

wer hat an der uhr gedreht?

Regulationsmechanismen der Segmentierung im Wirbeltierembryo

von Hendrik B. Tiedemann, Elida Schneltzer, Stefan Zeiser, Bastian Hoesel, Johannes Beckers, Gerhard K. H. Przemeck und Martin Hrabě de Angelis

Die Somitogenese ist ein Prozess in der Embryonalentwicklung aller Vertebraten, bei der die Grundlage für die Segmentierung des Wirbeltierkörpers gelegt wird. Vom mesenchymalen Gewebe seitlich des Neuralrohrs spalten sich am Vorderende kleine Zellballen (Somiten) ab, aus denen später die Wirbel hervorgehen. Dies geschieht mit einer speziesspezifischen Periodizität. Die molekularen Grundlagen dieser Somitogenese-Uhr sind noch immer nicht restlos aufgeklärt. Um diese Mechanismen besser verstehen zu können, haben wir ein Computermodell entwickelt, das es erlaubt, diese Vorgänge durch Differentialgleichungen zu beschreiben, für viele Zellen eines Gewebes zu berechnen und Genexpressionen anschaulich darzustellen.

Segmentierung des präsomitischen Mesoderms

Das gemeinsame Merkmal aller Wirbeltiere ist die Segmentierung ihrer Körperlängsachse. Die namensgebenden Knochen der Wirbelsäule sind dabei nur ein strukturbildendes Element – Nerven und Rumpfmuskulatur spiegeln die Periodizität entlang der Längsachse ebenso wider. Die Segmentierung wird früh in der Embryonalentwicklung angelegt – allerdings nicht auf einmal. Vielmehr wächst der sich entwickelnde Embryo quasi vom Kopf- zum Schwanzende. Dabei bildet sich ein mesenchymales Gewebe, in dem Zellen relativ locker gepackt und beweglich sind, zu beiden Seiten des Neuralrohrs, dem zukünftigen Rückenmark. Dieses präsomitische Mesoderm (PSM) wächst an seinem hinteren Ende und schnürt gleichzeitig am vorderen Ende regelmäßig wie ein Uhrwerk kleine Zellballen (Somiten) zu beiden Seiten des Neuralrohrs ab (Abb. 1). Das PSM wächst dabei in dem Maß am Hinterende nach, wie am Vorderende Somiten abgetrennt werden. Das Gleichgewicht zwischen Wachstum und Somitenbildung endet erst, wenn eine speziesspezifische Anzahl an Somiten erreicht wurde.

Uhr- und Wellenfront-Modell der Somitogenese

Dieser uhrwerkgleiche Mechanismus hat Biologen schon früh fasziniert. 1976 wurde zu seiner Erklärung das Uhr- und Wellenfront-Modell entworfen (Cooke & Zeeman, 1976). Es postuliert, dass ein molekularer Oszillator jede Zelle des PSMs in verschiedene Zustände bringt und gleichzeitig von der wachsenden Schwanzspitze ein Signal ausgeht, das aber nur eine begrenzte Reichweite hat. Sobald die Zellen am vorderen Ende des PSMs außerhalb der Reichweite dieses Signals geraten, das mit der wachsenden Schwanzspitze zurückweicht, wird ihr molekularer Schwingungszustand quasi eingefroren und zwischen Zellen mit verschiedenem Schwingungszustand eine Grenze zwischen dem neu zu bildenden Somiten und dem Rest des PSMs gebildet. Die genauen molekularen und zellbiologischen Mechanismen, die all das bewirken sollten, spezialisierte das Modell allerdings noch nicht.

Oszillierende Gene im präsomitischen Mesoderm

Erst vor 15 Jahren wurde im Hühnchenembryo das Gen *c-hairy1* beschrieben, das ein dem Modell entsprechendes periodisches Verhalten im PSM zeigt (Palmeirim *et al.*, 1997). Seine Oszillation in jeder Zelle beruht darauf, dass das von *c-hairy1* codierte Protein an den eigenen Promoter binden und eine Ablesung durch die RNA-Polymerase II verhindern kann. Allerdings währt diese Blockade nicht ewig. Das entsprechende Protein in der Maus (HES7) wird mit einer Halbwertszeit von ca. 20 Minuten in der Zelle abgebaut, ebenso wie die dazugehörige Boten-RNA. Dadurch wird die Blockade des Gens gelockert und das Gen kann abgelesen werden. Die Boten-RNA wird erneut produziert und wandert aus dem Zellkern ins Zytoplasma, wo sie in das Protein übersetzt wird, das dann wieder in den Kern transportiert wird und sich erneut am Promoter anlagert und ihn blockiert. Dieses Spiel führt zu einer oszillierenden Genexpression mit einer Periode von ca. 120 Minuten bei der Maus oder 90 Minuten beim Hühnchen.



Abbildung 1: Mausembryo am Tag 9,5 der Embryonalentwicklung. Das PSM und die Somiten sind grün angefärbt (Fluoreszenzmarkierung mit GFP) (Quelle: G. Przemeck).

Gradienten im PSM

In den folgenden Jahren wurden immer mehr oszillierende Gene im PSM gefunden. Nun ist nicht klar, ob alle gleich wichtig sind, oder ob es einen Hauptoszillator gibt, der alle anderen steuert. Mit den *Fgf*- und *Wnt*-Signalwegen wurden außerdem zwei Kandidaten für das Signal gefunden, das vom Hinterende ausgeht. In beiden Fällen setzen dabei Zellen Moleküle frei, die an Oberflächenrezeptoren binden und weitere Vorgänge in den Empfängerzellen auslösen können. Der Mechanismus, wie ein von hinten nach vorne abnehmendes Signal entsteht, ist allerdings besonders – auch hier spielt der Molekülabbau eine Rolle. Das PSM wächst nicht insgesamt, sondern nur an seinem hinteren Ende in einer Wachstumszone. Nur dort sind die *Fgf*- und *Wnt*-Gene angeschaltet und bilden Boten-RNA. Da diese eine lange Halbwertszeit von mehr als zwei Stunden haben, ergibt sich durch ihren langsamen Zerfall außerhalb der Wachstumszone im PSM ein Gradient der Signalintensität, der nach vorne hin abnimmt.

Das Zusammenspiel von Oszillator und Gradient – Leuchtreklame im präsomitischen Mesoderm

Eine weitere Besonderheit der Genexpression im PSM ist die Tatsache, dass die oszillierenden Gene nicht im ganzen PSM synchron schwingen, sondern dass eine Art Welle von hinten nach vorne läuft, sich dabei zusammenzieht und hinter dem zukünftigen Somiten zum Stehen kommt. Wir haben in einer früheren Arbeit gezeigt, dass diese Welle wie bei einem Reklameleuchtband zustande kommt, das aus einer Kette einzelner LEDs besteht (Tiedemann *et al.*, 2007). Jede Zelle (entsprechend einer LED im Leuchtband) oszilliert, aber die vorderen langsamer als die hinteren, was den Eindruck einer laufenden Welle erzeugt. In unserer Theorie ist einer der Gradienten im PSM dafür verantwortlich, die Abbauprozesse in der Zelle zu beeinflussen. Die Abbauraten der Protein- und Boten-RNAs bestimmen wiederum maßgeblich die Periode der zellulären Oszillatoren bzw. der genetischen negativen Feedback-Prozesse, die wir oben beschrieben haben.

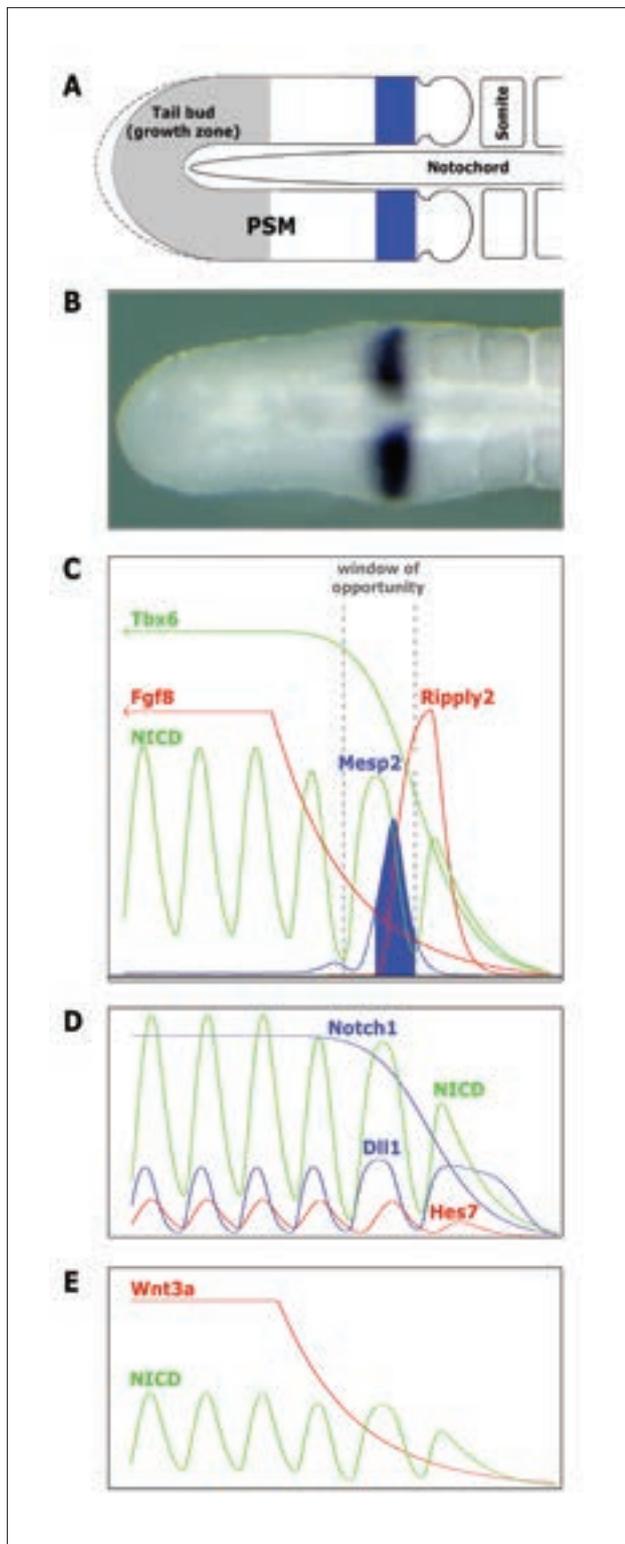
Synchronisation der molekularen Uhr

Das hört sich alles relativ einfach an, ist aber doch etwas komplizierter. Die schwingenden Gene jeder Zelle müssen zumindest auf gleicher Länge des PSMs miteinander synchronisiert sein, da sonst alle Zellen wild durcheinander „blinken“ würden und kein Muster bzw. keine definierte Wellenfront erkennbar wäre. Experimentell wurde festgestellt, dass der Delta/Notch Signalweg dafür verantwortlich ist. Eingebettet in die Zellmembran sind Liganden und Rezeptoren. Bindet ein Delta-Ligand (z.B. DLL1) einer Zelle an den Notch-Rezeptor einer benachbarten Zelle, wird im Notch-Molekül eine Schnittstelle für ein Schneide-Enzym zugänglich. Dies führt dazu, dass die intrazelluläre Domäne des Notch-Moleküls (NICD) abgetrennt wird und in den Zellkern wandert, wo sie sich an den Promoter der *Hes*-Gene anlagert und ihre Ablesung ermöglicht. Da durch die Bindung von Liganden einer Zelle an Rezeptoren einer anderen Zelle ein molekulares Signal gesendet wird, ergibt sich die Möglichkeit, die Oszillatoren der verschiedenen Zellen des PSMs miteinander zu koppeln und damit zu synchronisieren. Gleichzeitig entsteht dadurch im PSM eine Welle aus „aktiviertem Notch“ (NICD), die sich ebenfalls von hinten nach vorne bewegt, sich in Richtung der Längsachse des PSMs zusammenzieht und vor der nächsten noch zu bildenden Somitengrenze zum Stehen kommt.

Der Effektor

Der eigentliche Effektor der Grenzbildung ist dabei das *Mesp2*-Gen, das dafür sorgt, dass sich an seiner vorderen Expressionsgrenze die Zellen des PSMs auseinander bewegen, so dass sich ein Spalt bilden kann, der den neuen Somiten vom Rest des PSMs trennt. Eine Analyse des *Mesp2*-Promoters ergab, dass das Gen durch die gemeinsame Einwirkung von NICD und TBX6 aktiviert und durch die Wirkung von FGF8 gehemmt werden kann. Das *Tbx6*-Gen wird dabei im gesamten PSM durch den *Wnt*-Signalweg induziert. Da das TBX6-Protein aktivierend und

Abbildung 2: Zusammenhang der zeitlich und räumlich begrenzten Genexpression in der Somitogenese



Das Schema in **A** zeigt das PSM mit bereits gebildeten Somiten (rechts), der Wachstumszone (links) und einem sich bildenden Spalt, wobei die vordere Expressionsgrenze von *Mesp2* die zukünftige Somitengrenze induziert. **B** zeigt die *Mesp2* Expression im PSM eines Mausembryos. **C**: *Mesp2* wird durch die dynamische NICD Expression und TBX6 aktiviert und durch FGF8 und RIPPLY2 unterdrückt. **D**: NICD oszilliert, da es aus der Reaktion zwischen NOTCH1 und DLL1 hervorgeht. Die Expression von *Dll1* ist dynamisch, da es in unserem Modell durch den negativen Feedback-Oszillator *Hes7* beeinflusst wird. **E**: Die Expression von NICD erscheint wellenförmig, da die Oszillationen in den Zellen durch den WNT3A Gradient verlangsamt werden.

(A, C, D, E entnommen aus Tiedemann *et al.* (2012), PLoS Comput. Biol. 8, e10002586, doi:10.371/journal.pcbi.1002586.g001)

FGF8 im hinteren Teil des PSMs hemmend wirkt, ergibt sich ein nach hinten wandernder begrenzter Bereich im vorderen Teil des PSMs, in dem *Mesp2* aktiviert werden kann, falls auch NICD dazukommt (Oginuma *et al.*, 2010). Da NICD periodisch in der oben erwähnten Welle auf den vorderen Teil des PSMs trifft, in dem TBX6 die Aktivierung ermöglicht, ergibt sich eine scharf begrenzte periodische *Mesp2* Expression, die nach hinten wandernd im Takt der Uhr regelmäßig aufsteht und neue Somitengrenzen induziert (Abb. 2).

Einfache Computermodelle bilden nur einen Teil der Beobachtungen ab

In einfachen Computermodellen wurden sowohl die *Mesp2* Induktion durch eine dynamische NICD Expression als auch der negative Feedback der *Hes*-Gene auf sich selbst simuliert. Allerdings mussten dabei immer Teile „von Hand“ eingefügt werden, z.B. periodische Funktionen, die für die NICD-Expression stehen, oder experimentell bestimmtes Oszillationsverhalten für *Hes7*. Wie genau die NICD-Welle nun zustande kommt, war damit aber nicht geklärt. Überdies sind die einfachen Modelle letztlich auch unbefriedigend, da keine vollständige Kausalkette beschrieben wird und somit auch nicht geklärt ist, ob alle Teilprozesse wirklich so zusammenwirken, wie man sich das denkt.

Zell- und genbasierte Computersimulationen der Somitogenese helfen bei der Identifizierung des zentralen Oszillators

Wir haben nun ein zellbasiertes Computermodell entwickelt, in dem die wesentlichen molekularbiologischen Prozesse im PSM durch Differentialgleichungen beschrieben werden (Tiedemann *et al.*, 2012). Diese werden gleichzeitig in vielen hunderten bis tausenden „virtuellen Zellen“ numerisch gelöst. Die Zellen im Computer können sich außerdem in der Endzone des PSMs vermehren, über Delta-Liganden und Notch-Rezeptoren miteinander kommunizieren und die Konzentration eines beliebig gewählten Genprodukts durch Farbtintensität anzeigen (virtuelle *in situ* Färbung).

Ausgehend von experimentellen Befunden an Mäuseembryonen postulieren wir in unserem Modell *Hes7* als den zentralen Oszillator im PSM mit einem negativen Feedback des HES7-Proteins nicht nur auf seine eigene Expression, sondern auch auf den *Delta*-Promoter. Außerdem nehmen wir an, dass der Wnt-Gradient

den Abbau von NICD beeinflusst. Mit diesen Annahmen ergeben sich in unserem virtuellen PSM die charakteristischen Expressionsmuster von NICD, *Hes7*, *Dll1*, *Mesp2* und anderen Genen (Abb. 3). Außerdem lassen sich damit auch Störungen der Somitogenese besser verstehen, die beim Menschen zu Fehlbildungen der Wirbelsäule führen können, wenn „an der Uhr gedreht“ wird, z.B. durch Mutationen in den Genen *Hes7*, *Mesp2* oder *Lfng*. Letzteres spielt auch in unserem Modell eine Rolle, wurde aber aus Platzgründen hier nicht besprochen.

Ausblick: Computermodelle helfen, die Embryonalentwicklung besser zu verstehen

Natürlich ist unser Modell nur ein erster Schritt hin zu einem vollständigen Verständnis der Vertebraten-Segmentierung. Viele Prozesse sind noch nicht im Detail geklärt und quantitative Informationen zu den Zerfalls- und Bildungsraten vieler Genprodukte sind nur teilweise bekannt. Dennoch werden Computermodelle wie unseres mit der Zeit immer besser werden und die Möglichkeit bieten, auch andere Bereiche der Entwicklungsbiologie zu beleuchten. Aus Experimenten abgeleitete Hypothesen können dann überprüft, ihre Konsequenzen errechnet und quantitativ darstellbar gemacht werden.

Steckbrief Forschungsprojekt:

Das Projekt wird in der Arbeitsgruppe *Functional Genetics* im Institut für Experimentelle Genetik am Helmholtz Zentrum München bearbeitet und wurde unter anderem durch die Helmholtz-Allianz Systembiologie (Netzwerk CoReNe) finanziert.

Referenzen:

- Cooke, J., and Zeeman, E.C. (1976). A clock and wavefront model for control of the number of repeated structures during animal morphogenesis. *J. Theor. Biol.* 58, 455-476.
- Oginuma, M., Takahashi, Y., Kitajima, S., Kiso, M., Kanno, J., Kimura, A., and Saga, Y. (2010). The oscillation of Notch activation, but not its boundary, is required for somite border formation and rostral-caudal patterning within a somite. *Development* 137, 1515-1522.
- Palmeirim, I., Henrique, D., Ish-Horowicz, D., and Pourquie, O. (1997). Avian hairy gene expression identifies a molecular clock linked to vertebrate segmentation and somitogenesis. *Cell* 91, 639-648.
- Tiedemann, H.B., Schneltzer, E., Zeiser, S., Rubio-Aliaga, I., Wurst, W., Beckers, J., Przemeck, G.K.H., and Hrabě de Angelis, M. (2007). Cell-based simulation of dynamic expression patterns in the presomitic mesoderm. *J. Theor. Biol.* 248, 120-129.
- Tiedemann, H.B., Schneltzer, E., Zeiser, S., Hoesel, B., Beckers, J., Przemeck, G.K.H., and Hrabě de Angelis, M. (2012). From dynamic expression patterns to boundary formation in the presomitic mesoderm. *PLoS Comput. Biol.* 8, e1002586.

Kontakt:

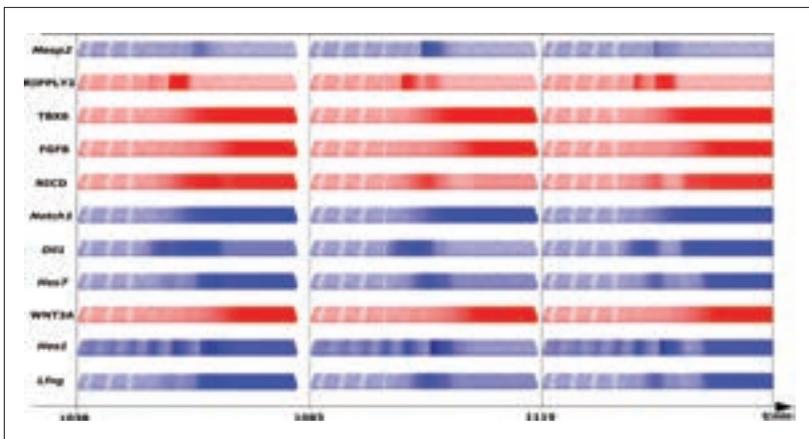


Dr. Hendrik Tiedemann

Institut für Experimentelle Genetik
Helmholtz Zentrum München,
Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit
und Umwelt GmbH
tiedemann@helmholtz-muenchen.de

www.helmholtz-muenchen.de/ieg/

Abbildung 3: Virtuelle Expressionsmuster zu drei verschiedenen Zeitpunkten innerhalb eines Zyklus der Somitogenese-Uhr



Gezeigt ist eine Hälfte des nach rechts wachsenden PSMs. Die Konzentrationen der Boten-RNA sind blau, die der Proteine rot angezeigt.

(Abbildung entnommen aus Tiedemann *et al.* (2012), *PLoS Comput. Biol.* 8, e10002586, doi:10.371/journal.pcbi.1002586.g003)