Appendix 42: Autonome Gen-Oszillationen und mechanische Kräfte steuern die Segmentierung der Wirbeltiere-Die Bildung von Somiten

Appendix 42: Autonome Gen-Oszillationen und mechanische Kräfte steuern die Segmentierung der Wirbeltiere-Die Bildung von Somiten

42.1 Vorbemerkung

Im Kapitel 40 haben wir am Beispiel der Entwicklung der Insektenflügel gelernt, wie durch subtiles Zusammenspiel der genetischen Expression, der dadurch eingeleiteten Reorganisation des Zytoskeletts, gepaart mit der Modifikation der physikalischen Eigenschaften der Zellen, aus den wenigen vorprogrammierten Zellen umfassenden Primordien, die aerodynamisch optimierten Flügel entstehen. Wir lernten dabei einige fundamentale Prinzipien der embryonalen Entwicklung kennen. Es zeigte sich, dass Netzwerke aus wenigen Genen und ihren Produkten als Sensoren morphogenetischer Gradienten wirken können und dass diese Fähigkeit zur Grenzziehung zwischen verschiedenen Gewebearten ausgenutzt werden kann. Wir sahen,

wie durch zeitlich gestaffelte Aktivierung des spezifischen Wnt-Signalwegs durch verschiedene Morphogene die Epithelzellen parallel und senkrecht zur Längsachse polarisiert werden können.

In diesem Kapitel werden wir ein neues universelles Prinzip der Entwicklungsbiologie kennen lernen: Die Segmentierung des Gewebes durch genetische Oszillatoren. Ein zentrales Paradigma der Segmentierung ist die Entwicklung der Somiten. Bei diesen handelt es sich um lineare Anordnungen kugelförmiger Klumpen aus Mesenchymzellen, die von einer Hülle aus Endothelzellen umgeben sind und dem Embryo eine Segmentierung aufprägen. Im Verlauf der Entwicklung entstehen daraus u. a. die Rippen, die Haut und die Skelettmuskeln. Die zeitlich aufeinander folgende Bildung der Somiten ist ein besonders eindrucksvolles Beispiel der Steuerung der embryonalen Entwicklung durch Gen-Oszillatoren. Sie zeigt aber auch, dass die periodische Expression der Gene allein nicht zur korrekten Bildung von Organen ausreicht, sondern dass dabei das Zusammenspiel zwischen Genetik und Modulation der physikalischen Eigenschaften der Zellen eine entscheidende Rolle spielt. Zur Einführung in das Thema betrachten wir zunächst einige Besonderheiten der Entwicklung der Wirbeltiere, beschränken uns dabei aber auf die Entwicklung der Vögel (engl: avian embryology).

42.2 Frühphase der Entwicklung: Vom befruchteten Ei zur Neuralröhre

Die äußerer Hülle der Vogeleier (auch Vitellinmembran) genannt: (engl vitelline membrane) besteht vor der Befruchtung (d.h. im Eierstock) aus einer faserigen Gewebeart. Sie umgibt die Plasmamembran der Eizelle und muss daher von den Spermien durchdrungen werden, um die Befruchtung auszulösen. Eine gute Zusammenfassung der Eier der Säugetiere und Vögel findet man in der Monographie von S.F. Gilbert [Gilbert 1997]. Die Hauptmasse des Innenteils des Eis besteht aus dem, als Nahrung dienenden Eigelb. Im Gegensatz zu den befruchteten

Eiern der Amphibien, bei denen einige Stunden nach der Befruchtung eine sphärische Hülle aus zusammenhängenden Epithelzellen entsteht (die das Blastocoel umschließt), entwickelt sich das Blastogel der Vogeleier über dem Eigelb nach dem in Abb. 42.1a gezeigten Schema. Zunächst besteht zwischen der Hülle und dem Eigelb ein Hohlraum. Nach der Befruchtung wandern Zellen vom Rand der äußeren Hülle (die Hypoblasten) in den Zwischenraum zwischen dem Eigelb und der Plasmamembran des Eis ein und bilden eine geschlossene flache Schale über dem Dottersack, dessen Innenraum ebenfalls Blastocoel genannt wird (s. Abb. 42.1b). Anstatt des sphärischen Gebildes entsteht ein flacher Sack. In der nächsten Phase setzt die Gastrulation ein. Die äußeren Hülle bildet eine Einbuchtung: Den Primitiv-Streifen (engl. primitive streak), da Zellen der äußeren Hülle (Epiblasten genannt) in den Innenraum des Blastocoels einwandern (s. Abb. 42.1a). Das Endergebnis ist die Aufteilung der Zellen in das Ektoderm (die Hülle des dorsalen Bereichs), das Mesoderm (die Zellen im Innenraum des Sacks) und das Endoderm (Die Zellen des ventralen Bereichs). Dies ist der Ausgangszustand der Neurulation. Darunter versteht man die Bildung der Neuralröhre als Ausgangszustand des Zentralnervensystems. Der Prozess soll im Folgenden kurz beschrieben werden, da er eng mit der Bildung der Somiten verbunden ist.

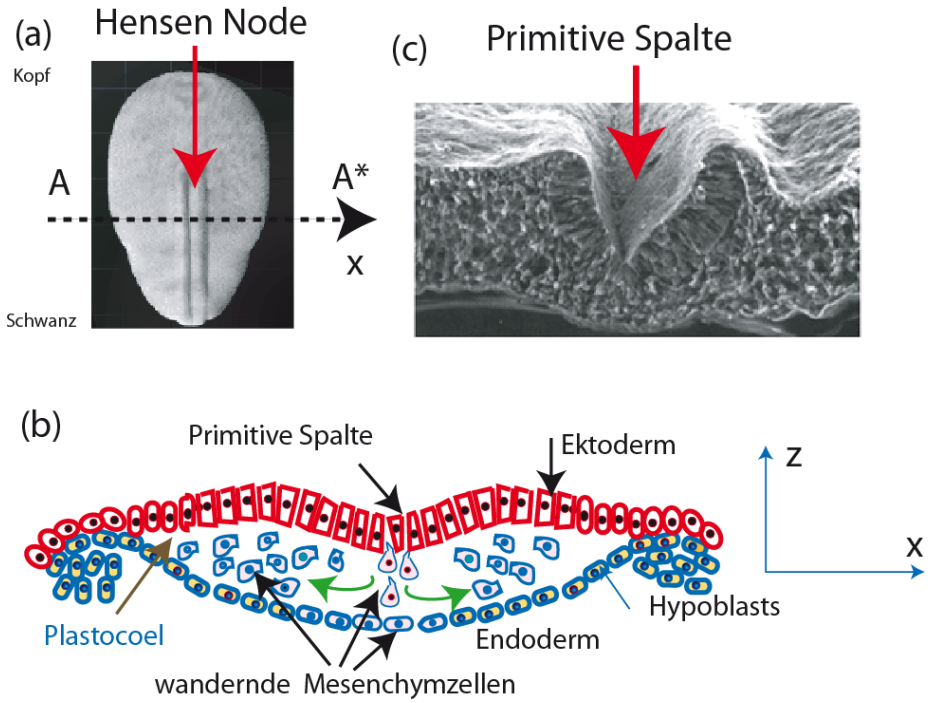

Figure 42.1: Abb 42.1: Zur Gastrulation der Eier der Vögel und Wirbeltieren. (a) Aufnahme des Primitivstreifens (engl. primitive streak) eines Maus-Embryos. Dieser entsteht im Schwanzbereich (auch caudale Seite des Embryos genannt, nach "cauda", lat. der Schwanz). Der Durchmesser des ganzen Gebildes ist etwa 0.4 mm. (b) Bildung eines Hohlraums (Blastocoel) durch Einwandern der Hypoblasten vom Rand, wodurch eine geschlossene Schicht von Endothelzellen ausgebildet wird. Prozess der Gastrulation, der durch Bildung einer Eindellung (dem Primitivstreifen, engl. primitive streak) im dorsalen Ektoderm entsteht. Aus dieser wandern Mesenchymzellen (die aus den Endothelzellen entstehen) in den Innenraum (das Blastocoel) ein und tragen zur Bildung des Mesoderm-Gewebes bei. (c) Erster Schritt zur Bildung des Neuralrohrs durch Einstülpung des Ektoderms. Man beachte, dass dies mit einer Änderung der Zelloberfläche und dem Ersatz der E-Cadherine durch N-Cadherine verbunden ist.

42.3 Die Neurulation

Die Neuralröhre bildet sich am späteren Kopfende (dem capita Ende). Sie beginnt mit der Bildung des Notochord. Dieses stabförmige Gebilde besteht aus Mesoderm-Zellen. Es erstreckt sich vom caudalen Ende (dem Hensler-Node) zum Kopfende und legt die zentrale Achse des Embryos fest. Durch Wechselwirkung des Mesoderm mit dem Ektoderms bildet sich eine Einstülpung des Ektoderms (s. Abb. 42.2b). Sie dringt immer tiefer in den Innenraum ein und bildet schließlich eine Röhre aus Endothelzellen: Die Neuralröhre. Die Einstülpung wird durch eine Reorganisation der Zelloberfläche der Epithelzellendes Ektoderms bewirkt, die den Charakter der Zellen ändert. Wie wir im Kapitel 13 und 23 lernten, werden die Epithelzellen (und die Endothelzellen) durch Zelladhäsionsmoleküle (ZAM) der Familie der sich selbst erkennenden (homophilen) Cadherine zusammengehalten. Die Zellen des Ektoderms werden durch die E-Cadherine zusammen gehalten (wobei E für Epithelzellen steht). Das Neutralrohr entsteht durch Ersatz dieser ZAM durch N-Cadherine (wobei N für "neural" steht). Der Prozess der Neurulation wird daher durch Aktivierung der Expression der N-Cadherine und Inhibition der E-Cadherin-Expression eingeleitet. Da ein ständiger Umbau der Plasmamembran stattfindet (wie wir in Kapitel 9 lernten) werden die E-Cadherine aus der Zellhülle entfernt. Während und nach der Bildung des Neuralrohrs entstehen andere Zell-Aggregate, aus denen später zahlreich innere Organe und Körperteile wie Blutgefäße, Muskeln und Knochen entstehen.

Ein Beispiel ist das prä-somitische Gewebe, aus dem sich im Verlauf der Entwicklung die Somiten bilden. Es besteht aus zwei stabförmigen Anordnungen von ungeordneten Mesoderm-Zellen, die beiderseits des Neuralrohrs und parallel zu diesem angeordnet sind und die man bei Vögeln auch Segmentplatte nennt. Man nennt das Somitengewebe auch para-axiales Mesoderm, da es sich neben dem Notochord, d.h. entlang der axialen Achse des Embryos erstreckt. Abb. 42.2b zeigt einen Querschnitt durch den Embryo (senkrecht zur Längsachse) und dient als Ausgangspunkt unserer folgenden Betrachtung.

42.4 Die Somitogenese

Darunter versteht man die Umwandlung der unstrukturierten Segmentplatte in perlschnurartig angeordneten sphärische Blöcken von Zellen: Die Somiten (s. Abb. 42.2).

Diese spielen eine zentrale Rolle für die Segmentierung der Embryone der Wirbeltiere und aus ihnen entstehen zahlreiche Körperteile, wie die Wirbelsäule und die zugehörigen Muskeln, die Rippen und die Haut. Jede Tierart entwickelt eine andere Zahl von Segmenten: Frösche besitzen 10, Menschen 33, Fische bis zu 48 und die Schlange sogar 300.

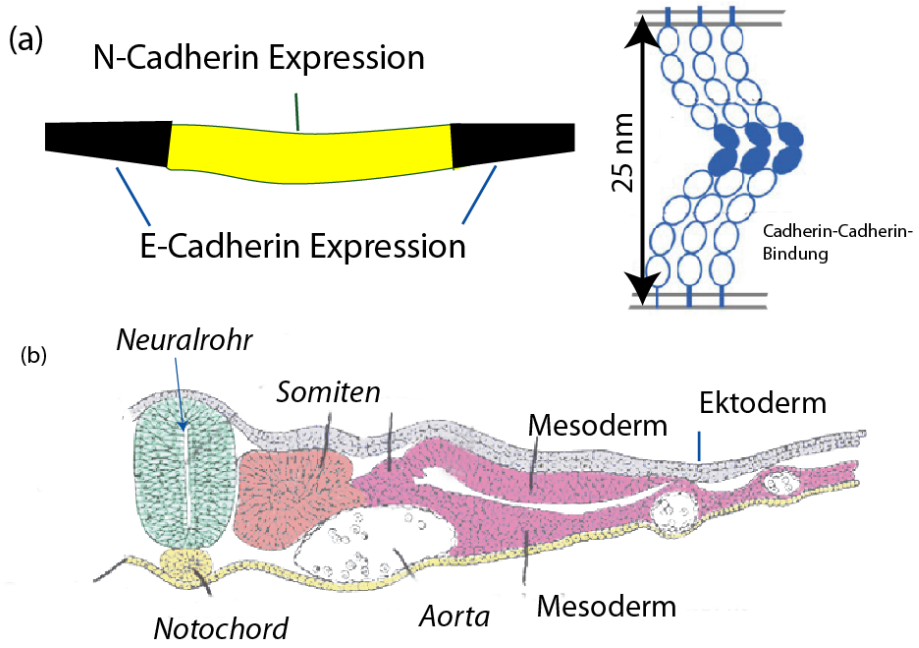

Figure 42.2: Abb. 42.2: (a) Querschnitt durch Platte aus Endothelzellen aus denen das Neuralrohr entsteht. Die zuvor an der Zelloberfläche vorhandenen E-Cadherine werden durch Rezeptoren (ZAM) der Klasse der N-Cadherine ersetzt. Das rechte Bild zeigt ein Modell der transversalen und lateralen Kopplung der Cadherine. Da die extrazellulären Domänen der Cadherine sehr lang sind, ist der Zell-Zell-Abstand 25 nm. Man beachte, dass die Cadherine dauernd durch Endozytose und Exocytose ausgetauscht werden . (b) Struktur der Blastula des Vogel-Embryos nach der Neurulation, mit der Verteilung der verschiedenen Gewebearten (modifiziert nach Wikipedia). Der Somit erstreckt sich unterhalb des Kopfbereichs in Richtung des caudalen Endes des Embryos, aber nur bis zu dem Hensen Knoten. Er besteht zunächst aus einer unregelmäßigen Anordnung von Stammzellen. Eine ausführliche Darstellung der Struktur und der biologischen Grundlagen Entwicklung der Somiten findet man in [Christ 1995].

Die Somitogenese findet etwa gleichzeitig statt wie die Neurogenese. Diese dramatische Umwandlung ist ein entscheidender Prozess der embryonalen Entwicklung. Hier findet die Segmentierung der Embryonen statt, mit der die Voraussetzung zur Bildung von Extremitäten und inneren Organen geschaffen werden. Die Somitogenese entspricht somit der Segmentierung der Inseketenlarven. Die molekulkarbiologischen Prozesse der Somitenbildung sind komplex,

da nicht nur zahlreiche Gene und Transkriptionsfaktoren daran beteiligt sind, sondern auch neue Zell-Signalsysteme ins Spiel kommen (neben den in den Kapiteln 40 und 41 behandelten). Die Situation wird noch dadurch komplexer, dass die Aktivitäten der Gene und Signalsysteme über Rückkopplungsschleifen miteinander gekoppelt sind. Andererseits verläuft die Segmentierung bei vielen Tierarten wie Vögeln, Fischen und Mäusen (aber auch dem Menschen) erstaunlich ähnlich ab. Man erwartet daher, dass sie durch universelle Mechanismen geregelt werden. Aus diesem Grund ist es sinnvoll, sich anhand eines Beispiels in die fundamentalen Prozesse der embryonalen Entwicklung einzuarbeiten. Die Somitogenese ist dafür besonders geeignet, da die Prozesse noch überschaubar sind und besonders intensiv erforscht wurden.

Wir werden bei der folgenden Diskussion manchen Genen, und Kontrollmechanismen ihrer Expression wieder begegnen, die bei der embryonalen Entwicklung der Insekten eine große Rolle spielten. Manche der Gene und Transkriptionsfaktoren haben allerdings bei den verschiedenen Tierarten verschiedene Namen, obwohl sie dieselbe Funktion erfüllen. Diese nicht sehr systematische Nomenklatur erschwert dem Anfänger das Lesen der Publikationen enorm (s. dazu [Giudicelli 2004]).

Abb. 42.3 zeigt die Mikroanatomie der Blastula der Vögel vor der Segmentierung und Abb. 42.4 während dieses Prozesses. Die brettförmige Segmentplatte besteht zu Beginn aus ungeordneten Anordnungen von Mesenchym-Zellen. Von diesem Mesoderm sondern sich, ausgehend vom Kopf (dem antereoren oder rostralen Pol), in regelmäßigen zeitlichen Abständen Blöcke von Zellen (Somiten genannt) ab. Diese bestehen aus gleich großen Hüllen aus Endothelzellen, die mit Mesenchymzellen gefüllt sind. Diese Segmentierung des Embryos ist ein vorübergehender Zustand. Wie oben erwähnt, sind die Somiten die Quelle aus denen andere Typen von Zellen und das assoziierte Gewebe entstehen (s. [Gilbert 1997], Chapter 9):

- Aus den Epithelzellen die am nächsten am Notochord liegen, bilden sich die Rippen. Man nennt diesen Satz von Zellen das Sklerotome.

- Aus den Zellen die am nächsten zur dorsalen Außenseite liegen, bildet sich die Epidermis des Rückens und man nennt den Cluster von Zellen daher das Dermatome.
- Aus den Zellen, welche zwischen dem Sklerotome und dem Dermatom liegen bilden sich die Myoblasten, die Vorläufer der Skelettmuskel-Zellen.

Die Gewebearten entstehen vor allem durch Teilung der epithelartigen Zellen der Hülle der Somiten, die zu Mesenchymzellen werden. Allerdings teilen sich auch die Zellen im Innern der Somiten laufend (s. [Christ 1995] und [Gilbert 1997] Ch. 9). Die Bildung von Myoblasten erfolgt durch die Expression spezifischer Transkriptionsfaktoren (wie MyoD). Diese aktivieren Gene, welche hohe Konzentrationen muskelspezifischer Proteine, wie Myosin II, Aktin und Dystrophin exprimieren. Die einkernigen Myoblasten wandeln sich durch Fusion in sehr lange, mehrkernige Zellen, aus denen dann die Muskelfasern entstehen. Der interessierte Leser findet eine gute Darstellung dieser Folgeprozesse der Somitenbildung in der Monogarphie von Gilbert [Gilbert 1997]. Im Folgenden wird nur die sequentielle Bildung der Somiten betrachtet, die einfachereren Prinzipien folgt und die zeigt, dass die embryonale Entwicklung auch durch Zusammenspiel von Genetik und Physik gesteuert wird.

Abb. 42.3 und 42.4 zeigen das Szenario der Somitenbildung, die am aperioren Ende der Segmentplatte stattfindet. Zellen wandern aus der Wachstumszone des Schwanzes in Richtung des Kopfes. Dies wurde durch Beobachtung der Migration fluoreszierende Zellen gezeigt, die in das Schwanzende eingebaut wurden (s. [Fraser 2002]). Bei Annäherung an den zuletzt gebildeten Somiten (s_0 in Abb. 42.3) verlangsamt sich die Bewegung und die Zellen bewegen sich nur noch im Bereich zweier benachbarter Somitenblöcke. Abb. 42.4 zeigt, dass die einwandernden Mesenchymzellen sich vom caudalen Ende her an den Somiten anlagern. Gleichzeitig bildet sich eine Epithelzell-Schicht aus, wie das rechte Bild in Abb. 42-4b zeigt. Häufig wandern auch Zellen aus dem Neuralrohr in den Bereich der Somiten ein.

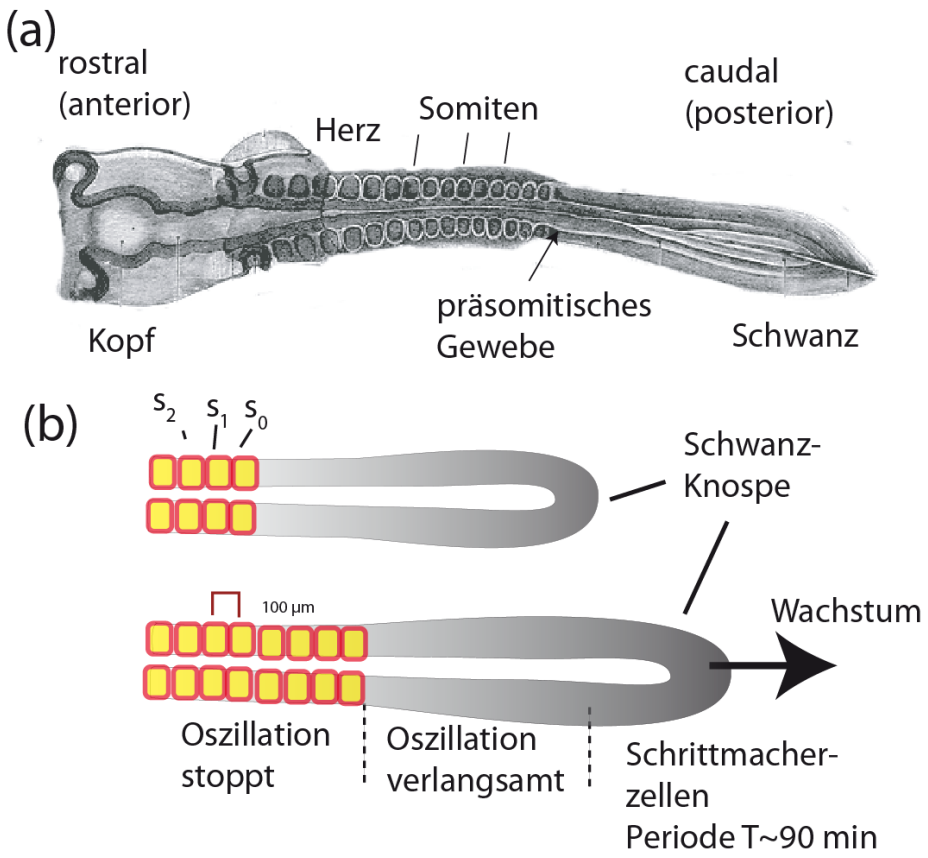

Figure 42.3: Abb. 42.3 (a) Hühnerembryo mit 15 ausgebildeten Somiten (Modifiziert nach Wikipedia Stichwort "'Somite"') (b) Bildung von Somiten aus stabartiger Anordnung des Mesoderms (Segmentplatten genannt) die sich beiderseits der Neuralröhre erstrecken. Die Kennzeichnung der Somiten erfolgt nach dem Alter. Der während der Beobachtung gebildete Block wird mit s_o, die älteren mit $s_1, s_2, ..s_n$ und die zukünftigen mit $s_{-1}, s_{-2}...s_{-n}$ bezeichnet. Die Abtrennung der quasispärischen Somiten von der Segmentplatte breitet sich wie eine Wanderwelle in Richtung anterior → posterior (auch rostra → caudal genannt) aus. Die Geschwindigkeit der Somitenbildung und der Verlängerung des Schwanzes sind korreliert, so dass der Embryo in die Länge wächst, während die Länge des prä-somitischen Gewebes gleich bleibt. Diese ist bei der Maus etwa 300 μm lang. Die Sequentierung erfolgt bei Embryos der Hühner im Rhythmus von T=90 min und bei Mäusen von T=120 min, was auf die Existenz eines genetischen Master-Oszillators hinweist.

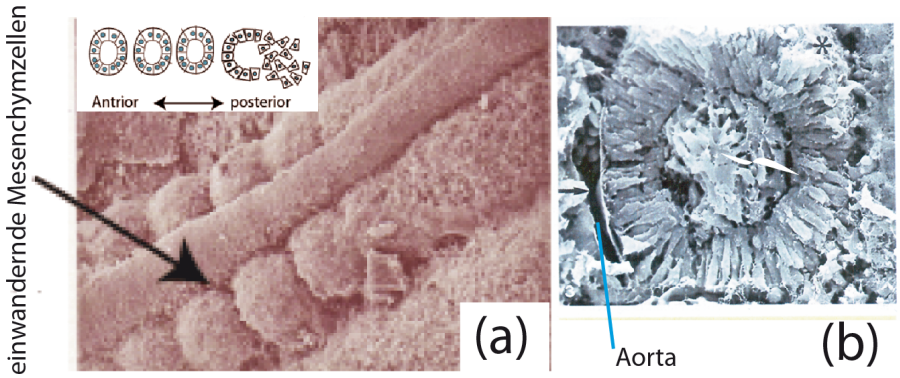

Figure 42.4: Abb. 42.4: Beobachtung der Somitenbildung mit dem Raster-Elektronenmikroskopie. (a) Aufsicht auf wachsende Somiten. Man beachte Folgendes: Während der Somitenbildung werden laufend neue Mesenchymzellen in das posteriale (caudale) Ende des präsomitischen Gewebes eingeschleust (s. unteres Schema), und zwar derart, dass die Länge der Präsomiten etwa konstant bleibt (s. Abb 42.3b). Zweitens: die neu gebildenten Somiten s_{-1} sind polar, so dass Zellen sich am aperioren Ende schon wie Epithelzellen aber am P-Ende noch wie Mesenchymzellen verhalten (s. Einsatz links oben).(b) Querschnitt durch einen Somiten. Man beachte den Aufbau der Somiten aus einer Kugelschale aus kolumnaren Zellen, die mit Mesenchymzellen gefüllt sind (Bilder nach [Christ 1995]). Die Epithelzellen adhärieren auf einer Basalmembran die mit dem Stern gekennzeichnet ist.

42.5 Die sequentielle Bildung der Somiten wird durch eine genetische Uhr (Segmentierungsuhr) gesteuert

Die sequenzielle Bildung der Somiten entsteht durch Übersetzung der zeitlichen Oszillation der Aktivität eines oder mehrerer Schlüssel-Gene in die räumliche Abspaltung der Somiten. Die Oszillation der Genexpression breitet sich wie eine Wanderwelle im präsomitischen Gewebe der Segmentplatte in posterior -anterior Richtung (A-P-Richtung) aus. Sie stoppt an der Stelle des neu entstehenden Somiten, so dass mit jeder Periode ein neuer Block von Zellen entsteht. Während der Somitenbildung werden laufend neue Mesenchymzellen am Schwanzende des

Präsomiten eingeschleust (und zwar durch dauernde Gastrulation oder Zellteilung), so dass die Länge desselben konstant bleibt (s. [Guidicelli and Lewis 2004] und [Palmeirim 1997]).Es ist wichtig darauf hinzuweisen, dass die wellenförmige Ausbreitung der Genexpression nicht die direkte Folge von Zellbewegungen ist, sondern auf der synchronisierten Expression der Gene in den präsomitischen Zellen beruht. Trotzdem wandern Zellen vom Schwanzende zu den Somiten wie wir unten sehen werden (s. [Fraser 2002]).

Die Schlüsselgene und Transkriptionsfaktoren

Die Bildung der Somiten wird aus heutiger Sicht durch das Zusammenspiel von fünf Signalsystemen bzw. Genen kontrolliert [Giudicelli 2004]:

1) Dem Fibroblasten-Wachstumsfaktors (engl fibroblast growth factor =FGF), ein die Zellteilung und das Zellwachstum stimulierendes Protein, das die Umwandlung von Mesenchym- in Endothelzellen hemmt.

2) Einem vom Kopf ausgehender Gradient der Retinalsäure, ein als morphogenetische Substanz wirkendes Hormon, das durch die Zellmembran in das Zytoplasma und den Kern gelangt, von Kern-Rezeptoren erkannt wird und über diese die Gen-Expression moduliert.

3) Den repressiven Transkriptionsfaktoren (TF) Hairy-1 bei Hühner ([Palmeirim 1997]) bzw. Hes-7 bei Mäusen ([Bessho 2003] [Giudicelli 2004]), welche durch die Gene c-hairy-1 bzw. hes7 kodiert werden, die autonomen Gen-Oszillator bilden können (s. Abb. 42. 5 unten).

4) Dem Protein lunatic fringe (durch das Gen flng kodiert), ein Modulator der Genexpression, der die Affinität der Notch-Rezeptoren für spezifische Morphogene erhöhen und für andere reduzieren kann (s. Gossar "fringe") und der eine Schlüsselrolle bei der Bildung von Grenzen zwischen verschiedem Gewebe spielt (s. Kapitel 41.6.2.2, [Sato et al 2002]).

5) Dem durch Notch vermittelte Signalsystemen, das (zusammen mit Lunatic Fringe) für die Ausbildung scharfer Grenzen zwischen den Somiten sorgt und dessen Aktivität durch die oszillierenden Gene Hes-1 (bzw. hairy-1) gesteuert wird.

An der Abgrenzung der Zellblöcke (Somiten) ist die ganze Segmentplatte und der als Wachstumszone wirkende Schwanz beteiligt. Es ist hilfreich die Segmentplatte in vier funktionell verschiedene Bereiche einzuteilen: Das Schwanzende, die Regionen I und II des präsomitischen Gewebes (PSM) sowie die schon segmentierten Bereiche III mit den Blöcken s_1, s_2 (Region IV). Die Zellen der Wachstumszonen (am caudalen Ende der Segmentplatte) exprimieren (im Fall der Maus) die Gene lfng und Hes-7 [Saga2001]). Die Expression ist aber nicht kontinuierlich, sondern oszillatorisch, und die Konzentration der exprimierten Proteine (Fringe oder Hes-7) ändert sich periodisch. Die Gene und ihre Produkte bilden also eine genetische Uhr. Die periodische Änderung der Transkription breitet sich wie eine Wanderwelle entlang der Segmentplatte in rostraler Richtung aus. Am aperioren Ende der Region III beginnt die Ausbildung der Somiten durch Umprogrammieren der Genexpression. Dabei spielt die Umwandlung von Mesenchymzellen in (zunächst undifferenzierte) Epithelzellen eine wichtige Rolle. Im Fall der Hühner verläuft die Somitogenese völlig analog. Die Rolle von hes-7 wird durch das Gen c-hairy übernommen.

42.6 Experimentelle Beobachtungen der genetischen Oszillation (Segmentierungsuhr)

Man kann die raum-zeitliche Oszillation der Gene auf zwei Weisen beobachten, entweder durch Markierung der Transkripte (m-RNA) der Gene mittels in situ Hybridisierung oder durch Anfärben der von diesen kodierten Proteinen mittels fluoreszierenden Farbstoffen, wie GFP.

Die lokale Expression der Gene kann man lange vor der Bildung der Somiten beobachten (s. Abb. 42.5). Ein Vorteil der Markierung mit Fluoreszenzsonden ist, dass man gleichzeitig die Bewegung der Zellen während der Somitogenese verfolgen kann, wie wir weiter unten sehen werden (s. [Fraser 200X]).

Die Oszillation der Genexpression im präsomitischen Gewebe wude erstmals von Palmeirim et al. [Palmeirim 1997] experimentell beobachtet, und zwar durch Beobachtung der raum-zeitlichen Verteilung des Expression des Gens c-hairy an Hühnerembryos. Die Beobachtung wurde später durch das im folgenden beschriebenen Experiment an Mäusen bestätigt und verfeinert [Bessho 2003]. Die beiden Experimente lieferten wichtige Einblicke in die genetische Kontrolle der Somitogenese:

- Abb. 42. 5a zeigt drei in zeitlicher Folge aufgenommene Verteilungen des Proteins Hes 7. Im linken Bild 42.5a ist Hes-7 am caudalen Ende sowie in der Nähe der bestehenden Somite angereichert, im mittleren Bild besitzt die Verteilung von Hes-7 ein Maximum in der Mitte (wo vorher kein Hes-7 beobachtet wurde) und im rechten wird der erste Zustand wiederholt. Dynamische Beobachtungen zeigen, dass das Maximum der Verteilung von Hes-7 wie eine Wanderwelle zum rostralen Ende der Segmentplatte läuft und in der Nähe des Somiten s_1 stoppt.

- Die gleichzeitige Beobachtung der Transkription der Genen hes-7 und lunatic fringe (lfng) zeigen ein überraschendes Ergebnis: In den Bereichen, in denen Hes-7 ein Maximum besitzt findet keine Transkription dieser Gene statt. In anderen Worten: Hes -7 ist ein Repressor des eigenen Gens, sowie des Gens lfng, dessen Produkt (Lunatic Fringe) die Empfindlichkeit des Notch-Rezeptors moduliert.

- Die Hes-7 Proteine werden mit einer Halbwertszeit von 23 min durch Proteasomen (unter Beteiligung von Ubiquitin) abgebaut, eine wichtige Voraussetzung für die Ausbildung oszilla-

torischen Verhaltens. Die Lebensdauer von 23 min ist mit der Periode der Somitogenese von 120 min kompatibel.

- Auch lunatic fringe unterdrückt die Expression seines eigenen Gens und diese negative Rückkopplung kann ebenfalls zur Bildung autonomer Gen-Oszillatoren beitragen [Dale 2003].

Bevor auf die Darstellung der Modelle genetischer Oszillatoren eingegangen wird, soll die Frage behandelt werden, wie die scharfen Grenzen zwischen den Somiten entstehen.

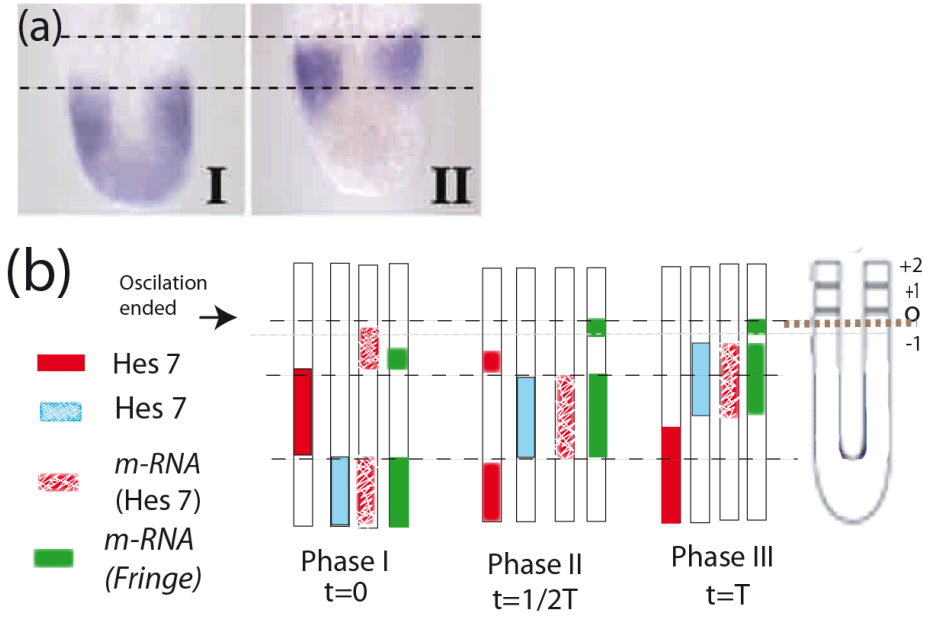

Figure 42.5: Abb. 42.5. Zur experimentellen Demonstration der genetischen Segmentierungsuhr. (a) Beobachtung (in situ) der räumlichen Verteilung des TF Hes 7 in den Somiten der Mausembryos. Die Embryos wurden mit Gluteraldehyd fixiert und mit Antikörpern gegen Hes 7 angefärbt. Gleichzeitig wurde die Verteilung der m-RNA von Hes-7 beobachtet und gezeigt, dass diese nur an den Stellen des PSG transkribiert wird, an denen Hes-7 fehlt. Gezeigt wird die Verteilung in den (in (b) definierten) Phasen I (links) und II (rechts). Das Bild wurde modifiziert nach [Bessho 2003]. b) Zeitliche Variation der Verteilungen (i) des Transkriptionsfaktors Hes 7, (ii) der durch das Gen hes7 kodierten m-RNA und der m-RNA des Gens Lfng, welche das Proteine Lunatic Fringe kodiert. Man beachte insbesondere, dass die Phase maximaler Expression von Hes 7 gegenüber der maximalen Transkription seines Gens um eine halbe Periode verschoben ist, während die Verteilungen der m-RNA von Hes-7 und Lunatic Fringe übereinstimmen. Das Experiment zeigt, dass Hes 7 seine eigen Expression und die von Lunatic Fringe unterdrückt. Die gestrichelte Linie im linken Bild markiert die Position der neuen Spalte zwischen den Somiten s_o und s_{-1} (modifiziert nach [Bessho 2003]).

42.7 Transplantationsexperimente liefern Einblicke in die Mechanismen zur Bildung scharfer Grenzen zwischen den Somiten

Betrachten wir nun die Frage, wie die Spalte zwischen den Somiten entstehen, nachdem die Segmentierungswelle in dem PSG stoppt und einer neuer Somit s_o entsteht. Der Prozess erfolgt in zwei Schritten. Der erste besteht in der vorläufigen Differenzierung der Zellen durch Ausbildung spezifischer Gen-Muster und der zweite in der Bildung der abgeschlossenen Somiten durch Reorganisation der Zellen durch zelluläre Bewegungen. Wir beginnen mit dem ersten Prozess. Wie bei der in Kapitel 40 beschriebenen Entstehung der dorsal-ventral Polarität der Insektenflügel spielt dabei der Notch-Rezeptor, sein Ligand Delta und ein Modulator der Fringe-Familie eine zentrale Rolle. Dies zeigen die in Abb. 42.6 gezeigten eleganten Experimente von Sato et al. [Sato 2002)].

Das erste Experiment beantwortet die Frage, ob die Zellen an der Position der neu entstehenden Somiten (s_{-1}) schon so vorprogrammiert sind, dass sie typische Spalten zwischen Somiten an präsomitischem Gewebe induzieren können. (Man beachte, dass mit s_o der zuletzt gebildeten Somiten gekennzeichnet wird). Im Experiment der Abb. 42.6a wurde Gewebe aus dem zu erwarteten Übergang zwischen dem den neu zu bildenden Somiten s_o und s_{-1} an die vermutete Position zwischen s_{-1} und s_{-2} (d.h. die Stelle $s_{-1.5}$) transplantiert. Es entwickelte sich in der Tat an dieser Stelle eine Spalte (wahrscheinlich durch Umwandlung von Mesenchym- in Endothelzellen). Man kann die Bildung von Spalten auch an anderer Stelle des PSG induzieren. Dieser Befund lehrt uns, dass die Zellen der neu entstehenden Somiten die Fähigkeit besitzen, die Somitenbildung im präsomitischen Gewebe zu induzieren. Es bestätigt außerdem die Idee von Wolpert, dass das Schicksal der Zellen im frühen Embryo von ihrer Position abhängt.

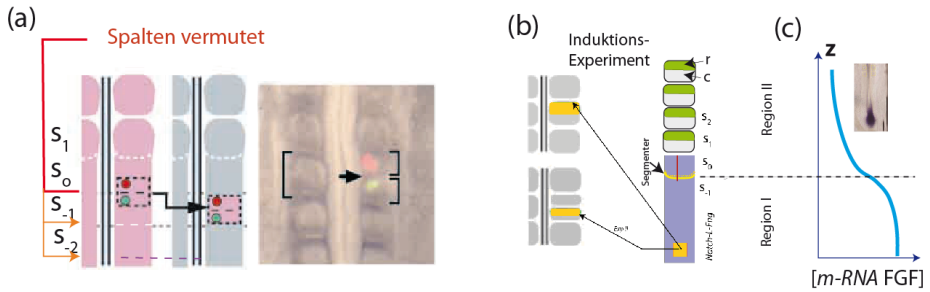

Figure 42.6: Abb. 42. 6. Zwei Experimente zur Demonstration der Grenzbildung zwischen den Somiten (nach [Sato2002]. (a) Gewebe Transplantation. Kleine Stücke des Gewebes mit 50-100 Zellen wurden auf der aperioren und der posterioren Seite des vermuteten Spaltes, d.h. am Übergang von s_o zu s_{-1} aus einem Donor herausgeschnitten und im Bereich des vermuteten Übergangs von s_{-1} nach s_{-2} eines Akzeptor-Embryos eingebaut. Die transplantierten Zellen induzieren in der Mitte des erwarteten Somiten s_{-1} eine Spalte. In einem zweiten, rechts gezeigten Versuch wurden die Zellen der aperioren bzw. posterioren Seite des Transplantats mit grün bzw. rot fluoreszierendem Farbstoff markiert und es wurde gezeigt, dass die Zellen auf den beiden Seiten des induzierte Spaltes verschieden sind. Dies zeigt, dass die Somiten polarisiert sind. (b) Transplantation genetisch programmierter Zellen zur Aufklärung der genetischen Kontrolle der Bildung von Spalten. Am caudalen Ende der Segmentplatte wurden Zellen durch Transfektion mit den Genen lfng, notch und delta-1 beladen, wobei die Methode der Elektroporation an den Embryonen angewendet wurde. Kleine Stücke der genetisch modifizierten Zellen wurden vom Schwanzende entnommen und in verschiedene Regionen des präsomitischen Teils der Segmentplatte oder bestehende Somiten (wie gezeigt) transplantiert. Wurden die Zellen in den aperioren Bereich der Somiten implantiert (wie oben im Bild) so passierte nichts, während bei Einbau in den posterioren Bereich (wie unten im Bild) eine Spalte durch die Mitte des Somiten induziert wurde. Dies zeigt, dass die Somiten in caudal-rostral-Richtung polarisiert sind. (c) Demonstration der Ausbildung eines Gradienten des Wachstumsfaktors FGF in caudal-dorsal Richtung, welcher die Segmentplatte in zwei Regionen I und II aufteilt. Der Einsatz zeigt die Verteilung der fgf-m-RNA. Das exprimierte Morphogen FGF sorgt für die Zellproliferation und verhindert die Umwandlung von Mesenchym- in Epithelzellen.

Das zweite Experiment zur Aufklärung der genetischen Kontrolle der Bildung von Spalten zwischen Somiten zeigt Abb. 42.6.b. Dazu wurden Zellen aus der Wachstumszone am caudalen Ende der Segmentpatte durch Transfektion mit den Genen notch, lunatic fringe (lfng) und delta-1 (dl-1) beladen, wobei daran erinnert wird, dass Delta ein Ligand des Rezeptors Notch ist. Diese Zellen wurden einmal in die aperiore und einmal in die posteriore Hälfte von ausgebildeten Somiten eingebaut. Im ersteren Fall fand man keine Änderung ihrer Struktur, während im zweiten Fall eine Spalte in der Mitte der Somiten entstand. Diese ektopische Induktion einer Spalte durch die Somiten zeigt, dass das Trio von Genen die Bildung scharfer Grenzen in unstrukturiertem Gewebe induzieren kann. Für den Leser des Kapitels 40 ist das keine Überraschung, denn diese Gene und ihre Produkte sorgen auch für die Bildung der dorsal-ventral Demarkationslinie.

42.8 Kontrolle der Somitogenese durch Gradienten des Wachstumsfaktors "fibroblast growth factor" (FGF)- Ein Modell

Bisher haben wir die an der Somitogenese beteiligten Gene und deren Produkte kennen gelernt, aber wir verstehen noch nicht welcher Mechanismus dafür sorgt, dass die genetische Wanderwelle stoppt und ein neuer Somit (s_0) entsteht. Da dies mit der Umwandlung von Mesenchym in Epithelzellen verbunden ist, liegt die Vermutung nahe, dass eine morphogenetische Substanz ins Spiel kommt. Tatsächlich wurde ein solcher Faktor entdeckt, nämlich der Wachstumsfaktor FGF8 (fibroblast growth factor), der durch das Gen fgf8 kodiert wird. Die Beobachtung der Transkription des Gens durch in situ Hybridisierung der mRNA zeigt, dass das Morphogen laufend in der Wachstumszone des Schwanzes erzeugt wird, in rostraler Richtung diffundiert und durch Zerfall einen in rostraler Richtung abfallenden Gradienten erzeugt (s. Abb. 42.7).

Man kann sich die Bildung der Somiten anhand der Abb. 42.5 und Abb. 42.6b wie folgt vorstellen, indem wir wieder annehmen, die Segmentplatte bestehe (neben dem Schwanzende) aus zwei Regionen I und II. In I entstehen aufgrund der Wirkung des Wachstumsfaktors FGF8 ständig neue Zellen, wodurch das caudale Ende nach hinten wächst; Gleichzeitig bewegt sich die Welle der hes-7- und lfrng-Expression in die anteriore Richtung. Die Segmentierung beginnt an der Position an der die Front der Hes-7 und lfrng Expression einen unteren Schwellwert des Wachstumsfaktors erreicht und die Repression des Mesenchymzell-Endothelzell-Übergangs genügend abgeschwächt ist.

Die scharfe posteriore Grenze des neuen Somiten (s_{-1}) wird (ähnlich wie im Fall der dorsal-ventral Grenze der Insektenflügel) durch die Proteine Lunatic Fringe, Delta-1(ein Analogon von Delta) und den Notch-Rezeptor vermittelt. Die ersten beiden Proteine sind in den Zellen der Region II verteilt. Dort wo die Fronten von Lunatic Fringe und Notch zusammentreffen, entsteht eine scharfe Front der Expression von Delta und zwar am aperioren Ende des Somiten s_{-1}. Nach Abb. 42.4 beurteilt, ist die Bildung der Front mit einer Mesenchym-Epithelzell-Übergang verknüpft.

42.9 Die anterior-posterior Polarisierung der nascenten Somiten

Das Bild 42.4b macht den Eindruck, als ob die Somiten isotrope sphärische Gebilde sind. Das ist keineswegs der Fall. Die oben beschriebenen Transplantationsexperimente zeigen nämlich, dass die Somiten keine isotropen Zellklumpen sind, sondern eine eingeprägte anterior-posterior Polarität besitzen. Diese ist wahrscheinlich die Voraussetzung dafür, dass aus den Somiten in der späteren Phase der Entwicklung das Rückgrad, die Muskeln und die Haut entstehen. Offenbar müssen noch weitere Gene und TF hinzukommen, um die Zell-Linien der anterioren

und posterioren Seite der Somiten zu trennen.

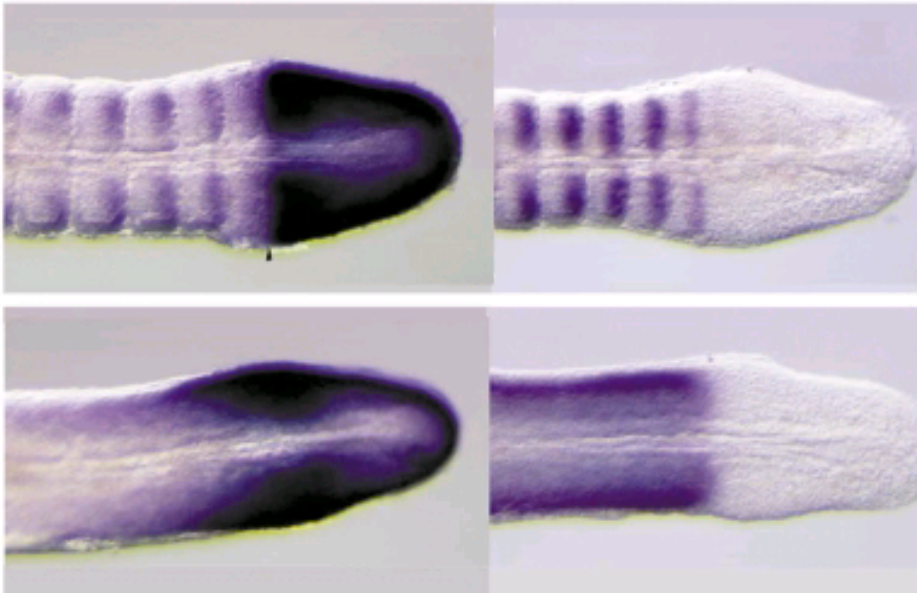

Figure 42.7: Abb. 42.6d. (a) Zur rostral-caudal Polarität der nascenten Somiten. Oben: Expression von Delta-1 in Wildtyp-Zellen. Unten Verlust der Polarität in Mutanten nach Entfernung von Mesp-1.

Aus heutiger Sicht spielt dabei das Zusammenspiel zwischen dem Delta-1-Notch-Komplex und dem Gen mesp-2 eine entscheidende Rolle [Saga 2001]. Der TF Mesp-2 wird vor allem in der anterioren Hälfte der Somiten exprimiert und regelt dort die Expression von Delta1 herunter. Die posteriale Hälfte der Somiten bildet dagegen, aufgrund der Wirkung von Delta-1, die scharfe Spalte welche die posteriore (= caudale) Hälfte der Somiten vom Präsomitengewebe trennt. Entfernt man mesp-2, so geht der Unterschied der zwei Hälften in den Somitblöcken verloren, wie Abb. 4.9 weiter unten zeigt. Die Mechanismen der Steuerung dieser Polarisierung sind noch unklar.

42.10 Über die Möglichkeit der Zell-Sortierung in den Somiten durch Zelladhäsion- und Mesenchym-Epithelzell-Umwandlung

Eine ungeklärte Frage ist, in welchen Merkmalen sich die Zellen in den beiden Hälften der Somiten unterscheiden. Da sich die Zellen ständig bewegen (s. 40.10) muss ein Mechanismus für die Sortierung der Zellsorten sorgen. Diese Unterschiede sind möglicherweise für die spätere Aufspaltung der Blöcke in das Dermatom, das Myotom und das Skleroton notwendig. Für die Zellsortierung sorgen die Zelladhäsionsmoleküle (ZAM, s. Kapitel 13 und [Steinberg 2005)]). Jede Zelle besitzt eine charakteristische Verteilung von einer oder mehreren Sorten von ZAM (z. B. Integrine und Cadherine). Diese kann sich aufgrund des ständigen Umbaus der Plasmamembran und der Genexpression laufend ändern. An der Somitogenese sind mehrere ZAM beteiligt, wobei manche wahrscheinlich nur vorübergehen exprimiert werden.

Die Bildung der sphärischen Somitenblöcke kann durch homophile C- Cadherine vermittelt werden, welche die sphärische Form stabilisieren.

Wie in Kapitel 40.4 gezeigt wurde, wirkt auf die Blöcke (mit dem Radius R) ein nach innen gerichteter Kohäsionsdruck der Größe: $p = \frac{\Sigma}{R}$. Dabei ist Σ die laterale Spannung, die durch die Adhäsionsstärke zwischen den Zellen bestimmt ist. Außerdem sind die Epithelzellen polarisiert, wie wir in Kapitel 23 sahen.

Eine zweite, für die Restrukturierung der Somiten wichtige Gruppe von ZAM sind die Protocadherine (PAPC). Diese integralen Membranproteine sind ebenfalls homophile ZAMs. Eine besondere Eigenschaft ist ihre Fähigkeit, die Expression des C-Cadherins herunter zu regeln, wodurch die Kopplung zwischen den Epithelzellen abgeschwächt wird, wie am Beispiel der

in Somitenbildung im Xenopus erstmals gezeigt wurde [Chen 2006]. Dies ist wichtig, wenn es im Verlauf der Entwicklung darum geht Epithel- in Mesenchymzellen umzuwandeln oder Epithelzellschichten aufzubrechen. Man hat die Auflösung der Epithelzellschicht durch PACS in Somiten der Maus auch direkt beobachtet (s. [Rhe 2003], Glossar, Stichwort mesp-2).

Eine dritte Gruppe von ZAM sind die Zellrezeptoren der Ephrin-Familie und ihre assoziierten Liganden: Den Ephrinen. Die Rezeptoren können über Lipidanker (Ephrin A) oder über α-Helizes (Ephrin B) in der Zellhülle verankert sein. Bei der Entwicklung des Zentralnervensystems (ZNS) regeln sie die Verteilung der von den Ganglionen der Sehzellen ausgehenden Axone im Gehirn (zum Mechanismus: s. Glossar "Eph" und [Gilbert, 2007]). Ihre Rolle bei der Segmentierung und der weiteren Entwicklung der Somiten ist noch unklar. Wir werden daher in der Synopsis genauer darauf eingehen.

Schließlich können auch die allgegenwärtigen Integrine die Sortierung der Zellen kontrollieren. Sie stellen vor allem die Kommunikation der Zellen der Oberfläche der Somiten mit dem Gewebe der Umgebung her. Wie Abb. 42.4b zeigt, stehen die Zellen an der Oberfläche in Kontakt mit einer Basalmembran, die ebenfalls zur Polarisierung dieser Zellen führen können. Die Aktivität der Integrine wird über die Ephrine hochgeregelt.

Ein völlig anderer Mechanismus der Kontrolle der Zelladhäsion findet über die Umwandlung von Epithel- in Mesenchymzellen statt. Diese wird durch eine spezifische Gruppe von Wachstumsfaktoren reguliert, wie dem Wachstumsfaktor fibroblast growth factor (FGF, s. Glossar). Exprimiert man FGF in Epithelzellen der menschlichen Niere, so wird die Expression der E-Cadherine um einen Faktor 2 und die des Intermediärfilaments Keratin zu 90% reduziert [Zeisberg 2002]. Durch diese Umprogrammierung können sich die Zellen wieder im Gewebe wie Mesenchymzellen bewegen. Dieser Mechanismus der Epithel-Mesenchym-Umwandlung kann auch in den Somiten sattfinden, in denen nach Abb.42 ein Gradient des FGF-aufgebaut wird, wobei die Konzentration des Morphogens im Bereich der Schwellwerts der Umwandlung

liegt [Zeisberg 2002].

42.11 Kontrolle der Somitenbildung durch hydrodynamische Kräfte

Die meisten Modelle der Embryogenesis gehen davon aus, dass die raum-zeitliche Verteilung der Genaktivität der wesentliche Regulator der Segmentierung ist. Es wird generell angenommen, dass die Erregung der Genexpression wie eine Wanderwelle vorangetrieben wird. Allerdings ist noch nicht klar, durch welchen Mechanismus die Bewegung der Front der Gen-Expression (von hes-7 und fringe) angetrieben wird. Wie in Experimenten von Kulesa und Fraser [Fraser 2002] gezeigt wurde, ist dies zweifelhaft.

Durch Injektion fluoreszierender Zellen in das Schwanzende kann man deren Bewegung in der Segmentplatte während der Segmentierung verfolgen. Dabei zeigt sich, dass die markierten Zellen in 4 Stunden etwa 1 mm in rostraler Richtung wandern und dabei sogar die Spalte zwischen den Somiten überspringen. Die Geschwindigkeit der Wanderwelle der Expression ist $\approx 3 - 4\frac{\mu m}{min}$. Dies folgt aus der Länge des präsomitischen Gewebes ($\approx 300 - 500\mu m$) und der Periode des Oszillators von ($T \approx 120 sec$). Die Geschwindigkeiten sind also ähnlich.

Andererseits verlaufen die beiden Transportprozesse nicht synchron, denn die Bewegung der Zellen ist dabei oft unabhängig von der Verteilung der Gene. Dies zeigt der Vergleich von Abb. 42.8b und Abb. 8c besonders deutlich. Abb. 42.7c zeigt die Verteilung der m-RNA des Gens ephA4, während Abb. 42.6b mittels Fluorezenzmikroskopie aufgenommene Bilder des Gewebes an derselben Stelle zeigt. Das Bild zeigt, dass die Verteilung der Genexpression und der Zellen der neu entstehenden Somiten nicht übereinstimmen. Auch nach der Bildung der Trennlinie können sich Zellen noch zwischen den benachbarten Somiten austauschen. Offenbar

spielen noch andere Mechanimen als die Genexpression eine Rolle.

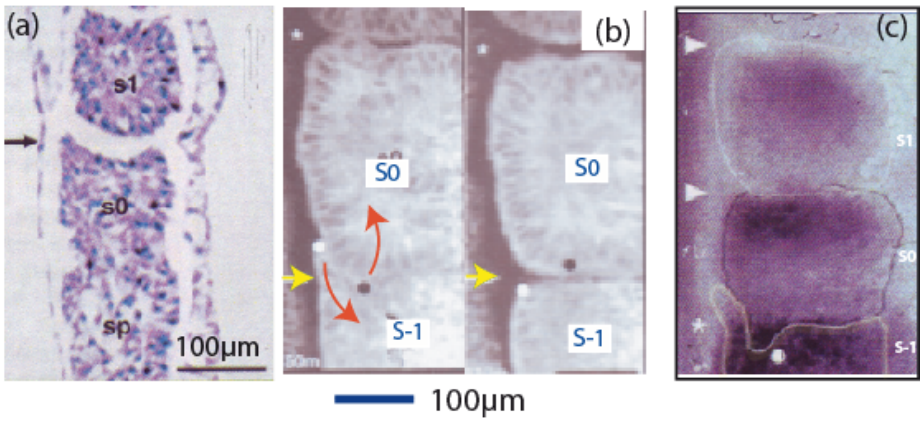

Figure 42.8: Abb 42.7 (a) Histologische Aufnahme des Übergangs zwischen einem ausgebildeten (s_1) und einem entstehenden Somiten (s_0). Man beachte die einige μm breite zellfreie Lücke zwischen s_0 und s_1. (b) Mikrofluoreszenzaufnahme des Übergangs zwischen dem Somiten s_0 und s_1 im zeitlichen Abstand von 63 min. Man beachte, dass zu Beginn das Gewebe des neu entstehenden Somiten eine Manchette um die caudale Seite von s_0 gebildet wurde (deren Spitze mit einem weißen Punkts markiert wurde). Im Verlauf der weiteren Entwicklung laufen diese Zellen nach unten (mit gebogenem Pfeil und schwarzem Punkt markiert), während die Zellen in der Kontaktzone (mit schwarzem Punkt markiert) sich nach oben bewegen und an der Spitze von s_{-1} in den Somiten s_0 übertreten. (c) Verteilung der Transkription des Gens ephA4 in demselben Bereich wie in (b). Das Gen wird auf den rostralen Seiten der Somiten exprimiert. Die Zellen der Manschette (Stern) wandern in den Somiten s_{-1} ein, obwohl sie das Gen ephA4 nicht exprimieren. Umgekehrt wandern die ephA4 exprimierende Zellen in den Somiten s_0 ein. Die Verteilung der Genexpression und der Zellen zwischen den Somiten ist also nicht identisch.

Wie kann man sich erklären, dass die Verteilung der Zellen (im Bereich der Manschette) nicht der des Gens ephA4 folgt. Eine Möglichkeit ist die Beeinflussung des Verhaltens der Zellen durch deren Wechselwirkung mit dem umgebenden Gewebe, wie der Basalmembrane der Aorta. Eine andere Möglichkeit besteht im Einfluss der Zelladhäsion. Das Genprodukt von ephA4

bestimmt die Zelladhäsion über die Wechselwirkung des Rezeptors Eph4A mit dem Liganden Eph A oder Eph B (s. Glossar). Gleichzeitig wird die Zell-Zell-Wechselwirkung aber auch durch die anderen Rezeptoren wie C-Cadherin, Procadherin und Integrin bestimmt, die der Wirkung der Ephrine entgegenwirkt. Schließlich muss man bedenken, dass die Genexpression einzelner Zellen ein statistischer Prozess ist, d.h. benachbarte Zellen können verschiedene Verteilungen von Rezeptoren an der Zelloberfläche besitzen.

42.12 Genetische Oszillatoren

Die rhythmische Expression der an der Segmentierung beteiligten Gene ist absolute Voraussetzung für die Somitogene. Dies zeigt sich u. a. dadurch, dass die Segmentierung entscheidend gestört wird, wenn man eine kontinuierliche Expression von Lunanic Fringe erzwingt (s. [Giudicelli 2004]). Da mehrer Gene und ihre Produkte beteiligt sind, ist es schwierig herauszufinden, ob ein spezifischer Gen-Oszillator als Schrittmacher fungiert. Im Allgemeinen nimmt man an, dass mehrere untereinander vernetzte Gene und ihre Produkte beteiligt sind. Tatsächlich kann man zeigen, dass im einfachsten Fall ein System aus drei Komponenten wie das Gen (wie hes 7) dessen m-RNA und der TF Hes-7 oszillatorisches Verhalten zeigt, wenn das Produkt die Expression hemmt [Giudicelli].

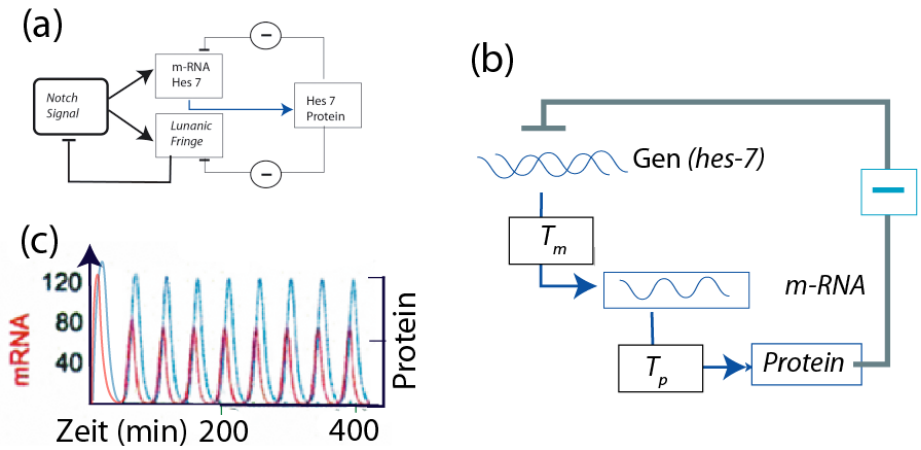

Figure 42.9: Abb:42.8: (a) Modell der Segmentierungsuhr der Somitenbildung . Das oszillierende Gen hes 7 (oder c-hairy) exprimiert das assoziierte Protein Hes 7. Dieses hemmt die Expression seines eigenen Gens hes 7 und von Lfng (welches das Protein Lunatic Fringe kodiert). Man beachte, dass Notch die Synthese von Lunatic fringe auf direktem Wege aktiviert. Aufgrund der Modifikation der extrazellulären Domäne von Notch durch Lunatic fringe wird seine Produktion auf indirektem Weg unterdrückt. Das System aus Notch und Lunanic Fringe bildet die wesentliche Element der Segmentierungs-Maschinerie. Da Hes 7 seine eigne Produktion durch negative Rückkopplung hemmt, kann es schon allein einen autonomen Oszillator bilden, wie die Abbildung (b) zeigt. b)Einfachster Gen-Oszillator aus einem Gen (z.B. hes-7) und seinem Produkt. Das System verhält sich als autonomer Oszillator, falls die m-RNA verzögert im Zytoplasma erscheint und die Biosynthese des Proteins ebenfalls verzögert einsetzt. Das untere Bild zeigt die leicht phasenverschobene Oszillation der m-RNS und des Proteins. Abb. (a) und (c) wurden nach [Lewis (2003)] modifiziert. Referenz: Lewis, J. (2003) Current Biology 13: 1398-1408

Sei R die Zahl der m-RNA Moleküle zur Zeit t und P die Zahl der Proteine, dann ist die zeitliche Änderung der Komponenten:

$$\frac{dP}{dt} = Ar - Bp$$
$$\frac{dr}{dt} = f(p) - Cr$$

$f(p) = \frac{k}{1+\frac{p}{p_0}^2}$

Dabei sind B und C die reziproken Lebensdauern des Proteins P und der RNA R und A ist die konstante Produktionsrate des Proteins. Die wesentliche Annahme ist, dass die Produktion der m-RNA mit der Konzentration des Proteins zunimmt. Das Quadrat des Verhältnisses $\frac{p}{p_0}$ trägt der Tatsache Rechnung, dass viele TF als Dimere wirken. Man kann allgemein zeigen, dass ein solches Gleichungssystem kein oszillatorisches Verhalten zeigt und hat daher komplexere Netzwerke in Betracht gezogen. Das obige Gleichungssystem gilt für den Fall, dass P und R sehr schnell produziert werden (wie in chemischen Reaktionen). Das Verhalten ändert sich, wenn wir Verzögerungszeiten einführen; Beispielsweise indem wir annehmen, dass die durch den FT initiierte Produktion der m-RNS mit einer Zeitverzögerung T_R zur Synthese des Proteins führt und dass auch die durch P initiierte Produktion der m-RNS zeitlich (um T_P) verzögert einsetzt.

$$\frac{dp(t)}{dt} = Ar(t - T_p) - Bp(t)$$
$$\frac{dm(t)}{dt} = fp(t - T_m) - Cm(t)$$

Das Gleichungssystem kann nur numerisch gelöst werden. Am einfachsten ist die Situation, wenn die Lebensdauern beider Komponenten klein sind im Vergleich zur gesamten Verzögerungszeit $T = T_p + T_r$. Abb. 42.8 zeigt das Verhalten eines sehr einfachen Systems mit einem Gen.

42.13 Synopsis

Die Segmentierung des präsomitischen Gewebes (Somitogenese) wird durch zwei Prozesse bestimmt:

- Der erste besteht in der periodischen Expression eines kurzlebigen Transkriptionsfaktors (Hes-7 im Fall der Mäuse, Hairy-7 im Fall der Hühner und Her-1 im Fall der Zebrafische) und des Modulators der Notch-Aktivität, Lunatic Fringe, durch die Zellen am Schwanzende (das als Spemannscher Organisator wirkt). Diese Zellen verhalten sich wie eine Anordnung synchron schwingender autonomer Oszillatoren. Die Periode (bei Mäusen 120 min und bei Hühnern 90 min) ist durch die Lebensdauer des TF bestimmt (23 min bei Hes-7). Die periodische Expression des TF (Hes-7) und des Notch-Modulators Lunatic Fringe (Lfng) breitet sich wie eine Wanderwelle in rostraler Richtung aus. Da dabei auch die Aktivität des Notch-vermittelten Signalweges oszilliert, erwartet man, dass sich die Erregung der Aktivität von Zelle zu Zelle ausbreitet.

- Im Abstand einer Segmentlänge ($\approx 100\mu m$) von dem zuletzt stabilisierten Somiten (s_0) stoppt die Welle und (in diesem zweiten Prozess) setzt eine dramatische Änderung der Genexpression in den Zellen des neu entstehenden Blocks ein. Der nascente Block wird am caudalen Ende durch Zusammenspiel des Notch-Signalsystems und Lunatic Fringe gegen den präsomatischen Verband abgetrennt, wobei der Abfall des Wachstumsfaktors FGF die Umwandlung der Mesenchym- in Epithelzellen ermöglicht.

Der nascente Block wird jedoch schon vor der Abrundung polarisiert, wobei zwei Gruppen von Proteinen ins Spiel kommen.

- Der TF Mesp-2 wird in der anterioren Hälfte der Somiten exprimiert und unterdrückt dort die Aktivität von Notch, wodurch die Oszillation gestoppt wird (s. Morimoto, M et al (2005) Nature 435, 354-359 (19 May 2005) Nature)

- Auf der aperioren Seite wird das Gen des Ephrin-Rezeptors Eph-4 und auf der posterioren

Seite das Gen des konjugierten Liganden Ephrin B exprimiert. (s. [Durbin 1998] und Abb. 42.9).

Die bisherigen Befunde haben die rund 40 Jahre alte Theorie der Segmentierung von Cooke und Zeeman [Cooke 1998] erstaunlich gut bestätigt. Die Oszillation des Notch-Signalwegs legt den Schluss nahe, dass sich die genetische Wanderwelle von Zelle zu Zelle ausbreitet.

Hier sollte man sich nochmals einen fundamentalen Unterschied zwischen der Segmentierung der Insekten und der Wirbeltiere klar machen. Während im ersten Fall die drei Gruppen von Genen (Gap-Gene, die Pair-Segment Gene und Segment-Polaritäts Gene) schon vor der Gastrulation beginnen, eine immer feinere Streifenbildung aufzubauen, wird bei den Wirbeltieren die Segmentierung durch Wiederholung desselben Prozesses, d.h. die rhythmische Zu- und Abnahmen der Expression spezifischer Gene (wie hes-7 oder c-hairy1) gesteuert. Der entscheidende Punkt ist jedoch, dass diese Ausbreitung der Front durch die autonome Oszillation der Genexpression der Zellen des präsomitischen Mesoderms bestimmt ist. Hier besteht eine Analogie zu der Ausbreitung der Nervenerregung in den Axonen. Auf der anderen Seite zeigen die Experimente von Kulesa und Fraser [Fraser 2002], dass die Somitogenese auch mit einer Bewegung von Zellen in der aperioren Richtung verbunden ist. Dies zeigt: Um die Entwicklung der Somiten zu verstehen, müssen wir noch mehr über die Zusammenhänge zwischen der Genexpression und der Reorganisation des Zytoskeletts (und damit der physikalischen Eigenschaften der Zellen) lernen.

42.14 Literatur

[Bessho 2003] Bessho, J., et al. (2003) Genetic expression by the bHLH factor Hes 7 is an essential mechanism for the somite segmentation clock. Genes and Development 17: 1451-1456

[Chen 2006] Chen, X., Gumbiner BM. (2006) Paraxial protocadherin mediates cell sorting and tissue morphogenesis by regulating C-cadherin adhesion activity. J. Cell Biol. 174: 301-313

[Christ 1995] Christ, B., Ordahl, CP. (1995) Early stages of chick somite development. Analytical Embryology 191: 381-396

[Cooke 1976] Cooke, J., Zeeman E. (1976) A clock and wavefront model for control of the number of repeated structures during animal morphogenesisJ. Theor. Biology 58: 455

[Cook 1998] Cooke J. (1998) A gene that resuscitates a theory - somitogenesis and a molecular oscillator Trends in Genetics 14, 85-,(1998)

[Durbin 1998] Durbin, L., et al. (1998) Eph signaling is required for segmentation and differentiation of the somites. Genes and Development 12: 3096-3109

[Dubrulle 2004] Dubrulle, J., Pourqui, O. (2004) fgf8-RNA decay establishes a gradient that couples axial elongation to patterning in the vertebrate embryo. Nature 427: 419-422

[Fraser 2002] Kulesa, P., Fraser, S. (2002) Cell dynamics during somite boundary formation revealed by time lapse analysis. Science 298: 991-995

(Gilbert 1997] Developmental Biology (1997) Sinauer Associates, Sunderland, Ma; USA.

[Giudicelli 2004] Giudicelli, F. und Lewis J. (2004)] Title??? Current Opinion in Genetics and Development 14, 407-414

[Kim 2000] Kim, SH., et al. (2000) The protocadherin PAPC establishes segment boundaries during somitogenesis in xenopus embryos. Current Biology 132: 821-830

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

[Palmeirim 1997] Palmeirim, I., et al. (1997) Avian hairygene expression identifies a molecular clock linked to vertebrate segmentation and somitogenesis. Cell 91: 639-648

[Rhe 2003] Rhe, J. et al (2003) The protocadherin papc is involved in the organization of the epithelium along the segmental border during mouse somitogenesis. Developmental Biology 254: 248-261

[Sato 2002] Sato, Y., et al. (2002) Morphological boundary forms by a novel inductive event mediated by lunatic fringe and notch during somite segmentation. Development 129: 3633-3644

[Saga 2001] Saga, Y., Takeda, H. (2001). The making of the somite molecular events in vertebrate segmentation. Nature Rev. Genetics XXXX 835-845

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

[Zeisberg 2002] Zeisberg, SF. (2002) Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation. Kidney International. 61:1714-28