

PRIMERI GENSKE EKSPRESIJE V ONTOGENETSKEM RAZVOJU

Špela Schrader

Nacionalni inštitut za biologijo, Večna pot 111, 1000 Ljubljana, spela.schrader@nib.si

Špela Schrader, rojena leta 1969, je diplomirala in magistrirala iz senzorične fiziologije žuželk na Univerzi v Ljubljani, ter leta 2004 doktorirala s temo iz razvojne nevrobiologije vinske mušice. Trenutno je zaposlena kot raziskovalka na Nacionalnem inštitutu za biologijo.

EXAMPLES OF GENE EXPRESSION DURING ONTOGENESIS

Špela Schrader

National institute of biology, Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana, Slovenia, spela.schrader@nib.si

Špela Schrader, born in 1969, completed BSc and MSc course in insect sensory physiology at the University of Ljubljana, and in 2004 completed a PhD in the field of developmental neurobiology. She is currently employed as a researcher at the National Institute of Biology.

Povzetek

Živali so zgrajene iz diferenciranih celic najrazličnejših oblik, ki opravljajo različne funkcije, pa vendar vse izvirajo iz ene same oplojene jajčne celice in imajo vse enak genski material. Raznolikost je posledica diferencialne aktivnosti genov, ki se vzpostavi med embrionalnim in kasnejšim ontogenetskim razvojem s pomočjo neprestanega "pogovora" med geni v jedru in proteini v citoplazmi.

Oploditev jajčne celice dopolni materinski genski material in sproži fascinanten proces razvoja novega bitja. Mati v citoplazmi jajčne celice pripravi proteine in informacijske molekule (mRNA), potrebne za začetek razvoja, geni v jedru pa nosijo navodila za nastanek novih nastajajočemu organizmu lastnih proteinov. V razvoju se oplojena jajčna celica deli. Večina delitev ni simetrična, hčerinske celice podedujejo različna navodila za delovanje in zato aktivirajo različne gene. Postopno skozi kaskado korakov regulacije genske aktivnosti in z nadaljnjimi delitvami celic narašča njihova medsebojna biokemijska raznolikost. V celicah je vedno več specifičnih regulatornih molekul, ki omejujejo možne poti njihovega nadaljnjega razvoja, vse do diferenciranih celic. Celice prek receptorjev na površini sprejmejo tudi signale iz okolice, ki dodatno vodijo njihov razvoj in diferenciacijo.

Pri vinski mušici se že pred prvimi pravimi delitvami oplojene jajčne celice ustvari zapleten prostorski vzorec regulatornih molekul, ki kasneje vsaki nastali celici povedo, v katerem delu embrija se nahaja, od tega pa je odvisno, kakšna bo njena nadaljnja usoda. Oblikujejo

se zarodne plasti endo-, mezo- in ektoderm. Ekspresija pronevralnih genov določi v ektodermu področje neuroektoderma, ki ima potencial za razvoj v živčno tkivo. Celice neuroektoderma z medsebojno komunikacijo izberejo tiste celice, ki se kasneje res razvijejo v živčno tkivo. Izbranke sledijo stereotipni seriji asimetričnih delitev, ki vodijo do nastanka determiniranih celičnih tipov. Medsebojna komunikacija v razvojnem drevesu sorodnih celic zagotavlja majhno možnost napak. Ko je usoda celice dokončno določena, celica diferencira. Tudi diferenciacija je interaktiven proces, ko signali iz okolja prek receptorjev, ki jih vsebuje posamična celica, vodijo njen razvoj.

Abstract

Differentiated cells adopt very different forms and perform different functions although all cells of an organism contain the same genetic information. They all arise from a single fertilized egg. During embryonic and later ontogenetic development the permanent cross-talk between proteins and genes leads to differential gene activity which directs the cells along different developmental pathways.

Fertilization completes the diploid chromosomal number and initiates the astonishing process of development of a new living being. The proteins and mRNAs deposited into the egg cell by the mother are necessary for the first developmental events, whereas the genes in the nucleus carry the information for new proteins, which take over the developmental process. During the development the fertilized egg divides asymmetrically. The daughter cells inherit the same genetic material but different cytoplasmic instructions and therefore activate different genes. During numerous successive regulatory events in subsequent cell divisions the biochemical differences among cells increase. Additionally, cells respond to extracellular signals which also influence differential genetic expression and cell differentiation. More and more specific regulatory molecules limit the developmental potential of each cell until different differentiated cell types arise.

In the fruit fly, a complex spatial pattern of regulatory molecules arises before the first cell divisions. This pattern provides positional information for emerging cells and specifies their future competence. The germ bands endo-, meso- and ectoderm are specified. In the ectoderm proneural gene expression defines the regions of neuroectoderm which adopt the potential for the development in the nervous tissue. In the neuroectoderm, the intercellular communication singles out the real neuronal precursors. They undergo a series of stereotypic asymmetric cell divisions, which result in determined cell types. After the cell fate is determined, the cells undergo differentiation which appears to be an interactive process as well. The signals from the environment acting through the specific receptors in the cell membrane influence the gene expression in the cell and thus regulate its metabolism and form.

Uvod

V ontogenezi se iz oplojene jajčne celice oz. zigote razvije mnogocelični organizem. Vse celice mnogoceličnega organizma vsebujejo isti genski material, in vendar so si izjemno različne – z različno obliko, kemijsko strukturo in delovanjem. Kako lahko iz ene same nediferencirane celice nastane množica različnih tipov celic, ki skupaj tvorijo organizem, je

temeljno vprašanje razvojne biologije.

Že dolgo so ljudje opazovali in opisovali potek razvoja. Tako še danes presenečajo natančne Malpighijeve risbe razvijajočih se piščančjih embrijev iz leta 1673. Bistven napredek je prineslo spoznanje, da so vsa živa bitja sestavljena iz osnovnih enot življenja – celic (Shleiden Mathias, Schwann Theodor, 1838/39). Celična teorija je bila podlaga za ločitev somatičnih celic, ki gradijo organizem, od spolnih celic, ki prenašajo informacijo za nastanek novega organizma na potomstvo (August Weismann). Z uničevanjem posamičnih celic zgodnjih embrijev so proti koncu 19. stoletja odkrili, da se razvoj pri različnih organizmih odvija različno. Pri nekaterih je razvoj v veliki meri določen z razporeditvijo regulacijskih faktorjev v jajčni celici. Če uničimo eno celico na dvocelični stopnji, polovica embria manjka – takemu tipu razvoja rečemo mozaični razvoj. Pri drugih je razvoj močno odvisen od medsebojne komunikacije med celicami – takemu razvoju rečemo regulatorni razvoj (Wilhelm Roux, Hans Driesch). Conklin je leta 1905 spremljal delitev ascidijske jajčne celice in opisal razvojno usodo vsake posamične celice ter tako vpeljal raziskovanje celičnih razvojnih dreves. Hans Spemann in Hilda Mangold sta leta 1924 odkrila fenomen indukcije in za odkritje je Spemann prejel Nobelovo nagrado za fiziologijo in medicino leta 1935. Posamične celice lahko inducirajo razvoj drugih celic ali struktur, kadar pridejo v stik s kompetentnim tkivom.

Kljub velikim odkritjem celične embriologije sta šele razvoj genetike in povezava genetike z embriologijo začela odkrivati poti, ki vodijo do razvoja kompleksnih mnogoceličnih organizmov iz ene same jajčne celice. Geni nosijo zapise za proteine, proteini (transkripcijski faktorji) pa so regulatorji nadaljnje ekspresije genov. Proteini tudi tvorijo skelet celic in s tem vplivajo na njihovo obliko, sodelujejo pri gibanju, pri transportu snovi znotraj celic in pri komunikaciji med celicami, tako v vlogi receptorjev kot ligandov (molekul, ki se vežejo na receptorje in jih s tem aktivirajo). Proteini v celici nastanejo po zapletenem postopku. Posamični gen se aktivira in se v jedru celice prepíše v informacijsko molekulo mRNA. Ta potuje v citoplazmo, kjer se prevede v protein.

V ontogenetskem razvoju lahko celice, ki nastajajo z delitvijo zigote, sledijo več možnim razvojnim potem. Možne izbire teh poti se med embriogenezo s časom postopno prek mnogih nivojev regulacije omejujejo. Koraki so med seboj povezani tako horizontalno kot tudi vertikalno. Povezanost nivojev zagotavlja kompleksna kontrola izražanja genov. Vsak gen ima lahko več regulatornih regij in v vsaki od njih je lahko mnogo vezavnih mest, ki izražanje gena bodisi zavrejo bodisi vzpodbudijo. Na vezavna mesta se vežejo regulatorji genske ekspresije – transkripcijski faktorji. Vključene so mnoge povratne zanke in recipročne (pogosto inhibitorne) povezave. Tako se v vsakem trenutku v celici prepisujejo geni, za katere je takrat v jedru prisotnih dovolj aktivatorjev in so odsotni represorji (slika 6 B). Regulacija nadalje poteka tudi na drugih nivojih - pri prevajanju genske informacije (mRNA) v proteine ter pri zlaganju proteinov v terciarno ali kvartarno obliko.

Poleg avtonomnih celičnih poti so v razvoju pomembne tudi poti, ki celico povezujejo z okoljem. Celica je kompetentna za prepoznavanje dražljajev iz drugih celic, če ima na površini primerne receptorje. Receptorji potem v celici sprožijo verigo procesov, ki vodijo do nastanka novih transkripcijskih faktorjev. Kako bo celica interpretirala dražljaj iz okolice, je odvisno od snovi (proteinov in drugih molekul), ki so prisotne v trenutku, ko

celica sprejme dražljaj. Tako so lahko isti signali uporabljeni v mnogih procesih in njihovo pojavljanje lahko vodi do različnih rezultatov.

V tem prispevku bomo preleteli nekaj korakov na poti od zigote vinske mušice do nastanka senzoričnih organov in rasti aksonov čutilnih celic v pravi del centralnega živčnega sistema. Začetne faze razvoja večceličnega embria iz oplojene jajčne celice so pri vinski mušici med najbolj raziskanimi. Razvoj se sproži z oploditvijo jajčne celice, ki je že sama nehomogena. Nehomogenost znotraj jajčne celice omogoči nastanek koncentracijskih gradientov različnih snovi, ki dajo posamičnim novonastalim celicam informacijo o legi (pozicijsko informacijo). Informacija o legi vodi celice in njihove potomke skozi nadaljnji razvoj specifikacije posamičnih tkiv. Tudi aksoni v zadnji fazi razvoja živčnega sistema, ko rastejo v pravo področje centralnega živčnega sistema, uporabijo informacijo o legi. V razvoju je bistvena neprestana komunikacija med celicami, kot kaže primer lateralne inhibicije, ki med za živčno tkivo specificiranimi celicami določi bodoče živčne prekursorje. Med seboj komunicirajo tudi asimetrično deleče se celice, ki se že v osnovi razlikujejo v prisotnih citoplazemskih komponentah in zato sledijo različnim razvojnim usodam v razvoju senzoričnih organov.

Razvoj vinske mušice od jajčne celice do blastoderma

Po oploditvi jajčne celice vinske mušice se zigota ne cepi, kot je to običajno pri večini drugih živalskih skupin, temveč se sprva deli le jedro. Nastane mnogojedrna tvorba oziroma sincicij. Jedra potujejo k celični membrani, se tam še nekajkrat delijo potem pa jih objame plazmalema. Nastane celični obod okrog rumenjaka na sredini in to tvorbo imenujemo blastoderm. V njej so že določene osnovne osi (spredaj-zadaj (anteriorno-posteriorno) in zgoraj-spodaj (dorso-ventralno)) in do neke mere specificirane tri zarodne plasti (ekto-, endo- in mezoderm), ki se nadalje oblikujejo in zavzamejo pravilni položaj v procesu gastrulacije.

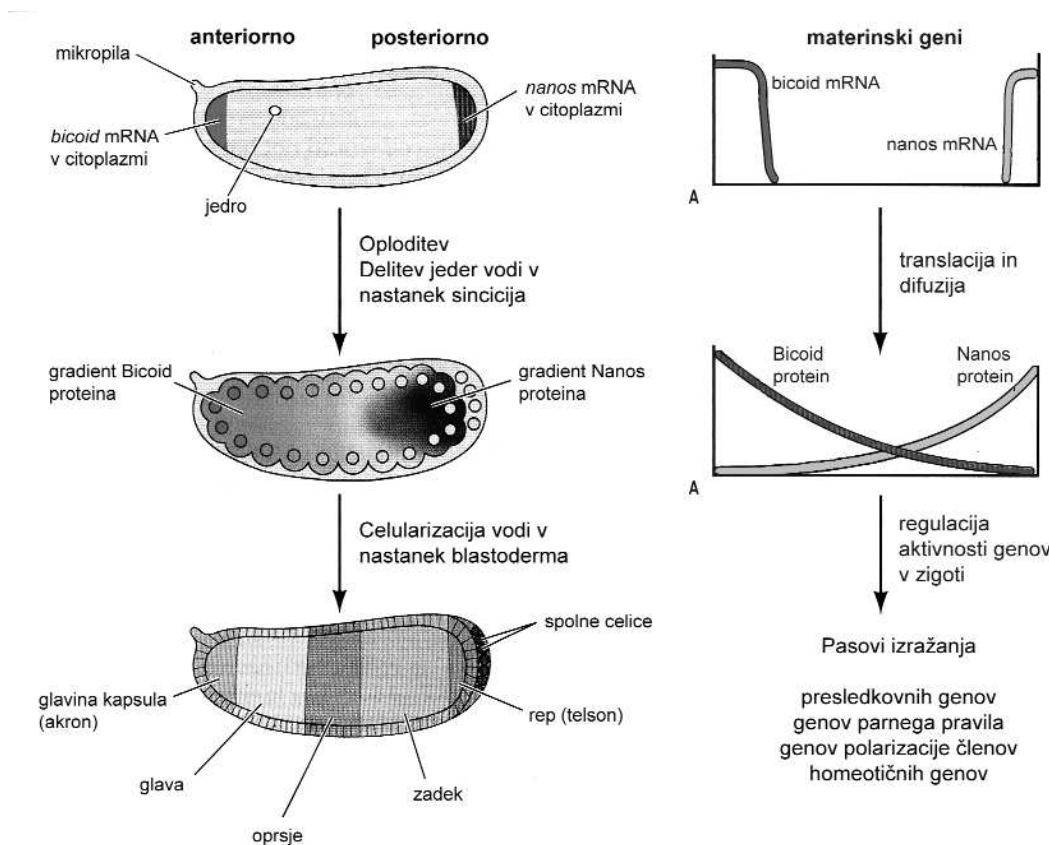
Jajčna celica

Osi so pravzaprav določene že ob nastanku jajčne celice. Jajčna celica ovalne oblike nastane v asimetričnih ovarijih mame muhe. V ovariju je obdana z več celicami negovalkami, ki proizvedejo vse snovi, ki so kasneje potrebne za razvoj embria. Regulatorni proteini in mRNA se v jajčni celici asimetrično pripnejo na elemente celičnega skeleta. Pri nastanku jajčne celice, transportu različnih proteinov in mRNA sodeluje več kot 50 specifičnih proteinov, namenjenih pravilni razporeditvi snovi v jajcu. Tako že mama muha poskrbi za to, da bo mala muhica vedela, kje je spredaj in kje je zadaj, kje je zgoraj in kje spodaj.

Materina navodila za anteriorno-posteriorno os

Najpomembnejša snov, ki določa os simetrije od glave do zadka (anteriorno-posteriorno), je navodilo v obliki mRNA za oblikovanje proteina Bicoid. Molekule *bicoid* mRNA so pripete na elemente celičnega skeleta v sprednjem delu jajca (slika 1). Navodila za nastanek regulatorja čakajo na trenutek, ko jih bo celična »mašinerija« začela prepisovati v signalne molekule. Ta znak je oploditev jajčne celice. Ko je jajčna celica oplojena, se mRNA začne prepisovati v beljakovinske signalne molekule, ki difundirajo od sprednjega dela proti

zadnjemu. Nastane koncentracijski gradient, ki vsakemu delčku na poti od sprednjega do zadnjega dela zigote "priredi" neko koncentracijo proteina Bicoid. Ker se Bicoid sočasno tudi razgrajuje z relativno kratkim razpolovnim časom, se koncentracija v celi jajčni celici nikoli ne izenači in gradient se ohranja. Bicoid deluje kot transkripcijski faktor, ki v različnih koncentracijah vpliva na prepisovanje različnih genov v jedrih vzdolž anteriorno-posteriorne osi. Medtem se jedro zigote deli, nastala jedra potujejo k celični membrani in pridejo pod vpliv različnih koncentracij regulatorja Bicoid. Bicoid je prvi in najpomembnejši regulator, ki jedrom določa lego vzdolž anteriorno-posteriorne osi in na ta način vodi nadaljnjo diferenciacijo v anteriorno-posteriorni osi.



Slika 1: Materinski proteini specificirajo os simetrije od glave do zadka.

zgoraj: V jajčni celici so materinske *bicoid* mRNA molekule nameščene v sprednjem delu, medtem ko so *nanos* mRNA pripete v zadnjem delu.

sredina: Po oploditvi se začne jedro zigote deliti, nastala jedra se namestijo ob celični membrani. Sočasno se materinske mRNA prepisujejo v proteine, ki z difuzijo potujejo v smeri manjše koncentracije (srednja vrsta). Nastanejo koncentracijski gradienti regulatornih molekul, ki dajo jedrom pozicijsko informacijo vzdolž osi od glave do zadka in sprožijo prepisovanje različnih kombinacij zigotičnih genov v različnih jedrih.

spodaj: Zigotični geni v celičnem blastodermu določijo območja, ki se bodo razvila v različne telesne dele.

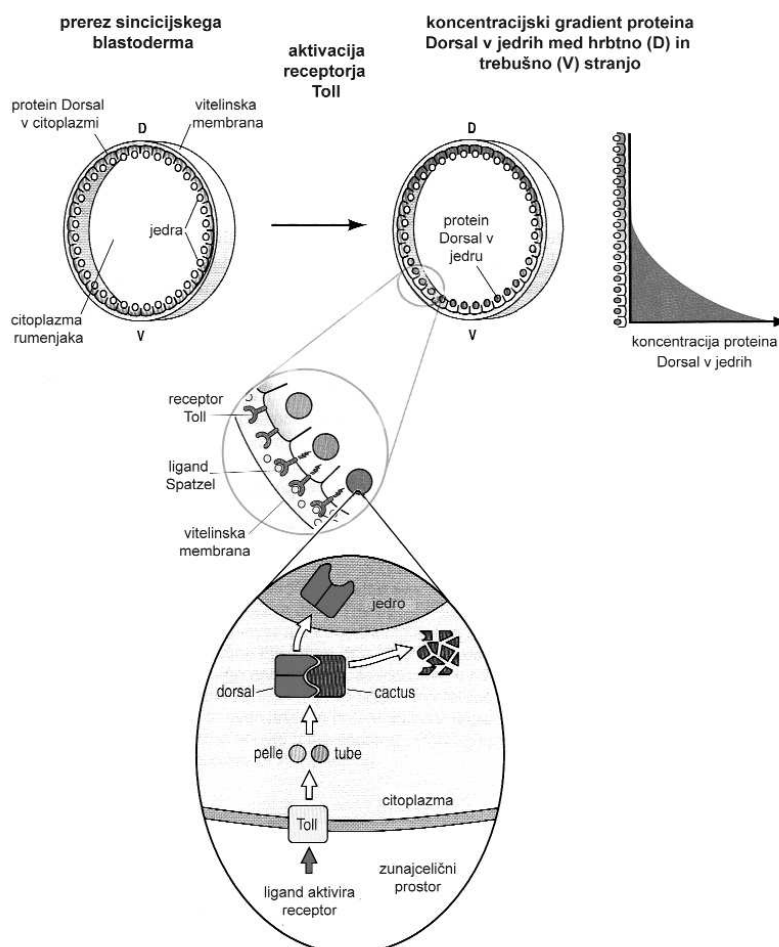
Prirejeno po: Gilbert, 2006

Poleg proteina Bicoid sodelujejo pri določanju anteriorno-posteriorne osi drugi materinski transkripcijski faktorji, ki se pojavljajo v gradientu: *nanos* mRNA je pripeta v zadkovem delu zigote s pomočjo proteina Oskar in določa posteriorni del embria tako, da protein Nanos zavira prepisovanje *hunchback* mRNA, ki je enakomirno prisotna po celi zigoti; tudi *caudal* mRNA je enakomirno razporejena po vsej zigoti, vendar njeno prepisovanje v sprednjem delu zavira Bicoid; receptorski protein, ki ga kodira gen *torso*, je nameščen v

membrani, medtem ko je njegov ligand immobiliziran v vitelinski ovojnici le na skrajnem glavinem in zadkovem koncu jajčne celice. Ob oploditvi se sprosti ter veže na receptor Torso, ki signal prenese v tam ležaja jedra in tako določa sprednji in zadnji skrajni konec embria.

Materina navodila za dorso-ventralno os

Podoben mehanizem materinskih produktov, ki se po oploditvi razporedijo v gradientu, določa lego jeder od hrbtne do trebušne dela (na dorso-ventralni osi). Glavno vlogo pri določanju dorso-ventralne osi ima transkripcijski faktor Dorsal, ki je enakomerno razporejen ob membrani jajčne celice vezan na drugi protein Cactus. Da bi Dorsal lahko deloval kot transkripcijski faktor, mora zapustiti citoplazmo in potovati v jedro. Signal za prehod v jedro je spet oploditev jajčne celice. Oploditev sproži verigo reakcij v prostoru med jajčno celico in obdajajočo vitelinsko membrano, kjer je v ventralnem delu vitelinske ovojnice pritrjen proteinski substrat. V tem zunajceličnem prostoru tako nastaja snov, ki aktivira receptorje v membrani jajčne celice, aktivirani receptorji pa v citoplazmi sprostijo protein Dorsal s proteina Cactus in Dorsal odpotuje v jedro. Ker veriga reakcij poteka ventralno, kjer je nameščen substrat, je ventralno aktiviranih največ receptorjev in v jedrih največ protein Dorsal. Njegova koncentracija v jedrih proti dorzalni strani embria upada (slika 2).



Slika 2: Materinski proteini specificirajo os simetrije od hrbtne do trebušne strani s pomočjo signalizacije iz vitelinske membrane.

zgoraj: Materinski protein Dorsal je enakomerno porazdeljen v citoplazmi sincicijskega blastoderma. Po vstopu proteina Dorsal iz citoplazme v jedra se oblikuje koncentracijski gradient proteina Dorsal v jedrih od trebušne proti hrbtne strani.

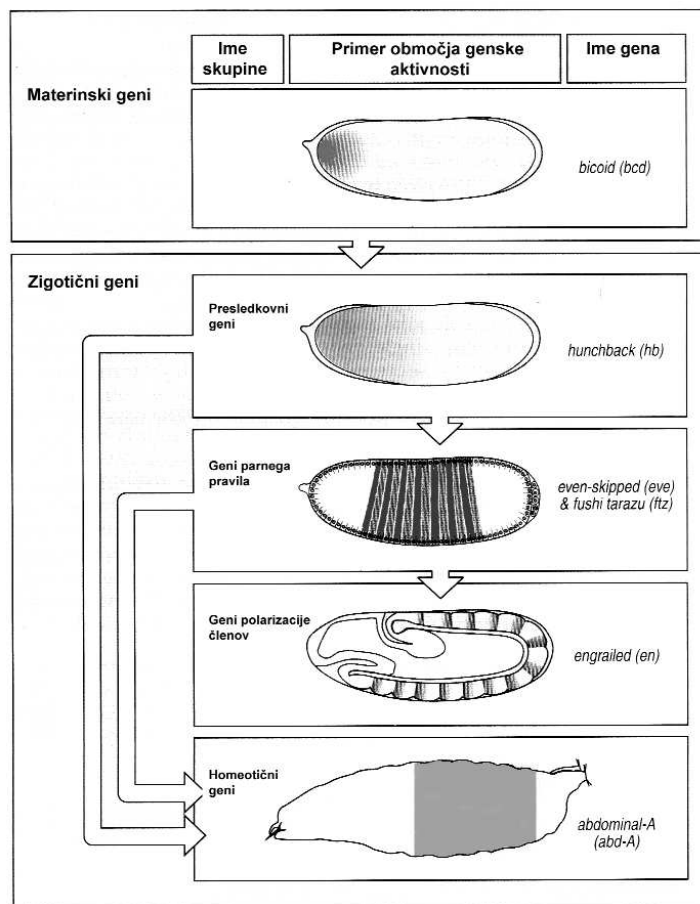
spodaj: Dorsal lahko vstopi v jedro in deluje kot transkripcijski faktor, če se sprosti z nosilnega proteina Cactus. Informacijska kaskada, ki jo sproži ligand Spätzel, ko se veže na receptor Toll, vodi v razpad proteina Cactus. Spätzel nastaja po oploditvi jajčne celice iz proteina, ki je nameščen ventralno v vitelinski membrani, zato je aktivacija receptorjev Toll močnejša v ventralnem delu blastoderma.

Prirejeno po: Wolpert, 1998

Tako vsako jedro v sincicijskem blastodermu pridobi edinstveno informacijo o svoji legi, ki označuje glavne osi zigote oz. embria. Mreža pozicijskih informacij materinskih regulatorjev vpliva na izražanje genov v zigoti.

Zigotična ekspresija interpretira materina navodila in ustvari kompleksen vzorec

Ko so vzpostavljeni koncentracijski gradienti materinskih transkripcijskih faktorjev, jih jedra sincicijskega blastoderma interpretirajo in nadgradijo s specifično ekspresijo zigotičnih genov, tako da pridobi vsako območje embria svojo identiteto. Večina genov, ki se sprva aktivirajo v zigoti, tudi sami kodirajo transkripcijske faktorje. Tako se vzdolž anteriorno-posteriorne osi pojavi več skupin transkripcijskih faktorjev v različnih kombinacijah, ki aktivirajo spet nove zigotične gene (slika 3).



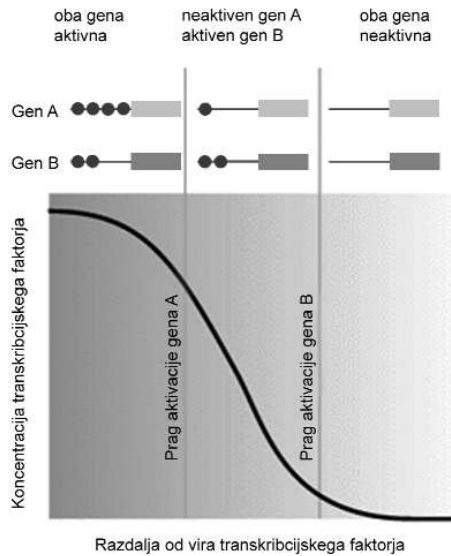
Slika 3: Zaporedno izražanje različnih skupin genov določi razdelitev telesa od glave do zadka.

Po oploditvi se začno v proteine prepisovati mRNA molekule, ki jih je mama namestila v jajce. Ti materinski proteini vzpostavijo pozicijsko informacijo znotraj jajca in aktivirajo različne zigotične gene. Štirje glavni razredi zigotičnih genov, ki se vključujejo v vzdolžni osi, so presledkovni (gap) geni, geni parnega pravila (pair-rule), geni polarizacije členov (segment polarity genes) in homeotični geni. Vsi se pojavljajo v različnih značilnih vzorcih in postopno usmerijo posamično področje blastoderma v razvoj v določen zaporedni člen nastajajoče muhe

Povzeto po: Wolpert, 1998

Različne koncentracije regulatorja lahko vplivajo na različne gene na različni način. Medtem ko se nekateri geni vključijo le pri dovolj visokih koncentracijah, se drugi vključijo tudi pri nizkih koncentracijah (slika 4), lahko je njihovo izražanje pri visokih koncentracijah celo zavrto. Za mnoge povezave med transkripcijskim faktorjem in ciljnim genom so

določili koncentracijski prag, ki je potreben za aktivacijo ali supresijo. Kontrolne regije imajo več različnih vezavnih mest z različno afiniteto za regulatorje. Ob veliki koncentraciji transkripcijskega faktorja se zapolnijo vsa vezavna mesta v regulatornih sekvencah različnih genov. Ob manjši koncentraciji se zapolnijo le vezavna mesta z višjo afiniteto, ki hitro vežejo vse razpoložljive regulatorne molekule (slika 4). Poleg tega nekatera vezavna mesta aktivirajo, druga pa zavirajo prepisovanje genov. Posamični geni imajo lahko več ločenih kompleksnih regulatornih regij, ki lahko neodvisno druga od druge aktivirajo isti gen (slika 6 B).

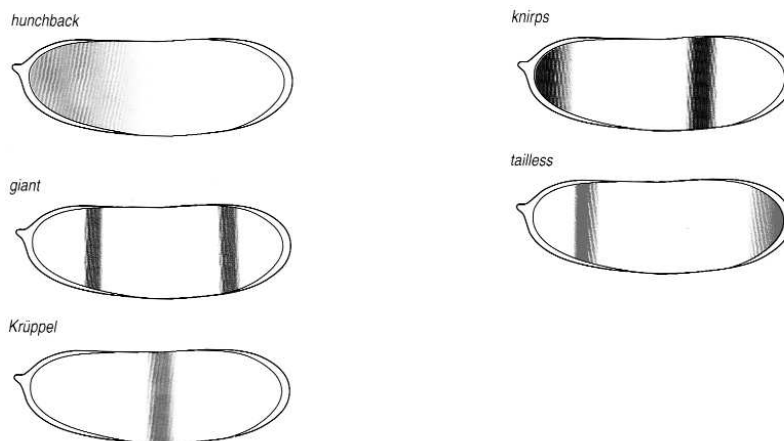


Slika 4: Koncentracije transkripcijskega faktorja je pomembna.

Shema prikazuje dva gena A in B (svetlejši in temnejši pravokotnik), ki imata regulatorno regijo z vezavnimi mesti za isti transkripcijski faktor (siv krogec). Gen A aktivira vezava štirih molekul transkripcijskega faktorja, gen B pa vezava dveh molekul transkripcijskega faktorja. Ker imajo vezavna mesta v regulatorni regiji gena B večjo afiniteto za vezavo transkripcijskega faktorja, se najprej zapolnijo vezavna mesta v tej regulatorni regiji. Tako se gen A aktivira le pri visoki koncentraciji transkripcijskega faktorja, medtem ko se gen B aktivira tudi pri nižjih koncentracijah. Pri zelo nizkih koncentracijah sta oba gena neaktivna. **Prirejeno po:** Wolpert, 1971.

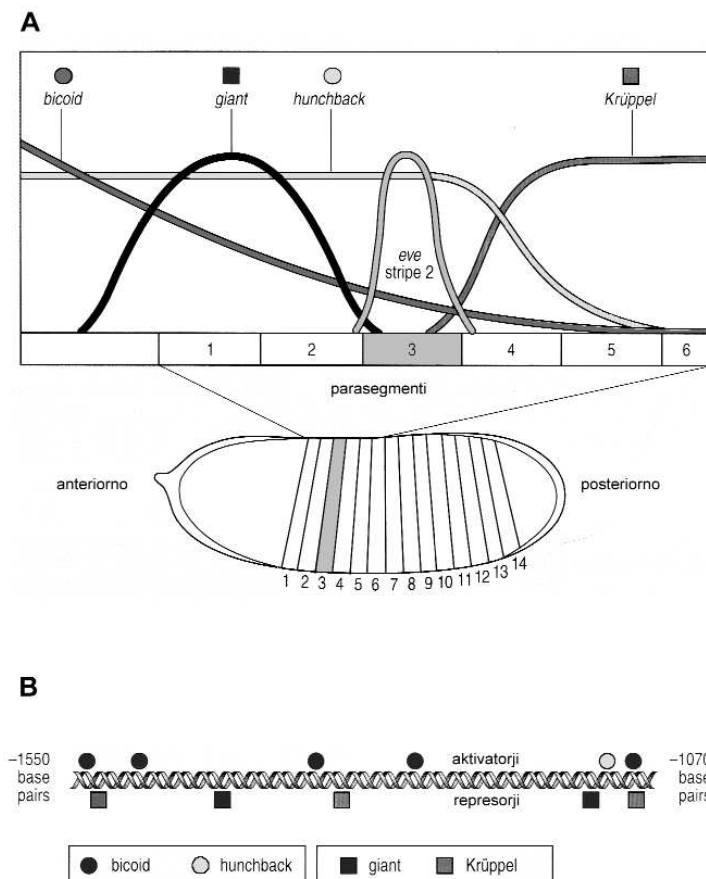
Prostorsko in časovno kompleksen vzorec v anteriorno-posteriorni osi

Prvi zigotični geni, ki se značilno aktivirajo v pasovih vzdolž anteriorno-posteriorne osi, se imenujejo presledkovni (gap) geni, saj njihove mutacije povzročijo, da del mušjega telesa enostavno manjka (gap). Materinski Bicoid v sprednjem delu embria sproži ekspresijo presledkovnega gena *hunchback*, le-ta pa v različnih koncentracijah aktivira presledkovne gene *giant*, *krüppel* in *knirps*. Ti trije se pojavljajo v posamičnih pasovih vzdolž anteriorno-posteriorne osi in se med seboj inhibirajo (slika 5). Tako vzajemno inhibicijo pogosto opazimo tam, kjer se morajo meje med področji izostriti.



Slika 5: Primeri področij aktivacije posamičnih presledkovnih genov
Povzeto po: Wolpert, 1998.

Presledkovnim genom, ki se pojavljajo v posamičnih širših pasovih, sledijo geni parnega pravila (pair-rule geni). Le-ti se aktivirajo v ožjih pasovih, ki nakazujejo bodočo enakomirno členjenost mušje ličinke (slika 3). Nekateri geni parnega pravila se aktivirajo v vseh lihih, drugi v vseh sodih parasegmentih. Zanimivo je, da njihova ekspresija ni odvisna od periodično ponavljajočih se regulatorjev, temveč je vsak pas aktiviran z drugo kombinacijo transkripcijskih faktorjev (slika 6 A). Tako morajo imeti geni parnega pravila več aktivacijskih regij, vsako od njih pa kontrolira več aktivatorjev in represorjev (transkripcijskih faktorjev iz skupin materinskih genov, presledkovnih genov in drugih genov parnega pravila; slika 6 B).



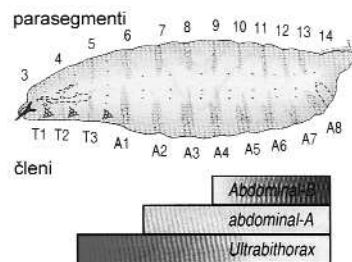
Slika 6: Kombinacija aktivatorjev in represorjev sproži izražanje genov v ozkih pasovih.

A: Grafični prikaz ravni različnih presledkovnih genov in materinskih proteinov v sprednjem delu embria. Nekateri delujejo kot aktivatorji, drugi kot represorji (glej B), skupaj pa regulirajo pas aktivacije gena *even-skipped* iz skupine genov parnega pravila.

B: Primer regulacijskega dela DNA, ki aktivira drugi pas aktivacije gena parnega pravila *even-skipped*. Geni parnega pravila se aktivirajo v več pasovih. Vsak pas ima lahko svojo regulacijsko regijo, različne regulacijske regije pa odgovarjajo na različne transkripcijske faktorje.

Povzeto po: Wolpert, 1998.

Presledkovni geni in geni parnega pravila skupaj aktivirajo homeotične gene, ki določajo identiteto posamičnih členov (slika 7). Tudi homeotični geni hranijo zapis za transkripcijske faktorje. Pravilna kombinacija izražanja homeotičnih genov vodi v razvoj tipičnega vzorca izrastkov na kutikuli, pravilno namestitev okončin posamičnih členih (glavinih okončin na glavi ter nog na vseh treh členih oprsja), določajo člene s krili, sestavo senzoričnih celic in diferenciacijo notranjih organov. Za razliko od presledkovnih genov in genov parnega pravila, ki prisotni le prvih nekaj ur razvoja, se izražanje homeotičnih genov ohranja večji del razvoja. Homeotični geni z zelo podobno sestavo so v različnem številu prisotni pri vseh raziskanih organizmih in povsod določajo lego struktur na anteriorno-posteriorni osi organizma.



Slika 7: Kombinacija homeotičnih genov določi značilnosti katerih telesnih členov se bodo razvile na določenem delu telesa.

Prikazana so območja aktivacije homeotičnih genov ultrabithorax, abdominalA in abdominalB

Povzeto po: Wolpert, 1998.

V izoblikovanem blastodermu se celične delitve nadaljujejo. Sledi fascinanten proces gastrulacije, ko celice mezoderma in endoderma urejeno potujejo s površine navznoter in oblikujejo notranje organe. Embrio se preoblikuje tudi navzven, osi simetrije postanejo prepoznavne. Čeprav so celice še podobne, nediferencirane, specifikacija treh zarodnih plasti (ekto-, mezo- in endoderma) celicam do neke mere omeji možen izbor razvojnih poti. Ektoderm pokriva površino in se kasneje razvije v povrhnjico, del ektoderma pa pridobi kompetenco za razvoj v živčno tkivo. Endodermalna cev v notranjosti oblikuje bodoča prebavila. Med obema se oblikuje mezoderm, ki se kasneje diferencira v mišice in žilje. V nadaljevanju razvoja se celice diferencirajo. Notranja diferenciacija celic se odraža na zunanji spremembi oblike. Celice pridobijo obliko, značilno za posamičen tip, in postopno oblikujejo organe.

Razvoj mehanosenzoričnih čutilnih organov

Živčno tkivo

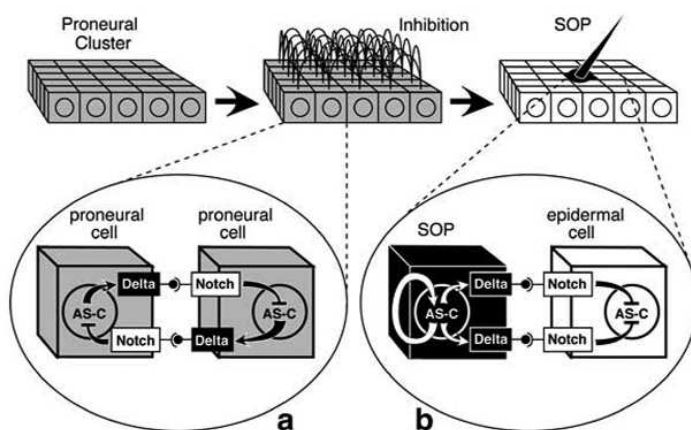
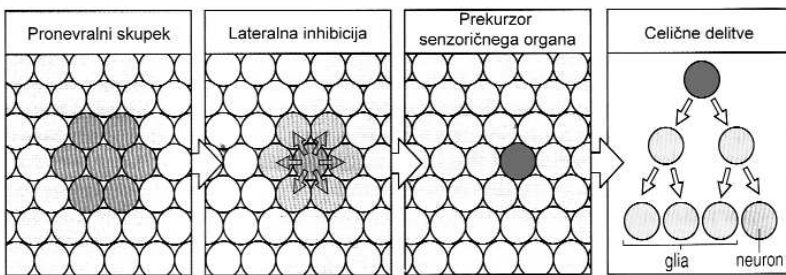
Med gastrulacijo del ektoderma pridobi kompetenco za razvoj v živčno tkivo. Različne kombinacije transkripcijskih faktorjev, ki smo jih spoznali v prvem delu razvoja kot specifikatorje pozicijske informacije, na podoben način kot pri specifikaciji osi diferencialno vklopijo gene, ki specifikirajo določen tip tkiva. Gene, ki specifikirajo tkivo za razvoj v živčevje, imenujemo pronevralni geni. Stabilno izražanje pronevralnih genov je potreben in zadostni pogoj, da se celice razvijejo v živčno tkivo. Vendar vse celice, ki začnejo izražati pronevralne gene, tega stanja ne ohranijo. Znotraj skupkov celic s pronevralnimi transkripcijskimi faktorji medcelična komunikacija določi posamične celice, ki bodo res sledile razvoju v živčne celice.

Lateralna inhibicija v pronevralnih skupkih celic

Medcelična komunikacija poteka s pomočjo snovi, ki jih celica izloča v okolje ali izpostavi na svoji površini na eni strani, in receptorskih molekul na površini kompetentnih celic na drugi strani. Ko se signalna molekula veže na receptorsko molekulo, le-ta spremeni obliko in tako sproži verigo reakcij, ki končno vodijo v spremenjeno ekspresijo genov v jedru receptorske celice. Kakšna bo reakcija receptorske celice, je odvisno predvsem od

mehanizmov, ki so v celici na razpolago ob sprejemu signalnih molekul. Prisotne molekule in njihove medsebojne povezave lahko "interpretirajo" prisotnost signalnih molekul v okolici.

Pri razvoju perifernega živčnega sistema medcelična komunikacija pomaga v skupku celic določiti tisto celico, ki se res razvije v receptorsko (živčno) celico. Celice v pronevralnih skupkih proizvajajo signalne molekule Delta in receptorje Notch. Če se ligand Delta veže na receptor Notch, Notch inhibira nadaljnjo produkcijo liganda Delta v svoji celici in sočasno inhibira diferenciacijo svoje celice. Tak vpliv med celicami je vzajemen in celice z začetno enako količino liganda in receptorja bi lahko vzdrževale krhko ravnotežje. Vendar ena celica v skupku verjetno naključno na površino izloči malenkost več liganda Delta in nekoliko bolj inhibira nastajanje proteina Delta v sosednjih celicah kot sosednje celice v njej. Krhko ravnotežje se poruši. Sinteza liganda Delta se pri izbrani celici ohranja in ojača, v sosednjih pa postopno slabi. Delta v izbrani celici tudi ohranja ekspresijo pronevralnih transkripcijskih faktorjev in celico usmeri na pot diferenciacije v živčno celico. Celica postane materinska celica senzoričnega organa (slika 8). Tak proces medcelične komunikacije, pri katerem ena diferencirajoča se celica zavre enak razvoj okoliških celic, imenujemo lateralna inhibicija. V njem je pogosto udeležen receptor Notch, ki, kadar je aktiviran, ohranja celice v nediferenciranem stanju.

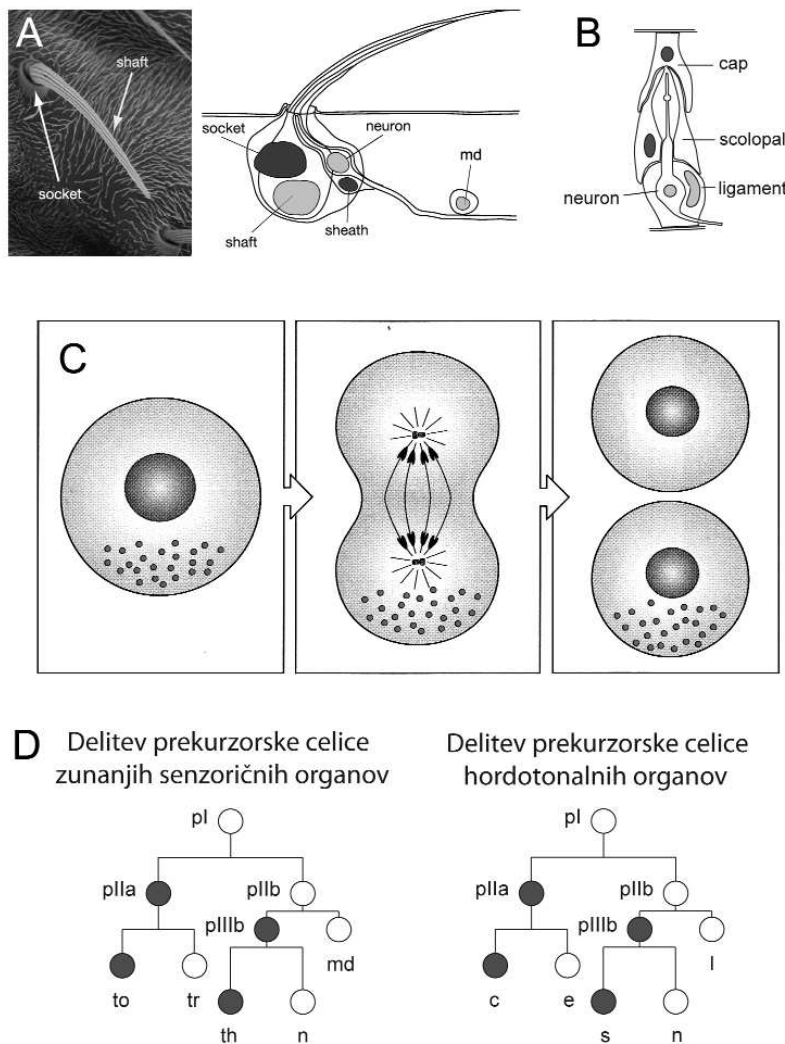


Slika 8: Lateralna inhibicija izbere posamične celice iz skupka za prekursorje živčnih celic.
zgoraj: Sprva skupina celic izraža pronevralne gene in vse so enako kompetentne za razvoj v živčno tkivo. Naključno ena celica prevzame pobudo in zavre diferenciacijo v živčno tkivo v sosednjih celicah. Izbrana celica postane prekursor senzoričnega organa, ki se oblikuje iz sestrskih celic po več zaporednih delitvah prekursorske celice.
spodaj: Vse celice v pronevralnem skupku na površini izpostavijo tako ligand Delta kot receptor Notch. Izbrana celica ohrani in ojača produkcijo Delta, ki vzdržuje aktivacijo pronevralnega gena (črna celica v krogu b). Zavrite celice prenehajo proizvajati ligand Delta in zavrejo prepisovanje pronevralnih genov.
Vir: Held:
<http://www.sdbonline.org/fly/lewheld/id36.htm>

Citoplazemske determinante v asimetričnih delitvah senzoričnih prekurzorjev

Žuželke imajo veliko zunanjih mehanosenzoričnih in kemosenzoričnih organov v povrhnjici, ki jih lahko opazimo na kutikuli kot čutilne dlake ali papile, pa tudi notranje mehanosenzorične (hordotonalne) organe pod povrhnjico, ki zaznavajo lego posamičnih delov živali. Vsi ti organi skupaj z očmi in motonevroni, ki oživčujejo mišice, tvorijo periferni živčni sistem žuželk.

Mehanosenzorični organi žuželk so zgrajeni iz ene živčne celice in treh podpornih celic (slika 9 A, B). Vse štiri celice so potomke ene senzorične prekursorske celice, ki se nekajkrat asimetrično deli, pri čemer citoskeletni elementi sodelujejo pri asimetrični porazdelitvi citoplazemskih regulatorjev kot tudi pri postavitvi delitvenega vretena in tako vodijo smer vsake delitve (npr. v ravnini epidermis, pravokotno na ravnino epidermisa, v določeni smeri glede na različne osi simetrije; slika 9 C). Stereotipen potek delitev, ki v nekaj korakih vodi do nastanka petih morfološko in funkcionalno očitno različnih celic, je zanimiv primer za razumevanje vloge asimetričnih delitev v razvoju.



Slika 9: Zaporedje asimetričnih delitev vodi v nastanek celic senzoričnih organov.

A) Fotografija čutilne dlake in shema celice, ki izgradi jamico (socket) in dlako (shaft), ovije nevron (sheath) ter sam nevron, ki organ oživčuje.

B) Shema celic, ki gradijo hordotonalni organ: nevron, katerega dendrit obdaja skolopalna celica, na vrhu ga pokriva čepica (cap), spodaj pa ga pritrjuje vezna (ligament) celica.

C) Shema asimetrične delitve prikazuje citoplazemske determinante, ki se zberejo v enem delu celice in se ob pravilni namestitvi delitvenega vretena neenakomerno razporedijo v hčerinski celici.

D) Zaporedje delitev, ki vodi v nastanek celic senzoričnih organov. Senzorična materinska celica zunanjih senzoričnih organov (pl) je nameščena v epidermisu. Prvič se deli tako, da obe potomki (pIIa in pIIb) ostaneta v epidermisu. Pred delitvijo se v prekursorski celici asimetrično porazdeli regulatorni protein Numb, tako da dobi prva (pIIa) aktivni Notch, medtem ko druga (pIIb) podeduje protein Numb. Drugo prekursorsko celico drugega tipa prepoznamo tudi po prisotnosti proteina Prospero – pomembnega regulatorja asimetričnih delitev.

Sledi delitev druge prekursorske celice drugega reda (pIIIb),

ki poteka pravokotno na ravnino epidermisa. Pri orientaciji mitotskega vretena pravokotno na ravnino epidermisa sodeluje produkt gena *inscutable*. Nastaneta dve celici, od katerih globlja celica podeduje (novonastali) Numb in več drugih regulatornih proteinov (Pon, Miranda, Prospero), zgornja, ki ostane v ravnini epidermisa, pa ohrani aktivni Notch (pIIIb). Numb pozitivna celica postane samostojna živčna celica manj poznanega tipa brez podpornih struktur (nevron z multiplimi dendriti – md), medtem ko se Notch pozitivna celica (pIIIb) kasneje ponovno deli. Sledi delitev prve prekursorske celice drugega reda (pIIa), ki prav tako poteka v ravnini epidermisa. Spet se asimetrično porazdeli protein Numb. Celica, kjer je aktivna Notch signalizacija, diferencira kot celica, ki gradi vdolbinico senzoričnega organa (tormogena celica ali socket cell); celica, ki podeduje Numb, pa diferencira kot celica, ki gradi čutilno dlako (trichogena celica). Zadnja nastopi delitev prekursorja tretjega reda (pIIIb). Spet se neenakomerno porazdeli regulatorni protein Numb. Celica, ki podeduje Numb in Prospero, postane živčna celica, ki oživčuje mehanosenzorični receptor, medtem ko Notch pozitivna celica diferencira kot ovojna (thecogena) celica, ki obdaja živčno celico.

Temnejše celice podedujejo receptor Notch, svetlejše celice podedujejo protein Numb (enako označena jedra v shemah A in B). n – nevron, to – tormogena celica (socket), tr – trichogena celica (shaft), th – thecogena celica (sheath), c – celica čepice (cap), e – epidermalna celica, s – skolopalna celica, l – vezna celica (ligament).

Povzeto po: A) Lai in Orgogozo, 2004; C) Wolpert, 1998; D) v skladu z Lai in Orgogozo, 2004.

Iz prekursorske celice nastane po štirih delitvah pet celic (slika 9 D). Zaporedje delitev prekursorske celice je enako pri vseh senzoričnih organih in je očitno že dolgo nespremenjeno ohranjeno v evoluciji. Ohranjena sta tudi dva glavna regulatorja – protein Numb in receptorski protein Notch. Numb se pred delitvijo asimetrično porazdeli v prekursorski celici in kot kretnica ob delitvah usmeri eno celico na alternativno pot diferenciacije, medtem ko Notch vodi drugo po “klasični” poti. Zanimivo je, da tako pri razvoju različnih senzoričnih organov kot v zaporednih delitvah na isti razvojni poti sodelujeta ves čas ista regulatorja. Njuna prisotnost je na različnih nivojih razvoja različno interpretirana, ker se v zaporednih delitvah pojavita skupaj z drugimi regulatorji oz. efektorskimi mehanizmi v celici. Tip senzoričnega organa, ki bo nastal, pa je določen že s pronevralnim genom, ki prekursorsko celico usmeri v razvoj v živčno tkivo. Zaporedje delitev senzorične prekursorske celice je natančno poznano (slika 9 D), čeprav ne poznamo vseh udeleženih regulatorjev in njihove vloge. Enako zaporedje delitev lahko opazujemo pri nastanku notranjih mehanosenzoričnih organov (hordotonalnih) organov (slika 9 D).

Povezava receptorjev s centralnim živčnim sistemom

Ko je receptorska celica determinirana, se poda na pot diferenciacije. Celično telo se oblikuje, izrasteta dendrit, ki zaznava dražljaje iz okolja, in akson, ki informacijo o dražljajih posreduje v centralni živčni sistem. Akson je dolg tanek izrastek celice, ki mora poiskati pravo pot do centralnega živčnega sistema in se tam povezati s pravimi postsinaptičnimi živčnimi celicami. Vedenje aksonskih rastnih stožcev vodijo receptorji na površini celice in efektorski mehanizmi v celici. Rastni stožci tipajo z malimi ročicami (filopodiji) po tkivu, in ko ujamejo prave molekule v svoji okolici, le-te aktivirajo receptorje v membrani rastnega stožca. Aktivirani receptorji prek celičnega skeleta vplivajo na premikanje in rast aksonov, sočasno pa lahko povzročijo spremembo genske ekspresije, ki vodi v sintezo in izpostavitve drugih receptorjev na površini. Tako rastni stožci korak za korakom iščejo pravo pot. Dotaknejo se iskane celice ali strukture, ki jo prepoznajo z receptorji, pomagajo si s kemijskimi gradienti in tipajo naprej. Akson, ki izrašča prvi, mora sam poiskati pravo pot s periferije do centralnega živčnega sistema. Vsi kasnejši aksoni sami premostijo le prostor do najbližje že uhojene poti, potem pa sledijo prvemu aksonu do centralnega živčnega sistema, kjer vsi poišejo pravo tarčo – postsinaptično celico.

V centralnem živčnem sistemu se zdi zaradi množice malih prepletenih izrastkov pot še posebno zapletena. Aksonskim stožcem zapleteno iskanje olajša koncentracijski gradient molekul, ki znotraj centralnega živčnega sistema zgradi neki koordinatni sistem. Pri določanju koordinatnega sistema v medio-lateralni smeri sodeluje protein Slit, ustrezne lege aksonskega stožca pa določajo različni tipi receptorja robo v rastnih stožcih aksonov. Katere tipe receptorjev robo izpostavi posamična živčna celica, pa kot prvi določajo pronevralni geni. Tako kot pronevralni geni usmerijo potomke senzorične materinske celice v diferenciacijo posamičnega tipa senzoričnega organa, tako posredno vplivajo tudi na lego aksona v centralnem živčnem sistemu. V medio-lateralni smeri pri tem sodelujejo receptorji tipa robo, v dorzo-ventralni smeri pa efektorski proteini še niso poznani.

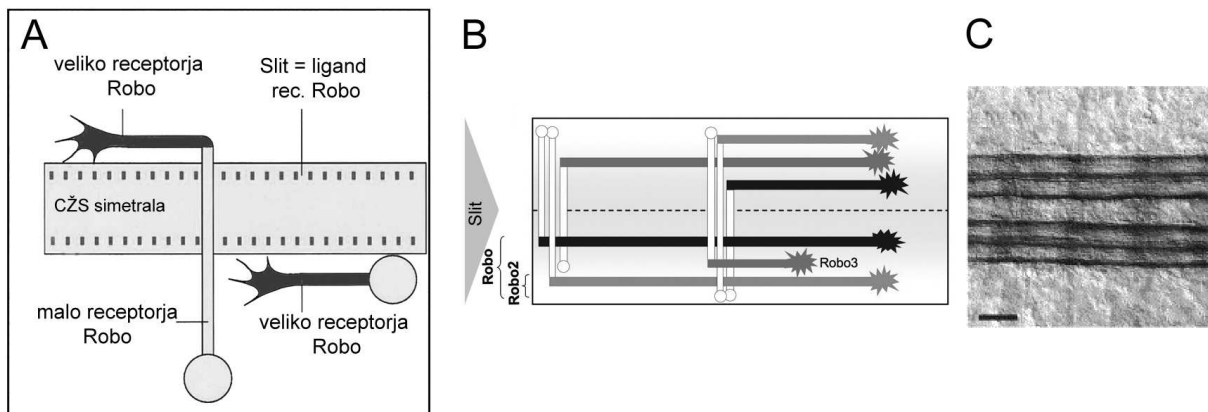
Protein Slit v zunajcelični prostor izločajo glia celic, ki so nameščene ob simetrali centralnega živčnega sistema. Slit počasi difundira proti robo centralnega živčnega sistema in po celi širini le-tega ustvari koncentracijski gradient, ki vpliva na gibanje rastnih stožcev

aksonov (slika 10 B). V membranah aksonskih rastiščev so sočasno nameščeni receptorji robo, ki jih ligand Slit aktivira in prek več signalnih proteinov vpliva na aktinske filamente in usmeritev rastiščev (slika 10 A).

Pri vinski mušici obstajajo trije receptorji robo: Robo, Robo 2 in Robo 3. Kombinacija različnih receptorjev robo v membrani je odvisna od zgodovine ekspresije genov v posamični celični liniji od pronevralnih genov naprej – nekateri rastiščev imajo le Robo, drugi Robo in Robo 2, spet tretji Robo in Robo 3, tisti, ki morajo prečkati simetralo in so namenjeni na drugo stran živčnega sistema, pa sploh nobenega od njih. Aktivirani receptor Robo namreč ne dovoli rastiščevu, da bi prečkal simetralo živčnega sistema. Živčne celice, ki izražajo le Robo, rastejo v področje blizu sredine (simetrale) centralnega živčnega sistema, Robo 3 usmeri rastiščev v intermediarni del centralnega živčnega sistema, Robo 2 pa v lateralni del (slika 10 C). Aksonski rastiščev, ki potujejo z ene na drugo stran centralnega živčnega sistema, na površini ne izpostavijo nobenega receptorja robo, dokler niso dosegli nasprotni strani. Po prehodu središčne črte, pa se sproži izražanje receptorja Robo, ki rastiščev aksona usmerijo stran od simetrale (slika 10 A).

Sklep

Na kratko smo spoznali pot, ki vodi od totipotente jajčne celice, predhodnice vseh celičnih tipov v mnogoceličnem organizmu, do posamične diferencirane in kompleksno oblikovane celice. Genski material nosi zapis, ki vodi razvoj. Deterministične poti zagotavljajo razvoj



Slika 10: Sistem Robo – Slit s pomočjo koncentracijskega gradienta določa oddaljenost rastiščev aksona od simetrale centralnega živčnega sistema.

Shemi in slika prikazujejo izsek iz centralnega živčnega sistema vinske mušice gledan od zgoraj. Simetrala centralnega živčnega sistema poteka po sredi z leve proti desni. Ob simetrali, kjer protein Slit nastaja, je njegova koncentracija največja in se manjša proti robovoma.

A) Posebne celice ob simetrali centralnega živčnega sistema (sivi pas) izločajo Slit. Aksoni, ki ne smejo prečkati simetrale, na površini izpostavijo veliko receptorja Robo (temen del aksona). Aksoni, ki morajo prečkati simetralo, sprva nimajo Robo v membrani (svetel del aksona). Ob prehodu simetrale se robo aktivira in nastali protein Robo zagotovi, da aksonski rastiščev ostane na nasprotni strani in ne vijuga sem in tja čez simetralo.

B) Poleg receptorja Robo se pri vinski mušici pojavljata še sorodna receptorja Robo 2 in Robo 3, ki določata koncentracijo molekule Slit, pri kateri se rastiščev obrne v longitudinalno smer, in na ta način določata oddaljenost živčnih vlaken od simetrale.

C) Slika centralnega živčnega sistema z obarvanimi longitudinalnimi snopi živčnih vlaken. Na vsaki strani simetrale se pojavljajo trije snopi, njihovo lego pa določajo ligand Slit in receptorji Robo, Robo 2 in Robo 3. Merilce 5 μm

Povzeto po: A) Simpson in sod., 2000; B) Santiago-Martinez in sod., 2006; C) Wills in sod., 2002.

materi oziroma očetu podobnega organizma, kar omogoča ohranjanje vrste. Snovi v celici niso razporejene naključno in ob delitvi potomke podedujejo različno zalogo regulatornih molekul. Tako lahko kompleksno prepletene kaskade genov preko svojih produktov postopno usmerjajo celico v diferenciacijo. Poleg zaprtega kroga med geni in proteini, ki spet vplivajo na aktivnost genov, pri razvoju sodeluje tudi okolje. Signali iz okolja lahko prav tako vključijo ali izključijo posamične gene in bistveno vplivajo na diferencialno gensko aktivnost in na fenotip nastajajoče živali. Svoje k raznolikosti fenotipov prispeva tudi naključje. Kljub temu da je v laboratorijskem okolju težje spoznavati nedeterministične vplive okolja na izražanje genov in posledično fenotip, je poznanih veliko primerov le-tega – od od težnosti odvisnih osi simetrije žabjega embria do od mehanske stimulacije odvisnega razvoja kosti pri človeku. V svetu, kjer človek vedno bolj spreminja tudi lastno okolje, se raziskave in poskusi vedno bolj usmerjajo v raziskovanje vpliva okolja na diferencialno gensko ekspresijo v ontogenezi in na fenotip nastajajoče živali.

Literatura

Gilbert S. F. 2006. *Developmental biology*, 8th edition. Sinauer Associates Publishers, Sunderland.

Held, L. I. Jr.: <http://www.sdbonline.org/fly/lewheld/id36.htm>.

Lai E. C., Orgogozo V. 2004. A hidden program in *Drosophila* peripheral neurogenesis revealed: fundamental principles underlying sensory organ diversity. *Developmental Biology*, 269: 1–17.

Santiago-Martínez E., Soplop N. H., and Kramer S. G. 2006. Lateral positioning at the dorsal midline: Slit and Roundabout receptors guide *Drosophila* heart cell migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 12441–12446.

Simpson J. H., Kidd T., Bland K. S., Goodman C. S. 2000. Short-range and long-range guidance by Slit and its Robo receptors: robo and Robo2 play distinct roles in midline guidance. *Neuron*, 28(3): 753–766.

Wills Z., Emerson M., Rusch J., Bikoff J., Baum B., Perrimon N., Van Vactor D. 2002. A *Drosophila* homolog of cyclase-associated proteins collaborates with the abl tyrosine kinase to control midline axon pathfinding. *Neuron*, 36(4): 611–622.

Wolpert L. 1971. Positional information and pattern formation. *Current topics in developmental biology*, 6(6): 183–224.

Wolpert L., Beddington R., Brockes J., Jessell T. 1998. *Principles of Development*. Oxford University Press, Oxford.