

# Vorbereitung «Segmentierung»

## Segmentierung entlang anterior-posterioren Achse

- Bicoid-Gradient führt zur Aktivierung zygotischer Gene (Segmentierungsgene), deren Genprodukte den Embryo entlang der Achse in kleinere Abschnitte unterteilen
- Bicoid und Nanos sind maternale Proteine, Genprodukte der Segmentierungsgene werden aber durch Embryo selbst produziert
- Drei Klassen der Segmentierungsgene: Lücken-Gene, Paarregel-Gene und Segmentpolaritäts-Gene
- Durch Bicoid-Gradient im Ei (Produkt der Ei-Polaritäts-Gene) wird dafür gesorgt, dass an unterschiedlichen Stellen im Embryo unterschiedliche Gene aktiviert werden. → Somit stellt Bicoid an bestimmten Stellen des Embryos Signale bereit: Positionssignale → Je nach Bicoidkonzentration werden bestimmte Lücken-Gene exprimiert
  - ⇒ Produkte der Lücken-Gene liefern zweite Ebene von Positionssignalen (sind örtlich begrenzter: können deshalb feinere Details der Musterbildung bewirken)
  - ⇒ Hunchback-RNA 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 periodisches Expressionsmuster der Segmentpolaritäts-Gene

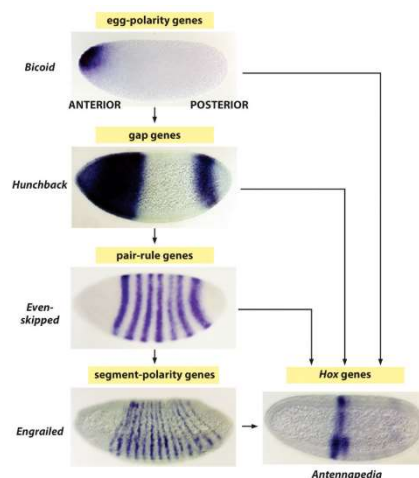


Figure 21-20 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

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

1: Insektenspezifische Musterbildung →  
sequentielle Induktion der Segmentierung

- Syncytium ist zentral für das Funktionieren dieser Genexpressionskaskade
  - ⇒ Dies erlaubt, dass Morphogene (z.B. Bicoid) frei zu allen Zellkernen im Embryo diffundieren können, ohne Zellmembranen überwinden zu müssen
  - ⇒ Erste Schritte der Musterbildung passieren in Drosophila somit bereits vor Zellularisierung
  - ⇒ Segmentpolaritäts-Gene können dann nach Zellularisierung den Embryo in noch kleinere Einheiten unterteilen
  - ⇒ Viele der Segmentpolaritäts-Gene codieren für Komponenten von Signaltransduktionswegen (Vor allem Wnt- oder Hedgehog- Signalweg)
- Warum hat sich diese Strategie der hierarchischen Steuerung in der Entwicklung bewährt?

- ⇒ Weil globale Positionsinformationen der Ei-Polaritätsgene nicht ausreichen um präzise Details in Körperstruktur zu steuern.
- ⇒ Deshalb wird auf mehreren Ebenen, die immer stärker lokal sind, die Musterbildung gesteuert.
  - Das macht die sequenzielle Induktion zu robusten Strategie
- Segmentpolaritäts-Gene werden nach Zellularisierung (Blastoderm hat sich in getrennte Zellen aufgeteilt, ist kein Syncytium mehr)
  - ⇒ Kommunikation muss nun über Zell-Zell-Signale stattfinden:
    - Nach Zellularisierung sind entscheidenden Komponenten Signalproteine, die in benachbarten Zellen Signale an- oder ausschalten können
      - Vor allem Wnt- und Hedgehog-Signalweg von Bedeutung (grosse Untergruppe der Segmentpolaritäts-Gene codiert für Komponente dieser beiden Signalwege)
    - Dient der Regulierung bestimmter Gene in bestimmten Zellen: Wingless (Komponente des Wnt-Signalwegs) und Hedgehog werden in benachbarten Streifen von Zellen exprimiert und induzieren gemeinsam Expression des Proteins Engrailed
      - Durch diese sequenzielle Induktion wird ein feinkörniges Expressionsmuster in jedem Segment erreicht.

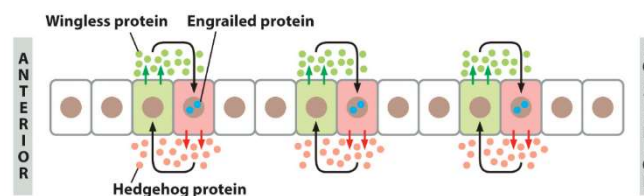


Figure 21-21 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

**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.

- Im Verlauf der ersten Stunden nach der Befruchtung Lücken- und Paarregel-Gene aktiviert, deren Expression ein scharf abgegrenztes System von Streifen entstehen lässt
  - ⇒ Regelmässiges Muster ist instabil und nur vorübergehend vorhanden
  - ⇒ Sobald Embryo nach Zellularisierung durch Gastrulation geht, sorgen Zellwanderung für Zerfallen des regelmässigen Musters.
  - ⇒ Positionsinformation der Ei-Polaritäts-, Lücken- und Paarregel-Gene werden in Form einer dauerhaften Aktivierung bestimmter Segmentpolaritäts-Gene und homöotischer Auswahl-Gene (Hox-Gene) gespeichert
    - Engrailed-mRNA wird in einer Serie aus 14 Banden im zellulären Blastoderm von Drosophila exprimiert. Jede Bande ist etwa eine Zelle breit. Diese Streifen liegen genau anterior zu ähnlichen Streifen, die das Gen Wingless exprimieren

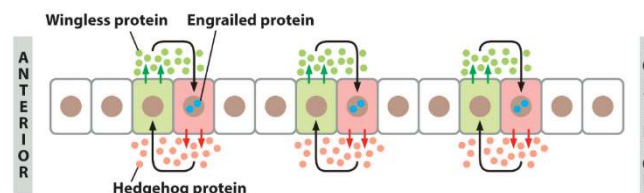


Figure 21-21 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

**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.

- Diese Streifen, in denen die beiden Proteine exprimiert werden, werden immer aufrechterhalten (durch gegenseitig verstärkendes Signal zwischen den Wingless-

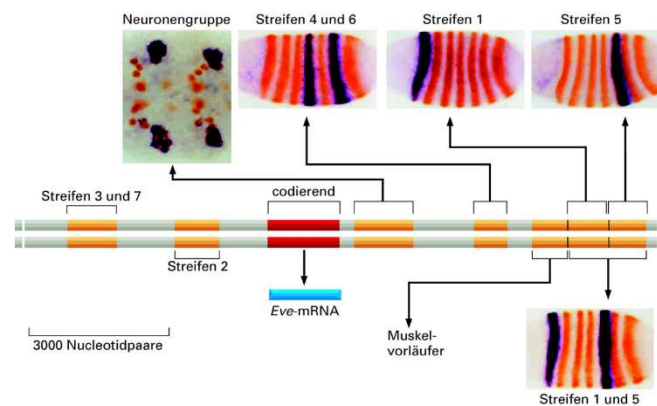
und Engrailed-exprimierenden Zellen), auch wenn Zellen wachsen, sich teilen und wandern

- Nach 3 Zellzyklen werden neu synthetisierte Regulatoren das Engrailed-Expressionsmuster festigen, das lebenslang in der Fliege anhält, noch lange nachdem die Signale, die es ausgelöst haben, verschwunden sind.
- Die Segmentgrenzen werden dann am posterioren Ende jedes Engrailed-Streifens gebildet.

- Regulatorische Module in den Segmentierungsgenen erlauben komplexe Genexpressionsmuster

⇒ Musterbildungsprozess ist abhängig von Abschnitten nicht-codierender DNA, die Expression eines Gens kontrollieren: Cis-regulatorische Elemente (CRE)

- Binden unterschiedliche regulatorische Proteine (Transkriptionsfaktoren) (= Produkte der vorher exprimierten Mustergene) → Gen wird an-/ausgeschaltet je nachdem, welche Proteine an regulatorische Regionen gebunden sind.
- Bsp: Paarregel-Gen Even-Skipped (Eve):



© 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.

In regulatorischen Regionen des Eve-Gens sind unterschiedliche Kontrollregionen (CRE) vorhanden. Jede dieser Regionen ist für bestimmte Region im Embryo zuständig (eine z.B. für Streifen 1, ...)

Jedes regulatorische Modul bindet bestimmte Kombination an Transkriptionsfaktoren. Diese sind Produkte der Ei-Polaritäts- und Lücken-Gene

Verschiedene Konzentrationen der Proteine Bicoid, Giant, Hunchback und Krüppel im 2. Streifen beeinflussen die Expression des Eve-Gens :

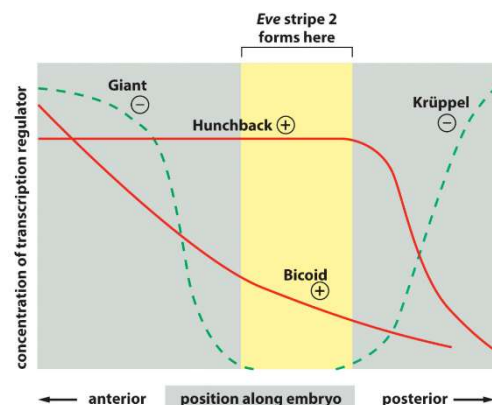
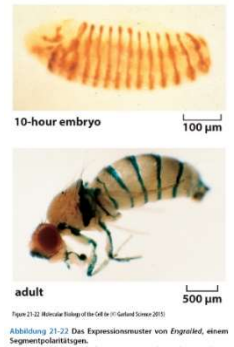


Figure 7-30 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

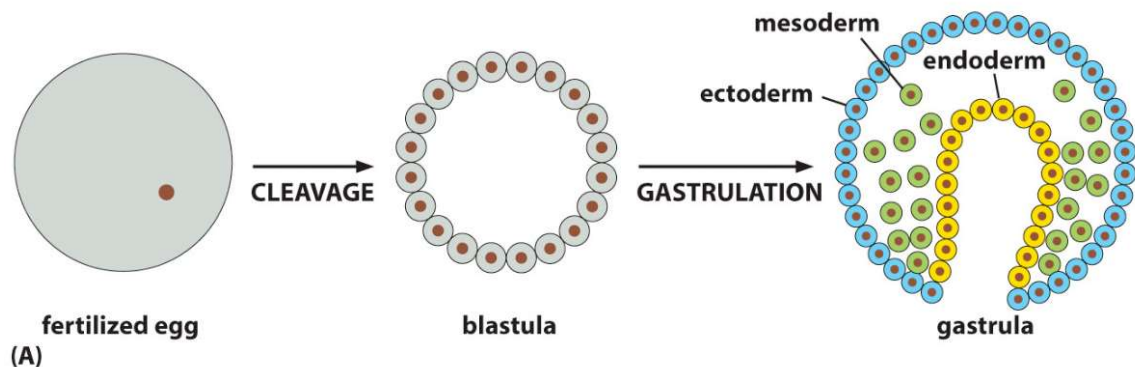
Abbildung 7-30 Verteilung der Transkriptionsregulatoren, die für die Expression von Eve im Streifen 2 verantwortlich sind.



- Diese modulare Art der DNA-Organisation bei vielzelligen Organismen erlaubt es, fast jedes gewünschte Genexpressionsmuster festzulegen, wobei die einzelnen Komponenten **voneinander unabhängig** anpassbar sind.

## Bildung von Wirbeln, Rippen und Muskelsegmenten aus Mesoderm

- Diese segmentierten Strukturen stammen von den 2, auf beiden Seiten des Neuralrohrs liegenden, Mesodermblöcken ab. Dieser Gewebeblock unterteilt sich nach und nach, vom Kopf zum Schwanz, in abgegrenzte Einheiten, die sogenannten Somiten



### • Somiten

- ⇒ sind Blöcke epithelialer Zellen, die ein Stück Mesoderm umhüllen.
  - Blöcke sind durch Spalten voneinander getrennt.
- ⇒ Die meisten bilden sich zu Muskeln aus, andere zu Wirbeln oder Unterhaut. Andere Untergruppe löst sich vom Somitenkörper ab, Zellen bewegen sich durch Körper und bilden Skelettmuskulatur

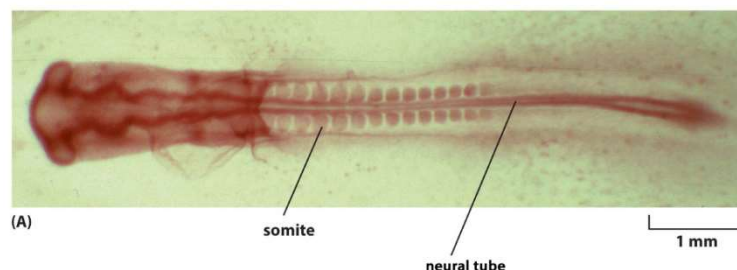
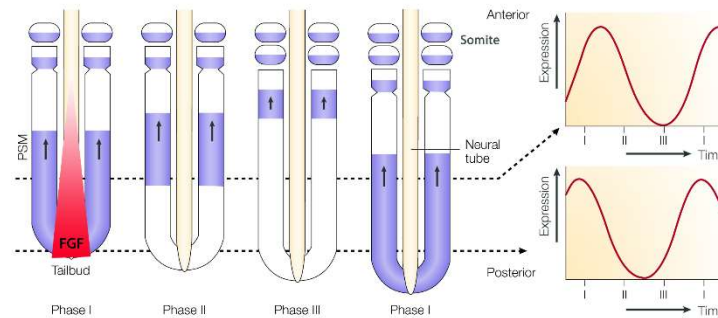


Abbildung 21-38 Somiten im Hühnerembryo nach 40 Stunden Brutzeit. (adaptiert von Molecular Biology of

- ⇒ Präsomitenmesoderm: am weitesten posterior liegender Mesodermblock
  - Durch Proliferation der hier liegenden Zellen bewegt sich Mesoderm in Richtung des zukünftigen Schwanzendes und die Somiten werden am anterioren (Kopfende) einer nach dem anderen in Richtung Schwanzende gebildet
  - Somiten entstehen dabei rythmisch (wie durch Uhr gesteuert): Rhythmus wird durch Oszillation (Schwingung) der Expression von bestimmten Genen im posterioren Teil des Prämesoderms bestimmt. Pro Oszillationszyklus wird ein neuer Somit gebildet
  - Oszillation der Genexpression = «Segmentation clock»: Pulsierendes Signal, das in periodische Anordnung von Segmenten übersetzt wird
- ⇒ Wie geschieht diese Übersetzung?
  - Im Prämesoderm wird mRNA des Wachstumsfaktors FGF8 synthetisiert und langsam translatiert
  - Wenn sich die Zellen während Bildung eines neuen Somiten von dieser Region wegbewegen, entsteht FGF8-Protein-Gradient. Höchste FGF8-Konzentration am Schwanzende.

- Prämesoderm bewegt sich weiter Richtung Schwanzende → Zellen verlieren Kontakt zum FGF8-Signal, wenn sie sich Kopfende nähern → Oszillierende Genexpression wird angehalten
- Zellen, die Kontakt zum Signal verlieren, befinden sich in unterschiedlichen Punkten des Oszillationszyklus (z.B. an Spitze des Zyklus → hohe Expression der Clock-Gene) → Zellen unterscheiden sich dadurch
- Dadurch wird in frühen Zellen wiederum die Expression anderer regulatorischer Gene aktiviert als in den späteren Zellen. → Gewebe wird so in unterschiedliche Blöcke zerteilt, die sich physisch voneinander unterscheiden und die einzelnen Somiten bilden



**Abbildung 1 Die "Segmentation clock" kontrolliert die Somitenbildung in Wirbeltieren.**  
Die Expression bestimmter Gene oszilliert in einzelnen Zellen, was Genexpressions-Wellen (hier violett eingezeichnet) im Präsomitenmesoderm (PSM) zur Folge hat. Wenn die Zellen heranreifen und aus der präsomitischen Region heraustreten, verlieren sie den Kontakt zum FGF8-Signal (rot) und die oszillierende Genexpression wird angehalten. Jede Genexpressions-Welle führt zur Bildung eines Somiten. Der rechte Teil zeigt, an welchem Punkt des Oszillationszyklus sich die Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Somitenbildung befinden. Die Länge des Oszillationszyklus ist für jede Spezies unterschiedlich (z.B. 90 Minuten beim Huhn, 120 Minuten bei der Maus). Jede Spezies legt unterschiedlich viele Somiten an. (adaptiert von Peel et al., *Nature*, 2005)

- ⇒ Somitenbildung wird also durch zwei Prozesse gesteuert: Einerseits durch den FGF8-Konzentrationsgradienten, der angibt, wann die Zellen angehalten werden. Andererseits bestimmt die Expression der Gene der "Segmentation clock", welche Gene in den angehaltenen Zellen aktiviert werden und bestimmt somit die Musterbildung der Somiten.
- ⇒ Wie funktioniert die Segmentationsuhr?
  - 3 Genklassen (in Maus), die oszillierende Expression im Präsomitenmesoderm zeigen: codieren für Komponente des Notch-, Wnt-, FGF-Signalwegs
  - Einige dieser Proteine wirken direkt auf regulatorische DNA ihres eigenen Gens → hemmen so ihre eigene Expression
  - Theorie: einfache negative Rückkopplungsschleife ist Grundlage für Oszillation

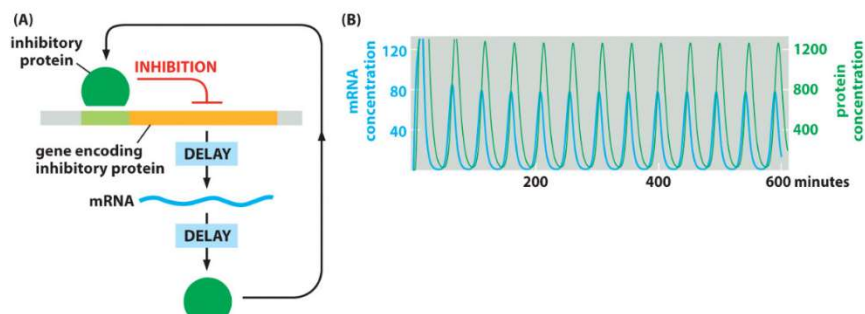


Figure 21-39 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

**Abbildung 21-39 Verzögerte negative Rückkopplung verursacht oszillierende Genexpression.**

(A) Ein einzelnes Gen, das für ein genregulatorisches Protein codiert, das seine eigene Expression hemmt, kann sich wie ein Oszillator verhalten. Damit es zur Oszillation kommt, muss es eine Verzögerung (oder mehrere Verzögerungen) im Rückkopplungskreislauf geben und die Lebenszeit der mRNA und des Proteins muss im Vergleich zur gesamten Verzögerung kurz sein. Die Verzögerung bestimmt den Zeitraum der Oszillation. Entsprechend einer Theorie ist ein solcher Rückkopplungskreislauf, der auf den Genen *Her1* und *Her7* im Zebrafisch oder dem Gen *Hes7* in der Maus basiert, der Schrittmacher der Segmentationsuhr, die die Somitenbildung steuert. (B) Die vorhergesagte Oszillation von *Her1* und *Her7*-mRNA und Protein, die unter Verwendung grober Schätzwerte berechnet wurde, passt zu diesem Gen im Zebrafisch. Die Konzentrationen wurden als Anzahl der Moleküle pro Zelle gemessen. Der vorhergesagte Zeitraum liegt nahe am beobachteten Zeitraum, der beim Zebrafisch bei 30 Minuten pro Somit liegt.

- Hes-Gen:
  - Teil der Segmentationsuhr
  - vom Notch-Delta-Signalweg reguliert

- Mit Transkription eines Hes-Gens steigt Menge seines Proteinprodukts so lange an, bis dies über negative Rückkopplung zu einer Hemmung der Transkription führt und die Proteinsynthese stoppt
- Protein wird degradiert und sobald Konzentration unter Schwellenwert fällt, beginnt Transkription von neuem
- An diesem Punkt tritt zeitliche Verzögerung auf, da zuerst Transkription und Translation erfolgen müssen, bis neue Proteine die zerfallenen Proteine ersetzt haben. → Diese Verzögerung in der Rückkopplungsschleife ist vermutlich die Hauptdeterminante für Zeitspanne der Oszillation der Uhr und somit für Grösse eines Somiten
- **Was wäre der Effekt auf das Timing der Somitenbildung, falls ein Stück des präsomitischen Mesoderms eines Hühnerembryos um 180° gedreht und an der Originalposition wieder eingesetzt würde?**

*Antwort :* Das Timing der Somitenbildung wird nur im rotierten Block umgekehrt und schreitet von posterior nach anterior voran. Der Rest der Somiten bildet sich normal von anterior nach posterior