

Gehirnentwicklung

Neuronale Stamm- und Vorläuferzellen

MICHAELA WILSCH-BRÄUNINGER UND WIELAND B. HUTTNER
MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR MOLEKULARE ZELLBIOLOGIE UND GENETIK, DRESDEN

Das zentrale Nervensystem von Wirbeltieren entsteht in der Embryonalentwicklung aus einem einschichtigen Epithel, dem Neuroepithel. Während der Neurogenese bildet sich aus diesem einfachen Epithel das komplexe Netzwerk des vielschichtigen Gehirngewebes. Dabei produzieren neurale Stammzellen und die aus ihnen hervorgehenden neuronalen Vorläuferzellen (die wir der Einfachheit halber beide unter dem Oberbegriff *progenitors* zusammenfassen) alle Nervenzellen (Neurone) des Gehirns.

■ Neuroepithelzellen, die primären *progenitors* des zentralen Nervensystems (und die aus ihnen hervorgehenden und ihnen sehr ähnlichen sekundären *progenitors*, die so genannten radialen Gliazellen) sind stark polarisiert (**Abb. 1**)^[1]. Ihre apikale Oberfläche grenzt an das Lumen des Ventrikels und ihre basale Seite kontaktiert eine Basallamina. Ein weiteres Charakteristikum der apiko-

basalen Polarität dieser *progenitors* sind Zell-Zell-Kontakte in der subapikalen Plasmamembran. Zur Zellteilung runden sich die Zellkörper an der apikalen Seite des Neuroepithels ab (ohne dass dabei jedoch die Zellen den Kontakt zur Basallamina verlieren). Wenn aus den Teilungen apikaler *progenitors* Neurone entstehen, fehlen diesen apikale Zell-Zell-Kontakte, und sie wandern nach basal, wo sie die neuronalen Zellschichten bilden (**Abb. 1**). Neurone sind postmitotische Zellen, die sich nicht teilen.

Neuronale *progenitors* und die verschiedenen Typen ihrer Zellteilung

Die frühen Zellteilungen im Neuroepithel während der Embryonalentwicklung generieren noch keine Neurone, sondern führen zu einer Vermehrung von neuronalen *progenitors* (symmetrisch proliferative Teilung; **Abb. 2 li.**)^[2]. Neurone können aus zwei prinzipiell verschiedenen Typen von Zellteilung entstehen. Zum einen, indem sich *progenitors* auf selbsterneuernde Weise teilen, wobei außer einem Neuron ein neuer *progenitor* gebildet wird (asymmetrisch neurogene Teilung)^[2]. Zum anderen, indem in einer „konsumierenden“ Zellteilung eines *progenitors* zwei Neurone entstehen (symmetrisch neurogene Teilung; **Abb. 2 Mi. u. re.**)^[2]. Während symmetrisch neurogene Teilungen typisch für die später beschriebenen basalen *progenitors* (s. u.) sind und bei den sich an der Ventrikeloberfläche teilenden apikalen *progenitors* überwiegend in der Spätphase der Neurogenese auftreten, sind – zumindest im Modellorganismus Maus – asymmetrisch neurogene Teilungen charakteristisch für apikale *progenitors*.

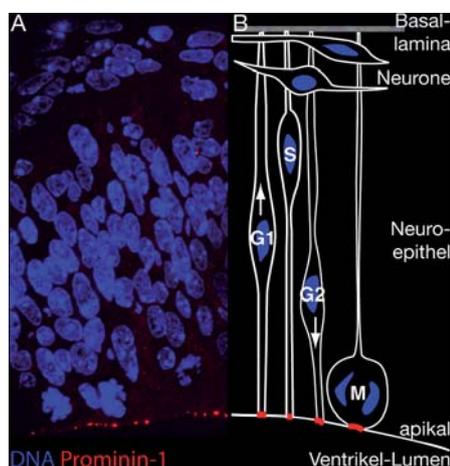
Orientierung der Teilungsebene – eine Determinante für den Typ der Zellteilung

Die apiko-basale Polarität der Neuroepithelzellen ist von entscheidender Bedeutung für das Zellschicksal^[1]. In anderen Modellen für asymmetrische Zellteilung, wie z. B. der Neurogenese von *Drosophila*, wird der Wechsel des Zellschicksals durch eine wesentliche Änderung der Orientierung der Teilungsebene verursacht, nämlich von senkrecht zur apikalen Oberfläche (vertikale Teilungsebene, **Abb. 2 li.**) zu parallel (horizontale Teilungsebene, **Abb. 2 Mi.**). Ähnliches wurde auch im embryonalen Gehirn von Säugern beobachtet. Während eine vertikale Teilungsebene die gleiche Verteilung der unterschiedlichen apikalen und basolateralen Zellbestandteile auf beide *progenitor*-Tochterzellen gewährleistet (**Abb. 2 li.**), erbt bei einer horizontalen Teilungsebene nur eine der Tochterzellen alle apikalen Komponenten einschließlich der Zell-Zell-Kontakte und bleibt daher *progenitor*. Dies erklärt auch die Delamination der anderen Tochterzelle, die entweder zu einem Neuron (**Abb. 2 Mi.**) oder zu einem basalen *progenitor* (s. u.) wird^[1].

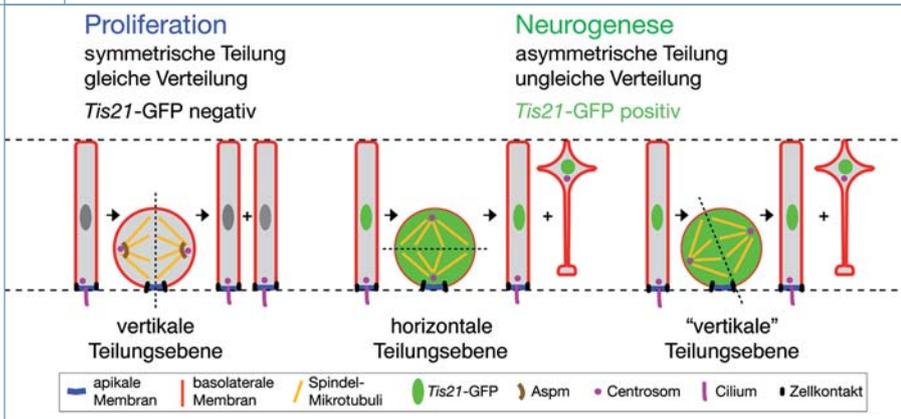
Allerdings sind horizontale Teilungsebenen in Neuroepithelzellen von Säugern, im Gegensatz zu Neuroblasten in *Drosophila*, selten und nur für einen sehr geringen Teil der asymmetrisch neurogenen Zellteilungen verantwortlich. Charakteristischerweise sind Neuroepithelzellen im Säugerhirn sehr langgestreckt (**Abb. 1**)^[1]. Dies impliziert, dass ihre apikalen Komponenten nur ein winziges Segment des mitotischen Zellkörpers einnehmen. Eine geringfügige Abweichung der Teilungsebene von der „perfekten“ vertikalen Orientierung kann deshalb bereits dazu führen, dass eine der beiden Tochterzellen keine apikalen Komponenten und Zell-Zell-Kontakte erbt und Neuron wird, dass also eine asymmetrisch neurogene Zellteilung erfolgt (**Abb. 2 re.**)^[3].

Mikrozephalie-Gen ASPM – Garant für eine vertikale Teilungsebene

Wie wird nun die Orientierung der Teilungsebene, die so entscheidend für das Tochterzellschicksal ist, in neuronalen *progenitors* kontrolliert? Die Position der mitotischen Spindel ist hier von entscheidender Bedeutung, da



▲ **Abb. 1:** Das Neuroepithel. **A**, Ultradünner (140 nm) Kryoschnitt durch das Neuroepithel im Telencephalon eines E10.5-Maus-embryos, gefärbt für DNA (Blau) und das apikale Membranprotein Prominin-1 (Rot). Die apikale Seite des Neuroepithels ist unten. **B**, Schematische Darstellung der Neuroepithelzellen, die sich vom Ventrikel-Lumen (apikale Seite, Rot) bis zur Basallamina erstrecken und deren Kerne sich während des Zellzyklus entlang der apiko-basalen Achse bewegen (G1: nach basal; G2: nach apikal; S-Phase ist basal und M-Phase apikal). Neugeborene Neurone wandern nach basal in Schichten zwischen den Neuroepithelzellkernen und der Basallamina.



▲ **Abb. 2:** Schematische Darstellung von apiko-basaler Polarität, mitotischer Spindel, Teilungsebene (gestrichelte Linie) und Expression des neurogenen Markers *Tis21*-GFP bei symmetrisch proliferativen (links) und asymmetrisch neurogenen (Mitte und rechts) Teilungen von Neuroepithelzellen.

die Teilungsfurche immer rechtwinklig zur Spindelachse verläuft und diese somit indirekt die Verteilung der apikalen Komponenten auf die Tochterzellen bestimmt (**Abb. 2**). Ein jüngst identifizierter Faktor für die Orientierung der mitotischen Spindel in Säugerneuroepithelzellen ist das *Aspm* (*abnormal spindle microcephaly-associated*)-Protein, das während der Zellteilung an den Polen der mitotischen Spindel konzentriert ist^[4]. Wird während der Neurogenese in der Maus die Menge von *Aspm* in Neuroepithelzellen durch RNA-Interferenz reduziert, so führt dies zu einer Abweichung der Teilungsebene: Neuroepithelzellen, in denen die Teilungsebene normalerweise exakt vertikal wäre, weisen nun leicht schräge Teilungsebenen auf. Es finden also asymmetrisch neurogene (anstelle von symmetrisch proliferativen) Teilungen statt^[4]. Bemerkenswerterweise verursachen Mutationen im menschlichen *ASPM*-Gen primäre Mikrocephalie, bei der die Größe des Gehirns drastisch reduziert ist^[5]. Dies kann durch eine verminderte Proliferation der *progenitors* als Folge verfrühter asymmetrisch neurogener Zellteilungen erklärt werden. All dies zeigt, wie entscheidend kleine Unterschiede in der Position der Spindel relativ zur apiko-basalen Achse für das Schicksal der Neuroepithelzellen und damit für die Gehirnentwicklung sein können.

Prominin-1/CD133, ein apikaler somatischer Stammzellmarker

Da bereits eine geringfügige Abweichung der Teilungsebene von ihrer Orientierung exakt parallel zur apiko-basalen Achse – was lediglich eine ungleiche Verteilung apikaler Komponenten zur Folge hat – zu einem unterschiedlichen Schicksal der Tochterzellen (*progenitor* und Neuron) führt^[3], muss man annehmen, dass in der apikalen Domäne der Neuroepithelzellen entscheidende Faktoren für das Zell-

schicksal lokalisiert sind. Ein Protein, das spezifisch in der apikalen Membran dieser *progenitors* lokalisiert ist, ist Prominin-1 (CD133), der erste charakterisierte Vertreter einer neuen Familie von Transmembranproteinen^[6]. Prominin-1 bindet Cholesterin und ist Bestandteil einer speziellen Membran-Mikrodomäne^[7]. Diese Membran-Mikrodomäne ist in Neuroepithelzellen spezifisch an der apikalen Oberfläche konzentriert (**Abb. 1A**), ist aber allgemein charakteristisch für verschiedene somatische Stammzellen, z. B. die hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks oder die so genannten *cancer stem cells* in Gehirntumoren^[6]. Bis vor kurzem war allerdings der Zusammenhang zwischen der Prominin-1-tragenden Stammzellmembran-Mikrodomäne und dem Wechsel der Neuroepithelzellen von Proliferation zu Neurogenese unklar.

Prominin-1-tragende *midbody*-Partikel und Cilien-Vesikel im Ventrikel

Einen wesentlichen Fortschritt brachte hier der überraschende Befund, dass in Mausembryonen – beginnend kurz vor Einsetzen der Neurogenese – in der Ventrikelflüssigkeit Membranpartikel auftreten, in denen Prominin-1 angereichert ist (**Abb. 3A–D**)^[8]. Eine Quelle für diese extrazellulären Partikel ist der so genannte *midbody* der Neuroepithelzellen^[9]. Im Verlauf ihrer Teilung ist der *midbody* die letzte Zytoplasmaverbindung zwischen den sich bildenden Tochterzellen, die zum Abschluss der Zytokinese beidseits durchtrennt und so als Membranpartikel in die Ventrikelflüssigkeit freigesetzt wird (**Abb. 3F**). Neben diesen *midbody*-Partikeln enthält die Ventrikelflüssigkeit kleinere Membranvesikel, die durch Abknospen von der apikalen Oberfläche der Neuroepithelzellen entstehen, u. a. vermutlich von deren primären Cilien, auf denen Prominin-1 ebenfalls angereichert ist (**Abb. 3E**).

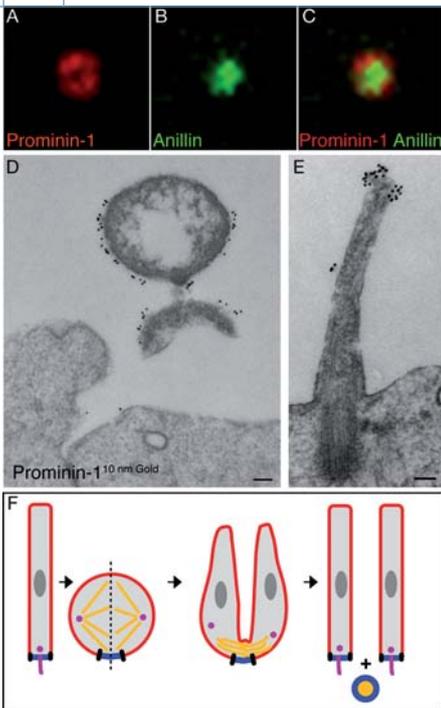
Was bedeutet die Freisetzung der *midbody*-Partikel und Cilien-Vesikel in die Ventrikelflüssigkeit für das Schicksal der Neuroepithelzellen? Zum einen wird durch die in jedem Zellzyklus einmal erfolgende Freisetzung des *midbody* die apikale Prominin-1-tragende Stammzellmembran-Mikrodomäne dieser Zellen sukzessive reduziert, was zu deren Wechsel von proliferativen zu neurogenen Zellteilungen beitragen dürfte. Zum anderen ist auch das primäre Cilium eng mit dem Zellzyklus assoziiert, da es nur während der Interphase (G1-S-G2) vorhanden ist und vor der M-Phase abgebaut wird (**Abb. 2** u. **3F**). Ohne diesen Abbau können sich die duplizierten Centrosomen nicht vom apikalen Plasmamembran-Kortex lösen, um auf eine gegenüberliegende Position am lateralen Zellkortex zu wandern und die Pole einer quer zur apiko-basalen Achse orientierten mitotischen Spindel aufzubauen, wie dies sowohl für symmetrisch proliferative (**Abb. 2 li.**) als auch asymmetrisch neurogene (**Abb. 2 re.**) Teilungen von Neuroepithelzellen der Fall ist. Eine interessante Möglichkeit ist deshalb, dass über die Freisetzung der Cilien-Vesikel in die Ventrikelflüssigkeit der Cilien-Abbau und damit die Geschwindigkeit des Zellzyklus (s. u.) und der Eintritt in die Mitose gesteuert werden.

Tis21, ein Marker für neurogene *progenitors*

Die bisher beschriebenen Untersuchungen über den Wechsel der Neuroepithelzellen von proliferativen zu neurogenen Teilungen basieren u. a. darauf, diese voneinander unterscheiden zu können. Der erste beschriebene pan-neurogene Marker, der im Modellorganismus Maus spezifisch in allen sich neurogen teilenden, nicht aber in sich proliferativ teilenden *progenitors* exprimiert wird, ist *Tis21*^[10]. Insbesondere eine transgene Mauslinie, die im Zellkern lokalisiertes GFP (grün fluoreszierendes Protein) unter der Kontrolle des *Tis21*-Promotors exprimiert, hat sich als wertvolles Werkzeug erwiesen, da hier die neuronale Determination der *progenitors* schon vor ihrer Teilung detektiert werden kann und sowohl asymmetrisch als auch symmetrisch neurogene Teilungen durch Analyse des Schicksals der Tochterzellen mithilfe von Zeitraffer-Videomikroskopie nachgewiesen werden können^[10] (**Abb. 2**).

Basale *progenitors*

Diese Zeitraffer-Videomikroskopie-Untersuchungen lieferten eine weitere Überraschung: Teilungen neurogener *progenitors* wurden



▲ **Abb. 3:** Midbody-Partikel und Cilien-Vesikel. **A–C,** Doppel-Immunofluoreszenz eines midbody-Partikels im Ventrikel-Lumen des Telencephalons eines E10.5-Mausembryos, gefärbt für das apikale Membranprotein Prominin-1 (Rot) und Anillin (Grün), ein mit dem kontraktiven Akto-Myosin-Ring assoziiertes Protein^[9]. **D, E,** Immun-Elektronenmikroskopie für Prominin-1 (10 nm Gold) eines midbody-Partikels im Ventrikel-Lumen (**D**) u. eines primären Ciliums an der apikalen Oberfläche einer Neuroepithelzelle (**E**) im Telencephalon eines E10.5-Mausembryos. **F,** Schematische Darstellung einer symmetrisch proliferativen Teilung einer Neuroepithelzelle mit Freisetzung eines midbody-Partikels (blau-gelber Ring). Farben u. Symbole wie in **Abb. 2**.

nämlich nicht nur – wie seit langem bekannt – an der apikalen Oberfläche des Neuroepithels beobachtet, sondern auch in seiner basalen Region, und dies interessanterweise insbesondere im Telencephalon^[10]. Während die apikalen Teilungen neurogener Neuroepithelzellen asymmetrisch waren (ein *progenitor* und ein Neuron als Tochterzellen)^[3, 10], waren die basalen Teilungen neurogener *progenitors* symmetrisch (zwei Neurone als Tochterzellen)^[10]. Basale *progenitors* entstehen aus apikalen Teilungen von Neuroepithelzellen,

teilen sich – zumindest im Mausembryo – nur noch einmal (in zwei Neurone), und verdoppeln so die Zahl der pro apikaler neurogener Teilung generierten Neurone. Basale *progenitors* sind insofern eine elegante Lösung der Evolution, um die räumlichen Voraussetzungen für eine Maximierung neurogener Zellteilungen zu schaffen, da diese nunmehr nicht nur apikal, sondern auch basal im Neuroepithel erfolgen^[10, 11].

Zellzykluslänge: Zeit als Ursache

In Anbetracht des Befunds^[10], dass Tis21 sowohl in sich apikal neurogen als auch sich basal neurogen teilenden *progenitors* exprimiert wird, aber eben nur in sich neurogen – und nicht proliferativ – teilenden *progenitors* (**Abb. 2**), stellt sich die Frage: was ist eigentlich die Funktion dieses Proteins? Tis21 wirkt antiproliferativ, indem es den Übergang von der G1- in die S-Phase hemmt. Tatsächlich haben sich neurogen teilende *progenitors* (**Abb. 2, Mi. u. re.**) eine längere G1-Phase als sich proliferativ teilende *progenitors* (**Abb. 2, li.**)^[12]. Diese G1-Verlängerung ist ursächlich am Wechsel der Neuroepithelzellen von Proliferation zu Neurogenese beteiligt^[13]. Die auf diesen Beobachtungen basierende *cell-cycle-length*-Hypothese postuliert, dass für diesen Wechsel im Zellschicksal die Wirkung eines (noch unbekannt) neurogenen Faktors einen Schwellenwert überschreiten muss und somit die Dauer seiner Wirkung kausale Funktion hat^[13]. Diese Hypothese impliziert, dass eine Beschleunigung des Zellzyklus die Differenzierung neuronaler Stammzellen verhindern sollte, was für die – bekanntermaßen schwierige – *in vitro*-Expansion dieser Zellen wesentlich sein könnte^[12].

Fazit und Ausblick

Während der vergangenen Jahre sind neuronale Stamm- und Vorläuferzellen immer mehr in den Fokus molekular-zellbiologischer Untersuchungen gerückt. Dies führt nicht nur zu einem zunehmend mechanistischen Verständnis der Entwicklung des Zentralnervensystems, sondern liefert auch Einsichten,

die für die Anwendung dieser Zellen in der Medizin relevant sind. Über all dem aber steht die Vision, die Evolution des faszinierendsten aller Organe zu verstehen, des menschlichen Gehirns. ■

Literatur

- [1] Götz, M., Huttner, W. B. (2005): The cell biology of neurogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 777–788.
- [2] Huttner, W. B., Kosodo, Y. (2005): Symmetric versus asymmetric cell division during neurogenesis in the developing vertebrate central nervous system. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17: 648–657.
- [3] Kosodo, Y., Roper, K., Haubensak, W., Marzesco, A. M., Corbeil, D., Huttner, W. B. (2004): Asymmetric distribution of the apical plasma membrane during neurogenic divisions of mammalian neuroepithelial cells. *EMBO J.* 23: 2314–2324.
- [4] Fish, J. L., Kosodo, Y., Enard, W., Paabo, S., Huttner, W. B. (2006): ASPM specifically maintains symmetric proliferative divisions of neuroepithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 10438–10443.
- [5] Bond, J., Roberts, E., Mochida, G. H., Hampshire, D. J., Scott, S., Ashkam, J. M., Springell, K., Mahadevan, M., Crow, Y. J., Markham, A. F., Walsh, C. A., Woods, C. G. (2002): ASPM is a major determinant of cerebral cortical size. *Nat. Genet.* 32: 316–320.
- [6] Fargeas, C. A., Fonseca, A.-V., Huttner, W. B., Corbeil, D. (2006): Prominin-1 (CD133): from progenitor cells to human diseases. *Future Lipidol.* 1: 213–225.
- [7] Röper, K., Corbeil, D., Huttner, W. B. (2000): Retention of prominin in microvilli reveals distinct cholesterol-based lipid microdomains in the apical plasma membrane. *Nature Cell Biol.* 2: 582–592.
- [8] Marzesco, A. M., Janich, P., Wilsch-Brauninger, M., Dubreuil, V., Langenfeld, K., Corbeil, D., Huttner, W. B. (2005): Release of extracellular membrane particles carrying the stem cell marker prominin-1 (CD133) from neural progenitors and other epithelial cells. *J. Cell Sci.* 118: 2849–2858.
- [9] Dubreuil, V., Marzesco, A. M., Corbeil, D., Huttner, W. B., Wilsch-Brauninger, M. (2007): Midbody and primary cilium of neural progenitors release extracellular membrane particles enriched in the stem cell marker prominin-1. *J. Cell Biol.* 176: 483–495.
- [10] Haubensak, W., Attardo, A., Denk, W., Huttner, W. B. (2004): Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: A major site of neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 3196–3201.
- [11] Kriegstein, A., Noctor, S., Martinez-Cerdeno, V. (2006): Patterns of neural stem and progenitor cell division may underlie evolutionary cortical expansion. *Nat. Rev. Neurosci.* 7: 883–890.
- [12] Calegari, F., Haubensak, W., Haffner, C., Huttner, W. B. (2005): Selective lengthening of the cell cycle in the neurogenic subpopulation of neural progenitor cells during mouse brain development. *J. Neurosci.* 25: 6533–6538.
- [13] Calegari, F., Huttner, W. B. (2003): An inhibition of cyclin-dependent kinases that lengthens, but does not arrest, neuroepithelial cell cycle induces premature neurogenesis. *J. Cell Sci.* 116: 4947–4955.

Korrespondenzadresse:

Dr. Michaela Wilsch-Bräuninger
Prof. Dr. Wieland B. Huttner
MPI für Molekulare Zellbiologie u. Genetik
Pfotenhauerstraße 108
D-01307 Dresden
Tel.: 0351-210-1500, Fax: 0351-210-1600
huttner@mpi-cbg.de, wilsch@mpi-cbg.de
www.mpi-cbg.de

AUTOREN



Michaela Wilsch-Bräuninger

Jahrgang 1967. 1986–1993 Biologiestudium an den Universitäten Tübingen und Sussex. 1993–1997 Promotion bei Christiane Nüsslein-Vollhard am MPI für Entwicklungsbiologie, Tübingen. 1998–2000 Postdoc an den Instituten für Zoologie und Anatomie, TU Dresden. 2001–2005 Leiterin der EM Facility. Seit 2005 Staff Scientist, MPI für Molekulare Zellbiologie und Genetik, Dresden.



Wieland B. Huttner

Jahrgang 1950. 1969–1975 Medizinstudium an den Universitäten Hamburg und Oxford. 1976 Approbation als Arzt. 1972–1976 Promotion am Institut für Physiol. Chemie, Universität Hamburg. 1976–1977 Postdoc am MPI für experimentelle Medizin, Göttingen, 1977–1980 Postdoc bei Paul Greengard, Yale University School of Medicine. 1981–1985 Nachwuchsgruppenleiter am MPI für Psychiatrie, Martinsried. 1985–1990 Gruppenleiter am EMBL, Heidelberg, 1991–2000 Prof. für Neurobiologie, Universität Heidelberg. Seit 1998 Direktor am MPI für Molekulare Zellbiologie und Genetik, Dresden.