹¹⁹⁾⁽¹²⁰⁾ schließen daraus, dass Neuronen zwar die Organisation des Neurofilament-Zytoskeletts zur Ausbildung eines großen Axon-Kalibers benötigen, dies jedoch für Überleben und Funktion der Nervenzelle, zumindest bei Säugetieren mit einer so kurzen Lebensdauer wie der Maus, nicht zwingend notwendig ist. Sie räumen jedoch auch ein, dass zusätzlich noch weitere Faktoren das Kaliber eines Axons beeinflussen müssen, da sich auch bei Axonen ohne Neurofilamente Größenunterschiede zeigen.

Wie bereits unter Punkt 4.1.1, 4.1.2 und 4.1.3 beschrieben, unterliegen die Neurofilamente einem starken Einfluss der myelinbildenden Zellen, der sich sowohl in ihrer Anzahl als auch in ihrer Anordnung innerhalb des Axons sowie in ihrem biochemischen Erscheinungsbild widerspiegelt. All diese Punkte wirken sich letztendlich auf das Kaliber des Axons aus.

5.1.1 Neurofilament-Anzahl und –Anordnung

Bei der Betrachtung normaler myelinisierter Axone fällt auf, dass in den myelinhaltigen Internodien zum einen die Anzahl, zum anderen aber auch besonders die Dichte der Neurofilamente größer sind als in den nicht myelinhaltigen Ranvierschen Knoten, dem Initialsegment oder den Endstücken (siehe auch Punkt 4.1.2).⁽⁶⁹⁾ Der Zusammenhang dieser Verhältnisse mit der Myelinisierung wird noch deutlicher, wenn man die Axone von Mäusen mit einer Myelinisierungs-Störung genauer untersucht. Vergleicht man beispielsweise die Axone von Trembler-Mäusen, die eine mutationsbedingte Myelinisierungs-Störung im PNS aufweisen,⁽⁶¹⁾⁽⁶²⁾⁽⁶³⁾ mit den Axonen normaler Tiere, kann man eindeutig erkennen, dass die Anordnung der Neurofilamente in den Trembler-Axonen mit einer mehr als doppelt so hohen Dichte einhergeht wie bei der Kontrollgruppe.⁽⁷⁵⁾ Auch bei der Betrachtung der Axone von Shiverer-Mäusen, die zwar im PNS eine nahezu unbeeinträchtigte Myelinisierung zeigen, dafür aber im ZNS einen mutationsbedingten Myelinmangel entwickeln,⁽⁶⁴⁾⁽⁶⁵⁾⁽⁶⁶⁾⁽⁶⁷⁾ ist die gesteigerte Dichte im Neurofilament-Zytoskelett im Vergleich zu normalen Axonen unschwer festzustellen.⁽⁶⁴⁾

Nach Hsieh *et al.*⁽⁶⁹⁾ bewirken nun sowohl die gesteigerte Neurofilament-Anzahl als auch zusätzlich die größeren Zwischenräume zwischen den einzelnen Filamenten eine Zunahme des Axonkalibers im Vergleich zu den unmyelinisierten Bereichen. Im Gegensatz hierzu sehen de Waegh *et al.*⁽⁷⁵⁾ in erster Linie die Anordnung der Neurofilamente als bestimmend für den Durchmesser des Axons an. Die Anzahl dieser Filamente erwähnen sie zwar zusätzlich als möglichen Faktor, weisen allerdings darauf hin, dass das Kaliber eines Axons auch ohne deren Änderung variieren kann.

Auch der Bericht von Cole *et al.*⁽⁷⁸⁾ sollte nicht außer Acht gelassen werden. Im Unterschied zu Hsieh *et al.*⁽⁶⁹⁾ stellten sie nämlich bei ihren Studien an hypomyelinisierenden transgenen Mäusen fest, dass die Reduktion des Axonkalibers wohl allein aufgrund dichter Packung der Neurofilamente zustande kam. Der Neurofilament-Gehalt im Axon, gemessen anhand der Menge

der NF-H-, NF-M- und NF-L-Untereinheiten, schien im Vergleich zur Kontrollgruppe unverändert zu sein. Offenbar reicht also bereits die Anordnung der Neurofilamente innerhalb des Axons allein aus, um dessen Kaliber zu bestimmen. Eine Verringerung der Filament-Anzahl, zu der es beispielsweise durch den bei Myelinmangel verminderten Transport von Neurofilament-Proteinen vom Perikaryon ins Axon kommen kann (siehe auch Punkt 4.1.4), könnte aber unter Umständen den den Durchmesser mindernden Effekt der dichteren Neurofilament-Anordnung noch verstärken. Ebenso könnte sich eine höhere Anzahl zusätzlich zur weiteren Streuung der Filamente positiv auf das axonale Kaliber auswirken.

Auch Nixon *et al.*⁽¹⁹⁾ sehen einen Zusammenhang zwischen der Anzahl und Anordnung der Neurofilamente und dem Kaliber des Axons. Bei ihren Untersuchungen an Neuronen des Retinalganglions von Mäusen (siehe auch Punkt 2.2.4) konnten sie feststellen, dass mit Beginn des myelinisierten Abschnitts der einzelnen Axone sowohl die Neurofilament-Anzahl als auch die Größe der Abstände zwischen diesen Filamenten im Vergleich zum unmyelinisierten Anfangsteil deutlich anstiegen. Mit diesem Anstieg konnte eine ebenso deutliche Zunahme des Axonkalibers verzeichnet werden. Die Zusammenhänge bei der Ausbildung des axonalen Phänotyps scheinen also in ZNS und PNS im Bezug auf die Abhängigkeit vom Zytoskelett sehr ähnlich zu sein.

5.1.2 Neurofilament-Phosphorylierung

Das Zustandekommen von Anzahl und Anordnung der Neurofilamente und somit indirekt auch deren Wirkung auf das Kaliber des Axons unterliegen dem Grad der Phosphorylierung der Neurofilament-Untereinheiten. Wie schon unter Punkt 4.1.3 angesprochen, wird durch eine gesteigerte Neurofilament-Phosphorylierung die negative Ladung der Neurofilament-Seitenarme erhöht, was aufgrund der dadurch entstehenden wechselseitigen Abstoßungskräfte Auswirkungen auf die

Minstdistanzen zwischen den einzelnen Filamenten und somit auf deren Lagerung innerhalb des gesamten Zytoskelett-Netzwerkes haben könnte.⁽⁶⁹⁾⁽⁷⁹⁾ Darüberhinaus erhöht sich nach Ansicht von Nixon *et al.*⁽¹⁹⁾ mit der Phosphorylierung auch die räumliche Ausdehnung der Neurofilament-Seitenarme. Diese beiden Effekte könnten eine Erklärung dafür sein, inwieweit die räumliche Verteilung der Filamente eine Zunahme des Axon-Kalibers bewirkt.

Als übergeordneter Auslöser dieser Reihe von Zusammenhängen bleibt wieder der Einfluss der myelinbildenden Zellen auf das Axon festzuhalten. Schon am normalen Axon wird deutlich, dass der Grad der Phosphorylierung der NF-H- und auch der NF-M-Untereinheiten in den myelinisierten Bereichen gegenüber den nicht-myelinisierten Abschnitten erhöht ist.⁽⁶⁹⁾ Bei der Betrachtung der demyelinisierten Axone von Trembler-Mäusen werden diese Verhältnisse noch eindeutiger. So berichten Kirkpatrick und Brady⁽⁷⁴⁾ von mehreren Studien, in denen sie die Effekte mangelnder Myelinisierung bei Trembler-Mäusen auf das axonale Zytoskelett untersuchten, und erkennen konnten, dass die dichtere Packung der Neurofilamente und die Verminderung des Kalibers der betroffenen Axone gegenüber normalen Axonen auch mit einer Reduktion der Neurofilament-Phosphorylierung einherging. Auch de Waegh *et al.*⁽⁷⁵⁾ unterstützen diese Befunde und bezeichnen die Neurofilament-Phosphorylierung als Hauptregulator des Axon-Kalibers. Sie konnten bei Trembler-Mäusen ebenfalls eine eindeutige Beziehung zwischen der Packungsdichte der Neurofilamente im Axon und dem Phosphorylierungsgrad dieser Filamente erkennen. So vermuten auch sie, dass in erster Linie durch phosphorylierungsabhängige Abstoßungskräfte und Ausdehnung der Neurofilament-Seitenarme und somit durch Veränderung der Minstdistanzen zwischen den einzelnen Filamenten einerseits, sowie zu benachbarten Strukturen andererseits, der axonale Durchmesser ausgebildet wird. Dass diese Vorgänge abhängig von der Myelinbildung am entsprechenden Axon sind, begründen de Waegh *et al.*⁽⁷⁵⁾ ebenso wie Hsieh *et al.*⁽⁶⁹⁾ mit der Tatsache, dass selbst innerhalb ein und desselben Axons Unterschiede im Phosphorylierungsgrad und der Anordnung der Neurofilamente und somit auch im Durchmesser zu erkennen sind, abhängig davon, ob man die myelinisierten

Internodien oder aber nicht-myelinisierte Bereiche wie das Initialsegment oder die Ranvierschen Knoten betrachtet. Insbesondere weil aufgrund des axonalen Transports ein ständiger Fluß der Zytoskelett-Bestandteile herrscht, bleiben diese Strukturen, wie beispielsweise im gerade beschriebenen Fall die Neurofilamente, in ihrem Erscheinungsbild nicht konstant, sondern werden je nach ihrem momentanen Aufenthaltsort myelinabhängig verändert. Dieses Phänomen beruht vermutlich auf einem Kinase-Phosphatase-System, welches abhängig vom Kontakt der myelinbildenden Zelle mit dem Neuron regional selbst auf kleinste Distanzen dynamisch gesteuert wird.⁽¹⁸⁾⁽⁷⁵⁾⁽⁸⁰⁾

5.1.3 Bedeutung der Zusammensetzung der Neurofilamente aus den Untereinheiten NF-L, NF-M und NF-H

Neurofilamente haben einen Durchmesser von etwa 10 nm, weshalb man sie der Gruppe der Intermediärfilamente zuordnet, die bezogen auf ihre Größe zwischen den Mikrotubuli mit ca. 25 nm Durchmesser und den Mikrofilamenten mit nur etwa 5-7 nm Durchmesser liegen.⁽⁴⁾ Die Neurofilamente selbst setzen sich aus drei verschiedenen Neurofilament-Polypeptiden, den so genannten Neurofilament-Untereinheiten, mit je einem kurzen Aminoende und einem großen Carboxylende, zusammen. Von diesen Untereinheiten liegt das NF-L-Polypeptid mit einem Molekulargewicht von etwa 70 kd im zentralen Teil des Filaments, während NF-M (ca. 150 kd) und NF-H (ca. 200 kd) die Seitenarme bilden.⁽⁷⁾⁽⁸⁾⁽¹⁰⁾

Für die Ausbildung eines stabilen und funktionsfähigen axonalen Zytoskeletts sowie eines Axons mit einem bestimmten Kaliber spielt nun auch Zusammensetzung der Neurofilament-Untereinheiten eine entscheidende Rolle. Diese ist nämlich erstaunlicherweise relativ variabel und beeinflußt so das Axon in nicht unerheblichem Maße. Sowohl bei *in vivo*- als auch *in vitro*-Experimenten zeigte sich, dass für den Zusammenbau eines Neurofilaments zwar unbedingt die NF-L-Untereinheit, zusätzlich aber nur eines der beiden anderen Polymere, also NF-M oder NF-H, notwendig ist.⁽¹⁰⁾⁽¹²¹⁾ Bei Versuchen mit Mäusen, denen

aufgrund einer gezielten Zerstörung des NF-L-Gens die betreffende Untereinheit komplett fehlte, konnten Zhu *et al.*⁽¹¹⁹⁾ die Notwendigkeit dieses Proteins für den Aufbau eines intakten Axons mit normalem Kaliber nachweisen. Tiere mit dem NF-L knockout entwickelten sich zwar normal und zeigten in keiner Weise einen auffälligen Phänotyp, jedoch bildeten sie sowohl im zentralen als auch im peripheren Nervensystem schwere axonale Hypotrophien mit einem deutlichen Mangel an Intermediärfilament-Strukturen aus. Auch die Regeneration von Nervenfasern nach Axotomie war bei diesen Mäusen im Vergleich zu normalen Tieren deutlich verlangsamt, und zwar sowohl bei homozygot als auch bei heterozygot defekten Tieren. So betrug zwei Wochen nach der Axotomie die Anzahl der regenerierten myelinisierten Axone bei den Tieren mit NF-L-Null/Null-Mutation nur maximal 25% derjenigen der Kontrolltiere. Trotzdem kommen Zhu *et al.*⁽¹¹⁹⁾ zu dem interessanten Ergebnis, dass die Axone dieser Tiere trotz des dramatischen Mangels an Neurofilamenten sowohl zur Regeneration über größere Distanzen als auch zur Remyelinisierung in der Lage sind, wenn auch über einen sehr viel längeren Zeitraum als normale Axone.

Ebenfalls in Versuchen mit Mäuse-Mutanten untersuchten Elder *et al.*⁽¹²⁰⁾ die Bedeutung der NF-M-Untereinheit für den Phänotyp von Axonen sowohl im ZNS als auch im PNS. Dabei zeigte sich, dass Tiere mit einer Null/Null-Mutation des NF-M-Gens zusätzlich einen drastischen Mangel an NF-L entwickelten, wovon fast 90% des normalen Gehalts fehlten. Am NF-M-Gen heterozygot defekte Mäuse zeigten immerhin einen NF-L-Mangel von etwa 50%. Elder *et al.*⁽¹²⁰⁾ vermuten deshalb, dass die Menge an NF-L durch die Menge an NF-M reguliert wird, um ein in etwa ausgeglichenes stöchiometrisches Verhältnis zwischen beiden Polypeptiden aufrechtzuhalten. Dabei berufen sie sich auch auf Beobachtungen aus früheren Studien ihrer Arbeitsgruppe. Für den gleichzeitigen Anstieg von NF-H bei den untersuchten knockout-Tieren findet sich jedoch keine völlig zufriedenstellende Erklärung. Vermutlich liegt jedoch auch hier ein Regulationsmechanismus zugrunde, der abhängig von der vorhandenen Menge an NF-M oder auch von NF-L ist.⁽¹²⁰⁾ Untersucht man nämlich den umgekehrten Fall, also Tiere mit einer durch Mutation gesteigerten NF-M-Bildung, kann man

feststellen, dass in einem solchen Fall die Menge an NF-H proportional abnimmt.⁽¹²²⁾

Wie Zhu *et al.*⁽¹¹⁹⁾ bereits bei ihren Mäusen mit NF-L-Mangel feststellen konnten, so zeigte sich auch bei den von Elder *et al.*⁽¹²⁰⁾ gezüchteten NF-M-Deletionsmutanten, dass diese sich ebenfalls normal entwickelten und aufgrund ihres Phänotyps oder ihres Verhaltens nicht von ihren normalen Artgenossen zu unterscheiden waren. Jedoch konnte auch bei ihnen eine dramatische Verkleinerung der axonalen Kaliber sowohl im ZNS als auch im PNS festgestellt werden. Hiervon waren Axone jeder Größe betroffen. Axone des Nervus ischiadicus beispielsweise wiesen bei NF-M-Null/Null-Mutanten einen durchschnittlichen Durchmesser von etwa 5,5 µm auf, während bei Tieren der Kontrollgruppe im Vergleich 7,2 µm gemessen wurden. Gleichzeitig mit dieser Verminderung der Axon-Kaliber war auch ein Rückgang der Neurofilament-Anzahl pro Axon zu verzeichnen. Elder *et al.*⁽¹²⁰⁾ vermuten als Ursache hierfür, dass die Bildung reifer Neurofilamente anhand der vorhandenen Menge von NF-L reguliert wird, welches ja gekoppelt an den Mangel an NF-M in nur geringem Maße vorliegt, wie oben beschrieben. Es sieht also so aus, als sei die NF-M-Untereinheit insofern sehr stark an der Regulation des axonalen Kalibers beteiligt, da sie den Level an NF-L verändern und somit die Anzahl an reifen Neurofilamenten im Axon steuern kann.

Während somit die Auswirkungen eines Mangels sowohl von NF-L als auch von NF-M auf den Phänotyp des Axons offensichtlich sind, scheinen die Folgen des Fehlens der schwersten der drei Neurofilament-Untereinheiten, dem NF-H-Polypeptid, überraschenderweise weitaus unbedeutender zu sein.⁽¹²³⁾⁽¹²⁴⁾ So berichten Elder *et al.*⁽¹²³⁾ von einer weiteren Studie mit einem Mäuse-Mutanten-Stamm, bei dem wiederum eine Null-Mutation, diesmal des NF-H-Gens, erzeugt wurde. Heterozygot deletierte Tiere wiesen dabei einen Rückgang an axonalem NF-H von etwa 50% auf, während bei homozygotem Gendefekt kein NF-H mehr messbar war. Auch diese Tiere erschienen bei der Geburt normal und zeigten bis zum Alter von etwa einem Jahr keinerlei Auffälligkeiten in ihrem Phänotyp, ihrer Entwicklung oder ihrem Verhalten, durch die sie von Artgenossen mit NF-H-

Plus/Plus-Genotyp hätten unterschieden werden können. In Bezug auf die im Axon vorliegenden Mengen der einzelnen NF-Untereinheiten konnte jedoch festgestellt werden, dass bei komplettem Fehlen des NF-H-Polypeptids die Menge an NF-L um ca. 10-25% gegenüber der Kontrollgruppe reduziert war. Dieser Rückgang ist jedoch vergleichsweise gering, wenn man bedenkt, dass bei den oben beschriebenen Versuchen mit NF-M-Null/Null-Mutanten⁽¹²⁰⁾ ein NF-L-Mangel von fast 90% gemessen werden konnte. Die Menge an NF-M blieb auch bei völliger Abwesenheit von NF-H nahezu unverändert. Aufgrund ihrer Untersuchungsergebnisse vermuten Elder *et al.*⁽¹²³⁾ deshalb, dass die Bedeutung der NF-H-Untereinheit für den Zusammenbau und die Reifung der Neurofilamente und somit für den Aufbau des axonalen Zytoskeletts eher unerheblich ist. So war die Menge der Neurofilamente sowohl in Axonen des ZNS als auch des PNS bei Tieren ohne NF-H nur etwa 10 % kleiner als bei normalen Mäusen. Auch ihre Zusammensetzung und Anordnung innerhalb des Axons war unauffällig. Die Bedeutung von NF-H scheint vielmehr beim Erreichen eines maximalen Axonkalibers zum Tragen zu kommen. Die Arbeitsgruppe konnte nämlich desweiteren erkennen, dass die myelinisierten Axone der Mäuse-Mutanten zwar in ihrer Anzahl nicht signifikant verändert waren, sie jedoch insgesamt kleiner waren und dass kein Axon der Versuchsgruppe den größten Durchmesser erreichte, der bei der Kontrollgruppe gemessen wurde. Dies gilt für Axone des ZNS und des PNS gleichermaßen. Axone des Nervus ischiadicus beispielsweise wiesen bei den Tieren mit NF-H-Null/Null-Mutation im Durchschnitt einen Durchmesser von $3,4 \pm 1,1 \mu\text{m}$ auf, während bei der Kontrollgruppe $3,6 \pm 1,0 \mu\text{m}$ gemessen werden konnten. Die relativ großen Axone des Zervikalstrangs waren bei Vorliegen einer NF-H-Null/Null-Mutation von normalerweise durchschnittlichen $6,13 \pm 1,91 \mu\text{m}$ Dicke auf $5,28 \pm 1,59 \mu\text{m}$ reduziert.

Zu ähnlichen Ergebnissen wie Elder *et al.*⁽¹²⁰⁾⁽¹²³⁾ kamen auch Jacomy *et al.*⁽¹¹⁸⁾ bei ihren Studien an Mäusen, die durch gezielte Zerstörung der entsprechenden Gene entweder für eine oder sogar für beide schweren Neurofilament-Untereinheiten, also NF-M und NF-H, homozygot defekt waren. Auch in dieser

Versuchsreihe hatte das Fehlen von NF-M allein eine deutliche Reduktion des Kalibers, besonders bei großen myelinisierten Axonen zur Folge, während ein Fehlen von NF-H kaum einen Effekt dieser Art hatte. Um die Bedeutung der einzelnen Polypeptide genauer untersuchen zu können, arbeiteten Jacomy *et al.*⁽¹¹⁸⁾ zusätzlich mit Tieren, denen infolge einer doppelten Null/Null-Mutation gleichzeitig NF-M und NF-H fehlten. Wie schon bei Mäusen mit Null/Null-Mutation des Gens nur einer einzelnen Neurofilament-Untereinheit zu beobachten war,⁽¹¹⁹⁾⁽¹²⁰⁾⁽¹²³⁾ so zeigten verblüffenderweise sogar diese zweifach homozygot deletierten Tiere keinerlei Auffälligkeiten in Entwicklung, Phänotyp oder Fruchtbarkeit, die sie von Artgenossen ohne Mutation unterschieden hätten. Bei morphologischer Analyse der Axone, unter anderem am Nervus ischiadicus dieser Tiere zeigte sich hingegen ein deutlicher Mangel an Intermediärfilament-Strukturen, begleitet von einem Anstieg der Mikrotubuli-Anzahl um fast das Doppelte im Vergleich zu normalen Axonen. Die Menge an NF-L in ZNS und PNS war insgesamt ebenfalls drastisch reduziert, im Durchschnitt um etwa 80%, und das vorhandene NF-L fand sich zum größten Teil in den Perikaryen der Neuronen und fehlte in den Axonen beinahe völlig. Da bei Tieren, denen nur jeweils eine der beiden schweren Untereinheiten fehlte, NF-L trotzdem, wenn auch reduziert, in den Axonen auftritt, vermuteten Jacomy *et al.*⁽¹¹⁸⁾, dass das NF-L-Polypeptid mindestens eine der beiden anderen Untereinheiten benötigt, um aus dem Perikaryon ins Axon transportiert werden zu können. Weiterhin besteht die Vermutung dieser Autoren, dass NF-L zwar genuin die Fähigkeit besitzt, oligomere Strukturen zu bilden, dass jedoch zur effektiven Ausbildung eines normalen Intermediärfilament-Netzwerkes die anderen Komponenten NF-M oder NF-H obligatorisch notwendig sind.

Was die axonalen Kaliber bei Fehlen von NF-M und gleichzeitig NF-H betrifft, so war deren Größenreduktion vergleichbar mit der von Tieren mit lediglich einer NF-L-Null-Mutation,⁽¹¹⁹⁾ und nur geringgradig deutlicher als bei Vorliegen von einer isolierten NF-M-Null-Mutation. Den deutlichen Anstieg des Mikrotubuligehalts der Axone von Mäusen mit doppelter Null-Mutation erklären Jacomy *et al.*⁽¹¹⁸⁾ ebenfalls anhand von Vergleichen mit Tieren mit nur einer

einfachen Mutation. In Abwesenheit von lediglich NF-M steigt die Mikrotubuli-Anzahl in den Axonen nur gering an, während der Mangel an NF-H oder an beiden schweren Polypeptiden einen Anstieg der Mikrotubulizahl um bis zu 200% verursacht. Offenbar spielt also die NF-H-Untereinheit eine wichtige Rolle bei der Regulation des Mikrotubuligehalts im Axon, für die Bildung des Neurofilamentgerüsts und somit für das zirkuläre Wachstum des Axons scheint sie jedoch von untergeordneter Bedeutung zu sein.

5.2 Bedeutung der Mikrotubuli

Die überaus wichtige Rolle der Neurofilamente bei der Ausprägung des axonalen Kalibers scheint heutzutage unumstritten. Dennoch gibt es Vermutungen, dass auch die Mikrotubuli, welche mit ihren etwa 25 nm Durchmesser⁽⁴⁾ die größte der drei filamentösen Strukturen des neuronalen Zytoskeletts darstellen, an der Ausbildung des Axonquerschnitts nicht ganz unbeteiligt sein könnten. Bestehend aus vielen linearen Tubulin-Untereinheiten stellt der Mikrotubulus ein Polymer dar, dessen Länge stark variieren kann und dessen zylindrische Form die stabilste unter den Filamenten des Axon-Zytoskeletts darstellt (siehe auch Punkt 2.2.2). Dies hat besondere Bedeutung bei der Erhaltung der langezogenen Form des Axons.⁽⁵⁾ Die wichtigste Aufgabe kommt den Mikrotubuli wohl aber im Rahmen des axonalen Transports zu, wo sie durch ihre strikt longitudinale Ausrichtung als Transportbahnen dienen, an welchen sich Mikrotubuli-abhängige Transportproteine orientieren. Ihre ebenfalls gleichförmig ausgerichtete Polarität – die (+)-Enden sind stets distal orientiert – unterstützt diese Funktion zusätzlich.⁽⁵⁾⁽¹²⁾

Friede und Samorajski vermuteten bereits im Jahre 1970, dass die Anzahl an Mikrotubuli für die Ausbildung des Axon-Kalibers eine Rolle spielt, wenn auch eine geringere als die der Neurofilamente. So zeigte sich schon damals bei Untersuchungen der Axone von Mäusen und Ratten, dass unabhängig von einer Myelinisierung mit zunehmendem Axon-Durchmesser die Anzahl an Mikrotubuli

ansteigt. In der Relation war dieser Anstieg allerdings deutlich kleiner als die Zunahme der Zahl an Neurofilamenten. Auch Faundez und Alvarez⁽¹²⁶⁾ konnten eine Zunahme der Mikrotubulimenge mit zunehmendem Axon-Kaliber feststellen, die ebenfalls bei myelinisierten und nicht-myelinisierten Fasern gleichermaßen zu erkennen war. Gleichzeitig konnte mit der Zunahme des Axon-Durchmessers eine geringere Packungsdichte der Mikrotubuli gemessen werden. Faundez und Alvarez⁽¹²⁶⁾ vermuten, dass sich die Organisation der axonalen Mikrotubuli eher an den Stabilitätsbedürfnissen des Zytoskeletts orientiert als an ihrer Funktion als Leitschienen für den axonalen Transport. Auch eine weitere Studie von Faundez *et al.*⁽¹²⁷⁾ kommt zu dem Ergebnis, dass die Mikrotubuli an der Ausbildung des Axon-Kalibers direkt beteiligt sind.

Wie sich den Ausführungen in Kapitel 4 entnehmen läßt, unterliegt das axonale Zytoskelett einem deutlichen Einfluss der myelinbildenden Zellen. Diesem Einfluss können sich auch die Mikrotubuli nicht entziehen. Wie schon unter Punkt 4.1.6 beschrieben, finden sich dabei geringe Unterschiede zwischen zentralem und peripheren Nervensystem. Während man an den mangelhaft myelinisierten Nervenfasern des PNS von Trembler-Mäusen eine geringere Stabilität des axonalen Mikrotubuliskeletts, eine veränderte Zusammensetzung und Phosphorylierung der axonalen Mikrotubuli-assoziierten Proteine sowie eine erhöhte Transportrate an beweglichem Tubulin feststellen kann,⁽⁶²⁾⁽⁶³⁾⁽⁷⁴⁾ zeigen sich bei der Untersuchung von Axonen des ZNS von Shiverer-Mäusen etwas andere Verhältnisse. So zählt man hier etwa doppelt so viele Mikrotubuli wie bei normalen Axonen, wobei deren Stabilität zwar wie in Trembler-Axonon verringert ist, die Dichte jedoch gegenüber normalen Axonen ebenfalls drastisch erhöht ist.⁽⁶⁴⁾⁽⁸¹⁾

Was den Einfluss des Myelins auf die Mikrotubuli-Anzahl im Axon und somit indirekt auf das axonale Kaliber betrifft, so finden sich in der Literatur inzwischen unterschiedliche Angaben. Hernández *et al.*⁽²⁰⁾ berichten von Untersuchungen myelinisierter und nicht-myelinisierter Bereiche bei Axonen des Nervus opticus adulter Ratten unter dem Elektronenmikroskop. Hierbei konnten sie feststellen, dass das Axon-Kaliber in den myelinisierten Bereichen um 59% größer war als in

den nicht-myelinisierten Abschnitten. Gleichzeitig mit dieser Kaliber-Zunahme stieg auch die Anzahl an Mikrotubuli im Axon um 36%, während die Dichte an Mikrotubuli pro μm^2 von 85 auf 20 sank. Bei Vergleichen myelinisierter und nicht-myelinisierter Opticus-Axone desselben Durchmessers erkannten Hernández *et al.*⁽²⁰⁾ interessanterweise, dass hier keinerlei Unterschiede in der Mikrotubuli-Dichte vorlagen. Sie gehen deshalb davon aus, dass die Packungsdichte unabhängig vom Myelin festgelegt wird und lediglich eine Anpassung an das jeweilige axonale Kaliber darstellt. Hingegen steigt laut den Darstellungen dieser Arbeitsgruppe die Anzahl an Mikrotubuli in Abhängigkeit vom Myelingeht. Inwieweit sich diese jedoch direkt auf das Axon-Kaliber auswirkt oder ob das Kaliber unabhängig von den axonalen Mikrotubuli bestimmt wird, wird nicht erläutert.

Im Rahmen ihrer Arbeit über Stabilität und Dichte des axonalen Mikrotubuli-Zytoskeletts untersuchten auch Kirkpatrick *et al.*⁽⁸¹⁾ die Axone des Nervus opticus normaler Mäuse, um eventuelle Zusammenhänge mit der Schichtdicke des Myelins aufzuzeigen. Diese Arbeitsgruppe konnte feststellen, dass mit zunehmender Myelinisierung und gleichzeitig steigendem axonalem Kaliber die Dichte der Mikrotubuli im Axon abnahm, also im Gegensatz zu den Aussagen von Hernández *et al.*⁽²⁰⁾ offenbar myelinabhängig reagiert. Bei 4-5 Schichten Myelin, was der niedrigsten Anzahl an Myelinschichten bei myelinisierten Axonen normaler Mäuse entspricht, konnten im Axonquerschnitt durchschnittlich 2,5 Mikrotubuli pro Hexagon gezählt werden, wobei ein Hexagon einer Fläche von $0,035 \mu\text{m}^2$ entsprach. Bei Axonen mit 11 oder mehr Myelinschichten sank diese Zahl auf 1,5 Mikrotubuli pro Hexagon. Inwieweit beziehungsweise ob überhaupt Veränderungen in der absoluten Mikrotubuli-Anzahl im Axon mit der Myelinisierung einhergingen, wird leider nicht erwähnt. Weitere Untersuchungen an Shiverer-Mäusen zeigten, dass bei diesen die mangelnde ZNS-Myelinisierung mit einer hohen Mikrotubuli-Dichte in Axonen des Nervus opticus einhergeht. Dies gilt für alle Größen von Axonen und auch für sämtliche Myelinisierungsgrade. Da trotz der Myelinisierungsstörung auch hier eine Korrelation zwischen Mikrotubuli-Dichte, Axon-Durchmesser und

Myelinisierung zu erkennen war, vermuten Kirkpatrick *et al.*⁽⁸¹⁾ das Vorhandensein vielfältiger und verschiedener Gliazellsignale zur Regulation der unterschiedlichen Faktoren des Mikrotubuli-Zytoskeletts im Axon.

Den Ausführungen von Hsieh *et al.*⁽⁶⁹⁾ lässt sich eine weitere Aussage bezüglich der Mikrotubuli-Anzahl im Axon entnehmen. In ihrer Studie untersuchten und verglichen sie die myelinisierten und nicht-myelinisierten Bereiche normaler Axone des Dorsalwurzelganglions. Erstaunlicherweise kamen sie hierbei zu dem Ergebnis, dass das axonale Kaliber in den myelinisierten Bereichen zwar deutlich größer ist als in den unmyelinisierten, dass jedoch die Anzahl an Mikrotubuli im Axon vom Myelin unbeeinflusst zu sein scheint und in myelinisierten und nicht-myelinisierten Bereichen gleich groß ist. Den Einfluss auf das Axon-Kaliber schreiben Hsieh *et al.*⁽⁶⁹⁾ in erster Linie der Anzahl und Anordnung der Neurofilamente zu, wobei jeweils ein deutlicher Unterschied zwischen myelinisierten und nicht-myelinisierten Axonabschnitten zu erkennen war.

Auch Jacomy *et al.*⁽¹¹⁸⁾ kommen zu dem Ergebnis, dass für das zirkuläre Wachstum eines Axons in erster Linie ein intaktes Neurofilament-Zytoskelett notwendig ist, der Gehalt an Mikrotubuli jedoch keinen direkten Einfluss zu haben scheint. Bei ihren Untersuchungen an Mäusen, die aufgrund von gezielter Genzerstörung für beide schweren Neurofilament-Untereinheiten, also NF-M und NF-H, homozygot defekt waren, zeigte sich, dass dieser Mangel eine deutliche Reduktion des Axon-Kalibers zur Folge hatte. Beeindruckender Weise stieg die Anzahl an Mikrotubuli im Axon gleichzeitig um bis zu 200%, verglichen mit normalen Axonen. Es hat also den Anschein, als könne selbst ein so deutlich gesteigerter Mikrotubuli-Gehalt einer Verminderung des axonalen Durchmessers nicht entgegenwirken. Durch weitere Versuche mit Tieren, denen jeweils nur eine der beiden genannten Untereinheiten fehlte, konnten Jacomy *et al.*⁽¹¹⁸⁾ schließlich erkennen, dass das NF-H-Polypeptid eine wichtige Rolle bei der Regulation der Mikrotubuli-Anzahl im Axon zu spielen scheint. Die enorme Zunahme der Mikrotubuli-Anzahl konnte lediglich bei Abwesenheit von NF-H festgestellt werden, wohingegen ein NF-M-Mangel nur eine minimale Erhöhung dieser Zahl

nach sich zog. Somit kann der drastische Anstieg im oben beschriebenen Fall offenbar dem Fehlen von NF-H zugeschrieben werden.

Bei der Suche nach Klärung, inwieweit Anzahl und Anordnung der Mikrotubuli im Axon myelinabhängig gesteuert werden und ob ein direkter Einfluss dieser Parameter auf das Axonkaliber vorliegt, scheinen auch die Arbeiten von Zhao *et al.*⁽¹²⁸⁾⁽¹²⁹⁾ recht bedeutungsvoll. Diese Arbeitsgruppen beschäftigten sich mit Wachteln, bei denen eine Nonsensemutation im NF-L-Gen vorliegt. Aufgrund dieser Mutation sind diese Tiere in keiner Weise in der Lage, auch nur geringste Mengen an polymerisationsfähigem NF-L-Protein zu bilden, was zu einem drastischen Mangel an Neurofilamenten führt.⁽¹³⁰⁾ Dies resultiert sowohl im peripheren als auch im zentralen Nervengewebe in deutlicher axonaler Hypotrophie.⁽¹³¹⁾ Verblüffend ist, dass von dieser Axonhypotrophie anscheinend nur myelinisierte Nervenfasern betroffen sind. Untersuchungen von Zhao *et al.*⁽¹²⁹⁾ an den Axonen unmyelinisierter Fasern von Wachteln mit Mutation im Vergleich zu solchen von Tieren ohne Mutation haben nämlich ergeben, dass hier keinerlei Unterschiede in Durchmesser oder Umfang vorlagen. Auffallend war jedoch dabei, dass in den Axonen der Mutanten die Anzahl an Mikrotubuli signifikant erhöht war. Zhao *et al.*⁽¹²⁹⁾ vermuten daher, dass es sich bei diesem Phänomen um einen kompensatorischen Anstieg handeln könnte, der dem Ausgleich des Mangels an Neurofilamenten dient und so eine Verringerung des Axonkalibers verhindert. Daraus schließen sie wiederum, dass am Erhalt der Größe eines unmyelinisierten Axons Neurofilamente und Mikrotubuli gleichermaßen beteiligt sein könnten. Unerwarteterweise lassen sich diese Vermutungen jedoch nicht ohne weiteres auf myelinisierte Axone von Wachteln mit der beschriebenen Mutation übertragen. Hierzu führten Zhao *et al.*⁽¹²⁸⁾ in einer weiteren Studie Untersuchungen durch, wobei diesmal die myelinisierten Fasern des Nervus peroneus von Wachteln mit Mutation und von Tieren aus einer Kontrollgruppe betrachtet wurden. Hierbei zeigte sich, dass bei Tieren mit Mutation die untersuchten Axone deutlich kleiner waren als bei normalen Tieren. Gleichzeitig konnte zwischen beiden Gruppen kein prägnanter Unterschied in der durchschnittlichen Anzahl an Myelinlamellen oder deren Anordnung festgestellt

werden. Was die axonalen Mikrotubuli betrifft, so zeigten diese bei Axonen von Tieren mit Mutation eine dichtere Anordnung als bei Axonen der Kontrollgruppe. Die absolute Anzahl an Mikrotubuli pro Axon mit einer bestimmten Anzahl an Myelinlamellen war jedoch in beiden Gruppen gleich. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Untersuchungen an unmyelinisierten Axonen von Wachteln mit einer Nonsensemutation im NF-L-Gen⁽¹²⁹⁾ konnte also bei dieser Studie mit Axonen myelinisierter Nervenfasern solcher Tiere kein Anstieg der Mikrotubuli-Anzahl festgestellt werden. Offenbar tritt in diesem Fall kein Versuch der Kompensation des Neurofilamentmangels in Erscheinung. Sicherlich sollte dieses Ergebnis zu Überlegungen anregen, inwieweit der beobachtete Anstieg der Mikrotubuli-Anzahl in den unmyelinisierten Axonen⁽¹²⁹⁾ wirklich dem Ausgleich des Mangels an Neurofilamenten dient oder ob dieses Phänomen auch andere Ursachen haben könnte.

Insgesamt läßt sich erkennen, dass die Bedeutung der axonalen Mikrotubuli im Rahmen der Bildung des Axonkalibers noch nicht restlos geklärt zu sein scheint. Zwar finden sich ausreichend eindeutige Erklärungen, dass die wesentlichere Rolle in diesem Zusammenhang den Neurofilamenten zukommt, jedoch lassen sich die Aussagen der verschiedenen Autoren bezüglich der Mikrotubuli noch nicht völlig miteinander in Einklang bringen.

5.3 Bedeutung der elektrischen Aktivität des Neurons

Bei der Überlegung, wodurch die Größe eines Axons bestimmt wird, stellt sich die Frage, ob hier neben den inneren Bestandteilen des Neurons auch äußere Umstände Einfluss haben. Besonders naheliegend erscheint in diesem Zusammenhang die Betrachtung der elektrischen Aktivität der Nervenzelle zu sein. Man könnte vermuten, dass Neuronen mit hoher Aktivität dickere Axone ausbilden als solche mit geringerer Aktivität, da eine höhere Impulsfrequenz eine höhere Beanspruchung des Impuls-leitenden Axons darstellt als eine niedrige, ähnlich wie beispielsweise ein stark beanspruchter Muskel kräftiger ausgebildet

wird als ein wenig beanspruchter. Inwieweit aber läßt sich diese Vermutung wirklich bestätigen?

Zumindest was ihren Einfluss auf die Myelinbildung sowohl im ZNS als auch im PNS betrifft, ist die Rolle der neuronalen Impulsfrequenz bekannt (siehe auch Punkt 3.4.6). Sowohl Oligodendrozyten⁽⁵⁶⁾ als auch Schwannzellen⁽⁵⁵⁾ sind hier, jeweils in etwas unterschiedlichem Maße, betroffen. Nach Demerens *et al.*⁽⁵⁶⁾ besitzen die Oligodendrozyten des ZNS die Fähigkeit, ohne direkten axonalen Kontakt Bestandteile des Myelins zu produzieren und sogar Myelin-artige Gebilde zu formen. Durch gezielte Hemmung der elektrischen Aktivität untersuchter Axone mittels Tetrodotoxin (TTX), welches die neuronalen Na⁺-Kanäle blockiert, konnte die Arbeitsgruppe jedoch sowohl bei *in vitro*- als auch *in vivo*-Versuchen feststellen, dass zur Bildung normaler Myelinscheiden bioelektrische Aktivität von Neuronen in direkter Umgebung der Oligodendrozyten notwendig zu sein scheint. Gleichzeitig kamen die Autoren zu dem Ergebnis, dass die Myelinbildung im ZNS für die Stärke der elektrischen Aktivität des jeweiligen Neurons sensitiv zu sein scheint, da einerseits die Hemmung der Aktionspotentiale eines Axons die Myelinbildung der benachbarten Oligodendrozyten unterdrückt, andererseits eine Aktivitätssteigerung auch eine Steigerung der Myelinbildung nach sich zieht.

Auch Crespo *et al.*⁽¹³²⁾ untersuchten die Auswirkungen der neuronalen bioelektrischen Aktivität auf Axon und Myelinbildung. Sie arbeiteten mit Zellen des Retinalganglions von Ratten und überprüften, inwieweit eine Blockade der elektrischen Aktivität hier Einfluss auf die Axone des Nervus opticus hat. Auch diese Arbeitsgruppe bediente sich dabei der Methode der Hemmung der Aktionspotentiale mittels Tetrodotoxin, welches durch direkte Infusion in das Auge eingebracht wurde. Zum Vergleich wurden auch die optischen Axone von Tieren nach systemischer TTX-Injektion sowie einer unbehandelten Kontrollgruppe untersucht. Crespo *et al.*⁽¹³²⁾ konnten feststellen, dass die allgemeine Morphologie der Nervi optici aller drei Gruppen gleich war. Auch der Beginn der Myelinisierung lag stets im selben Zeitrahmen, so dass in jeder Gruppe am Tag 7 p.n. erste myelinisierte Fasern zu erkennen waren. Diese

Beobachtung steht übrigens auch mit den Erkenntnissen von Colello *et al.*⁽¹³³⁾ im Einklang, die davon ausgehen, dass der Beginn der Myelinbildung im ZNS unabhängig von der elektrischen Aktivität des Axons ist. Bei den Untersuchungen von Crespo *et al.*⁽¹³²⁾ war jedoch auffallend, dass die direkt per TTX-Infusion behandelten Nerven am Tag 12 p.n. deutlich weniger myelinisierte Fasern aufwiesen als die der beiden anderen Gruppen, nämlich nur etwa 10% anstatt etwa 14%. Außerdem zeigten diese Nerven größere Mengen an dimorphem Myelin, welches zusätzlich zur normalen Umwicklung eines Axons noch weitläufige komplizierte Formen ausbildete oder auch ein bereits myelinisiertes Axon ein zweites Mal umhüllte. Trotzdem war die Dicke der Myelinschichten wiederum in allen drei Gruppen gleich. In Bezug auf die Größe der einzelnen Axone des Nervus opticus stellte sich interessanterweise heraus, dass es hier keinerlei Unterschiede zwischen den drei untersuchten Gruppen gab, weder bei myelinisierten noch bei unmyelinisierten Fasern. Crespo *et al.*⁽¹³²⁾ schließen aus ihren Ergebnissen, dass die elektrische Aktivität der Neuronen zwar in gewissem Maße eine Rolle für die Bildung von normalem Myelin im Nervus opticus zu spielen scheint, dass sie jedoch nicht an der Ausbildung und Erhaltung des Axonkalibers beteiligt ist.

Auch im PNS sind Wechselwirkungen zwischen der bioelektrischen Aktivität des Neurons und der Myelinisierung der Axone bekannt. So beschreiben Fitzgerald und Fulton (1992, zitiert nach Stevens *et al.*⁽⁵⁵⁾) beispielsweise, dass Schwannzellen trotz ständigem direkten Kontakt zu Axonen des Dorsalwurzelganglions mit der Myelinbildung erst beginnen, wenn sich die ursprünglich niedrige axonale Aktionspotentialfrequenz in einer bestimmten pränatalen Phase erhöht. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Verhältnissen im ZNS spricht dies dafür, dass ein gewisser Grad an neuronaler elektrischer Aktivität für Schwannzellen zur Initiierung der Myelinisierung signalgebend ist. Desweiteren fanden Stevens *et al.*⁽⁵⁵⁾ bei ihren Untersuchungen am Dorsalwurzelganglion von Mäusen heraus, dass eine niedrige axonale Impulsfrequenz von nur 0,1 Hz die Myelinisierung um mehr als das Dreifache reduzierte im Vergleich zu Axonen, die mit 1 Hz stimuliert wurden sowie zu

unstimulierten Kontrollgruppen. Offenbar wirkt sich hier, anders als im ZNS, nur eine Verringerung der elektrischen Aktivität auf die Myelinbildung aus, während eine Steigerung derselben keinen Effekt hat. Die Autoren vermuten, dass die Hemmung der Myelinbildung bei niedriger Aktionspotentialfrequenz darauf beruht, dass in diesem Fall die Expression Kalzium-unabhängiger Zelladhäsionsmoleküle, besonders L1, stark reduziert wird. L1 ist für den Start des zellulären Myelinisierungsprogramms notwendig.⁽²⁵⁾⁽³⁷⁾⁽³⁸⁾ Wurden nämlich die gleichen Stimulationsversuche unter Bedingungen durchgeführt, unter denen es zu keiner Verringerung der L1-Expression kommen konnte, ergaben sich keinerlei Auswirkungen auf die Myelinbildung.⁽⁵⁵⁾

Was nun die Größe des Axons im PNS betrifft, so scheinen auch hier, wie bereits für das ZNS beschrieben, keine direkten Zusammenhänge mit der bioelektrischen Aktivität des Neurons zu bestehen. Gordon *et al.*⁽¹³⁴⁾ führten Studien an adulten Kaninchen durch, bei denen sie über am Nerv angebrachte Elektroden die elektrische Aktivität des Nervus peroneus communis bzw. des Nervus tibialis sowohl vor als auch nach Axotomie untersuchten. Ebenso führten sie mikroskopische Untersuchungen der Axongröße und -morphologie der entsprechenden Nerven durch. Als Ergebnis dieser Versuchsreihe zeigte sich, dass sowohl die Menge an Aktionspotentialen als auch das Kaliber der einzelnen Axone nach deren Axotomie drastisch zurückgingen. Noch weitaus bemerkenswerter war jedoch, dass diesem Geschehen auch durch anhaltende elektrische Stimulation der axotomierten Fasern nicht entgegengewirkt werden konnte. Ganz im Gegenteil hatte eine solche Stimulation zwar anfangs für die Dauer von etwa einem Monat einen geringen Faser-erhaltenden Effekt, ab etwa 90 Tagen jedoch zeigten stimulierte Nerven deutlich mehr atrophiierte Axone als unstimulierte. Sowohl licht- als auch elektronenmikroskopisch erschienen diese atrophiierten Fasern gesund und selbst die kleinsten unter ihnen waren nach wie vor myelinisiert. Gordon *et al.*⁽¹³⁴⁾ schließen aus ihren Ergebnissen, dass die neuronale Aktivität für die Erhaltung des Axonkalibers im PNS wenn überhaupt nur eine sehr geringe Rolle spielt. Sie vermuten vielmehr, dass die Größe der

Nervenfasern in erster Linie durch den funktionellen Kontakt mit dem peripheren Zielorgan beeinflusst wird.

5.4 Bedeutung des peripheren Innervationsgebietes

Wie sich aus den bisherigen Ausführungen erkennen läßt, unterliegt das Kaliber eines Axons dem Einfluss einer Vielzahl von Faktoren. Während hier besonders die inneren Bestandteile des Axons eine Rolle spielen, die ihrerseits wiederum in unterschiedlichem Maße den Auswirkungen der Myelinisierung unterliegen, scheint beispielsweise die elektrische Aktivität des Neurons in diesem Zusammenhang nur von untergeordneter Bedeutung zu sein. Anders verhält es sich offenbar mit der Größe des peripheren Innervationsgebietes. So finden sich in der Literatur Hinweise darauf, dass das Axonkaliber direkt über Signale des Zielorgans beeinflusst wird und das hierbei auch dessen Größe entscheidend ist. Voyvodic⁽⁴²⁾ führte Untersuchungen an der Unterkieferspeicheldrüse von Ratten durch, wobei er das Verhältnis zwischen der Größe des Zielorgans und der Anzahl der innervierenden Neuronen des oberen Zervikalganglions während der Entwicklung der Tiere veränderte. Durch Ligation des Ductus mandibularis bei Ratten im Alter von 4 Wochen erreichten deren Speicheldrüsen bis zum Alter von 30 Wochen nur etwa 20% des normalen Gewichtes in diesem Alter. Die Anzahl der innervierenden Neuronen jedoch blieb unverändert. In einer anderen Gruppe wurde direkt nach der Geburt ein Ast des die Speicheldrüse innervierenden Nervs durchtrennt, woraufhin diese Tiere im Alter von 30 Wochen zwar eine normal groß entwickelte Drüse hatten, welche jedoch nur von 5-50% der normalen Neuronenzahl innerviert wurde. Voyvodic⁽⁴²⁾ konnte feststellen, dass eine Verringerung der relativen Größe des Zielorgans eine durchschnittliche Verkleinerung der Axonkaliber um 31% im Vergleich zu Kontrollaxonen zur Folge hatte. Ebenso bewirkte eine Zunahme der relativen Größe des innervierten Organs eine Größenzunahme der Axone um etwa 24%. Voyvodic⁽⁴²⁾ vermutet aufgrund seiner Ergebnisse das Vorhandensein rückläufiger Signale des

Zielorgans mit Auswirkung auf die Regulation des Kalibers der Axone der innervierenden Neuronen. Eine ähnliche Annahme äußern auch Gordon *et al.*⁽¹³⁴⁾, die bei ihren Untersuchungen zur Rolle der elektrischen Aktivität des Neurons im Zusammenhang mit dem Axonkaliber zu dem Schluß kommen, dass in erster Linie der funktionelle Kontakt zum peripheren Zielorgan für die Regulation der Fasergröße verantwortlich sein muss (siehe auch Punkt 5.3).

Auch Yin und Oppenheim⁽¹³⁵⁾ berichten von solchen Vermutungen aufgrund der Ergebnisse von Transplantationsversuchen beim Hühnerembryo. Sie verpflanzten am Tag 2 der Embryonalentwicklung das Neuralrohr des Thoraxsegmentes in die Lendenregion, wodurch die hieraus entstehenden ursprünglich thorakalen Motoneuronen die Muskulatur der Hintergliedmaße des Hühnerembryos innervierten. Das erstaunliche Ergebnis dieser Versuche war nicht nur, dass ein Großteil dieser thorakalen Neuronen problemlos über das Schlüpfen der Küken hinaus überlebte und die Muskeln funktionstüchtig innervierte, sondern noch viel mehr, dass sich einige wichtige Parameter dieser Neuronen so veränderten, dass sie schließlich im Großen und Ganzen einem normalen lumbalen Motoneuron glichen und kaum noch der ursprünglichen thorakalen Form. So hatten sich nicht nur das Verhältnis von weißer und grauer Substanz sowie die Art der Verzweigung der Dendriten und die Zellgröße in Richtung auf die normale Histologie des Lendenmarks verändert, sondern auch die Verteilung und Größe sowie der Myelinisierungsgrad der Axone der Neuronen, die die Hintergliedmaße innervierten. Die Axone des heterotopen Implantates waren deutlich größer und stärker myelinisiert als orthotope thorakale Axone und nur unwesentlich kleiner und schwächer myelinisiert als die normalen Axone der Lendenregion. All diese Veränderungen traten auch auf, wenn das Transplantat keinen direkten Kontakt zum rostralen Rückenmark und zum Gehirn hatte. Daher schließen Yin und Oppenheim⁽¹³⁵⁾ aus ihren Beobachtungen, dass die Ausbildung der einzelnen neuronalen Parameter, also unter anderem auch Axongröße und Myelinisierung durch Signale des innervierten Gebietes gesteuert wird. Wie nun die jüngsten Studien von Salami *et al.*⁽¹³⁶⁾ über die Normalentwicklung der thalamocorticalen Fasern der Ratte zeigen, sind solche Signale tatsächlich vorhanden. Diese Analyse

ging der Frage nach, warum Signale aus dem Thalamus in allen corticalen Gebieten (jeweils Lamina IV) gleichzeitig eintreffen, obwohl doch beträchtliche Entfernungsunterschiede zwischen den nach lateral führenden und den nach dorso-medial gerichteten Axonen bestehen. Es zeigte sich bei diesen Tieren im Alter zwischen zwei und vier Wochen, dass die Leitungsgeschwindigkeit der Axone je nach ihrer Länge variiert, allerdings nur in der weißen Substanz, nicht jedoch innerhalb der intracorticalen Strecke. Die kürzesten Axone besitzen in ihrem myelinisierten Abschnitt die kleinste, die längsten Axone die höchste Leitungsgeschwindigkeit. Als Ursache fanden Salami *et al.*⁽¹³⁶⁾ die Variation der Myelinisierungsdicke dieser Fasern, so dass das Gesamtkaliber zwischen 0,33 und 0,54 μm variiert, wobei das Axon selbst wahrscheinlich in den langsameren Fasern zusätzlich querschnittsreduziert ist. Diese Differenz war in situ jedoch nicht messbar. Ebenso wie Yin und Oppenheim⁽¹³⁵⁾ können auch Salami *et al.*⁽¹³⁶⁾ keine Angaben über die Natur der diese Myelinisierung modifizierenden Faktoren machen.

6. Wechselseitige Beziehungen zwischen Axon und Myelinhülle

In einem Neuron findet sich, wie in fast jeder anderen Zelle auch, eine Vielzahl unterschiedlicher Strukturen, die in ihrer Gesamtheit das Zytoskelett der Zelle bilden und zu einem Großteil auch im Axon der Nervenzelle wiederzufinden sind. Je nach Anzahl und Erscheinungsbild nehmen diese Bestandteile, wie beispielsweise in besonderem Maße die Neurofilamente, Einfluss auf das endgültige Aussehen des reifen Axons, wie in den vorhergehenden Kapiteln beschrieben. In welchem Rahmen aber spielen bei der Entstehung des axonalen Phänotyps direkte Wechselwirkungen mit der Umgebung des Axons, also in erster Linie mit Myelinscheide und Gliazellen, eine Rolle?

Bei dieser Überlegung ist es naheliegend, die Beziehung zwischen Axon und Myelinscheide genauer zu betrachten und zu untersuchen, welche Zusammenhänge hier gefunden werden können. Bekannt ist, dass sowohl die Myelinbildung selbst unter dem Einfluss einer Vielzahl von Faktoren steht, als auch die Erhaltung der gebildeten Myelinscheide (siehe auch Punkt 3.4). Hierzu gehören beispielsweise der direkte Kontakt zu einem Axon, die Expression verschiedener Moleküle auf der Axon-Oberfläche sowie einiger Proteine in den myelinisierenden Zellen, die elektrische Aktivität des Axons sowie auch das Axonkaliber. Insgesamt lassen sich hier geringgradige Unterschiede zwischen zentralem und peripheren Nervensystem feststellen.

Um eine ausreichende Menge an Myelinbestandteilen zu produzieren und somit eine normale Myelinbildung zu gewährleisten, benötigen Schwannzellen unbedingt einen stabilen Kontakt zu dem zu myelinisierenden Axon. Im Gegensatz zu den Oligodendrozyten des ZNS, welchen auch ohne neuronalen Kontakt möglich ist, myelinspezifische Proteine und Glycolipide zu bilden,⁽⁴⁰⁾ scheinen für Schwannzellen bestimmte membran-assoziierte Moleküle wie N-Cadherin und L1 sowie das Zelladhäsionsmolekül N-CAM beim Start der

Myelinisierung eine Rolle zu spielen.⁽²⁴⁾⁽²⁵⁾⁽³⁹⁾ Gleichzeitig entscheidet sich durch den Grad der Expression des P0-Proteins in der Schwannzelle, ob sie sich zur myelinisierenden Zelle ausdifferenziert oder das Axon lediglich umhüllt. Im ersten Fall steigt P0 postnatal deutlich an, während im zweiten Fall die geringe pränatale Expression beibehalten wird.⁽³⁹⁾⁽⁴⁴⁾ Nach Lee *et al.*⁽⁴⁴⁾ wird dieser Grad der P0-Expression im postnatalen Zeitraum axonal beeinflusst. Zusätzlich steuert der direkte Kontakt zwischen Axonen und Schwannzellen in den letzteren die Expression eines weiteren Genortes, des Krox-20. Dieser wird in reifen myelinbildenden Schwannzellen sehr intensiv in das Krox-20-Protein, einen sogenannten Zink-Finger-Transkriptionsfaktor, umgeschrieben. Nach Murphy *et al.*⁽⁴⁷⁾ ist dieser Prozess notwendig für die dauerhafte Aufrechterhaltung des Myelinisierungsprogramms in der Schwannzelle. Eine ähnliche Aufgabe scheint sowohl in Schwannzellen als auch in Oligodendrozyten dem Myelin-assoziierten Glycoprotein (MAG) zuzukommen.⁽⁵⁰⁾⁽⁵¹⁾

Was die Auswirkungen der elektrischen Aktivität des Axons betrifft, zeigt sich, dass die Oligodendrozyten des ZNS sensibler zu reagieren scheinen als die Schwann'schen Zellen. So bewirkt eine Steigerung der elektrischen Aktivität des Axons bei Oligodendrozyten auch eine Steigerung der Myelinbildung. Ebenso wird bei Hemmung dieser Aktivität die Myelinbildung durch die Oligodendrozyten eingestellt.⁽⁵⁶⁾ Schwannzellen hingegen scheinen nur auf niedrige Aktionspotential-Frequenzen zu reagieren und die Myelinisierung zu verringern. Eine Frequenzsteigerung hingegen hat hier keinen Effekt.⁽⁵⁵⁾

Schließlich scheint auch das Kaliber des zu umhüllenden oder zu myelinisierenden Axons selbst Einfluss auf die Myelinbildung zu haben. Nach Webster *et al.* (1971, zitiert nach Garbay *et al.*⁽²⁴⁾) sowie nach Windebank *et al.*⁽⁴¹⁾ haben zumindest im PNS Axone zu Beginn der Myelinisierung einen Durchmesser von mindestens 0,7 µm. Allerdings hat eine genetisch hervorgerufene Verminderung des Axonkalibers keine Verringerung der Myelindicke zur Folge. Im ZNS hingegen scheint ein direkter Zusammenhang zwischen Axongröße und Schichtdicke des Myelins zu bestehen, da hier eine Kaliberverkleinerung eindeutig mit einem Myelinrückgang einhergeht.⁽⁴³⁾

Alles in allem ist also klar ersichtlich, dass die Myelinscheide unter dem Einfluss vieler nicht zuletzt axonaler Faktoren steht, unter anderem auch unter dem des Axonkalibers selbst. Wie aber verhält es sich umgekehrt? Gibt es auch Anzeichen dafür, dass die Myelinschicht, sei es lediglich durch ihr Vorhandensein an sich oder auch in Abhängigkeit von ihrer Dicke oder der Zahl ihrer Lamellen, die Größe des axonalen Kalibers direkt beeinflusst?

Aus den bisherigen Ausführungen dieses und des vorhergehenden Kapitels wird deutlich, dass die Myelinbildung in hohem Maße, wenn auch in erster Linie indirekt, an der Ausbildung des Axonkalibers beteiligt ist. So werden besonders Anzahl, Anordnung und Phosphorylierung der axonalen Neurofilamente durch die myelinisierenden Zellen gesteuert. Bei diesen Parametern handelt es sich um die wahrscheinlich wichtigsten bei der Entwicklung des axonalen Phänotyps. Auch scheinen die Mikrotubuli im Axon, deren Rolle im Rahmen der Entstehung des Axonkalibers noch nicht restlos geklärt zu sein scheint (siehe auch Punkt 5.2), dem Einfluss myelinbildender Zellen zu unterliegen (siehe auch Punkt 4.1.6).

In Verbindung mit diesem offensichtlichen indirekten Einfluss der Myelinhülle auf das Kaliber des Axons sind nun auch Überlegungen naheliegend, in welchem Umfang auch ein direktes Wechselspiel zwischen der Größe des Axons und der Myelinschicht vorhanden sein könnte. Hierbei könnte es sich vor allem um einen direkten Zusammenhang zwischen der Dicke der Myelinschicht und dem Durchmesser des Axons handeln. Da ja die Myelinisierung bekannterweise Einfluss auf verschiedene Komponenten des Axons nimmt und so an der Ausbildung des axonalen Phänotyps beteiligt ist, könnte man als Schlußfolgerung annehmen, dass eine dickere Myelinhülle einen größeren Einfluss und somit deutlichere Auswirkungen auf das Axon haben könnte als eine dünnere. Zumindest für das zentrale Nervensystem scheint sich diese Vermutung zu bestätigen, wie der Bericht von Brady *et al.*⁽⁶⁴⁾ zeigt. Bei ihren Untersuchungen zur Bedeutung von kompaktem Myelin für die Neuronen des ZNS verwendete diese Arbeitsgruppe neben Wildtyp-Mäusen zwei verschiedene Arten transgener Mäuse mit etwas unterschiedlichen Myelindefekten. Die so genannten Shiverer-Mäuse leiden aufgrund einer autosomal rezessiven Mutation im MBP-Gen an

einem absoluten Mangel an kompaktem Myelin im ZNS, was sich bei diesen Tieren äußerlich durch starken Tremor und Krampfanfälle bemerkbar macht. Außerdem ist die Lebensdauer von Shiverer-Mäusen mit nur etwa 100 Tagen gegenüber normalen Mäusen deutlich verkürzt.⁽⁶⁵⁾⁽⁶⁶⁾⁽⁶⁷⁾ Zusätzlich zu den spontanen Shiverer-Mäusen arbeiteten Brady *et al.*⁽⁶⁴⁾ mit transgenen Shiverer-Mäusen. Diese ursprünglich von Readhead *et al.*⁽¹³⁷⁾ gezüchteten Tiere entstanden, indem das Wildtyp-MBP-Gen durch Mikroinjektion in befruchtete Eizellen der Keimlinie von Shiverer-Mäusen eingebracht wurde. Solche für das Wildtyp-MBP-Gen homozygoten transgenen Shiverer-Mäuse (MBP/MBP-Mäuse) exprimieren sowohl MBP-mRNA als auch Protein in einer Größenordnung von etwa 25% verglichen mit normalen Tieren. Dadurch sind sie in der Lage, zumindest dünne Schichten von kompaktem Myelin im ZNS zu bilden. Interessanterweise zeigen diese Mäuse dann nahezu keine Anzeichen von Tremor und haben gleichzeitig auch eine annähernd normale Lebensdauer. Brady *et al.*⁽⁶⁴⁾ hatten so also die Möglichkeit, neben normal myelinisierten ZNS-Neuronen von Wildtyp-Mäusen und unmyelinisierten ZNS-Neuronen von Shiverer-Mäusen noch eine gewisse Art der Zwischenform von beiden, nämlich die nur gering myelinisierten ZNS-Neuronen dieser MBP/MBP-Mäuse in ihre Untersuchungen mit einzubeziehen. Dabei stellte sich heraus, dass auch der Phänotyp der MBP/MBP-Axone bezogen auf einzelne axonale Parameter eine Zwischenstufe zwischen den beiden anderen Axongruppen einnahm. So genügte der geringe Grad der Myelinisierung offenbar, um den langsamen axonalen Transport im Vergleich zu normalen Axonen unverändert aufrecht zu erhalten, während beispielsweise die Mikrotubulianzahl und der Grad der Neurofilament-Phosphorylierung genauso verringert waren wie bei Shiverer-Axonen. Bei der Neurofilamentanzahl und -anordnung hingegen lagen die MBP/MBP-Axone zwischen den beiden anderen. Brady *et al.*⁽⁶⁴⁾ werten das Zustandekommen dieser Zwischenform als ein Indiz dafür, dass die Neuronen des ZNS für die Dicke der Myelinschicht sensitiv sind.

Leider fehlen Berichte von ähnlicher Genauigkeit bezüglich des direkten Einflusses der Myelinschichtdicke auf das Axon für die Verhältnisse im PNS.

Bekannt ist, dass auch hier bedeutende Auswirkungen der Myelinisierung auf den Phänotyp des Axons vorliegen. Ebenso weiß man, dass ein Myelinmangel mit Veränderungen im axonalen Zytoskelett und einem Rückgang des Axonkalibers einhergeht. Diese Befunde wurden bereits ausführlich in den Kapiteln 4 und 5 dargelegt. Was jedoch die Dicke der Myelinschicht betrifft, wird zwar berichtet, dass hier eine direkte Korrelation zum Kaliber des Axons besteht, allerdings sind Fraher und Dockery⁽¹³⁸⁾ der Ansicht, dass in diesem Zusammenhang das Axon der signalgebende Partner ist, unter dessen Einfluss die Dauer des Myelinisierungsvorganges durch die Schwannzelle und somit die Myelinschichtdicke festgelegt wird. Ob es auch einen entgegengesetzt gerichteten Einfluss dieser Dicke der Myelinschicht auf das Kaliber des Axons gibt, so wie er beispielsweise von Brady *et al.*⁽⁶⁴⁾ für das ZNS beschrieben (siehe oben), wird nicht erläutert.

Abschließend kann festgestellt werden, dass die Interaktion zwischen Neuriten und ihrer Umhüllung seit einiger Zeit sehr intensiv erforscht wird und demzufolge auch laufend neue Erkenntnisse mitgeteilt werden. Die hier vorgelegte Sammlung des gegenwärtigen Wissens ist somit stets am Ende offen. Um die Geschlossenheit des Eindrucks zu wahren, wird nun mit der Erfassung der Literatur bis Mai 2003 ein zwar artefizieller, aber durchaus plausibler Schlusspunkt gewählt.

7. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Literaturhinweise aus vielen Forschungsarbeiten zu den Beziehungen zwischen Neuron und Gliazelle sowohl im zentralen als auch im peripheren Nervensystem gesammelt und, so weit aufgrund von unübersichtlichen Versuchsanordnungen notwendig, auch interpretiert. Dabei wurde festgestellt, daß schon der Beginn der Axonumhüllung bei Oligodendrozyten und Schwannzellen unterschiedlich verläuft. Erstgenannte Zellen können ihr Myelin auch ohne axonalen Kontakt bilden, Schwannzellen hingegen sind auf einen solchen Kontakt stark angewiesen. Die Myelinbildung hängt dabei von den Membranzellen N-Cadherin, L1, N-CAM und vor allem von P0 im PNS, dagegen von MAG im ZNS ab. Nervenbündel mit geringer Myelinbildung bilden Fasern mit unterschiedlicher Dicke aus, eine deutliche Myelinbildung stabilisiert jedoch den Faserphänotyp. Die wichtigste Komponente ist dabei generell die Ausprägung der Neurofilamente. Sie besitzen Einfluss auf die proximo-distale Ausdehnung der Axone: im ZNS nimmt die Neurofilament-Anzahl nach distal zu, im PNS dagegen ab. Noch bedeutsamer aber ist der Einfluss der Neurofilamente auf das Axonkaliber. Mit der Kontaktaufnahme der Hüllzellen mit einem Axon wird die Expression der Neurofilamente aufreguliert und der Transport von der Produktionsstätte im Perikaryon in das Axon wird beschleunigt. Neurofilamente liegen dann in signifikant größerer Anzahl und Dichte im Bereich der Internodien vor, wobei die Anwesenheit der Untereinheiten NF-M und NF-L entscheidend für die Zunahme des dortigen Axonkalibers ist. NF-H hingegen steuert die Menge der dort ebenfalls vorkommenden Mikrotubuli. Eine Kaliberveränderung kann nun auf zweifache Weise zustande kommen: erstens können (z.B. mutationsbedingt) die Neurofilament-Untereinheiten NF-L, NF-M und/oder NF-H fehlen, wodurch es je nach Art und Ausprägung dieses Mangels zu einer Kaliberabnahme und unter Umständen gleichzeitiger Zunahme der Mikrotubuli-Anzahl kommt, insbesondere in myelinisierten Fasern. Zweitens kann bei Störungen der Myelinbildung die Dicke der Myelinscheide abnehmen.

Daraufhin sinkt zwar ebenfalls das durchschnittliche Axonkaliber, der Neurofilament- und der Mikrotubuli-Transport sind im ZNS beide intensiviert, während erstgenannter im PNS zurückgeht, in beiden Teilen des Nervensystems steigt die Neurofilament-Dichte, aber gleichzeitig sinkt der Phosphorylierungsgrad der Neurofilamente. Diese Verknüpfungen zeigen, daß sowohl der Myelinisierungsgrad die Neurofilament-Anwesenheit im Axon steuert, als auch die umgekehrte Abhängigkeit, nämlich die der Myelindicke von der Zusammensetzung axoplasmatischer Komponenten. Man kann dies zusammenfassen mit dem Resultat, daß offenbar im ZNS die Kaliberstärke direkt mit der Myelindicke korreliert ist, während im PNS nur extreme Kaliberschwankungen Veränderungen der Anzahl der Myelinlamellen nach sich ziehen. In dieses sich gegenseitig bedingende und stützende Netzwerk greifen noch zwei weitere Parameter ein, nämlich zum einen die elektrische Aktivität zentralnervöser Axone, die im Gegensatz zu peripheren Axonen die Myelinbildung initiiert und auch im Weiteren stabilisiert, zum anderen die Größe und Ausdehnung des zu innervierenden Zielgebietes. Hier liegen aktuelle Erkenntnisse vor, die eine überraschende Feinsteuerung der Myelinbildung auch in Abhängigkeit von der Länge der Fasern bis zur Synapse erkennen lassen.

8. Summary

The interrelationship between myelination and the axonal phenotype in the central and peripheral nervous system of mammals.

This literature review is concerned with the current state of research into the relationship of neurons and glial cells in the central as well as the peripheral nervous system. Where necessary, the results were interpreted to allow a better understanding of studies employing very complex experimental techniques. It became evident that already the beginning of the axonal sheathing of oligodendrocytes and Schwann cells occurs different. The former are able to develop their myelin without axonal contact, whereas Schwann cells are strongly dependent upon such a contact. Myelination in the PNS depends on the membrane molecules N-cadherin, L1, N-CAM and especially P0. In contrast to this MAG is of particular importance in the CNS. Nerve fiber bundles with poor myelination form fibers of various thicknesses while considerable myelination results in a more uniform fiber phenotype. The most important component in this connection in general is the shape of the neurofilaments. They affect the proximo-distal extension of axons: neurofilament density increases distally in the CNS, but decreases in the PNS. However, even more important is the influence of neurofilaments on axonal caliber. Once axonal contact is made by the ensheathing cell, the expression of neurofilaments is increased and the transport from the production site in the pericaryon to the axon is accelerated. Neurofilaments then occur in greater numbers and of elevated density in the internodal region with the presence of the subunits NF-M and NF-L being vital for the increase of axonal caliber at that place. NF-H on the contrary regulates the density of the microtubules present in this region. A change in axonal diameter can thus occur twofold: firstly, the absence of the neurofilament subunits NF-L, NF-M and/or NF-H (e.g. as the result of a mutation) leads, with the extent of the effect

depending on the type and degree of the deficiency, to a decrease in axonal caliber and possibly a simultaneous increase in microtubular density, particularly in the case of myelinated fibers. Secondly, disturbance of the myelination process can result in a general decrease of the thickness of the myelin sheath. This also consequently reduces the average axonal caliber, neurofilamental and microtubular transport are enhanced in the CNS, whereas the former is diminished in the PNS, neurofilament density is increased in both parts of the nervous system, but at the same time the degree of phosphorylation of the neurofilaments is lessened. The described connections indicate that the degree of myelination regulates the presence of neurofilaments in the axon as well as the thickness of the myelin sheath is dependent upon the composition of the axoplasmal components. This can be summarized with the result, that obviously in the CNS axonal thickness is directly correlated with the myelin sheath thickness, whereas in the PNS only extreme variations result in alterations of the number of myelin lamellae. Two further parameters are of importance in this closely interrelated system: on the one hand the electrical activity of central nervous axons, which unlike in peripheral nervous axons initiates and furthermore stabilizes myelination, on the other hand the size and extension of the target area to be innervated. Referring to this, current findings indicate that a surprisingly fine regulation of myelination is also dependent on the length of the nerve fiber from the pericaryon to the synapse.

9. Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
Abb.	Abbildung
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CALI	chromophore-assisted laser inactivation
CNP	2':3' -Cyclic nucleotide-3'-phosphodiesterase
d.h.	das heißt
E-Cadherin	epitheliales Cadherin
FGF	fibroblast growth factor
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GGF	glial growth factor
HRP	horseradish peroxidase
Hz	Hertz
IFAP	intermediate filament-associated protein
IGF-I	insulin-like growth factor I
kd	Kilodalton
Krox-20	zinc finger transkription factor gene/protein

L1	L1 adhesion molecule
Lys	Lysin
μm	Mikrometer
MAG	myelin-associated glycoprotein
MAP	microtubule-associated protein
MBP	myelin basic protein
MOG	myelin-oligodendrocyte glycoprotein
MPR-Region	multiphosphorylation repeat-Region
mRNA	messenger ribonucleic acid
N-Cadherin	neurales Cadherin
N-CAM	neural cell adhesion molecule
NF-H	neurofilament heavy subunit
NF-L	neurofilament light subunit
NF-M	neurofilament medium subunit
NGF	nerve growth factor
NgR	Nogo-66-Rezeptor
nm	Nanometer
OGF	oligodendroglial growth factor
OMgp	oligodendrocyte-myelin glycoprotein
p.n.	post natum
P0	major peripheral myelin protein
PLP	proteolipid protein
PMP-22	peripheral myelin protein-22
PNS	peripheres Nervensystem
Pro	Prolin
RNA	ribonucleic acid

SAG	Schwann cell membrane glycoprotein
Ser	Serin
SV40	simian virus 40
TGF- β	transforming growth factor β
TTX	Tetrodotoxin
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

10. Literaturverzeichnis

- 1) **Sinowatz F., 1992**
‘Nervengewebe‘
in ‘Histologie‘, Hees H., Sinowatz F. (eds.), Deutscher Ärzte -Verlag,
Köln
- 2) **Liebich H.-G., 1993**
‘Nervengewebe (Textus nervosus)‘
in ‘Funktionelle Histologie: Farbatlas und Kurzlehrbuch der
Mikroskopischen Anatomie der Haussäugetiere‘, Liebich H. -G.,
Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart
- 3) **Levitan I.B., Kaczmarek L.K., 1991**
‘An introduction to the cellular structure of neurons and glia‘
in ‘The Neuron: Cell and Molecular Biology‘, Levitan I.B., Kaczmarek
L.K. (eds.), Oxford University Press, New York
- 4) **Naves F.J., Huerta J.J., Garcia-Suarez O., Urdangaray N., Esteban I.,
Del Valle M.E., Vega J.A., 1996**
‘Distribution of immunoreactivity for cytoskeletal (microtubule,
microtubule-associated, and neurofilament) proteins in adult human dorsal
root ganglia’
Anatomical Record 244, 246-256
- 5) **Lodish H., Berk A., Zipursky L.S., Matsudaira P., Baltimore D.,
Darnell J., 2000**
‘Cell motility and shape II: Microtubules and intermediate filaments’
in ‘Molecular Cell Biology’, 4th ed., Freeman W.H. (ed.), New York
- 6) **Lasek J.R., Phillips L., Katz M.J., Autilio-Gambetti L., 1985**
‘Function and evolution of neurofilament proteins‘
Ann. N.Y. Acad. Sci. 455, 462-478
- 7) **Hirokawa N., 1991**
‘Molecular architecture and dynamics of the neuronal cytoskeleton’
in ‘The Neuronal Cytoskeleton’, Burgoyne R.D. (ed.), Wiley-Liss, Inc.
- 8) **Hirokawa N., Glicksman M.A., Willard M.B., 1984**
‘Organization of mammalian neurofilament polypeptides within the
neuronal cytoskeleton.’
J. Cell. Biol. 98, 1523-1536

- 9) **Capano C.P., Pernas-Alonso R., Di Portio U., 2001**
“Neurofilament homeostasis and motoneurone degeneration.”
BioEssays 23, 24-33
- 10) **Lee M.K., Cleveland D.W., 1996**
“Neuronal intermediate filaments.”
Annu. Rev. Neurosci. 19, 187-217
- 11) **Cooper G.M., 2000**
“The cytoskeleton and cell movement.”
in “The cell: a molecular approach.”, Cooper G.M., 2nd ed., Sinauer Associates, Inc.
- 12) **Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J., 1994**
“The cytoskeleton”
in “Molecular Biology of the Cell”, 3rd ed., New York and London: Garland Publishing
- 13) **Lodish H., Berk A., Zipursky L.S., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J., 2000**
“Cell motility and shape I: Microfilaments”
in “Molecular Cell Biology”, 4th ed., Freeman W.H. (ed.), New York
- 14) **Matiasek, K., 2003**
Persönliche Mitteilung
- 15) **Dent E.W., Kalil K., 2001**
“Axon branching requires interactions between dynamic microtubules and actin filaments.”
J. Neurosci. 21, 9757-9769
- 16) **Bearer E.L., Reese T.S., 1999**
“Association of actin filaments with axonal microtubule tracts.”
J. Neurocytol. 28, 85-98
- 17) **Drake P.F., Lasek R.J., 1984**
“Regional differences in the neuronal cytoskeleton.”
J. Neurosci. 4, 1173-1186
- 18) **Nixon R.A., 1998**
“Dynamic behavior and organisation of cytoskeletal proteins in neurons: reconciling old and new findings.”
BioEssays 20, 798-807

- 19) **Nixon R.A., Paskevich P.A., Sihag R.K., Thayer C.Y., 1994**
“Phosphorylation on carboxyl terminus domains of neurofilament proteins in retinal ganglion cell neurons in vivo: influences on regional neurofilament accumulation, interneurofilament spacing, and axon caliber.”
J. Cell. Biol. 126, 1031-1046
- 20) **Hernández C., Blackburn E., Alvarez J., 1989**
“Calibre and microtubule content of the non-medullated and myelinated domains of optic nerve axons of rats.”
Europ. J. Neurosci. 1, 654-658
- 21) **Schlaepfer W.W., Bruce J., 1990**
“Neurofilament proteins are distributed in a diminishing proximodistal gradient along rat sciatic nerve.”
J. Neurochem. 55, 453-460
- 22) **Hsieh S.T., Crawford T.O., Griffin J.W., 1994**
“Neurofilament distribution and organization in the myelinated axons of the peripheral nervous system.”
Brain Res. 642, 316-326
- 23) **Kirschner D.A., Blaurock A.E., 1992**
“Organization, phylogenetic variations, and dynamic transitions of myelin.”
in “Myelin: Biology and Chemistry”, Martenson R.E. (ed.), CRC Press, Inc.
- 24) **Garbay B., Heape A.M., Sargueil F., Cassagne C., 2000**
“Myelin synthesis in the peripheral nervous system”
Prog. Neurobiol. 61, 267-304
- 25) **Doyle J.P., Colman D.R., 1993**
“Glial-neuron interactions and the regulation of myelin formation”
Current Opinion in Cell Biology 5, 779-785
- 26) **Morell P., Quarles R.H., 1999**
“Myelin formation, structure and biochemistry.”
in “Basic neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects.”, 6th ed., Siegel G.J., Agranoff B.W., Fisher S.K., Albers R.W., Uhler M.D. (eds.), Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia
- 27) **Dahme E., Schmahl W., 1999**
“Nervensystem”
in “Grundriß der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere.”, 5th ed., Dahme E., Weiß E. (eds.), Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart

- 28) **Fannon A.M., Sherman D.L., Ilyina-Gragerova G., Brophy P.J., Friedrich V.L.Jr., Colman D.R., 1995**
“Novel E-cadherin-mediated adhesion in peripheral nerve: Schwann cell architecture is stabilized by autotypic adherens junctions.”
J. Cell. Biol. 129, 189-202
- 29) **Hasegawa M., Seto A., Uchiyama N., Kida S., Yamashita T., Yamashita J., 1996**
“Localization of E-cadherin in peripheral glia after nerve injury and repair.”
J. Neuropathol. Exp. Neurol. 55, 424-434
- 30) **Scherer S.S., Xu Y., Bannerman P.G.C., Sherman D.L., Brophy P.J., 1995**
“Periaxin expression in myelinating Schwann cells: modulation by axon-glia interactions and polarized localization during development.”
Development 121, 4265-4273
- 31) **Williams A.C., Brophy P.J., 2002**
“The function of the periaxin gene during nerve repair in a model of CMT4F.”
J. Anat. 200, 323-330
- 32) **Gould R.M., Jessen K.R., Mirsky R., Tennekoon G., 1992**
“The cell of Schwann: An update”
in ‘Myelin: Biology and Chemistry’, Martenson R.E. (ed.), CRC Press, Inc.
- 33) **Kahle W., 1986**
“Histologie.”
in ‘Taschenatlas der Anatomie Band 3: Nervensystem und Sinnesorgane.’; Kahle W., Leonhardt H., Platzer W. (eds.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- 34) **Lubetzki C., Demerens C., Anglade P., Villarroya H., Frankfurter A., Lee V. M., Zalc B., 1993**
“Even in culture, oligodendrocytes myelinate solely axons.”
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6820-6824
- 35) **Remahl S., Hildebrand C., 1990**
“Relations between axons and oligodendroglial cells during initial myelination.
II. The individual axon.”
J. Neurocytol. 19, 883-898

- 36) **Snipes G.J., Suter U., 1994**
“Signaling pathways mediating axon -Schwann cell interactions”
Trends Neurosci. 17, 399-401
- 37) **Seilheimer B., Persohn E., Schachner M., 1989**
“Antibodies to the L1 adhesion molecule inhibit Schwann cell ensheathment of neurons in vitro.”
J. Cell. Biol. 109, 3095-3103
- 38) **Wood P.M., Schachner M., Bunge R.P., 1990**
“In hibition of Schwann cell myelination in vitro by antibody to the L1 adhesion molecule.”
J. Neurosci. 10, 3635-3645
- 39) **Takeda Y., Murakami Y., Asou H., Uyemura K., 2001**
“The roles of cell adhesion molecules on the formation of peripheral myelin.”
Keio J. Med. 50, 240-248
- 40) **Mirsky R., Winter J., Abney E.R., Pruss R.M., Gavrilovic J., Raff M.C., 1980**
“Myelin -specific proteins and glycolipids in rat Schwann cells and oligodendrocytes in culture.”
J. Cell Biol. 84, 483-494
- 41) **Windebank A.J., Wood P., Bunge R.P., Dyck P.J., 1985**
“Myelination determines the caliber of dorsal root ganglion neurons in culture.”
J. Neurosci. 5, 1563-1569
- 42) **Voyvodic J.T., 1989**
“Target size regulates caliber and myelination of sympathetic axons.”
Nature 342, 430-433
- 43) **Elder G.A., Friedrich V.L., Lazzarini R.A., 2001**
“Schwann cells and oligodendrocytes read distinct signals in establishing myelin sheath thickness.”
J. Neurosci. Res. 65, 493-499
- 44) **Lee M.-J., Brennan A., Blanchard A., Zoidl G., Dong Z., Taberner A., Zoidl C., Dent M.A.R., Jessen K.R., Mirsky R., 1997**
“P₀ is constitutively expressed in the rat neural crest and embryonic nerves and is negatively and positively regulated by axons to generate non-myelin-forming and myelin-forming Schwann cells, respectively.”
Mol. Cellul. Neurosci. 8, 336-350

- 45) **Griffiths I.R., Mitchell L.S., McPhilemy K., Morrison S., Kyriakides E., Barrie J.A., 1989**
“Expression of myelin protein genes in Schwann cells.”
J. Neurocytol. 18, 345-352
- 46) **Chavrier P., Zerial M., Lemaire P., Almendral J., Bravo R., Charnay P., 1988**
“A gene encoding a protein with zinc fingers is activated during G0/G1 transition in cultured cells.”
EMBO J. 7, 29-35
- 47) **Murphy P., Topilko P., Schneider-Maunoury S., Seitanidou T., Baron-Van Evercooren A., Charnay P., 1996**
“The regulation of Krox -20 expression reveals important steps in the control of peripheral glial cell development.”
Development 122, 2847-2857
- 48) **Guennoun R., Benmessahel Y., Delespierre B., Guezou M., Rajkowsky K.M., Baulieu E.E., Schumacher M., 2001**
“Progesterone stimulates Krox -20 gene expression in Schwann cells.”
Brain Res. Mol. Brain Res. 90, 75-82
- 49) **Carenini S., Montag D., Schachner M., Martini R., 1998**
“MAG -Deficient Schwann cells myelinate dorsal root ganglion neurons in culture.”
GLIA 22, 213-220
- 50) **Li C., Tropak M.B., Gerlai R., Clapoff S., Abramow-Newerly W., Trapp B., Peterson A., Roder J., 1994**
“Myelination in the absence of myelin-associated glycoprotein.”
Nature 369, 747-750
- 51) **Fruttiger M., Montag D., Schachner M., Martini R., 1995**
“Crucial role for the myelin-associated glycoprotein in the maintenance of axon-myelin integrity.”
Eur. J. Neurosci. 7, 511-515
- 52) **Carenini S., Montag D., Cremer H., Schachner M., Martini R., 1997**
“Absence of the myelin-associated glycoprotein (MAG) and the neural cell adhesion molecule (N-CAM) interferes with the maintenance, but not with the formation of peripheral myelin.”
Cell Tissue Res. 287, 3-9

- 53) **Montag D., Giese K.P., Bartsch U., Martini R., Lang Y., Bluthmann H., Karthigasan J., Kirschner D.A., Wintergerst E.S., Nave K.A., et al., 1994**
“Mice deficient for the myelin-associated glycoprotein show subtle abnormalities in myelin.”
Neuron. 13, 229-246
- 54) **Marcus J., Dupree J.L., Popko B., 2002**
“Myelin-associated glycoprotein and myelin galactolipids stabilize developing axo-glial interactions.”
J. Cell. Biol. 156, 567-577
- 55) **Stevens B., Tanner S., Fields R.D., 1998**
“Control of myelination by specific patterns of neural impulses.”
J. Neurosci. 18, 9303-9311
- 56) **Demerens C., Stankoff B., Logak M., Anglade P., Allingquant B., Couraud F., Zalc B., Lubetzki C., 1996**
“Induction of myelination in the central nervous system by electrical activity.”
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 9887-9892
- 57) **Giulian D., Johnson B., Krebs J.F., Tapscott M.J., Honda S., 1991**
“A growth factor from neuronal cell lines stimulates myelin protein synthesis in mammalian brain.”
J. Neurosci. 11, 327-336
- 58) **Carson M.J., Behringer R.R., Brinster R.L., McMorris F.A., 1993**
“Insulin-like growth factor I increases brain growth and central nervous system myelination in transgenic mice.”
Neuron 10, 729-740
- 59) **Guénard V., Gwynn L.A., Wood P.M., 1995**
“Transforming growth factor- β blocks myelination but not ensheathment of axons by Schwann cells *in vitro*.”
J. Neurosci. 15, 419-428
- 60) **Zanazzi G., Einheber S., Westreich R., Hannocks M.J., Bedell-Hogan D., Marchionni M.A., Salzer J.L., 2001**
“Glial growth factor / neuregulin inhibits Schwann cell myelination and induces demyelination.”
J. Cell. Biol. 152, 1289-1299

- 61) **Suter U., Welcher A.A., Ozcelik T., Snipes G.J., Kosaras B., Francke U., Billings-Gagliardi S., Sidman R.L., Shooter E.M., 1992**
“Trembler mouse carries a point mutation in a myelin gene.”
Nature 356, 241-244
- 62) **de Waegh S.M., Brady S.T., 1991**
“Local control of axonal properties by Schwann cells: neurofilaments and axonal transport in homologous and heterologous nerve grafts.”
J. Neurosci. Res. 30, 201-212
- 63) **de Waegh S.M., Brady S.T., 1990**
“Altered slow axonal transport and regeneration in a myelin -deficient mutant mouse: the trembler as an in vivo model for Schwann cell -axon interactions.”
J. Neurosci. 10, 1855-1865
- 64) **Brady S.T., Witt A.S., Kirkpatrick L.L., de Waegh S.M., Readhead C., Tu P.-H., Lee V.M., 1999**
“Formation of compact myelin is required for maturation of the axonal cytoskeleton.”
J. Neurosci. 19, 7278-7288
- 65) **Chernoff G.F., 1981**
“Shiverer: an autosomal recessive mutant mouse with myelin deficiency.”
J. Hered. 72, 128
- 66) **Readhead C., Hood L., 1990**
“The dysmyelinating mouse mutations shiverer (shi) and myelin deficient (shimld).”
Behav. Genet. 20, 213-234
- 67) **Roach A., Takahashi N., Pravtcheva D., Ruddle F., Hood L., 1985**
“Chromosomal mapping of mouse myelin basic protein gene and structure and transcription of the partially deleted gene in shiverer mutant mice.”
Cell 42, 149-155
- 68) **Rosenbluth J., 1880**
“Peripheral myelin in the mouse mutant shiverer.”
J. Comp. Neurol. 193, 729-739
- 69) **Hsieh S.T., Kidd G.J., Crawford T.O., Xu Z., Lin W.M., Trapp B.D., Cleveland D.W., Griffin J.W., 1994**
“Regional modulation of neurofilament organization by myelination in normal axons.”
J. Neurosci. 14, 6392-6401

- 70) **Sánchez I., Hassinger L., Sihag R.K., Cleveland D.W., Mohan P., Nixon R.A., 2000**
“Local control of neurofilament accumulation during radial growth of myelinating axons in vivo: Selective role of site-specific phosphorylation.”
J. Cell Biol. 151, 1013-1024
- 71) **Watson D.F., Griffin J.W., Fittro K.P., Hoffman P.N., 1989**
“Phosphorylation-dependent immunoreactivity of neurofilaments increases during axonal maturation and beta, beta'-iminodipropionitrile intoxication.”
J. Neurochem. 53, 1818-1829
- 72) **Archer D.R., Watson D.F., Griffin J.W., 1994**
“Phosphorylation-dependent immunoreactivity of neurofilaments and the rate of slow axonal transport in the central and peripheral axons of the rat dorsal root ganglion.”
J. Neurochem. 62, 1119-1125
- 73) **Sánchez I., Hassinger L., Paskevich P.A., Shine H.D., Nixon R.A., 1996**
“Oligodendroglia regulate the regional expansion of axon caliber and local accumulation of neurofilaments during development independently of myelin formation.”
J. Neurosci. 16, 5095-5105
- 74) **Kirkpatrick L.L., Brady S.T., 1994**
“Modulation of the axonal microtubule cytoskeleton by myelinating Schwann cells.”
J. Neurosci. 14, 7440-7450
- 75) **de Waegh S.M., Lee V.M., Brady S.T., 1992**
“Local modulation of neurofilament phosphorylation, axonal caliber, and slow axonal transport by myelinating Schwann cells.”
Cell 68, 451-463
- 76) **Carden M.J., Trojanowski J.Q., Schlaepfer W.W., Lee V.M., 1987**
“Two-stage expression of neurofilament polypeptides during rat neurogenesis with early establishment of adult phosphorylation patterns.”
J. Neurosci. 7, 3489-3504
- 77) **Clark E.A., Lee V.M., 1991**
“Dynamics of mammalian high-molecular-weight neurofilament subunit phosphorylation in cultured rat sympathetic neurons.”
J. Neurosci. Res. 30, 116-123

- 78) **Cole J.S., Messing A., Trojanowski J.Q., Lee V.M., 1994**
“Modulation of axon diameter and neurofilaments by hypomyelinating Schwann cells in transgenic mice.”
J. Neurosci. 14, 6956-6966
- 79) **Carden M.J., Trojanowski J.Q., Schlaepfer W.W., Lee V.M., 1987**
“Two-stage expression of neurofilament polypeptides during rat neurogenesis with early establishment of adult phosphorylation patterns.”
J. Neurosci. 7, 3489-3504
- 80) **Starr R., Attema B., De Vries G.H., Monteiro M.J., 1996**
“Neurofilament phosphorylation is modulated by myelination.”
J. Neurosci. 44, 328-337
- 81) **Kirkpatrick L.L., Witt A.S., Payne H.R., Shine H.D., Brady S.T., 2001**
“Changes in microtubule stability and density in myelin-deficient shiverer mouse CNS axons.”
J. Neurosci. 21, 2288-2297
- 82) **Yin X., Crawford T.O., Griffin J.W., Tu P., Lee V.M., Li C., Roder J., Trapp B.D., 1998**
“Myelin-associated glycoprotein is a myelin signal that modulates the caliber of myelinated axons.”
J. Neurosci. 18, 1953-1962
- 83) **Sahenk Z., Brady S.T., 1987**
“Axonal tubulin and microtubules: morphologic evidence for stable regions on axonal microtubules.”
Cell Motil. Cytoskeleton 8, 155-164
- 84) **Jessen K.R., Mirsky R., 1999**
“Schwann cells and their precursors emerge as major regulators of nerve development.”
Trends Neurosci. 22, 402-410
- 85) **Riethmacher D., Sonnenberg-Riethmacher E., Brinkmann V., Yamaai T., Lewin G.R., Birchmeier C., 1997**
“Severe neuropathies in mice with targeted mutations in the ErbB3 receptor.”
Nature 389, 725-730
- 86) **Molliver D.C., Wright D.E., Leitner M.L., Parsadanian A.S., Doster K., Wen D., Yan Q., Snider W.D., 1997**
“IB4-binding DRG neurons switch from NGF to GDNF dependence in early postnatal life.”
Neuron 19, 849-861

- 87) **Colello R.J., Schwab M.E., 1994**
“A role for oligodendrocytes in the stabilization of optic axon numbers.”
J. Neurosci. 14, 6446-6452
- 88) **Caroni P., Schwab M.E., 1988**
“Antibody against myelin-associated inhibitor of neurite growth neutralizes nonpermissive substrate properties of CNS white matter.”
Neuron 1, 85-96
- 89) **Caroni P., Schwab M.E., 1988**
“Two membrane protein fractions from rat central myelin with inhibitory properties for neurite growth and fibroblast spreading.”
J. Cell. Biol. 106, 1281-1288
- 90) **Caroni P., Schwab M.E., 1989**
“Codistribution of neurite growth inhibitors and oligodendrocytes in rat CNS: appearance follows nerve fiber growth and precedes myelination.”
Dev. Biol. 136, 287-295
- 91) **Sefton A.J., Lam K., 1984**
“Quantitative and morphological studies on developing optic axons in normal and enucleated albino rats.”
Exp. Brain Res. 57, 107-117
- 92) **Crespo D., O’Leary D.D., Cowan W.M., 1985**
“Changes in the numbers of optic nerve fibers during late prenatal and postnatal development in the albino rat.”
Brain Res. 351, 129-134
- 93) **McKerracher L., Winton M.J., 2002**
“Nogo on the go.”
Neuron 36, 345-348
- 94) **Wong E.V., David S., Jacob M.H., Jay D.G., 2003**
“Inactivation of myelin-associated glycoprotein enhances optic nerve regeneration.”
J. Neurosci. 23, 3112-3117
- 95) **Tang S., Qiu J., Nikulina E., Filbin M.T., 2001**
“Soluble myelin-associated glycoprotein released from damaged white matter inhibits axonal regeneration.”
Mol. Cell. Neurosci. 18, 259-269

- 96) **Li S., Strittmatter S.M., 2003**
“Delayed systemic Nogo -66 receptor antagonist promotes recovery from spinal cord injury.”
J. Neurosci. 23, 4219-4227
- 97) **Fournier A.E., GrandPre T., Gould G., Wang X., Strittmatter S.M., 2002**
“Nogo and the Nogo -66 receptor.”
Prog. Brain. Res. 137, 361-36
- 98) **Li Y., Raisman G., 1994**
“Schwann cells induce sprouting in motor and sensory axons in the adult rat spinal cord.”
J. Neurosci. 14, 4050-4063
- 99) **Kalil K., Schneider G.E., 1975**
“Retrograde cortical and axonal changes following lesions of the of the pyramidal tract.”
Brain Res. 89, 15-27
- 100) **Lahr S.P., Stelzner D.J., 1990**
“Anatomical studies of dorsal column axons and dorsal root ganglion cells after spinal cord injury in the newborn rat.”
J. Comp. Neurol. 293, 377-398
- 101) **Firkins S.S., Bates C.A., Stelzner D.J., 1993**
“Corticospinal tract plasticity and astroglial reactivity after cervical spinal injury in the postnatal rat.”
Exp. Neurol. 120, 1-15
- 102) **Bandtlow C.E., Heumann R., Schwab M.E., Thoenen H., 1987**
“Cellular localisation of nerve growth factor synthesis by in situ hybridization.”
EMBO J. 6, 891-899
- 103) **Leibrock J., Lottspeich F., Hohn A., Hofer M., Hengerer B., Masiakowski P., Thoenen H., Barde Y.A., 1989**
“Molecular cloning and expression of brain -derived neurotrophic factor.”
Nature 341, 149-152
- 104) **Meyer M., Matsuoka I., Wetmore C., Olson L., Thoenen H., 1992**
“Enhanced synthesis of brain -derived neurotrophic factor in the lesioned peripheral nerve: different mechanisms are responsible for the regulation of BDNF and NGF mRNA.”
J. Cell. Biol. 119, 45-54

- 105) **Neuberger T.J., De Vries G.H., 1993**
‘Distribution of fibroblast growth factor in cultured dorsal root ganglion neurons and Schwann cells. II. Redistribution after neural injury.’
J. Neurocytol. 22, 449-460
- 106) **Olby N.J., Blakemore W.F., 1996**
‘Primary demyelination and regeneration of ascending axons in the dorsal funiculus of the rat spinal cord following photochemically induced injury.’
J. Neurocytol. 25, 465-480
- 107) **Sims T.J., Gilmore S.A., 1983**
‘Interactions between interspinal Schwann cells and the cellular constituents normally occurring in the spinal cord: an ultrastructural study in the irradiated rat.’
Brain Res. 276, 17-30
- 108) **Graca D.L., Blakemore W.F., 1986**
‘Delayed remyelination in rat spinal cord following ethidium bromide injection.’
Neuropathol. Appl. Neurobiol. 12, 593-605
- 109) **Blakemore W.F., Crang A.J., 1988**
‘Extensive oligodendrocyte remyelination following injection of cultured central nervous system cells into demyelinating lesions in adult central nervous system.’
Dev. Neurosci. 10, 1-11
- 110) **Yazaki T., Miura M., Asou H., Toya S., Uyemura K., 1994**
‘Peripheral myelin P0 protein mediates neurite outgrowth of cortical neurons in vitro and axonal regeneration in vivo.’
Neuroscience Letters 176, 13-16
- 111) **Schneider-Schaulies J., von Brunn A., Schachner M., 1990**
‘Recombinant peripheral myelin protein P0 confers both adhesion and neurite outgrowth-promoting properties.’
J. Neurosci. Res. 27, 286-297
- 112) **Takei K., Uyemura K., 1993**
‘Expression of a P0-like glycoprotein in central nervous system myelin of amphibians (*Ambystoma mexicanus*, *Xenopus laevis* and *Rana catesbeiana*).’
Comp. Biochem. Physiol. 106, 873-882

- 113) **Hoffman P.N., Thompson G.W., Griffin J.W., Price D.L., 1985**
“Changes in neurofilament transport coincide temporally with alterations in the caliber of axons in regenerating motor fibers.”
J. Cell. Biol. 101, 1332-1340
- 114) **Hoffman P.N., Griffin J.W., Price D.L., 1984**
“Control of axonal caliber by neurofilament transport.”
J. Cell. Biol. 99, 705-714
- 115) **Hoffman P.N., Griffin J.W., Gold B.G., Price D.L., 1985**
“Slowing of neurofilament transport and the radial growth of developing nerve fibers.”
J. Neurosci. 5, 2920-2929
- 116) **Yamasaki H., Bennett G.S., Itakura C., Mizutani M., 1992**
“Defective expression of neurofilament protein subunits in hereditary hypotrophic axonopathy of quail.”
Lab. Invest. 66, 734-743
- 117) **Eyer J., Peterson A., 1994**
“Neurofilament -deficient axons and perikaryal aggregates in viable transgenic mice expressing a neurofilament- β -galactosidase fusion protein.”
Neuron 12, 389-405
- 118) **Jacomy H., Zhu Q., Couillard-Després S., Beaulieu J.-M., Julien J.-P., 1999**
“Disruption of type IV intermediate filament network in mice lacking the neurofilament medium and heavy subunits.”
J. Neurochem. 73, 972-984
- 119) **Zhu Q., Couillard-Després S., Julien J.-P., 1997**
“Delayed maturation of regenerating myelinated axons in mice lacking neurofilaments.”
Exp. Neurol. 148, 299-316
- 120) **Elder G.A., Friedrich V.L., Jr., Bosco P., Kang C., Gourov A., Tu P. H., Lee V.M., Lazzarini R.A., 1998**
“Absence of the mid-sized neurofilament subunit decreases axonal calibers, levels of light neurofilament (NF-L), and neurofilament content.”
J. Cell. Biol. 141, 727-739
- 121) **Xu Z., Marszalek J.R., Lee M.K., Wong P.C., Folmer J., Crawford T.O., Hsieh S.T., Griffin J.W., Cleveland D.W., 1996**
“Subunit composition of neurofilaments specifies axonal diameter.”
J. Cell. Biol. 133, 1061-1069

- 122) **Wong P.C., Marszalek J., Crawford T.O., Xu Z., Hsieh S.T., Griffin J.W., Cleveland D.W., 1995**
“Increasing neurofilament subunit NF-M expression reduces axonal NF-H, inhibits radial growth, and results in neurofilamentous accumulation in motor neurons.”
J. Cell. Biol. 130, 1413-1422
- 123) **Elder G.A., Friedrich V.L., Jr., Kang C., Bosco P., Gourov A., Tu P. - H., Zhang B., Lee V.M., Lazzarini R.A., 1998**
“Requirement of heavy neurofilament subunit in the development of axons with large calibers.”
J. Cell. Biol. 143, 195-205
- 124) **Rao M.V., Houseweart M.K., Williamson T.L., Crawford T.O., Folmer J., Cleveland D.W., 1998**
“Neurofilament -dependent radial growth of motor axons and axonal organization of neurofilaments does not require the neurofilament heavy subunit (NF-H) or its phosphorylation.”
J. Cell. Biol. 143, 171-181
- 125) **Friede R.L., Samorajski T., 1970**
“Axon caliber related to neurofilaments and microtubules in sciatic nerve fibers of rats and mice.”
Anat. Rec. 167, 379-388
- 126) **Faundez V., Alvarez J., 1986**
“Microtubules and calibers in developing axons.”
J. Comp. Neurol. 250, 73-80
- 127) **Faundez V., Cordero M.E., Rosso P., Alvarez J., 1990**
“Calibers and microtubules of nerve fibers: differential effect of undernutrition in developing and adult rats.”
Brain Res. 509, 198-204
- 128) **Zhao J.X., Ohnishi A., Itakura C., Mizutani M., Yamamoto T., Hojo T., Murai Y., 1995**
“Smaller axon and unaltered numbers of microtubules per axon in relation to number of myelin lamellae of myelinated fibers in the mutant quail deficient in neurofilaments.”
Acta Neuropathol. 89, 305-312

- 129) **Zhao J.X., Ohnishi A., Itakura C., Mizutani M., Yamamoto T., Hayashi H., Murai Y., 1994**
“Greater number of microtubules per axon of unmyelinated fibers of mutant quails deficient in neurofilaments: possible compensation for the absence of neurofilaments.”
Acta Neuropathol. (Berl.) 87, 332-336
- 130) **Ohara O., Gahara Y., Miyake T., Teraoka H., Kitamura T., 1993**
“Neurofilament deficiency in quail caused by nonsense mutation in neurofilament-L gene.”
J. Cell. Biol. 121, 387-395
- 131) **Yamasaki H., Bennett G.S., Itakura C., Mizutani M., 1992**
“Defective expression of neurofilament protein subunits in hereditary hypotrophic axonopathy of quail.”
Lab. Invest. 66, 734-743
- 132) **Crespo D., Verduga R., Villegas J., Fernández-Viadero C., 1995**
“Dimorphic myelin in the rat optic nerve as a result of retinal activity blockage by tetrodotoxin during early postnatal period.”
Histol. Histopathol. 10, 289-299
- 133) **Colello R.J., Devey L.R., Imperato E., Pott U., 1995**
“The chronology of oligodendrocyte differentiation in the rat optic nerve: evidence for a signaling step initiating myelination in the CNS.”
J. Neurosci. 15, 7665-7672
- 134) **Gordon T., Gillespie J., Orozco R., Davis L., 1991**
“Axotomy-induced changes in rabbit hindlimb nerves and the effects of chronic electrical stimulation.”
J. Neurosci. 11, 2157-2169
- 135) **Yin Q.-W., Oppenheim R.W., 1992**
“Modifications of motoneuron development following transplantation of thoracic spinal cord to the lumbar region in the chick embryo: evidence for target-derived signals that regulate differentiation.”
J. Neurobiol. 23, 376-395
- 136) **Salami M., Itami C., Tsumoto T., Kimura F., 2003**
“Change of conduction velocity by regional myelination yields constant latency irrespective of distance between thalamus and cortex.”
PNAS 100, 6174-6179

- 137) **Readhead C., Popko B., Takahashi N., Shine H.D., Saavedra R.A., Sidman R.L., Hood L., 1987**
“Expression of a myelin basic protein gene in transgenic shiverer mice: correction of the dysmyelinating phenotype.”
Cell 48, 703-712
- 138) **Fraher J., Dockery P., 1998**
“A strong myelin thickness -axon size correlation emerges in developing nerves despite independent growth of both parameters.”
J. Anat. 193, 195-201

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Verfassung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wolfgang Schmahl für die Überlassung des Themas und seine hervorragende und motivierende Betreuung. Insbesondere danke ich ihm für die jederzeit gewährte fachliche Beratung und die sorgfältige und rasche Durchsicht aller Entwürfe.

Herrn Dr. Kaspar Matiasek danke ich ebenfalls für die schnelle und gründliche Durchsicht des Manuskriptes und seine Anregungen und konstruktive Kritik.

Besonders danken möchte ich auch Frau Dr. Cordula V. Mora für die wertvolle Hilfe bei der Übersetzung der Zusammenfassung und die stets aufmunternden Gespräche fachlicher und nicht-fachlicher Art mit ihr während der Entstehung dieser Arbeit.

Ganz besonders herzlich danken möchte ich meinem Freund Kai, sowohl für seine enorme Hilfe in allen Computer-technischen Fragen und bei der Fertigstellung des Lay-Outs und dem Druck dieser Arbeit, als auch vor allem für seine große Geduld mit meinen nicht immer nur Dissertations-bedingten Launen und sein Verständnis für mich und meinen Beruf, sowie für seine Gabe, mich auch an schlechten Tagen stets wieder aufzuheitern.

Nicht zuletzt aber gilt mein größter Dank meinen Eltern, nicht nur für die schnelle Korrektur des Manuskriptes durch meine Mutter und die vielen wieder aufgefüllten Druckerpatronen von meinem Vater, sondern ganz besonders für ihre immer gewährte uneingeschränkte Unterstützung bei allem, was ich mir im Leben bisher in den Kopf gesetzt habe, und vor allem dafür, dass sie es mir mit der Finanzierung des Studiums ermöglicht haben, meinen Traumberuf zu ergreifen.

Lebenslauf

Name:	Michaela Jüstel
Geburtsdatum:	10. August 1976
Geburtsort:	Gräfelfing
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Eltern:	Heinz Karl Jüstel, Ingenieur i.R. Gabriele Jüstel, geb. Anton, Lehrerin
1982-1986	Josef-Dosch-Grundschule Gauting
1986-1995	Otto-von-Taube-Gymnasium Gauting
30. Juni 1995	Allgemeine Hochschulreife
1995-2001	Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
10. Januar 2001	Abschluss des Studiums mit dem Ablegen des dritten Abschnitts der Tierärztlichen Prüfung
01. Februar 2001	Erteilung der Approbation als Tierärztin
01. März 2001 bis 31. Juli 2002	Tätigkeit als Assistenztierärztin in der Tierärztlichen Praxis Dr. Anita Müller in Gauting
seit 01. Mai 2001	Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Institut für Tierpathologie der LMU München
seit 01. August 2002	Tätigkeit als freie tierärztliche Mitarbeiterin in der Tierärztlichen Praxis Dr. Anita Müller sowie bei der Firma Mangfalltaler-Jungbullen-Erzeugergemeinschaft w.V. in Kirchheim