

Hermann Rohrer

Forschungsgruppenleiter Entwicklungsneurobiologie
Max-Planck-Institut für Hirnforschung, Frankfurt/M

Molekulare Kontrolle der Entwicklung des autonomen Nervensystems



Molekulare Kontrolle der Entwicklung des autonomen Nervensystems

Hermann Rohrer

Forschungsgruppenleiter (FG Entwicklungsneurobiologie)

Max-Planck-Institut für Hirnforschung

Frankfurt/M

Zusammenfassung

Die Entwicklung des Nervensystems erfordert Mechanismen, welche die Differenzierung unterschiedlicher Nervenzellen steuern. Im autonomen Nervensystem wird die Entstehung von Nervenzellen durch eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren kontrolliert, die durch Differenzierungsfaktoren aus der BMP-Familie induziert werden. Die unterschiedliche Entwicklung sympathischer und parasympathischer Neuronen beruht auf der selektiven Expression des Transkriptionsfaktors Hand2 in sympathischen Vorläuferzellen. In einer späteren Entwicklungsphase entstehen innerhalb der sympathischen und parasympathischen Ganglien funktionell unterschiedliche Nervenzellen. Diese funktionelle Spezialisierung wird durch Signale aus den innervierten Zielorganen bestimmt. Faktoren der gp130-Zytokinfamilie sind in vivo für die zielorganabhängige Differenzierung cholinergischer sympathischer Neuronen verantwortlich.

Molekulare Kontrolle der Spezifizierung autonomer Nervenzellen

Die initiale Entstehung autonomer Nervenzellen wird durch Differenzierungsfaktoren (BMPs) ausgelöst, die in unmittelbarer Nachbarschaft sympathischer und parasympathischer Ganglienanlagen produziert werden (Müller and Rohrer, 2002; Schneider et al., 1999). BMPs induzieren in den Vorläuferzellen die Expression der Transkriptionsfaktoren Ascl1 und Phox2a/b, welche einerseits den generellen neuronalen Differenzierungsprozess steuern (Abb. 1), andererseits die initiale noradrenerge Differenzierung auslösen (Goridis and Rohrer, 2002; Rohrer, 2003). Essentiell für die Produktion des noradrenergen Transmitters (Überträgerstoff)

Noradrenalin sind die Enzyme Tyrosinhydroxylase (TH) und Dopamin- β -Hydroxylase (DBH). Die Expression von TH und DBH wird zunächst sowohl in parasympathischen als auch in sympathischen Neuronen initiiert, im weiteren Verlauf der Entwicklung aber nur in sympathischen, nicht in parasympathischen Neuronen weiter exprimiert (Abb. 1). Die noradrenerge Differenzierung sympathischer Neuronen korreliert mit der selektiven Expression der Transkriptionsfaktoren Hand2 und Gata3 (Lucas et al., 2006; Müller and Rohrer, 2002; Tsarovina et al., 2004).

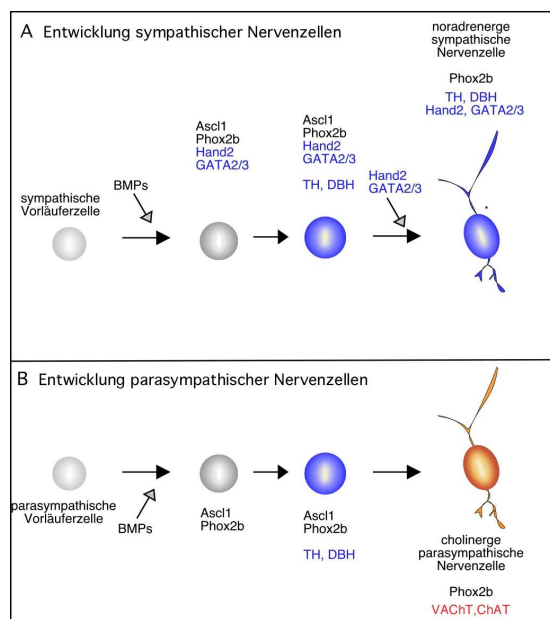


Abb. 1: Schematische Darstellung der Entstehung sympathischer (A) und parasympathischer (B) Nervenzellen aus Vorläuferzellen in der Neuralleiste. Unter dem Einfluss von extrazellulären Differenzierungsfaktoren (BMPs) wird die Produktion von Transkriptionsfaktoren ausgelöst (Ascl1, Phox2b, Hand2, Gata2/3). Hand2 und Gata2/3 werden selektiv in sympathischen Neuronen exprimiert. Hand2 ist für die Aufrechterhaltung der Expression von TH und DBH verantwortlich, die spezifisch für noradrenerge Zellen sind. Parasympathische Neuronen exprimieren die cholinergen Markergene ChAT und VAcHT und zeigen nur eine transiente TH- und DBH-Expression.

Die Regulation der Expression ist für das DBH-Gen detailliert untersucht worden, wobei eine direkte Transkriptions-Stimulierung durch Phox2a/b und Hand2 nachgewiesen wurde. Weil eine Eliminierung des Transkriptionsfaktors Hand2 zu

einem Verlust noradrenerger, nicht jedoch pan-neuronaler Eigenschaften führt (Hendershot et al., 2008; Lucas et al., 2006; Morikawa et al., 2007), und zudem die Hand2-Überexpression in sympathischen und parasymphatischen Neuronen eine Stimulierung bzw. Induktion noradrenerger Differenzierung bewirkt (Howard et al., 2000; Müller and Rohrer, 2002), kann gefolgert werden, dass Hand2 selektiv in der Kontrolle noradrenerger Entwicklung involviert ist.

Der Transkriptionsfaktor Hand2 ist für den Funktionserhalt differenzierter sympathischer Neuronen erforderlich

Da Hand2 nicht nur während der Entwicklung sondern auch in differenzierten, postmitotischen Nervenzellen nachzuweisen ist, stellte sich die Frage, ob Hand2 für den Funktionserhalt im murenen Nervensystem benötigt wird. Diese Frage wurde zunächst in vivo untersucht, indem das Hand2-Gen in bereits noradrenerg differenzierten, DBH-exprimierenden Neuronen eliminiert wurde (in Hand2^{Fl/fl;DBH-Cre} Mäusen (Schmidt et al., 2008).

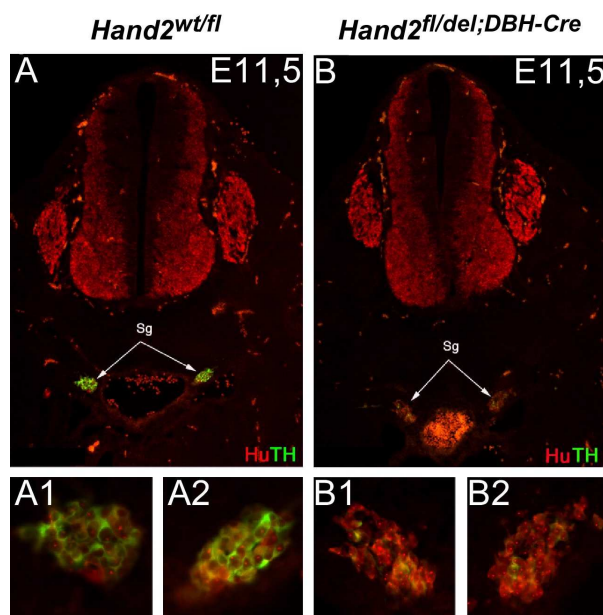


Abb. 2: Die Eliminierung von Hand2 in DBH-exprimierenden sympathischer Neuronen führt zu einer selektiven Reduzierung der TH-Expression. In Gewebenschnitte von E11.5 Mausembryonen wurde der neuronale Marker Hu (rot) und der noradrenerge Marker TH (grün) durch Antikörperfärbung nachgewiesen. In Kontrollembryonen wird TH und Hu ko-exprimiert (A, A1, A2), während im Hand2 knockout fast keine TH-Färbung nachzuweisen ist (B, B1, B2). (A1-B2) Ausschnittvergrößerung von (A,B).

Die starke Reduzierung der TH-Expression bei sehr geringen Effekten auf die Expression des pan-neuronalen Marker Gens Hu unterstützt die Vorstellung, dass Hand2 für den Erhalt der Th und DBH Expression benötigt wird (Abb. 2).

Allerdings ist diese Aussage, aufgrund der relativ frühen Expression von DBH in der Entwicklung sympathischer Neuronen, auf unreife sympathische Neuronen beschränkt. In einem zweiten Ansatz wurden deshalb Kulturen differenzierter, postmitotischer Neuronen eingesetzt und die Hand2 Expression durch siRNA reduziert (Schmidt et al., 2008). Hand2 siRNA führte zu einer stark verringerten DBH- (Abb. 3) und TH-Expression, während die pan-neuronalen Marker TuJ1, HuD und SCG10 (nicht gezeigt) durch die Reduzierung der Hand2-Expression nicht betroffen waren. Interessanterweise wird durch Hand2 die Expression cholinergischer Markergene in noradrenergen sympathischer Neuronen inhibiert.

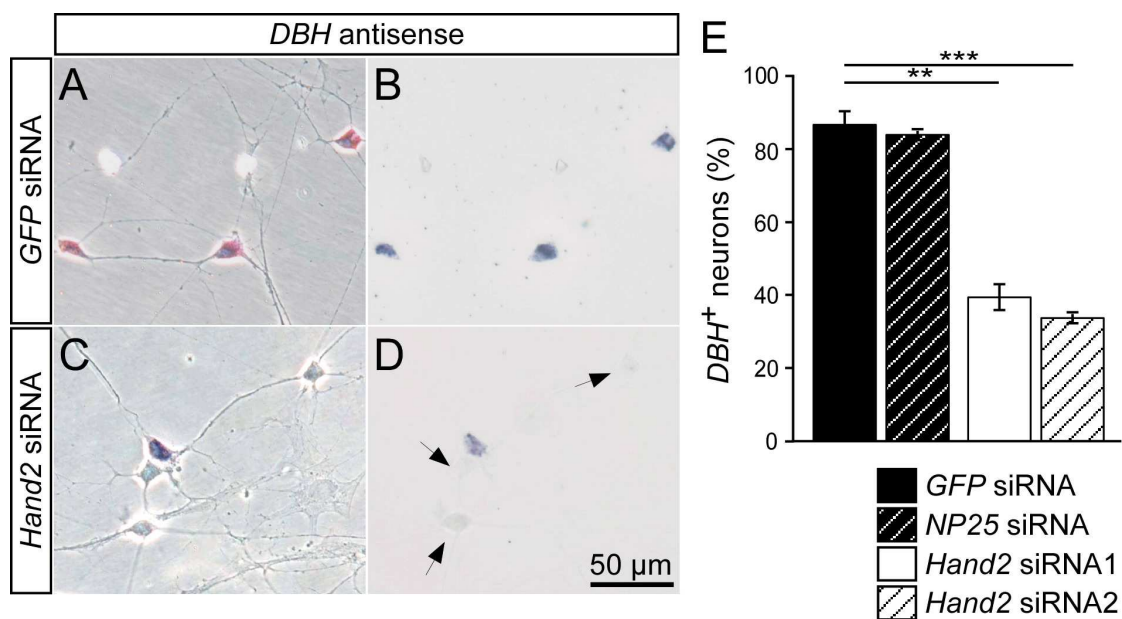


Abb. 3 Die Expression von DBH in sympathischen Neuronen wird durch siRNA-medierten Hand2 knockdown reduziert. Neuronen, die mit Hand2 siRNA transfiziert wurden, weisen reduzierte DBH-Expression auf, die in >60% der Zellen unterhalb der Nachweisgrenze durch in situ-Hybridisierung liegt. (A-D) Nachweis der DBH mRNA in Kontrolltransfektionen (A,B) und Hand2 knockdown (C,D) durch in situ Hybridisierung. (E) Die Quantifizierung zeigt eine Reduzierung des Anteils DBH⁺-Neuronen durch Hand2 siRNA auf ca 40% der Kontrolle (GFP siRNA, NP25 siRNA)..

Diese Ergebnisse zeigen somit, dass Hand2 nicht nur die initiale noradrenerge Differenzierung steuert, sondern auch eine essentielle Rolle für den Funktionserhalt

maturer noradrenerger sympathischer Neuronen ausübt, indem TH und DBH Expression stimuliert und die Expression cholinergener Gene antagonisiert wird.

Signale aus Zielorganen bestimmen die Identität sympathischer Nervenzellen

Innerhalb der sympathischen und parasympathischen Ganglien können funktionelle neuronale Subtypen aufgrund ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften, ihrer Zielorgane (z.B. Herz, Lunge, Blutgefäße, exocrine Drüsen, Knochen und Verdauungstrakt) und durch die Expression von Neurotransmittern bzw. Neuropeptiden unterschieden werden. Die Entstehung funktionell verschiedener sympathischer Nervenzellen lässt sich in zwei Phasen einteilen: eine frühe Phase, in der noradrenerge sympathische Neuronen entstehen (Abb. 1), und in eine späte Phase, in der die Spezialisierung der Nervenzellen durch Signale aus den innervierten Zielgebieten gesteuert wird (Abb. 4N). In beiden Phasen spielen extrazelluläre Signale eine entscheidende Rolle. Während die initiale Differenzierung durch die BMPs ausgelöst wird, ist die Identität der Faktoren welche die späten Spezialisierungen bewirken weitgehend ungeklärt.

Die bislang am besten charakterisierte funktionelle Subpopulation besteht aus cholinergen sympathischen Nervenzellen, welche die Schweißdrüsen und die Knochenhaut innervieren (Ernsberger and Rohrer, 1999; Francis and Landis, 1999). Durch die selektive Eliminierung des gp130 Signalwegs in sympathischen Neuronen konnte die physiologische Relevanz der gp130-Zytokine für die cholinerge Differenzierung in vivo bewiesen werden (Stanke et al., 2006) (Fig. 4).

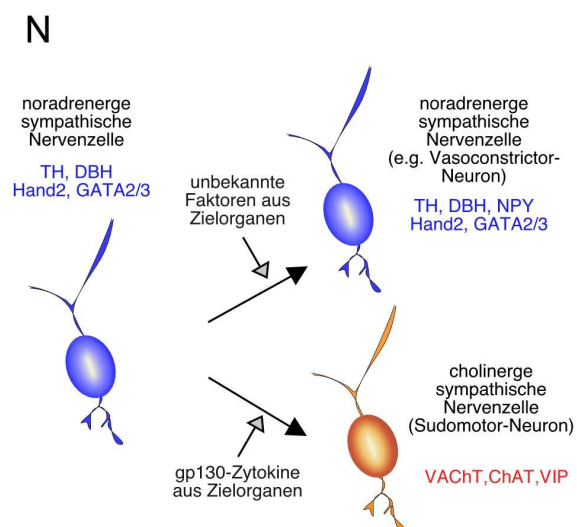
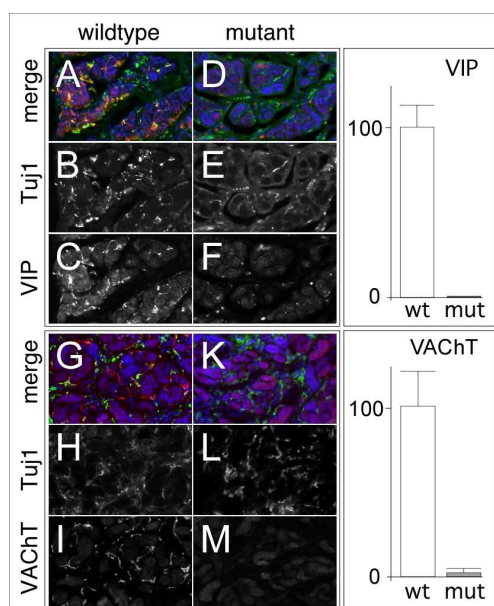


Abb. 4: Die Innervation der Schweißdrüsen in gp130-defizienten Mäusen weist keine cholinergen Eigenschaften auf. In Gewebeschnitten aus der Haut von Kontrolltieren und von gp130^{-/-} Tieren (gp130^{DBHCre}) wurde die Expression des pan-neuronalen Markers Tuj1 (β -III-Tubulin), des Neuropeptids VIP und des cholinergen Markers VACht immunhistologisch nachgewiesen. Die Expression von VIP und VACht fehlt fast vollständig in der Schweißdrüseninnervation von gp130^{-/-} Tieren (Einzelfärbung: F und M; quantitative Analyse in den Balkendiagrammen). Dagegen ist die Innervation, nachgewiesen durch TuJ1, in gp130^{-/-} Tieren nicht betroffen (B, E, H, L). In Bild A, D, G und K sind die Färbungen für Tuj1 (grün) und VIP bzw. VACht (rot) überlagert. Die Zellkerne sind blau angefärbt. In (N) ist schematisch gezeigt, dass die Spezifizierung funktioneller Subtypen sympathischer Neuronen durch Faktoren aus dem Zielgebiet festgelegt wird (Bild A-M aus Stanke et al., 2006).

Nachdem durch diese Arbeiten das Prinzip bestätigt wurde, dass Zielorgane für die Spezialisierung von Nervenzellen essentiell sind, können Faktoren in anderen Zielorganen, wie z.B. Blutgefäßen, identifiziert werden, welche die Differenzierung der innervierenden Neuronen steuern.

Literaturhinweise

Ernsberger, U. and Rohrer, H. (1999). Development of the cholinergic neurotransmitter phenotype in postganglionic sympathetic neurons. *Cell Tissue Res.* **297**, 339-361.

Francis, N. J. and Landis, S. C. (1999). Cellular and molecular determinants of sympathetic neuron development. *Ann.Rev.Neurosci.* **22**, 541-566.

Goridis, C. and Rohrer, H. (2002). Specification of catecholaminergic and serotonergic neurons. *Nat.Rev.Neurosci.* **3**, 531-541.

Hendershot, T. J., Liu, H., Clouthier, D. E., Shepherd, I. T., Coppola, E., Studer, M., Firulli, A. B., Pittman, D. L. and Howard, M. J. (2008). Conditional deletion of Hand2 reveals critical functions in neurogenesis and cell type-specific gene expression for development of neural crest-derived noradrenergic sympathetic ganglion neurons. *Dev Biol* **319**, 179-91.

Howard, M. J., Stanke, M., Schneider, C., Wu, X. and Rohrer, H. (2000). The transcription factor dHAND is a downstream effector of BMPs in sympathetic neuron specification. *Development* **127**, 4073-4081.

Lucas, M. E., Müller, F., Rüdiger, R., Henion, P. D. and Rohrer, H. (2006). The bHLH transcription factor hand2 is essential for noradrenergic differentiation of sympathetic neurons. *Development* **133**, 4015-4024.

Morikawa, Y., D'Autreaux, F., Gershon, M. D. and Cserjesi, P. (2007). Hand2 determines the noradrenergic phenotype in the mouse sympathetic nervous system. *Dev Biol* **307**, 114-26.

Müller, F. and Rohrer, H. (2002). Molecular control of ciliary neuron development: BMPs and downstream transcriptional control in the parasympathetic lineage. *Development* **129**, 5707-5717.

Rohrer, H. (2003). The role of bone morphogenetic proteins in sympathetic neuron development. *Drug News Perspect* **16**, 589-596.

Schmidt, M., Lin, S., Pape, M., Ernsberger, U., Stanke, M., Kobayashi, K., Howard, M. J. and Rohrer, H. (2008). The bHLH transcription factor Hand2 is essential for the maintenance of noradrenergic properties in differentiated sympathetic neurons. *Dev. Biol.* **under revision**.

Schneider, C., Wicht, H., Enderich, J., Wegner, M. and Rohrer, H. (1999). Bone morphogenetic proteins are required in vivo for the generation of sympathetic neurons. *Neuron* **24**, 861-870.

Stanke, M., Duong, C. V., Pape, M., Geissen, M., Burbach, G., Deller, T., Gascan, H., Otto, C., Parlato, R., Schütz, G. et al. (2006). Target-dependent specification of the neurotransmitter phenotype: cholinergic differentiation of sympathetic neurons is mediated in vivo by gp130 signaling. *Development* **133**, 141-150.

Tsarovina, K., Pattyn, A., Stubbusch, J., Müller, F., Van der Wees, J., Schneider, C., Brunet, J. F. and Rohrer, H. (2004). Essential role of Gata transcription factors in sympathetic neuron development. *Development* **131**, 4775-4786.