Appendix 40: Vom Ei zum Embryo: Musterbildung durch genetisch gesteuerte morphogenetische Felder

Appendix 40: Vom Ei zum Embryo: Musterbildung durch genetisch gesteuerte morphogenetische Felder

40.1 Vom Ei zum Embryo: Mikroanatomie der Entwicklung

Es gibt mehrere Millionen von Tierarten mit extrem unterschiedlichem Aussehen, und man würde intuitiv erwarten, dass Ihre Entwicklung vom befruchteten Ei zum ausgewachsenen Tier völlig verschieden verläuft. Eine der großen Überraschungen der Entwicklungsbiologie der letzten Jahrzehnte war die Entdeckung, dass die Entwicklung der Wirbeltiere und Insekten nicht nur nach einem erstaunlich ähnlichen Schema verläuft, sondern dass sie oft von ähnlichen Genen und Transkriptionsfaktoren gesteuert wird. Die Forschung konzentrierte sich daher auf einige Musterbeispiele (Paradigmen), an denen die Mechanismen der embryonalen Entwicklung der Entwicklungsbiologie seit vielen Jahren systematisch untersucht werden. Dazu zählen der Wurm Elegans, die Fruchtfliege Drosophila, die Amphibien und, neuerdings, die Hühner und Mäuse.

Die frühe Phase der Entwicklung, d.h. nach der Befruchtung und vor der Gastrulation, verläuft bei den verschiedenen Tierarten oft recht unterschiedlich. Dies gilt besonders für manche Insekten wie die Drosophila, die im Zentrum des Interesses der nächsten drei Kapitel stehen. In der späteren Phase, d.h. unmittelbar nach der Gastrulation und während der Bildung der Organe verlaufen die Entwicklungen bei den verschiedenen Lebewesen ähnlich. Sie startet mit einer Schale aus Endothelzellen, dem Blastocel. Die Entwicklung der Körperteile (Arme, Beine) und Organe sowie deren Lage im Körper wird durch eine Familie von Genen, den homöotischen Selektorgenen (oder HOX-Genen) gesteuert, die im Laufe der Evolution erstaunlich gut konserviert wurden.

In diesem Kapitel sollen die wesentlichen Prozesse der Strukturierung der Embryone grobkörnig dargestellt werden. Detaillierte Darstellungen und experimentelle Beweise der Aussagen findet man in den Büchern der Entwicklungsbiologie [Gilbert] und Zellbiologie (s. [Alberts] Ch 21 oder [Lodish et al. Ch. 22] und in zahlreichen Übersichtsartikeln [1].

Die Entwicklungsbiologie ist ein sehr breites Feld und nimmt in den Büchern der Zellbiologie zusammen mit dem Problem der Steuerung der embryonalen Entwicklung mehrere Kapitel in Anspruch. Eine ausführliche Darstellung würde den Rahmen dieses Buches sprengen. Wir betrachten daher nur zwei charakteristische Beispiele, an denen man die Prinzipien der Zell-Differenzierung durch genetische Expression eingehend untersucht wurde: Die Segmentierung der Insekten und die Bildung der Vorläufer der Skelettmuskeln, den Somiten.

Die Physik der Evolution konzentrierte sich in der Vergangenheit vor allem auf die Fragen

[1] Die Größe der Eizellen ist bei Wirbeltieren und Fröschen oder Fischen sehr unterschiedlich. Die menschliche Eizelle hat einen Durchmesser von etwa 0.1 mm, die von Fischen dagegen 1-2 mm. Die Zellen sind also etwa 10 bis 100 mal größer als die normaler somatischer Zellen 10-20 μ m. Das Ei der Drosophila ist länglich: 0.5x 0.15 mm. Alle Eizellen enthalten vor der Befruchtung einen Kern.

der Musterbildung durch Gradienten der die Entwicklung steuernden morphogenetischen Substanzen, wobei die behandelten Modelle von Turing und Gierer/Meinhart im Vordergrund des Interesses standen. Erst seit den 80iger Jahren hat man damit begonnen, die Frage der Kontrolle der embryonalen Entwicklung durch Kaskaden der genetischen Expression systematisch anzugehen. Dieser Paradigmenwechsel wurde durch die bahnbrechenden Experimente von Christiane Nüsslein Vollhardt angetoßen [NüVoll]. Inzwischen gibt es zahlreiche Modelle der genetischen Steuerung der embryonalen Entwicklung durch genetische Schaltkreise. Wir werden auf diese formalen theoretischen Modelle erst in späteren Kapiteln eingehen und uns zunächst mehr auf die prinzipielle Frage konzentrieren, wie Muster der genetische Expression entstehen und welche Rolle die physikalischen Eigenschaften der Zelle und des Gewebes dabei spielen können. Daher ist Absicht dieses Kapitels nicht eine umfassende Darstellung der Entwicklungsbiologie zu geben, sondern den Physikstudenten zu zeigen, welche großartigen Fragestellungen sich hier auftun und sie stärker mit Konzepten der genetischen Informationsverarbeitung bei Eukaryonten vertraut zu machen. Wir betrachten zwei Beispiele: Die Segmentierung der Insekten am Beispiel der Drosophila nach der Bildung der Blastula, und die Entstehung der Muskeln und Gliedmaßen der Hühnerembryos aus dem Mesoderm. An letzterem Beispiel werden wir auch sehen, dass viele physikalische Prozesse wie Adhäsion und mechanische Deformation eine wichtige Rolle spielen.

Die zentrale Frage der Embryologie ist, wie die genetische Information räumlich und zeitlich in die Ausbildung von spezifischen Körperteilen und Organen des Gewebes umgesetzt wird. Konkrete Beispiele sind: Die Segmentierung der Insekten, bei deren Entwicklung der Muskeln und Gliedmaßen durch Zelldifferenzierung oder die Bildung der Farbmuster auf den Schmetterlingsflügeln. Schon vor etwa 100 Jahren propagierte der Zoologe Hans Driesch (1867-1941) die Idee, dass das Verhalten und Schicksal einer Zelle während der Evolution von seiner Position im Embryo abhängt. Er postulierte, dass sich Zellen im Frühstadium der Entwicklung (d.h. im Zustand der Blastula oder nach der Gastrulation) durch Differenzierung zu jedem Zelltyp entwickeln können. Ihr Schicksal hängt allein von ihrer Position in der Blastula ab. Ein Hinweis

lieferte die Beobachtung, dass sich jede Zelle nach der ersten Teilung in eine lebensfähige Larve entwickeln kann.

Zwei für uns wichtigen Frühstadien der Entwicklung eines Embryos der Amphibien zeigt Abbildung 40.1. Nach einer Serie von Teilungen bildet sich aus einem kompakten Haufen von Zellen eine quasisphärische Hülle aus ca. 10.000 Zellen, das Blastogcoel (bei Wirbeltieren Blastozyt genannt). Dieser bildet schon zwei Pole aus, den animalischen und den vegetativen (s. Abb.40.1a). Danach beginnt der Prozess der Gastrulation. Dieser startet mit dem Ablösen einzelner Zellen (den Mesenchymzellen), die mittels Pseudopodienbildung an der inneren Zellwand entlang wandern. Gleichzeitig entsteht am animalische Pol eine Einstülpung, aus der spätere die Darmröhre (Urdarm genannt) entsteht. Eine weitere Einstülpung entsteht am Ende der Phase in der Nähe des animalischen Pols, dem späteren Mund. Die wandernden Mesenchymzellen setzen sich an der Innenwand der Hülle ab und bilden charakteristische Muster. Aus ihnen bildet sich im weiteren Verlauf der Entwicklung das Skelett durch den Prozess der Biomineralisierung.

Im Verlauf der weiteren Entwicklung spaltet sich die äußerer Zellschicht in drei Untersysteme auf: Das Ektoderm (Außenschicht), das Mesoderm (Mittelschicht) und das Endoderm (Innenschicht). Man nennt diese Zellverbände auch Keimblätter. Wie Abb. 40.2 zeigt, entsteht aus dem Ektoderm die Haut und das Nervensystem (nach der Bildung der Neuralröhre durch Abspaltung der Endothelzellschicht), aus dem Endoderm der Darm und die inneren Organe (Leber, Niere, Lunge) und aus dem Mesoderm die Muskeln und die Knochen der Vertebraten.

Figure 40.1: Abb. 40.1: Zwei Ereignisse bei der Entwicklung eines Seeigeleis. a) Eizelle des Seeigels nach ca 10 Stunden mit Bildung eines Hohlraums (Blastocoel). Die untere Einstülpung wird im Laufe der Entwicklung zum Darm (und wird oft Urdarm genannt). Der Endzustand dieser Entwicklungsphase ist eine polare Zellhülle mit ausgeprägten (animalischem und vegetativem) Polen. An der Innenwand der Zellhülle lagern sich zwei Reihen von Mesenchymzellen an, aus denen sich später das Knochengerüst ausbildet. Die Zellen wandern oft entlang von vorgeformten Netzwerken aus Fibronektin. b) Austritt einer Mesenchymzelle aus dem Endothelium. Diese entstand durch Umwandlung aus einer Endothelzelle. Sie verliert ihre Fähigkeit zur Adhäsion an das Ei umgebende Gewebe, das vorwiegend aus dem Protein Hyalin besteht und adhäriert dagegen bevorzugt an die Basalmembran. Dies erfolgt durch genetische Änderung des Musters, der an der Oberfläche der Zelle exponierten Zelladhäsionsmoleküle (ZAM). Zu den neu exponierten Rezeptoren gehört CD44, das an die Hyaluronsäure bindet, und Integrine die an Fibronektin, binden (s. dazu auch Abb. 13.8)

Nach der Gastrulation bildet sich bei Wirbeltieren die Neuronalröhre und das präsomitische Gewebe aus. Erstere bildet sich durch Einstülpung der Hülle und anschließender Abschnürung der Endothelzellschicht. Sie ist der Vorläufer des späteren Nervensystems, d.h. dem Rückenmark und dem Gehirn. Das präsomitische Gewebe spaltet sich aus dem Mesoderm ab. Es lagert sich seitlich an dem Neuralrohr an und erstreckt sich vom Schwanz zum Kopf. Aus diesem entstehen in dem Prozess der Segmentierung Blöcke von Zellen (Somiten oder Urwirbel genannt), aus denen in den späteren Phasen die Muskeln und das Knochengerüst der Wirbelsäule entstehen. Schon nach 24 Stunden kann man in manchen Fällen den künftigen Kopf und

Schwanz des Embryos unterscheiden.

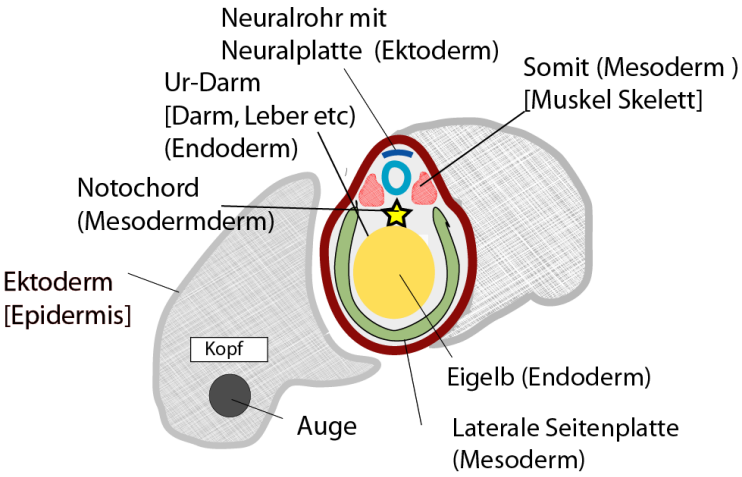

Figure 40.2: Abb. 40.2: Schnitt durch einen Embryo der Amphibien nach der Gastrulation, das die Aufteilung des Gewebes in Ektoderm, Endoderm und Mesoderm zeigt. Aus dem Ektoderm entsteht die Haut, das Nervensystem und die sensorischen Organe. Aus dem Endoderm (den Zellen des Urdarms) entstehen der Darm und die Lungen, während das Mesoderm die Quelle der Muskeln, der Gliedmassen und der Blutzellen ist. Das Mesoderm entsteht aus dem Ektoderm während der Gastrulation durch Umwandlung von Epithelzellen in Mesenchymzellen.

40.1.1 Kontrolle der embryonalen Entwicklung der Drosophila durch zwei Gruppen von Segmentierungsgenen

Nach der Befruchtung (engl. fertilisation) entsteht aus dem komplex aufgebauten Ei in drei bis vier Stunden die Blastula: Eine elliptische Schale aus ca. 6000 Epithelzellen, die mit Eigelb gefüllt ist. Vor dieser Ausbildung der Hülle aus Epithelzellen entstehen zunächst einige tausend Kerne durch Replikation im Innern des Eis. Die Teilung der Kerne erfolgt in etwa 10 Minuten. Da diese nicht mit einer Zellteilung verbunden ist, schwimmen die Kerne zunächst frei im Zytoplasma der Eizelle herum. Man nennt diesen Zustand syncytialen Blastoderm. Nach 2-3 Stunden lagern sich die Kerne am Rande der Hülle des Eis an und werden im Verlauf einer

Stunde durch eine Plasmamembran eingeschlossen, so dass eine Hülle aus Endothelzellen, also ein Blastoderm entsteht. Dieses ist mit Eigelb gefüllt. Alle Zellarten entstehen bei der weiteren Entwicklung aus den rund 6000 Endothelzellen.

In der nächsten Phase beginnt die Gastrulation, indem sich die Hülle in Längsrichtung einstülpt und die drei Keimblätter ausgebildet werden, welche die spätere Entwicklung in die Organe festlegt (s. Abb. 40.2). Nach ca einem Tag ist eine segmentierte Larve mit festgelegtem Körperplan, aber ohne Beine, Fühler und Flügel, entstanden. Nach ca. 5 Tagen findet die Metamorphose der Puppe statt, bei der die Extremitäten entstehen und nach insgesamt 10 Tagen platzt die Puppe und die Fliege erscheint.

Wir befassen uns hier nur mit dem Anfangsstadium der Segmentierung der Insekten ausführlich, während wir die weitere Entwicklung während der Metamorphose nur grob skizzieren. Die folgende Beschreibung kann nur eine grobe Einführung in das Gebiet der Entwicklung der Drosophila liefern. Eine besonders gute und detaillierte Einführung findet man in der Monographie von S. F. Gilbert [Gilbert] und im Buch "Die Zelle" [Albrecht et al.] Ch. 21)].

Unsere heutige tiefe Einsicht in die embryonale Entwicklung verdanken wir der Aufklärung des Genoms und der Entwicklung zahlreicher raffinierter Methoden der Molekularbiologie. Mit dieser können einzelne Gene innerhalb des Genoms versetzt oder gezielt ausgeschaltet werden und durch Beobachtung der Veränderung des Körperbaus auf die Rolle derselben geschlossen werden. Einen wegweisenden Fortschritt brachte die Entdeckung der die Segmentierung der Drosophila steuernden Gene. Wie Abb. 40.3 zeigt, kann man die Entwicklung der Larve der Drosophila in fünf Phasen aufteilen, die durch die Aktivität von zwei Gruppen von Genen gesteuert werden: Die Lücken-Gene und die Paar-Regel-Gene (engl. gap genes and pair rule genes). Wir geben zunächst eine grobe Übersicht über die wesentlichen Schritte dieser Entwicklung und gehen dann auf zwei Prozesse etwas genauer ein.

Der erste Schritt besteht in der Festlegung der vier Raumrichtungen welche die Vorder- und Hinterseite (die Richtung anterior $\longleftrightarrow$ posterior, oder A-P-Polarität) sowie die Ober und Unterseite (die Richtung dorsal $\longleftrightarrow$ ventral) festlegen. Die A-P-Polarität wird erstaunlicherweise schon vor der Befruchtung aufgrund der polaren Struktur des Eis (dem Oozyt) festgelegt (s. [Gilbert], Ch.14). Dies erfolgt durch polare Ansammlungen von zwei Gruppen von m-RNA in der Eizelle, welche nach der Befruchtung zwei Transkriptionsfaktoren (TF) Bicoid und Nano exprimieren. Dabei häuft sich die m-RNA für Bicoid an der anterior (der späteren Kopfregion) und die für Nano an der posterior Seite (der späteren Schwanzregion) an. Es hat sich gezeigt, dass die Polarität der m-RNA-Verteilung durch Bindung der m-RNA für Bicoid an Ansammlungen von Mikrotubuli und die von Nano an Clustern aus F-Aktin in der unbefruchteten Eizelle (dem Oozyt) bestimmt wird (s. Abb. 14.3 erste Zeile). Es ist also keineswegs so, dass das Zytoplasma der Eizelle strukturell isotrop ist, sondern die Eizelle besitzt eine intrinsische Polarität, die durch die Polarität des Zytoskeletts bestimmt ist. Zwei weitere m-RNA Reservoirs, welche für die Synthese der Transkriptionsfaktoren Hunchback und Caudal, sorgen, sind zunächst homogen verteilt und bilden erst in der zweiten Phase Gradienten aus.

Die m-RNA lebt in der Regel nur kurz, denn sie wird schnell durch spezifische Enzyme, die Exonukleasen, abgebaut. Um die Informationsträger langfristig zu stabilisieren, wird an das 3'-Ende ein Stück Polyadenylat (polyA) angedockt. Diese Kappe wird nach der Befruchtung so modifiziert, dass das Bicoid Protein exprimiert wird.

Die Polarität dorsal-ventral wird durch den Gradienten des als morphogenetisches Signal wirkenden Transkriptionsfaktors Dorsal festgelegt. Dieses Protein wird 90 min nach der Befruchtung durch Expression des mütterlichen Dorsal-Gens erzeugt. Es ist zunächst im Zytoplasma der vielkernigen Eizelle, dem syncytialen Blastoderm, homogen verteilt. Dorsal wird aber nur von den Zellen im Bauchbereich aufgenommen und löst dort die Ausbildung von Mesoderm-Gewebe und inneren Organen aus. Wir werden die Ausbildung der D-A-Polarität im Kapitel 40.5 etwas genauer betrachten. In der ersten Phase der Entwicklung des befruchteten Eis besteht die Zelle

noch aus einer mit vielen Kernen gefüllte Hülle (Syncyticum genannt). Als erstes entsteht ein Gradient aus dem als TF fungierenden Hunchback-Protein durch die antagonistische Wirkung der polar verteilten TF der Gene bicoid und nano (Phase I und II Abb.40.3). Diese Morphogene werden durch Transkription der im unbefruchteten Zustand vorhandenen m-RNA gebildet. Da Bicoid als Gen-Aktivator fungiert, die Transkription des Gens hunchback aktiviert, und Nano diese unterdrückt, entsteht in A-P-Richtung ein Gradient von Hunchback. Dadurch wird die Position des Kopf und Schwanzbereichs festgelegt. Hinzu kommt Caudal, das einen Gradienten in P?A-Richtung ausbildet, da seine Translation am Kopf durch Bicoid inhibiert wird (s. Abb. 40.3). Für die Ausbildung dieser Gradienten der TF ist sehr wichtig, dass die Kerne frei im Zytoplasma schwimmen und die morphogenetisch wirkenden Proteine frei diffundieren können; Also nicht erst die Zellhüllen durchdringen müssen, um in den Kern zu gelangen. Einblicke in die Rolle der Gene und deren Produkte (morphogen wirkende Proteine) für die Entwicklung spezifischer Organe liefern Untersuchungen an der Wirkung von Mutationen. Entfernt man z.B. das Gen bicoid, so entstehen Larven ohne Kopf aber mit zwei Hinterteilen. Weitere Beispiele für die Rolle der Gene bicoid und nano findet man in der Monographie von Gilbert [Gilbert] und in Abb. 40.3.

Man wundert sich zunächst darüber, dass sich die Kerne ohne Plasmamembran teilen. Dies ist nicht so verwunderlich wenn man bedenkt, dass die Lipid/Potein-Doppelschicht nur zur Abgrenzung gegenüber der feindlichen Umwelt dient, was innerhalb der Eizelle der Zelle nicht nötig ist. Tatsächlich zeigen die Untersuchung der Verteilung der Mikrotubuli und des Aktins, dass jeder Kern von einem Netzwerk aus MT und einer Art Aktinkortex umgeben sind. Das MT-Netzwerk bildet wie bei der normalen Zellteilung während der Trennung der Chromosomen (d.h. in der Anaphase) eine Spindel mit zwei Zentrosomen [Kellog 1988]. Der Vorteil dieser hüllenfreien Kernteilung ist die hohe Geschwindigkeit und die schnelle Verteilung der m-RNA und Transkriptionsfaktoren.

Die Gradienten der TF Bicoid, Nano, Hunchback und Caudal kontrollieren nun den nächsten

Schritt der Segmentierung durch Kontrolle der Expression von acht Lückengenen (engl. Gap-Genes): z. B. giant, krüppel, und knirps hunchback (Phase III in Abb.40.3). Während in der ersten Phase (I und II in Abb.40.3) die Entwicklung des Embryos durch weitreichende Gradienten der TF bestimmt ist, entstehen im Prozess III nun Gruppen von Zellen mit eigener Identität (Signatur). Diese Phase geht mit der Ausbildung der Hülle aus Endothelzellen einher, die jedoch alle noch in Mesenchym-Zellen umgewandelt werden können. Die Lücken-Gene legen eine Grobstruktur des Embryos fest. Der Name der Gene basiert auf der Beobachtung, dass das Fehlen dieser Gene zu Lücken im Aufbau der Larven führt [NüVoll].

Klasse	Namen
Lücken-Gene	krüppel (Kr), knirps (kni), hunchback (hb), giant (gt)
Paar-Regel-Gene	hairy (h), even skipped (eve), fushi tarazu (ftz), paired (prd)
Segment-Polaritäts-Gene	engrailrd (en), wingless (wg), cubitus interruptus (ci), hedgehog (hh), patched (ptc)

Tabelle 40.1: Auswahl einiger an der Segmentierung der Drosophila beteiligten Gene(die wir oft summarisch als Segmentierungsgene bezeichnen: Die Namensgebung der Gene erfolgt traditionsgemäß nach den Effekten, die durch ihr Ausschalten hervorgerufen werden. Der Name "hunchback" weist darauf hin, dass seine Entfernung Fehler im Bereich des Brustkorbes (Thorax) erzeugt.

Der Prozess der Segmentierung wird durch die Expression einer zweiten Klasse von Segmentierungs-Genen, den neun Paar-Regel-Genen (engl. Pair-Rule Genes, PR-G), wesentlich verfeinert. Die für uns wichtigsten dieser Gene sind hairy (h), even-skipped (eve), fushi tarazu (ftz) und runt (run) (s. Tabelle I)). Die Gene werden noch vor der Ausbildung der Hülle aus Endothelzellen aktiviert und man kann die von ihnen kodierten Proteine (TF) durch eine spezielle, weiter unten beschriebene Technik beobachten (s. Abb.40.6). Markiert man eines dieser Genprodukte, so beobachtet man 14 streifenartigen Anordnungen, wobei sich markierte (also dunkle) und nicht markierte (helle) Bereiche abwechseln (s. Abb. 40.3 Phase V). Der

Embryo wird also in 15 Segmente aufgeteilt. Man bezeichnet die 14 Streifen als Parasegmente. Diese entstehen dadurch, dass in den dunklen Bereichen das markierte Protein exprimiert wird, in den hellen dagegen nicht. In diesem wird dagegen ein anderes PR-Gen exprimiert. Das Bild in der fünften Reihe der Abb. 40.3 zeigt als Beispiel die Verteilung der exprimierten Proteine für den Fall der beiden PR-Gene fushi tarazu (ftz) und even skipped (eve). Mit den PRG wird die genetische Information digitalisiert. Jedes der grauen und gelben Segmente im Zustand V ist etwa vier Zellen breit und die Zahl der Zellen in entlang des Umfangs ist 60.

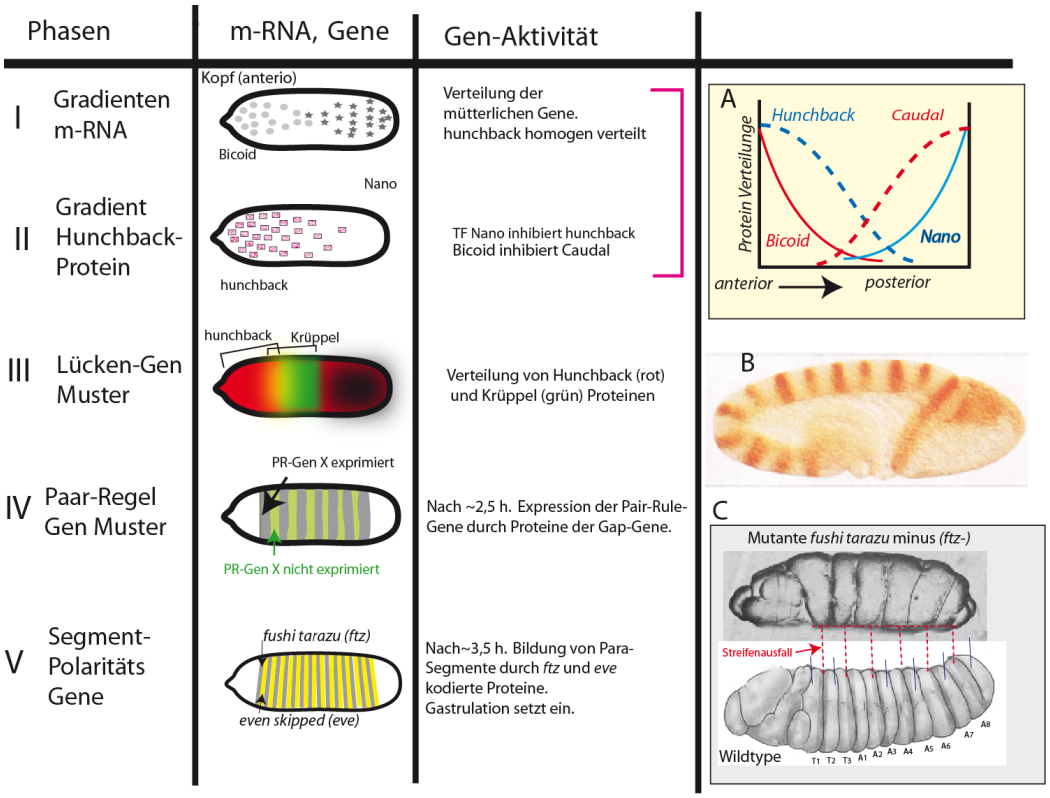

Figure 40.3: Abb. 40.3: Zeitliche Folge der Entwicklung der Drosophila in sechs Stufen. In den Phasen I-IV besteht die befruchtete Eizelle nur aus einer Ansammlung von vielen Kernen (Syncyticum). Die Ausbildung von Zellhüllen und damit einer Schale aus 6000 Endothelzellen beginnt in der Phase IV aufgrund der Expression der Pair-Rule Gene. Färbt man die durch ein PR-Gen exprimiertes Protein an, so beobachtet man 7 angefärbte Streifen, die durch ebenso breite unmarkierte getrennt sind (s. Bild IV). Dadurch wird der Embryo in 15 Segmente geteilt. In den hellen Segmenten wird ein anderes der PR-Gene exprimiert. Das Bild der Phase V zeigt beispielsweise die Verteilung der Expression der Gene even skipped (gelb markiert) und fushi turazu (grau markiert). Man kann die Wirkung der Produkte der PR-Gene in der späteren Phase der Entwicklung an der Ausbildung der Segmente sehen, die in der Phase V noch nicht sichtbar sind.. Einsatz A: Polare Verteilung der m-RNA der Morphogene Bicoid und Nano, sowie der TF Hunchback und Caudal im Oozyt. Einsatz B: Natürliche gekrümmte Form der Larve im Ei. Einsatz C: Das Bild zeigt die Wirkung der Elimination des Gens fushi tarazu auf die später beobachtete Segmentierung. Man sieht, dass die Aufteilung der Segmente in Parasegmente unterdrückt wird. Der Name des Gens heißt übrigens übersetzt "weniger Segmente"(Unterdrückung der Parasegmente).

40.1.2 Die Segmentierung als Zusammenspiel repressiver und aktivierender Transkriptionsfaktoren.

Nach der phänomenologischen Beschreibung der 6 Stufen der Entwicklung der Larve müssen wir nun folgender Frage nachgehen. Wir hatten oben gesehen, dass die Genprodukte der mütterlichen RNA (bicoid und nano) sowie der Lückengene (hunchback und caudal) in der Eizelle diffundieren können, da die Chromosomen in Zustand des Syncyticum nicht von Zellhüllen umgeben sind. Wie können dann aber scharfe Verteilungen der Transkripte der für die Segmentierung verantwortlichen Genen im Embryo entstehen, die notwendig sind, um den Zellverbänden der Parasegmente ihre Identität zu verleihen? Diese Identität bestimmt, welche Extremitäten (Beine, Flügel, Fühler) nach der Metamorphose der Larve zur Fliege entstehen.

Die Bildung der Segmente und Parasegmente beruht auf der Ausbildung relativ scharfer Verteilungen der durch die Lücken und Paar-Regel exprimierten Morphogenen (s. Abb.40.3, Einsatz A und Abb. 40.4b). Diese entstehen durch die Kontrolle der Expression der Lückengene durch die mütterliche TF Bicoid, Caudal und Nano. Die Expression des TF Hunchback wird beispielsweise durch Bicoid aktiviert und durch Nano unterdrückt, wodurch eine breite Verteilung mit Maximum am Kopfende entsteht. In analoger Weise entsteht eine Anhäufung des TF Caudal am Schwanzende. Die Verteilungen werden zusätzlich durch die Kontrolle der Expression der Lückengene durch die von anderen Genen dieser Klasse kodierten TF verschärft.

Nehmen wir das Beispiel des TF Krüppel. Seine Expression wird an der Vorderseite (anterio) durch den TF Hunchback und an der Hinterseite (posterio) durch die Produkte der Gene knirps und tailless unterdrückt.

Die anschließende Verschärfung der Verteilung der Proteinprodukte der acht PR-Gene erfolgt durch Wechselwirkung der Gene mit den TF der Lückengene. Das kann man an dem gut untersuchten Beispiel des PR-Gens even-skipped am Besten sehen. Wie wir oben sahen, wird diese

nur in jedem zweiten Parasegment der sieben Doppelstreifen exprimiert (s. Phase V in Abb.40.3). Jedes der sieben Parasegmente (eve) wird durch ein anderes Segment auf dem DNA-Strang reguliert. Diese liegen alle im Bereich des Chromsoms, das für die Steuerung der Segmentierung verantwortlich ist (und etwa 850 bp lang ist). Die Promotoren der PR-Gene werden von den Transkriptionsfaktoren der Lücken-Gene erkannt und deren Bindung kann die Expression aktivieren oder unterdrücken. Die Expression des TF von eve (TF_E) erfolgt aber nur dann, falls ihre Konzentration eine gewisse Schwelle überschreitet. Im Fall von even skipped fungiert der TF Hunchback (TFHkb) und auch Bicoid als Aktivator, während die TF von giant (TF_{Gt}) und krüppel (TF_{Kr}) als Inhibitoren wirken und die Expression von TF_E unterdrücken. Dadurch wird die Expression von eve auf den zweiten Streifen eingeschränkt. Wie Abb. 40.4 zeigt, ist die Aktivierung durch die hohe Konzentration des Aktivators Hunchback an der Kopfseite bestimmt.

Wie kann aber die Expression von eve in den anderen Streifen aktiviert werden, wo die Konzentration von Hunchback niedrig ist? Hier nimmt man an, dass die Natur einen anderen Trick benutzt: Auf jedem der Promotoren von eve gibt es mehrere Bindungsstellen, für die regulierenden TF (d. h.TF_{Hkb}, TF_{Gt}) und TF_{Kr}, s. Abb. 40.4a.) und die Expression von eve ist auch dadurch bestimmt, wie viele Plätze es für die inhibierenden und aktivierenden TF gibt. Nach Abb. 40.4a gibt es für die Kontrolle der eve-Expression im ersten Streifen etwa gleich viel Positionen für die aktivierenden und inhibierenden TF. Im Promotor für eve im dritten Streifen, wo der Hunchback Spiegel schon abgefallen ist, gibt es dagegen 20 Bindungsstellen für den Aktivator Hunchback, aber keine einzige für den Inhibitor Krüppel. Eine weitere Möglichkeit auf Gradienten der TF zu reagieren, besteht in der Einstellung der Bindungsstärke für jeden TF. Durch die Kombination beider Mechanismen können Gene den Gradienten morphogenetischer Substanzen erfassen.

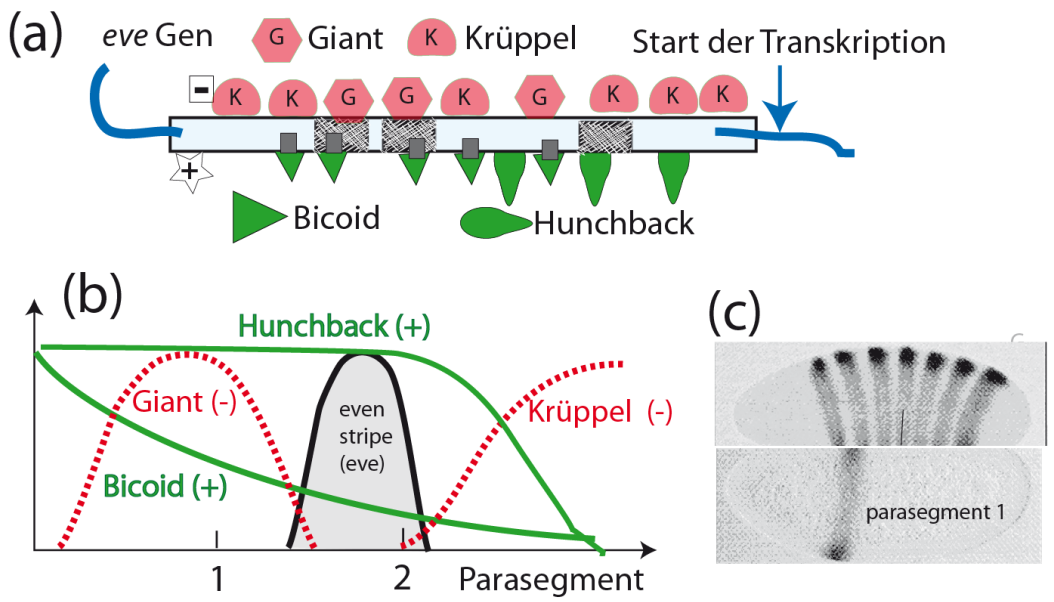

Figure 40.4: Abb. 40.4. Modell der Steuerung der Bildung des Streifens 2 durch lokalisierte Expression von eve (s. Abb 40.3 Phase V). (a) Die Expression von eve wird durch eine 815 bp lange DNA-Sequenz im Gen bestimmt. Das obere Bild zeigt die Verteilung der Bindungsstellen der TF Bicoid und Hunchback, welche die Expression von eve aktivieren und von Giant und Krüppel, welche diese unterdrücken. (b) Verteilung der Transkriptionsfaktoren in den ersten drei Parasegmenten. (c) Ein experimenteller Beweis der Anhäufung von Eve skipped im zweiten Streifen. Beschreibung siehe Text.

Zusammenfassung: Bisher haben wir Folgendes gelernt: Die Segmentierung der Insektenlarven wird zunächst nur durch die quasi-periodische Anhäufung spezifischer Transkriptionsfaktoren evident. Die Aufteilung in Parasegmente wird durch eine hierarchische Anordnung von Transkriptionsfaktoren festgelegt, an deren Spitze die heterogene Verteilung der TF Bicoid, Nano und Caudal steht. Es besteht eine 1:1 Abbildung der Verteilung der TF und der Aktivität der Gene.

Da die Verteilungen der TF aufgrund ihrer Diffusion ziemlich breit sind, hat die Natur zwei

Mechanismen der Fokussierung (zur Bildung der 14 Parasegmente) entwickelt. Der erste beruht auf der wechselseitigen Kontrolle der Aktivität der PR-Gene untereinander. Der zweite besteht in der Einstellung der Zahl der Bindungsplätze für Aktivatoren und Inhibitoren auf den Promotoren der PR-Gene. Der zweite Mechanismus ermöglicht den Zellen auf Gradienten morphogenetischer Substanzen, wie Transkriptionsfaktoren zu reagieren.

40.1.3 Die Anordnung der Hox-Gene in den Chromosomen bestimmt das Schicksal der Zellen bei der Reifung der Larven

Nachdem wir Einblick in die Mechanismen der Segmentierung gewonnen haben, erhebt sich als nächstes die Frage, wie das Schicksal der Zellen während der Metamorphose der Insektenlarven bestimmt wird. Welcher deus ex machina sorgt dafür, dass in einem bestimmten Parasegment Beine und keine Fühler entstehen. Eine andere Frage ist, ob die zeitliche Folge der Expression der Gene im Genom festgelegt ist. Diese Spezifizierung besorgt eine neue Gruppe von Genen: Die homöotischen Selektorgene (engl. homeotic selector gens), die man oft kurz HOX-Gene nennt. Insekten besitzen zwei Familien von Hox-Genen: der Antennapedia-Komplex und der Bithorax-Komplex. Ersterer reguliert die Entwicklung der Körperteile im Bereich des Kopf und des Brustkorbs (dem Thorax) und letzterer in der Bauchregion (s. Abb. 40.4.2). Die Expression der Hox-Gene wird durch eine spezifische Gruppe von Proteinen kontrolliert, die alle eine hoch konservierte, spezifische DNA-Bindungsdomäne besitzen, die Homöodomäne genannt wird und welche 60 Aminosäuren lang ist. Die zugeordnete Basensequenz der DNA-Bindungsdomäne heißt Homöobox und ist etwa 189 Nukleotide lang. Die Homeodomänen bilden alle dieselbe DNA bindende Sekundärstruktur der Form Helix-Knäul-Helix, die auch für die Bindung der bakteriellen Repressoren verantwortlich ist (siehe Kapitel 36). Die homöotischen Selektorgene (HOX-Gene) kommen in allen Tierarten vor, von den Insekten bis zum Menschen. Sie haben sich im Verlauf der Evolution kaum verändert. Im Falle der Insekten kennt man acht Vertreter dieser Gen-Familie. Sie exprimieren eine Gruppe von Proteinen (HOX-Proteinfamilie genannt),

welche die Expression der Gene regulieren.

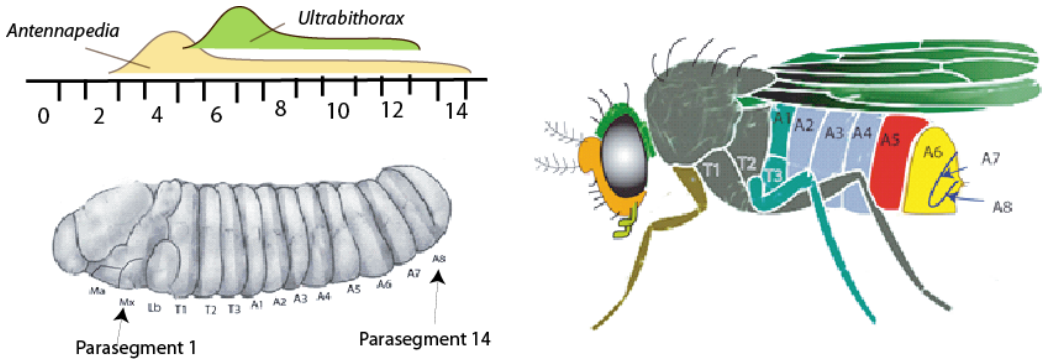

Figure 40.5: Abb. 40.4.2. Beziehung zwischen der Anordnung der Parasegmente in der Larve und in der Fliege einerseits und der zwei Gruppen von Hox-Genen (Antennapedia-Komplex und Bithorax-Komplex) andererseits. Das linke Bild zeigt die Verteilung der Expression der 8 Gene über die 14 Parasegmente der Larve. Am Beispiel der Gene antennapedia und ultrabitorax wird gezeigt, dass sich die Expression eines HOX-Gens über mehrere Parasegmente erstreckt, dass sie aber in einigen Segmenten besonders stark ist. Aufgrund der spezifischen Verteilung der Expression der HOX-Gene bekommt jede Zelle ein Gedächtnis Ihrer Position in der Larve

Abb. 40.4.2 zeigt (am Beispiel zweier Hox-Gene), dass die Expression sich über mehrere Parasegmenten der Larve erstrecken kann, aber in ein bis zwei besonders stark ist. Dadurch erhalten die Zellen das mehrfach erwähnte Gedächtnis für ihre Position. Wie oben erwähnt, wird die Expression der Gene durch die TF der Hox-Proteinfamilie reguliert. Dabei werden viele Gene durch ihr eigenes Proteinprodukt aktiviert.

Die Expression der richtigen Gene an den richtigen Parasegmenten wird durch eine erstaunliche Korrelation zwischen der Position der Gene in den Chromosomen und der Reihenfolge ihrer Expression erleichtert. Die Hox-Gene sind in zwei Domänen eines Chromosoms (mit der Nummer 3) angeordnet und zwar so, dass im ersten Komplex die Gene der Kopfregion (der Antennapedia-Komplex) und im zweiten die der Thorax und der Bauchregion (Bithorax-Komplex) kommen.

Diese Anordnung erfolgt in 3'-5' Richtung der DNA, in der auch die Polymerasen arbeiten. Dadurch können die vor dem eigentlichen Gen liegenden regulatorischen DNA-Sequenzen, wie Bindungsstellen für Verstärker (engl. Enhancer) gemeinsam nutzen. Ausführliche Darstellungen der Anordnung der Hox-Gene in den Chromosomen und der erstaunlichen Analogien zwischen den HOX-Genen der Insekten und der Säugetiere fndet man in den Büchern der Zellbiologie und in [Gilbert 1997], Ch 16.

Man hat die Existenz und Funktion der Hox-Gene und ihrer Proteinprodukte schon vor über 100 Jahren beobachtet, aufgrund der Bildung bizarrer Phänotypen der Insekten. Die Biologen wissen schon lange, dass Gliedmaßen bei Insekten aber auch bei Menschen vertauscht werden können oder an falschen Segmenten bei Insekten erscheinen können. Man nennt dieses Verhalten Homeotopie. Ein wichtiges Gen ist antennapedia, welches das Schicksal der Zellen im Bereich des Thorax und des Kopfes bestimmt. Wenn man dessen Produkt, den TF Antennapedia, überexprimiert, so erscheint am Kopf ein Paar Beine anstatt der Antennen. In Mutanten, in denen die Expression des Gens unterdrückt wird, erscheinen anstelle der Vorderbeine Antennen [s.[Gilbert] Ch 14).

Ein anderes Beispiel ist das Fehlen des Gens ultrabithorax (Ubx). Dessen Proteinprodukt unterdrückt die Ausbildung eines Flügelpaars am Brustkorb (Thorax). Entfernt man es, so entsteht statt kurzer Stumpen ein zusätzliches Flügelpaar. (s. Abb.40.5).

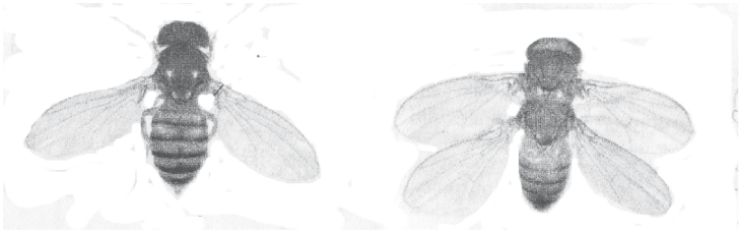

Figure 40.6: Abb. 40.5. Beispiele der Mutation des Hox-Gens Ultrabithorax (Ubx), dessen Proteinprodukt die Ausbildung der Flügel an unerwünschten Stellen unterdrückt. Entfernt man es, so entsteht am Brustkorp (Thoraxregion) ein zusätzliches Flügelpaar. Das Bild wurde modifiziert nach [Lewis 1978].

40.1.4 Die dorsal-ventral Polarität wird durch das mütterliche Morphogen Dorsal festgelegt

Die Polarität dorsal-ventral wird durch den Gradienten des als morphogenetisches Signal wirkenden Transkriptionsfaktors Dorsal festgelegt. Dieses Protein wird 90 min nach der Befruchtung durch Expression des mütterlichen Dorsal-Gens erzeugt. Es ist zunächst im Zytoplasma der vielkernigen Eizelle, dem syncytialen Blastoderm, homogen verteilt. Nachdem die im Zytoplasma verteilten Kerne zur inneren Oberfläche der Plasmamembran gewandert sind, wird Dorsal von den Kernen im Bauchbereich aufgenommen, während ein spezieller Mechanismus die Aufnahme durch die Kerne im Rücken verhindert (s. [Alberts 2002] Chapter 21). Die Konzentration des Morphogens nimmt beim Übergang vom Bauch zum Rücken graduell ab, so dass ein morphogenetischer Gradient entsteht (s.[NüVo 1989]). In den ventralen Kernen aktiviert Dorsal die Expression verschiedener Gene, wobei die Art des exprimierten Gens von der Konzentration des Morphogens abhängt. Wie weiter unten gezeigt wird (s. Abb 40.5), hängt die Expression eines spezifischen Gens (z. B. von dorsal) davon ab, wie viele Bindungsstellen für aktivierende und repressive TF die regulatorische Einheit des Gens besitzt und wie groß das Verhältnis der besetzten aktivierenden bzw. repressiven Bindungsstellen

ist. Da die Besetzung der Bindungsstellen von der Konzentration der TF abhängt und da die Expression des Gens oberhalb eines Schwellwertes des Besetzungsverhältnisses einsetzt, wird der Gradient des Morphogens in ein Muster der Genexpression übersetzt.

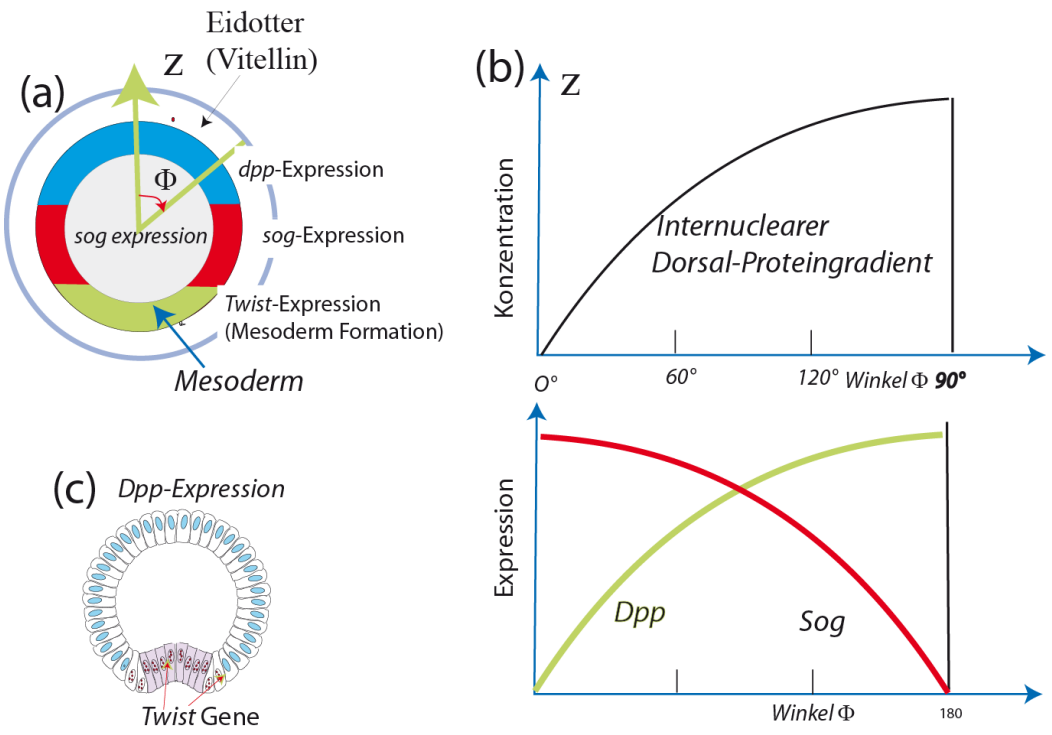

Figure 40.7: Abb.40.6

Die dorsal-ventral Polarität wird durch das Muster der Expression der Gene decapentaplegic (dpp) und twist festgelegt. Ersteres wird in den Kernen des dorsalen Bereich exprimiert, wo die Konzentration hoch ist, und twist in den Kernen des Bauchbereichs, wo c_{dorsal} niederig ist. In den Zwischenbereichen werden andere Gene aktiviert, wie, short gastrulation (sog). Die Produkte der drei Gene bestimmen die weitere Entwicklung des syncytialen Blastoderm.

Das von twist kodierte Morphogen Twist, induziert die Bildung des Mesoderms durch Umwandlung von Epithel- in Mesenchym-Zellen (s. Abb. 40.6 c). Letztere wandern während der Gastrulation nach innen und bilden das Mesoderm, aus dem die Knochen, die Skelettmuskeln

und zahlreiche innere Organe und Blutgefäße entwickelt werden.

40.1.5 Die Ausbreitung (Eversion) der Flügel bei der Metamorphose- Die Rolle von Metallproteasen.

Die Entwicklung der Extremitäten erfolgt in zwei Phasen: Während der Entwicklung müssen diese aus den Imaginalscheiben gegen die Außenwelt geschützt werden und sind daher durch eine Kutikularmembran bedeckt. Während der Metamorphose von der Larve zum Insekt findet ein Umbau des Gewebes statt. Die IS sind in die Körperoberfläche der Larven eingebettet und die Flügel müssen während der Metamorphose die Hülle (Kutikularmembran) der Larve durchbrechen. Diese wird u.a durch die Basalmembran gebildet (s. Kapitel 23.). Hier hat man es mit demselben Problem zu tun, wie beim Durchtritt der Krebszellen durch die Basalmembran der Adern bei der Invasion ins Blut. Der Trick besteht in der Expression von Metallproteasen durch die Zellen, welche das Gewebe abbauen.

Appendix 40.A. Über die Regulation der Gen-Expression in Eukaryonten

40.1.6 Einleitung

In diesem Appendix stellen wir einige Besonderheiten der Kontrolle der genetischen Expression in eukaryontischen Zellen zusammen (in Ergänzung zum Kapitel 36. Appendix C). Wir beschränken uns dabei auf die Prozesse, die für das Verständnis der embryonalen Entwicklung unbedingt erforderlich sind. Einige elementaren Prozesse der Genexpression blieben beim Übergang von den Prokaryonten zu den Eukaryonten erhalten, wie die Steuerung der Transkrip-

tion durch Operatoren und Repressoren, oder den Trick, mehrere Bindungsstellen für einen Repressor im Chromosom anzulegen. Die Natur musste aber zahlreiche raffinierter Konzepte erfinden, um die stark kondensierten DNA aufzubrechen und spezifische DNA-Fragmente für die Transkritionsfaktoren zugänglich zu machen. Genetische Schaltprozesse erfordern daher zahlreiche Mechanismen der Gen-Restrukturierung.

Wie für die Transkription der DNA in Bakterien, gibt es auch in Eukaryonten vor jedem Struktur-Gen eine regulatorische DNA-Sequenz und einen Promotor zur Kontrolle der Expression (s. Abb 40.A1). Der Promotor besitzt eine spezifische Bindungsstellen für einen allgemeinenTranskriptionsfaktor (TF II), der an einen, aus bis zu 14 Proteinen bestehenden supramolekularen Komplex andockt. Eine Domäne des TF II bindet spezifisch an eine aus T und A aufgebaute Basensequenz (TATA-Box genannt) und vermittelt die Andockung der Polymerase II an den Promotor (s. Abb. 40.A.1). Der supramolekulare Prozess fungiert dabei als Attraktor für die Polymerase II. Die Bindung der Komponenten des supramolekularen Komplexes und der Polymerase erfolgt in der Regel sukzessiv. Der supramolekulare Komplex kann aber auch als Ganzes binden und man bezeichnet ihn daher als RNA-Polymerase II-Holoenzym. Die TATA-Box liegt 25-35 bp vor dem Beginn des eigentlichen Gens (d. h "stromaufwärts" oder englisch "upstream"). Der TF II wurde in Laufe der Evolution kaum modifiziert. Manche TF II-Komplexe von Hefe können daher die Expression in menschlichen Zellen einleiten.

Es gibt drei wesentliche Unterschiede zwischen der Expression in Prokaryonten und Eukaryonten:

1. Im Gegensatz zur Transkription in Prokaryonten kann die Polymerase II nur in Gegenwart des allgemeinen Transkriptionsfaktors aktiv werden.

2. Wie Abb. 40.A.1 zeigt, können die vor den Genen liegenden regulierenden DNA-Sequenzen

einige 10.000 bp lang sein und mehrere Bindungsstellen für mindestens zwei weitere Gruppe von Kontrollproteinen aufweisen, nämlich die Gen-Aktivator Proteine und die Gen Repressor Proteine. Die DNA Sequenzen zur Bindung der Aktivatoren nennt man Gen-Verstärker (engl. gene enhancers). Sie sind typischerweise 50-200 bp lang und können oft tausende Basenpaare von der TATA-Sequenz entfernt liegen und trotzdem durch Schleifenbildung mit der spezifischen Bindungsstelle und dem allgemeinen TF an der TATA-Sequenz wechselwirken. Es gibt tausende dieser spezifischen Kontrollproteine und 5-10 % des menschlichen Genoms werden zur Kodierung der Kontrollproteine benötigt.

3. Nach Kapitel 2 (Abb.2.4) ist die DNA in den Chromosomen an Histone gekoppelt und die perlschnurartige Anordnung der so entstehenden Nukleosomen werden aufgrund der Wirkung zweiwertige Ionen und andere Proteine sehr stark kondensiert. Daher können zusätzliche Proteinkomplexe ins Spiel kommen, die diese Überstrukturen aufzubrechen und die Transkription zu beschleunigen. Man nennt diese auch Mediatoren der Genexpression (mediators).

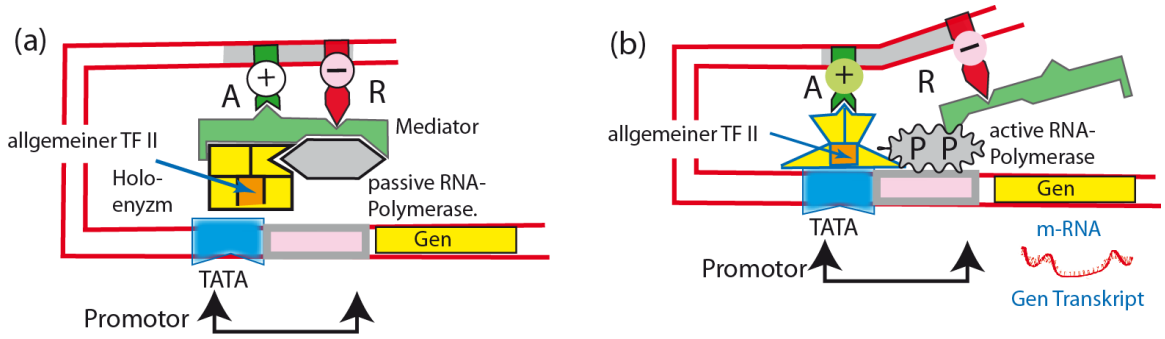

Figure 40.8: Abb. 40.A1: Vereinfachtes Modell der lokalen Restrukturierung der Chromosomen durch den Mediator (a) und des genetischen Schalters im aktivierten Zustand (b). (a) Die dicht gepackten Nukleosomen (s. Abb. 2.4) werden durch einen supramolekularen Proteinkomplex (Mediator genannt) und andere Helferproteine aufgebrochen. Der Mediator vermittelt die Kopplung zwischen dem Aktivator (A) und dem RNA-Polymerase II-Holoenzym (zu dem mehrere TF gehören können). Der genetische Schalter besteht aus der stromaufwärts vom Strukturgen (Gen) liegenden Promoter, der RNA-Polymerase II und den allgemeinen Transkriptionsfaktoren TF-II. Der Promotor besteht aus den Bindungsstellen (TATA) für den allgemeinen Transkriptionsfaktor (TF II) und für die RNA-Polymerase II (Pol II). Der TF-II koppelt an den aus über 10 Proteinen bestehenden Komplex der, zusammen mit der Polymerase, an den Promotor bindet. Ohne diese Kopplung ist die Polymerase nicht aktiv. Man beachte dass die DNA-Sequenz zwischen TATA und der Bindungsstelle für den Aktivator einige 10 000 bp betragen kann. Die Transkription wird durch Phosphorylierung von Pol II eingeleitet (siehe [Lodish] Ch.9; [Alberts], Ch. 7). A ist der Gen-Aktivator und R der Gen-Repressor oder-Inhibitor, deren Funktion weiter unten genauer beschrieben wird. Das Bild b zeigt den aktivierten Zustand. Der Aktivator vermittelt die starke Kopplung des TF an die TATA-Box. Der Repressor kann die Bindungstelle für den TF blockieren oder er kann die durch den Mediator vermittelte Bindung des TF verhindern.

40.1.7 Molekulare Mechanismen der TF-DNA Wechselwirkung

Es gibt eine ganze Reihe molekularer Mechanismen zur Kontrolle der spezifischen Bindung der Transkriptionsfaktoren an die DNA, die oft durch Bildung von Komplexen kombiniert werden. Als Beispiel hatten wir in Kapitel 36 die Bindung des Dimeren eines Repressors and den Operator betrachtet (Abb. 36.7). Wir hatten weiter gezeigt, wie durch Bildung von Tetrameren entfernte Bereiche der DNA gekoppelt werden können. In Eukaryonten gibt es eine weitere Vielfalt von Proteinen, welche hoch selektiv an spezifische Bereiche der DNA-binden. Wir betrachten der Einfachheit halber nur zwei Beispiele: Die Zinkfinger und die Leucine-Zipper (s. Abb 40.2):

1. Bei den Zinkfingern handelt es sich um zwei Peptid-Domänen (aus einer α-Helix und einem β-Faltblatt), die durch Zinkatome zusammen gehalten werden. Die Zn-Ionen bilden eine Koordinationsbindung mit je zwei Histidin- und Cystein-Gruppen. Sie schmiegen sich an die große Kule der DNA an und bilden spezifische Anordnungen von Basenpaaren (s. [Albrecht] Ch. 7). Die Proteine können sich zu Clustern zusammenlagern, und so sehr selektive spezifische Anordnungen von Basenpaaren in der DNA erkennen. Man nimmt an, dass sich im Verlauf der Evolution spezifische Cluster ausgebildet haben, die sehr selektiv spezifische Gene exprimieren können.

2. Der Leucin-Zipper besteht aus zwei langen α-Helizes, die einen Y-förmigen Komplex bilden. Jeder der beiden Arme des Ypsilons besitzt eine spezifische Struktur und bindet nur dann in die große Kule, falls diese die richtige Anordnung von Basenpaaren aufweist. Durch Kombination verschiedener α-Helizes können Komplexe entstehen, die nur dann an DNA binden, wenn zwei Anordnungen von Basenpaaren im richtigen Abstand voneinander angeordnet sind. Dies eröffnet vielfältige Möglichkeiten, TF zu kombinieren, um Kombinationen von Anordnungen zu erkennen. Abb. 40.2 zeigt, wie durch Kombination von zwei unterschiedlichen α-Helizes drei Anordnungen von Basenpaaren erkannt werden können. Allerdings sind die Möglichkeiten,

Kombinationen von Leucin-Zippern zu bilden stark eingeschränkt, da sich Komplexe nur bilden, wenn die hydrophoben Aminosäuren im oberen Teil der Zipper einen hydrophoben Grat ausbilden. Dadurch wird die Zahl der Zipper-Komplexe wesentlich eingeschränkt.

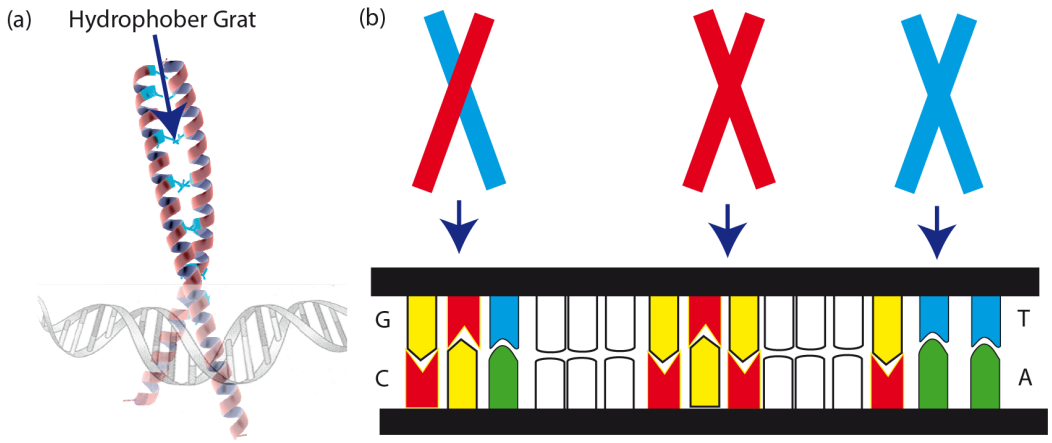

Figure 40.9: Abb.40.A.2. Struktur der Leucin-Zipper, die aus zwei α-Helizes bestehen, welche ein Y-förmiges Dimer bilden. Im Bereich des Stammes werden die Helizes über hydrophobe Seitengruppen (meist Leucin) zusammengehalten, während die unteren Hälften auseinander fächern und sich an die große Kule anschmiegen. Die unteren Hälften der Helizes binden aber nur an spezifische Kombinationen von Basenpaaren. Gezeigt werden Kombinationen von zwei Helizes, die an drei Anordnungen von Basenpaaren anlagern können. Man beachte, dass die reißverschlussartige Anordnung der α-Helizes nur möglich ist, wenn die hydrophoben Seitenketten der Aminosäuren einen hydrophoben Grat bilden.

40.1.8 Chromatin Restrukturierung (engl. chromatin remodeling)-Ein primärer Schritt der Genexpression.

Wie wir im Kapitel 36 sahen, ist die DNA im Chromatin auf zwei Weisen vor ungewünschten Transkriptionen geschützt: Erstens durch die Bindung an Histone und zweitens durch die Bildung von 30 nm Filamente und deren Zusammenballung in den Chromosomen. Dieser kon-

densierte Zustand muss für die Transkription aufgebrochen werden, damit das RNA-Polymerase II-Homoenzym an seinen Promotor binden kann. Diese Aufgabe übernimmt ein supramolekularer Proteinkomplex, den wir Mediator oder Chromatin-Restrukturierungs-Faktor nennen, zusammen mit einem weiteren supramolekularen Proteinkomplex dem RNA-Polymerase II-Holoenzym (s. Abb 40.3) und dem in Abb.40.A.1 gezeigten Gen-Aktivator (A). Hinzu kommen andere Helferproteine, die wir hier nicht einzeln aufführen können (s. dazu z.B. [Lodish] oder [Alberts] Ch.7).

Nachdem die lokale Struktur aufgebrochen ist, müssen die Histone acetyliert werden, um die positiven Ladungen zu kompensieren. Dazu dient das Enzym Histoin Acetylase (das hier aber zur Vereinfachung nicht gezeigt wird). Wir beschreiben dagegen zwei Methoden, mit denen diejenigen Stellen im Genom markiert werden können, die bei der Transkription eines gewissen Gens involviert sind (s. Abb. 40.A.3).

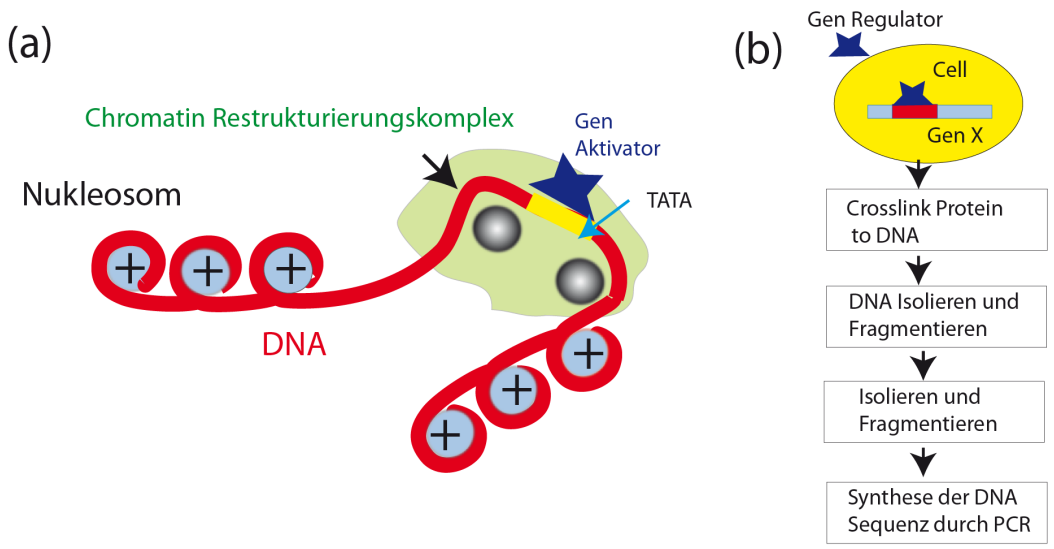

Figure 40.10: Abb. 40.A 3. (a) Schema der lokalen Restrukturierung der Chromosomen zur Exponierung eines spezifischen Gens und der Identifizierung der die Expression regulierenden Proteine. Das kronenartige Protein "Gen-Regulator" steht für das in Abb. 40.A.1a gezeigten Holoenzym. Notwendig ist außerdem die Entfernung der positiven Ladungen der Histone durch Acetylierung. Das rechte Bild zeigt die Methode zur Identifizierung derjenigen Positionen im Genom, die bei der Expression eines m-RNA durch Regulationsproteine besetzt werden.

Der Aktivator kann die Transkriptionsrate um einen Faktor 1000 beschleunigen (s. [Alberts] Ch.7). Man hat die beschleunigende Funktion des Aktivators durch zwei Gruppen von Experimenten bewiesen. Das einfachste besteht darin, den Aktivator mit dem Transkriptionsfaktor oder dem Holoenzym zu fusionieren und die Rate der m-RNA Produktion zu bestimmen. Eine universell einsetzbare Methode ist die Chromatin Immuno-Präzipitation. Mit dieser kann man feststellen, an welchem Bereich im Genom einer lebenden Zelle ein bestimmtes Protein (z.B. ein Aktivator oder ein TF) bindet. Die DNA und das Protein bilden so stabile Komplexe, dass sie auch noch einige Zeit nach dem Aufbrechen der Zelle im Lysat (dem Material, das nach Öffnen der Zellen freigesetzt wird) bestehen. Man stabilisiert diese Komplexe durch Vernetzung (z.B. mit Formaldehyd). Danach zerstückelt man die DNA mechanisch, so dass Fragmente aus 300-1000 bp entstehen. Um diese aus dem Lysat zu befreien, benutzt man die Methode der

Immunopräzipitation. Man bindet die DNA-Protein-Komplexe an kolloidale Partikel (z. B. aus Agarose) die mit Antikörpern gegen das gesuchte Protein bedeckt sind. Nach der Abtrennung der Kolloide durch Sedimentation werden die DNA-Fragmente abgetrennt und ihre Struktur bestimmt. Man kann die Struktur mit besonders hoher Empfindlichkeit bestimmen, indem man die DNA-Fragmente durch die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction PCR) vervielfältigt.

40.1.9 Kontrolle der Genexpression durch Wachstumsfaktoren und Zell-Zell Kommunikation

Am Anfang der Entwicklung der Drosophila Larven (im Zustand der Syncyticum) wird die Entwicklung allein durch die Gradienten der TF bestimmt, die sich frei in der Eizelle bewegen können. Sobald die Kerne jedoch von Plasmamembranen eingeschlossen werden, muss die Expression in der Regel von außen gesteuert werden. Diese wird durch mehrere Familien von Zell-Rezeptoren vermittelt, welche auf verschiedene Weise in die Transkription der Gene eingreifen (s. [Alberts] Ch. 7). Bei einer Gruppe handelt es sich um Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, die von anderen Zellen exportiert werden und sich im Gewebe diffusiv ausbreiten (S. Kapitel 40)). Dadurch kann die Genexpression verschiedener Zellen über größere Entfernungen synchronisiert werden. Wir betrachten im Folgenden drei Beispiele, die man cum grano salis durch das allgemeine Schema der Abb. 40.A.4 beschreiben kann (s. [Alberts] Ch 7 und Glossar "Embrologie).

1. Ein Mechanismus der Signalübertragung wird durch die Familie der Wnt-Proteine vermittelt, die man fast gleichzeitig in Mäusen und in Drosophila entdeckte. Es kontrolliert das Gen wingless, das für die Entwicklung der Flügel der Fliegen eine wichtige Rolles spielt. Es wird von dem Rezeptor Frizzled erkannt, falls dieser in der Membran einen Komplex mit einem Co-Rezeptor LRP bildet. Frizzled ist ein Tyrosinkinase-Rezeptor und wie wir in Kapitel 9.

A gesehen haben, werden solche Rezeporen aktiviert, indem der Ligand die Bildung eines Dimeren aus dem Rezeptor und einem Co-Rezeptor vermittelt. Die Bindung führt auf Umwegen dazu, dass das Protein β-Catenin einen Repressor am Gen wingless entfernt und die Expression des Gens einleitet. β-Catenin ist eines dieser multifunktionellen Proteine, die man oft in Zellen antrifft. Wir haben das Protein in Kapitel 28 als einen Teil des Mechanosensors der Endothelzellen kennen gelernt, wo es eine wichtige Rolle als Aktin-Membran Koppler spielt, indem es F-Aktin an die zytoplasmatische Domäne der Zelladhäsionsmoleküle der Cadherin Familie bindet.

2. Im Appendix des Kapitels 36 hatten wir einen anderen fundamentalen Kontrollmechanismus kennen gelernt, der über die Zell-Zell-Adhäsion vermittelt wird. Er beruht auf der spezifischen Bindung der Membranrezeptoren Notch und Delta, die in verschiedenen Zellen verankert sind. Auch hier beruht der Mechanismus der Modulation der Genexpression (wie in Abb 40.A.4 gezeigt) auf der Freisetzung eines Mediators.

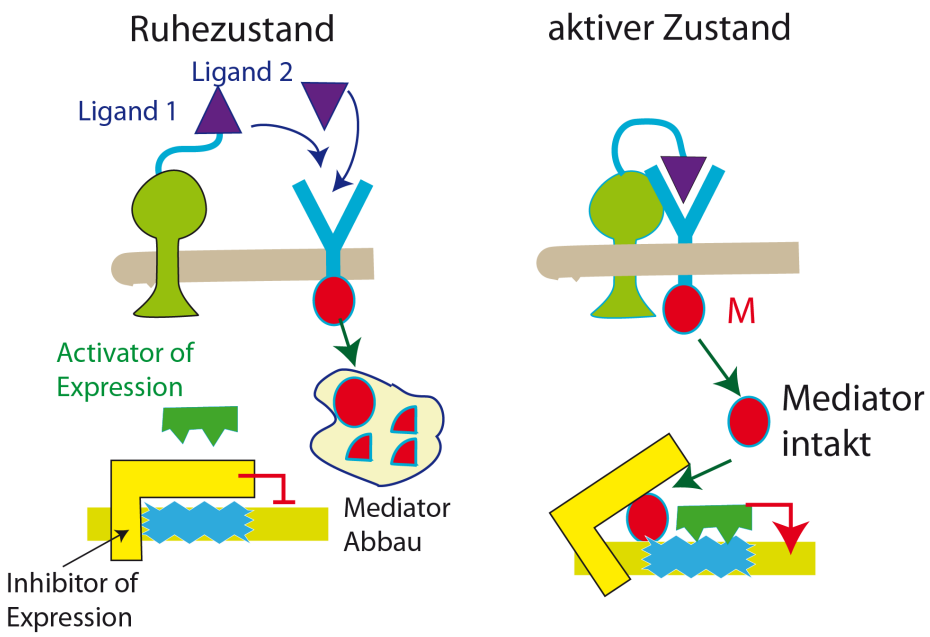

Figure 40.11: Abb. 40.A.4. Generelles Schema der durch Signalmoleküle kontrollierten Genexpression. In den oben betrachteten Beispielen wirken immer ein membranständiger Rezeptor und ein assoziierter Co-Rezeptor zusammen. Ohne Signalmoleküle wird der potentielle Aktivator (hier Mediator genannt) der Gene laufend im Zytoplasma abgebaut oder auf andere Weise an der Bindung an das Gen gehindert, wie im linken Bild gezeigt. Die Expression des Gens wird in allen Fällen durch einen Repressor verhindert. Bindet das Signalmolekül, so bleibt der Mediator intakt. Er diffundiert in den Kern und entbindet den Repressor vom Operator des Zielgens. Das Gen kann exprimiert werden.

3. Ein weiterer allgemeiner Kontrollmechanismus der Gen-Expression wird schließlich über Steroidhormone (wie Retinalsäure oder Cortison) vermittelt. Sie binden an spezifische Rezeptoren im Zytoplasma. Der Komplex diffundiert in den Kern und wirkt dann, meist zusammen mit einem anderen Protein, in der Regel als Aktivtor der Genexpression (siehe den Übersichtsartikel von A. Aranda und A. Pascual (2001) Physiological Reviews 81: 1269-1304).

4. Ein besonders komplexer, aber wichtiger Mechanismus der Genexpression wird durch das Hedgehog Proteine (Hh) vermittelt. Es wird durch das Segment-Polaritätsgen hedgehog (hh)

kodiert. Störungen des durch dieses Molekül vermittelten Signalweges können fatale Folgen für das Überleben der Embryos haben. In Kapitel 40 wird die Rolle des Signalmoleküls für die Ausbildung der Asymmetrie der Fliegenflügel diskutiert. Die durch Hh kontrollierten Gene (hedgehog (hh), engrailled (en), decapentaplegic (dpp) und das den Rezeptor kodierenden Gen patched (ptc)) werden durch Bindung von Hh an den Membranrezeptor Patched (Ptc) eingeschaltet. Dies führt zur Freisetzung eines aktivierenden TF (CiA) der Zinkfinger-Familie mit dem Namen "Cubitus interruptus". In Abwesenheit von Hh wird die Expression durch einen starken Repressor CiR unterdrückt.

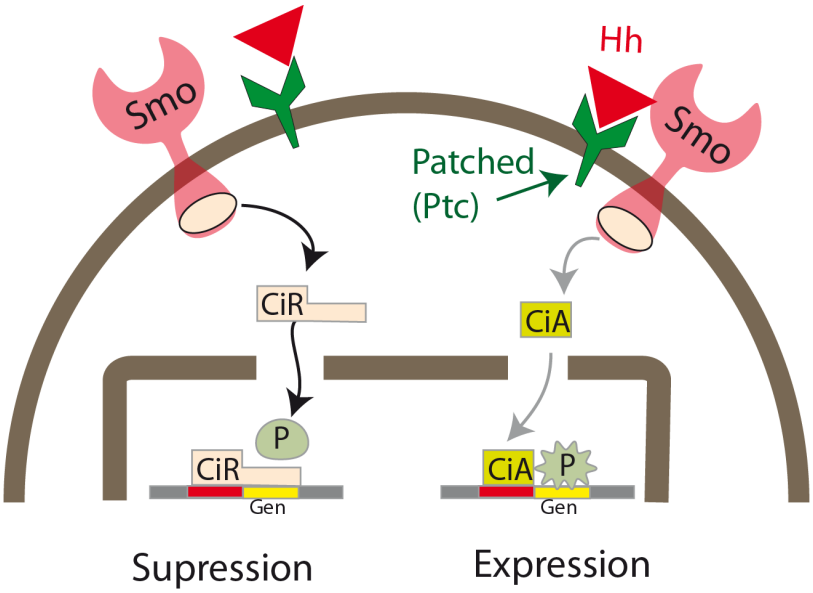

Figure 40.12: Figure 40.A.5 Drei Zustände der durch Hh vermittelten Signalübertragung. In Abwesenheit des Morphogens (Hh) wird die Expression der durch Hh kontrollierten Gene (dpp, hh, engrailed, patched (ptc)) unterdrückt, da der Repressor CiR der Familie der Zinkfinger-TF "Cubitus interruptus" (Ci) im Überschuss vorhanden ist. Bei hohen Konzentrationen von Hh führt dessen Wechselwirkung mit dem Co-Rezeptor Smoothen zur Bildung der aktivierenden Mitglieder (CiA) der Ci-Familie. Dadurch werden alle von Hh kontrollierten Gene aktiviert. Bei mittleren Konzentrationen von Hh werden CiR und CiA gleichzeitig erzeugt. Nur die Genen mit niedrigem Schwellwert der Aktivierung (wie dpp) werden exprimiert. Bei den hohen Konzentrationen von Hh wird patched überexprimiert. Hedgehog wird vollständig gebunden und von der Zelle durch Endozytose aufgenommen. Dadurch wird die Expression aller von Patched kontrollierten Gene unterdrückt. Zu Details der Bildung von CiR und CiA siehe [Chen 1994].

Die Wirkung von Hh auf den Rezeptor Patched hängt in komplexer Weise von der Konzentration von Hh ab. In Abwesenheit von Hh wird im Zytoplasma der TF Ci so biochemisch modifiziert, dass er als Repressor (CiR) der Transkription wirkt und die Expression der Morphogene Dpp, sowie des Rezeptors Patched unterdrückt. Bei kleinen Konzentrationen von Hh wird die Funktion des Repressors CiR unterdrückt. Mit zunehmender Konzentration von Hh wird eine aktivierende Form CiA von "Cubitus interruptus" erzeugt, welche die Expression mehrerer

Proteine aktiviert, insbesondere decapentaplegic (dpp), patched (ptc) und engrailed (en). Es gibt einen Zwischenzustand der Hh Konzentration, bei dem die TF CiR und CiA sich gegenseitig kompensieren können, so dass nur die Gene mit niedrigen Schwellen der Expression (wie dpp) exprimiert werden können. Auf diese Weise entstehen drei Zustände der Ci- Expression: Ein repressiver, ein neutraler und ein aktiver.

Eine wichtige Besonderheit des Signalwegs zur Bildung von Gewebegrenzen ist die Internalisierung der Patched-Hh- Komplexe bei hohen Konzentrationen von Patched. Dadurch wird Hedgehog aus dem Gewebe entfernt. Auf diese Weise kann die Expression der durch Hh kontrollierten Gene unterdrückt werden, was für die Bildung polarer Strukturen sehr wichtig ist (siehe Haupttext 40.3.1). Dies eröffnet zahlreiche Möglichkeiten zur Kontrolle der Genexpression durch die durch Hh, Patched und Smothened vermittelte Signalübertragung. Ein zentraler Schritt bei der Aktivierung der Genexpression ist die Internalisierung der mit Hh beladenen Rezeptoren. Hh ist ein Morphogen mittlerer Reichweite, das sich über rund 5 Zellen erstreckt.

40.1.10 Literatur

Wichtige Orginalarbeiten:

[1] Chen Y, Struhl G. Dual roles for patched in sequestering and transducing Hedgehog. Cell. 1996; 87:553-563.

[2] Strigini M. Cohen, S. (1997) A Hedgehog activity gradient contributes to AP axial patterning of the Drosophila wing. Development 124, 4697-4705

[3] Review: Hooper, J., Scott, M. (2006), Communication with hedgehog Nature Mol. Cell

Biol.6: 306-315.

Literatur

Pastor-Pareja JC, Grawe F, Martin-Blanco E, Garcia-Bellido A (2004) Invasive cell behavior during Drosophila imaginal disc eversion is mediated by the JNK signaling cascade. Dev Cell 7: 387-399

Allgemeine Literatur zur Entwicklungsbiologie.

[Alberts] Alberts, B et al. (2008) Molecular Biology of the Cell. 5th ed. Taylor and Francis. New York.

[Gilbert] Gilbert, S. F.(2006) Developmental Biology. Sinauer Associates Sunderland, Mass., USA

[Lodish] Lodish, H. et al (2008) Molecular Cell Biology, 6th edition, W.H. Freeman Company New York

Spezialliteratur

[Kellog 1998] Kellog, DR., et al. Behaviour of MT and actin filaments im living Drosophila embryos. Development 103: 675-686 (1998).

[NüVo 1980] Nüsslein-Volhard,C., Wieschaus, E. (1980) Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila. Nature 287:795-801 (1980)

[NüVo 1989] Roth, S., et al. A gradient of nuclear localisation of the Dorsal Proteindetermines the dorsoventral pattern in the Drosophila Embryo, Cell 59 1189-1202 (1989)

[Srivastava 2007] Srivastava, A., et al (2007) Organ and tissue integrity is often maintained in animals by a specialized extracellular matrix structure called the basement membrane (BM), PNAS, 104:2721-2726