

Axonale Wegfindung im ventralen Nervenstrang von *C. elegans*

Hutter, Harald

Max-Planck-Institut für medizinische Forschung

Selbständige Nachwuchsgruppe - Entwicklungsgenetik des Nervensystems

Forschungsgebiet: Entwicklungs- und Evolutionsbiologie/Genetik

Korrespondierender Autor: Hutter, Harald

E-Mail: hutter@mpimf-heidelberg.mpg.de

Zusammenfassung

Das Gehirn besteht aus einer großen Zahl von Nervenzellen, die auf ganz bestimmte Weise miteinander zu neuronalen Netzwerken verschaltet sind. Wir untersuchen, wie diese neuronalen Netzwerke im Verlauf der Embryonalentwicklung entstehen. Uns beschäftigt dabei insbesondere die Frage, wie auswachsende Nervenfortsätze (Axone) es schaffen, präzise ihr Zielgebiet anzusteuern, wo sie synaptische Kontakte mit ihren Zielzellen ausbilden. Wir benutzen den Nematoden *Caenorhabditis elegans*, um die Gene zu identifizieren und zu studieren, die das gerichtete Auswachsen von Axonen steuern. In genetischen Screens konnten wir mehrere neue Transkriptionsfaktoren identifizieren, die Aspekte der terminalen Differenzierung von Neuronen kontrollieren, wie z. B. die Expression zelltypspezifischer Marker oder das gerichtete Auswachsen der Nervenfortsätze. Axone wachsen in einer bestimmten Reihenfolge aus, die ersten auswachsenden Axone (Pioniere) haben eine besondere Bedeutung für die Navigation nachfolgender Axone. Mit Mikromanipulationsexperimenten untersuchen wir detailliert Abhängigkeiten zwischen früh und spät auswachsenden Axonen. Es stellte sich heraus, dass der Pionier zwar wichtig, aber nicht unersetzbar für später auswachsende Axone ist. Dies zeigt, dass der Pionier keine einzigartigen Fähigkeiten zur Navigation hat. Er ist jedoch dafür notwendig, dass alle Axone richtig auswachsen und bietet offenbar eine zusätzliche Informationsquelle, die sicherstellt, dass alle neuronalen Verbindungen reproduzierbar und korrekt gebildet werden. Zwischen früh und spät auswachsenden Axonen gibt es Abhängigkeiten, in der Regel aber keine strikten Pionier-Nachfolger-Beziehungen, wo nachfolgende Axone bedingungslos früher auswachsenden folgen. Sogar verschiedene Axone, die im selben Axonbündel auswachsen, benutzen unterschiedliche Kombinationen von Signalen für ihre Navigation. Diese Ergebnisse sind eine wichtige Grundlage für die Interpretation axonaler Defekte, wie sie in Mutanten zu finden sind, und liefern grundlegende Erkenntnisse in bezug auf die 'Logik' der Navigation von Axonen.

Abstract

*The brain consists of a large number of neurons, which are connected in specific ways to form neuronal circuits. We are studying how these neuronal circuits are generated during embryonic development. In particular we address the question of how outgrowing neuronal processes (axons) manage to navigate precisely towards their target areas. We are using the nematode *Caenorhabditis elegans* with its simple and invariant anatomy to identify and analyse the genes required for correct axon outgrowth. In genetic screens for mutants with axon outgrowth defects we identified several novel transcription factors, which control certain aspects of neuronal differentiation like expression of celltype specific markers and the specific pattern of axonal outgrowth. Axons grow out sequentially during development and the first axons to grow out - the pioneers - are thought to play a special role in guiding follower axons. With micromanipulation experiments we are dissecting systematically dependencies between early and late*

outgrowing axons. The pioneer was found to be important but not absolutely essential for the outgrowth of follower axons, suggesting that pioneers do not have unique pathfinding abilities. However, they provide one additional source of information which ensures that every follower axon navigates correctly, so that neuronal connections are made reproducibly in the same way in every animal. Subtle dependencies between early and late outgrowing axons exist, but strict pioneer-follower relationships are rare. Apparently even axons extending in the same axon bundle use different combinations of signals for their navigation. These results provide a conceptual framework for the interpretation of axon outgrowth defects found in mutants and provide general insights into the 'logic' of axon outgrowth.

Einführung

Das Gehirn ist eines der faszinierendsten Organe, das die Natur hervorgebracht hat. Es besteht aus einer großen Zahl von spezialisierten Nervenzellen (Neuronen), die auf ganz bestimmte Weise zu neuronalen Schaltkreisen verknüpft sind. Die meisten dieser neuronalen Verbindungen entstehen während der Embryonalentwicklung, wenn Nervenzellen Fortsätze (Axone und Dendriten) aussenden, die oft über lange Strecken in ihre Zielgebiete wachsen, wo sie mit bestimmten Zielzellen - anderen Neuronen oder nicht-neuronalen Zellen wie Muskelzellen - synaptische Verbindungen herstellen. Wir untersuchen die molekularen Grundlagen der axonalen Wegfindung im Nematoden *Caenorhabditis elegans*, der eine vergleichsweise kleine Zahl von Nervenzellen hat, die in jedem Tier reproduzierbar auf gleiche Weise auswachsen.

Wir verfolgen verschiedene Ansätze, um zum einen die ‚Logik‘ dieses Navigationsprozesses zu verstehen und andererseits die Gene, die diesen Prozess steuern, zu identifizieren und zu charakterisieren. Die molekularen Mechanismen sind sehr wahrscheinlich evolutionär konserviert, sodass unsere Arbeit vermutlich zu einem allgemeinen molekularen Verständnis dieses Aspekts der Gehirnentwicklung beitragen wird.

Das Nervensystem in *C. elegans*

Das Nervensystem eines erwachsenen *C. elegans*-Tieres besteht aus genau 302 Nervenzellen. Die Axone dieser Nervenzellen sind in der Regel unverzweigt und wachsen in jedem Tier auf gleiche Weise aus, sodass das fertig gebildete Nervensystem vergleichsweise übersichtlich und in jedem Tier gleich aussieht. John White und seine Kollegen haben das gesamte Nervensystem mithilfe von elektronenmikroskopischen Schnitten im Detail rekonstruiert, sodass wir den genauen Verlauf jedes einzelnen Axons kennen [1]. Inzwischen ist es möglich, Nervenzellen und ihre Axone durch die Expression von Reporterproteinen wie z. B. des ‚Green Fluorescent Proteins‘ (GFP) im lebenden Tier sichtbar zu machen, was die Analyse des Nervensystems wesentlich vereinfacht (**Abb. 1**). Durch die Kombination verschiedenfarbiger Reporterproteine können verschiedene Klassen von Nervenzellen im selben Tier unterschiedlich markiert werden, sodass Abhängigkeiten und Beziehungen zwischen Neuronen untersucht werden können.

Unsere Arbeiten konzentrieren sich im Moment auf die Navigation von Axonen zum und innerhalb des ventralen Nervenstranges von *C. elegans*. Dieser Strang durchzieht das gesamte Tier und besteht aus zwei Teilsträngen, die rechts und links der ventralen Mittellinie liegen. Der Ventralstrang enthält Axone von Interneuronen und Motorneuronen, die das Bewegungsverhalten des Tieres steuern.

Interneuronaxone wachsen hauptsächlich aus dem Gehirn in den Ventralstrang ein, wo fast alle im rechten Teilstrang weiterwachsen (Abb. 1B). Motorneuronenzellkörper liegen entlang der ventralen Mittellinie. Deren Axone wachsen ebenfalls in den rechten Teilstrang ein, sodass am Ende die beiden Teilstränge

eine sehr unterschiedliche Zahl von Axonen enthalten - etwa 55 im rechten und nur 4 im linken Strang. Die Axone, aus denen der Ventralstrang besteht, wachsen nacheinander in einer genau festgelegten Reihenfolge aus [2]. Als erstes wächst das AVG-Axon auf der rechten Seite des Ventralstranges aus. Daran anschließend wachsen inhibitorische Motorneurone (D-Typ) aus, danach die PVP- und PVQ-Interneurone sowie zuletzt - praktisch gleichzeitig - die Axone der Interneurone des Motorschaltkreises sowie die der exzitatorischen Motorneurone (**Abb. 2**). Diese Beobachtung wirft die Frage auf, inwieweit später auswachsende Axone von der Anwesenheit der früher ausgewachsenen abhängen, inwieweit also zwischen den Axonen Pionier-Nachfolger-Beziehungen bestehen.

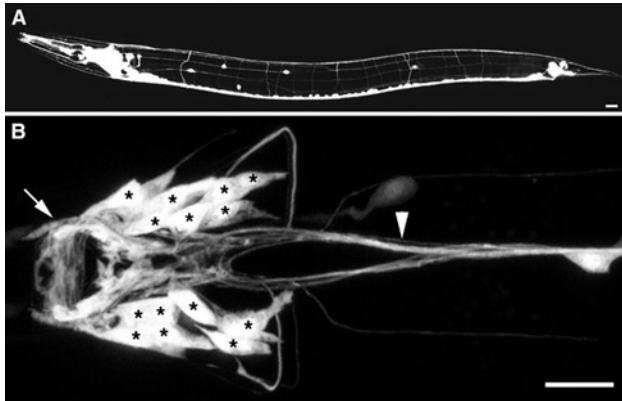


Abb. 1: *C. elegans*-Nervensystem: **A)** Gesamtansicht eines Tieres (Seitenansicht, Kopf liegt links), gesamtes Nervensystem mit GFP angefärbt. Nervenzellkörper (helle Bereiche) liegen vor allem im Kopf, entlang der Ventralseite, in Schwanzganglien sowie vereinzelt seitlich im Tier. Nervenstränge durchziehen das Tier ventral, an verschiedenen Positionen lateral sowie dorsal. **B)** Kopfbereich eines Tieres (Bauchansicht), in dem die Interneurone des Motorschaltkreises mit GFP markiert sind. Axone wachsen von den Zellkörpern (*) zunächst in den Nervenring (Pfeil), um dann auf der Bauchseite in den Ventralstrang einzuwachsen. Am Beginn des Ventralstranges (Dreieck), wechseln alle Axone auf die rechte Seite und wachsen eng gebündelt zusammen weiter. Balken: 10µm

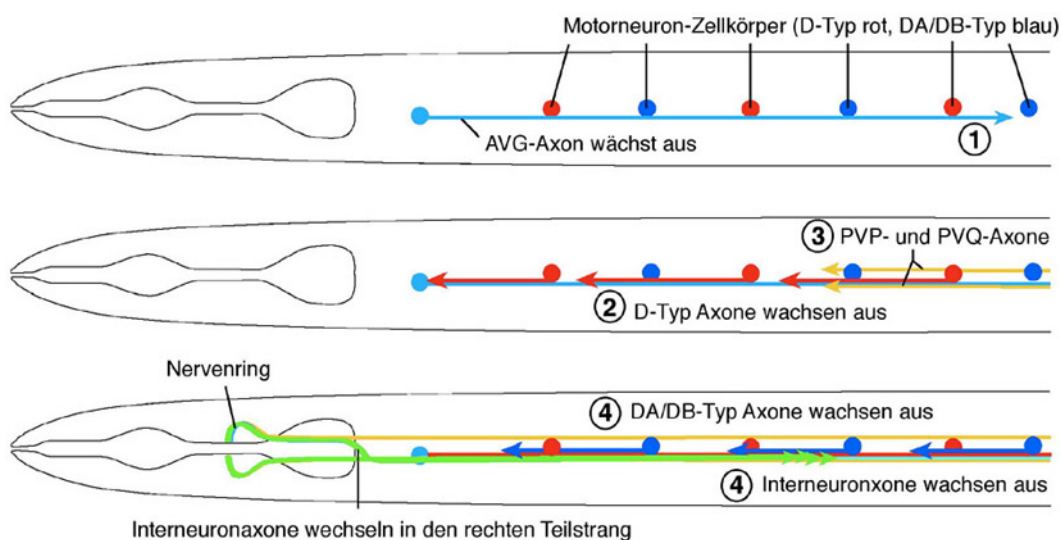


Abb. 2: Schematische Darstellung der Reihenfolge des Auswachsens der Axone im Ventralstrang.

Pionier-Nachfolger-Beziehungen

Wir testeten systematisch, inwieweit solche Abhängigkeiten bestehen, indem wir gezielt einzelne Pionierneurone durch Bestrahlung mit einem Laser schädigten, sodass sie keine Fortsätze mehr aussenden (Laserablationsexperiment). Zunächst untersuchten wir die Rolle des Pionierneurons AVG. Etwa ein Drittel der Tiere, in denen AVG durch Laserablation eliminiert wurde, hatte Defekte im Auswachsen der Interneuron- bzw. Motorneuronaxone. Die Defekte betrafen typischerweise einzelne oder wenige Axone, während die überwiegende Mehrheit korrekt ausgewachsen war. In über der Hälfte der Tiere wurden keinerlei Defekte in den später auswachsenden Axonen gefunden. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Pionierneuron AVG nicht absolut notwendig ist, damit nachfolgende Axone richtig auswachsen. Diese Axone können offenbar unabhängig von AVG navigieren, das keine exklusiven Fähigkeiten zur Wegfindung hat. Allerdings stellt das AVG-Axon offenbar eine zusätzliche Informationsquelle für spät auswachsende Axone dar, durch die sicher gestellt wird, dass *alle* nachfolgenden Axone ihren Weg finden. Möglicherweise ist es für spät auswachsende Axone, von denen stets mehrere gleichzeitig navigieren müssen, schwieriger, Zugang zu allen relevanten Signalen zu erhalten, sodass zusätzliche Signale notwendig werden, um sicherzustellen, dass jedes einzelne Axon den richtigen Weg findet.

Durch die gleichzeitige Verwendung verschiedenfarbiger Reporterproteine konnten wir auf Einzelzellebene analysieren, inwieweit spät auswachsende Axone sekundär betroffen sind, wenn in einem bestimmten Tier früh auswachsende Axone Fehler machen. Für diese Analyse nutzen wir Mutanten in verschiedenen Genen, die für die korrekte Navigation früh auswachsender Axone wichtig sind. Es stellte sich heraus, dass nur in wenigen Einzelfällen strikte Abhängigkeiten zwischen früh und spät auswachsenden Axonen existieren. Ein Beispiel dafür ist die Abhängigkeit des PVQ-Axons vom unmittelbar zuvor auswachsenden PVP-Axon (**Abb. 3 A - C**). Typischer waren subtilere Abhängigkeiten, die sich nur nach statistischer Analyse der Einzeldefekte zu erkennen gaben. So ist beispielsweise die Zahl der Defekte in Interneuronaxonen reduziert in Tieren, in denen die beiden PVQ-Axone im selben Teilstrang verlaufen wie die Interneuronaxone. Dies deutet darauf hin, dass sich die später auswachsenden Interneuronaxone zu einem gewissen Grad am Vorhandensein bzw. Nichtvorhandensein der PVQ-Axone orientieren. Insgesamt ergab diese Analyse ein Netzwerk von Abhängigkeiten zwischen verschiedenen Gruppen von Axonen (**Abb. 4**). Diese Analyse macht deutlich, dass Axone bei der Navigation eine Vielzahl von Signalen aus ihrer Umgebung erkennen und integrieren. Die Kenntnis der Abhängigkeiten der verschiedenen Axone voneinander ist eine essenzielle Grundlage für die Interpretation der Defekte, die in verschiedenen Mutanten gefunden wurden.

Genetische Screens

Die zuerst auswachsenden Axone sind in ihrer Navigation auf sich allein gestellt. In verschiedenen Organismen wurden in den letzten Jahren mehrere evolutionär konservierte extrazelluläre und zellgebundene Signale gefunden, die für verschiedene Aspekte der Navigation bestimmter Axone wichtig sind. Alle diese Signale sind in *C. elegans* vorhanden, und inzwischen sind Mutanten in den entsprechenden Genen bekannt. Überraschenderweise wächst das Axon des Pioniers AVG in all diesen Mutanten normal aus, was zeigt, dass die entscheidenden Signale, die AVG für seine Orientierung verwendet, bisher unentdeckt geblieben sind. Um die Gene für solche bisher nicht entdeckten Signale zu finden, isolierten wir Mutanten, die Defekte im Auswachsen verschiedener Axone des Ventralstranges aufweisen. Wir isolierten die Mutanten nach direkter visueller Inspektion der Axone mithilfe der oben erwähnten GFP-Markern. Die invariante Anordnung der Axone und das einfache Muster der unverzweigten Nervenfortsätze im normalen Tier erleichtert es sehr, axonale Defekte zu erkennen. Auf diese Weise konnten wir auch Mutanten mit weniger ausgeprägten axonalen Defekten isolieren, die nicht zu auffälligen Verhaltensdefekten führen und deshalb in früheren Screens nicht gefunden wurden. Die Kartierung der isolierten Mutanten zeigte, dass die Mehrzahl in bisher noch nicht bekannten Genen liegt.

Eine erste Charakterisierung der Defekte ergab, dass sich die Mutanten grob in zwei unterschiedliche Klassen gruppieren lassen. Die erste Gruppe enthält Mutanten, bei denen nur die Interneurone des Motorschaltkreises betroffen sind. Diese Gene könnten Komponenten (Signale, Rezeptoren etc.) betreffen, die nur von dieser Klasse von Neuronen benutzt wird. Die zweite Gruppe besteht aus Mutanten, bei denen eine Vielzahl verschiedener Neurone z. T. auf unterschiedliche Art und Weise betroffen ist. Die entsprechenden Gene kodieren wahrscheinlich für Proteine, die allgemein für die Navigation von Axonen wichtig sind.

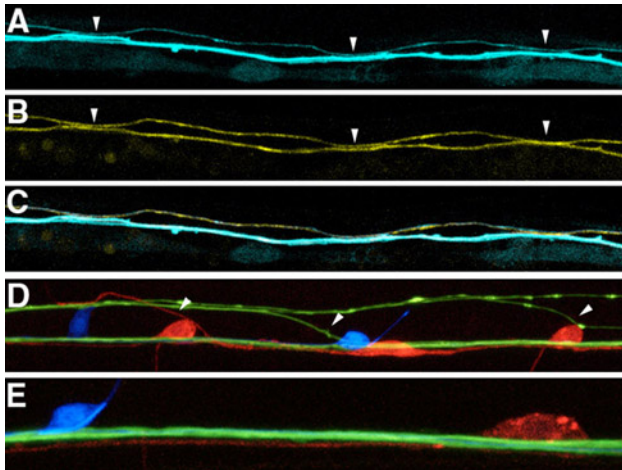


Abb. 3: Korrelation von Defekten in früh und spät auswachsenden Axonen: A - C) PVP-Axone (A) und später auswachsende PVQ-Axone (B) wechseln an genau denselben Stellen zwischen rechtem und linkem Teilstrang hin und her (Pfeilspitzen). D - E) In *lin-11*-Mutanten (D) wachsen Interneuron- und D-Typ-Motorneuronaxone zum Teil im linken statt im rechten Teilstrang bzw. wechseln zwischen den Teilsträngen hin und her. Mehrfarben-GFP-Markierung: Interneuronaxone in grün, D-Typ-Motorneurone in rot, DA/DB-Typ-Motorneurone in blau. Motorneurone und Interneurone machen unabhängig voneinander Fehler (Pfeilspitzen). E) Wildtyp als Vergleich. Alle Axone laufen eng gebündelt im rechten Teilstrang.

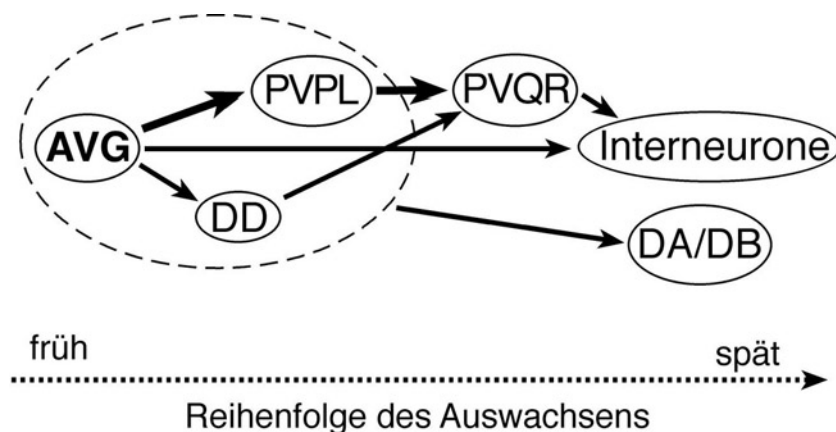


Abb. 4: Netzwerk von Abhängigkeiten zwischen früh und spät auswachsenden Axonen. Verschiedene Gruppen von Axonen sind nach der Reihenfolge des Auswachsens von links nach rechts angeordnet. Abhängigkeiten zwischen bestimmten früh und spät auswachsenden Axonen sind durch Pfeile dargestellt, wobei die Dicke des Pfeiles die Stärke der Abhängigkeit widerspiegelt.

Mehrere dieser Gene werden in der Arbeitsgruppe zurzeit intensiver studiert. Eines davon ist *lin-11*, ein LIM-Homeobox-Transkriptionsfaktor, der unter anderem für die korrekte Differenzierung bestimmter sensorischer Neurone wichtig ist [3, 4]. *LIN-11* ist aber auch im AVG-Neuron exprimiert, und das Spektrum der Defekte in *lin-11*-Mutanten (Abb. 3D, E) ist identisch mit dem Spektrum an Defekten, wie sie nach der Laserablation von AVG zu beobachten sind. *Lin-11* ist offensichtlich für die korrekte Differenzierung des AVG-Neurons verantwortlich. Gene, die von *lin-11* reguliert werden, sind möglicherweise direkt daran beteiligt, nachfolgende Axone zu leiten und die Mutationen in *lin-11* bieten einen guten Ansatzpunkt, diese Zielgene zu identifizieren.

Ein weiteres Gen (*zag-1*), das für die Navigation einer Vielzahl von Axonen auch außerhalb des Ventralstranges essenziell ist, stellte sich ebenfalls als Transkriptionsfaktor heraus [5]. *ZAG-1* ist im Embryo transient in einer Vielzahl von Neuronen exprimiert, wenn diese sich ausdifferenzieren. Neben charakteristischen Defekten im Auswachsen der Nervenfortsätze findet man in *zag-1*-Mutanten auch neuronale Gene wie Glutamat- oder Odorantrezeptoren in den falschen Neuronen exprimiert, was darauf schließen lässt, dass *ZAG-1* bestimmte Aspekte der Differenzierung dieser Neurone kontrolliert. Es ist bekannt, dass die Expression der richtigen Rezeptoren für extrazelluläre Signale entscheidend für das korrekte Auswachsen der Axone ist und dass Axone durch gezielte Fehlexpression bestimmter Rezeptoren fehlgeleitet werden können [6]. Wahrscheinlich ist *ZAG-1* einer der Transkriptionsfaktoren, die an der Regulation der Expression der entsprechenden Rezeptoren auf Neuronen beteiligt sind.

Revers genetische Ansätze

Unabhängig von unseren genetischen Screens untersuchen wir auch gezielt Gene aus Familien, für die es bereits deutliche Hinweise gibt, dass sie an axonaler Wegfindung beteiligt sein könnten. Zur Zeit konzentrieren wir uns auf Zelladhäsionsmoleküle der Immunoglobulin- (IgCAM) und Cadherinsuperfamilien. Diese Genfamilien sind in *C. elegans* vergleichsweise groß mit 17 bzw. 12 Mitgliedern. Mutanten in drei IgCAMs (*sax-3*, *unc-5*, *unc-40*) und einem Cadherin (*hmr-1*) sind bereits bekannt und zeigen verschiedene axonale Defekte. Wir haben im letzten Jahr die Expression der IgCAMs untersucht und gezielt Mutanten in den IgCAMs und Cadherinen isoliert, die in Nervenzellen exprimiert sind. Alle diese Mutanten sind lebensfähig und zeigen keine auffälligen Verhaltensdefekte, was darauf schließen lässt, dass die Entwicklung des Nervensystems in diesen Mutanten nicht schwerwiegend gestört ist. Wir untersuchen diese Mutanten zur Zeit detailliert auf mögliche Nervensystemdefekte und werden diese Art der Analyse auf weitere Kandidatengenfamilien ausdehnen. Die bisherigen Daten passen jedoch in das Bild, das bei der Analyse der bisherigen Mutanten und der Pionier-Nachfolgebeziehungen entstanden ist: Jedes einzelne Neuron nutzt eine Vielzahl verschiedener Informationsquellen für die Navigation, und der Verlust einer einzelnen Quelle hat nur moderate Defekte zur Folge, so dass auch nicht unbedingt zu erwarten wäre, dass der Verlust eines einzelnen Adhäsionsmoleküls (IgCAM oder Cadherin) dramatische Konsequenzen hat.

Ausblick

Unsere genetischen Screens haben sich als viel versprechender Ansatz herausgestellt, um neue Gene zu identifizieren, die direkt oder indirekt für die Navigation von Nervenfortsätzen essenziell sind. Die Identifizierung verschiedener Transkriptionsfaktoren, die Aspekte der Differenzierung von Neuronen kontrollieren, bietet einen Ansatzpunkt, um über die Identifizierung der Zielgene diejenigen Gene zu finden, die direkt für das gerichtete Auswachsen von Axonen verantwortlich sind. Weitere Screens und die Analyse der noch nicht charakterisierten Mutanten werden uns zu weiteren Genen führen, die für diesen Prozess wichtig sind. Die revers genetischen Ansätze erlauben es uns, die Analyse auf ganze Genfamilien auszudehnen und so den Schritt von einer Einzelgenanalyse hin zur Analyse ganzer Familien zu machen. Weitere Ansätze, wie RNAi-Screens, die hier nicht im Detail besprochen wurden, werden

die Identifizierung der noch fehlenden Gene beschleunigen, sodass wir hoffentlich in absehbarer Zeit alle wesentlichen Komponenten, die für diesen Prozess wichtig sind, in Händen haben, damit wir beginnen können, deren Zusammenspiel zu untersuchen.

Literatur:

- [1] White, J., Southgate, E., Thomson, J. and Brenner, S. (1986). The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Phil. Trans. Royal Soc. London B.* 314, 1-340.
- [2] Durbin, R. M. (1987). *Studies on the development and organisation of the nervous system of Caenorhabditis elegans*, (ed., pp. 150: Cambridge)
- [3] Hobert, O., D'Alberti, T., Liu, Y. and Ruvkun, G. (1998). Control of neural development and function in a thermoregulatory network by the LIM homeobox gene *lin-11*. *J Neurosci* 18, 2084-96.
- [4] Sarafi-Reinach, T. R., Melkman, T., Hobert, O. and Sengupta, P. (2001). The *lin-11* LIM homeobox gene specifies olfactory and chemosensory neuron fates in *C. elegans*. *Development* 128, 3269-81.
- [5] Wacker, I., Schwarz, V., Hedgecock, E. M. and Hutter, H. (2003). *zag-1*, a zinc-finger-homeodomain transcription factor controlling neuronal differentiation and axon outgrowth in *C. elegans*. *Development* in press.
- [6] Hamelin, M., Zhou, Y., Su, M. W., Scott, I. M. and Culotti, J. G. (1993). Expression of the UNC-5 guidance receptor in the touch neurons of *C. elegans* steers their axons dorsally. *Nature* 364, 327-30.