Appendix 41: Die Entwicklung der Insektenflügel: Musterbildung durch morphogenetische Felder und direkte Zell-Zell-Kommunikation

Appendix 41: Die Entwicklung der Insektenflügel: Musterbildung durch morphogenetische Felder und direkte Zell-Zell-Kommunikation

41.1 Prolog

In diesem Kapitel gehen wir der Frage nach, wie während der Entwicklung des Embryos zelluläre Muster, Körperteile und Organe durch räumlich und zeitlich programmierte Zell-Differenzierung entstehen. Wir betrachten dazu die Entwicklung von Insektenflügel am Beispiel der Drosophila, die während der letzten 50 Jahre besonders intensiv untersucht wurde. An diesem Beispiel sollen fundamentale Konzepte der embryonalen Entwicklung von Organen eingeführt werden. Wie wir schon im letzten Kapitel 40 gesehen haben, wurden viele Gene und Mechanismen zur Steuerung der Genexpression in der Frühphase der embryonalen Entwicklung im Verlauf der biologischen Evolution wenig verändert. Sie verlaufen bei Insekten und bei

Wirbeltieren erstaunlich ähnlich. Daher ist es sinnvoll, sich an einem gut untersuchten Beispiel in die fundamentalen Prozesse der Entwicklungsbiologie einzuarbeiten. Die Prozesse sind zwar bei höheren Lebewesen wesentlich komplizierter als bei Insekten, aber sie verlaufen nicht prinzipiell anders. Dies hat uns insbesondere das Beispiel der HOX-Gene gezeigt. Die Analogie reicht sogar bis zur Kontrolle des Stoffwechsels durch Hormone, wie Insulin, das den Metabolismus der Fette und Kohlenhydrate in Fett-Zellen reguliert. Wenn man die Prinzipien der genetischen Kontrolle der Organbildung am einfachen Beispiel der Flügelbildung gut verstanden hat, hat man die Voraussetzung geschaffen, um komplexere Fragestellung der embryonalen Entwicklung anzugehen.

In den letzten 50 Jahren wurden große Fortschritte auf dem Gebiet der Entwicklungsbiologie erzielt und tiefe Einblick in die Rolle der genetischen Expression gewonnen, wie wir in Kapitel 40 sahen. Trotzdem ist es immernoch ein Geheimnis, wie sich die physikalischen und biologischen Eigenschaften der Zellen durch die Differenzierung ändern, oder wie die Zellen Gradienten morphogener Substanzen messen. Abgesehen von generischen theoretischen Modellen von Gierer und Meinhardt und Turing haben die Physiker das Gebiet der embryonalen Entwicklung erst in den letzten 10 Jahren entdeckt, um Fragen der Zusammenhänge zwischen physikalischen Eigenschaften und der embryonale Entwicklung vom Ei zum Lebewesen aufzuklären. Dieses Kapitel dient dazu die Begeisterung der Physiker für dieses Gebiet zu wecken, auf dem es noch viel zu entdecken gibt.

Um den folgenden Text besser zu verstehen, wird empfohlen, sich zunächst mit der Reifung der Fliegenlarven durch sukzessives Häuten und Metamorphose vertraut zu machen, wozu Wikipedia gut geeignet ist. Im Appendix 41.A findet man eine Zusammenfassung der Phänomenologie der Entwicklung der Imaginalscheiben (IS), aus denen die Flügel entstehen.

Die moderne Entwicklungsbiologie begann mit zwei revolutionären Entdeckungen von Hans

Driesch und Hans Spemann [1]:

Driesch trennte die zwei, während der ersten Teilung der befruchteten Eis eines Seeigeleis, entstehenden Tochterzellen und zeigte, dass aus jeder der Zelle ein normaler, nur etwas kleinerer Seeigel entsteht. Später zeigte sich, dass alle Zellen, die bis zur Gastrulation entstehen, die Fähigkeit besitzen, durch Zellteilung jeden beliebigen Zelltyp zu bilden.

Die zweite fundamentale Entdeckung machte Hans Spemann und seine Doktorandin (Hilde Mangold) durch elegante Transplantationsexperimente. Sie schnitten winzige Stückchen aus den Embryonen von Molchen (kurz vor und während der Gastrulation, s. Abb 40.1) aus und transplantierten sie an beliebige Stellen desselben oder eines anderen Embryos. Sie fanden zwei Verhaltensweisen. Stammten die Zellen von Stellen außerhalb des Randes des Urmunds, so bildeten sie dasselbe Gewebe wie ihre neue Umgebung, d.h. sie waren nicht vorprogrammiert (engl. non-committed). Zellen, die vom Rand des Urmunds (der Lippe) ausgeschnitten wurden, bildeten jedoch in der neuen Umgebung einen zweiten Urmund durch Gastrulation. Es bildeten sich nach Abschluss der Entwicklung siamesische Zwillinge. Spemann schloss daraus, dass das Schicksal der Zellen der Urmundlippe vorbestimmt ist, unabhängig von der neuen Umgebung nach der Transplantation. Er nannte den Prozess embryonale Induktion (der Zellen der neuen Umgebung durch die vorprogrammierten Zellen). Tatsächlich folgt aus der Beobachtung, dass die Position der Zellen im Embryo ihr Schicksal im Laufe der Entwicklung bestimmt. Man nennt diesen Zusammenhang zwischen der Position einer Zelle im Embryo und ihrer Entwicklung das Prinzip der Positions-Information (Principle of positional information).

[1] Der Entwicklungsbiologe und Naturphilosoph Hans Driesch lebte von 1867 bis 1941. Er gehört zu den wenigen aufrechten deutschen Professoren, die sich gegen die Entlassung der jüdischen Kollegen wehrte und wurde daher von der Universität Leipzig entlassen. Hans Spemann (1869-1941, Nobelpreis 1935) war ein deutscher Zoologe und einer der Väter der Embryologie. Thomas Morgan (1866-1945, Nobelpreis 1933) war ein amerikanischer Zoologe, der erstmals zeigte, dass die Gene in den Chromosomen linear angeordnet sind und der die erste Genkarte entwickelte.

Das dritte zentrale Prinzip der Entwicklungsbiologie entdeckte der amerikanische Zoologe Thomas Morgan. Er postulierte, dass die Differenzierung einer Zelle und seiner Position im Embryo durch Gradienten morphogener Substanzen bestimmt sein könnte, wobei zunächst unklar blieb, um welche Substanzen es sich dabei handelt. Im Kapitel 40 haben wir schon gelernt, dass es sich hierbei um Transkriptionsfaktoren handelt. Wir werden später sehen, dass auch Hormone oder Signalsubstanzen, wie die Retinalsäure, als Morphogene fungieren können.

Im Kapitel 40 hatten wir uns mit der frühen Phase der Entwicklung eines Lebewesens vom befruchteten Ei zum segmentierten Embryo befasst und gesehen, wie die phänomenologisch kugelsymmetrische Eizellen (z.B. des Seeigels) durch sukzessive Aktivierung der verschiedenen Arten von Genen polarisiert und segmentiert werden. Wir haben aber auch gelernt, dass das Zytoplasma der Eizelle durch die polare Ansammlung von mindestens zwei Klassen von m-RNA vorpolarisiert sein kann. In diesem Kapitel geht es darum, wie die homöotischen Selektorgene, in den als Wachstumszonen wirkenden, primären Imaginalscheiben das Wachstum und die Bildung der Organe steuern. Die Selektorgene bestimmen, an welchen Parasegmenten welche Extremitäten (Beine oder Flügel) entstehen (s. Kapitel 40.6), indem die durch sie stimulierte Expression von TF und Morphogenen das Wachstum steuern.

In diesem Kapitel betrachten wir die Entwicklung der Insektenflügel als Paradigma der genetischen Steuerung der Gewebebildung im Verlauf der Entwicklung der Larven und vor dem Einsetzen der Metamorphose. Wir konzentrieren uns dabei auf die Bildung der Flügel der Drosophila (insbesondere der Drosophila melanogaster, auch "Schwarzbäuchige" Taufliege genannt). An diesen wurde eine ungeheuere Menge von Experimente durchgeführt, seit Thomas Morgan vor 100 Jahren begann, an diesen rund 2,5 mm großen Insekten systematische entwicklungsbiologische Experimente durchzuführen.

41.2 Spezifische Polarisations-Regionen (Imaginal-Scheiben) steuern die Bildung der Extremitäten und Organe der Fliegen.

41.2.1 Einführung

Das Prinzip der Positionsinformation ist sehr universell und wird im Verlauf der Entwicklung eines Embryos immer wieder eingesetzt. Die am besten untersuchten Beispiele sind die Bildung der Flügel der Vögel aus den Flügelknospen [s. [Alberts] Ch. 21) und die Entstehung der Extremitäten der Insekten (Flügel, Antenne, Haltere (s. Glossar)) oder der Augen aus den Imaginalscheiben (IS) (engl: imaginal discs). Diese Wachstumszonen (insgesamt 19) bilden sich nach der Segmentierung der Larven (s. Abb. 41.2a).

Im Kapitel 40 haben wir gesehen, wie in der ersten Phase der Entwicklung aus dem isotropen Syncytikum ein segmentierter Embryo entsteht, und dass die Segmentierung durch sukzessive und interaktive Expression der Genprodukte der Lücken-Gene, der Paar-Regel-Gene und der Segment-Polarisations-Gene immer mehr verfeinert wird. Diese Phase dauert etwa einen Tag und führt zur Bildung der juvenilen Larve von etwa 0.5 mm Länge. Die Larve wird durch eine Polymerschicht (Haut) geschützt. Sie wächst die nächsten 8 Tage bis zu einer Länge von etwa 2.5 cm, wobei sich die Larve mehrfach häutet und die steife Polymerhülle abstreift (s. Appendix 41. A). In der ersten Phase zeigt sich die Segmentierung nur in der periodischen Verteilung der Paar-Regel-Gene (z.B. von even skipped (eve), und fushi tarazu (ftz)). Genauere Untersuchungen zeigen jedoch, dass sich schon nach etwa 9 Stunden im Epithelium der juvenilen Larven spezifische Bereiche ausbilden. Diese Bereiche bilden die Wachstumszonen der Extremitäten, der Augen und Geschlechtsorgane. Man nennt sie allgemein Imaginalscheiben (engl. imaginary discs) (IS). Zu Beginn bestehen die Zonen nur aus einigen zehn Endothelzellen, die aber schon die Anlagen zur Bildung der spezifischen Körperteile besitzen, wie wir gleich sehen werden.

Man nennt die Urform der IS in dieser Phase Primordien. Die Bildung der Körperteile aus diesen Zonen wird durch Aktivierung einer neuen Gruppe von Genen und ihren Produkten gesteuert: Den homöotischen Selektorgene (engl homeotic selection genes). Diese Gene werden oft kurz als HOX-Gene und die durch diese kodierten Proteine als Hox-Proteine bezeichnet. Offenbar sind die Zellen der IS die Träger der Positionsinformation im Sinne des Wolpert Modells der Positions-Information.

Da jeder Körperteil aus einer spezifischen IS entspringt, handelt es sich um determinierte Stammzellen (Endothelzellen) deren Schicksal vorprogrammiert ist. Dies zeigt folgendes Transplantationsexperiment: Man entnimmt einer kurz vor der Verpuppung stehenden Larve etwas Gewebe aus einer IS und transplantiert es in den Körper einer jungen Larve. Während der Metamorphose entsteht an dieser Stelle derjenige Körperteil, den die Zellen im Donor-Embryo gebildet hätten.

Die Bildung von Körperteilen und Organen aus Wachstumszonen ist ein universelles Prinzip der embryonalen Entwicklung, die von Insekten bis zum Menschen nach ähnlichen Prinzipien abläuft. Das zeigt das Beispiel der Bildung von Extremitäten (engl. appendices) der Wirbeltiere, wie der Flügel der Vögel. Sie entstehen aus knospenartigen Ansammlungen von Mesenchymzellen, den Flügelknospen, aus denen durch Differenzierung sukzessive die Knochen, d.h. der Oberarm, der Mittelarm und die Finger entstehen (siehe Kapitel 41. [Lodish]). Als Signalsubstanz fungiert hier die Retinalsäure. Man nennt die Bereiche (Klumpen) aus determinierten Mesenchymzellen, aus denen die Körperteile entstehen, auch Polarisations-Regionen (oder Polarisations-Zonen). In der Regel handelt es sich um relative kleine Bereiche aus rund 100μm Durchmesser. Die Gastrula der Seeigel (Abb.41.1) umfasst etwa 30 Zellen, die Flügelknospen der Hühner enthalten 100.

41.2.2 Die genetische Steuerung der Entwicklung der Insektenflügel: Eine Übersicht

Ein Beispiel, an dem die Prinzipien der genetische Steuerung der biologischen Morphogenese erläutert werden sollen, ist die Entwicklung der Insektenflügel mit ihrer charakteristischen Asymmetrie in anterio-posterior Richtung und Rippenbildung (s. Abb. 41.1b). Die Flügel entwickeln sich im Verlauf der Reifung der Larven aus den Imaginalscheiben (IS), die in unter der Außenhaut der Larven (der Kutikula) in das Gewebe eingebettet sind. In den jungen (einen Tag alten) Larven der Drosophila bestehen die IS eines Körperteils nur aus etwa 30-50 Zellen (den Primordia). Diese vermehren sich durch Zellteilung im Laufe der Reifung der Larven auf 30.000-50.000 Zellen, d.h. bis zu der nach etwa 9 Tagen einsetzenden Metamorphose. Einen kurzen Überblick über den Reifungsprozess wird in Appendix 41A gegeben.

Für die folgende Diskussion nehmen wir zunächst an, die IS bestehe aus einer zweidimensionalen Schicht aus Stammzellen. Wie Abb. 41.1 zeigt, enthält die kleine Zellschicht von rund 50 Zellen schon eine Art Masterplan der Entwicklung, in dem die zwei Polaritäten der Flügel, die Vorder- und Hinterseite (= aperior-posterior Polarität) und die Ober und Unterseite (=dorsal-ventral) schon festgelegt sind (s. [Morata 2001]). Dabei wird die A-P-Polarität durch die Expression des Gens engrailed auf der posterioren Seite und die D-V-Polarität durch die Expression von apterous auf der dorsalen Seite festgelegt. Es gibt einige Hinweise, dass diese Festlegung des Schicksals der Zellen des Primordiums durch die HOX-Gene gesteuert wird. Allerdings fehlen noch direkte Beweise.

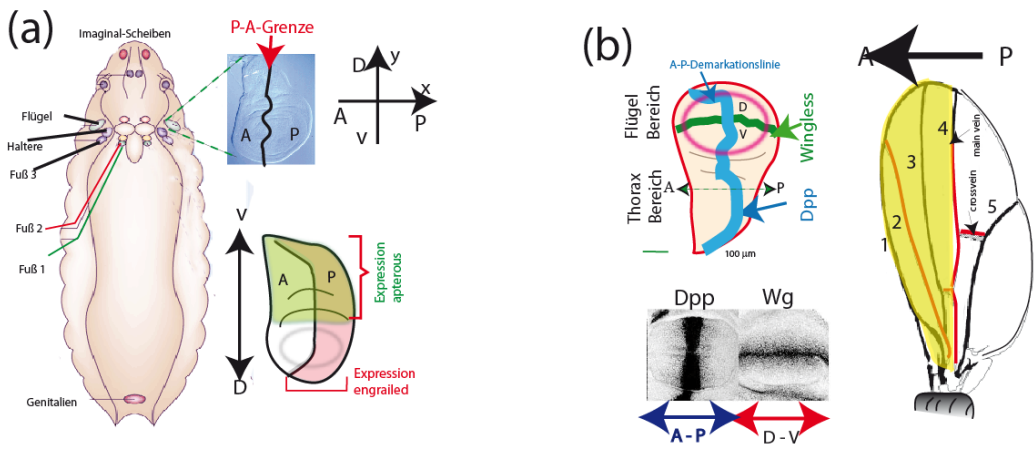

Figure 41.1: Abb. 41. 1. Zur Bildung der Insektenflügel aus Imaginalscheiben (IS) der reifen Larven (im dritten Larvenstadium). Festlegung der beiden Polaritäten A-P und D-V durch einseitige Gen-Expression. (a) Das linke Bild zeigt die Positionen einer Auswahl der insgesamt 19 Imaginalscheiben (IS). Das Bild oben rechts zeigt eine mikroskopische Aufnahme der die Flügel bildenden IS (Primordien) nach etwa 6 Tagen und die Definition der zwei Achsen anterior-posterior (A-P) und dorsal-ventral (D-V). Die längliche Form der IS besteht aus einem anterioren (A) und einem posterioren (P) Bereich, durch welche die A-P-Polarität der Flügel bestimmt ist. Man nennt die Zellen eines Typs (A oder B) oft auch Zell-Linien. Von diesen sind 34 der Klasse A und 21 der Klasse P zuzuordnen [Martin 2009]. Das Bild unten rechts zeigt, dass die zwei Achsen (A-P und D-V) durch die einseitige Verteilung der Expression der Gene engrailed (gezackt) und apterous (flügellos) festgelegt werden. Die Verteilung der Genexpression führt zur Aufspaltung der IS in vier Quadranten, die man auch Kompartimente nennt. (b) Links oben: Stabilisierung der Mosaikstruktur des Flügels durch Bildung der Grenzlinien (Demarkationslinien) zwischen den vier Zell-Linien. Diese werden durch Streifen aus Zellen gebildet, welche die Morphogene Dpp (in A-P-Richtung) und Wingless (in D-V-Richtung) exprimieren. Das untere Bild zeigt die Markierung der Zell-Streifen durch GFP markierte Dpp und Wingless (Wg) nach [Japs 2004]. Das rechte Bild zeigt die Struktur des Flügels. Der gelb-grün unterlegte Bereich markiert die Zellen des Typs A (aperior). Die Rippen 1-5 und die Querrippe sind sogenannte Venen (engl. veins). In den voll entwickelten Flügeln sind die Venen mit Lymphe gefüllt und dienen der Versorgung der Flügel. Man beachte, dass die Zellschichten der dorsalen und ventralen Seite während und nach der Morphogenese durch Polymerfilme (aus Chitin) ersetzt werden (siehe auch Appendix 41.A).

Wir diskutieren zunächst einige wichtige Experimente und Beobachtungen, die zu dem heutigen Bild der Aufteilung der Flügel-IS in Kompartimente geführt haben und gehen dann dazu über, die Steuerung des Wachstums durch morphogene Gradienten zu beschreiben. Der Leser sollte an dieser Stelle folgende Faustregeln im Auge behalten (s. dazu auch Kapitel 39A und das Glossar "Embryologie):

Die Expression der Gene (z. B. der Paar-Regel Gene in Tabelle 40.1) wird durch Transkriptionsfaktoren geregelt, die von diesen selbst oder von anderen Genen derselben oder einer anderen Klasse (z.B. von Segment-Polaritäts-Genen) kodiert werden. Dadurch bilden sich Netzwerke von miteinander gekoppelten Genen, die oft eine gewisse Aufgabe erfüllen, wie die Bildung von Demarkationslinie zwischen zwei Kompartimenten (die wir weiter unten betrachtens. Abb.41.1) oder die Entstehung isolierter Haare (s. Kapitel 36.A).

Viele Morphogene (oft Liganden genannt) wirken über membranständige Rezeptoren, welche andere Gene über spezifische Signalkaskaden ein- oder ausschalten. Die Morphogene können im Gewebe frei diffundieren oder (wie die Rezeptoren) an Membranen gebunden sein. Beispiele des ersten Falls sind die über den Wnt-Signalweg vermittelten Regelprozesse (s. Glossar). Das für uns wichtigste Beispiel des zweiten Falls ist der über den Rezeptor Notch vermittelte Signalweg.

Der Mechanismus der Stimulation der Signalkaskaden bestimmt die Reichweite der Wirkung der Morphogene. Der über Notch vermittelte Signalweg erfordert den direkten Zell-Zell-Kontakt, während die über diffusive Liganden bestimmten Reichweiten mehrere Zelldurchmesser (≈ 100 μm) betragen können.

Einige Morphogene wirken wie Wachstumsfaktoren und leiten die Proliferation der Zielzellen ein, wie der TGF-β-Signalweg, der über Decapentaplegic (Dpp) aktiviert wird, das in dem

Gewebe frei diffundiert.

Die Bildung der anterior-posterior und dorsal ventral-Grenzlinien (sowie der Venen der Flügel) erfordert das Zusammenspiel mehrer Gene und Morphogene, wie an den Beispielen der Bildung der A-P- und D-V- Grenzen diskutiert wird.

Manche Morphogene wirken nicht direkt als TF sondern sie modulieren die Eigenschaften der Rezeptoren für Morphogene derart, dass diese die Expression eines spezifischen Gens noch stärker aktivieren und andere inhibieren. Ein wichtiges Beispiel ist das Morphogen Fringe, das die Grenzen zwischen den Somiten festlegt (s. Kapitel 41).

Um die Übersicht zu behalten, werden im Folgenden nur die wichtigsten der an der Entwicklung der Flügel beteiligten Spieler betrachtet. Detaillierte Betrachtungen der molekularen Mechanismen der Genexpression oder der Signalkaskaden würden uns zu sehr von dem Ziel ablenken, folgende zentrale Fragen zu beantworten: Wie werden die Grenzen zwischen verschiednen Zelllinien (z. B. dorsalen und ventralen) gebildet? Wie wird das Wachstum der Körperteile beschränkt?

41.2.3 Einige revolutionäre Experimente

Bestrahlungsexperimente: Jahrelange Untersuchungen der Wirkung der durch Röntgenbestrahlung induzierten Mutationen auf die Form der Insektenflügel lieferten folgende wichtigen Erkenntnisse. Die Zellen der Wachstumszonen (IS) zerfallen von Anfang an in zwei Gruppen (Zell-Linien) A und P, welche links und rechts einer scharfen Demarkationslinie liegen (s. Abb. 41.1a). Die Zweiteilung überträgt sich auf die Flügel, die in eine anteriore (A) und eine posteriore Hälfte (B) zerfallen. Diese werden durch eine scharfe, etwa 50 μm breite, Demarkationslinie

getrennt. Sie besteht aus etwa 5 Reihen von Zellen, welche das Protein Decapentaplegic (dpp) exprimieren und dessen Struktur und Funktion wir weiter unten betrachten (s. Abb. 41 b, und Appendix 41.A). Die Experimente zeigten:

Jede Mutation der Zellen in der IS des Typs A (bzw. P) führt nur zu Veränderungen der Form des Flügels auf der anterioren (bzw. posteriorer) Seite, aber nie auf der anderen. Die Demarkationslinie läuft etwa entlang der zentralen Achse des Flügels, fällt aber nicht mit der zentralen Vene zusammen. Spätere Untersuchungen der Gene zeigten schließlich, dass die Zellen der posterioren Hälfte der IS das S-P-Gen engrailled exprimieren, währen die der anterioren Hälte dies nicht tun.

Eine analoge Asymmetrie der Genexpression zeigen die Flügel in der ventral-dorsal Richtung. In diesem Fall besteht der Unterschied darin, dass die Zellen der dorsalen Seite (D) das Gen apterous (übersetzt flügellos) exprimieren, während die der Seite V das nicht tun. Insgesamt entsteht durch diese Unterschiede der Zelle eine Aufteilung der IS in vier Segmente, die man auch Kompartimente nennt.

Transplantationsexperimente: Zur Klärung der Frage, wodurch das Wachstum der Kompartimente des Flügels kontrolliert wird, wurden folgendes elegante Experiment durchgeführt [Martin 2009]. Durch kurzfristige Erhöhung der Temperatur der sich entwickelnden Eier auf 37°C entstehen Mutationen (M+), welche wesentlich langsamer wachsen als der Wildtyp. Durch Kontrolle der Dauer der Erhöhung erreicht man, dass höchstens eine Zelle pro Kompartiment mutiert ist. Die Analyse der Struktur der Flügel lieferte zwei Ergebnisse.

Erstens: Jede Zelllinie (die Mutante und der Wildtyp) teilen sich unabhängig voneinander und die von Ihnen bedeckten Flächen in den Kompartimenten der Flügel sind durch die eingeprägten Teilungsraten der Zellen bestimmt.

Zweitens: die Größe der Kompartimente zwischen den Rippen des Flügels wird durch die Mutationen nicht geändert. Das Experiment liefert keine Antwort auf die Frage, was die Größe der Flügel bestimmt. Eine Möglichkeit ist die Verlangsamung des Metabolismus der Zellen. Einen anderen Weg der Limitierung des Wachstums durch Gradienten der Morphogene, werden wir später kennen lernen.

41.3 Genetische Netzwerke bilden Sensoren morphogenetischer Gradienten und kontrollieren so die Bildung polarer Gewebestrukturen

41.3.1 Ein elegantes Experiment

Wie Abb. 41.1b zeigt, wird die Polarität der Flügel schon im Primordium aus rund 100 Zellen durch die einseitige Expression des Gens engrailed (en) im Kompartiment P und die Expression des Wachstumsfaktors Dpp entlang der Demarkationslinie zwischen den Zellinien A und P bestimmt. Der Streifen aus Dpp exprimierenden Zellen ist das Organisationszentrum der A-P-Polarisierung. Dpp ist ein starker Wachstumsfaktor, der Gradienten in beide Richtungen senkrecht zur A-P-Grenzlinie ausbildet. Die A-P-Polarität (Asymmetrie) wird durch Zusammenspiel von vier wichtigen Genen (engrailed (en), hedgehog (hh), wingless und patched (ptc)) und ihren Genprodukten verwirklicht. Wie bei vielen anderen Prozessen der Polarisierung des Gewebes in Drosophila spielt das Morphogen Hedgehog (Hh) eine führende Rolle. Hh ist ein lösliches Morphogen mittlerer Reichweite. Aufgrund seiner Größe (MG 98 000) und der Bindung an den membranständigen Patched, diffundiert es im Gewebe langsam und beeinflusst die Genexpression über drei bis vier Zelldurchmesser.

Einblick in die Kontrolle der A-P-Polarität der Flügel durch Hh lieferten das elegante Experiment der Abb. 41.2 [Stringili 1997]. Es zeigt die räumliche Verteilung der exprimierten Proteine Hh und En, sowie die Position der Dpp exprimierenden Zellen. Die Position letzterer wurde durch die Methode der dpp-LacZ-Markierung sichtbar gemacht (s. Kapitel 39. A).

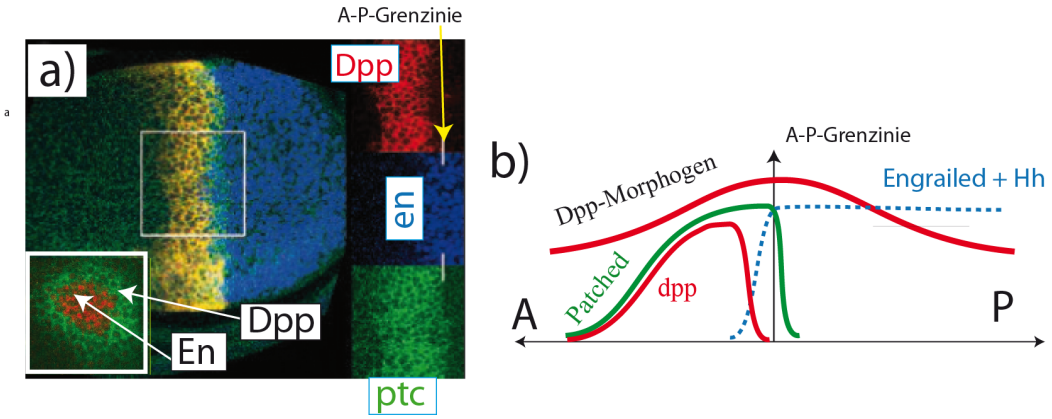

Figure 41.2: Abb 41.2: (a) Beobachtung der räumliche Verteilung der exprimierten Proteine Hh und En, sowie die Position der Dpp exprimierenden Zellen im dritten Häutungsstadium. Die En (blau) und patched (grün) produzierenden Zellen wurden mit Antikörper markiert. Die Position der Dpp (rot) markierten Zellen wurde durch die Methode der dpp-LacZ-Markierung sichtbar gemacht (Bild modifiziert nach [Stringini 1997]). Die Verteilung der Proteine in dem weißen Rahmen wurde auf der rechten Seite in hoher Vergrößerung gezeigt. Die zwei weißen Linien markieren die Demarkationslinie der A-P-Polarität. Der Einsatz links unten zeigt die ringartige Expression eines Dpp exprimierenden Klons (grün markiert) der einen Cluster aus En exprimierenden Zellen umgibt. Der Ring ist einige Zelldurchmesser breit. (b) Unterschiedliche Verteilung der Morphogene in den Kompartimenten A und P. Man beachte, dass Hh nicht auf der aperioren Seite exprimiert wird, dass es sich aber diffusiv einige Zelldurchmesser in A hinein ausbreiten kann. Dadurch entsteht ein dünner Streifen Dpp-produzierenden Zellen links von der A/P-Grenzlinie liegt.

Aus dem Experiment der Abb. 41.2 kann man folgendes lernen:

1. Das En-Protein wird nur im Kompartiment P exprimiert und der linke Rand des Bereichs der En-Expression markiert die A-P-Grenze (s. zwei vertikale weiße Linien rechts im Bild der Abb. 41.2 a).

2. Der Rezeptor Patched wird im ganzen Kompartiment A (aber nur dort) exprimiert. Die Konzentration fällt aber mit dem Abstand von der A-P-Grenze schnell ab.

3. Hh wird an der AP- Grenze und bis etwa 5 Zelldurchmesser in den A-Bereich hinein exprimiert, während die Dpp exprimierenden Zellen nur links von der A-P-Grenze erscheinen und etwa so weit wie Patched in den A-Bereich hinein ragt.

4. Das Morphogen Dpp breitet sich in dem A- und dem P-Bereich durch Diffusion aus.

Nun ergeben sich folgende Fragen: Was stabilisiert das oben beschriebene asymmetrische Muster der Genexpression? Was sorgt für die Begrenzung der Dpp exprimierenden Zellen auf den zentralen Streifen (Abb.41.1) und für die Unterdrückung der Expression von Hh im anterioren Kompartiment?

Hier kommt die außergewöhnliche Kontrolle der Genexpression durch Hedgehog ins Spiel, die zunächst ausführlich beschrieben wird.

41.3.2 Die Hedgehog/Patched vermittelte Signalkaskade(oder der über das Rezeptorpaar Smoothened/Patched vermittelte Signalweg wirkt als Sensor morphogenetischer Gradienten)

Das Morphogen Hedgehog reguliert die aperior-posterior Polarisierung vieler Organe und Körperteile. Es kontrolliert die Expression einer ganzen Reihe von Genen, von denen wir hier nur hedgehog, dpp, engrailed und patched betrachten. Der durch Bindung des Hedgehog Proteins (Hh) an den membranständigen Rezeptor Patched vermittelte Signalweg spielt eine universelle Rolle für die Bildung von polarem Gewebe oder für die Ausbildung scharfer Grenzen zwischen verschiedenen Gewebearten. Ein besonders gut untersuchtes Beispiel ist die Ausbildung der A-P-Polarität der Fliegenflügel. In diesem Fall wird der Signalweg durch Bindung von Hh an den Rezeptor Patched (Ptc) eingeschaltet, der in Kombination mit dem Co-Rezeptor Smoothened die Expression der Gene engrailed (en) und decapentaplegic (dpp), aber auch von patched (ptc)und hedgehog (hh) selbst, reguliert. Dabei bestimmt die Konzentration von Hh welcher der Gene exprimiert wird, und zwar auf folgende Weise (s. Abb. 41.3):

In Abwesenheit von Hh wird die Expression aller angesprochenen Gene durch einen starken Repressor (CiR) der TF der Familie "Cubitus interruptus" unterdrückt (s. Glossar). Dabei handelt es sich um einen TF der Zinkfinger-Familie. Durch die Bindung des Morphogens Hh an den Rezeptor Patched wird zusätzlich eine aktivierende Form der Familie "Cubitus interruptus" (nämlich CiA) freigesetzt. Wie Abb. 40. A5 zeigt, erfolgt dieser Prozess auf dem Umweg der Komplexbildung zwischen dem Rezeptoren Patched und Smoothened (Smo). Dadurch wird ein komplizierter intrazellulärer Signalweg geöffnet, der am Ende zur Bildung eines aktivierenden TF (CiA) der Ci-Familie führt (s. Abb. 41.3a und b).

Die Expression der Gene hängt vom Konzentrationsverhältnis $\alpha = \frac{[CiA]}{[CiR]}$ ab, das seinerseits durch die Konzentration von Hh bestimmt ist. Jedes der oben genannten Gene wird oberhalb eines charakteristischen Schwellwertes von α oder der Hh-Konzentration [Hh] exprimiert (s. Abb

41.3c). Bei kleinen Werten von α wird das Morphogen Dpp exprimiert, welches die niedrigste Schwelle besitzt. Bei mittleren Werten kommen die Gene patched und engrailed hinzu und erst bei hohen Werten von α wird auch das Gen Hh eingeschaltet.

Eine wichtige Besonderheit des durch Patched vermittelten Signalwegs 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 einiger, durch Hh kontrollierten Gene unterdrückt werden, was für die Bildung polarer Strukturen sehr wichtig ist (siehe Haupttext 41.3.1).

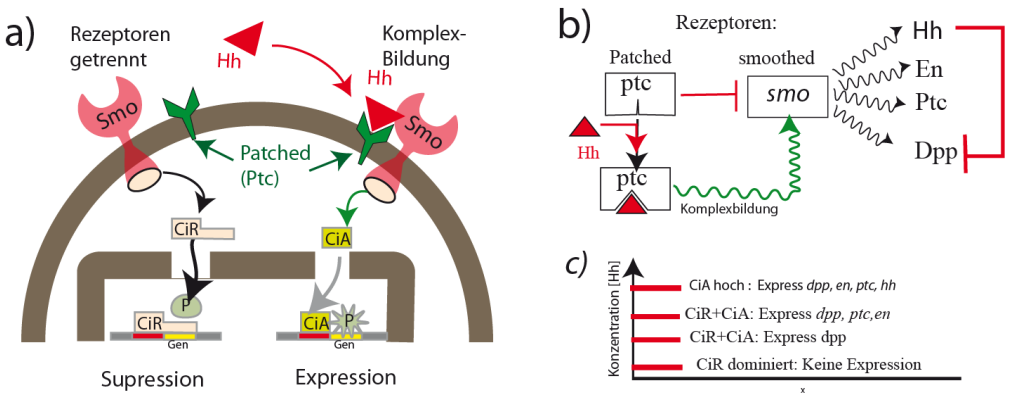

Figure 41.3: Abb. 41.3: Zur Kontrolle der durch Hh vermittelten Expression durch Komplexbildung zwischen dem Hh-Rezeptor Patched (Ptc) und dem Co-Rezeptor Smoothened (Smo). Solange Hh nicht an Ptc bindet, wird Smo nicht engagiert (siehe (b)) und die Expression aller Gene wird durch den repressiven Transkriptionsfaktor (CiR) der Familie "Cubitus interruptus" (Ci) unterdrückt. Bindung von Hh induziert die Aktivierung einer Signalkaskade, die zur Bildung eines aktivierenden TF (CiA) führt. Das Verhältnis der Konzentrationen $\alpha = \frac{[CiA]}{[CiR]}$ nimmt mit dem Bruchteil der Hh bindenden Morphogene zu, d.h. α steigt mit der Hh-Konzentration [Hh]. Mit zunehmendem [Hh] werden die Gene exprimiert, für die das Verhältnis α einen charakteristischen Schwellwert übersteigt. Mit zunehmendem α (oder [Hh]) wird zuerst dpp eingeschaltet. Danach folgen die Gene en, ptc, und schließlich hh selbst. (b) Schematische Darstellung der durch Hh vermittelten Aktivierung der Genexpression. In Abwesenheit von Hh wird die Expression aller Gene durch den repressiven TF CiR unterdrückt. Mit zunehmender Konzentration [Hh] wird durch Komplexbildung zwischen Patched und Smoothened der, die Expression aktivierende, Zinkfinger TF CiA freigesetzt und das Verhältnis $\alpha = \frac{[CiA]}{[CiR]}$ nimmt zu. Die Gene dpp, en, ptc und hh werden sukzessive eingeschaltet, falls α einen charakteristischen Schwellwert übersteigt. (c) Schemastische Darstellung der sukzessiven Expression der Gene dpp, en, ptc und hh mit zunehmender Hh Konzentration. Die Gene bilden offenbar ein Netzwerk, das als Sensor zur Messung morphogenetischer Gradienten wirken kann.

Die Entwicklung der stabilen A-P- Polarität kann man sich aufgrund der obigen Eigenschaften des durch Hh kontrollierten Gen-Schalters wie folgt vorstellen: Im ganzen P-Bereich wird

Hh laufend (engl. constitutively) durch En exprimiert. Dagegen wird die Dpp-Expression durch En unterdrückt. Da die Hh-Konzentration hoch ist, werden die Hh-bindenden Patched Rezeptoren durch die Zellen internalisiert, so dass die Zellen kein Dpp exprimieren können. Da die Reichweite des Morphogens Hh aber nur einige 10 μm beträgt, wird Dpp links von der A-P-Linie nur in einem dünnen, etwa 5 Zellen breiten Streifen erzeugt. Auch die Dichte der Patched exprimierenden Zellen fällt schnell auf null ab (s. Abb. 41.3 und 3b). Da die Schwelle der Hh Expression am höchsten ist, gibt es im A-Bereich keine Hh erzeugenden Zellen. Trotz der Asymmetrie kann sich Dpp aufgrund seiner großen Reichweite links und rechts von der Grenze ausbreiten (s. Abb. 41.3 b). Da Dpp ein sehr kompetenter Wachstumsfaktor ist, stimuliert er das Wachstum der Imaginal-Scheibe bis zur dritten Häutungsphase. Auf die Frage was das Wachstum stoppt, werden wir im nächsten Abschnitt eingehen.

41.3.3 Eine Zwischenbilanz

Die A-P-Polarität der Flügel ist schon in dem, nur einige 10 Zellen umfassendem Primordium festgelegt, aus dem sich die Flügel entwickeln. Die Polarität wird durch das genetische Netzwerk festgelegt, welches durch die Bindung des Morphogens Hedgehog (Hh) an den Rezeptor Patched die Expression der vier Genen dpp, en, ptc und hh kontrolliert wird. In Abwesenheit von Hh im Gewebe wird die Expression der Gene durch den repressiven Vertreter (CiR) der TF-Familie "Cubitus interruptus" unterdrückt. Die Bindung des Liganden Hh an Patched aktiviert eine Signalkaskade, welche den aktivierenden Vertreter CiA freisetzt. Mit zunehmender Hh-Konzentration [Hh] steigt das Verhältnis der Konzentrationen $\alpha = \frac{[CiA]}{[CiR]}$ und die vier Gene werden sukzessive aktiviert. Da die Schwelle von $\alpha(j)^*$ oberhalb der die Expression der Gene einsetzt, für die vier Gene verschieden ist (wobei $\alpha(dpp)^* < \alpha(ptc)^* < \alpha(en)^* < \alpha(hh)^*$ werden auf der aperioren Seite (A) die Gene ptc und dpp und auf der posterioren Seite en und hh exprimiert.

Das Wachstum der IS durch Proliferation der Zellen wird durch Ausschüttung des starken Wachstumsfaktors Dpp gesteuert, der sich beiderseits der A-P-Grenze diffusiv ausbreitet [Kruse 2004]. Der Streifen der Dpp exprimierenden Zellen wirkt also als Organisationszentrum des Wachstums. Wie Abb 41.4 zeigt, erfolgt das Wachstum der Primordien durch Teilung der Zellen in lokalen Bereichen, die statistisch in den Kompartimenten A und B verteilt sind. Man kann diese lokalen Teilungszonen durch spezifisches Anfärben der Zellen in der Mitose-Phase beobachten [Milan, 1995]. Über die Gradienten der Morphogene (Hh und Dpp und En) und des Rezeptors Patched wird die Eigenschaft der Zellen festgelegt. Das Modell der Positions-Ordnung von Wolpert und Spemann wird damit auf eine molekularbiologische Grundlage gestellt.

41.4 Was begrenzt das Wachstum der Zellen: Inverse Kopplung zwischen morphogenetischen Gradienten und Genexpression

41.5 Vorbemerkung zur Anatomie der IS (s. auch Appendix 41.A)

Wir haben bisher stillschweigend angenommen, dass die Imaginalscheiben aus zweidimensionalen Anordnungen von Epithelzellschichten bestehen. Dies gilt auch für die frühe Phase der Entwicklung. Mit zunehmender Entwicklung entsteht eine komplexe Zellschicht, die aus vier Regionen besteht (s. Abb. 41.A.1). Zwei der Regionen dienen der Entwicklung von Gelenken; Aus einer entsteht der Nacken, an dem der Flügel andockt und aus der vierten Region entstehen die Flügel selbst. Da es sich um ein sackartiges Gebilde handelt, nennt man diese Region auch oft Flügelsack (engl. wing pouch). Zu Beginn besteht dieser aus säulenförmigen Zellen.

Wie oben erwähnt und in Abb. 41.3 gezeigt wird, wachsen die Flügel-IS durch Zellteilung in lokalen Wachstumszonen, die statistisch an verschiedenen Stellen innerhalb der A und P-Kompartimenten entstehen und etwa vier Zellen enthalten. Viele Beobachtungen zeigen, dass die Kompartimente der IS isotrop wachsen, d.h. jede Zelle eines Kompartiments kann sich mit gleicher Wahrscheinlichkeit teilen, bis das Kompartiment seine natürliche Größe erreicht hat, d.h. das Zellwachstum ist isotrop (s. das Experiment mit langsam wachsenden Mutanten in 42.2.3). Dies ist erstaunlich, da der Wachstumsfaktor Dpp mit dem Abstand von der A-P- Grenze schnell abfällt. Das Wachstum durch Zell-Proliferation wird durch den potenten Wachstumsfaktor Dpp aktiviert. Da dieser während der ganzen Entwicklung bis zur Metamorphose wirkt, erhebt sich die Frage, wodurch die Größe der Flügel-IS begrenzt wird. Es gibt a priori zwei Erklärungen für dieses zunächst rätselhafte Verhalten. Das Wachstum kann durch physikalische Randbedingungen oder durch Kontrolle (Abregelung) der Wirkung des Morphogens begrenzt werden. Den ersten Mechanismus werden wir weiter unten besprechen. Der zweite Weg geht über einen universellen Mechanismus, der erst neuerdings entdeckt wurde [Müller 2005], [Affolter]. Er beruht auf dem Zusammenspiel des Gradienten des Wachstumsfaktors Dpp und einem spiegelbildlichen Gradienten der Transkrition des gens brinker. Das von brk kodierte Protein Brinker wirkt als Repressor von Dpp und unterdrückt diese (s. Abb 41.3). Dabei kommt die Doppelfunktion von Dpp zum Tragen, das einerseits als Wachstumsfaktor fungiert und andererseits die Expression des Gens brk unterdrückt (s. [Müller 2003)]).

Aus heutiger Sicht stellt man sich folgendes Szenarium des begrenzten Wachstums vor: In der Nähe der A-P-Grenze wird die Expression von Brinker unterdrückt, da der Dpp-Spiegel hoch ist. An den äußeren Enden des Flügelsacks (engl. wing pouch) ist die Brk-Konzentration dagegen wegen des Abfalls der Dpp-Konzentration hoch und unterdrückt die Expression des Wachstumsfaktor und des Wachstums. Das Modell wird durch einige Beobachtungen gestützt.

Zum Beispiel liefert das Ausschalten des brk-Gens viel größere Flügel. Dasselbe beobachtet

man, wenn die Dpp-Expression dauernd aktiviert wird. Dies zeigt: Das Wachstum wird durch die Unterdrückung der Expression des Repressors Brk durch den Wachstumsfaktor selbst begrenzt [Affolter 2007].

Nun bleibt noch die Frage, weshalb das Wachstum der Flügel-IS homogen ist, wie Abb. 41.4 zeigt, obwohl das als Zytokin wirkende Dpp mit dem Abstand von der A-P-Grenze aufgrund der Wirkung von Brinker abnimmt. Eine mögliche Erklärung liefert folgende Beobachtung: Die Häufigkeit der durch Dpp induzierten Zellteilung hängt auch von der Dichte der Rezeptoren (z.B. Thickvein =Tkv) ab. Andererseits wird die Expression des Rezeptors durch Dpp heruntergeregelt und daher nimmt die Dichte mit dem Abstand von der A-P-Grenze zu [Lecuit 1998]. Daher wird die Wirkung des Morphogens isotroper.

41.5.1 Kontrolle des Wachstums durch die Versorgung

Eine andere Möglichkeit für begrenztes Wachstums ist die Versorgung der Zellen mit den für das Wachstum notwendigen Nahrungsmitteln, wie am Flügelwachstum von Schmetterlingen beobachtet wurde. Man kann die Flügel IS in Petrieschalen wachsen lassen wenn man dem Medium Lymphe der Adern zusetzt [Nijhout2002]. Der Grund ist die Anwesenheit von Bombyxin, ein mit Insulin verwandtes Hormon. Hormone der Insulin-Familie kontrollieren auch das Wachstum der Drosophila [Ikeya 2002]. Störungen der durch Insulin vermittelten Signalübertragung führen zu Zwergwachstum. Der Grund ist ein kausaler Zusammenhang zwischen der Verfügbarkeit der Nahrung und des durch Insulin vermittelten Wachstums. Bei Mangel an Nahrung verlangsamt sich dessen zeitlicher Umsatz. Dies ist notwendig, um die biochemischen Prozesse an die neue Situation anzupassen, damit die Regelsysteme nicht außer Kontrolle geraten; Ein "metabolischer Homöostase" genannter Prozess. Sie wird bei Menschen durch Insulin und bei Insekten durch Insulinartige Hormone kontrolliert. Da die Versorgung der Flügel-IS über den Transport der Lymphe durch Venen erfolgt (die ein verzweigtes Leitungssys-

tem bilden), kann die Nahrungszufuhr und damit das Wachstum mit zunehmendem Größe verlangsamt werden. Wir werden auf diesen Punkt bei der Diskussion der fraktalen Strukturen zurückkommen. Übrigens spielt die Versorgung der Zellen nur bis zur Metamorphose eine Rolle, da danach die dorsalen und ventralen Epithelzellschichten durch Polymerfilme ersetzt werden (s. Fig 41.5).

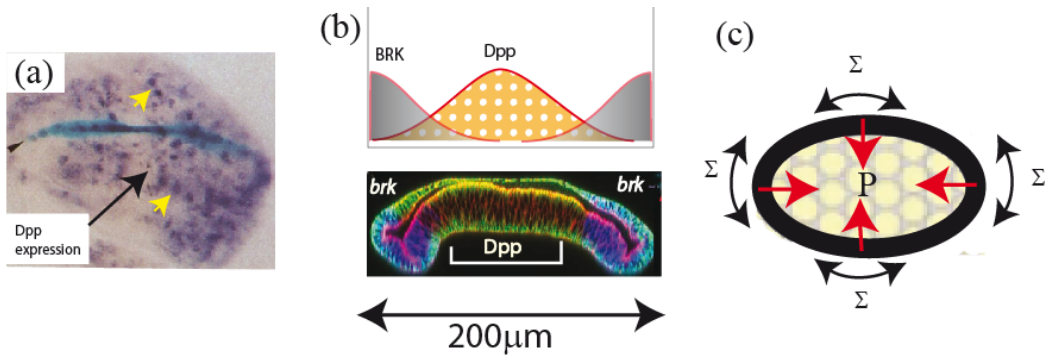

Figure 41.4: Abb. 41.4. Kontrolle des Zellwachstums im Flügelsack (engl. wing pouch). (a) Demonstration des lokalen Wachstums der Imaginalscheiben durch Proliferation von Zellen (Klonen) die statistisch in den A- und P-Bereichen verteilt sind. Beobachtung der sich teilenden Klone erfolgte durch Anfärben der in die Mitosephase übergehenden Zellen (gelbe Pfeile). (b) Demonstration der Kontrolle des Wachstums durch gegenläufige Gradienten des Morphogens Dpp und des (die Dpp-Expression unterdrückenden) Repressors Brinker. Die blaue Farbe zeigt die Expression des Repressors Brinker an, die durch Markierung der Expression des Gens brk beobachtet wurde. Die rote Farbe zeigt mit Phalloidin markiertes Aktin und die grüne GFP-markiertes MT. Die gelbe Farbe entspricht der Überlagerung der beiden Zytoskelett-Komponenten. Man beachte, dass die Mikrotubuli auf der basolateralen und Actin auf der apikalen Seite angereichert ist, d.h. die Zellschicht ist in vertikalen Richtung polarisiert c) Einfaches Modell des durch mechanische Spannung begrenzten Wachstums, in einem durch die Venen begrenzten Territorium (nach [Aegerter-Wilmsen])

41.5.2 Mechanische Kontrolle des Wachstums: Ein Modell [Farhadifar 2007]

Die Form der Zellen im Epithelium des Flügelsacks ändert sich während der Entwicklung vom frühen Larvenzustand bis zur Verpuppung erstaunlich stark. Während die Formen der kolumnaren Zellen in den Primordien unregelmäßige Polygone bilden, nehmen diese in der Endphase des Wachstums eine immer regelmäßigere hexagonale Form an (s. Abb. 41.5). Kurz vor der Verpuppung beobachtet man eine schnelle Zunahme der Hexagone von 50 auf 80 % [Classen 2005]. Diese Formumwandlung geht mit dem Wachstum der Haare einher, die aus dem Zentrum jeder Zelle herauswachsen. Das interessanteste an dem Prozess ist, dass er mit einer Polarisierung der Zelle in tangentialer Richtung verbunden ist, auf die wir im Kapitel 41.5 zurückkommen werden.

Man kann die Reorganisation der Zellform verstehen, wenn man den Aufwand an elastischer Energie betrachtet, der mit dem Wachstum des Endotheliums verbunden ist. Dieses erfordert eine ständige Umformung der Zellen, da diese durch homophile Wechselwirkung zwischen den E-Cadherinen (s. Kapitel 13) miteinander verbunden sind. Da die Adhäsion durch Kopplung ihrer intrazellulären Domänen an die Bündel aus Actin-Myosin stabilisiert werden (s. Kapitel 13), müssen nicht nur die Bindungen zwischen den Cadherinen gelöst werden, sondern auch das Zytoskelett muss ständig umstrukturiert werden. Hier kommt die in Kapitel 9 diskutierte Eigenschaft der Zellen ins Spiel, ihre Plasmamembranen durch ständigen Materialaustausch mittels Endozytose und Exozytose zu erneuern. Auf diesem Weg werden die Adhäsionsdomänen dauernd (engl. constituently) durch Endozytose aus der Plasmamembran entfernt und durch Exozytose wieder eingebaut. Dieses dynamische Verhalten ist sehr wahrscheinlich für die Reorganisation der Form der Zellen wichtig (s. [Classen 2005]).

Betrachten wir nun das Wachstum zweidimensionaler Schichten von Epithelzellen (oder Endothelzellen) in einer durch Barrieren begrenzten Fläche (der Dimension L^2), bis die Fläche mit

einer konfluenten Schicht bedeckt ist. Wir nehmen an, dass die Zellteilung, wie in Abb. 41.4a experimentell beobachtet, an jeder beliebigen Stelle im betrachteten Territorium stattfindet. Man wird intuitiv folgendes Verhalten erwarten: Zunächst werden die Zellen aufgrund der Zell-Zell-Adhäsion locker gepackte Bereiche bilden und ihre Form ist durch die Adhäsionsstärke und die elastischen Eigenschaften der Verbundmembran der Zellhülle bestimmt, d.h. sie werden sich ganz ähnlich verhalten, wie adhärierende Vesikel (s. Kapitel 13). Aufgrund der Adhäsion werden die Zellen polygonale Querschnitte annehmen, ähnlich wie zweidimensionaler Schaum. Allerdings haben wir es mit lebenden Systemen zu tun und die apikale Seiten können durch die Aktin-Myosin-Bündel kontrahiert werden (s. Abb.41.5 a). Mit zunehmender Packungsdichte müssen die Zellen kontrahieren, damit sich durch Zellteilung neue Klone bilden können.

In erster Näherung besteht der mit dem Einbau neuer Zellen verbundene elastische Energieaufwand aus drei Beiträgen [Farhadifar 2007]:

1. Die laterale Kompression des Querschnitts

$$\Delta G_K = \frac{1}{2}K(A - A_0)^2 \tag{1}$$

wobei K der Kompressionsmodul ist und A_0 die Fläche, welche die Zelle im nicht komprimierten Zustand annehmen würde.

2. Die laterale Spannung (Linienspannung) der Zellhülle, die folgende Form hat

$$\Delta G_\Sigma = \frac{1}{2}\Sigma_{i,j} l_{i,j} \tag{2}$$

wobei l_{ij} die Länge des Kontakts zwischen den Zellen ist.

3. Die Variation des apikalen Umfangs (L) der Zellen aufgrund der aktiven Kontraktion des Actin-Myosin Rings.

$$\Delta G_{\Lambda} = \frac{1}{2}\Lambda L^2 \tag{3}$$

wobei L der Umfang der Zelle auf der apikalen Seite ist.

Die gesamte elastische Energie hat dann die Form

$$\Delta G = \Sigma_i \Delta G_K^i + \Sigma_{i<<j} \Delta G_{\Sigma}^{ij} + \Sigma_i \Delta G_{\Lambda}^i \tag{4}$$

Die laterale Spannung Σ ist vor allem durch die Zell-Zell-Adhäsion bestimmt. Sie kann in guter Näherung implizit durch die Young Gleichung dargestellt werden:

$$w = \Sigma(1 - cos\theta_0) \tag{5}$$

Da die Adhäsion die Kontaktflächen zwischen den Zellen zu vergrößern sucht, ist Δ_{Σ} in der Regel negativ. Der Beitrag Δ_{Λ}wirkt der Expansion entgegen. Aus diesem Grund bestimmen die letzten beiden Terme in Gl. 41.1 die Form der Zellen und diese ist allein durch die reduzierten elastischen Spannungen Σ^* und Λ^* bestimmt, wobei:

$$\Lambda^* = \frac{\Lambda}{KA_0^{\frac{3}{2}}} \text{ und } \Sigma^* = \frac{\Sigma}{KA_0} \tag{6}$$

Dabei wird allerdings angenommen, dass die Zellen leicht in die dritte Dimension ausweichen können und der Beitrag ΔG_K in Gl. 41.1 keinen Einfluss auf die Zellform hat.

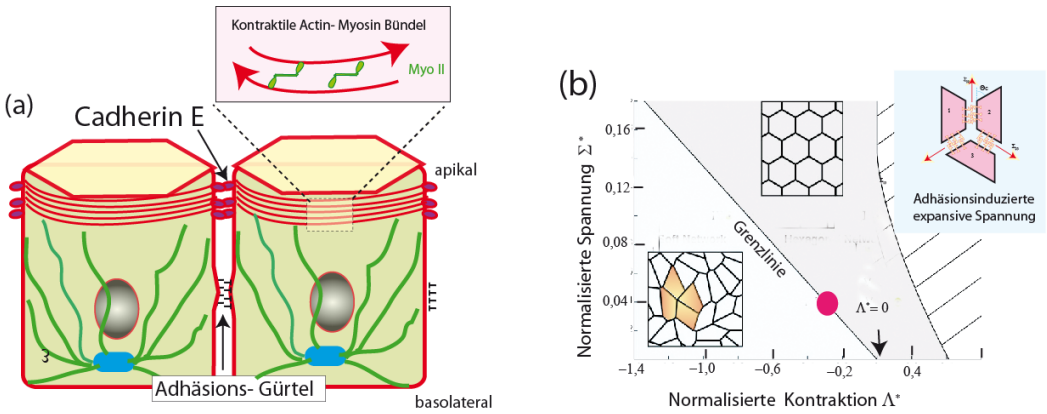

Figure 41.5: Abb. 41.5. Zur mechanischen Kontrolle des Wachstums des Epitheliums in einem Territorium mit fester Fläche. (a) Repräsentation des Flügelsacks als zweidimensionale Schicht aus Epithelzellen. Der kontraktile Ring besteht aus Actin-Myosin-Bündel. Myosin II bildet aktive Mikrobündel, welche den Ring kontrahieren. Voraussetzung ist die Phosphorylierung der leichten Kette über die Rho-Kinase (nach Abb. 28.4). Man beachte, dass die Zellen in Richtung der Längsachse polarisiert sind. (b) Kontrolle der Topologie des zellulären Netzwerks der Endothelzellen während des Wachstums. Durch das Zusammenspiel zwischen der (expansiv wirkenden) lateralen Spannung zwischen den Zellen und der Kontraktion des Umfangs der apikalen Seite durch den Aktin-Myosin Gürtel (nach [Farhadifar 2007]). Das "Phasendiagramm" zeigt den Übergang des zellulären Netzwerks von einem ungeordneten Zustand, in dem die Zellen polygonale Formen variabler Seitenzahlen annehmen und einem Zustand mit hexagonalen Formen. Σ^* und Λ^* sind die normierten Spannung und Kontraktilität. Man beachte, dass die Gesamtzahl der Flächen (F, steht für faces), die Zahl der Spitzen (V steht für vertices) und Ecken (E steht für edges) durch die Euler-Gleichung F+V-E=2 festgelegt sind.

Auf der Basis der oben dargestellten Ideen berechneten Farhadifar et al. [Farhadifar 2007] den Einfluss der Zell-Proliferation auf die Formen der Zellen mit einem eleganten numerischen Verfahren, das ihnen ermöglichte, die Änderung der Topologie der zellulären Netzwerke

während des Wachstums zu beobachten. Die Computerexperimente lieferten folgende wichtige Einsichten in die Restrukturierung der Zellformen während des Wachstums:

Bei kleinen Packungsdichten der Zellen entsteht ein weiches (fluides) Netzwerk mit einem hohen Anteil an Polygonen mit 4, 5, 7 und sogar 9 Ecken. Mit zunehmender Linienspannung Σ^* nimmt der prozentuale Anteil der Hexagone zu und oberhalb eines, von Λ^* abhängigen, Grenzwertes findet ein abrupter Übergang in ein hexagonales Netzwerk statt. Die theoretischen Vorhersagen stimmen erstaunlich gut mit Beobachtungen der topologischen Umwandlung des Netzwerkes beim Übergang vom Larven- in den Puppenzustand überein (s. [Classen 2005]).

Obwohl das Modell viele Aspekte vernachlässigt, kann es die Umwandlung der Zellformen quantitativ erstaunlich gut beschreiben. Es sollte allerdings beachtet werden, dass die Kanten der Zellen nicht atomar scharf sind, wie bei Schäumen. Sie sind aufgrund der Biegesteifigkeit der Zellhüllen abgerundet und besitzen eine endliche Kontaktkrümmung R_c. Wie wir in Kapitel 13 gelernt haben, hängt diese von der Biegesteifigkeit κ der Membran und der Adhäsionsenergie (w) ab, gemäß $w = \frac{\kappa}{2R_c^2}$.

Der Beitrag der Kontaktkrümmung wird die Zahl der Ecken mit zunehmender Steifigkeit der Zellen reduzieren.

41.5.3 Bemerkungen zu biochemischen Kontrollmechanismen

An dieser Stelle sind noch einige Bemerkungen zur biochemischen Kontrolle der Zelldichte angebracht. Die mechanische Kontrolle des Wachstums ist in der Regel mit einer Reorganisation der Mikrostruktur des Zytoskeletts verbunden, die über biochemische Signale vermittelt wird. Im Fall des Wachstums erfolgt dies durch den Wachstumsfaktor Dpp (siehe [Shen 2005] und

[Widmann 2009]). Wird dessen Wirkung geschwächt, so wachsen kleinere Flügel.

Elegante Experimente von Widmann und Dahmann zeigen, dass Dpp während der Umwandlung des Primordiums in den Flügelsack (s. Abb. 41. A.1) die Reorganisation des Zytosketts vermittelt. Zu Beginn besteht das Primordium aus einem Sack, der von kubischen Zellen umschlossen ist. Im Verlauf der Entwicklung entsteht daraus der Flügelsack, dessen untere Hälfte aus kolumnaren Zellen besteht, die eine 50 μm dicke Schicht bilden.

Ursache der Reorganisation des Zytoskeletts ist die Aktivierung der GTPasen der Rho Familie (Rho-1). Diese reichern sich besonders auf der apikalen Seite der Epithelzellen (d.h. die zum Lumen weisende Seite) an und sorgen so für die Verlängerung der Zellen. Ursache dafür ist die spontane Kontraktion der Zellen (auf der apikalen Seite) aufgrund der Aktivierung der Myosin II (s. dazu das Schema der Abb. 28.4). Deaktiviert man Dpp, nehmen die Zellen wieder ihre kubische Form an [Widmann 2009]. Die Experimente zeigen, dass man bei mechanischen Modellen des Wachstums immer auch die spannungsinduzierten Prozesse der Signalübertragung im Auge behalten muss.

Kontrolle der Zelldicht durch Apotose und mechanische Kräfte

Ein weiterer wichtiger Mechanismus der Kontrolle der Zelldichte ist die Apotose. Wie erwähnt, dienen einige der Genprodukte dazu, die Apoptose zu unterdrücken. Ein Beispiel ist das Signalmolekül Dpp. Entfernt man Dpp, so werden die Zellen durch Apoptose aus dem Gewebe entfernt. Ein anderes, im nächsten Kapitel beschriebenes Beispiel, ist das Morphogen Vestigial. Unterdrückt man den zum Zelltod führenden Signalweg, so werden die Zellen auf andere Weise aus dem Gewebe entfernt, wie folgende Versuche zeigten. In einem Teil der Zellen des Primordiums wurde die Wirkung von Dpp durch Entfernen des Rezeptors thickvein unterdrückt und die Apotose durch eine weitere Mutation blockiert. Die Zellen wurden verkürzt, verloren den Kontakt zu den Epithelzellen der apikalen Schicht des Primordiums und wurden aus dem

Zellverband entfernt [Shen 1998]. Eine Ursache ist die Veränderung des Adhäsionsverhaltens. Diese wird vor allem durch einen drastischen Umbau des Zytoskeletts verursacht. Der Aktinkortex kollabiert und die Mikrotubuli werden abgebaut. Dies ist auch die Ursache für die Entbindung der Zellen von der apikalen Oberfläche. Wie in Kapitel 13 beschrieben wurde, ist die Stärke der Zell-Adhäsion durch die Kopplung des Zytoskeletts an die intrazellulären Domänen der Zelladhäsionsmoleküle (ZAM) bestimmt. Dies zeigt, dass Dpp seine Wirkung über die Kontrolle der Struktur des Zytoskeletts ausübt. Dieses Experiment zeigt sehr eindringlich, dass wir mehr über die genetische Kontrolle der Materialeigenschaften der Zellen lernen müssen, um die Grundlagen der embryonalen Entwicklung zu verstehen.

41.6 Die Bildung orientierter Sinneshaaren durch planare Zell-Polarisierung des Endotheliums: Ein universelles Konzept

41.6.1 Einleitung

Wie in Kapitel 41.5 erwähnt, findet kurz vor der Verpuppung ein dramatischer Umbau der Endothelzellen statt. Zuerst bilden die Endothelzellen des ausgewachsenen Flügels ein hexagonales Netzwerk aus. Während der Verpuppung wächst (nach etwa 30 h) aus der apikalen Seite jeder Zelle eine Borste heraus, die alle in eine Richtung geneigt sind (s. Abb. 41.6a). Am äußeren Rand der Zellen entstehen mehrere Reihen von Sinneshaaren, auf die wir hier nicht weiter eingehen. Die gegen die Normale der apikalen Oberfläche geneigten Haare werden durch orientiertes Wachstum von Aktinbündeln erzeugt, wie das Bild 41.6.b zeigt. Da die Haare nicht im Zentrum der Hexagone wachsen, sondern auf der distalen Seite, muss es einen genetischen Mechanismus geben, der die Zellen in tangentialer Richtung polarisiert. In den letzten Jahren hat man einige Gene gefunden, welche dies leisten und festgestellt, dass die tangentiale

Polarisierung in Insekten und Wirbeltieren nach einem universellen Mechanismus erfolgt. Im Fall der Drosophila spielt das Gen multiple wing hairs (mwh) und dessen Genprodukt, das Protein Multiple Wing Hair, eine zentrale Rolle. Man nennt solche Proteine auch generell "Planar-Cell-Polarity-Protein (PCP-Protein).

Das Protein MWH (oder ein anderes PCP) steuert die tangentiale Polarisierung über einen spezifischen (unkonventionellen) Wnt-vermittelten Signalweg. Bisher haben wir gelernt, dass dieser über den Transfer des β-Catenin in den Zellkern führt (siehe dazu das Glossar "Wnt Signalweg"). Der konventionelle, durch β-Catenin vermittelte, Signalweg reguliert die Polarisierung der Zellen in Richtung der langen Achse. Er wirkt in der frühen Phase der Entwicklung. In der späteren, die planare Polarisierung einleitenden Phase, wird der durch Catenin vermittelte Weg in der Drosophila durch ein spezifisches Protein, mit dem Namen Diego, blockiert. Durch zeitliche Trennung der Prozesse kann die normale und tangentiale Polarisierung durch denselben Signalweg vermittelt werden.

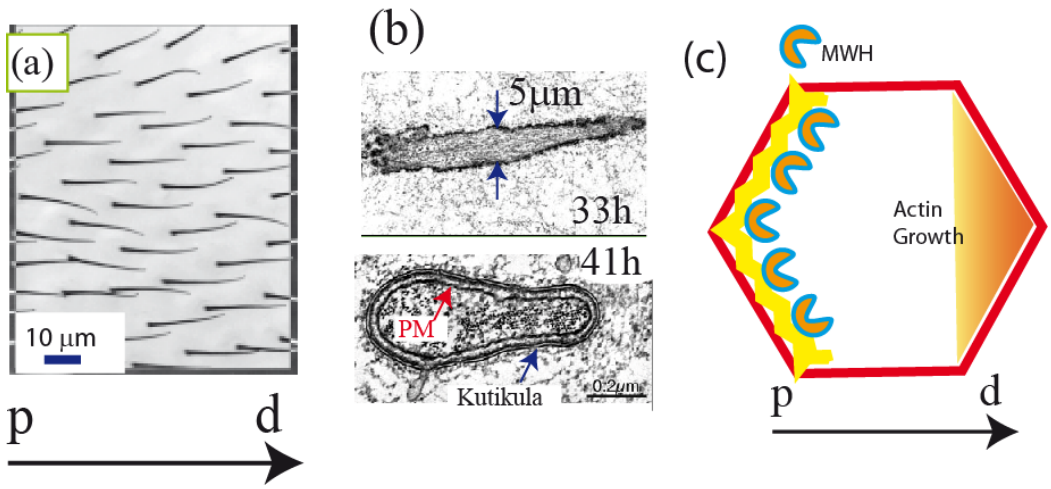

Figure 41.6: Abb. 41.6. (a) Sinneshaare auf der dorsalen Oberfläche der Flügel. Diese sind lokal gegen die Normale der apikalen Zelloberfläche geneigt, und zwar alle in eine Richtung. (b) Zur zeitlichen Entwicklung der Haare. Oben: Haar nach 33h. Unten: Querschnitt durch ein Haar nach 44 h. Die gereiften Haare sind an der Basis in p-d-Richtung verbreitert (wie die Spitzen von Dornen) und werden durch eine Kutikula umhüllt. (c) Modell der tangentialen Polarisierung durch asymmetrische Expression des Schlüssel-Gens multiple wing hairs (mwh). Das Genprodukt MHW sammelt sich in der frühen Phase der Haarbildung auf der proximalen Seite an und verhindert dort die Aktinpolymerisation (s. Text). In der späteren Phase (nach ca 41h) wird die polare Verteilung von MHW aufgehoben. Die Haare werden durch Vernetzung der Aktinbündel mit Fascin stabilsiert.

41.6.2 Zur molekularen Basis der planaren Polarisierung (s. Abb. 41.6c)

Über den molekularen Mechanismus der planaren Polarisierung ist noch wenig bekannt. Man weiß jedoch, dass das Protein PCP das Wachstum von Aktin- Bündeln unterdrückt, d.h. das Protein ist ein negativer Regulator. Das derzeit favorisierte Modell basiert auf der Idee, dass das auf der proximalen Seite angereicherte Protein MWH die Aktin Polymerisation unterdrückt, so dass Aktin nur auf der proximalen Seite wachsen und damit ein Haar ausbilden kann. Um die Bildung mehrerer Haare zu vermeiden, wird die lokale Anreicherung im Laufe der Zeit (nach ca

40h) aufgehoben. Während dieser Zeit werden die Aktinbündel durch Fascin stabilisiert und die Haare werden durch ein Kutikula (lat. Häutchen) umhüllt. Es gibt eine Reihe experimenteller Evidenzen für dieses Modell.

1. Entfernt man das Protein MWH, so wachsen mehrere Haare, während deren Bildung unterdrückt wird, wenn man das Protein überexprimiert.

2. Das von dem Gen mhw exprimierte Protein MHW hat dieselbe Struktur wie das N-Terminale Ende der Formin Protein Familie, welche für das Wachstum von Aktinbündel eine zentrale Rolle spielen (s. Glossar "Activation of Actin" und Kapitel 18, Abb.18.10). Dieses Ende besteht aus den Domänen GBD und FH3, welche zwei Funktionen erfüllen. Das GBD-Segment bindet GTPasen der Rho-Familie, wodurch das Protein aktiviert wird. FH3 sorgt für die Bindung der Formine an andere Proteine und dient auf diese Weise der Lokalisierung der Formine, z.B. an Gerüstproteine oder an Myosine (s. [Yan 2008]).

MWH könnte auch an das normal Formin der Zellen binden und die Bündelbildung unterdrücken. Eine interessante Möglichkeit ist die feste Bindung der Unterdomäne DID an das DAD-Segment des C-terminalen Endes, wodurch Formin dauerhaft inaktiviert würde. In der späteren Phase (d. h. nach 40 h) könnte Formin dann durch Bindung der Rho-GTPase an das GBD-Segment aktiviert werden.

Natürlich sind an dem Prozess des polaren Wachstums noch viele andere Gene und ihre Produkte beteiligt. Aus Platzgründen verzichten wir auf deren Darstellung und verweisen den interessierten Leser auf die unten zitierte Spezialliteratur, insbesondere [Yan 2008] .

41.7 Regulation und Stabilisierung der dorsal-ventral Grenzziehung

41.7.1 Einleitung

Wie Abb. 41.1 zeigt, ist auch die dorsal-ventral-Polarität der Flügel schon in den aus einigen 10 Zellen aufgebauten Primordien festgelegt. Die dorsalen und ventralen Klone werden durch einen dünnen Streifen von Zellen gebildet, welche das spezielle Morphogen wingless exprimieren. Wie schon erwähnt, trennt diese das ventrale Territorium (V), welche das Gen apterous exprimieren, von dem dorsalen, welche das nicht tut (s. Abb. 41.1).

Der unterschiedliche Aufbau der dorsalen und der ventralen Territorien spielt für die Entwicklung aerodynamisch optimierter Flügel eine zentrale Rolle. Die beiden Zell-Linien sorgen für den unterschiedlichen Aufbau der Oberflächen der Flügel nach dem Ersatz der ventralen und dorsalen Epithelzellschichten durch die Polymerfilme (s. Abb.41.3). Bei Schmetterlingen müssen die beiden Oberflächen der Flügel unterschiedliche Farbmuster entwickeln. Die Flügel der Drosophila entwickeln auf der Oberfläche dicht gepackte Anordnungen aus einigen Nanometer großen Nadeln, welche zwei Funktionen erfüllen (siehe 41 Appendix A). Sie erniedrigen die Reflektivität der Flügel, und erschweren so die Sichtbarkeit der Insekten durch ihre Feinde. Ihre Oberfläche wirkt aufgrund des Lotuseffekts wasserabstoßend.

Im Fall der A-P-Polarisierung wurde die Asymmetrie durch die unterschiedlichen Schwellen geschaffen, bei denen die beteiligten Gene durch das Master-Morphogen Hedgehog (Hh) eingeschaltet werden. Bei der Bildung der D-V-Grenze kommen dagegen die besonderen Eigenschaften der durch Rezeptoren der Notch-Familie vermittelten Signalübertragung ins Spiel. Wie wir in Kapitel 36.B sahen, basiert diese auf dem direkten Kontakt zwischen den Zellen und ermöglichen durch laterale Inhibition die Ausbildung lokaler Strukturen, wie einzelne Haare

oder von Grenzlinien zwischen Territorien aus verschiedenen Klonen.

Hinzu kommt in diesem Fall die Abgrenzung der Bereiche durch Expression spezifischer Zelladhäsionsmoleküle der Integrin-Familie [Blair 2007], [Kin 1995]. Die Zell-Linien D und V induzieren die Expression unterschiedlicher Integrine. Die dorsalen Zellen exprimieren Integrine der Spezies $\alpha_{PS1} - \beta_{PS}$, und die ventralen $\alpha_{PS2} - \beta_{PS}$. Die Integrine vermitteln die Adhäsion der Zellen derselben Linie (d.h. A und P) untereinander. Der physikalische Grund für die Trennung der Zell-Linien ist derselbe, wie bei der Phasentrennung in Mischungen (z.B. Legierungen aus Metallen). Die selektive Adhäsion führt dazu, dass die Cluster von 20-30 Zellen einer Sorte (A oder B), die sich bei der Entstehung der Imaginalscheibe, d. h den Primordien, spontan bilden, eine Grenzflächenspannung Σ erzeugen (siehe Abb. 41.4 und Kapitel 41. A).

Nehmen wir der Einfachheit halber an, die Zellen eines Kompartiments bilden eine kreisförmige Scheibe mit dem Radius R bilden, so entsteht in den Domänen D und V ein Kohäsionsdruck P der Größenordnung

$$P = \frac{\Sigma}{R} \tag{7}$$

der zur automatischen Separation der Zellen führt.

41.7.2 Genetische Kontrolle des polaren Wachstums in D-V-Richtung durch das Notch-vermittelte Signalsystem

Vorbemerkung

Im Kapitel 41.3 haben wir gelernt, wie das polare Wachstum der Primordien durch das Zusam-

menspiel eines Wachstumsfaktors (Dpp) und eines Wachstums-Supressors (Brinker) reguliert werden kann. Da beide Proteine im Gewebe diffundieren können, wirken die Morphogene über große Distanzen. Ein ganz anderer Mechanismus kontrolliert das Wachstum der Primordien in Richtung der D-V-Achse. Es wird über den durch Notch (übersetzt Kerbe) vermittelten Signalweg gesteuert und kann sich daher nur von Zelle zu Zelle ausbreiten.

Das Wachstum wird durch ein Zusammenspiel von mindestens fünf Genen und ihren Genprodukte vermittelt. Zu Beginn des Wachstums ist die D-V- Polarität durch Expression des Gens apterous in dem dorsalen Territorium und der Bildung einer Demarkationslinie aus Wingless exprimierenden Zellen festgelegt (s. Abb. 41.1und [Kim, 1995]). Der Rezeptor Notch wird in den Membranen aller Zellen der Flügel-IS exprimiert. Da er nur Signale zwischen adhärierenden Zellen übertragen kann, sorgt er für die Aufrechterhaltung der D-V-Grenze während des Wachstums und zwar durch Vermittlung der Proteine Serrate (Ser), Delta (Dl) und Fringe (Fr) (d. h. den Produkten der Gene serrate (ser), delta (dl) und fringe (frn)). Ser und Dl sind die Liganden des Rezeptors Notch. Da es sich um integrale Membranproteine handelt, können sie nur über Zell-Zell-Kontakte wirken. Das Wachstum des Flügel-Sacks in D-V-Richtung wird schließlich durch ein außergewöhnliches Zusammenspiel der Proteine Vestigial und Wingless (Wg) voran getrieben. Diese werden interaktiv durch Expression der Gene vestigial und fringe exprimiert. Ehe wir zum Wachstum kommen, betrachten wir zunächst die Stabilisierung der D-V- Grenzlinie (s. dazu auch Abb. 41.5).

Die Stabilisierung der D-V Demarkationslinie

Entscheidend für die Stabilisierung der D-V-Grenzlinie ist das Protein Fringe, das nur von Zellen im dorsalen Bereich des Primordiums exprimiert wird (Abb. 41.5), und zwar als Folge der apterous Expression. Es ist in den Membranen des Golgi-Apparats integriert und verändert die Struktur der extrazellulären Domäne von Notch derart, dass die Wirkung von Delta auf die Zelle, in der sich Fringe befindet (also in D) verstärkt wird, während sie von Serrate unterdrückt wird. Daher wirkt das in D-Zellen durch Vermittlung von Apterous exprimierte Serrate nur

auf die Zellen in V- Bereich und das in allen Zellen exprimierte Delta nur auf die Zellen in D- Bereich. Zusammen genommen führt das dazu, dass Notch nur von Zellen in einem engen Streifens beiderseits der dorsal-ventral Grenze aktiviert wird.

Wie Abb.41.4 (b) zeigt, resultiert die Aktivierung von Notch in der Expression des Morphogens Wingless entlang der Demarkationslinie. Wg ist ein diffusives Morphogen, das etwa 5-10 Zelldurchmesser in die Umgebung diffundiert.

Die Bildung der D-V-Grenzlinie ist ein Paradigma der Grenzziehung zwischen Territorien verschiedener Klone, denn das Morphogen Fringe kommt bei Entwicklungsprozessen immer dann ins Spiel, wenn es darum geht, Territorien gegeneinander abzugrenzen. Diese Fähigkeit beruht auf der Kontrolle der Aktivität der durch Notch vermittelten Signalwege. (Zur Wirkung von Fringe siehe Glossar Stichwort "Fringe"). Die D-V- Grenzlinie fungiert nun (zusammen mit dem Streifen von Dpp exprimierenden Zellen der A-P-Grenze) als Organisator des Flügel-Wachstums. Sie wird am Ende des Wachstums zum Rand der Flügel (s. Abb. 41.A.2).

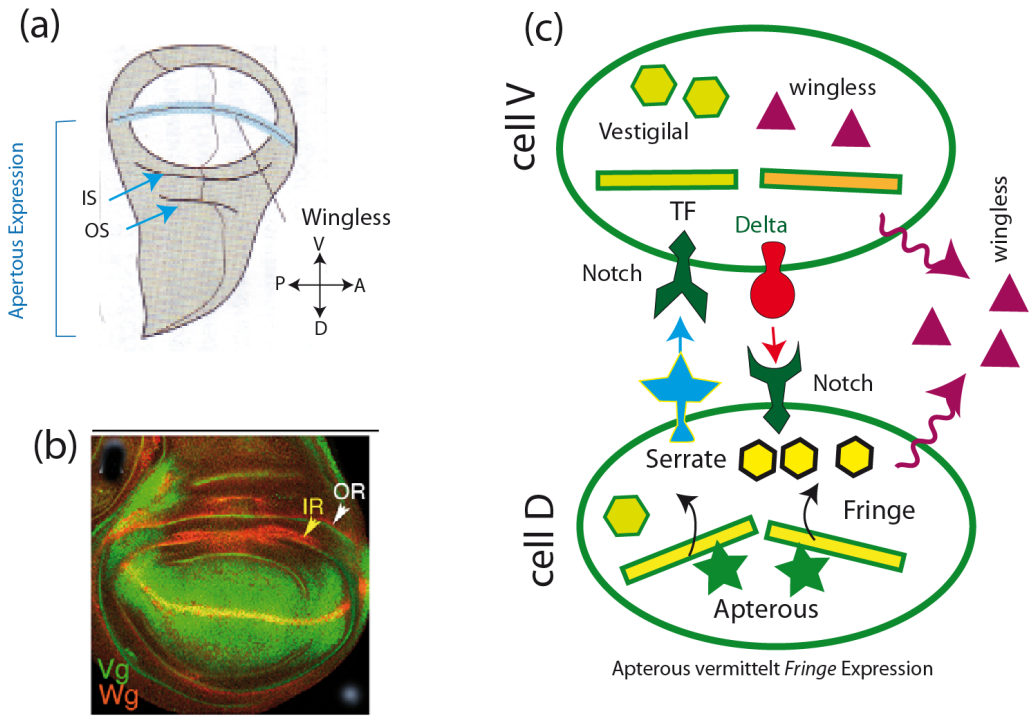

Figure 41.7: Abb. 41.7. a) Zur Erinnerung an die polare Struktur der Flügel IS mit markiertem inneren und äußeren Ring. Entlang der beiden Ringe IR und QR, welche den inneren Flügelsack umgeben, ist die Flüge-IS gefaltet. Der innere (IR) wird am Anfang der dritten Häutungsphase aktiviert und der äußere (OR) in der späten Phase. Die zwei Ringe spielen eine wichtige Rolle für die Ausbildung des Thorax und des Halses b) Mikrofluoreszenz-Aufnahme eines Flügelsacks einer Wildtyp-Drosophila. Grün: Markierung der Expression von GFP-Vg; Rot: die Wg Expression. Im gelben Streifen der D-V-Grenze überlappen sich die Wg- und Vg-exprimierenden Zellen. Er markiert die D-V-Grenze. Man beachte, dass Wg auch stark in den äußeren Ringen IR und OR exprimiert wird. Nach [Zecca, 2007a], Abb. 1a). c) Modell der Ausbildung der D-V-Demarkationslinie. Beide Klone (D und V) exprimieren Notch-Rezeptoren und Delta. Apterous induziert im Klon D die Aktivierung des Notch-Modulators Fringe. Fringe verstärkt die Wirkung von Delta und unterdrückt die von Serrate im Klon D. Daher wird Delta nur im Klon D und Serrate nur im Klon V exprimiert. Infolgedessen wird Notch nur im dünnen Streifen der D-V-Grenze markiert. Diese Zellen exprimieren wingless wie der gelbe Streifen in (b) zeigt. Wingless ist ein diffusives Morphogen, das etwa 5-10 Zelldurchmesser in die Umgebung diffundiert.

41.7.3 Das Wachstums der Flügel-IS durch progressive Umfunktionierung von Zellen aus der Umgebung des Primordiums- Die Rolle des Morphogens Vestigial

Eine Schlüsselrolle beim Wachstum der Primordien in D-V-Richtung spielt das vom Gen vestigial kodierten Protein Vestigial (Vg), das außergewöhnliche Eigenschaften besitzt (s. Glossar "Vestigial)). Es unterscheidet sich von den als Zytokine wirkenden Morphogenen dadurch, dass es allein die Differenzierung oder Proliferation der Zellen nicht aktivieren kann, sondern nur zusammen mit anderen Proteinen wie Wingless (Wg) oder auch dem Wachstumsfaktor Dpp aktiv ist [Zecca 2007]. Eine andere wichtige Aufgabe von Vg besteht darin, die Apoptose der Zellen in der Imaginalscheibe (dem Flügelsack) zu verhindern.

Vg wird schon zu Beginn der Entwicklung der Flügel-IS (d. h .im Primordium) von allen Zellen exprimiert und legt dadurch deren weiteres Schicksal fest. Vg ist kein richtiger Wachstumsfaktor, sondern das Protein rekrutiert, zusammen mit Wg, Zellen aus der Umgebung in den Flügelsack [Zecca 2007] und vermittelt auf diese indirekte Weise das Wachstum der Flügel.

Experimentelle Evidenz für dieses Model wurde durch folgendes elegante Experiment erbracht. Das Gen wg wurde mit dem des membrangebundenen Rezeptors Neurotactin fusioniert. Über diesen Trick wurde das Morphogen Wg an die Zellen gekoppelt, um seine Bewegung im Gewebe zu verhindern. Es zeigte sich, dass Wg tatsächlich die Expression von Vg in benachbarten Zellen aktivieren kann (und zwar auf die im nächsten Absatz gezeigte Weise). Daraus folgt, dass sich die Expression von Vestigial unter der Wirkung des diffusiven Morphogens Wg in das benachbarte Gewebe ausbreiten kann, ähnlich wie die Ausbreitung eines Waldbrandes. Man bezeichnet solche Prozesse in der Regeltechnik auch als Vorwärtsregelung (engl. feed forward control). Abb. 41.6 zeigt ein Modell der Vorwärtsregelung.

Die Expression von vg wird durch zwei Genverstärker (Enhancer) kontrolliert, die zeitlich gestaffelt eingeschaltet werden. Der "boundary enhancer" (BE) wird über den Delta-Notch Mechanismus eingeschaltet und treibt die frühe Entwicklungsstufe des Flügelsacks an (d.h. bis zum Ende der zweiten Häutungsphase). Der "quadrant-enhancer" (QE) kontrolliert die Wachstumsphase der Flügel-IS vor allem in der dritten Häutungsphase. (s. [del Alamo 2002], [Zecca 2007]). Entsprechend dieser zeitlichen Folge der Entwicklung wird der BE durch die Morphogene Dpp aktiviert, während der QE über den Wingless eingeschaltet wird.

Die sehr eindrucksvollen Experimente von Zecca und Struhl [Zecca 2007] zeigen am Beispiel des Flügels, dass das Wachstum spezifischer Körperteile während der embryonalen Entwicklung durch sukzessive Rekrutierung und Umfunktionierung von an anderen Orten erzeugten Stammzellen verwirklicht werden kann. Im Fall des Flügelsacks wird der Prozess durch das sekretierte, über einige Zelldurchmesser wirkende, Morphogen Wg gesteuert. Das an den Rezeptor Frizzled bindende Wg verstärkt (über den Enhancer QE) die Expression des vestigial Gens in den von Wg erreichten Zellen. Voraussetzung ist allerdings, dass Vg schon schwach exprimieren wird, die Zellen also vorprogrammiert sind. Die Expression von Vg propagiert also (getrieben durch Wg) von Zelle zu Zelle und breitet sich wie ein Waldbrand in die Umgebung aus. In anderen Worten: Die umprogrammierten Zellen der Umgebung des Primordiums werden in dieses integriert. Wg muss übrigens ständig wirken: Erstens, um die in den Flügelsack eingebrachten Zellen in diesem zu halten und zweitens, um deren Apoptose durch ständige Expression von Vg zu verhindern.

Man erwartet, dass die in das wachsende Primordium integrierten Zellen aus der Umgebung ständig ersetzt werden, um die Kontinuität des Gewebes zu gewährleisten. Es wurde tatsächlich beobachtet, dass mit der Rekrutierung der Zellen in den Flügelsack die Proliferation der Zellen in der Umgebung zunimmt (s. [Zecca] Fig. 7).

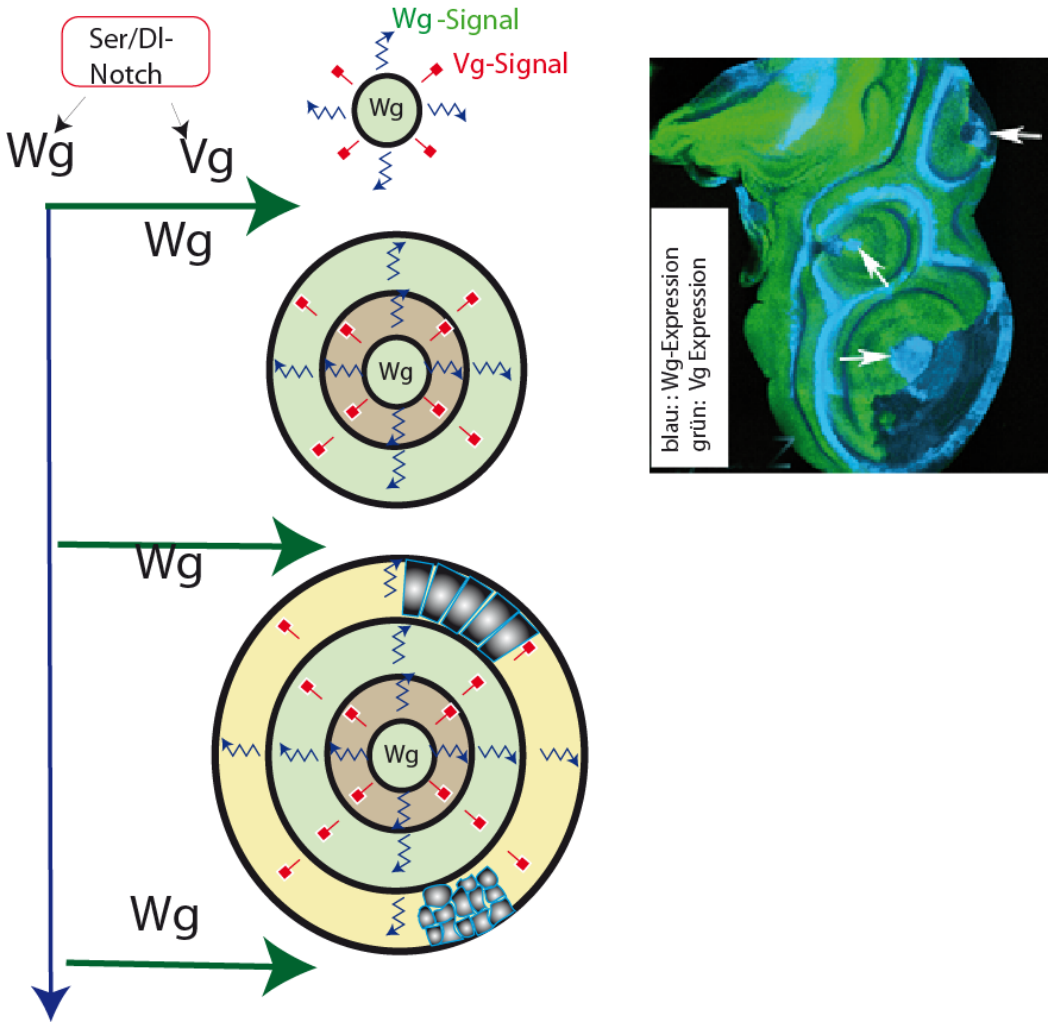

Figure 41.8: Abb. 41.8:a) Modell des Wachstums der Flügel IS in der dritten Häutungsphase durch sukzessive Rekrutierung von Zellen aus der Umgebung des Primordiums. Der Prozess wird durch die Wg und Vg exprimierenden Zellen des D-V-Grenze initiiert. Die schwarzen, gewellten Pfeile zeigen die Aktivierung der Expression von Vg durch Einschalten des Enhancers QE an. Die roten Pfeile stehen für die Ausbreitung des Morphogens Vestigial b)Demonstartion der ectopischen Expression von Wg in Vg exprimierenden Zellen in apertous-null Mutanten (nach [Zecca 2007]). Blau markiert, ist die Expression von Wg, die durch die Methode der Lac-Galactose visualisiert wird; Grün markiert sind die Vg produzierenden Zellen.

Abb. 41 7b zeigt ein Experiment zum Beweis der Rekrutierung von Vg exprimierenden

Zellen durch Wg . Diese wurden an apertous-null-Mutanten der Primordien durchgeführt, die (wegen des Fehlens von ap) kein Wg exprimieren können. Man implantierte Gewebe aus ap-Nullzellen Cluster von vg exprimierenden Klonen und beobachtete das Verhalten der Zellen in der Umgebung. Wie Abb. 41.5.b zeigt, induzieren die Klone in den umgebenden Zellen sehr hohe Konzentrationen von Vg, die ihrerseits Wg exprimieren. Dies zeigt, dass der Enhancer QE durch Wg aktiviert wird.

41.7.4 Synopsis

In diesem Kapitel haben wir zwei verschiedene Mechanismen des polaren Wachstums von Gewebe kennen gelernt, die dafür sorgen, dass die in den Wachstumszentren (Organisationszentren) festgelegte quadrupolare Polarität während des Wachstums (von ca 100 auf 500.00 Zellen) erhalten bleibt. Das Wachstum in der anterior-posterior Richtung wird von dem Streifen von Dpp exprimierenden Zellen entlang der A-P-Grenze reguliert. Es wird durch das als Zytokin wirkende Dpp angetrieben, das weit in das Gewebe hinein diffundiert und das Wachstum der Zellen von außen (exogen) induziert. Es handelt sich um einen autonomen Prozess.

Im Gegensatz dazu wird das von der ventral-dorsal Grenzlinie ausgehende Wachstum durch Rekrutierung von Stammzellen aus der Umgebung der Flügelscheibe realisiert. Voraussetzung ist, dass die Zellen das Protein Vestigial schwach exprimieren, eine Voraussetzung, die dadurch gegeben ist, dass Vg die Apothose der Zellen verhindert. Die Vergrößerung der Flügelscheibe erfolgt durch Propagation der durch Wg vermittelten vg-Expression von Zelle zu Zelle. Da hierzu Wingless notwendig ist, handelt es sich um einen nicht autonomen Mechanismus des Wachstums. Die in den Flügelsack rekrutierten Zellen werden durch Proliferation in der Umgebung des Primordiums ersetzt. Ein Geheimnis bleibt die Koordinierung des Wachstums in A-P- und D-V-Richtung. Offenbar ist dazu das Zusammenspiel zwischen den beiden Mechanismen notwendig, über das aber noch wenig bekannt ist.

41.8 Appendix 41. A. Die Entwicklung der Flügel-Imaginalscheiben der Drosophila Melanogaster, ("Schwarzbäuchige" Taufliege). Vom Primordium zum Puppenzustand

Die jugendlichen Larven (Maden) der Drosophila melanogaster, haben etwa die Größe des Eis (0.5 mm) und besitzen nur einen primitiven Mund aber keine Füße. Die Hülle der Larve besteht aus der segmentierten Endothelzellschichten (s. 40.5) die durch eine polymere Schutzschicht, die Kutikula, geschützt ist. Diese besteht vorwiegend aus dem Polysaccharid Chitin und Wachsen. Die Larven wachsen innerhalb einiger Tage bis zu einer Länge von 2.5 cm, wobei sie sich dreimal häuten (englisch: häuten = to molt) müssen, da der Chitinpanzer zu klein wird. Man unterscheidet also mehrere Stadien der Entwicklung (engl. instats).

Wenn die Larven ausgewachsen sind, beginnen sie sich zu verpuppen. Im Puppenzustand (engl. pupa state) findet in der abgeschlossenen Hülle eine dramatische Entwicklung und strukturelle Umwandlung statt, während der aus den Imaginalscheiben die inneren Organe und Körperteile entstehen. Nach etwa 48 Stunden schlüpfen die Fliegen.

Die Imaginalscheiben sind die Wachstumszentren (oder Spemannsche Organsiatoren) der Larven, aus denen sich während ihrer Reifung und vor der Metamorphose die Urzustände der Extremitäten, der Augen und Genitalien entwickeln. Die Larve der Drosophila besitzt 9 Paare und eine isolierte IS für die Genitalien (s. Abb. 41.1). Man kann die Bildung der IS schon unmittelbar nach der Segmentierung und vor der ersten Häutung erkennen und zwar aufgrund lokaler Deformationen (insbesondere Faltungen) der Segmente, an den Stellen an denen später

die Körperteile entstehen [Bate und Arias 1991]. Man nennt diese Zonen auch "Ansätze" (oder Primordien). Sie bestehen zunächst nur aus 20-40 Endothelzellen, die in das Endothelium der Larve eingebettet sind. Im Laufe der Reifung der Larven wachsen die IS bis auf einige 30.000 Zellen an. Da sie mit dem Endothelium verbunden bleiben, bilden die IS starke Falten, die ins Innere der Larve ragen und zu deutlich sichtbaren, lokalen Verdickungen führen.

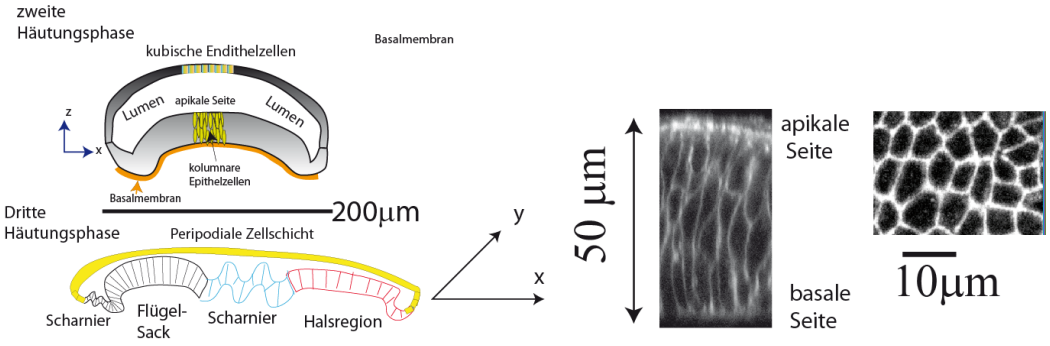

Figure 41.9: Abb.41.A.1. Zur Entwicklung der Flügel. Schematische Darstellung der Anatomie des Flügel-Primordiums nach der zweiten Häutungsphase. Das sackartige Gebilde besteht oben aus einer dünnen Epithelzellschicht (peripodiale Zellschicht genannt). Die oberen Zellen besitzen eine kubische Gestalt. Die untere Hälfte besteht aus einer Mehrfachschicht aus kolumnaren Zellen. Aus diesen entsteht der eigentliche Flügelsack (wing pouch). Das linke Bild zeigt Mikrofluoreszenzaufnahmen eines Schnittes durch die x-z-Ebene (links) und die x-y-Ebene. Man beachte, dass die apikale Seite der Endothelzellen zum Lumen hin orientiert ist. Wahrscheinlich ist die basale Membran mit einer Basalmembran bedeckt. Das Bild links unten zeigt eine schematische Darstellung der Flügel-IS nach der dritten Häutungsphase. Die obere Zellschicht bleibt erhalten, während die untere in vier Bereiche zerfällt. Für uns ist nur der Flügelsack von Interesse.

Über die Umstrukturierung der Flügel-IS während der Metamorphose

Die Flügel-IS wächst während der Entwicklung der Larven stärker als der ganze Körper. Sie erhalten aber ihre volle Funktionsfähigkeit erst nach der letzten Häutung und der Entfaltung der

Flügel (s. Abb. 41A.1b, [Kiger 2007] [Watson 2008]). Die gefalteten Flügel strecken sich, indem Lymph-Flüssigkeit (über eine herzartige Pumpe) in die Venen gepumpt wird. Die Flügel haben zwar ihre charakteristische Form gebildet, um aber die Struktur unter Atmosphärenbedingungen zu stabilisieren, werden die ventralen und dorsalen Epithelzellschichten durch Polymerfilme aus Polysaccharid (der Kutikula; engl cuticle) ersetzt. Dazu wird die laterale Adhäsion der Zellen durch Cadherine und Integrine aufgehoben und die Zellen entbinden. Sie fließen über die Venen in den Körper zurück. Man kann diesen Prozess direkt durch Anfärben der Zellen beobachten. Abb. 41.A.1b zeigt zwei Zustände während der Entfernung der Zellen. Der interessierte Leser findet eine ausführliche Darstellung der Ausbildung der Flügel während der Metamorphose in Wikipedia unter dem Stichwort Flügel (Insekt).

Trotz der dramatischen Umstrukturierung sind die dorsale und ventrale Seite sehr verschieden aufgebaut. Die Oberfläche vieler Insektenflügel ist beispielsweise mit regelmäßigen Anordnungen von Noppen (mit Abständen von 150 nm und 20 nm Höhe) bedeckt, die möglicherweise aus Wachsen bestehen. Diese dienen gleichzeitig zur Tarnung durch Reduktion der Reflektivität und zur Wasserabstoßung aufgrund des Lotus-Effekts (s. Watson et al. (2008) Putative functions and functional efficiency of ordered cuticular nanoarrays of insect wings Biophys J. 94: 3352-3360).

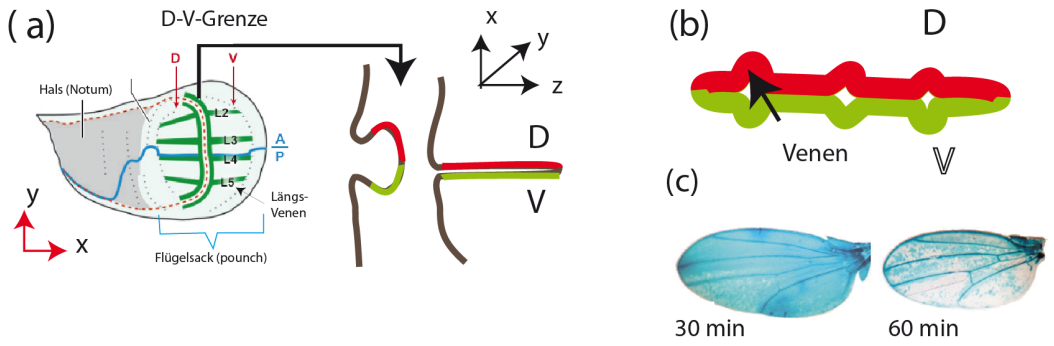

Figure 41.10: Abb. 41.A2.(a) Schematische Darstellung der Flügelbildung durch scharfe Faltung des Flügelsacks nach der letzten Häutung. Die Flügel erhalten ihre endgültige Struktur mit den Rippen. In diesem Zustand bestehen die dorsalen und ventralen Seiten noch aus Epithelzellen. (b) Die Rippen entwickeln sich zu Kanälen die mit Lymphe gefüllt sind. Die Innenseiten der Kanäle sind mit Endothelzellen ausgekleidet. Spezielle (herzartige) Pumpen sorgen für den Materialaustausch zwischen den Flügeln und dem Körper. (c) Umstrukturierung der Flügel. Die Schichten aus Endothelzellen werden durch zwei Polymerfilme ersetzt, während die Epithelzellen in den Körper zurückgepumpt werden. Die dorsalen und ventralen Polymerschichten besitzen verschiedene Strukturen.

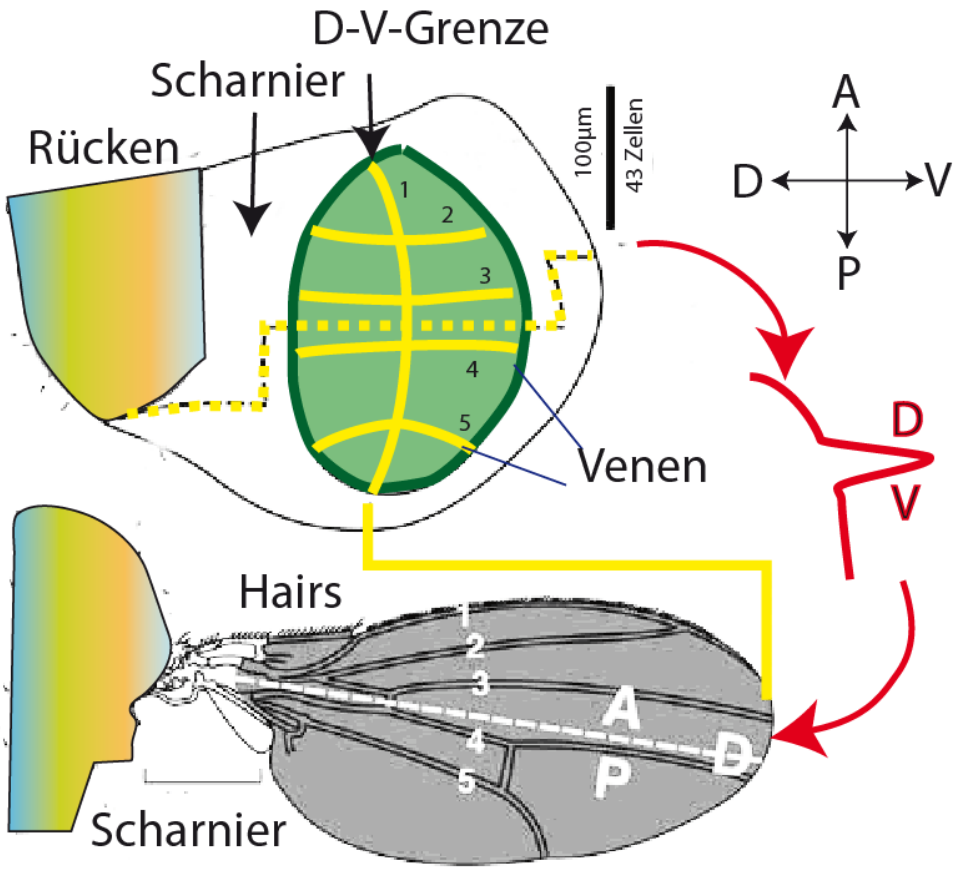

Figure 41.11: Abb 41.3. Übersicht über den Zusammenhang zwischen der Kompartimentierung der Imaginalscheibe der Flügel und der endgültigen Organisation des Flügels. Nach Lewis I. Held, Jr. "Imaginal Discs" Cambridge University Press.

41.9 Appendix 41.B Das French Flag Modell.

Nach L. Wolpert [Wolpert, 1969] kann man das Prinzip der Positionsinformation sehr eindrucksvoll durch das in Abb. 41.B gezeigte "French Flag Modell" darstellen. Als einfaches Beispiel betrachten wir eine Reihe von Zellen, die sich ringförmig um einen länglichen Embryo anordnen mögen. Wir nehmen an, dass Paare von Zellen (1/2; 2/3; usw.) in blaue weiße und rote Zellen differenzieren können, wenn ein morphogen wirkendes Signalmolekül (z.B. ein TF) die

Schwellkonzentrationen S1 und S2 unterschreitet. Wir haben bei der Diskussion der Abb.39.5 gesehen, wie die Schwellen, unterhalb der ein Gen exprimiert wird, durch das Verhältnis der Zahl der Bindungsstellen für Aktivatoren und Repressoren eingestellt werden kann.

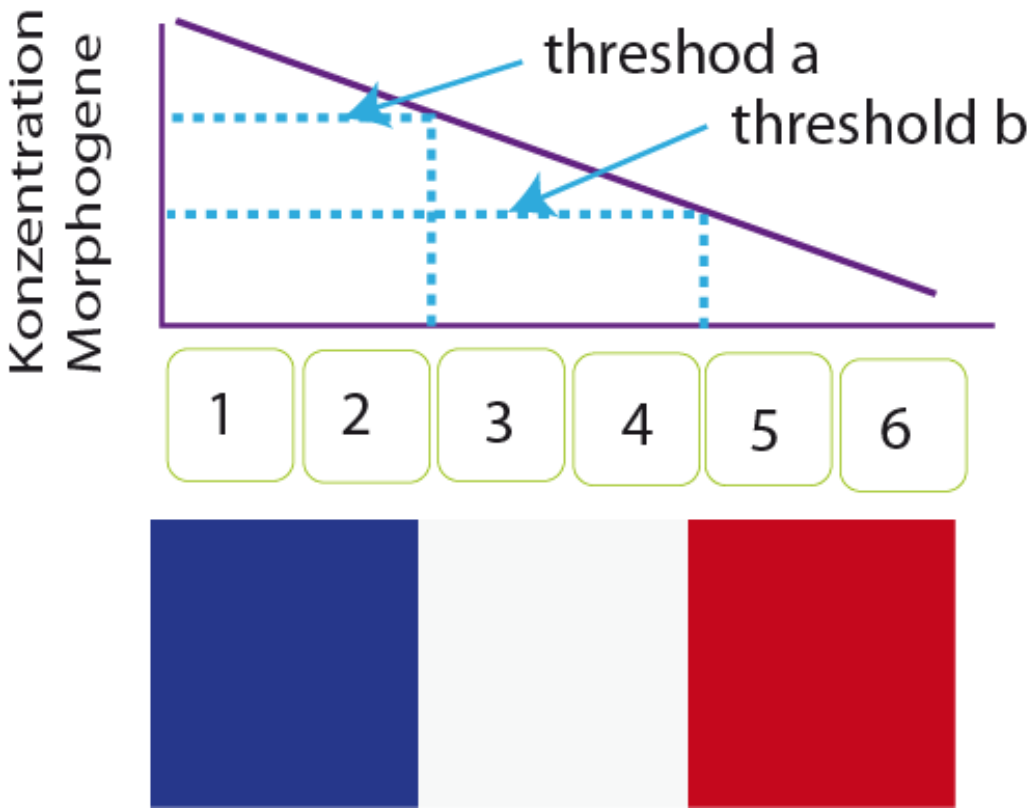

Figure 41.12: Abb.41.A4. Das French Flag Modell. Abbildung zeigt eine Reihe von Zellen (1-6)- Diese können paarweise in blaue, weiße und rote Zellen differenzieren, wobei der Übergang rot-weiß bei der Schwelle b (S1) und weiß-rot bei a (S2) eintritt.

41.10 Literatursammlung

Allgemeine Literatur zur Entwicklungsbiologie der Drosophila.

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

New York. Chapter 21.

[Gilbert] Gilbert, S. F.(2006) Developmental Biology. Sinauer Associates Sunderland, Mass., USA Chapter 14.

Lewis I. Held, Jr. "Imaginal Discs" Cambridge University Press.

[Lodish]. Lodish, H. et al (2008) Molecular Cell Biology, 6th edition, W.H. Freeman Company New York, Chapter 22.

Spezialliteratur

[Bate 1991] Bate, M., Arias, A. The embryonic origin of imaginal discs in Drosophila Development 112: 755-761 (1991)

[Bertet 2004] Bertet C, Sulak L, Lecuit T. (2004) Myosin-dependent junction remodeling controls planar cell intercalation and axis elongation. Nature 429: 667-671.

[Blair 1995] Blair (1995) Functions for PS integrins in tissue adhesion, migration, and shape changes during early embryonic development in Drosophila. Dev Biol. 169: 322-36.

[de Celis 1996] de Celis, A.. Bellido G., Bray S. (1996) Activation and function of Notch at the dorsal-ventral boundary of the wing imaginal disc. Development 122: 359-369.

[de Celis] de Celis, JF., Ruiz-Gómez, M. (1995) groucho and hedgehog regulate engrailed expression in the anterior compartment of the Drosophila wing. Development 121, 3467-3476.

[Casili 2004] Casali, A., Struhl, G. (2004) Reading the Hedgehog morphogen gradient by measuring the ratio of bound to unbound patched protein Nature 431: 76-80

[Classen 2005] Classen, A., et al. (2005) Hexagonal packing of Drosophila wing epithelial cells by the planar cell polarity pathway. Dev Cell 9:805-817

[Day 2000] Day, S., Lawrence, PA., (2000) Development 127: 2977-2987

[Farhadifar 2007] Farhadifar, R., et al. (2007) The influence of cell mechanics, cell-cell interactions, and proliferation on epithelial packing, Current Biology 17: 2095-2104

[Gibson 2005] Gibson, M., Perrimon N. (2005) Extrusion and death of DPP/BMP compromised epithelial cells in the developing Drosophila wing. Science 307 17851788

[Gumbine 2005]Gumbine, B (2005) Regulation of Cadherin mediated adhesion in morphogenesis |Nature Rev. Mol.Cell.Biol. 6.622 -634

(Hooper) Hooper, JE. Scott.MP, (2006) Communication with hedgehog. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 6:3006-3016

[Ikeya 2002] Ikeya, T., Galic, M. et al. (2002) Nutrient-Dependent Expression of Insulin-like peptides from Neuroendocrine cells in the CNS contributes to growth regulation in Drosophila. Current Biology 12: 1293-1300

[Kim 1995] Kim, J., Irvine, K. D., and Carroll, S. B. 1995. Cell recognition, signal induction,

and symmetrical gene activation at the dorsal-ventral boundary of the developing Drosophila wing. Cell 82: 795-802

[Kiger 2007] Kiger, J. et al. (2007) Tissue Remodeling During Maturation Of The Drosophila Wing. Dev Biol. 301: 178-191

[Klein 1999] Klein,T., Aries.AM.(1999) The vestigial gene product provides a molecular context fort he interpretation of signals during the development of the wing of Drosophila Development 12 6913-6925

[Kruse 2004] Kruse, K. et al. (2004) DPP gradient formation by dynamin-dependent endocytosis: receptor trafficking and the diffusion model. Development 131: 4843-4856

[Lecuit 1998] Lecuit, T., Cohen, SM. (1998) Dpp receptor levels contribute to shaping the Dpp morphogen gradient in the Drosophila wing imaginal disc. Developent 125:, 4901-4907

[Milan 1996] Milan, M., et al. (1996) Cell cycling and patterned cell proliferation in the wing primordium of Drosophila (imaginal discs/morphogenesis) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93: 640-645

[Morata2001] How drosophila appendages develop (2001) Nature Revs. Mol.Cell Biol. 2: 89-97

[Molony 2000] Moloney, D. et al (2000) Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch. Nature 406: 369-375

[Moloney 2000] Moloney, D. et al (2000) Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch

Nature 406: 369-375

[Müller2003] Müller, B., et al (2003) Conversion of an extracellular Dpp-Morphogen gradient into an inverse transcriptional gradient Cell 113: 221-233

[Nijhout2002] Nijhout HF. , Grunert, LW. (2002) Bombyxin is a growth factor for wing imanginal disc in Lepidoptera. Proc. Natl. Acad. Sci 99:15446-15450

[Panin 1997] Panin, VM- et al. (1997) Fringe modulates Notch-ligand interactins. Nature 387: 908-912

[Shen 2005] Shen, J., Dahmann, C. (2005) Extrusion of cells with inappropriate Dpp signaling from Drosophila wing disc epithelia Science: 307:1789-1790

[Steinberg 2005] Fotya, RA., Steinberg MS. (2005) The differential adhesion hypothesis: a direct evaluation Developmental Biology 278: 255- 263

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

[Tabata 2004] Tabata, T., Takei Y. (2004) Morphogens, their identification and regulation, Development 131: 703-712

[Towne/ Holtfreter 1955)] Townes, PL., Holtfreter, J. (1955) Directed movements and selective adhesion of embryonic amphibian cells J. Exp. Zoology 128: 53-120

Tögel et al., Herzen beflügeln, BIOspektrum, 05.10, 16. Jahrgang

[Watson 2008] Watson et al. (2008) Putative functions and functional efficiency of ordered cuticular nanoarrays of insect wings Biophys. J. 94: 3352-3360

[Widmann 2009] Widmann, T., Dahmann, Ch. (2009) Dpp signaling promotes the cuboidal-to-columnar shape transition of Drosophila wing disc epithelia by regulating Rho1. J Cell Science 122: 1362-1371

[Wolpert 1969] Wolpert, L. (1969). Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation.J. theor. Biol. 25: 1-47

[Yan]Yan, J. et al (2008)The multiple-wing-hairs Gene Encodes a Novel GBD-FH3 Domain-Containing Protein That Functions Both Prior to and After Wing Hair Initiation Genetics.180: 219-228

[Zecca 2007] Zecca Myriam and Struhl, G. (2007) Recruitment of cells into the Drosophila wing primordium by a feed-forward circuit of vestigial autoregulation Development 134: 3001-3010