

Entwicklungsbiologie

Vorlesung

1.) Einleitung - Befruchtung

• Stadien der Entwicklung der Tiere

- **Zygote** = befruchtetes Ei

- Teilungsstadien:

→ große Zygote $\xrightarrow{\text{rasche mitotische Teilungen}}$ viele kleine Zellen, sog. Blastomere

⇒ Blastula

- Gastrulation:

→ koordinierte Zellbewegungen zur Bildung der 3 Keimblätter:

* Ektoderm (äußeres Keimblatt) ⇒ Epidermis + Nervensystem

* Mesoderm (mittleres - " -) ⇒ einige Organe (Herz, Nieren, Gonaden)

⇒ BG (Knochen, Muskelzellen, Sehnen, Blutgefäße)

⇒ Blutzellen

* Entoderm (inneres - " -) ⇒ Epithel v. Nahrungskanal + assoziierten Organen

- Organogenese

→ Zellen interagieren → Umlagerung → Bildung v. Gewebe + Organen → Zelldiff.

- Metamorphose

→ häufig: viele Larvenstadien bevor adult; umfangreiche Gewebeumorganisationen

- Reifes Stadium

→ Fortpflanzungsfähig mit wachsenden + reifen Keimzellen:

* **Spermatozyten** bzw. **Oozyten** } die die **Keimbahn** bilden

↳ **Befruchtung** = Fusion v. Spermatozyte + Oozyte

Mechanismen gegen Polyspermie

1. Der schnelle Block ggn. Polyspermie

→ Erhöhung des Membranpotentials durch Na^+ -Einstrom in die befruchtete Eizelle (= Depolarisation) = Akrosomale Reaktion

2. Der langsame Block ggn. Polyspermie

2.1 Welle v. Ca^{2+} -Freisetzung ^{im Cytoplasma} ausgehend v. Spermieinschlagstelle

2.2 Kortikale Reaktion - Exozytose der Kortikogranula

* Vitellinmembran löst sich v. Ei-Zellmembran

↳ Expansion durch Wassereinstromung in Folge v. Einlagerung v. (muco)Polysacchariden aus Granulae

* Verhärtung der Befruchtungsmembran (Vitellinm. nach Bind. durch Proteinvernetzung mancher Granulainhalte)

* zusätzl. hyaline Schutzschicht darüber mit Bestandteilen aus Granulae

2.3 Aktivierung des Eizytoplasmas

* pH steigt

2.) Grundbegriffe & Konzepte

• Begriffe

- **Differenzierung**: → Ausbildung zelltyp-spezifischer Eigenschaften
 - * morpholog. Veränderungen
 - * Einschränkung der Entwickl.möglichkeiten
- **„Commitment“**: → Festlegung auf ein Zellschicksal
- **Spezifizierung**: → eine Zelle ist spezifiziert für ein best. Zellschicksal, wenn sie **ex-vivo** (Kulturschale) autonom differenziert
- **Determination**: → eine Zelle ist determiniert zu einem best. Zellschicksal, wenn sie sich - auch nach Transplantation an andere Stelle des Embryos - in den „ursprungsgemäßen“ Zelltyp diff.
(Abb: Skript S.22 u.)
- **Entwicklungspotenz**: → Gesamtheit aller Zellen, die sich in geeigneter Umgebung in eine best. Zelle entwickeln kann
- **Kompetenz**: → Fähigkeit auf ein best. Signal durch eine Entwicklungsentscheidung reagieren zu können
- **Diversifizierung**: → Einschlagen unterschiedl. Diff.wege von Zellen einer ursprüngl. einheitlichen Zellpopulation
- **Musterbildung**: → aus einer einheitlicheren Zellpop. entstehen unter starker Regulation spezifischere Regionen, die im Verlauf der Entwicklung best. Strukturen bilden

- **Anlageplan** = Karte, in der spätere Körperregionen auf Oberfl. des Blastoderm projiziert werden
 - ↳ definiert aus welchen Zellen welche Strukturen entstehen
 - experimentelle Erforschung: Markierung^(GFP) best. Zelle(n) → Verfolgen der Markierung → schauen, welche entwickelte Struktur diese enthält
 - (- eine der ersten Entscheidungen: Keimbahnzelle o. somatische Zelle)

• Determination - Experimentprinzip

- Ab wann ist Zellschicksal festgelegt? → Transplantation v. Anlage für xy zu versch. Zeitpunkten an andere Stelle z → Ab wann wird xu anstatt z ausgebildet?

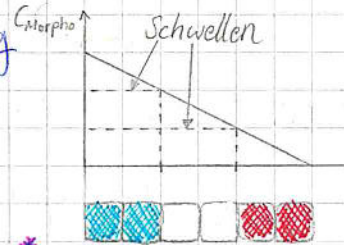
„Determinanten“ und Mosaik-Entwicklung

- **Weismann-Theorie** der **Kerndeterminanten**: → geht davon aus, dass Faktoren aus Kern (=Determinanten) asymmetrisch an Tochterzellen weitergegeben werden → spezif. Entwicklung
 - * gibt es tatsächlich, ABER im Wesentlichen erfolgt eine regulative Entwicklung mit ^{viel} Signalaustausch + vielen Induktionsvorgängen

Positionsinformationen durch morphogenetische Gradienten

- „French flag“-Modell der Musterbildung

- jede Zelle einer Zellreihe hat Potential blau, weiß o. rot zu werden



- Zellreihe ist Konz.gradient einer Substanz* ausgesetzt

- jede Zelle erhält Positionsinfo vom Konz.wert

- * Interpretation erfolgt mittels best. Schwellenwerte

- * **Morphogen** = Substanz, die bei unterschiedl. Konzentrationen unterschiedl. zelluläre Differenzierung (antworten) auslöst

Gewebespezifische Steuerung der Genexpression

- in 4 Dimensionen:

- Transkription

- Prozessierung

- Transport (Nucleus → Cytoplasma)

- Translation

- Sichtbarmachung der Genexpression mittels In-situ-Hybridisierung

3.) Gene steuern die Entwicklung - Drosophila I

- Einleitung, Genetik & maternale Gensysteme -

• Riesenchromosome

- ca. 1000fach „überreplizierte“ DNA-Stränge in Speicheldrüsenzellen
- Genaktivität sichtbar an „Puffs“

• Teilungsstadien

- nach Befruchtung erfolgt rasche Abfolge v. Kernteilungen ohne Zellteilung

⇒ Syncytium

- Kerne wandern in Peripherie u. bilden das syncytiale Blastoderm
- Zellwände entstehen u. damit das zelluläre Blastoderm
- Polzellen (= spätere Keimzellen) bilden posterior eigenständige Gruppe
- Gastrulation (...)

• Identifikation von Musterbildungsgenen

- Experiment: Mutagenese der Fliegen

→ Mutantenscreening → Gene v. Embryonen mit Veränderungen im Phänotyp der Musterbildung werden untersucht indem man deren Genome mit dem einer gesunden Fliege vgl.

- Bsp.: Gap-Gene für Bildung gr. Körperabschnitte; Paarregel-Gen Mutanten fehlt jedes 2. Parasegment; Segmentpolaritäts-Gen M. fehlt Unterabschnitt aller Parasegm.

• Zygotisches Gensystem

- **zygotische Gene** = solche, die v. DNA im Embryo-Nucleus abgelesen werden
- - " - - " - zeigen ^{mutierten} mutanten Phänotyp nur, wenn sie homozygot sind
- erste Expression ab syncytialem Blastoderm-Stadium
- Bsp.: → Segmentierungsgene (Gap, Paarregel, Segmentpolaritätsgene)
→ homöotische Gene

Das maternale Gensystem

Maternale Geneffekte

- ↳ Auswirkungen des mütterl. Genoms auf Entwickl. des Embryos
- **maternale Genprodukte** werden ins Ei transportiert o. wirken entscheidend bei Bildung der Oocyte mit
 - d.h. sie sind Teil der Musterbildung (u. Defekt dieser stört Musterbildung)
- Embryonen zeigen nur Defekte bei homozygot mutanter Mutter (o' egal)

Das maternale Gen „Bicoid“ (bcd)

- notwendig für Bildung der anterioren Strukturen (Kopf + Thorax)
 - kann bei Injektion unabhängig v. Position Kopf + Thorax induzieren
 - Proteingradient gibt Positionsinfo
- Modell zur Bildung des **bcd**-Gradienten:

↳ lokale Quelle liefert mRNA

→ Verteilung durch Diffusion im syncytialen Embryo

→ „dispersed sink“: Abbau im ges. Embryo durch begrenzte Stabilität

→ Etablierung eines stabilen Proteingradienten

* Beweis: erhöhte Konz. verschiebt Expressionsgrenzen u. somit Ort der Bildung der Kopffalte nach hinten / posterior

↳ **Bicoid** ist ein Morphogen! (Weitere: **nanos**; **torso** → Rezeptorkinase!)

→ Frage I: Welche Gene reguliert bcd, wenn es K.-u.T.-Entwicklung steuert?

→ Experiment:

Schritt 1: ^{Knock-out-}Mutagenese v. Gap Genen → Welche haben Ausfälle von K. u. T.?

Schritt 2: Gescreente Gene, die bei knock-out Ausfälle hervorriefen werden wiederum in bcd-(knock-out) Mutanten auf Aktivität geprüft

→ Expression: hunchback - nein, anteriores giant - nein, Krüppel - reduziert

⇒ diese Gap Gene werden v. Bicoid reguliert!

→ Frage II: Wie reguliert bcd die gefundenen Gene? bzw. wie wirkt es in seiner Rolle als Morphogen?

* bcd = Transkriptionsfaktor! → bindet Enhancer bei a) niedriger Konz. nur an Gen R b) hoher Konz. an Gen A+R (aufgrund v. versch. Bind.affinitäten)

4.) Gene steuern die Entwicklung - Drosophila II

- Segmentierung & Segmentidentität -

• Gap-Gene

- werden v. maternalen Genen aktiviert
- alle G.-G. reprimieren wechselseitig ihre Expression! (bei hoher Konz.)
 - **Paarregel-Gen**-Promotoren integrieren regulatorische Wirkung der exprim. Gap-Gene
 - * Enhancer „berechnet“ Summe der Inputs v. Aktivatoren + Repressoren
 - ↳ Aktivierung bzw. Repression erfolgt durch Schwellen (im syncytialen Blastoderm)
- Rolle der **Paarregelgene** bei Segmentierung:
 - Expression v. 7 **Parasegmenten** Streifen + 7 Zwischenregionen
 - ⇒ 14 **Parasegmente** ≠ Metamere
 - * Parasegmente besitzen anteriore + posteriore Hälfte
 - ↳ - " - 1 ant. wird zu cephalen Segment 1, restl. Segmente bestehen aus 2 ParasegmentHÄLTEN ⇒ Ps. 1p. + Ps. 2a = cephalen - " - 2 etc.
 - ↳ **Segmentpolaritätsgene** werden in allen Parasegmente exprimiert u. geben den Zellen ihre Positionsinformation
- ↳ Frage: Wie formen sich aus gleichgestalteten Parasegmenten heteronome Metamere?

• Homeotische Gene

- **Homeobox-Gene** kodieren Transkriptionsfaktoren (TF), sie
 - besitzen **Homeodomäne** = konservierte, DNA-bindende Proteindomäne
- **Wichtig**: Die homeotischen Gene der **HOX**-Familie bestimmen die Segmentidentität in ALLEN Tieren!
 - sie sind **KOLINEAR** angeordnet, d.h. sie liegen auf der DNA in der gleichen Reihenfolge vor, in der sie im Embryo v. anterior nach posterior die Segmentidentität bestimmen!

- Wirkung der Hox-Gene:

→ Segmentidentität wird durch „posteriorste“ exprim. Hox-Gen bestimmt

→ KEINE kombinatorische Wirkung

- Aktivierung:

→ erfolgt durch Gap- & Paarregelgene (u.a.?)

- Bem.: anteriore Gene werden als erste exprimiert

- Mutationen:

→ Verlust eines Hox-Gens ⇒ i.d.R. anteriore Transformation (T2 + T3 mit Flügeln)

= Loss-of-function

→ Überexpression o. dominante Mutationen ⇒ häufig posteriore

= Gain-of-function

Transformationen (Antenne durch Bein ersetzt)

Hierarchisches System der Musterbildungsgene

1. Ebene: **Koordinatengene** (= Maternaleffektgene)

→ Bsp.: **Bicoid**¹, **nanos**², **torso**³

→ legen 3 Hauptbereiche der Anterior-posterioren Achse fest (durch Regulation der Gap-Gene):

Kopf/Thorax¹ - Abdomen² - Acron+Telson³ (terminal)

2. Ebene: **Segmentierungsgene**

→ Unterebene a) Gapgene

b) Paarregelgene

c) **Segmentpolaritätsgene** (Positionsinformation)

→ bestimmen Bildung der 14 Parasegmente + Anordnung der Zellen darin

3. Ebene: **Homeotische Gene**

→ **Hox-Gen Cluster**

→ bestimmen Identität der Parasegmente

↓ Segmentidentität

4. Ebene: **Realisatorgene**

↓ Zellidentität/diff.

→ kontrollieren gewebe- u. organspezifische Genexpression in jedem Bereich des Embryos

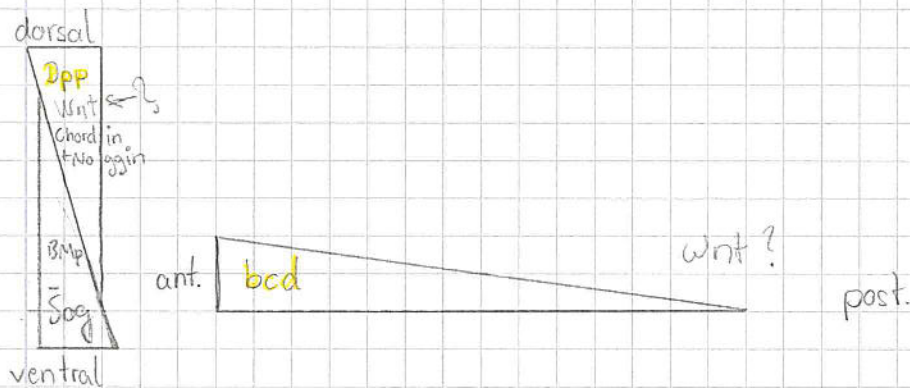
5. Ebene: **Strukturgene**

→ prägen Form & Funktion der Zellen endgültig aus

(... Drosophila II - Segmentierung & Segmentidentität...)

• Dorsoventrale Musterbildung

- bereits in Oogenese initiiert
- Zygote: früh → der TF „Dorsal“ liegt in Gradient vor u. ^{reprimiert} ~~aktiviert~~...
... später → das Signal ^{den} Dpp mit ^{stoff} entsprechendem Aktivitätsgradient
→ „Dorsal“ reprimiert (!) Dpp ventral ⇒ nur in dorsaler Hälfte exprimiert
- Dpp + Antagonist **Scg** kontrollieren als zygotisches Morphogen die (weitere) dorsoventrale Musterbildung!



• Mechanismen der Musterbildung (= Zsmfassung / Wdh.)

- Lokalisierte Determinanten
 - zytoplasmat. Determination durch Verankerung v. mRNA am Zytoskelett (bcd + nanos)
 - „eingelagerte“ Signale in der Eimembran
 - Morphogengradienten
 - kombinatorische Regulation
 - Integration des Inputs vieler TF's (Promotor & Enhancer summieren Akti. + Inhi.)
 - Signale + Antagonisten schärfen Gradienten (→ u. daraus folgende Entscheidungen)
 - z.B. Dpp ↔ Scg (short gastrulation)
 - Metamere Muster durch unabhängige Mechanismen festgelegt
 - Segmentierungs-Genkaskade bildet Segmente
 - Hox-Code legt Segmentidentität fest
 - Orthogonale Systeme bilden kartesisches Koordinatensystem (s.o.)
 - anterioposterior, dorsoventral; später: proximo-distal ⇒ 3D
- = 3D Morphogengradienten mit Antagonisten, TF Kombination, lokalisierte Determinanten, 5?

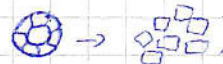




5.) Wirbeltierentwicklung I - Zelleistungen & Gastrulation

• Zelldifferenzierungsleistungen

... in Mesenchymzellen

- **Kondensation** (Mesenchym verdichtet sich)
- Zellteilung
- Zelltod
- Wanderung (Bewegung zu best. Zeit an best. Ort)
- Wachstum
- Matrixproduktion u. -abbau (extrazell. Matrix)

... in Epithelzellen

- **Dispersion** = Verteilung (gesamtes Epithel → Mesenchym )
- **Delamination** (Teil des Epithels → Mesenchym )
- Formveränderung o. Wachstum 
- Zellwanderung, **Interkalation** 
- Zellteilung
- Wanderung 
- Matrixproduktion u. -abbau

• Zelladhäsion

- Zellen sind über ^{z.B.} **Cadherine** gebunden, welche am Cytoskelett _(Aktin) befestigt sind
- versch. Zelltypen besitzen versch. Cadherine an der Oberfläche

(* Bsp.: Epithelzellen → E-Cadherin, Neuralleistenzellen → N-Cadherine)

* gleichartige Cadherine binden besser als solche unterschiedlicher Typen

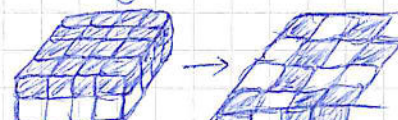
- Experiment: Dispersion u. Mischung v. Epithel- u. Neuralplattenzellen --
--> Reaggregation der beiden Zelltypen zu 2 einheitlichen Geweben erfolgt

• Gastrulation bei Amphibien (Bsp.: *Xenopus*)

1. Involution = Einwanderung des Mesoderms } **Embolie** ← sicher?

→ initiiert durch Bildung der **Flaschenhalszellen**, welche durch kontraktile **Actin**filamente geformt werden 

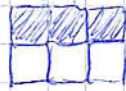
2. **Radiäre Interkalation** der Zellen sorgt für Umwachsung der vegetalen Hälfte durch animale Zellen } **Epibolie**



3. Mediolaterale Interkalation vermittelt die konvergente

Extension

⇒ Achsenbildung



(nebeneinander,
Aufsicht)

↳ Ergebnisse:

1. Drei Keimblätter (Ecto-, Meso- & Entoderm) liegen übereinander
„wie Zwiebelschalen“
2. Die meisten Zellen liegen auf dorsaler Seite in ant.-post. Achse

↳ siehe VL. skript S. 71-73 für Abb.en

6.) Wirbeltierentwicklung II - Achsenbildung und der Gastrula-Organisator

Die 3 Induktionsvorgänge in der frühen Xenopus-Musterbildung

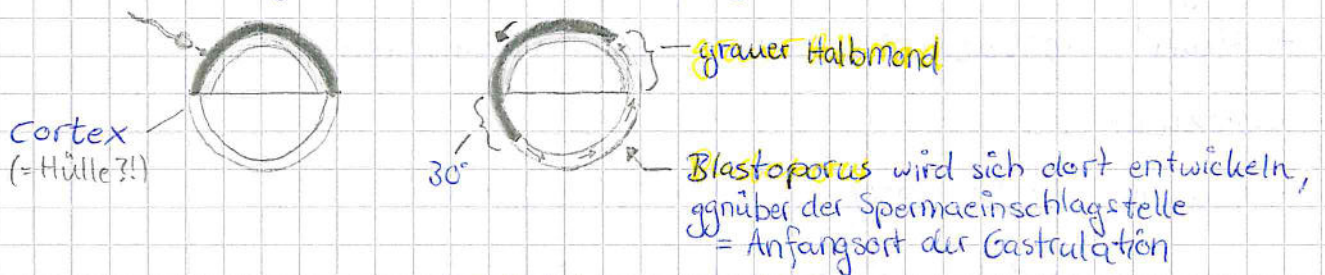
1. Bildung & Signale des Nieuwkoop Centers

- erster Schritt der Achsenbildung:
rotationssymmetr. Ei → dorso-ventrale Asymmetrie
- dorsale vegetale frühe Blastomere **Nieuwkoop-Zentrum**
können Achsen induzieren



→ **Corticale Rotation**

- * Verschiebung (Rotation) des **kortikalen Zytoplasmas** bewirkt die Entstehung der dorso-ventralen Asymmetrie



- * Genaktivierung durch Corticale Rotation

↳ Microtubuli-Netz (zuvor durch Spermaster organisiert) transportiert

posteriorisierendes Wnt enthaltende Vesikel nach dorsal

→ **Wnt** aktiviert **β -catenin**, einen TF, der die Expression dorsaler Gene fördert

* **Nodal** = ^{Morphogen} Zielgen u. a.

} 2 Hauptaktivitäten des Nieuwkoop-Centers

2. Mesoderm Induktion

- vegetale Zellen induzieren Mesoderm
- Induktion & Bildung v. Mesoderm erfolgt nur bei (erfolgreicher) Interaktion zw. vegetalen Zellen u. denen der **animalen Kappe**

* Achtung: bereits während Oogenese werden maternale mRNAs am vegetalen Pol des Kroscheis lokalisiert = **lokalisierte Determinante** (wie Vg1, Nodal, TGF's)