

Diss. ETH Nr. 9925

Targeted Disruption of the Cell Recognition Molecule P₀ Gene in Mice

ABHANDLUNG

Zur Erlangung des Titels

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

der

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZÜRICH

vorgelegt von

Karl Peter Giese

Dipl. Chemiker, Ruhr-Universität Bochum (BRD)

geboren am 12.03.1964

von Lippstadt (BRD)

Angenommen auf Antrag von:

Prof. Dr. M. Schachner, Referent

Prof. Dr. M. Aguet, Korreferent

1992

1. KURZFASSUNG

Die Myelinisierung ist ein entwicklungsbiologischer Prozeß im Nervensystem, der recht gut auf der molekularen Ebene untersucht worden ist. Zellerkennungsmoleküle sowie die von myelinbildenden Zellen ausschließlich exprimierte Myelinproteine scheinen an der Myelinisierung beteiligt zu sein. Aus den Analysen von spontan auftretenden Mutanten, in denen einzelne Myelinproteingene mutiert sind, konnten wichtige Erkenntnisse über die Bedeutung dieser Myelinproteine für die Myelinisierung gewonnen werden. P₀ ist sowohl ein Zellerkennungsmolekül, als auch ein Myelinprotein des peripheren Nervensystems (PNS). Aufgrund seiner Struktur, der Expression während der Entwicklung, und Funktionsanalysen *in vitro* wurde vermutet, daß P₀ für die Spiralisierung der Schwann'schen Zellfortsätze sowie für die Ausbildung der "major dense lines" und "intra-period lines" während der Myelinisierung zuständig ist.

Da keine Mausmutanten mit einem affektierten P₀ Gen bekannt waren, wurden P₀ Mausnullmutanten erzeugt. Embryonale Stammzellen wurden mit einem Substitutionsvektor transfiziert, welcher aus dem klonierten P₀ Gen mit einer Insertion zwischen dem dritten und vierten Kodon bestand. Als Insertionselement diente eine Neomycin Phosphotransferase-genexpressionkassette. Ein Zellklon mit einem substituierten P₀ Allel wurde mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion und anschließender Southern Blot Analyse identifiziert. Zellen dieses Zellklons wurden in Blastocysten injiziert, welche danach in scheinträchtige Mäuse implantiert wurden. Unter den entstandenen chimären Mäusen befand sich ein Männchen, das die Mutation des P₀ Gens vererben konnte. Die heterozygoten Mutanten exprimierten das P₀ Protein zu nur ca. 50% gemäß einer Western Blot Analyse, zeigten aber keine offensichtlichen Aberrationen im Verhalten und auf der morphologischen Ebene. Homozygote Mutanten exprimierten kein P₀ Protein gemäß Western Blot Analysen und zeigten zu Beginn der vierten postnatalen Woche ein aberrantes Verhalten, welches ähnlich zu dem von Mutanten war, die im PNS eine Hypomyelinisierung aufweisen. Zu diesem Zeitpunkt besaßen die Mutanten einen leichten Tremor und die Bewegungen der Hinterbeine waren unkoordiniert. Dieses aberrante Verhalten wurde mit fortschreitendem Alter der Mäuse ausgeprägter und zusätzlich bekamen einige Mutanten Konvulsionen. Eine Paralyse wurde jedoch nicht beobachtet. Die Mutanten überlebten bis zum siebten Lebensmonat, dem längsten beobachteten Zeitpunkt. Die Morphologie

der adulten peripheren Nerven wurde auf ultrastruktureller Basis untersucht. Einige Axon-Schwann Zelleinheiten befanden sich auf der Stufe des 1:1 Verhältnisses. Hingegen bildeten die meisten der Axon-Schwann Zelleinheiten myelinähnliche Strukturen aus, welche an einigen Stellen "major dense lines" aufwiesen. Diese Strukturen bestanden aus nur wenigen Myelinschleifen. Weiterhin wurden einige Axon-Schwann Zelleinheiten beobachtet, die teilweise kompaktes Myelin mit einer normalen Periodizität aufwiesen. Zusätzlich degenerierten einige Schwann'sche Zellen und Axone. Generell waren die "intraproduct lines" häufiger abnormal als die "major dense lines". Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den vermuteten Funktionen von P₀ und zeigen zusätzlich, daß es neben P₀ weitere Moleküle gibt, die "intraproduct lines" im PNS ausbilden können, und daß die Anwesenheit von P₀ für die Integrität der Schwann'schen Zellen wichtig ist. Letztendlich ergaben immunocytochemische Analysen mit adulten P₀ Nullmutanten, daß Moleküle die an der Myelinisierung im PNS beteiligt zu sein scheinen, entweder verstärkt (MAG, PLP), normal (L1), oder vermindert im PNS exprimiert werden (MBP). Dies läßt vermuten, daß Bindungsereignisse, in die P₀ involviert ist, Signale vermitteln, die die Expression dieser Moleküle beeinflussen. Wegen der veränderten Molekülexpression kann man deshalb nicht mit Sicherheit sagen, ob der beobachtete Phänotyp auf den Verlust von P₀ oder auf die dadurch bedingten Veränderungen in der Expression anderer Moleküle zurückzuführen ist. Die P₀ Nullmutanten repräsentieren jedoch ein einzigartiges Modell, um die Abhängigkeiten der Regulation der Molekülexpression während der peripheren Myelinisierung zu studieren.

2. SUMMARY

Myelination is a developmental biological process in the nervous system which is quite well characterized at the molecular level. Cell recognition molecules and myelin proteins being exclusively expressed by myelin-forming cells appear to be involved in myelination. The analyses of spontaneously arising mutants having one mutated gene encoding a myelin protein yielded important insights into the role of myelin proteins for myelination. P₀ is a cell recognition molecule as well a myelin protein of the peripheral nervous system (PNS). According to its structure, expression during development, and function *in vitro* it has been suggested that P₀ is involved in spiralling of Schwann cell processes and in formation of major dense and intraperiod lines during myelination.

Since no mouse mutant having an affected P₀ gene is known, P₀ null mutant mice were generated. Embryonic stem cells were transfected with a replacement vector, which consisted of the cloned P₀ gene having an insertion between the third and fourth codon. As insertion element served a neomycin phosphotransferase gene expression cassette. A cell clone containing a replaced P₀ allele was identified by the polymerase chain reaction and following Southern blot analysis. Cells of this cell clone were injected into blastocysts which thereafter were implanted into pseudo-pregnant foster mothers. One male of the resulting chimaeric mice transmitted the mutation of the P₀ gene to offspring. Heterozygous mutants expressed approximately 50% of the normal level of the P₀ protein according to a Western blot analysis, but showed no overt abnormal phenotype in behaviour and in morphology. Homozygous mutants expressed no P₀ protein according to Western blot analyses, and showed at the beginning of the fourth postnatal week aberrant behaviour, which was similar to that of mutants having hypomyelination in the PNS. At this time point, the mutants had a slight tremor and the movements of hindlimbs were uncoordinated. This aberrant behaviour became more pronounced with age, and additionally some mutants got convulsions. However, paralysis was not observed. The mutants survive seven months, the longest analyzed time span. The morphology of the peripheral nerves was examined at the ultrastructural level. Some axon-Schwann cell units were at the stage of the 1:1 relationship. In contrast, most axon-Schwann cell units formed myelin-like figures, which contained at some sites major dense lines. These structures consisted of only a few lamellae. Furthermore, some axon-Schwann cell units were observed containing partially compact myelin with a normal periodicity. Additionally, some Schwann cells

and axons degenerated. In general, the intraperiod lines were more frequently abnormal than the major dense lines. These observations are consistent with the suggested functions of P₀ and show additionally, that in addition to P₀ further molecules can form intraperiod lines in the PNS, and that the presence of P₀ is necessary for the integrity of Schwann cells. Finally, immunocytochemical analyses in adult P₀ null mutant mice showed, that molecules suspected to be involved in myelination in the PNS are either present at a higher (MAG, PLP), normal (L1), or lower level (MBP) in the PNS. Therefore it is suggested that binding events involving P₀ mediate signals which influence the expression of these molecules. Because of the dysregulation of these molecules, the observed phenotype cannot be assigned directly to the lack of P₀. However, the P₀ null mutants represent a unique model for studying dependencies of the regulation of the expression of molecules during peripheral myelination.