

Wie Nervenfasern zu ihren Zielen finden

Christine E. Bandtlow, Zürich

Zusammenfassung

Neuronale Wachstumskegel wandern oftmals über längere Distanzen zu ihren Zielgebieten, wobei die ungeheure Präzision der axonalen Wegfindung ein auffallendes Charakteristikum darstellt. Als Weglenkungs- und Positionserkennungsmoleküle dienen dabei sowohl lösliche als auch membrangebundene Faktoren, die in der unmittelbaren Umgebung der wachsenden Nervenfasern vorliegen und entsprechende Rezeptoren auf der Oberfläche des Wachstumskegels aktivieren. Man unterscheidet dabei mindestens vier verschiedene Wirkungsmechanismen: Anziehung durch Kontakt, Anziehung durch lösliche Faktoren (Chemoattraktion), Wachstums-Hemmung durch Kontakt und Abstossung durch lösliche Faktoren (Chemorepulsion). Derartige Wirkungsprinzipien werden von vielen Molekülen ausgelöst, die in verschiedene unterschiedliche Familien von neuronalen Lenkungs- und Erkennungsmolekülen zusammengefasst werden können, wie Zelladhäsionsmoleküle der Immunoglobulin Superfamilie, Netrine bzw. membrangebundene Hemmstoffe wie RAGS, die sich alle durch eine hochspezifische Wirkungsweise auszeichnen. Wir stehen sicher erst am Anfang in unserem Verständnis über die genaue Funktion dieser und anderer Moleküle während der Entwicklung bzw. bei der Regeneration des Nervensystems.

How nerve fibers find their targets

Neuronal growth cones traverse long distances along appropriate pathways to find their correct targets. Secreted and cell surface molecules in the growth cone's environment bind to receptors on the growth cone's surface, trigger second messenger signals, and lead to appropriate steering decisions. Growth cones appear to be guided by at least four different mechanisms: contact-mediated attraction, chemoattraction, contact-mediated inhibition, and chemorepulsion. These mechanisms are mediated by different families of guidance molecules, including neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily, netrins, and membrane bound inhibitors such as RAGS, all of which appear to be highly specific in their activity on certain growth cones. We are just beginning to gain insights into the function of these and other molecules in the developing and regenerating nervous system.

1 EINLEITUNG

Das Nervensystem von höheren Vertebraten zeichnet sich durch eine enorm hohe Komplexität aus. Dabei entstehen die Faserverbindungen zwischen einzelnen Nervenzentren und ihren Nervenzellen während einer relativ kurzen Zeitspanne der Individualentwicklung. Zwar ist die bislang herkömmliche Meinung, dass die Faserverbindungen im Gehirn bzw. Rückenmark fest etabliert sind und sich nicht mehr verändern können, nicht korrekt, da Verknüpfungspunkte bzw. kürzere Nervenfaserverzweige nahezu lebenslang neugebildet und umgewandelt werden können. Dennoch beschränkt sich die Bil-

dung der grösseren Faserzüge und Verbindungen ausschliesslich auf die Fötalperiode und eine relativ kurze Zeit nach der Geburt. Die gesamte Funktion des Nervensystems beruht auf einer korrekten Verschaltung einzelner Faserzüge, denn erst die komplexe Gesamtheit der neuronalen Verbindungen ermöglicht die hoch entwickelten Leistungen des Gehirns. Die Frage nach den Mechanismen und Prinzipien, die der Entstehung der Faserverbindungen zugrundeliegen, ist deshalb ein zentrales Thema der Entwicklungs-Neurobiologie.

Wie die Entstehung des gesamten Organismus wird auch die Entstehung des Nervensystems durch die vorhandene

genetische Information gesteuert. Auf den ersten Blick stellt die Komplexität des Nervensystems ein schier unlösbares Problem dar: das menschliche Genom besteht nur aus etwa 300 000 Genen, doch das Nervensystem enthält ca. 10^{12} Nervenzellen bzw. 10^{15} Synapsen. Daher ist es völlig ausgeschlossen, dass die Entwicklung jeder einzelnen Nervenzelle von einem spezifischen Gen kontrolliert wird. Doch wie können einzelne Nervenzellen sich überhaupt finden, einander erkennen und die richtigen Verbindungen knüpfen?

Gerade in den letzten Jahren haben sich Neurobiologen mit diesen Fragen intensiv auseinandergesetzt, in der Hoffnung, die mechanistischen Grundlagen zu entdecken, die die Präzision der axonalen Weg- und Zielfindung determinieren, und herauszufinden, wie derartige Informationen in entsprechende Lenkungs- und Erkennungsmoleküle übersetzt werden können.

2 MECHANISMEN DER AXONALEN WEGLENKUNG

Ein wesentliches Prinzip der axonalen Weglenkung beruht sicherlich auf einer intensiven Kommunikation der wachsenden Nervenfasern mit ihrer Umgebung, d.h. mit anderen Nerven-, aber auch Nicht-Nervenzellen. Nur der ständige Informationsaustausch mit der näheren und weiteren Umgebung ermöglicht der Nervenfasern, ihr Ziel zu erreichen bzw. zu erkennen. Als Pfadfinder fungieren dabei keulenförmige, nach Amöbenart vordringende Strukturen an der Spitze jeder auswachsenden embryonalen Nervenfasern, die sogenannten Wachstumskegel (Abb. 1). Die Bedeutung dieser Struktur wurde Ende des 19. Jh. vom spanischen Neuroanatom Ramon y Cajal erkannt, der sie mit einem Rammbock verglich, der sich seinen Weg durch das dichte Neuroepithel bahnt (RAMON Y CAJAL, 1928). Wachstumskegel sind hochmotile Strukturen mit zahlreichen fingerähnlichen Fortsätzen, den Filopodien, die regelrecht ausschwärmen und ihre Umgebung erkunden. Filopodien sind ständig in Bewegung, strecken sich aus, wandern umher und ziehen sich zurück, und das alles innerhalb weniger Minuten. Schon sehr frühe Experimente hinterließen den Eindruck, dass Nervenfasern nicht ziellos auswachsen, sondern dass die Wachstumskegel einen offensichtlich ausgezeichneten chemischen Spürsinn besitzen, der es ihnen erlaubt, sich an bestimmten chemischen Erkennungsmerkmalen aus ihrer Umwelt zu orientieren. Damit ist die Wegstrecke, die eine Faser zurücklegt, das Ergebnis einer ununterbrochenen Folge von Entscheidungen, die von den als Vorhut ausgesandten Filopodien getroffen werden. Es lässt sich daher einfach vorstellen, dass Wachstums-

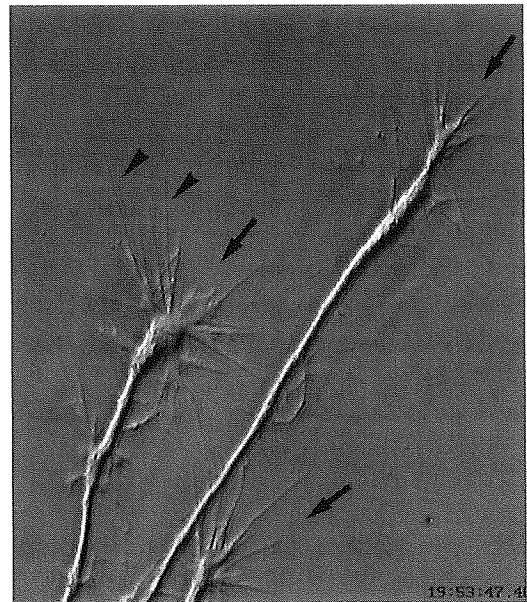


Abb. 1. Wachstumskegel unterschiedlicher Morphologie von auswachsenden Nervenfasern in Kultur (Pfeile). Hauptcharakteristikum sind die dünnen, tentakelähnlichen Fortsätze, die Filopodien (Pfeilspitzen).

Fig. 1. Neuronal growth cones with characteristic filiform filopodia (arrowheads).

kegel als Sensoren und Integratoren fungieren, die die Fülle von Weglenkungs- und Positionserkennungsmolekülen aus der Umgebung einer wachsenden Nervenfasern nicht nur empfangen, sondern auch weiterverarbeiten und somit das Wachstumsverhalten einer Nervenfasern bestimmen.

Die zugrunde liegenden Kommunikationsarten, d.h. die Sprachen, mit denen die Nervenfasern während ihres Wachstums mit ihrer Umwelt kommunizieren, unterteilt man in zwei Signalsysteme:

Lösliche Proteine, die in Zielgebieten bestimmter Nervenfasern produziert, in den Extrazellulärraum freigesetzt und diffusible radiäre Konzentrationsgradienten ausbilden können. Solche vektoriell angebotene Informationen wirken nicht nur über längere Distanzen, sondern können sich sowohl fördernd als auch hemmend auf das axonale Wachstum auswirken. Nervenfasern, die auf positive, d.h. chemoattraktive Faktoren ansprechen, wachsen gezielt auf die Produktionsquelle zu und meiden Quellen von negativen, d.h. chemorepulsiven Faktoren. In verschiedenen Modellsystemen sind derartige Faktoren als effektiv die Wachstumsrichtung von Nervenfasern beeinflussend beschrieben worden.

Direkte Interaktion von Axonen mit verschiedenen Glycoproteinen in der Zellmembran anderer Zellen bzw. mit Bestandteilen der extrazellulären Matrix stellt eine andere Form der

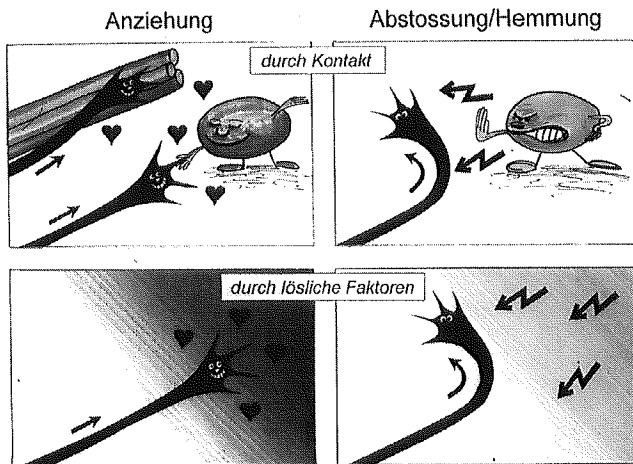


Abb. 2. Die Weglenkung von Wachstumskegeln kann in vier Kategorien unterteilt werden: Anziehung durch Kontakt bzw. durch lösliche Faktoren und Abstossung durch Kontakt bzw. lösliche Faktoren.

Fig. 2. Guidance of neuronal growth cones may be divided into four categories: attraction by respectively contact and soluble factors, and repulsion by respectively contact and soluble factors.

Zell-Zell-Kommunikation dar. Auch in diesem Fall können sich die Signale sowohl positiv (fordernd) als auch negativ (inhibitorisch) auf das Wachstum auswirken und dienen meist der Weg- bzw. Positionserkennung (Abb. 2).

Obwohl diese Definitionen der verschiedenen Signalsysteme bestimmte, unterschiedliche Wirkungsmechanismen implizieren, ist der tatsächliche Unterschied zwischen löslichen und auf Zelloberflächen fixierten Molekülen nicht immer eindeutig. Lösliche Proteine können an Oberflächenmoleküle binden und dann nicht unbedingt über längere Distanzen wirken.

3 CHEMISCHE SIGNALE WEISEN DEM AUSWACHSENDEN AXON DEN WEG

3.1 Positive Faktoren – Zelladhäsionsmoleküle

Die Bedeutung von positiven, d.h. das axonale Wachstum fördernden Molekülen wurde insbesondere von SPERRY (1963) durch seine *Chemoaffinitäts-Hypothese* geprägt. Die grundlegende Idee dieser Hypothese beruhte auf der Annahme, dass einzelne Nervenzellen sich in der Frühphase ihrer Entwicklung (noch bevor sie eine Nervenfaser bilden) unterschiedliche molekulare Marker, also Erkennungsmoleküle, zulegen. Die Ausbildung der richtigen Verknüpfung zwischen zwei Nervenzellen würde demnach davon abhängen, ob die Moleküle auf der Oberfläche der jeweiligen Zellen

zueinander passen. In späteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass adhäsive Zell-Zell-Kontakte zwischen dem Wachstumskegel und sog. Zelladhäsionsmolekülen (*cell adhesion molecules*, CAMs) auf der Oberfläche von Nachbarzellen oder in der extrazellulären Matrix eine Rolle spielen. In den letzten Jahren ist eine Fülle derartiger Zelladhäsionsmoleküle gefunden worden. Basierend auf ihrer unterschiedlichen Struktur werden viele der an der Adhäsion beteiligten Glycoproteine einer von drei Hauptfamilien zugeordnet. Die erste ist die *Immunoglobulin-Superfamilie*, mit N-CAM, L1, MAG, TAG-1/axonin etc. die grösste der drei Familien darstellend. Die zweite Familie umfasst eine Gruppe strukturell verwandter Glycoproteine namens *Cadherine*, von denen N-Cadherin ein wichtiger Vertreter im Nervensystem ist. Die dritte Familie wird von einer grossen Gruppe von Glycoproteinen gebildet, die man *Integrine* nennt. Die Integrine vermitteln Interaktionen zwischen Zelloberfläche und Molekülen in der extrazellulären Matrix wie Laminin, Fibronectin, Tenascin und einige Proteoglycane. All diese Moleküle gehören zu typischen positiven Weglenkungs- und Positionserkennungsfaktoren (Tab. 1).

Im nachfolgenden Beispiel soll kurz erläutert werden, inwieweit sich das Wachstumsverhalten einer Nervenfaser ändern kann, wenn der Kontakt mit derartigen Molekülen unterbunden wird. Experimente mit Invertebraten, z. B. Heuschrecken, haben gezeigt, dass die Etablierung des Nervensystems in diesen Organismen sehr stereotyp abläuft, d.h. die Wahl der Wegfindung einzelner Nervenfaser von Embryo zu Embryo gleich ist. In frühen Experimenten von David Bentley und seinen Mitarbeitern in Californien konnte gezeigt werden, dass der Weg eines ganz bestimmten Fasertrakts in der Beianlage des Heuschreckenembryos immer dann seine Richtung änderte, wenn die Wachstumskegel bestimmte, auf dem Weg liegende Zellen kontaktiert hatten. Um den Beweis zu liefern, dass die Kontaktaufnahme dieser Zellen tatsächlich zu einer Neuorientierung der Wachstumskegel führt, entfernten BENTLEY & CAUDY (1983) diese Zellen mittels Laserstrahlen noch vor dem Zeitpunkt der Kontaktaufnahme. Wie erwartet, befanden sich nun die auswachsenden Wachstumskegel in einem «orientierungslosen Zustand», in dem auffallend viele Fasern einen falschen Weg einschlugen und erst über diverse «Umwege» wieder in ihre eigentliche Bahn zurückfanden (Abb. 3).

3.2 Positive, lösliche Moleküle

Doch, wie bereits erwähnt, können Axone auch durch chemische Faktoren angezogen werden, die von den Zielzellen abgegeben werden. Neben den klassischen Neurotrophinen

Tab. 1. Einige neuronale Weglenkungs- und Erkennungsmoleküle, die im Text teilweise erwähnt werden.

Tab. 1. *Some neuronal guiding and recognition molecules, part of which are mentioned in the text.*

Anziehung	Abstossung/Hemmung
Adhäsionsmoleküle	
N-CAM, TAG-1, Fasciclin II	MAG, Cadherin,
MAG, Cadherin, KALIG-1	Semaphorin I
Extrazelluläre Matrixmoleküle	
Laminin, Fibronectin, Kollagen, Proteoglycane	Proteoglycane, Tenascin, Restrictin, RAGS ¹ /AL-1 ²
	Mit ZNS-Myelin assoziierte Nervenwachstumshemmstoffe
Neurotransmitoren	
Acetylcholin, Dopamin, Serotonin	Acetylcholin, Serotonin, Nitritoxid
Neurotrophine	
NGF, BDNF, NT-3	
Netrin-1, Netin-2	Netrin-1 ¹ /UNC-6 ³ Collapsin-1 ¹ /Semaphorin III ² Semaphorin II

¹ Mittels Schrägstrich gekoppelte Namen bezeichnen Stoffe gleicher Wirkung, aber aus verschiedenen Tieren: ¹ Huhn, ² Maus, ³ Nematode *Caenorhabditis elegans*.

wie Nervenwachstumsfaktor (*nerve growth factor*, NGF), BDNF, NT-3, NT-4/5, CNTF, FGF etc., sind in dieser Kategorie auch Neurotransmitoren zu finden (s. Tab. 1). Ein Beispiel für eine relativ neue Klasse von Molekülen stammt aus dem Labor von Marc Tessier-Lavigne aus Berkeley, Californien. Zellkulturexperimente hatten gezeigt, dass die Zellen der Bodenplatte der ventralen Seite des sich entwickelnden Rückenmarks von Säugern offensichtlich einen Faktor produzieren, der eine anziehende Wirkung auf die dorsal gelegenen Commissural-Neurone auszuüben scheint (Abb. 4) (TESSIER-LAVIGNE et al., 1988; PLACZEK et al., 1990). Diese Fasern wachsen genau auf die Bodenplatte zu und schliessen sich dann einem longitudinal laufenden Fasertrakt an.

Wenn dorsale Explantate des Rückenmarks aus Mäuseembryonen der entsprechenden Entwicklungsphase in unmittelbarer Nähe des Bodenplattenexplantats kultiviert werden, wachsen Commissuralfasern auch in Kultur direkt auf

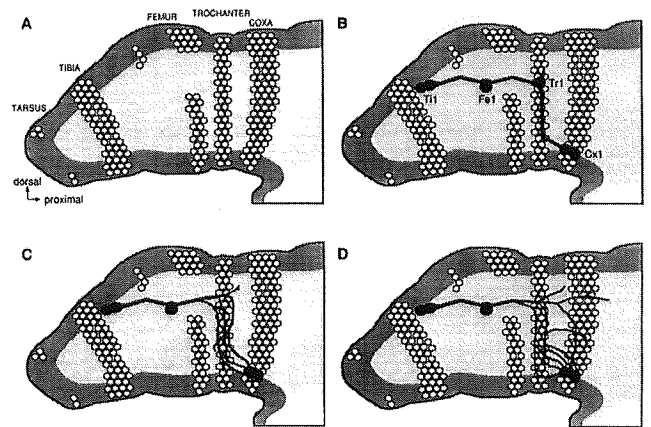


Abb. 3. A: Schema der Beinanlage eines Heuschreckenembryos. B: Diagramm, das den normalen, stereotypen Verlauf bestimmter Nervenfasern in der Beinanlage zeigt. C–D: Wird nun eine der Kontaktzellen (Tr1) noch vor der Kontaktaufnahme durch den Wachstumskegel mittels Laserstrahl entfernt, so ist der weitere Verlauf des wachsenden Axons wie in den beiden Beispielen gestört.

Fig. 3. A: limb bud of grasshopper embryo. B: diagram of normal stereotype course of outgrowing specific axons in the limb bud. C–D: after selective killing of guide post cells (Tr1) by laser radiation, pioneer axons lose oriented growth.

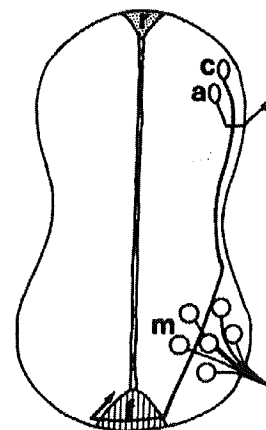


Abb. 4. Schematische Darstellung des Verlaufs von Commissuralfasern im sich entwickelnden Wirbeltier-Rückenmark. (f) ventrale Bodenplatte; (r) dorsale Deckplatte; (a) Assoziations-Neurone, deren Fasern ipsilateral in den *Funiculus lateralis* auswachsen; (c) dorsal gelegene Commissural-Neurone, deren Fasern ventral Richtung Bodenplatte wachsen; (m) Motoneurone mit peripheral auswachsenden Fasern.

Fig. 4. Schematic course of commissural axons in the embryonic spinal cord. f = ventral plate, r = dorsal plate, a = associative neurons with axons growing towards the funiculus lateralis, c = dorsal commissural neurons with axons growing towards the ventral plate, m = motor neurons with axons projecting ventrolaterally to form the ventral roots of the spinal nerves.

das Bodenplattenexplantat zu. In nachfolgenden biochemischen und molekularbiologischen Experimenten konnten zwei Faktoren aus Bodenplattenzellen gereinigt und kloniert werden, die *Netrin 1* und *Netrin 2* genannt wurden. Beides sind lösliche Proteine, wobei vor allem *Netrin 1* von Bodenplattenzellen sezerniert wird und damit als vektoriell angebotene Information in Form eines ventral-dorsalen Gradienten im Rückenmark vorliegt (Abb. 5) (SERAFINI et al., 1994; KENNEDY et al., 1994).

Die Experimente verdeutlichten zudem, dass *Netrin 1* nur während einer bestimmten Entwicklungsphase produziert und auch nur von einer selektiven Gruppe von Nervenzellen wahrgenommen wird, da andernfalls die wesentlich näher zur Bodenplatte lokalisierten Motoneurone (s. Abb. 4) ebenfalls von *Netrin 1* angezogen werden müssten. Interessanterweise ist in diesem Zusammenhang auch gezeigt worden, dass *Netrin 1* ein bifunktionelles Protein ist, das sowohl anziehende als auch abstossende Wirkung auf Wachstumskegel ausüben kann. Während *Netrin 1* anziehend auf Commissuralfasern wirkt, scheint auf den Wachstumskegeln der Motoneurone des *Nucleus Trochlearis* ein anderer Rezeptor aktiviert zu werden, der die chemorepulsive Wirkung von *Netrin 1* signalisiert (COLAMARINO & TESSIER-LAVIGNE, 1995), weshalb diese Fasern die genau entgegengesetzte Richtung einschlagen, d.h. von der Bodenplatte wegwachsen (Abb. 5).

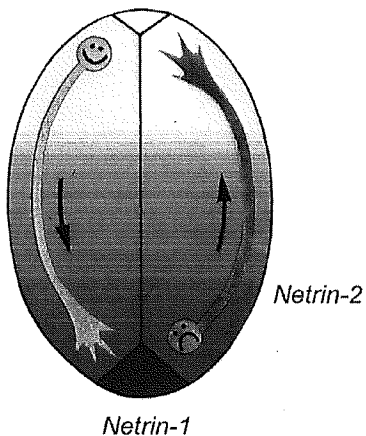


Abb. 5. Graphische Darstellung der bifunktionellen Wirkungsweise von *Netrin-1*, das als vektorielle Information in Form eines ventral-dorsalen Gradienten anziehend für Commissuralfasern wirkt (links) und gleichzeitig abstossend für die Axone der ventral gelegenen Trochlearis-Neurone (rechts).

Fig. 5. Graphic representation of the bifunctional action of *netrin-1* forming a ventro-dorsal gradient attracting the commissural axons (left) and repulsing the axons of the ventral trochlearis neurons (right).

3.3 Negative, hemmende Faktoren

In den letzten Jahren wurde aber auch die Bedeutung von Nervenwachstums-Hemmstoffen erkannt. Solch repulsive Faktoren werden während des axonalen Wachstums in Gehirnregionen exprimiert, die von spezifischen Nervenfasern gemieden werden und deshalb als Sperrgebiete gelten. Auch hier unterscheidet man Zelloberflächenmoleküle und lösliche Faktoren (s. Tab. 1).

Ein gut untersuchtes System in diesem Zusammenhang ist die retinotectale Projektion im Hühnchenembryo, in dem die räumlichen Nachbarschaftsbeziehungen zwischen den Nervenzellen der Retina über ein topographisches Projektionsmuster im Gehirn erhalten bleiben. So wachsen z. B. die temporalen Axone der retinalen Ganglienzellen ausschliesslich in den anterior liegenden Teil des Tectums, nicht aber in den posterioren Teil (s. Abb. 6). Die Gruppe von Friedrich Bonhoeffer am Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie konnte zeigen, dass für dieses Projektionsverhalten die Anwesenheit eines repulsiven Faktors verantwortlich gemacht werden kann, dessen Expression in Form eines Gradienten vom posterioren zum anterioren Tectum hin abfällt

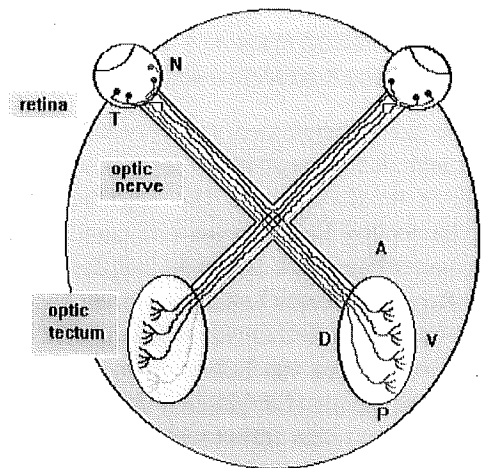


Abb. 6. Graphische Darstellung der topographischen Projektion des Retinotectal-Systems im Hühnchenembryo. (N) Nasal gelegene Ganglienzellen der Retina projizieren in den posterioren Teil (P) des Tectums, temporal gelegene Ganglienzellen (T) projizieren in den anterioren Teil (A) des Tectums. Damit ist die nachbarschaftliche Beziehung zwischen den Ganglienzellen der Retina in einem topographischen Projektionsmuster auf der ersten Schaltstelle im Gehirn (Tectum) beibehalten.

Fig. 6. Graphic representation of topographic projection of the retinotectal system in the chicken embryo. The nasally situated neurons (N) of the retina project into the posterior part (P) of the tectum, whereas the temporally situated neurons (T) project into the anterior part (A) of the tectum. Thus, the neighbourly situation of the retinal neurons is preserved as a topographic projection pattern in the tectum, i.e. the first association centre of the brain.

und ausschliesslich von temporalen Fasern erkannt wird (WALTER et al., 1987). Dieser aus posterioren tectalen Membranen des Hühnchenembryos gereinigte Faktor (*retinal axonal guidance signal*, RAGS) ist ein membranverankertes Protein, das einer bestimmten Familie von sog. EPH-Liganden zugeordnet werden kann. Andere Mitglieder dieser Familie wurden in den letzten Jahren auch in weiteren Modellsystemen als wichtige axonale Lenkungsmoleküle beschrieben. Interessanterweise kann rekombinantes RAGS in Zellkultur den Kollaps von Wachstumskegeln temporaler retinaler Ganglienzellen auslösen (COX et al., 1990; DRESCHER et al., 1995). Basierend auf diesen Ergebnissen vermutet man, dass RAGS eine abstossende Wirkung auf die auswachsenden temporalen Fasern ausübt und sie deshalb den posterioren Teil des Tectums meiden.

In den nächsten Abschnitten soll die Wirkungsweise eines Zelloberflächen-Hemmstoffes beschrieben werden, der zwar weniger bei der Entwicklung des Nervensystems eine Rolle spielt als vielmehr dazu beiträgt, dass verletzte Nervenfasern des Gehirns und Rückenmarks nicht über längere Strecken regenerieren können.

4 OLIGODENDROZYTEN ALS INHIBITOREN WACHSENDER NERVENFASERN

Hinweise für das Vorhandensein von Nervenwachstumshemmern im zentralen Nervensystem (ZNS) höherer Wirbeltiere erschienen im Kontext von Untersuchungen über das fehlende regenerative Verhalten von verletzten Nervenfasern im Gehirn und Rückenmark. Schon Anfang des Jahrhunderts konnte in Tierexperimenten bewiesen werden, dass das fehlende Nachwachsen verletzter Nervenfasern nicht auf einem generellen Unvermögen von Nervenzellen des ZNS beruht, sondern eher auf negative Einflüsse aus der Umgebung nachwachsender Nervenzellen zurückzuführen sei, die eine Regeneration über längere Strecken nicht unterstützen (CAJAL, 1928; DAVID & AQUAYO, 1983). Bei der intensiven Untersuchung einzelner Komponenten des ZNS-Gewebes bezüglich der Fähigkeit, das Wachstum von Nervenfasern zu hemmen, stiessen SCHWAB & CARONI (1988a) am hiesigen Hirnforschungsinstitut auf eine spezielle Zellart, nämlich Oligodendrozyten. Diese hochspezialisierten Zellen kommen ausschliesslich im ZNS vor und bilden die isolierenden Myelinhüllen um die Nervenzellfortsätze, die eine schnelle Reizleitung ermöglichen.

Werden nun dissoziierte Oligodendrozyten mit Nervenzellen zusammen in Kultur gehalten, zeigen Video-Zeitrafferaufnahmen, dass die Kommunikation zwischen diesen

beiden Zelltypen fatale Folgen für die Nervenzelle hat (BANDTLOW et al., 1990). Bereits der erste Kontakt von Filopodien des Nervenwachstumskegels mit Oligodendrozyten führt innerhalb weniger Minuten zu einer drastischen Bewegungseinschränkung des Wachstumskegels, die sich in einem über mehrere Stunden andauernden Wachstumsstillstand manifestiert. Dieser Wachstumsstillstand ist von einem völligen Kollaps der Wachstumskegel-Struktur begleitet (Abb. 7). Die Beobachtung, dass sowohl der Wachstumsstopp als auch der Kollaps von Wachstumskegeln ein strikt kontaktabhängiges Phänomen darstellt, legte den Schluss nahe, dass lösliche, von Oligodendrozyten freigesetzte Faktoren als mögliche Hemmstoffe auszuschliessen waren. Ausserdem ist die beobachtete Wachstumsinhibition lokal begrenzt. Wachstumskegel einer verzweigten Nervenfaserkollabieren nicht, wenn nur einer der Wachstumskegel Kontakt mit Oligodendrozyten aufnimmt. Interessanterweise waren solche kontaktinduzierten Phänomene nur bei Oligodendrozyten zu beobachten, aber nicht bei anderen Zellen des ZNS, z. B. Astrozyten.

Biochemische Studien zeigten, dass für die Wirkung der Oligodendrozyten zwei membranassoziierte Moleküle verantwortlich gemacht werden können, die entsprechend ihrem Molekulargewicht als Nervenwachstumshemmer NI-35 (35 kDa) und NI-250 (250 kDa) bezeichnet werden und als Komponenten des ZNS-Myelins bislang bei Ratten, Rindern, Hühnern und Menschen gefunden wurden. Die genaue molekulare Analyse dieser beiden Proteine steht noch aus, aber

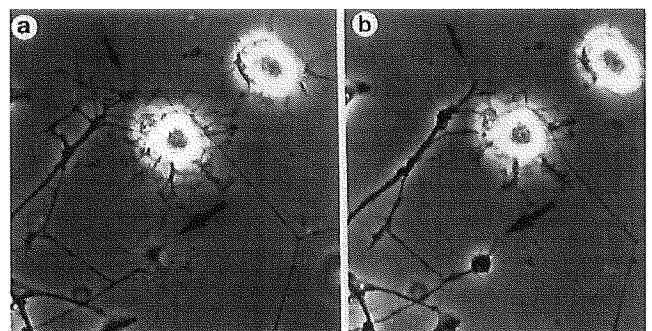


Abb. 7. Interaktion von wachsenden Nervenfasern von Spinalganglienzellen mit Oligodendrozyten in Kultur. (a) Die grossflächigen Wachstumskegel der Axonen (Pfeile) kontaktieren mit ihren zahlreichen Filopodien einen Oligodendrozyten. (b) 60 min später sind die Wachstumsspitzen der Fasern kollabiert. Das Wachstum der Fasern kommt zum Stillstand.

Fig. 7. Interaction of growing axons of sensitive spinal ganglion neurons with oligodendrocytes in culture. (a) The large growth cones of the axons (arrows) contact with their numerous filopodia an oligodendrocyte. (b) 60 minutes later the growth cones are collapsed and growth of the axons ceases.

erste Hinweise deuten daraufhin, dass die beiden Komponenten immunologisch miteinander verwandt sind. Die Immunisierung mit partiell gereinigten Hemmstoffen ermöglichte die Herstellung monoklonaler Antikörper, die die Hemmaktivität beider Inhibitoren aufheben (CARONI & SCHWAB, 1988b). In Anwesenheit dieser Antikörper, IN-1 genannt, werden Nervenfasern nach Kontakt mit Oligodendrozyten in ihrem Wachstum nicht gehemmt, sondern überqueren sie mühelos (Abb. 8).

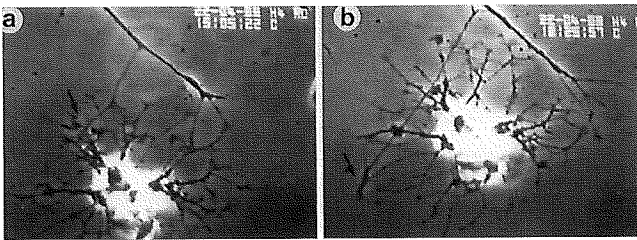


Abb. 8. In Anwesenheit des neutralisierenden Antikörpers IN-1 führt der Kontakt des Wachstumskegels (Pfeil) nicht zum Kollaps (a). Nach 120 min hat die Faser den Oligodendrozyten nahezu vollständig überquert (b). 600-fache Vergrößerung.

Fig. 8. (a) In the presence of the neutralizing antibody IN-1 contact of the growth cone (arrow) with an oligodendrocyte does not cause the collapse. (b) After 120 min the axon has almost fully traversed the oligodendrocyte. Magnification: 600 times.

Ähnlich der Wirkungsweise der Oligodendrozyten induzieren die partiell aus Rückenmarksmylein von Rindern gereinigten Hemmstoffe NI-35/250 binnen weniger Minuten den Kollaps und die nachfolgende Retraktion von Wachstumskegeln kultivierter Nervenzellen (Abb. 9). Erst nach mehreren Stunden können sich kollabierte Wachstumskegel erholen und erneut auswachsen, wobei sie nach wie vor auf die myelinassoziierten Hemmstoffe reagieren. Auch in diesem System kann die Anwesenheit des neutralisierenden Antikörpers IN-1 den kollabierenden Effekt der Hemmstoffe verhindern. Interessanterweise zeigte kein anderes von uns untersuchtes Myelinprotein eine nur annähernd vergleichbare Wirkungsweise.

Doch wie können diese myelinassoziierten Hemmstoffe den Zusammenbruch eines Wachstumskegels herbeiführen? Welche intrazellulären Mechanismen sind daran beteiligt?

5 DER WACHSTUMSKEGEL ALS INTEGRATOR VON LENKUNGSMOLEKÜLEN

Viele Experimente haben gezeigt, dass die Umsetzung von Positions- und Lenkungssignalen im Wachstumskegel einer wachsenden Faser stattfindet. Die Orientierung eines

Wachstumskegels in einem ihn steuernden Gradienten oder nach Kontaktaufnahme mit einer anderen Zelle basiert möglicherweise auf inneren Verstärkungsmechanismen, die durch jeweilige Faktoren aktiviert werden. Auf molekularer Ebene ist vorstellbar, dass die gleichmässig über den Wachstumskegel verteilten Rezeptoren verschiedener Signalmoleküle auf der Seite der höheren Konzentration des Lenkungsfaktors oder der von Filopodien vermittelten Kontaktaufnahme stärker aktiviert werden, was sich in den nachgeschalteten, intrazellulären Kaskaden der Signaltransduktion fortsetzt.

Unter den bekannten intrazellulären Botenstoffen des Wachstumskegels steht wohl das Kalziumion (Ca^{2+}) im Mittelpunkt des Interesses. Seine intrazelluläre Konzentration beträgt im intakten Wachstumskegel ungefähr 100 nM. Generell versucht eine wachsende Nervenfasern diese Ca-Konzentration möglichst konstant einzuhalten. Verändert sich jedoch die Konzentration über oder unter diesen Sollwert, so kann sich diese Veränderung, je nach Ausmass, in einer Veränderung der Struktur oder der Wachstumsgeschwindigkeit des Wachstumskegels äussern. So war seit längerem bekannt, dass extrazelluläre Reize wie z. B. Aktivierung spannungsabhängiger Ca-Kanäle durch Depolarisation zu einer vielfachen Erhöhung der intrazellulären Ca-Konzentration führt und damit den Kollaps des Wachstumskegels bewirkt.

Wäre es möglich, dass auch die mit Myelin assoziierten Nervenwachstumsinhibitoren ihre Kollaps induzierende

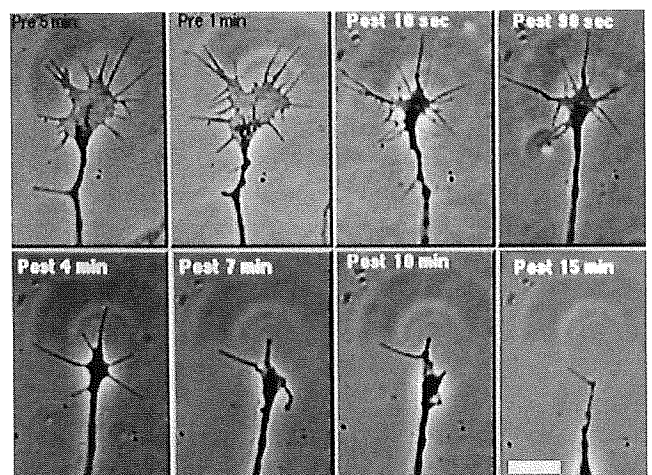


Abb. 9. Beobachtung der morphologischen Veränderungen eines Wachstumskegels einer Spinalgangliennervenfaser durch Zugabe der partiell gereinigten Inhibitoren NI-35/250. Innerhalb weniger Minuten kollabiert und retrahiert die Nervenfasern.

Fig. 9. Observation of morphological changes of the growth cone of the axon of a spinal ganglion neuron in the presence of the partially purified inhibitors NI-35/250. Within a few minutes the growth cone collapses and the axon retracts.

Wirkung über Veränderungen der intrazellulären Ca-Konzentration bewirken?

6 MYELINASSOZIIERTE HEMMSTOFFE UND KALZIUMKONZENTRATION

Direkte Messungen der intrazellulären Kalziumkonzentration in Wachstumskegeln sensorischer Nervenzellen mittels des Ca-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffs Fura-2 zeigten, dass die Hemmstoffe NI-35/250 tatsächlich einen vorübergehenden Anstieg der intrazellulären Ca-Konzentration über mehrere Minuten bewirkten (Abb. 10). Derartige Veränderungen waren in Anwesenheit des Antikörpers IN-1 nicht zu beobachten. Doch wodurch kam es zu einem Ca-Anstieg bzw.

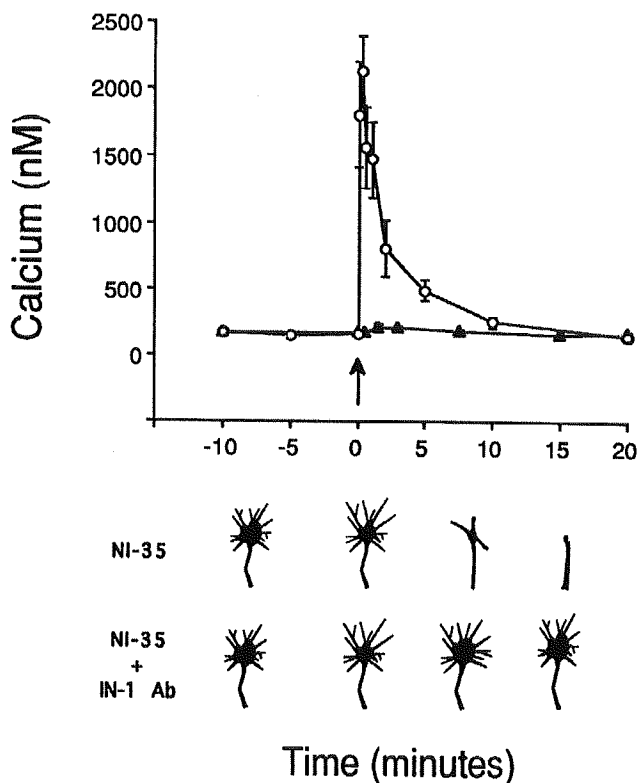


Abb. 10. Bestimmung der intrazellulären Kalziumkonzentration in Wachstumskegeln nach Zugabe von NI-35/250 in An- bzw. Abwesenheit des neutralisierenden Antikörpers IN-1. Während NI-35/250 einen transienten Anstieg der Kalziumkonzentration bewirkt (○), der zu einer morphologischen Veränderung führt, kann IN-1 diesen Effekt verhindern (▲).

Fig. 10. Determination of intracellular calcium concentration in growth cones after the addition of NI-35/250 in the presence and absence respectively of the neutralizing antibody IN-1. Whereas NI-35/250 alone cause a transient rise of the concentration (○), IN-1 inhibits this effect (▲).

bestand damit ein kausaler Zusammenhang mit den Strukturveränderungen des Wachstumskegels?

Eine Erhöhung der intrazellulären Ca-Werte kann in Nervenzellen, aber auch in ihren Wachstumsspitzen, sowohl durch einen Einstrom von Ca^{2+} über die Aktivierung spannungs- oder ligandabhängiger Ca-Kanäle als auch durch Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Kompartimenten durch die Aktivierung intrazellulärer Ca-Kanäle erfolgen. Bislang sind zwei intrazelluläre Ca-Kanäle bekannt, die physiologisch entweder durch die intrazellulären Botenstoffe 1,4,5-Inositoltriphosphat (IP₃-Rezeptor) bzw. cADP-Ribose (Ryanodinrezeptor) geöffnet werden und unterschiedlichen Kompartimenten des Endoplasmatischen Retikulums bzw. der Mitochondrien angehören (GALIONE, 1993).

Um zu zeigen, dass der NI-35/250-bedingte Anstieg der intrazellulären Ca-Konzentration in kausalem Zusammenhang mit den beobachteten morphologischen Veränderungen steht, wurden eine Reihe von Experimenten mit einer grossen Anzahl pharmakologischer Reagenzien durchgeführt, die entweder den Eintritt extrazellulärer Ca^{2+} oder die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern verhindern. Interessanterweise konnte die Blockierung spannungsgesteuerter Ca-Kanäle weder die Erhöhung der Ca-Werte noch den folgenden Kollaps verhindern. Dantrolen dagegen, ein Antagonist der ryanodinsensitiven intrazellulären Ca-Kanäle, konnte den NI-35/250-induzierten Kollaps verhindern. Diese Untersuchungen stützten die Hypothese, dass ein Anstieg der intrazellulären Ca-Konzentration in Wachstumskegeln einen entscheidenden Schritt bei der Vermittlung des Kollapses durch die myelinassoziierten Wachstumsinhibitoren darstellt (BANDTLOW et al., 1993).

8 SCHLUSSFOLGERUNGEN

Obwohl gerade in den letzten Jahren durch Zellkultur-Experimente erste Einblicke in die Struktur und Wirkungsweise von neuronalen Weglenkungs- und Erkennungsmolekülen gewonnen werden konnten, ist oftmals die genaue physiologische Funktion nicht bekannt. Es ist jedoch sicher, dass die ungeheuer komplexe Verschaltung der Nervenfasern nur durch die konzertante Interaktion vieler, vermutlich multifunktionaler Faktoren entstehen kann.

9 LITERATUR

BANDTLOW, C., ZACHLEDER, T. & SCHWAB, M.E. 1990. Oligodendrocytes arrest neurite growth by contact inhibition. – *J. Neurosci.* 10, 3837–3848.

- BANDTLOW, C.E., SCHMIDT, M.F., HASSINGER, T.D. SCHWAB, M.E. & KATER, S.B. 1993. Role of intracellular calcium in NI-35-evoked collapse of neuronal growth cones. - *Science* 259, 80.
- BENTLEY, D. & CAUDY, M. 1983. Pioneer axons lose directed growth after selective killing of guidepost cells. - *Nature* 304, 62-65.
- CARONI, P. & SCHWAB, M.E. 1988a. Two membrane protein fractions from rat central myelin with inhibitory properties for neurite growth and fibroblast spreading. - *J. Cell Biol.* 106, 1281-1288.
- CARONI, P. & SCHWAB, M.E. 1988b. Antibody against myelin-associated inhibitor of neurite growth neutralizes nonpermissive substrate properties of CNS white matter. - *Neuron* 1, 85-96.
- COLAMARINO, S.A. & TESSIER-LAVIGNE, M. 1995. The axonal chemoattractant netrin-1 is also a chemorepellent for trochlear motor axons. - *Cell* Vol. 81, 521-529.
- COX, E.C., MÜLLER, B. & BONHOEFFER, F. 1990. Axonal guidance in the chick visual system: posterior tectal membranes induce collapse of growth cones from the temporal retina. - *Neuron* 2, 31-37.
- DAVID, S. & AGUAYO, A.J. 1981. Axonal elongation into peripheral nervous system «bridges» after central nervous system injury in adult rats. - *Science* 241, 931-933.
- DRESCHER, U., KREMOSER, C., HANDWERKER, C., LÖSCHINGER, J., NODA, M. & BONHOEFFER, F. 1995. In vitro guidance of retinal ganglion cells axons by RAGS, a 25 kDA tectal protein related to ligands for Eph receptor tyrosine kinases. - *Cell* 82, 359-370.
- GALIONE, A. 1993. Calcium-induced calcium release and its modulation by C-ADP-ribose. - *Trends Pharmacol. Sci.* 13, 304-306.
- KENNEDY, T.E., SERAFINI, T., DE LA TORRE, J.R. & TESSIER-LAVIGNE, M. 1994. Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. - *Cell* 78, 425-435.
- PLACZEK, M., TESSIER-LAVIGNE, M., JESSELL, T. & DODD, J. 1990. Orientation of commissural axons in vitro to a floor plate-derived chemoattractant. - *Development* 110, 19-30.
- RAMON Y CAJAL, S. 1928. Degeneration and Regeneration of the nervous System. (Engl. transl. and reprint, 1959). - Hafner, New York.
- SERAFINI, T., KENNEDY, T.E., GALKO, M.J., MIRZAYAN, C., JESSELL, T.M. & TESSIER-LAVIGNE, M. 1994. The netrins define a family of axon outgrowth promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. - *Cell* 78, 409-424.
- SPERRY, R.W. 1963. Chemoaffinity in the orderly growth of nerve fiber patterns and connections. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 50, 703-710.
- TESSIER-LAVIGNE, M., PLACZEK, M., LUMSDEN, A.G., DODD, J. & JESSELL, T.M. 1988. Chemotropic guidance of developing axons in the mammalian central nervous system. - *Nature* 336, 775-778.
- WALTER, J., HENKE-FAHLE, S. & BONHOEFFER, F. 1987. Avoidance of posterior tectal membranes by temporal retinal axons. - *Development* 101, 909-913.

PD Dr. Christine Bandtlow, Institut für Hirnforschung, August-Forel-Strasse 1, Postfach 732, CH-8029 Zürich