

Bernd Knöll

AG Neuronale Gen-Expression,
Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Interfakultäres Institut für Zell-Biologie

**Die Rolle des Transkriptionsfaktors SRF (Serum Response Faktor)
beim Aufbau neuronaler Schaltkreise**



**Die Rolle des Transkriptionsfaktors SRF (Serum Response Faktor)
beim Aufbau neuronaler Schaltkreise**

Dr. Bernd Knöll
AG Neuronale Gen-Expression
Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Interfakultäres Institut für Zell-Biologie
Abt. Molekular-Biologie
Auf der Morgenstelle 15
72076 Tübingen
bernd.knoell@uni-tuebingen.de
Tel: 07071-29-78843

ZUSAMMENFASSUNG

Serum Response Faktor (SRF) ist ein Transkriptionsfaktor, der als Genregulator maßgeblich an der Expression von Genen, die für das neuronale Zellgerüst (Zytoskelett) kodieren, beteiligt ist und damit die Morphologie von Neuronen beeinflussen kann. Zusätzlich induziert synaptische Transmission eine SRF-vermittelte Genexpression, die zur Aktivierung potentiell Lern- und Gedächtnis-assoziiierter Gene führt. In den letzten Jahren haben die Arbeiten von Kollegen und uns gezeigt, dass SRF eine zentrale Regulator-Funktion im Gehirn einnimmt: so konnten unsere Arbeiten zeigen, dass in SRF Mausmutanten die Neuron-Morphologie derart verändert ist, dass weder geordnetes Nervenfasernwachstum noch gerichteter Aufbau von neuronalen Netzwerken möglich ist. Zusätzlich konnten wir zeigen, dass SRF zur Ausbildung der isolierenden Myelin-Scheide, die Nervenfasern umgibt, benötigt wird. Arbeiten des Nobelpreisträgers Eric Kandel (Columbia University, New York) und von David Ginty (Johns Hopkins University, Baltimore) zeigten wichtige Funktion von SRF bei Lern- und Gedächtnisvorgängen.

SRF lenkt auswachsende Nervenfasern an ihr Ziel

Der Serum Response Faktor (SRF) ist ein Transkriptionsfaktor, der seine Aufgabe innerhalb der Nervenzelle im Zellkern ausübt (siehe Abb. 1A-C). Hier greift er gezielt in die Expressionsrate von Genen ein, von denen viele für Komponenten des neuronalen Zellgerüsts kodieren. Diese Gerüstproteine wie z.B. Actin und Mikrotubuli (siehe Abb. 1A) verleihen einer Nervenfasern - die im Rückenmark bis zu einem Meter lang sein kann - Stabilität und ermöglichen gleichzeitig eine dynamische Umstrukturierung in Reaktion auf Umweltreize.

Wir konnten für SRF eine wichtige Funktion bei der axonalen Wegfindung beschreiben, ein Prozess, der während der Gehirnentwicklung sicherstellt, dass die korrekten Nervenzellen miteinander verbunden werden und eine synaptische Verschaltung eingehen. Bei diesem Prozess sendet eine Nervenzelle ein Axon aus, das durch Lenkungsmoleküle in der Umgebung durch das Gehirn navigiert und schließlich zu seiner Zielzelle gelenkt wird. Dabei befindet sich an der Spitze der wachsenden Nervenfasern ein sog. Wachstumskegel (siehe Abb.1H), der gleich einem Computer Lenkungsinformation integriert und diese in Richtungsänderungen umsetzt. Vergleichbar mit Schildern im Straßenverkehr kennt man repulsive axonale Lenkungsmoleküle (z.B. Ephrine, Slits, Semaphorine), die das Einwachsen von Nervenfasern in bestimmte Gehirnareale verhindern und umgekehrt solche die attraktiv wirken (z.B. Netrine, Neurotrophine). Zur Untersuchung der axonalen Lenkung benutzen wir als Modellsystem den Hippocampus, eine Gehirnregion von entscheidender Bedeutung bei Lern- und Gedächtnisprozessen, deren Funktionsstörung zu den bekannten Beeinträchtigungen z.B. bei Morbus Alzheimer führt.

Zur Analyse von SRF bei der axonalen Wegfindung im Hippocampus setzen wir Mausmutanten ein, bei denen das *Srf* Gen deletiert wurde, also kein SRF Protein in der Nervenzelle mehr zur Verfügung steht. Auftretende Funktionsverluste in *Srf* Mutanten im Vergleich zur wild-typischen Maus lassen im Umkehrschluss die Rolle des SRF Proteins im „normalen“ Tier bestimmen.

Unsere Arbeiten (Knöll *et al.*, *Nature Neuroscience*, 2006) erkannten, dass in *Srf* Mausmutanten die axonale Wegfindung hippocampaler Moosfaser-Axone gestört ist (siehe Abb. 1D-G). Moosfaseraxone verbinden die Körnerzell-Neurone mit sog. Pyramidenzell-Neuronen. In wild-typischen Mäusen (Abb. 1D, F) teilen sich auswachsende Moosfasern in zwei Äste auf, die oberhalb und unterhalb - aber

immer außerhalb - der *Cornu Ammonis* (CA3) Schicht verlaufen, ehe sie mit den Pyramidenzell-Neuronen Synapsen ausbilden. In *Srf* Mutanten dagegen (Abb. 1E, G) unterbleibt diese Aufgabelung und die Moosfasern werden fehlgelenkt, indem sie in die CA3-Schicht eintreten, anstatt – wie im Wild-typ – außerhalb zu wachsen. Wir gehen zurzeit davon aus, dass die Wirkung von repulsiven axonalen Lenkungsmolekülen in *Srf* Mutanten eingeschränkt ist und diese nicht – wie im Wild-typ – die Moosfasern durch ihre abstoßende Wirkung aus der CA3-Schicht herausdrängen können. In der Tat konnten wir zeigen, dass z.B. Ephrine, repulsiv-wirkende Lenkungsfaktoren in *Srf* Mutanten nicht korrekt arbeiten. Ephrine führen normalerweise zu einem transienten Wachstumskegelkollaps, von dem man annimmt, dass er im lebenden Tier eine Richtungsänderung weg von einer Ephrin-Quelle (und damit falschen Zielzelle) bewirkt. Dazu bauen Ephrine das Actin-Zellgerüst z.B. in den fingerartigen Fühlern (sog. Filopodien) der Wachstumskegel ab (Vgl. Abb. 1H mit J). Den Wachstumskegeln von Mäusen ohne SRF fehlen diese Filopodien schon im Grundzustand (Abb. 1I). Nach Ephrin-Zugabe stellten sich zuvor unbekannte Wachstumskegel-Strukturen ein, indem Actin-Polymere jetzt ringförmig verbunden sind (Abb. 1K).

Zusammenfassend zeigten diese Befunde, dass SRF ein wichtiger Genschalter bei der axonalen Lenkung im Hippocampus ist und die Morphologie von Nervenzellen und ihren Wachstumskegeln entscheidend beeinflussen kann.

SRF reguliert die Bildung der Isolationsschicht von Axonen

Axone sind – vergleichbar der Ummantelung eines Stromkabels – von einer Isolationsschicht umgeben, der sog. Myelinscheide, die eine schnelle elektrische Reizweiterleitung der Aktionspotentiale ermöglicht. Die Myelinscheide im Gehirn wird von spezialisierten Glia-Zellen, den Oligodendrozyten, gebildet (siehe Abb. 2A). Eine (Zer)Störung der Myelinscheide hat fatale Auswirkungen auf den neuronalen Schaltkreis, die sich z.B. in der Multiplen Sklerose oder bei Querschnittslähmungen manifestieren.

Durch einen eher zufälligen Befund konnten wir eine wichtige Rolle von SRF bei der Entwicklung dieser Myelinscheide beschreiben (Stritt *et al.*, *Nature Neuroscience* 2009, zur Publikation akzeptiert). In einem genom-weiten Transkriptomics Ansatz mit Hilfe von Affymetrix Microarrays wollten wir alle neuronalen Gene ausfindig machen, deren Transkription von SRF reguliert wird. Überraschenderweise waren die von der

SRF Deletion am stärksten betroffenen Gene solche, die nicht in Neuronen angeschaltet werden, sondern Gene in Oligodendrozyten, die für die Ausbildung der Myelinscheide zuständig sind. In weiteren histologischen Experimenten (Abb. 2B, C) und anhand von Elektronen-Mikroskopie (Abb. 2D, E) konnten wir in der Tat belegen, dass die Myelinscheide in *Srf* Mausmutanten nicht im normalen Umfang gebildet wird, sodass die Axone in *Srf* Mutanten quasi „nackt“ vorliegen. Das Fehlen der Myelinscheide geht einher mit einer Degeneration des Axons. Die von uns untersuchte SRF-defiziente Maus könnte in folgenden Projekten als Modellsystem bei z.B. neuronaler Degeneration und/oder Multiplen Sklerose wichtige neue Ansätze zur Entstehung dieser Krankheiten liefern.

Diese Ergebnisse zeigten, dass SRF neben der axonalen Lenkung (sozusagen auf der neuronalen Seite), eine zweite Funktion bei der Ausbildung der Myelinscheide für Glia-Zellen als Genschalter überwacht.

REFERENZEN

Knöll B, Kretz O, Fiedler C, Alberti S, Schütz G, Frotscher M, Nordheim A □

SRF controls neuronal circuit assembly in the hippocampus. □

Nature Neuroscience 2006 Feb; 9(2):195-204.

Knöll B*, Weini C, Nordheim A, Bonhoeffer F

Stripe assay to examine axonal guidance and cell migration. □

Nature Protocols 2007 May;2(5):1216-1224. *Korrespondierender Autor

Pandithage R, Lilischkis R, Jedamzik R, Lüscher-Firzlaff J, Vervoorts J, Harting K, Lasonder E, **Knöll B***, Lüscher B*

The regulation of SIRT2 function by cyclin-dependent kinases affects cell motility.

The Journal of Cell Biology 2008 Mar 10;180(5):915-29.

* gemeinsame Senior-Autorenschaft

Stritt C, Stern S, Harting K, Sinske D, Manke T, Schwarz H, Vingron M, Nordheim A,

Knöll B

Paracrine control of oligodendrocyte differentiation by Serum Response Factor (SRF) mediated gene expression in neurons.

Nature Neuroscience 2009 *in press*.

ABBILDUNGSBESCHREIBUNGEN

Abbildung 1: SRF als Genregulator bei der axonalen Wegfindung

(A-C) Verteilung des Mikrotubuli Zellgerüsts (A) und des Transkriptionsfaktors SRF (B) in einem Neuron. Mikrotubuli verteilen sich uniform, wogegen SRF im Zellkern zu finden ist.

(D, F) Schematische Darstellung (D) der axonalen Wegfindung im Hippocampus. Vom *Gyrus Dentatus* (DG) treten Moosfaseraxone (in rot) aus den Zellkörpern von Körnerzellen aus (ebenfalls rot), überqueren den Hilus und bilden mit den Dendriten der Pyramidenneurone (grau) der CA3-Schicht eine Synapse aus. In wild-typischen Mäusen werden Moosfaseraxone, die von DG Richtung CA3-Schicht wachsen, auf beiden Seiten *außerhalb* der CA3-Schicht zu ihren Zielzellen gelenkt (D, F). Dort bilden sie excitatorische (anregende) Synapsen außerhalb der CA Region (+). Inhibitorische Synapsen (-) von Interneuronen (blau) werden am Zellkörper der Pyramidenneurone (grau) gebildet (D). In Kontrollmäusen (F) splitten sich die Moosfasern in einen größeren (suprapyramidalen; Pfeile) und einen schwächeren (infrapyramidalen; Pfeilköpfe) Trakt auf.

E, G) In *Srf*-Mutanten, denen SRF fehlt, begehen Moosfasern axonale Wegfindungsfehler. Anstatt wie im Wild-typ (D, F) auf beiden Seiten außerhalb der CA3-Region zu wachsen, treten sie in die CA3-Schicht ein. Damit bilden sie excitatorische Synapsen *innerhalb* der CA3-Schicht an den Zellkörpern selbst und nicht, wie im Wild-typ, außerhalb an den dendritischen Verzweigungen (E).

(H-K) Gezeigt sind Wachstumskegel, bei denen das Actin-Zytoskelett rot und das Mikrotubuli-Gerüst grün angefärbt wurde.

H) Ein Wachstumskegel einer wild-typischen Maus zeigt typischerweise fingerartige Filopodien (Pfeile).

I) In den Wachstumskegeln von *Srf*-Mutanten ist die Ausbildung zytoskelettaler Strukturen beeinträchtigt, die Wachstumskegel sind aufgebläht und es fehlen Filopodien, was dem Wachstumskegel ein abgerundetes Erscheinende verleiht.

J) Inkubiert man Wachstumskegel von wild-typischen Mäusen mit Ephrin-A5 tritt ein Wachstumskegel-Kollaps ein, das heißt Gerüststrukturen innerhalb des Wachstumskegels brechen zusammen.

K) In SRF-defizienten Wachstumskegeln ist kein kompletter Wachstumskegel-Kollaps möglich. Stattdessen sind nach Ephrin-A5 Inkubation ringförmige Gerüststrukturen) zu erkennen.

Maßstabsbalken (F, G) = 100 μm ; (H-K) = 5 μm

Abbildung 2: SRF und seine Rolle bei der Ausbildung der Myelinscheide

(A) Oligodendrozyten sind spezialisierte Gliazellen, die im Gehirn Axone von Neuronen (rot) mit einer Myelin-Isolationsschicht umgeben.

(B, C) In Wild-Typ (B) und *Srf*-Mutante (C) wurde die Myelinscheide mit Antikörpern gegen das Myelin-spezifische Protein MBP (Myelin Basisches Protein) angefärbt. In *Srf*-Mutanten bleibt die Ausbildung der Myelinscheide weitestgehend aus.

(D, E) Elektronen-mikroskopische Aufnahmen von Wild-typ (D) und SRF-defizienten (E) Axonen. Während im Wild-Typ die meisten Axone von einer Myelinscheide (schwarz, siehe Pfeile) umgeben sind, fehlt diese häufig in *Srf*-Mutanten (mit Stern gekennzeichnete Axone).

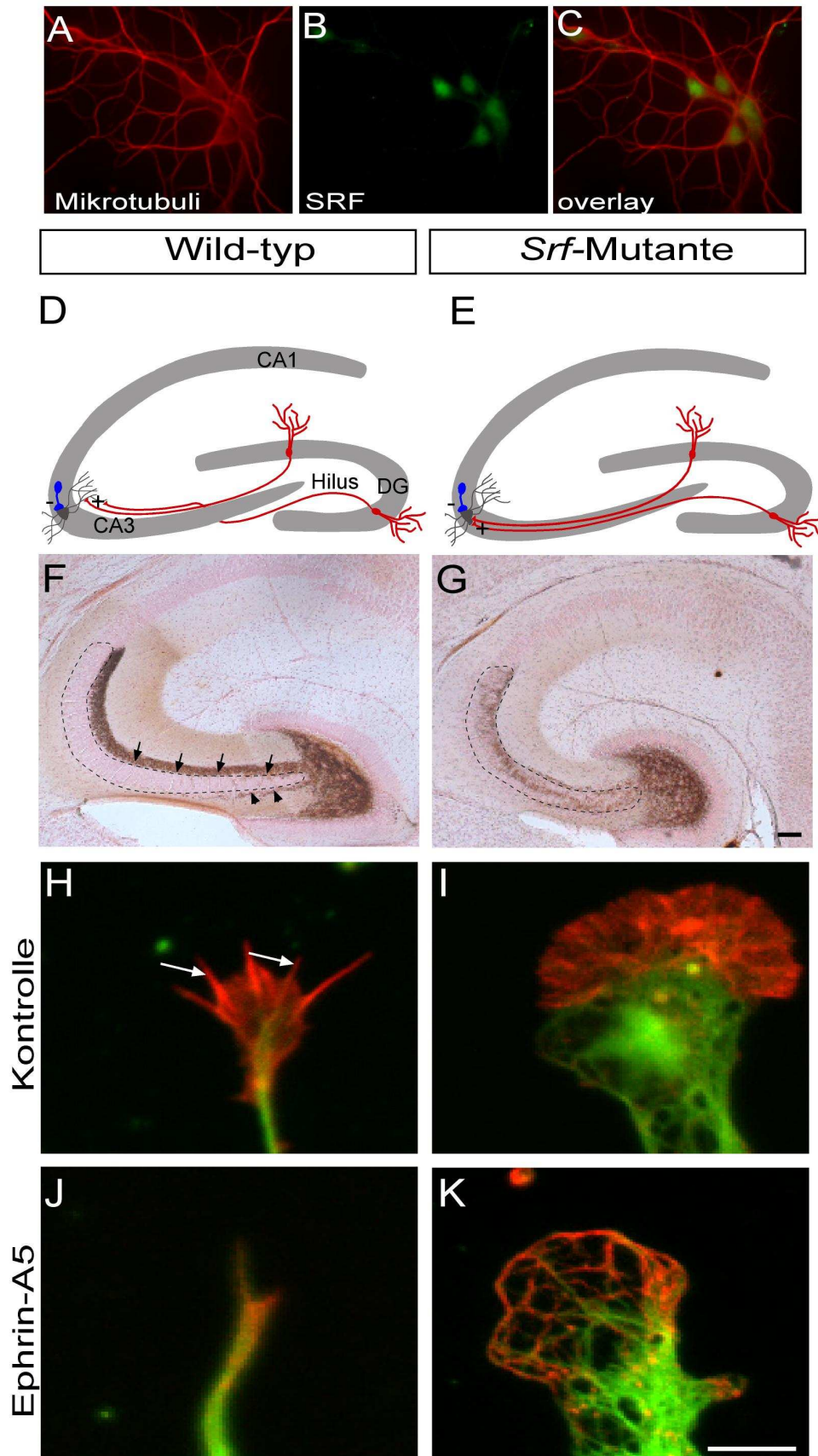


Abbildung 1

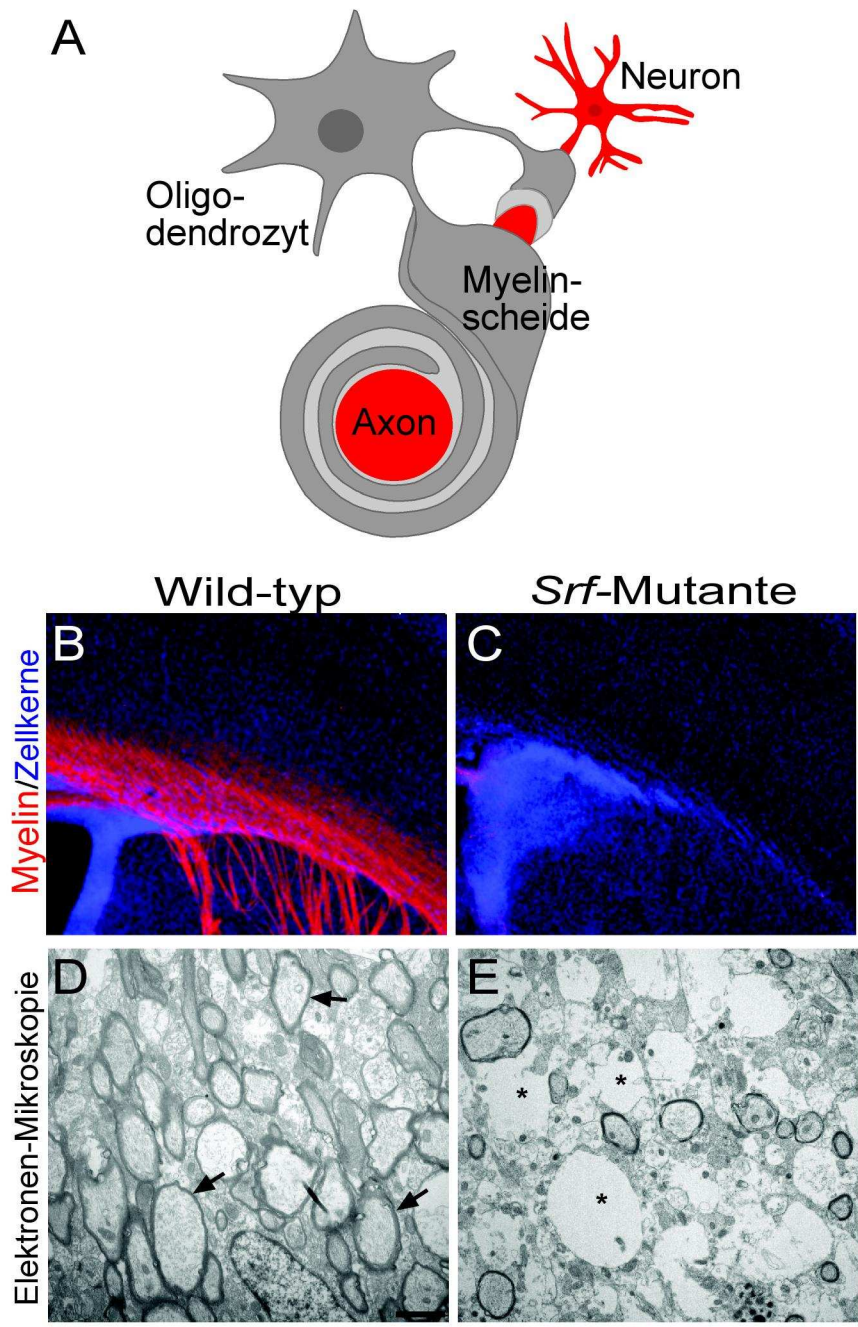


Abbildung 2