Wissenschaft – Neural tube patterning

Pax6: Funktionen entlang der rostro-kaudalen Achse des Neuralrohrs

Rosa-Eva Hüttl1,2 und Andrea B. Huber1,3

1 Institut für Entwicklungsgenetik, Helmholtz Zentrum München, Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt (GmbH), Ingolstädter Landstr. 1, 85764 Neuherberg

2 Institut für Physiologische Genomik, Ludwig-Maximilians-Universität München, Pettenkoferstr. 12, 80336 München

3 Bernstein Coordination Site (BCOS), Bernstein Network Computational Neuroscience, Albert Ludwigs Universität Freiburg, Hansastr. 9A, 79104 Freiburg

# Abstract

During development of the CNS, proliferation, cell fate designation, and patterning decisions are tightly regulated by interdependent networks of key transcriptional regulators. We propose a novel aspect of how Pax6 not only utilizes its modular structure to perform distinct functions but also employs individual sub-domains, thus generating a new level of complexity for transcriptional regulation by one single transcription factor in dorso-ventral and rostro-caudal neural tube patterning.

Hinterhirn und Rückenmark beherbergen ein komplexes Netzwerk aus Inter (IN)- und Motorneuronen (MN), die für die Koordination des Bewegungsapparates unabdingbar sind. Die Bildung dieser Zellen in der frühen Embryonalentwicklung (7-8 Tage nach der Befruchtung) hängt von einer Vielzahl sich gegenseitig regulierender Transkriptionsfaktoren (TF) und deren Auswirkungen auf Progenitoren in der Ventrikulärzone ab (Abb. 1A). Je nach dorso-ventraler Position entstehen unterschiedliche Zelltypen: Die Progenitor (p) MN Domäne generiert unter der Regie der TF Pax6 und Olig2 im Hinterhirn und Rückenmark somatische MN (sMN). Aus den weiter dorsal gelegenen p2 und p1 Domänen gehen ventrale (V) IN hervor. Eine Sonderstellung nimmt die p3 Domäne ein: Vorläuferzellen exprimieren *Nkx2.2* und produzieren im Hinterhirn branchio- und viszeromotorische Nervenzellen (bMN, vMN). Im Rückenmark entstehen in dieser Domäne V3 IN (Abb. 1B, C). Bei der Ausbildung dieser Domänen, und insbesondere der Grenzen dazwischen, spielen Wechselwirkungen dieser lokal exprimierten TF eine entscheidende Rolle [1]. Interessanterweise ermöglicht der modulare Aufbau der DNA-Bindedomänen von Pax6 dabei selektive Funktionalitäten nicht nur entlang der dorso-ventralen, sondern auch der rostro-kaudalen Achse des Neuralrohrs.

## Pax6 und Nkx2.2 inhibieren sich gegenseitig

Der zur Familie der Paired Box Gene gehörige TF Pax6 wurde als eines der maßgeblich an der Augenentwicklung beteiligten Gene entdeckt. Die für die Proteinfamilie charakteristische Paired Domain (PD) spielt jedoch auch während der Ausbildung der Progenitordomänen und anschließenden Neurogenese nicht nur im Gehirn, sondern auch im Neuralrohr eine entscheidende Rolle ([2], Abb. 2A). *Pax6* wird von Vorläuferzellen in der Ventrikulärzone exprimiert und der TF bildet einen von ventral nach dorsal zunehmenden Gradienten entlang der Ventrikulärzone aus(Abb. 1A). In der funktionellen Null-Mutante *Pax6Sey* geht die repressive Interaktion mit *Nkx2.2* verloren, was zu einer Expansion der p3 Domäne führt und eine veränderte Identität der ursprünglichen pMN-Vorläuferzellen nach sich zieht. Dies bedeutet, dass im Hinterhirn bMN und vMN anstatt sMN generiert werden. Des Weiteren hat der Verlust von Pax6 zur Folge, dass die weiter dorsal gelegenen Progenitordomänen und die daraus hervorgehenden IN nicht gebildet werden ([3], Abb. 2B). Im Umkehrschluss führt der Verlust von Nkx2.2 dazu, dass MN in ventrale Bereiche des Neuralrohrs expandieren, während Zellen, die in der p3 Domäne generiert werden, verloren gehen [4].

## Hinterhirn: Die PAI Unterdomäne ist verantwortlich für die p3-pMN Grenze

Interessanterweise ist die PD in zwei Subdomänen unterteilt, welche unterschiedliche DNA-Bindestellen erkennen ([5], Abb. 2A): PAI und RED. Mittels N-Ethyl-N-Nitrosoharnstoff wurden Mausmodelle generiert, welche den Augen-Phänotyp lens-corneal-adhesions (Leca) zeigten, der unter anderem auch durch spezifische Punktmutationen in den PAI (*Pax6Leca4*) oder RED (*Pax6Leca2*) Unterdomänen der Pax6 PD zustande kommt ([6], Abb. 2A). Eine genaue Analyse dieser Mäuse zeigte unterschiedliche Rollen der beiden Domänen hinsichtlich Proliferation und Neurogenese während der Entwicklung des Gehirns: Verlust der RED Domäne steigerte die Proliferation von Progenitorzellen im Kortex, während eine Mutation der PAI Domäne einen gegenteiligen Effekt erzielte. Lediglich in *Pax6Leca4* mutanten Mäusen war auch die Neurogenese betroffen, was zu einem schmaleren Kortex mit verringerten Neuronenzahlen führte und phänotypisch die Ereignisse in Kortizes von *Pax6Sey* Mutanten widerspiegelt [7].

Im Hinterhirn zeigt sich in *Pax6Sey* und *Pax6Leca4* Mutanten ein ähnliches Bild: Die p3 Domäne ist in diesen Tieren auf Höhe der Nervenzellen der VI. und XII. Hirnnerven vergrößert, während die pMN Domäne stark reduziert ist. Dies hat auch hier einen Identitätswechsel von sMN sowie einen Verlust eben jener Hirnnerven zur Folge (Abb. 2B, C). Erstaunlicherweise wirkt sich eine Mutation der RED Unterdomäne nicht auf Domänengrenzen oder Neurogenese aus, was dafür spricht, dass die PAI Unterdomäne maßgeblich an den molekularen Mechanismen zur Grenzbildung und MN Entwicklung beteiligt ist [8].

Im Gegensatz zu *Pax6Sey* Embryonen wurden in beiden selektiven Mutanten die weiter dorsal gelegenen Progenitordomänen sowie die ventralen IN normal gebildet (Abb. 2B, C). Einerseits könnten hier andere Bindestellen von Pax6, wie z.B. die HD oder TA-Domäne mitwirken, da diese in den Leca-Mutanten intakt sind. Andererseits ist es möglich, dass PAI und RED Domäne redundant für die jeweils andere einspringen, um die Neurogenese ventraler IN im Hinterhirn sicherzustellen.

## Rückenmark: p3-pMN Grenze und Motorneuronen

Bislang wurde die Rolle von Pax6 zur Kontrolle der Domänenbildung und Neurogenese hauptsächlich im Gehirn und Hinterhirn untersucht, während über die Funktion des TF im Rückenmark nur sehr wenig bekannt ist.

Bei der Untersuchung von *Pax6Sey* und *Pax6Leca4* Mutanten ergibt sich auf den ersten Blick ein ähnliches Bild: Die Anzahl der MN in der medialen Kernsäule (MMC, Abb. 1C, 2D, E), welche axiale Skelettmuskulatur innervieren, ist reduziert. MN der auf das brachiale und lumbale Rückenmark begrenzten lateralen Kernsäulen (LMC) werden normalerweise in gleicher Anzahl in den medialen und lateralen Teilen gebildet und innervieren die Muskulatur der Vorderbeine (Abb. 1C). Verlust von Pax6 führt zu einer Verschiebung der Anzahl dieser Zellen hin zu medialen LMC MN, der Anteil lateraler MN am der gesamten LMC ist verringert. Während die pMN Domäne auch in *Pax6Leca4* Embryonen kleiner ist als in Kontrolltieren, ist im Gegensatz zur *Pax6Sey* Mutante die p3 Domäne jedoch nicht vergrößert. Auch die unveränderte Zellzahl von V3 IN spricht gegen eine Identitätsänderung der MN zu diesem Zelltyp bei einem Funktionsverlust der PAI Unterdomäne ([8], Abb. 2D, E).

Je weiter kaudal die Progenitorzonen im Rückenmark gelegen sind, desto unwichtiger scheint Pax6 für die Bildung der Domänengrenzen zu sein. Pax6 inhibiert *Nkx2.2* über die Regulierung extrazellulärer Wnt-Inhibitoren, wie z.B. sFRP2. Entlang der rostro-kaudalen Achse gewinnt der TF Sp8 immer mehr an Bedeutung, und nur bei simultaner Blockade der beiden TF Pax6 und Sp8 findet man eine Expansion der p3 Domäne in lumbalen oder sakralen Bereichen des Rückenmarks [9]. Ähnliche Ergebnisse zeigen sich im lumbalen Rückenmark von *sFRP2* Mutanten [10], was eine Interaktion des Wnt-Signalweges mit Sp8 impliziert. Interessanterweise fehlt sowohl in *Pax6Sey* als auch in *Pax6Leca4* Mutanten eine spezifische Untergruppe von Sp8-positiven MN in der MMC (Abb. 2D, E). Während der TF jedoch in *Pax6Sey* Tieren herunterreguliert wird, ist er in *Pax6Leca4* Mutanten in der Ventrikulärzone hochreguliert.

Dies spricht für eine spezifische Funktion der PAI Domäne in der MN Entwicklung im brachialen Rückenmark, während die Regulierung der Wnt/Sp8 Signalwege zur korrekten p3-pMN Grenzbildung wahrscheinlich redundant von beiden Subdomänen gesteuert wird.

## Rückenmark: pMN-p2 Grenze und Interneuronen

Während im Hinterhirn der *Pax6Sey* Mutante die Progenitordomänen der V1 und V2 IN komplett fehlen [8], haben Mutationen der PAI oder RED Unterdomänen keinen Einfluss auf die Bildung dieser Zellen.

Im Rückenmark von *Pax6Sey* Mutanten ergibt sich ein ähnliches Bild wie im Hinterhirn: V1 IN fehlen gänzlich, und analog zur verkleinerten p2 Domäne werden geringere Anzahlen von V2 IN generiert (Abb. 2D). Dies hängt hauptsächlich mit der Tatsache zusammen, dass in *Pax6Sey* Tieren Neurogenin (Ngn) 2, das maßgeblich zur Interneuronenbildung beträgt, sowie bestimmte Enhancergene für Ngn 2 dereguliert sind [11].

Im Vergleich zur funktionellen Null-Mutante ergibt sich in *Pax6Leca4* Embryonen ein gänzlich gegensätzliches Bild: die p2 Domäne ist deutlich vergrößert und es werden mehr ausdifferenzierte V2 IN gebildet (Abb. 2E). Gleichzeitig sind Ngn1 und insbesondere Ngn2 signifikant hochreguliert. Dies lässt auf veränderte Bedingungen in der wechselseitigen Regulierung von Pax6 und Ngn2 im Rückenmark schließen, welche höchstwahrscheinlich sowohl Vorläuferzellproliferation als auch Differenzierung zu Nervenzellen beeinflussen [8].

So ergeben sich unterschiedliche Rollen während der Entwicklung für die PD Unterdomänen, insbesondere für PAI, entlang des Neuralrohrs. Im Hinterhirn scheint die Hauptaufgabe in der Regulierung der p3-pMN Grenze und der verlässlichen Bildung bestimmter MN Subtypen zu liegen. Im brachialen Rückenmark wird diese Grenze verlässlich gebildet, während die PAI Subdomäne in der Grenzbildung zwischen pMN und p2 Domäne involviert zu sein scheint.

Unsere Ergebnisse zeigen daher einen neuen Aspekt der Funktionalität eines modular aufgebauten TF auf: Pax6 nutzt nicht nur seine unterschiedlichen Paired und Homeodomänen, um unterschiedliche Funktionen auszuführen, sondern auch individuelle Subdomänen. Diese generieren damit eine neue Komlexitätsebene für Transkriptionsregulation durch einen einzelnen TF sowohl für dorso-ventrale, als auch für rostro-kaudale Musterbildung im Neuralrohr.

# Literatur

1. Guthrie, S., *Patterning and axon guidance of cranial motor neurons.* Nat Rev Neurosci, 2007. **8**(11): p. 859-71.

2. Haubst, N., Berger, J., Radjendirane, V., et al., *Molecular dissection of Pax6 function: the specific roles of the paired domain and homeodomain in brain development.* Development, 2004. **131**(24): p. 6131-40.

3. Ericson, J., Rashbass, P., Schedl, A., et al., *Pax6 controls progenitor cell identity and neuronal fate in response to graded Shh signaling.* Cell, 1997. **90**(1): p. 169-80.

4. Briscoe, J., Sussel, L., Serup, P., et al., *Homeobox gene Nkx2.2 and specification of neuronal identity by graded Sonic hedgehog signalling.* Nature, 1999. **398** (6728): p622-7

5. Epstein, J.A., Glaser, T., Cai, J., et al., *Two independent and interactive DNA-binding subdomains of the Pax6 paired domain are regulated by alternative splicing.* Genes Dev, 1994. **8**(17): p. 2022-34.

6. Thaung, C., West, K., Clark, B. J., et al., *Novel ENU-induced eye mutations in the mouse: models for human eye disease.* Hum Mol Genet, 2002. **11**(7): p. 755-67.

7. Walcher, T., Xie, Q., Sun, J., et al., *Functional dissection of the paired domain of Pax6 reveals molecular mechanisms of coordinating neurogenesis and proliferation.* Development, 2013. **140**(5): p. 1123-36.

8. Huettl, R.E., Eckstein, S., Stahl, T., et al., *Functional dissection of the Pax6 paired domain: Roles in neural tube patterning and peripheral nervous system development.* Dev Biol, 2015.

9. Li, X., Liu, Z., Qiu, M., et al., *Sp8 plays a supplementary role to Pax6 in establishing the pMN/p3 domain boundary in the spinal cord.* Development, 2014.

10. Lei, Q., Jeong, Y., Misra, K., et al., *Wnt signaling inhibitors regulate the transcriptional response to morphogenetic Shh-Gli signaling in the neural tube.* Dev Cell, 2006. **11**(3): p. 325-37.

11. Scardigli, R., Schuurmans, C., Gradwohl, G., et al., *Crossregulation between Neurogenin2 and Pathways Specifying Neuronal Identity in the Spinal Cord.* Neuron, 2001. **31**(2): p. 203-217.

# Korrespondenzadresse

Dr. Rosa-Eva Hüttl

Institut für Physiologische Genomik,

Ludwig-Maximilians-Universität München,

Pettenkoferstr. 12,

80336 München

Tel: +49-(0)89-218075251

Fax: +49-(0)89-218075216

Email: rosa.huettl@med.uni-muenchen.de

# Kurzvitae

Andrea Huber

Biologiestudium an der Universität Basel. **2000** Promotion an der Eidgenössichen Technischen Hochschule (ETH) Zürich. **2000 – 2005** Postdoc an The Johns Hopkins University, Baltimore. **2006 – 2013** Gruppenleiterin am Helmholtz Zentrum München. Seit **2013** Leitung der Koordinationsstelle des Bernstein Netzwerks Computational Neuroscience in Freiburg.

**Rosa Eva Hüttl**

Biologiestudium an der Technischen Universität München. **2012** Promotion am Helmholtz Zentrum München/Technische Universität München. **2012 – 2015** Postdoc am Helmholtz Zentrum München. Seit **2015** am Institut für Physiologische Genomik der Ludwig-Maximilians-Universität München.

# Abbildungslegenden

**Abb. 1: Motor- und Interneuronengenerierung im Hinterhirn und Rückenmark**. A, B) Progenitordomänen werden in der ventralen Ventrikulärzone entlang des Neuralrohrs in einem dorso-ventralen Muster ausgebildet. **Nervenzellen im ventralen Hinterhirn**: bMN und vMN gehen aus Nkx2.2+ Progenitoren der p3 Domäne hervor. sMN des VI. und XII. Hirnnervs werden von Olig2+ Progenitoren der pMN Domäne gebildet. Die Grenze zwischen p3 und pMN Domäne hängt von der inhibierenden Interaktion der TF Pax6 und Nkx2.2 ab. Ventrale V2 und V1 IN stammen von Vorläuferzellen in den p2 und p1 Domänen ab. C) **Nervenzellen im ventralen, brachialen Rückenmark**: Progenitoren der p3 Domäne bilden V3 IN, alle sMN werden von Vorläuferzellen der pMN Domäne generiert. Pax6 und hauptsächlich Sp8 sind zur korrekten Ausbildung der p3-pMN Domänengrenzen nötig. Vorläuferzellen in der p2 Domänen bilden verschiedene Typen von V2 IN aus, V1 IN stammen von Progenitoren in der p1 Domäne ab.



**Abb. 2: Motor- und Interneuronengenerierung in *Pax6* Mutanten. A)** Modulärer Aufbau des Pax6 Proteins. **B)** **Progenitordomänen und Nervenzellen im Hinterhirn**. ***Pax6Sey***: Die p3 Domäne expandiert auf Kosten der pMN Domäne, bMN und vMN werden anstatt von sMN generiert. Ventrale IN fehlen, da die Progenitordomänen nicht gebildet werden. **C)** ***Pax6Leca4***: Die p3 Domäne expandiert, bMN und vMN werden anstatt von sMN generiert. Ein kleiner Rest von Progenitorzellen in der pMN Domäne bildet einige sMN. Ventrale IN werden normal gebildet. **D)** **Progenitordomänen und Nervenzellen im brachialen Rückenmark**. ***Pax6Sey****:* Die p3 Domäne expandiert auf Kosten der pMN Domäne, jedoch nicht im selben Maße wie im Hinterhirn. Anzahl der V3 IN ist erhöht, während weniger sMN des MMC und LMCl gebildet werden. Geringere Expression von *Ngn2* bewirkt eine Reduktion der p2 Domäne und daraus resultierend der Anzahl von V2 IN. V1 IN werden nicht gebildet, da die p1 Domäne fehlt. **E) *Pax6Leca4***: Die p3 – pMN Domänengrenze sowie V3 IN werden normal gebildet. Die p2 Domäne ist auf Kosten der pMN Domäne vergrößert. Dies, sowie die vermehrte Produktion von Ngn2 in der p2 Domäne führt zur übermäßigen Produktion von V2 IN, während sMN des MMC und LMCl in ihrer Anzahl verringert sind.*..*V1 IN werden normal gebildet.

