Vorbereitung - Segmentierung

Einleitung

In dieser Lektion werden wir uns mit der Ausbildung der Segmente bei *Drosophila* und Wirbeltieren beschäftigen. Sie werden sehen, dass bei *Drosophila* die Segmente gleichzeitig durch eine Reihe von Segmentierungsgenen gebildet werden, während die sogenannten Somiten bei Wirbeltieren nacheinander entstehen.

Durch die Expression von Segmentierungsgenen wird der Embryo in Segmente unterteilt

Aus der Lektion "Achsenbildung" wissen Sie bereits, dass in *Drosophila* die anterior-posteriore Achse im Embryo durch die maternalen Proteine Bicoid und Nanos festgelegt wird. Dort haben Sie auch gelernt, dass durch den Bicoid-Gradienten die ersten zygotischen Gene aktiviert werden, die Segmentierungsgene, deren Genprodukte den Embryo entlang der Achse in kleinere Abschnitte unterteilen. Beachten Sie, dass Bicoid und Nanos maternale Proteine sind, die Genprodukte der Segmentierungsgene aber durch den Embryo selbst produziert werden.

Die drei Klassen der Segmentierungsgene sind die Lücken-Gene, Paarregel-Gene und Segmentspolaritäts-Gene. Lücken-Gene sorgen für eine grobe Untergliederung des Embryos, Paarregel-Gene bestimmen die weitere Unterteilung des Embryos in Segmente und Segmentpolaritäts-Gene geben den einzelnen Segmenten eine Polarität, also eine Ausrichtung. Parallel zu den Segmentpolaritäts-Genen sind die homöotischen Auswahlgene aktiv, um die Unterschiede zwischen den einzelnen Segmenten festzulegen.

Die meisten der Segmentierungsgene (genau wie die Ei-Polaritäts-Gene auch) codieren für Proteine, die die Transkription regulieren. Man hat herausgefunden, dass ihre Expression einer Hierarchie folgt, bei der die Ei-Polaritäts-Gene (*bicoid, nanos*, etc.) zuoberst stehen (Abb. 21-20).

Die Produkte der Ei-Polaritäts-Gene bilden einen Proteingradienten im Ei der dafür sorgt, dass an unterschiedlichen Stellen im Embryo unterschiedliche Gene aktiviert werden. Somit stellt Bicoid an bestimmten Stellen des Embryos Signale bereit. Man nennt diese Signale auch Positionssignale. Je nachdem, wie hoch die Bicoid-Konzentration an einer Stelle im Embryo ist, werden bestimmte Lücken-Gene exprimiert. Manche Lücken-Gene werden in Regionen exprimiert, in denen die Bicoid-Konzentration hoch ist, andere in Regionen niedriger Bicoid-Konzentration.

Die Produkte der Lücken-Gene liefern ihrerseits eine zweite Ebene solcher Positionssignale. Diese sind aber örtlicher begrenzter als diejenigen der Ei-Polaritäts-Gene und können dadurch feinere Details der Musterbildung bewirken. Sehen Sie sich die Expression der Gene in Abb. 21-20 an. *Hunchback*-RNA (lila) ist spezifisch in scharf abgegrenzten Regionen des Embryos vorhanden. Die Expression der Lücken-Gene löst die Expression der Paarregel-Gene aus. Die Zusammenarbeit der Produkte dieser beiden Genklassen erzeugt dann ein periodisches Expressionsmuster der Segmentpolaritäts-Gene.

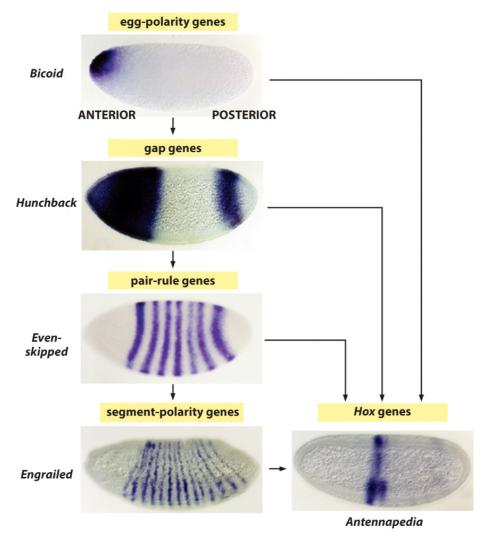


Figure 21-20 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Abbildung 21-20 Die regulatorische Hierarchie der Ei-Polaritäts-, Segmentierungs- und Hox-Gene.

Die Segmentierungsgene werden in drei Klassen (Gap, pair-rule und segment-polarity genes) eingeteilt. Die Photos zeigen die Expressionsmuster repräsentativer Beispiele von Genen jeder Kategorie. Die Hox-Gene, die später in dieser Vorlesung besprochen werden, legen die bleibenden Unterschiede zwischen einem Segment und dem nächsten fest.

Diese Art der Musterbildung ist insektenspezifisch, die aufgrund des Syncytiums in Insekten möglich ist. Aus der Lektion "Achsenbildung" wissen Sie, dass sich das *Drosophila-*Ei in den ersten Stunden der Embryonalentwicklung in eine mehrkernige Zelle verwandelt, deren Zellkerne nicht durch Membranen voneinander abgegrenzt sind. Dies erlaubt, dass Morphogene (z.B. Bicoid) frei zu allen Zellkernen im Embryo diffundieren können, ohne Zellmembranen überwinden zu müssen.

Die ersten Schritte der Musterbildung passieren in *Drosophila* also bereits vor der Zellularisierung. Die Segmentpolaritäts-Gene können dann nach der Zellularisierung den Embryo in noch kleinere Einheiten unterteilen. Viele der Segmentpolaritäts-Gene codieren für Komponenten von Signaltransduktionswegen, die meisten davon gehören zum Wnt- oder zum Hedgehog-Signalweg, die Sie bereits in den Vorlesungen von Prof. Werner kennengelernt haben.

Warum hat sich diese Strategie der hierarchischen Steuerung in der Entwicklung bewährt? Die globalen Positionsinformationen der Ei-Polaritäts-Gene reichen wohl kaum aus, um präzise, feine Details in der Körperstruktur zu steuern. Darum wird auf mehreren Ebenen, die immer stärker lokal sind, die Musterbildung gesteuert. Das macht die sequenzielle Induktion zu einer robusten Strategie.

Die Produkte der Segmentpolaritäts-Gene codieren für Komponenten von Signalwegen

Wenn die Segmentpolaritäts-Gene am unteren Ende der Hierarchie exprimiert werden, ist die Entwicklung von *Drosophila* bereits fortgeschritten. Durch die Zellularisierung hat sich das Blastoderm nun in getrennte Zellen aufgeteilt, die Zelle ist kein Syncytium mehr. Das hat Auswirkungen darauf, wie die Produkte der jetzt exprimierten Segmentpolaritäts-Gene im Embryo wirken: Die Kommunikation muss nun über Zell-Zell-Signale stattfinden. Nach der Zellularisierung sind also die entscheidenden Komponenten Signalproteine, die in benachbarten Zellen Signale an- oder ausschalten können. Dabei sind vor allem der Wnt- und der Hedgehog-Signalweg von Bedeutung. Sie kennen diese beiden Signaltransduktionswege bereits aus den Vorlesungen von Prof. Werner. Viele Segmentpolaritäts-Gene codieren für Komponenten dieser beiden Signalwege.

Die Expression der Wnt- und Hedgehog-Signalproteine dient nun wiederum der Regulierung der Expression bestimmter Gene in ganz bestimmten Zellen des Embryos: *Wingless* (eine Komponente des Wnt-Signalwegs) und *Hedgehog* werden in benachbarten Streifen von Zellen exprimiert und induzieren gemeinsam die Expression des Proteins Engrailed (Abb. 21-21).

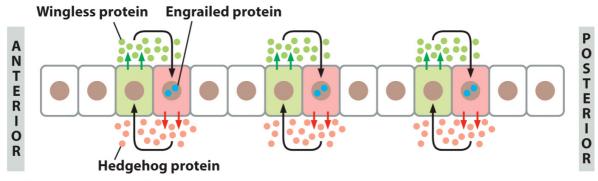


Figure 21-21 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

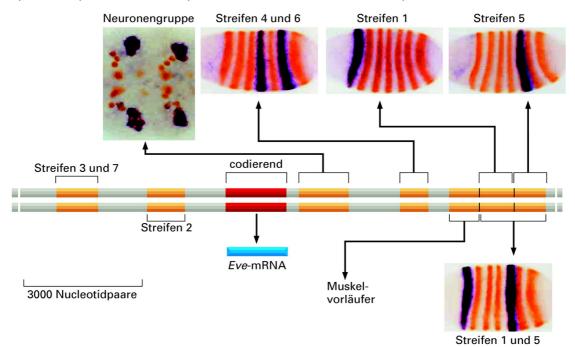
Abbildung 21-21 Gegenseitige Aufrechterhaltung der Expression von Hedgehog und Wingless durch sequentielle Induktion. Engrailed ist ein Transkriptionsregulator (blau), der die Expression von Hedgehog antreibt. Hedgehog codiert für ein sekretiertes Protein (rot), das seinen eigenen Signalweg in den Nachbarzellen aktiviert und diese dazu bringt, das Gen Wingless zu exprimieren. Wingless wiederum codiert für ein sekretiertes Protein (grün), das auf die Nachbarzellen wirkt und dort die Expression von Engrailed und Hedgehog aufrechterhält. Diese Art der Kontrollschleife wiederholt sich entlang der A-P-Achse.

Zusammenfassend können wir folgendes festhalten: Im Verlauf der ersten Stunden nach der Befruchtung werden die Lücken- und Paarregel-Gene aktiviert, deren Expression ein scharf abgegrenztes System von Streifen entstehen lässt. Dieses regelmässige Muster ist aber instabil und nur vorübergehend vorhanden, denn wenn der Embryo nach der Zellularisierung durch die Gastrulation geht, finden zahlreiche Zellwanderungen statt, so dass das regelmässige Muster zerfällt. Um dauerhaft zu speichern, wo die Segmentgrenzen sind, wird die Positionsinformation der Ei-Polaritäts-, Lücken- und Paarregel-Gene durch die dauerhafte Aktivierung bestimmter Segmentpolaritäts-Gene und homöotischer Auswahl-Gene (*Hox-*

Gene) gespeichert. Ein Beispiel für ein solches Segmentpolaritäts-Gen haben wir gerade kennengelernt: Engrailed. Die *Engrailed*-mRNA wird in einer Serie aus 14 Banden im zellulären Blastoderm von *Drosophila* exprimiert. Jede Bande ist etwa eine Zelle breit. Die Ei-Polaritäts-, Lücken- und Paarregel-Gene produzieren also ein vorübergehendes Muster, an das sich andere Gene (Segmentpolaritätsgene und Hox-Gene) erinnern. Die Funktion der Hox-Gene werden Sie in der nächsten Vorlesung "Segmentidentität" kennenlernen.

Regulatorische Module in den Segmentierungsgenen erlauben komplexe Genexpressionsmuster

Wir wollen uns nun auf molekularer Ebene damit beschäftigen, wie die beschriebene Ausbildung der feinen Muster durch die Segmentierungsgene möglich ist. Der Musterbildungsprozess ist abhängig von Abschnitten nicht-codierender DNA, die die Expression eines Gens kontrollieren. Besonders wichtig sind hier die Cis-regulatorischen Elemente (CRE) zu. CREs binden unterschiedliche regulatorische Proteine (Transkriptionsfaktoren), in unserem Fall sind dies die Produkte der vorher exprimierten Musterungsgene. Ein Gen wird an- oder abgeschaltet je nachdem, welche Proteine an die regulatorischen Regionen gebunden sind. Betrachten wir das Paarregel-Gen Even-skipped (Eve) als Beispiel, wie diese Inputs entscheiden, ob das Gen exprimiert wird oder nicht.



© 2011 Wiley-VCH, Weinheim Alberts - Molekularbiologie der Zelle ISBN: 978-3-527-32384-5 Abb. 22-039

Abbildung 22–39 Modulare Organisation der regulatorischen DNA des *Eve*-Gens.

Im hier gezeigten Experiment wurden Fragmente regulatorischer DNA mit dem Reporter-Gen LacZ verknüpft, sodass das LacZ-Gen unter der Kontrolle der regulatorischen DNA-Abschnitte steht. Transgene Embryonen, die solche Konstrukte enthalten, wurden angefärbt, um das Muster der LacZ-Expression (blau) nachzuweisen. Die orangefarbigen Streifen zeigen die Bereiche der normalen Eve-Expression. Verschiedene Abschnitte der regulatorischen Bereiche des Eve-Gens (ocker) konnten gefunden werden, die die Eve-Expression in unterschiedlichen Regionen anschalteten. Werden zwei Regulationsbereiche der DNA direkt hintereinander vor das Reporter-Gen plaziert, so ensteht ein Expressionsmuster, das der Summe der Einzelaktivitäten der Regulatorsequenzen entspricht (z. B. die Streifen 1 und 5, Photo unten rechts). Getrennte und voneinander unabhängige Regulatormodule sind für die Expression des Gens zu verschiedenen Zeitpunkten und an verschiedenen Orten verantwortlich. Das Bild ganz links zeigt die Wirkung eines DNA-Elements, dessen Wirkung erst nach den anderen gezeigten Stadien einsetzt und das die Expression von Eve in einer Neuronengruppe kontrolliert

Auf der vorherigen Seite haben Sie gesehen, dass die Segmentierungsgene sequenziell induziert werden, das heisst, die Expression eines Gens wird durch die Produkte eines früher

exprimierten Gens aktiviert. In der Abbildung 22-39 sehen Sie, dass in der regulatorischen Region des *Eve*-Gens unterschiedliche CREs vorhanden sind. Jeder dieser CREs ist für die Expression von *Eve* in einer bestimmten Region im Embryo zuständig, einer beispielsweise für Streifen 4 und 6, eine andere für Streifen 1, usw.

An jeden dieser CREs binden unterschiedliche Kombinationen von Transkriptionsfaktoren und steuern so die Expression des Gens *Eve*. Die Transkriptionsfaktoren sind die Produkte der Ei-Polaritäts- und Lücken-Gene. Ein konkretes Beispiel hierfür ist in Abb. 7-30 dargestellt, wo gezeigt wird, wie die verschiedenen Konzentrationen der Proteine Bicoid, Giant, Hunchback und Krüppel im 2. Streifen die Expression des *Eve*-Gens beeinflussen. Sie werden diese Regulation nochmals genauer in der Vorlesung besprechen wo Sie auch lernen, wie ein solcher CRE molekular aussehen kann.

Diese modulare Art der DNA-Organisation erlaubt es, fast jedes gewünschte Genexpressionsmuster festzulegen, da unterschiedliche Kombinationen an Transkriptionsfaktoren an unterschiedliche CREs binden können.

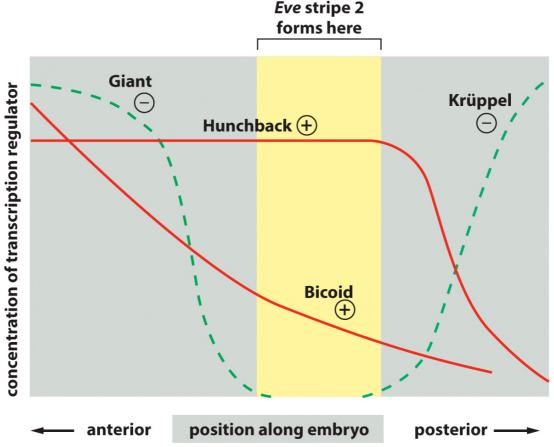


Figure 7-30 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Abbildung 7-30 Verteilung der Transkriptionsregulatoren, die für die Expression von *Eve* im Streifen 2 verantwortlich sind.

Die Verteilung der Proteine wurde durch Anfärbung des Embryos mit Antikörpern gegen die vier Proteine sichtbar gemacht. Die Expression von Eve im 2. Streifen geschieht nur dort, wo die beiden Aktivatoren (Bicoid und Hunchback) vorhanden sind und die beiden Repressoren (Giant und Krüppel) fehlen. In Fliegenembryonen, denen Krüppel fehlt, wird sich der 2. Streifen in die posteriore Richtung ausdehnen. Ebenso wird der 2. Streifen sich posterior erweitern, wenn die DNA-Bindungsstellen für Krüppel im regulatorischen Element (CRE) für den 2. Streifen durch eine Mutation inaktiviert wurden.

Segmentierung bei Wirbeltieren

Einer der kennzeichnendsten Vorgänge, die in der Entwicklung eines Wirbeltiers vonstattengehen, ist die Bildung der Segmente - sich wiederholende Einheiten aus Wirbeln, Rippen und Muskelsegmenten - entlang der Körperachse. Diese Einheiten werden aus dem Mesoderm gebildet. Wir werden uns nun einen kurzen Überblick darüber verschaffen, wie diese Segmente gebildet werden.

Die Segmentierung des Mesoderms führt zur Bildung der Somiten

Die segmentierten Strukturen, die für Wirbeltiere charakteristisch sind, stammen von den zwei, auf beiden Seiten des Neuralrohrs liegenden, Mesodermblöcken ab (Abb. 21-3). Diese Zellblöcke aus mesodermalen Zellen gliedern sich nach und nach, von Kopf zum Schwanz, in abgegrenzte Einheiten, den Somiten, ab.

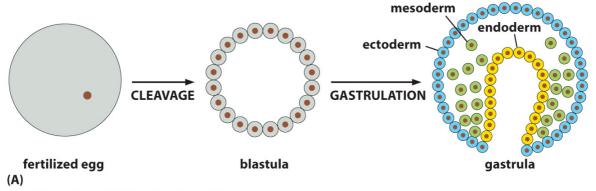


Figure 21-3 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

Abbildung 21-3 Die frühen Stadien der Embryonalentwicklung am Beispiel Frosch.

(A) Ein befruchtetes Ei teilt sich und bildet die Blastula – eine Hohlkugel aus Epithelzellen. Im anschliessenden Prozess der Gastrulation senken sich einige der Zellen in den Hohlraum ein, um dort das Mesoderm (grün) und das Endoderm (gelb) zu bilden. Ectodermale Zellen (blau) bleiben an der Aussenseite.

Die Zellblöcke der Somiten bestehen aus epithelialen Zellen, die ein Stück Mesoderm umhüllen. Die Blöcke sind durch Spalten voneinander getrennt (Abb. 21-38). Die meisten Zellen der Somiten bilden sich zu Muskeln aus. Andere Untergruppen von Somitenzellen entwickeln sich zu Wirbeln oder zur Unterhaut. Eine andere Zellgruppe löst sich vom Somitenkörper ab und die Zellen bewegen sich durch den Körper, um die Skelettmuskulatur zu bilden.

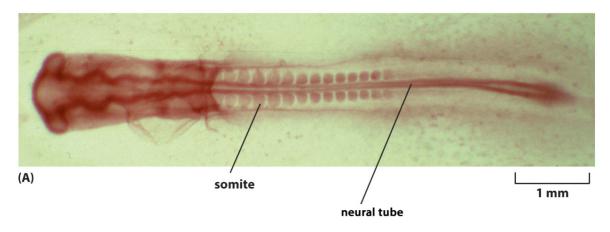


Abbildung 21-38 Somiten im Hühnerembryo nach 40 Stunden Brutzeit. (adaptiert von Molecular Biology of the Cell, Alberts et al., 6th edition)

Die Somiten werden einer nach dem anderen, vom Kopf in Richtung Schwanz, gebildet. Der am weitesten posterior (d.h. in Richtung Schwanz) liegende Mesodermblock wird Präsomitenmesoderm genannt. Durch die Proliferation der hier liegenden Zellen bewegt sich das Mesoderm in Richtung des zukünftigen Schwanzendes und die Somiten werden am anterioren (Kopfende) einer nach dem anderen in Richtung Schwanzende gebildet.