



NO als Regulator neuronaler Motilität und Regeneration in einfachen Nervensystemen

Gerd Bicker und Michael Stern

Zusammenfassung

Stickstoffmonoxid (NO) ist als gasförmiger Botenstoff im Nervensystem bekannt. Es spielt eine Rolle bei synaptischer Plastizität, aber auch bei neuronalen Entwicklungs- und Regenerationsvorgängen. Wir untersuchen die Funktion von NO und seiner Signalkaskade über zyklisches GMP am Heuschreckenembryo. Dessen sich entwickelndes Nervensystem ist sehr gut für pharmakologische Manipulationen in Gewebekultur geeignet. Wir analysieren die zellulären Mechanismen der NO-Wirkung an drei Beispielen: 1. im peripheren Nervensystem beim Auswachsen von Pionierneuronen in der Antenne, 2. im zentralen Nervensystem bei der axonalen Regeneration serotonerger Interneurone nach Axotomie und 3. im enterischen Nervensystem bei der Migration von Neuronen, die den Darm-Nervenplexus bilden. In allen Fällen dient intern freigesetztes Stickstoffmonoxid bzw. die Synthese von zyklischem GMP als ein permissives Signal für den jeweiligen Entwicklungsvorgang. Kohlenstoffmonoxid (CO) moduliert als ein weiterer gasförmiger Botenstoff antagonistisch zu NO die Wanderung der Darmneurone. Experimente mit humanen Modellneuronen in Zellkultur weisen darauf hin, dass NO auch bei der Bildung des menschlichen Nervensystems Aspekte der Zellmigration reguliert.

Abstract

Nitric oxide (NO) is known as a gaseous messenger in the nervous system. It plays a role in synaptic plasticity, but also in neural development and regeneration. We study the function of NO and its signalling cascade via cyclic GMP in the grasshopper embryo. Its developing nervous system is well suited for pharmacological manipulations in tissue culture. We analyse cellular mechanisms of NO action in three examples: 1. in the peripheral nervous system during antennal pioneer axon outgrowth, 2. in the central nervous system during axonal regeneration of serotonergic neurons after axotomy, and 3. in the enteric nervous system during migration of neurons forming the midgut nerve plexus. In each case, internally released NO or NO-induced cGMP synthesis acts as a permissive signal for the developmental process. Carbon monoxide (CO), as a second gaseous messenger, modulates enteric neuron migration antagonistic to NO. Experiments on human model neurons in cell culture indicate that NO regulates cell migration also during human brain development.

Keywords: growth cone; insect embryo; cGMP; protein kinase G; carbon monoxide

Ein gasförmiger Botenstoff und sein Rezeptor

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein reaktives Gas, das im Organismus als membranpermeabler Botenstoff von Zelle zu Zelle signalisieren kann. Es wurde zuerst als Endothelium-derived Relaxing Factor (EDRF) beschrieben, der nach einer Freisetzung aus Endothelzellen die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur bewirkt. Die Entdeckung dieses atypischen Transmitters auch im Gehirn vor etwa 20 Jahren stellte eine der größeren Überraschungen in den

Neurowissenschaften dar. Eine Informationsübertragung durch ein Gas, das auf Bedarf von einer Zelle produziert wird, durch die Membran diffundiert und die Funktion einer anderen Zelle reguliert, repräsentiert ein vollständig neuartiges Signalisierungsprinzip in dem durch seine strikten anatomischen Verbindungen charakterisierten Nervensystem. Die prominente Rolle von NO bei der Modulation synaptischer Plastizität und bei der Pathologie neuronaler Erkrankungen wurde bereits von Wolf (1997) in einem Neuroforumartikel dargestellt.

NO wird in Neuronen von einer Ca^{2+} /Calmodulin stimulierten NO-Synthase (NOS) gebildet (Abbildung 1). Einer der Signaltransduktionswege dieses reaktiven Gases ist seine Bindung an die Häm-Gruppe der löslichen Guanylylcyclase (Garthwaite 2008). Die resultierende Aktivierung löslicher Guanylylcyclasen (sGC) reguliert zelluläre Funktionen über die Synthese von cGMP (Abbildung 1). Da die Aktivierung der sGC durch NO im nanomolaren Bereich erfolgt, stellt die NO/cGMP-Signaltransduktion eine hochempfindliche Signalkaskade der zellulären Kommunikation dar (Garthwaite 2008).

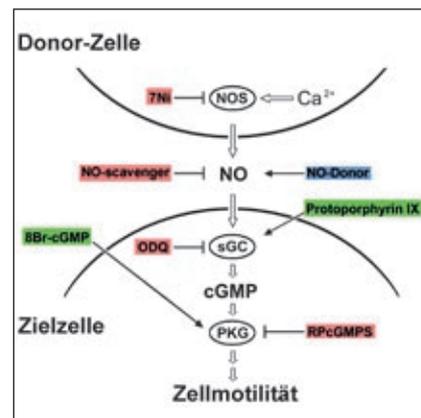


Abb. 1: Schema des transzellulären NO/cGMP Signalweges.

Neuronale Aktivität der Donor-Zelle führt zum Einstrom von Kalzium, das zur Aktivierung der NO-Synthase (NOS) führt. NOS katalysiert die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO), welches durch die Zellmembran diffundiert und in der Zielzelle an die lösliche Guanylylcyclase (sGC) bindet. Die Stimulation von sGC durch NO führt zur Bildung des sekundären Botenstoffs zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP), welches wiederum die Proteinkinase G (PKG) aktiviert. Über weitere Zwischenschritte wird schließlich die Motilität von Zellen und Wachstumskegeln reguliert. In embryonaler Gewebekultur ist es möglich, an unterschiedlichen Stellen pharmakologisch in die Signalbahn einzugreifen, sei es durch Applikation von externem NO (blau), durch andere Aktivatoren der Signalbahn (grün) oder durch Inhibitoren (rot).

Zyklisches GMP aktiviert eine Vielzahl von Effektorproteinen einschließlich der Proteinkinase G (PKGI und PKGII), Phosphodiesterasen und durch zyklische Nucleotide regulierte Ionenkanäle (Lucas et al. 2000). Obwohl NO als ein unkonventioneller Transmitter durch die Zellmembran diffundieren kann, wird die Spezifität der zellulären Kommunikation über die aktivitätsabhän-

gige Synthese und eine diskrete Verteilung des Rezeptorproteins (sGC) erhalten. Da die NO-Synthase NADPH als Kofaktor benötigt, lassen sich NO synthetisierende Zellen mit der NADPH-Diaphorase-Histochemie (Wolf 1997) auf mild fixierten Gewebeschnitten darstellen. Eine weitere Darstellungsmöglichkeit der NO-Donorzellen erfolgt mit Antikörpern gegen NO-Synthase. Die Zielzellen des NO-Signals können über eine NO-induzierte cGMP-Synthese im lebenden Gewebe mit einer immunzytochemischen Methodik identifiziert werden.

Auch Insekten nutzen das NO/cGMP-System. Vor etwa 15 Jahren konnte die Freisetzung dieses Moleküls durch eine Ca^{2+} /Calmodulin stimulierte NOS in neuronalen Primärkulturen nachgewiesen und die cGMP synthetisierenden Zielzellen in einem Insektengehirn zytologisch dargestellt werden (Müller und Bicker 1994; Bicker et al. 1996). Inzwischen sind eine Reihe von zellulären Wirkungen der NO/cGMP-Signaltransduktion bei der Modulation neuronaler Plastizität in den übersichtlichen Schaltkreisen von Insektennervensystemen



Abb. 2: Wanderheuschrecke auf Papyrusblüte. Ausschnitt aus einem Wandbild in der Grabkammer des Horemhab aus dem 15. Jh. v. Chr.

beschrieben worden. So wirkt NO zum Beispiel als retrograder Botenstoff bei der Lichtadaptation im visuellen System der Heuschrecke (Schmachtenberg und Bicker

1999) oder es stimuliert die Freisetzung von Neurotransmittervesikeln an der neuromuskulären Synapse von Drosophila-Larven (Wildemann und Bicker 1999).

Leadership

International research and engineering teams guarantee creativity and precision for HEKA instruments and software.

www.heka.com

HEKA Elektronik
Dr. Schulze GmbH
Wiesenstraße 71
D-67466 Lambrecht/Pfalz
Germany
phone +49 (0) 63 25 / 95 53-0
fax +49 (0) 63 25 / 95 53-50
eMail sales@heka.com

HEKA Electronics Inc.
47 Keddy Bridge Road
R.R. #2
Mahone Bay, NS B0J 2E0
Canada

phone +1 902 624 0606
fax +1 902 624 0310
eMail nasales@heka.com

HEKA Instruments Inc.
2128 Bellmore Avenue
Bellmore, New York 11710-5606
USA
phone +1 516 882 1155
fax +1 516 467 3125
eMail ussales@heka.com

Electrophysiology Electrochemistry

HEKA provides the finest instruments today to achieve the needed progress of tomorrow...

- patch clamp amplifiers
- multi-channel stimulation/acquisition patch clamp systems
- potentiostats/galvanostats
- acquisition interfaces
- software for acquisition and analysis
- pipette pullers
- micromanipulators
- complete patch clamp set-ups
- scanning electrochemical microscopes

HEKA



NO als essenzieller Entwicklungsregulator

Da die neuronale Expression von NOS im Wirbeltiernervensystem bei Entwicklungs- und Regenerationsprozessen dynamisch reguliert wird, kann man NO nicht nur eine Rolle bei der Modulation synaptischer Plastizität, sondern vermutlich auch bei Entwicklungsmechanismen zuschreiben. Als Beispiel seien nur die Entwicklungsprozesse der Neurogenese, der neuronalen Migration und des Neuritenwachstums genannt, die durch experimentelle Änderungen in der NO-Konzentration moduliert werden können (Hess et al. 1993; Packer et al. 2003; Moreno-Lopez et al. 2004). Es stellt sich nun die Frage, ob NO ein essenzieller Faktor für die Entwicklung ist. Dazu wurde bei der genetisch zugänglichen Taufliede *Drosophila*, deren Genom nur ein einziges NOS-Gen (dNOS) enthält, mehrere Punktmutationen isoliert, die zu einem Ausfall der Enzymaktivität des mutierten NOS-Proteins führten (Regulski et al. 2004). Fliegen, die für eine der Punktmutationen homozygot sind, sterben während der embryonalen oder frühen larvalen Entwicklung. Natürlich lässt sich aus dieser Untersuchung noch kein Mechanismus ableiten, wie NO die Em-

tenarten besitzen ein relativ übersichtliches zentrales Nervensystem, das aus individuell identifizierten Vorläuferzellen, Neuroblasten, entsteht, die sich im Stammzellmodus teilen. Seit einem Jahrhundert wird die Biologie der Heuschrecke intensiv erforscht, um Strategien zur Bekämpfung dieses schwarmbildenden Schadinsekts zu entwickeln, das bereits durch seine Bedrohung der Ernten im alten Ägypten (Abbildung 2) zum Symbol für eine biblische Plage wurde. Ironischerweise stellte sich bei der Forschung heraus, dass das Heuschreckennervensystem ein einfaches wie robustes neurophysiologisches Präparat für die Analyse komplexer sensomotorischer Integrationsprozesse ist. Die Bildung morphologisch eindeutig identifizierbarer Neurone aus den Neuroblasten ließen den Heuschreckenembryo außerdem zu einem Modellorganismus für das Studium zellulärer Mechanismen der axonalen Wegfindung werden. Im Lebenszyklus dieses hemimetabolen Schadinsekts legen die Weibchen die Eier als Gelege im Boden ab, die durch ein schaumartiges Sekret zusammengehalten werden. Der Embryo ernährt sich im Ei vom Dotter, schlüpft dann als wurmförmige Larve und entwickelt sich über fünf frei bewegliche Grashüpferstadien, die bereits eine große Ähnlichkeit zum erwachsenen Tier zeigen,

Wegfindung in Gewebekultur nachgewiesen (Kolodkin et al. 1992).

NO/cGMP-Signaltransduktion reguliert das Auswachsen von Pionierneuronen

Das Auswachsen der Nervenzellen während der Entwicklung wird von sogenannten Wachstumskegeln ermöglicht, die als bewegliche Zellstrukturen an der Spitze von neuronalen Fortsätzen sitzen. Pionierneurone legen die ersten axonalen Bahnen bei der Entwicklung des Nervensystems. Später auswachsende Axone können über Mechanismen der Zell-Zelladhäsion den bereits bestehenden Bahnen nachfolgen. Diese Strategie der axonalen Navigation wurde exemplarisch an Extremitätenanlagen des Heuschreckenembryos nachgewiesen, in denen identifizierbare Paare von Pionierneuronen die frühen axonalen Wege von Sinneszellen zum Zentralnervensystem festlegen, wenn die zu überbrückenden Distanzen noch kurz sind (Bate 1976; Bentley und O'Connor 1992). In der Extremitätenanlage befindet sich zwischen einem ektodermalen Epithel und lockerem mesodermalem Gewebe eine Basallamina, auf der die Axone von Sinneszellen und Motoneuronen auswachsen.

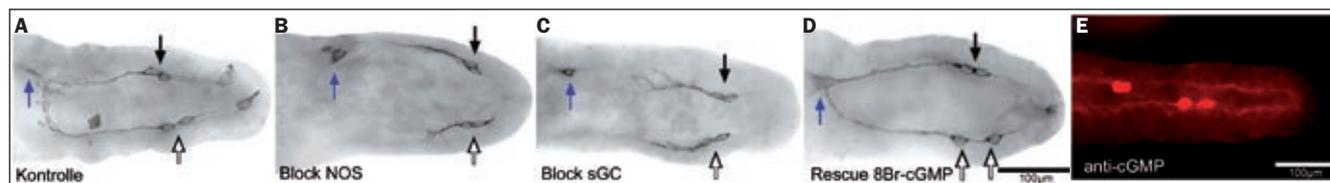


Abb. 3: Stickstoffmonoxid fördert das Auswachsen antennaler Pionierneurone im Heuschreckenembryo. (A-D) Antennenspitzen von 32% Embryonen, nach 24h in Kultur, in denen ein neuronenspezifischer Marker immunzytochemisch dargestellt ist. Je zwei Paar Pionierneurone (schwarze und weiße Pfeile) sowie eine Wegweiserzelle an der Basis der Antenne (blaue Pfeile) sind angefärbt. In Kontrollversuchen (A) erreichen die Pionier-Axone während der Kulturdauer die Wegweiserzelle. Bei Blockierung der NOS durch Zugabe von 500 µM 7NI (B) oder Blockierung der sGC durch 200 µM ODC (C) wird die Wegweiserzelle nicht erreicht. Im Rescue-Experiment wird diese hemmende Wirkung von 200 µM ODC durch gleichzeitige Zugabe von 500 µM 8Br-cGMP vollständig wieder aufgehoben (D). Die cGMP-Produktion in den antennalen Pionierneuronen lässt sich nach Stimulation mit dem NO-Donor-Nitroprussid (SNP) in Gegenwart des Phosphodiesterase-Inhibitors IBMX mit einem Antiserum gegen cGMP nachweisen (E).

bryonalentwicklung reguliert. Die Letalität der NOS-Mutationen zeigt jedoch, dass bei *Drosophila* NO als ein essenzieller Entwicklungsregulator angesehen werden muss. Bei Säugetieren könnten die Auswirkungen von NOS-Defekten auf die Entwicklung durch die kompensatorische Wirkung mehrerer NOS-Isoformen maskiert werden.

Um einen zellulären Zugang zur Rolle von NO bei der neuronalen Entwicklung zu bekommen, haben wir uns auf die Untersuchung der Wanderheuschrecke und der afrikanischen Wüstenheuschrecke (*Locusta migratoria*, *Schistocerca gregaria*) konzentriert. Diese sehr ähnlich gebauten Insek-

zum adulten Insekt. Der Heuschreckenembryo lässt sich relativ leicht aus dem Ei herauspräparieren und intakt in Gewebekultur halten. Ein weiterer experimenteller Vorteil liegt darin, dass sich die ca. 50 Eier eines Geleges in unterschiedliche experimentelle und Kontrollgruppen gleichen Alters aufteilen lassen, die in Gewebekultur mit bioaktiven „small molecule“ Verbindungen oder blockierenden Antikörpern behandelt werden können. So wurde zum Beispiel am Heuschreckenembryo das erste Mitglied der Semaphorine, einer prominenten Familie von Zellerkennungsmolekülen identifiziert und seine kausale Funktion bei der axonalen

Die Wachstumskegel der Pionierneurone navigieren dabei entlang von sezernierten Semophoringradienten. Weitere Leitsignale sind von epithelialen Zellen exprimierte transmembranständige Semaphorine und Wegweiserzellen, an denen sich die Filopodien entlang der Segmentgrenzen orientieren können. Abbildung 3 zeigt das Auswachsen zweier Paare von Pionierneuronen von einer distalen Region in der Antennenknospe in proximaler Richtung zum Cerebralganglion im Kopf. In späteren Entwicklungsstadien schließen sich die Axone von weiteren Sinneszellen an, die sich im ektodermalen Epithel differenzieren.

Zum Auffinden von Embryonalstadien, in denen NO/cGMP gesteuerte Entwicklungsprozesse ablaufen, haben wir eine einfache zytochemische Technik eingesetzt, die von De Vente et al. (1987) erfunden wurde. Intakte Embryonen werden mit einem NO-Donor inkubiert, der die Bildung von cGMP in Zielzellen mit funktionell aktivierbaren sGC-Enzymen stimuliert. Der schnelle enzymatische Abbau des cGMP wird durch Gabe von Phosphodiesterase-Inhibitoren verhindert. Nach Fixierung des Gewebes kann das gebildete cGMP mit einem Antikörper in diskreten Zellen nachgewiesen werden. Typischerweise tritt die cGMP-Immunreaktivität oftmals nur in bestimmten Entwicklungsstadien vorübergehend auf. Ein Beispiel für Zielzellen, die eine NO-induzierte cGMP-Immunreaktivität beim axonalen Auswachsen zeigen, sind die zwei Paare von Pionierneuronen an der Antennenspitze (Abbildung 3E). Da die epithelialen Zellen an der Basallamina den NOS-Marker NADPH-Diaphorase exprimieren, vermuten wir, dass NO als ein endogener Botenstoff freigesetzt wird,

der als transzelluläres Signal auf die Pionierneurone einwirkt. Eine Inhibition der NO-Synthese durch einen NOS-Blocker (Abbildung 1) führt dosisabhängig zu einer Reduktion bis zur Verhinderung des Wachstums der Pionieraxone (Abbildung 3) (Seidel und Bicker 2000). Ein ähnlicher Effekt wird durch Hemmung der sGC erzielt. Um unspezifische Effekte der Enzyminhibitoren auf die Zellchemie des Embryos auszuschließen, konnten wir den Block der NOS durch 7NI und der sGC durch ODQ (Abbildung 1) durch eine gleichzeitige Applikation mit dem membranpermeablen cGMP-Analogen 8Br-cGMP vollständig aufheben (Abbildung 3D). Diese „Rescue-Experimente“ zeigen zudem, dass das cGMP-Signal nicht gerichtet auf den Wachstumskegel wirken muss, sondern eine homogene Badapplikation in der Gewebekultur ausreichend ist, um das vollständige Auswachsen der Pionieraxone zu gewährleisten (Seidel und Bicker 2000). Vermutlich wirkt zumindest in dem frühen Entwicklungsabschnitt an der Spitze der Antennenanlage die NO/cGMP-Kaskade

als ein permissives und nicht als ein instruktives Signal für das axonale Wachstum. Weiterführende Untersuchungen zeigen, dass die Wachstumsregulation der Antennenpioniere kein Spezialfall ist, sondern auch bei anderen Pionierneuronen die Steuerung des axonalen Wachstums über NO/cGMP erfolgt (Pätschke und Bicker 2007).

NO fördert Regeneration im Zentralnervensystem

Wir fragten uns nun, ob die Wachstumsregulation durch NO auf das periphere Nervensystem beschränkt ist, oder ob sich ähnliche Vorgänge auch im Zentralnervensystem abspielen. Da die frühembryonale Entwicklung des Zentralnervensystems nur unter Schwierigkeiten in Gewebekultur nachvollzogen werden kann, haben wir diese Fragestellung mithilfe eines Regenerationsparadigmas untersucht (Stern und Bicker 2008). Die Regeneration des geschädigten Nervensystems steht seit jeher im Mittelpunkt medizinischen und neurobiologischen

Visit us in Göttingen and discover...

The leading tools in neuroscience research

At MBF, we are dedicated to providing you with the most comprehensive microscopy image analysis solutions and the best support in the industry. We invite you to view our latest product offerings, including our new multi-channel confocal stereology system.

NeuroLucida® > Neuroanatomical Analysis

Stereo Investigator® > Unbiased Stereology

AutoNeuron® > Automated Neuron Tracing

Virtual Slice™ > Full-Slide Imaging



MicroBrightField Europe e.K.

web www.mbfbioscience.com | email info@mbfbioscience.com | phone +49 (0)391 732 6989

Providing solutions to neuroscience researchers for over 18 years

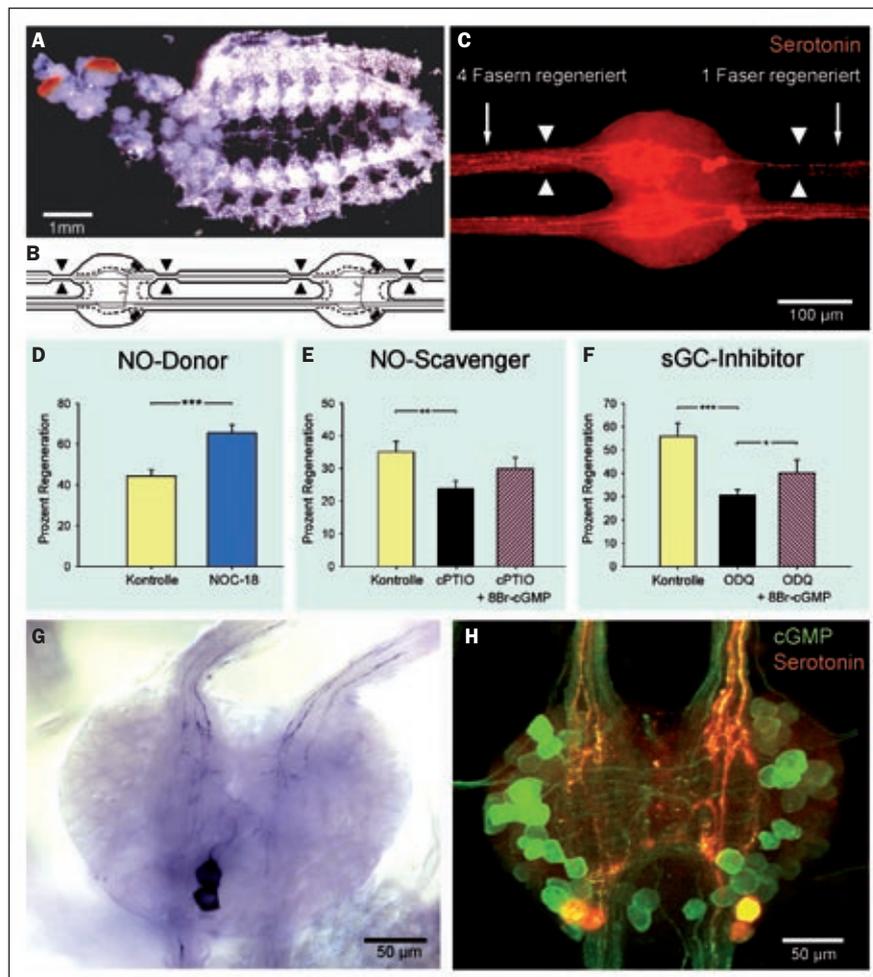


Abb. 4: Stickstoffmonoxid fördert die Regeneration serotonerger Axone im Heuschreckenembryo. (A) Filetpräparat eines zu 65% entwickelten Heuschreckenembryos in Kultur. Das Zentralnervensystem ist freigelegt. (B) Eines der beiden Konnektive zwischen zwei Abdominalganglien wird an zwei Stellen gequetscht (Pfeilspitzen). Danach wird das Präparat für 48 h bei 30°C kultiviert. (C) Fluoreszenzfärbung der vier in jedem Ganglion vorhandenen intersegmentalen serotonerger Interneurone, 48 h nach dem Quetschen. (D) Unter Kontrollbedingungen regenerieren nach 48 h ca. 40% der gequetschten Axone, in Gegenwart des NO-Donors NOC-18 (500 μ M) mehr als 60%. (E) Abfangen von intern produziertem NO mit dem Scavenger cPTIO reduziert die Regeneration, dies lässt sich im Rescue-Versuch mit membranpermeablem cGMP (8Br-cGMP) teilweise aufheben. (F) Inhibition der NO-abhängigen sGC mit ODQ (200 μ M) reduziert Regeneration, dies wird im Rescue mit 8Br-cGMP wieder aufgehoben. Daten in (D-F) sind Mittelwerte aus mindestens zehn Embryonen. (G) NADPH-Diaphorase-Färbung zeigt, dass zu diesem Zeitpunkt NO produzierende Neurone vorhanden sind. (H) Konfokale Aufnahme einer Doppelfärbung gegen Serotonin und cGMP nach Stimulation mit einem NO-Donor. Viele Neurone antworten auf NO mit cGMP-Produktion, die serotonerger sind auch darunter.

Interesses. Während periphere Nerven nahezu problemlos regenerieren, ist zumindest bei höheren Wirbeltieren Regeneration im Zentralnervensystem (ZNS) nur sehr eingeschränkt möglich. Darum steht die Suche nach regenerationsfördernden Faktoren im Fokus aktueller Forschung. Dazu bietet es sich an, mit Wirbellosen zu arbeiten, bei denen Regeneration auch im ZNS möglich ist. Wir konnten bereits zeigen, dass Axone

im adulten Heuschrecken-ZNS prinzipiell regenerieren (Pätschke et al. 2004). Noch besser lässt sich die Regeneration an einem Embryo-Kultursystem untersuchen. Dazu wird der späte Embryo geöffnet und mit freigelegtem ZNS in Kultur genommen (Abbildung 4A). Quetschen eines der paarigen Nerven, die die Ganglien des Bauchmarks verbinden, zerstört die darin verlaufenden Axone (Abbildung 4B). Mit

immunzytochemischen Methoden kann man die Regeneration einzelner (z.B. serotonerger) Axone verfolgen (Abbildung 4C) und quantifizieren. Innerhalb von zwei Tagen regenerieren ca. 40% der Axone über die Quetschstelle hinaus.

Appliziert man Substanzen, die NO freisetzen, erhöht sich dieser Prozentsatz signifikant (Abbildung 4D). Nicht nur extern zugefügtes Stickstoffmonoxid, sondern auch intern produziertes kann Regeneration fördern: Fängt man intern produziertes NO mit einem NO-Scavenger ab, ist die Regeneration reduziert (Abbildung 4E). Als interne NO-Quelle kommen neben Hämocyten vor allem NOS exprimierende Neurone in Frage, die mit der NADPH-Diaphorase-Technik sichtbar gemacht werden können (Abbildung 4G). Deren Axone könnten durch die Quetschung zur NO-Produktion angeregt werden. Wie im peripheren Nervensystem erfolgt auch im ZNS die Wirkung von NO über cGMP. Wird die sGC inhibiert, ist die Regeneration reduziert, lässt sich aber im Rescue-Versuch durch Zugabe von 8Br-cGMP teilweise wiederherstellen (Abbildung 4F). Die serotonerger Interneurone selbst, die hier als Beispiel betrachtet wurden, wie auch eine Vielzahl anderer Zellen vermag auf NO-Stimulation mit erhöhter cGMP-Produktion zu antworten (Abbildung 4H), sodass man von einem allgemeinen Effekt ausgehen kann. Es ist möglich, und sogar wahrscheinlich, dass NO das Wachstum von ZNS-Axonem nicht nur bei der Regeneration, sondern auch bei der natürlichen Entwicklung beeinflusst.

Der Einfluss von NO auf Regeneration geschädigten Nervengewebes ist auch aus anderen Organismen bekannt, z.B. aus dem ZNS des Blutegels (Duan et al. 2005), aber dort wirkt NO indirekt über die Vermittlung von Mikroglia. Auch bei der Regeneration des peripheren Nervensystems von Wirbeltieren scheint es eine Rolle zu spielen (Keilhoff et al. 2002), hier allerdings durch Förderung der für Regeneration wichtigen vorhergehenden Wallerschen Degeneration.

Zellmigration im enterischen Nervensystem

Viele der molekularen Leitsignale, die axonales Auswachsen steuern, sind identisch mit den Leitsignalen, die für eine gerichtete Wanderung von Neuronen bei der Hirnentwicklung verantwortlich sind (Song und Poo 2001). Daher überlegten wir, ob das NO/cGMP-System auch bei Insekten für die Regulation von Zellwanderung verantwortlich sein könnte. Wir untersuchten deshalb den

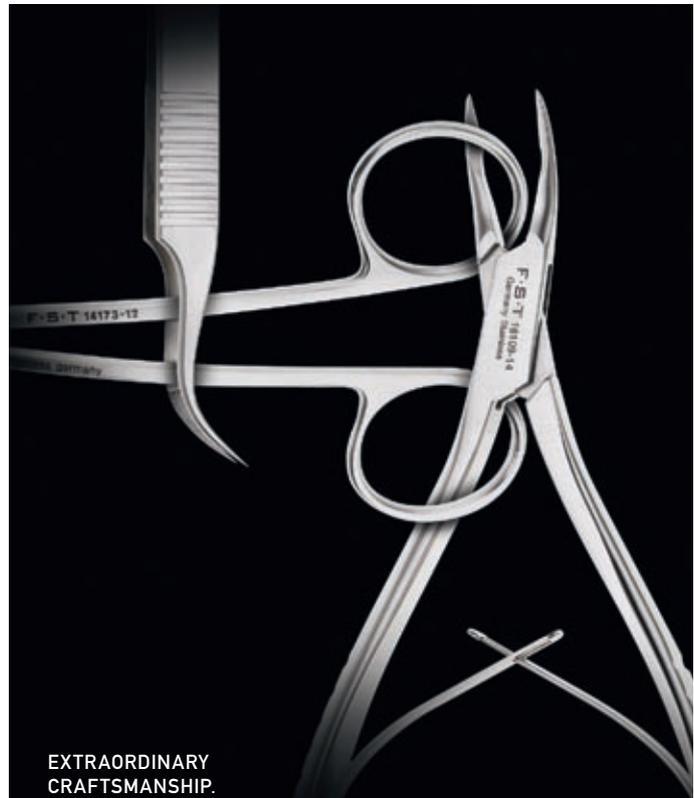
als stomatogastrisches oder auch als enterisches bezeichneten Teil des peripheren Nervensystems, das den Darm innerviert. Die Entwicklung des enterischen Nervensystems von Insekten ähnelt der umfangreichen Zellwanderung aus den Neuralleisten der Wirbeltiere, bei denen sich Ganglien des autonomen Nervensystems bilden. Daher ist das enterische Nervensystem der Insekten ein gut etabliertes Modellsystem für zellbiologische Studien der neuronalen Wanderung (Hartenstein 1997). Der Darm der Heuschrecke besteht aus drei Abschnitten, dem Vorder-, Mittel- und Hinterdarm. Die Neurone des Mitteldarmplexus werden in einer neurogenen Zone des ektodermalen Vorderdarms geboren und bilden Zellpakete von postmitotischen, aber noch nicht vollständig differenzierten Neuronen an der Grenze zwischen Vorder- und Mitteldarm. Anschließend durchlaufen sie eine Phase schneller Zellwanderung, während der sie die Mitteldarmgrenze überqueren und sich als „Kettenmigration“ auf vier geradlinig verlaufenden Zugstraßen über die Oberfläche des Mitteldarms bewegen (Abbildung 5A-C). Nach Beendigung dieser schnellen Wanderphase verlassen die Mitteldarmneurone die Zugstraßen, verteilen sich im Mitteldarmplexus und nehmen synaptische Kontakte mit der Darmmuskulatur auf (Abbildung 4D). Während der schnellen Wanderungsphase zeigen die Neuronen eine vorübergehende, NO-induzierte cGMP-Immunreaktivität, die mit dem Ausreifen des Plexus nachlässt (Haase und Bicker 2003). Die Bildung von cGMP wird daher entwicklungsabhängig reguliert und korreliert mit der Wanderungsphase und dem Neuritenwachstum. Wir zeigten durch Westernblotting mit einem Antikörper gegen eine konservierte Sequenz in der NOS, dass sich in den Entwicklungsstadien der Wanderungsbewegung im Darmgewebe eine höhere Konzentration des Enzyms als im zentralen Nervengewebe befindet (Knipp und Bicker 2009). Damit stellt der Darm eine potenzielle NO-Quelle dar, die das „Timing“ der Zellwanderung zur Innervierung seines Plexus über cGMP regulieren kann. Zur Untersuchung einer kausalen Beziehung zwischen dem NO/cGMP-System und der Zellmigration haben wir wieder in unserem Embryokultursystem die Signaltransduktion in Echtzeit chemisch manipuliert. Die Blockade der endogenen NO-Synthese verhindert die Migration der Mitteldarmneurone (Haase und Bicker 2003). Der sGC-Inhibitor ODQ blockiert ebenfalls dosisabhängig die Zellwanderung. Da ein spezifischer PKG-Inhibitor außerdem die Zellmigration hemmt, wirkt cGMP vermutlich über PKG als Effektorenzym. Die Verzögerung der Neuronenwanderung durch Hemmung der NO- oder cGMP-Synthese kann durch exogene Gabe von membranpermeablem cGMP oder der pharmakologischen Stimulation der sGC vollständig aufgehoben werden (Abbildung 5E-J). Die Rescue-Experimente zeigen, dass die NO/cGMP-Signaltransduktion essenziell für die Regulation der Zellwanderung ist und *in vivo* ein gewisser cGMP-Spiegel für die Beweglichkeit der Mitteldarmneurone benötigt wird. Da die Inhibition der NOS oder sGC keine Fehler in der Navigation auf den Wanderungsstraßen hervorruft, gibt es bei dieser Form der Zellmigration keine Evidenz für eine richtungsweisende Funktion der NO-Freisetzung. NO wirkt also permissiv aber nicht instruktiv auf die gerichtete Zellwanderung.

Um eine transzelluläre Diffusion von NO aus den Darmzellen zu den wandernden Mitteldarmneuronen zu untersuchen, wurde Hämoglobin als NO-Scavenger (Abbildung 1) eingesetzt. Da exogen zugesetztes Hämoglobin durch seine Molekülgröße bedingt in der extrazellulären Gewebeflüssigkeit verbleibt, ist sein Hemmeffekt auf die Zellwanderung der Mitteldarmneurone

als Evidenz für eine interzelluläre NO/cGMP-Signalübermittlung zu werten (Knipp und Bicker 2009).

Es ist momentan noch nicht im Detail bekannt, wie die NO/cGMP/PKG-Kaskade das Wanderverhalten der Mitteldarmneurone beeinflusst. Die Zellwanderung wird von einer Umorganisation des Zytoskeletts begleitet und hängt unter anderem von Kräften ab, die bei der Polymerisation von Aktin an den Wachstumskegeln ansetzen. Die Aktinfilamente werden an dem unterliegenden Substrat angeheftet und tragen so zur Translokation des Wachstumskegels bei. Wir haben filamentöses Aktin in den wandernden Mitteldarmneuronen mittels fluoreszenzgekoppeltem Phalloidin mikroskopisch visualisiert. In der Wanderphase sind Aktinfilamente hauptsächlich in den Zellfortsätzen und nicht im Zellkörper lokalisiert. Unter Bedingungen, in denen die Wanderung durch eine Blockade der NO/cGMP/PKG-Kaskade unterbunden wird, bildet sich ein dichtes Netzwerk von Aktinfilamenten im Zellkörper (Haase und Bicker 2003). Dieser Zustand kann auch durch eine Aktivierung der cAMP/Proteinkinase A-Signalkaskade erreicht werden. Die chemischen Manipulationen in Embryokultur zeigen, dass die NO/cGMP-Signaltransduktion antagonistisch zur cAMP/PKA-Kaskade auf die Zellwanderung wirkt.

Neben den wandernden Neuronen wird der Mitteldarmplexus auch von zusätzlichen Neuriten innerviert, die am Vorderdarm positionierten kleinen Ganglienknotten des enterischen Nervensystems entspringen und größtenteils durch Serotonin-Immunzytochemie darstellbar sind (Stern et al. 2007). Das Neuritenwachstum dieser Neuronenpopulation folgt unmit-



EXTRAORDINARY CRAFTSMANSHIP.

Fine Science Tools is committed to serving the world's scientific and biomedical research communities with a full range of precision surgical and micro-surgical instruments. Unparalleled quality and customer service has made us the leading global distributor of fine European surgical tools.

finescience.de
+49 (0) 6221 905050

F · S · T[®]
FINE SURGICAL INSTRUMENTS FOR RESEARCH™ FINE SCIENCE TOOLS

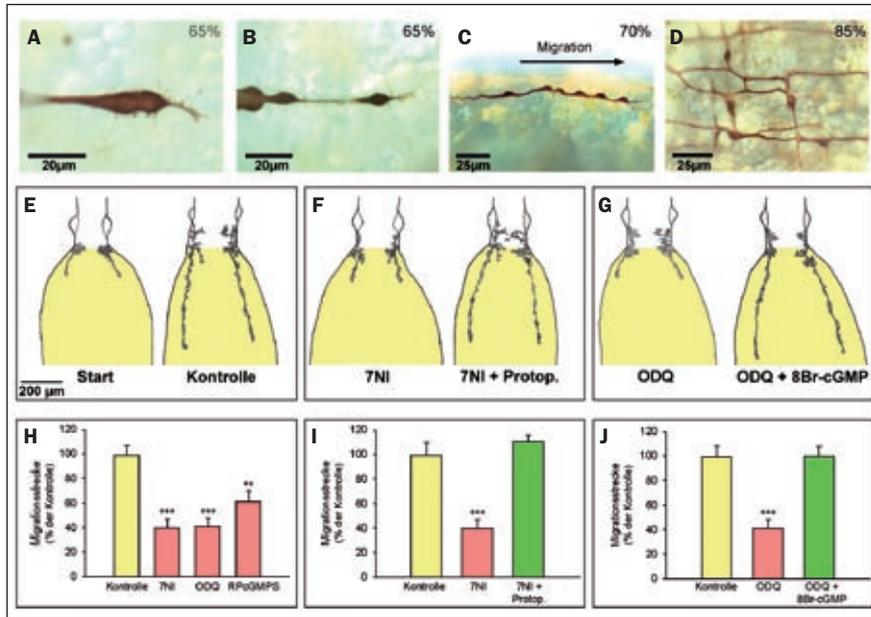


Abb. 5: Stickstoffmonoxid reguliert die Migration enterischer Neurone im Heuschreckenembryo. (A-D) NO-induzierte cGMP-Immunfärbung migrierender enterischer Neurone auf dem Mitteldarm in verschiedenen Entwicklungsstadien (angegeben in %). Die führenden Neurone lassen immunreaktive Filopodien erkennen (A, B), werden von einer Kette von wandernden Neuronen gefolgt (C), die später die Zugstraßen verlassen und einen Plexus ausbilden (D). (E-H) Zeichnungen von cGMP-immunreaktiven enterischen Neuronen vor (Start) bzw. nach 24 Stunden in Kultur (alle anderen Zeichnungen). Es sind jeweils zwei von insgesamt vier Zugstraßen pro Darm gezeichnet. Zu Beginn des Experiments befinden sich die Neurone an der Grenze zwischen Vorderdarm und Mitteldarm (gelb) und wandern in 24 h ca. 300 µm posterior (E). Inhibition der NOS mit 7NI verhindert diese Migration, lässt sich aber durch direkte Stimulation der sGC mit Protoporphyrin IX wiederherstellen (F, I). Inhibition der sGC mit ODQ verhindert die Migration, lässt sich aber durch gleichzeitige Applikation des membranpermeablen cGMP-Analogons 8Br-cGMP wiederherstellen (G, J). Auch Inhibition der Proteinkinase G mit RPcGMPS hemmt die Migration (H). Die Daten in H-J sind Mittelwerte aus jeweils mindestens zehn Embryonen.

telbar der Kettenmigration der Mitteldarmneuronen auf den vier Wanderungsstraßen. Diese Neuriten zeigen keine NO-induzierte cGMP-Synthese. Dadurch konnten wir die Frage entscheiden, ob sich eine Blockade der NO-Synthese auch auf die Entwicklung von Neuronen auswirkt, die keine unmittelbaren Zielzellen der NO/cGMP-Kaskade sind. Wird die Wanderung der Mitteldarmzellen pharmakologisch mit 7NI gehemmt, so wird auch das Auswachsen der serotonergen Fasern verzögert (Stern et al. 2007). Damit ist gezeigt, dass Entwicklungsdefekte, die durch eine Störung der NO-Synthese bedingt sind, auch auf andere Zellen außerhalb der NO/cGMP-Signalkaskade übersprechen.

Verkehrsregulation der Zellwanderung durch CO

Durch seinen einfachen Verlauf auf den geradlinigen Zugstraßen und die Mög-

lichkeit, eine Vielzahl von Embryonen im gleichen Entwicklungsstadium in der Multiwellplatte mit chemischen Verbindungen zu inkubieren, bietet sich die Zellwanderung auf dem Mittelarmplexus als ein Screeningsystem für die expandierende neue Disziplin der „chemischen Biologie“ an. Die bisher beschriebenen Versuche zeigten, dass wir den „loss of function“ Defekt in der Zellwanderung, durch Zugabe von Enzymaktivatoren stromabwärts des Blocks der NO-Signaltransduktionskette (Abbildung 1) kompensieren konnten. Wir haben inzwischen eine Reihe von Verbindungen auf ihre Wirksamkeit getestet, die Zellwanderung zu beschleunigen. Ein Überschuss des NOS-Substrats L-Arginin, verschiedene NO-Donoren und die Verstärkung der sGC-Enzymaktivität mit dem NO-unabhängigen Aktivator YC-1 führen jedoch zu keiner statistisch signifikanten Beschleunigung der Zellwan-

derung. Überraschenderweise konnten wir jedoch mit niedrigen Konzentrationen von bestimmten Metalloporphyrinen, die als Hänoxigenase-Inhibitoren wirken, eine robuste Beschleunigung der Zellwanderung erzielen (Knipp und Bicker 2009). Hänoxigenase katalysiert den Abbau von Häm zu Biliverdin, einem Prozess, bei dem Kohlenstoffmonoxid (CO) als Beiprodukt frei wird (Boening und Snyder 2003). Umgekehrt kann man durch Applikation eines Hänoxigenase-Substrats oder von CO-Donoren auf den Insektenembryo die Zellwanderung wieder verzögern. Durch Arbeiten, die im Labor von Solomon Snyder ihren Ausgang nahmen, steht CO unter gut begründetem Verdacht, ein weiterer gasförmiger Botenstoff zu sein, der im Nervensystem aktivitätsabhängig gebildet wird. Wir konnten am Insektenembryo zeigen, dass die wandernden Mitteldarmneuronen eine transiente Immunreaktivität gegen die neuronale Isoform der Hänoxigenase zeigen (Knipp und Bicker 2009). Da die pharmakologische Hemmung der Hänoxigenase zu einem „gain of function“ in der Zellwanderung führt, postulieren wir, dass eine endogene CO-Produktion in den Mitteldarmneuronen die Zellwanderung verzögert. Sowohl NO als auch CO binden an sGC, aber bei der Stimulation der enzymatischen cGMP-Bildung ist NO um Größenordnungen effizienter als CO. Daher könnte über einen Wettbewerbsmechanismus CO als endogener Koregulator die NO-induzierte cGMP-Bildung verringern und als Bremspedal die Wanderung der Mitteldarmneuronen dem Verkehrsfluss anpassen.

Regulation der Zellmotilität im Nervensystem von Vertebraten

Da NO bereits als ein essenzieller Mediator der Zellwanderung in der glatten Muskulatur, in Epithelien und bei Makrophagen identifiziert wurde (Brown et al. 1999; Elferink und VanUffelen 1996), ist es im Rückblick eigentlich nicht verwunderlich, dass dieser gasförmige Botenstoff auch als Regulator der Zellmotilität bei der Entwicklung in Vertebratennervensystemen eingesetzt wird. Bei einem bestimmten NO synthetisierenden Neuron der Schnecke *Helisoma* orchestriert die NO/cGMP-Signalbahn das Neuritenwachstum und eine Verlängerung der Filopodien auf dem Wachstumskegel (Trimm und Rehder 2004). Diese präzise Funktion steht vermutlich im Zusammenhang mit einer verbesserten Orientierung des Wachstumskegels an Entscheidungspunkten der



Wegfindung. Erstaunlicherweise reguliert NO nicht nur die Zellwanderung in tierischem Gewebe, sondern besitzt auch beim Spitzenwachstum von pflanzlichen Pollenschläuchen eine Leitfunktion (Prado et al. 2004). Da viele der Signalkaskaden der axonalen Navigation zwischen Evertrebraten und Vertebraten in der Evolution konserviert sind, wollen wir uns der Frage zuwenden, ob NO auch bei den massiven Neuronenwanderungen bei der Entwicklung des Wirbeltiergehirns eine Rolle spielt.

Es gibt in der Tat eine Reihe von Hinweisen, die diese Vorstellung unterstützen. Neuroanatomische Studien mit Markern gegen NOS und sGC deuten darauf hin, dass die wandernden Neuroblasten des rostralen migratorischen Stroms potenzielle Zielzellen für NO Signale sind (Guitierrez-Mecinas et al. 2007). Bei der Entwicklung des menschlichen Rückenmarks exprimieren definierte Untergruppen von Interneuronen auf ihrer Wanderung zum Zielgebiet NOS (Foster und Phelps 2000). Für die transiente Expression von Enzymen der NO/cGMP/PKG-Kaskade in kritischen Phasen der Hirnentwicklung lassen sich noch weitere Beispiele anführen.

Die Bildung des Zerebellums ist charakterisiert durch eine charakteristische Wanderung der Körnerzellen von der externen zu der internen Körnerzellschicht. Eine pharmakologische Blockade der NOS oder der Einsatz des NO-Scavengers Hämoglobin in einem Kultursystem für Zerebellumschnitte hemmen die Wanderung der Körnerzellen (Tanaka et al. 1994). Diese Experimente sind Evidenz für eine Rolle von endogener NO-Synthese bei Wanderungsprozessen der Körnerzellen. Knockout-Mäuse, die in einer Isoform der PKG defizient sind, zeigen Störungen in der Entwicklung des Neokortex, die sich auf abnormale neuronale Wanderung zurückführen lassen und damit die cGMP/PKG-Signalbahn implizieren (Demyanenko et al. 2005). Kürzlich wurde ein besonders spektakuläres Beispiel für strukturelle Plastizität im Nervensystem entdeckt, das auf einer gerichteten Orientierung von präsynaptischen Zellfortsätzen beruht. Die NO-Freisetzung aus hippocampalen Neuronen induziert retrograd eine multiaxonale Innervation der dendritischen Spines (Nikonenko et al. 2008).

Lassen sich nun die Ergebnisse vom Entwicklungsmodell des Insektenembryos auch auf die menschliche Gehirnentwicklung übertragen? Um diese Frage ansatzweise experimentell anzugehen, haben wir Neurosphärenkulturen einer humanen Teratokarzinomzelllinie (Ntera2) etabliert, die sich unter dem Einfluss von Retinsäure in postmitotische Neuronen differenzieren (Paquet-Durand und Bicker 2007). Werden die Neurosphären auf adhärenthem Substrat plattiert, so migrieren die Vorläuferzellen aus der Peripherie aus und lassen sich videomikroskopisch bezüglich ihrer Wanderstrecke quantifizieren. Wir konnten durch Blockade wie durch Aktivierungsexperimente eine positive Wirkung von NO/cGMP/PKG-Signaltransduktion auf die Motilität neuronaler Vorläuferzellen in der Zellkultur nachweisen (Tegenge und Bicker 2008). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sowohl bei der Entwicklung des Grashüpfer- wie des menschlichen Nervensystems NO als Regulator für Mechanismen der Zellwanderung dient.

Literatur

Garthwaite, J. (2008): Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *Eur J Neurosci* 27: 2783-2802.

The "Swiss Army Knife" of Electrophysiology



ELC-03XS

Suitable for **extracellular recordings** with high gain, **juxtosomal filling** of dyes or DNA, **intracellular recordings**, **whole-cell patch clamp** in true CC or VC mode, single cell stimulation and **electroporation**, amperometry and voltammetry, and iontophoresis

Versatile Current Clamp Amplifier

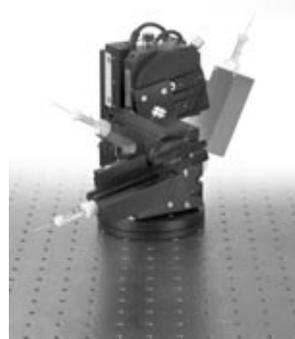


BA-03X

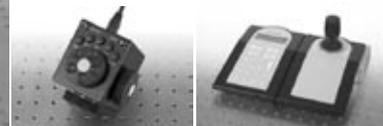
Suitable for **intracellular recordings**, **extracellular recordings** with high gain and **electroporation**

Ψ Scientifica

PatchStar



The PatchStar is a high precision, stable and motorized manipulator, with the ability to move in XYZ and a virtual approach axis. It offers a resolution of 20 nm, 4 axes of motion (three real, one virtual) and is electrically silent.



Other npi electronic instruments

- Single Electrode voltage clamp amplifiers
- Two Electrode voltage clamp amplifiers
- Temperature control systems
- Bridge-/Intracellular amplifiers
- Extracellular amplifiers
- EPMS modular system, Bessel filters
- Drug application systems
- Data acquisition hard and software
- Voltammetric / amperometric amplifiers
- ALA Scientific perfusion systems and accessories
- EXFO Burleigh micropositioners and mounts
- Scientifica micropositioners and mounts

npi electronic GmbH

Hauptstrasse 96, D-71732 Tamm, Germany
Phone +49 (0)7141-9730230; Fax: +49 (0)7141-9730240
support@npielectronic.com; http://www.npielectronic.com



- Haase, A. und Bicker, G. (2003): Nitric oxide and cyclic nucleotides are regulators of neuronal migration in an insect embryo. *Development* 130: 3977-3987.
- Knipp, S. und Bicker, G. (2009): Regulation of enteric neuron migration by the gaseous messenger molecules CO and NO. *Development* 136: 85-93.
- Seidel, C. und Bicker, G. (2000): Nitric oxide and cGMP influence axonogenesis of antennal pioneer neurons. *Development* 127: 4541-4549.
- Stern, M., Knipp, S. und Bicker, G. (2007): Embryonic differentiation of serotonin-containing neurons in the enteric nervous system of the locust (*Locusta migratoria*). *J Comp Neurol* 501: 38-51.
- Stern, M. und Bicker, G. (2008): Nitric oxide regulates axonal regeneration in an insect embryonic CNS. *Dev Neurobiol* 68: 295-308.
- Wolf, G. (1997): Gasproduktion im Nervensystem: Stickoxid. *Neuroforum* 3/97: 100-107.

Eine vollständige Literaturliste kann bei den Autoren angefordert werden.

Danksagung

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung und allen Mitgliedern unseres Labors für ihre Beiträge zur Forschung an der NO-Signaltransduktion.

Kurzbiografien

Gerd Bicker: 1970–1976 Studium der Biologie in Freiburg. Promotion an der Universität Freiburg von 1976–1979 mit Aufenthalt am Weizmann Institute of Science. Anschließend Postdoc an der University of California, Santa Cruz und der University of Alberta, Edmonton von 1979-1982. Wissenschaftlicher Mitarbeiter und Oberassistent an der FU Berlin von 1982-1992. Von 1992-1997 Heisenberg-Stipendiat der DFG mit mehreren Forschungsaufenthalten am Department of Molecular and Cell Biology, University of California, Berkeley. Seit 1997

Professor für Zellbiologie an der Tierärztlichen Hochschule Hannover.

Michael Stern: 1986-1992 Studium der Biologie in Hamburg, 1995 Promotion an der Universität Hamburg, 1995-1997 Postdoc am Sussex Centre for Neurosciences, UK. Seit 1998 wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe Bicker an der Tierärztlichen Hochschule Hannover.

Korrespondenzadresse

Prof. Gerd Bicker
 Abteilung Zellbiologie,
 Physiologisches Institut,
 Stiftung Tierärztliche Hochschule
 Hannover
 Bischofsholer Damm 15/102
 30173 Hannover
 Tel: + 49 (0)511 856-72 72
 Fax: + 49 (0)511 856-76 87
 E-Mail: gerd.bicker@tiho-hannover.de

STELLENMARKT

UNIVERSITÄT LEIPZIG



Max Planck Institute
for Evolutionary Anthropology

MAX-PLANCK-GESSELLSCHAFT

MAX
PLANCK
INSTITUTE
FOR
HUMAN
COGNITIVE AND BRAIN SCIENCES
LEIPZIG



The International Max Planck Research School Neuroscience of Communication: Function, Structure, and Plasticity is based at the MPI for Human Cognitive and Brain Sciences, Leipzig (Germany) and the University of Leipzig, also involving the MPI for Evolutionary Anthropology, Leipzig and the Institute of Cognitive Neuroscience at UCL (UK).

The IMPRS offers a unique interdisciplinary graduate programme to study the functional, structural, and plastic bases of human communication. Besides behavioural work, the programme draws on elaborate modern imaging techniques including a 7-Tesla MRI scanner and a 306-channel MEG system.

The school invites **applications for PhD scholarships**.

Successful candidates will be accepted into one of the following four modules: (1) Verbal Communication (Language), (2) Non-verbal Communication (Action and Interaction), (3) Neuroscience, or (4) Methods. Requirement for successful candidates is a Master's (or qualified equivalent) degree in disciplines like computer science, linguistics, neurobiology, neurology, physics, psychiatry, psychology, or related fields.

Further requirements include outstanding academic performance; excellent oral and written English language skills; aptitude for original, independent, and creative work; performed research and published, or submitted for publication, results (desirable). Candidates near to completion may also submit applications, indicating the date of completion. Depending on qualification and background, we may consider applicants with a Bachelor's degree.

The application must be supported by a degree and school certificate, academic transcripts, a CV, three names and email addresses of academic referees, and a personal statement explaining the candidate's motivation and reasons for pursuing a PhD at the IMPRS. Applications should indicate the preferred module into which the candidate wishes to be accepted, and specify the preferred supervisor. Applications are to be submitted in electronic format only until **31 March 2009**.

All admitted students receive a scholarship for the duration of 3 years. The graduate programme will start with the Summer Semester 2009 at the University of Leipzig (1 April 2009). The language of the IMPRS is English. Further information under: <http://imprs-neurocom.mpg.de>.

Contact: Dr Antje Holländer, IMPRS Co-ordinator, e-mail: imprs@cbs.mpg.de, phone: +49 (0)341 9940-2261