
Lothar Jaenicke

Signale der Zelldifferenzierung

Es ist beeindruckend zu verfolgen, wie sich aus einer Zelle ein Organismus entwickelt. Die Information des Genoms wird auf Teile des Cytoplasmas übertragen, organisiert dieses und gibt damit neue Funktion. Jedoch wird nicht in jeder Zelle das ganze Genom genutzt, sondern es bleibt ein sehr erheblicher Teil abgedeckt und stumm. Die differenzierte Zelle findet sich dann auf Grund von Molekularsignalen und Signal/Rezeptor-Wechselspiel mit anderen zusammen und bildet so organisierte vielzellige Formen, von spezialisierten Geweben und Organen bis zum vollständigen Organismus.

Die Untersuchung dieser Vorgänge hat gezeigt, daß sie im Grundprinzip bei Pflanzen und Tieren, bei niederen und höheren Eukaryonten gleich ablaufen. Es ist daher verständlich, daß sie vornehmlich an einfachen Organismen, stellvertretend für die komplexeren, studiert werden, obgleich das Interessensziel letzten Endes dem Menschen gilt, um im physiologischen und pathologischen Geschehen Fragen des eigenen Lebens zu beantworten. Pflanzen haben vor Tieren den Vorteil, daß sie weniger Ansprüche an das Milieu stellen und manche innere Organisation kenntlicher zeigen. Dagegen sind sie allerdings weniger leicht zu manipulieren, da Zellwand und andere Strukturen schwerer zu durchdringen sind, dadurch das Innere schlechter zugänglich ist und überhaupt die Chemie und Biochemie pflanzlicher Zellen noch vielfach in den Anfängen steckt.

Volvox, der erste arbeitsteilige Organismus

Wir haben als Objekt dieser Untersuchung von Differenzierungsvorgängen die vielzellige Grünalge *Volvox carteri* (Abb. 1) gewählt.'

Dieser Organismus besteht nur aus zwei Zelltypen: den wenigen Gonidien, das sind die generativen Zellen, aus denen sich die Nachkommenschaft der nächsten Generation entwickelt, und den sie als Hülle umgebenden zahlreichen somatischen Zellen. Diese sind, nach dem Bauplan der einzelligen Grünalge *Chlamydomonas*, die der einfachste Vertreter der ganzen Gruppe ist, mit 2 Geißeln und einem Augenfleck versehen, die Richtungsbewegung des Gesamtorganismus nach koordiniertem Schema ermöglichen. Sie sind so weit differenziert, daß Rück-

entwicklung zu generativen Zellen im Normalfall nicht mehr möglich ist. Sie müssen also nach Ende ihrer Funktion, als Hülle des Elternsphäroids der Tochter-Generation Schutz und Ernährungsmöglichkeit zu geben, absterben. Die Gonidien dagegen sind in einem weiteren Sinn partiell unsterblich: Sie teilen sich in systematischer Weise, wobei ein Teil der so entstehenden Zellen im Verbund zu Gonidien der nächsten Generation determiniert und beiseitegestellt werden, und den somatischen Zellen, die dabei, nach einer geordneten Wanderung und Umdisponierung im

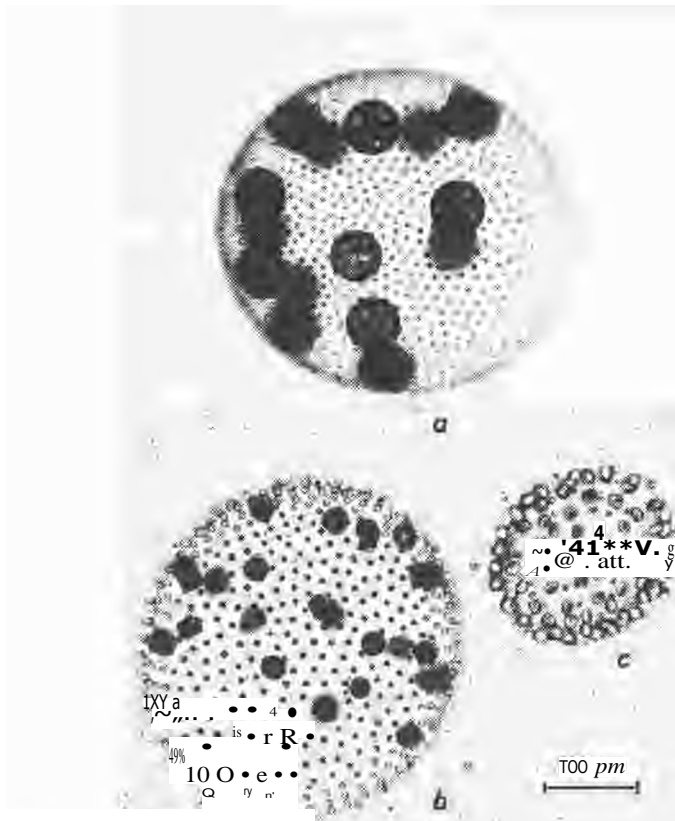


Abbildung 1

Polvox carteri f. nagariensis

Vegetatives Sphäroid: oben

Weibliches Sphäroid: unten links

Männliches Sphäroid: unten rechts

Vorgang der Inversion, den Schutz um die neuen Gonidien und somit den Sphäroiden der Filialgeneration im Inneren, eine differenzierte somatische Hülle bilden.

Dies war bereits den beschreibenden Phykologen seit Jahrzehnten bekannt; über die biochemischen und molekularen Prozesse jedoch, die dieser Phänomenologie zugrunde liegen, wußte man fast nichts, wie auch über eventuelle Struktur- und Funktionsmoleküle so gut wie nichts bekannt war. Wir halten es deshalb für ein attraktives Projekt, die Differenzierung an diesem Organismus modellhaft zu untersuchen, zumal die Induktion und sexuelle Fortpflanzung bei ihm durch einen chemischen endogenen Stoff (außer physiologischem Streß), dem „Sexualinduktor“, initiiert werden kann.

Das Differenzierungs-Pheromon

Dieser Sexualinduktor ist ein Glykoprotein von ungewöhnlich hoher Wirksamkeit. Er wird vom reifenden Männchen-Stamm gebildet und beim Zerfall der Spermienpakete in das Medium abgegeben, aus dem wir ihn isolieren und reinigen konnten.⁴ Der Reinigungsvorgang umfaßt die in *Tabelle I* zusammengefaßten Schritte.

Tabelle I:
Reinigung des Induktors

	rel. Aktivität
(1) Filtriertes Medium	1
(2) Adsorption an CM-Sephadex Elution mit 0.15 M NaCl. Dialyse	9
(3) Chromatofokussierung Elution mit 0.01 M Carbonat/Borat, pH 10.5	200
(4) HPLC-RP-Chromatographie Elution mit 0.1% TFE im CH ₃ CN-Gradienten	350

Das Reinprodukt besteht aus mindestens zwei, durch HPLC-Verfahren trennbaren, Isoinduktoren gleicher Potenz, aber durch unterschiedliche Glykosylierung verschiedener Molekularmasse (28.5 bzw. 27kDa).⁵ Die Gesamt-Aminosäure- und -Zucker-Analyse des α - und β -Isoinduktors zeigt *Tabelle II*.

Obgleich wir die Art und Qualität der glykosylierenden Oligosaccharide noch nicht kennen, läßt sich vermuten, daß der wesentliche Unterschied nicht in den N-glykosidisch gebundenen Zuckern besteht, denen

Tabelle II:

A) Aminosäure-Analyse des α - und β -Induktors
(mol/mol Induktor)

	α	β		α	β		α	β
Asx	19	19	Gly	13	14	Leu	16	16
Thr	13	14	Ala	17	16	Tyr	4	4
Ser	20	21	Cys	5	5	Phe	11	11
Glx	18	18	Val	12	12	Lys	8	8
Pro	10	10	Met	2	3	His	1	1
Hyp	0	0	Ile	8	8	Arg	10	10

B) Zuckeranalyse des α - und β -Induktors
(mol/mol Induktor)

	α	β		α	β		α	β
Ara	1	1	Man	15	15	GlcNAc	8	8
Xyl	12	12	Gal	11	9			

wohl die N-Acetylglukosamin- und Mannosereste zuzuordnen sind, sondern in den 0-glykosidisch gebundenen Arabinogalaktan- und Xylanresten.

Daß *Volvox* in der Lage ist, sowohl N-glykosidische wie auch 0-glykosidische Glykoproteine zu bilden, haben wir durch *in vivo* und *in vitro*-Experimente bewiesen: Die Hemmung der Induktorbildung durch Tunicamycin kann als Indiz für den ersten Reaktionstyp genommen werden.⁶ Versuche mit Polvox-Membranpartikeln haben darüber hinaus gezeigt, daß diese — durchaus in Übereinstimmung mit den Vorgängen in anderen Eukaryonten — die Transglykosylierung von Nucleosiddiphosphat-Zuckern (UDP-Glukose, UDP-N-Acetylglukosamin, GDP-Mannose) mittels Dolicholphosphat als Transportmetaboliten und die primäre Ausbildung von verzweigten, längeren Oligosaccharidspezies katalysieren,⁷ die dann, nach Übertragung auf die spezifischen Acceptor-Asparaginreste, durch eigene Glykosidasen auf die endgültige Form getrimmt werden. Inzwischen wurde auch eine solche Trimming Glukosidase I in *Volvox* charakterisiert.⁸

Auch die 0-Glykosylierung wurde in Polvox-Mikrosomenpräparationen am Beispiel der Arabinose-Übertragung nachgewiesen.⁹ Die Acceptor-Peptide müssen gehäufte Hydroxyprolylgruppen enthalten, wie sie im natürlichen Verband z. B. im Extensin vorkommen und auch in einigen Strukturproteinen von Grünalgen nachgewiesen sind.¹⁰

Allerdings enthält der Induktor bemerkenswerterweise kein Hydroxyprolin. Seine Aminosäureanalyse (vgl. *Tabelle II*) ist recht unauffällig, sieht man bei einem so stark basischen Protein ($pI = 10.5$) von dem hohen Prozentsatz saurer Aminosäurereste ab. Diese müssen demnach weitgehend amidiert sein. Damit stimmt die Spaltung mit der Staphylokokken-Protease V8 überein, die Asparaginsäure- und Glutaminsäure-spezifisch ist: Es entstehen nur 8 oder 9 Fragmente, die übrigen (29) sauren Reste sind verschlossen, so daß ein Netto-Überschuß von mindestens 10 basischen Resten bleibt, der sehr wohl die Ladungseigenschaften des Induktors erklären kann.' Außerdem hat die Sequenzanalyse von peptidischen Fragmenten des deglykosylierten Induktors, z. B. in dem 16-Peptid ... Phe Gln Ser Phe Leu Ser Pro Thr Ile Ser Asn Leu Asn Phe Ser Lys ... nur Glutamin- und Asparagin-Reste ergeben. Diese Sequenz enthält zudem eine Asn-X-Ser-Sequenz, die als potentielle N-glykosidische Zuckerbildungsstelle angesprochen werden könnte. Wo und wie allerdings die Arabinose-, Xylose- und Galaktosereste unterzubringen sind, ist bisher noch unklar.

Mit Hilfe eines von dem 16-Peptid abgeleiteten 27-Nukleotids als Sonde wird zur Zeit versucht, aus einer cDNA-Bank das Induktorgen zu erhalten, um die Totalsequenz des Wirkmoleküls und eventuell dieses selbst in größeren Mengen für weitere proteinchemische und molekularbiologische Untersuchungen zu gewinnen.

Vom Signal zum Mechanismus der Zelldifferenzierung

Die Wirkungsweise des Induktors ist unbekannt. Bemerkenswert ist, daß ein Gonidium erst unmittelbar vor der 1. Teilung induktionskompetent wird." Davor läßt sich der Induktor - trotz der außerordentlich hohen Bindungskonstante (er hat seine biologische Wirkschwelle bei $10^{-16}M$) - auswaschen. Im weiteren Vorgang werden die dann angelegten Tochttersphäroide (also der nächsten Generation) - proportional zur Induktorkonzentration - induziert. Es ist aber, bei entsprechend sensiblen Stämmen auch möglich, durch physikalischen oder chemischen Streß die Gonidien der jeweiligen Generation zu induzieren. Solche Einwirkungen sind kurzzeitige Temperaturerhöhung (Hitzeschock),¹² pH-Senkung oder sehr kurze Einwirkung von Glutardialdehyd oder Formaldehyd in reversibler, permeabilisierender Bindung z. B. als Anthranilsäureformalid.¹³ Einen solchen Versuch zeigt *Abb. 2*.

Im Rahmen der Vorstellung, daß der sexuelle Zyklus der primäre Vorgang ist, der durch eine vom Genom kommende Information ausgelöst wird, und der nicht-sexuelle, vegetative Zyklus eine Sparmaßnahme, die unter günstigen, nicht-Streßbedingungen vorteilhaft ist, könnte man po-

studieren, daß Hitzeschock(proteine) oder die einwirkenden Chemikalien einen Repressor blockieren oder inaktivieren, der das Signal „sexuelle Gonidienteilung“ abdeckt. Dieses stellt die „Teilungsuhr“ so, daß sie über die 6. Teilung der Gonidien hinweggeht und dann erst die - je nach dem Geschlecht des Stammes - eigentümliche inäquale Zellteilung erfolgen läßt.³ Diese ist beim weiblichen Stamm die 7., beim männlichen die 9. Teilung, so daß ca. 32 Eiblastomere, bzw. 256 Spermienblastomere, aus denen sich schließlich durch weitere Teilungen (ohne Inversion) die Spermienpakete - mit dem Induktor in den Zwickeln zwischen den Spermienköpfen - bilden, wobei auch charakteristische Änderungen im Vorgang der Inversion stattfinden, so daß die geschlechtsreifen weiblichen Sphäroide mit ihrer die Eier umgebenden somatischen Hülle den vegetativen in der phänotypischen Anordnung gleichen, während bei den männlichen die in Gleichzahl vorhandenen Spermienpakete und somatischen Zellen gemeinsam im Sphäroid-Mantel liegen (vgl. *Abb. 1*). Hier ist die inäquale Determinierungsteilung zugleich die letzte in der Entwicklung. Die Spermien sind, wie die somatischen Zellen, endgültig differenziert, während die Eier, die, wie die vegetativen Gonidien, haploid

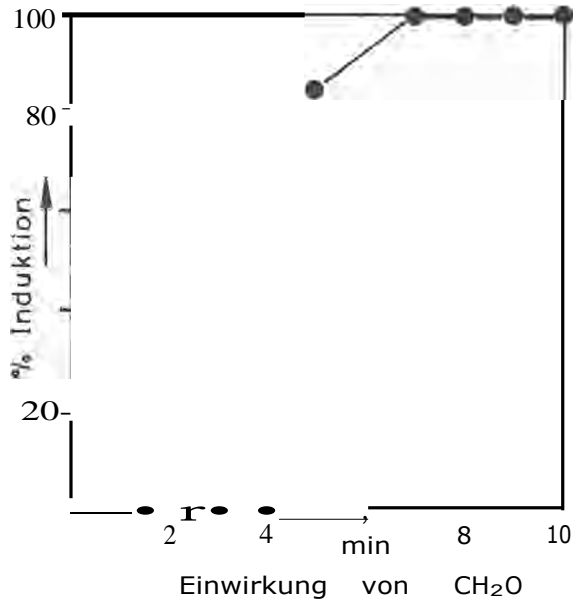


Abbildung 2

Induktion von *Polvox carteri* durch Anthranilsäure-Formalid

sind, wieder in einen vegetativen Kreislauf einmünden können, wenn sie unbefruchtet bleiben. Auch dies verträgt sich mit der Vorstellung, daß Sexualität ursprünglich, vegetative Fortpflanzung dagegen eine entwicklungsgeschichtlich spätere Vereinfachung ist.

Es ist also ein interner Zählmechanismus oder Zeitgeber, der durch die Schockwirkungen beeinflusst wird und der im vegetativen Zustand auf frühzeitige Differenzierung gestellt ist. Damit wird auch der Induktor in diesen Zählmechanismus eingreifen, und man hat zu postulieren, daß er im Sphäroid spezifisch gebunden wird und unmittelbar oder über enzymatisch-katalysierte Verstärkungsvorgänge am Genom bzw. dem Repressor/Operator-System angreift.

Proteinphosphorylierung im Polvox-Sphäroid

Auf der Suche nach differenzierungstypischen Vorgängen haben wir vor allem nach Signalen und Enzymen der Protein-Modifizierung gesucht. Eine sehr auffallende Beobachtung ist, daß sich das Muster phosphorylierter Proteine unmittelbar nach Zugabe des Induktors zu Sphäroiden der Entwicklungsstufe I* sehr charakteristisch ändert.¹ In diesem Stadium ist ein hochmolekulares (Glyko)protein (pp290) stark an Serinresten phosphoryliert. Sofort nach Zugabe des Induktors (technisch ist die Messung erst ca. 2 min später möglich) fällt dieser Wert — je nach Menge des Induktors, aber bei für 100% Induktion ausreichender Menge — auf 55% des ursprünglichen Werts ab (vgl. *Abb. 3*).

Im Lauf einiger Stunden entstehen neue phosphorylierte (Glyko)proteine, pp120 und pp240, in steigender, jedoch verhältnismäßig sehr viel geringerer Menge. Wieweit dies in direktem Zusammenhang mit der Induktion selbst steht, ist eine noch ungelöste Frage, der mit Hilfe pp290-spezifischer Antikörper nachgegangen werden soll.

Ein solches Antiserum vermag mit der Induktion zu interferieren, wie aus der Zusammenstellung in *Tabelle III* hervorgeht. In einem »dot-blot« Verfahren wurde gezeigt, daß diese Antikörper (³²P-markierte) lösliche (Glyko)proteine von Zellextrakten etwa proportional der Induktionshemmung binden. Dies kann auf einen gemeinsamen Angriffspunkt (direkt als Rezeptor; indirekt als konvergierendes Folgeprodukt) zurückgeführt werden, ist aber zur Zeit noch jeder Deutung offen. Auch die histologische Lokalisierung des Bindeorts durch Fluoreszenz- oder

* Wir unterscheiden die folgenden Entwicklungsstadien:

I = vom Schlüpfen bis zum Beginn der Teilung der Gonidien; II = Gonidienteilungen (ohne Volumenzunahme); III = Inversion; IV = Reifung der Tochttersphäroide (Volumenzunahme durch Synthese von „Matrix“-Material); V = Schlüpfen.

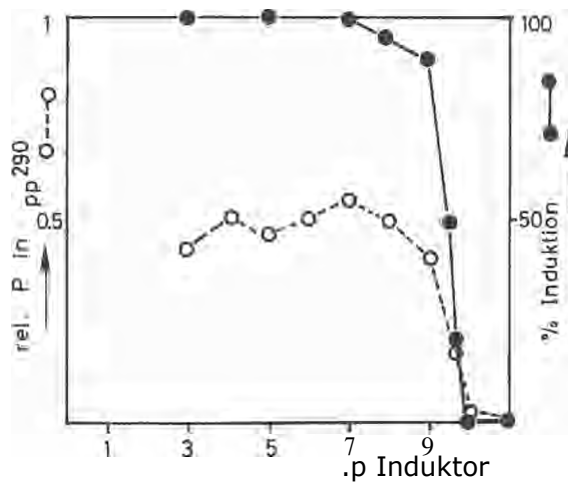


Abbildung 3
Phosphorylierung von Matrix-Glykoproteinen vor und nach Zugabe von Induktor

Tabelle III:
Monoklonale Antikörper (Maus) gegen angereinigtes Phosphoprotein pp290

Nr.	Klon	Klasse	Hemmung der Induktion (%)	Blot-Bindung von löslichen (Glyco)proteinen der Sphäroide (%)
1	1/2C8	μ	100	12.6
2	1/3H9	y3	70	6.6
3	1/6E1	y2b	45	4.5
4	1/7C1	y2b	60	5.4
5	1/8G8	y2b	50	7.2
6	2/1D11	.t	35	5.7
7	2/1H8	μ	70	17.7

Enzym-markierte Antikörper ist geplant. Ein auffallender Prozentsatz der gut bindenden Antikörper sind IgM; dies mag mit den vielfachen Bindestellen dieser Klasse zusammenhängen.

Die Glieder einer Kontroll-Kaskade — Nachweis und Beschreibung

Phosphorylierung von Proteinen erfordert Proteinkinasen. Diese sind häufig einer „second messenger“-abhängigen Signalkaskade angeschlossen, in der cyclisches Nukleotid, vor allem 3', 5'-cyclo-Adenylat (cAMP), der Signalgeber ist, dessen Konzentration auf der einen Seite durch die bildende Adenylatcyclase, auf der anderen durch die spaltende Phosphodiesterase geregelt wird. Deren Aktivität wiederum wird durch Calcium-Ionen, Guanylate und andere regulatorische Moleküle kontrolliert.

Die Beteiligung dieser Kontrollmoleküle an der Differenzierung und Induktion von *Volvox* ist nicht direkt bewiesen. Eine ganze Anzahl Hemmstoffe solcher Regelkreise, wie Forskolin oder Phorbolster haben unter den bisher gewählten Bedingungen keinen Einfluß auf den Induktionsvorgang; dagegen kann sowohl durch den PDE-Hemmstoff IMBX wie durch den Calmodulinhemmstoff Trifluoperazin die Induktion beeinträchtigt werden, wie die Werte der *Tabelle IV* erkennen lassen.¹⁴

Tabelle IV:

Wirkung von Hemmstoffen auf Phosphorylierung und Induktion

Substanz	Konzentration	Proteinphosphorylierung	Induktion
	—	100%	100%
Isobutylmethylxanthin(IMBX)	0.35 µg/ml	65	5
Trifluoperazin	0.3 µg/ml	10	5
Monensin	6 µM	55	20
Tunica.mycin	0.2 µg/ml	60	0
Concanavalin	3 µg/ml	100	0

Nach diesen indirekten Hinweisen haben wir nun versucht, die wesentlichen Enzyme einer Proteinphosphorylierungskaskade in *Volvox*-Zellen nachzuweisen und ihre — oder ihrer Produkte — Veränderung im Laufe der Entwicklung in Abwesenheit und in Gegenwart des Induktorglykoproteins zu verfolgen. Es sind dies cAMP als Sekundär-Signal, Adenylatcyclase als Enzym der Bildung von cAMP und 3', 5'-Phosphodiesterase als Enzym der inaktivierenden Hydrolyse von cAMP. Verwendet wurden die zellulären Elemente des Sphäroids und die Matrix, in die die Gonidien eingebettet sind und die durch die somatischen Zellen begrenzt wird. Diese Matrix ist sehr reich an Kohlenhydraten: Arabinose, Mannose, Galaktose, auch N-Acetylglukosamin und hat durch

Sulfatierung oder Uronsäuren einen sauren pI-Wert. Sie ist ein bislang noch nicht definiertes Gemisch von Polysacchariden und Proteinen. In ihr finden sich auch cAMP und einige der genannten Enzymaktivitäten. Die Zellen lassen sich durch Siebung und Fraktionierung in nahezu reine somatische Zellen und Gonidien auftrennen, an denen allerdings stets noch Reste der Matrix hängen. Die isolierten Gonidien können zu kompletten, wenngleich in der ersten Generation noch nicht gut entwickelten, Sphäroiden regenerieren und auch durch den Induktor induziert werden.³ Dazu scheinen jedoch weitere Faktoren aus der Matrix nötig zu sein, worauf die Ergebnisse der *Tabelle V* schließen lassen.⁴ Es ist auch möglich, daß das saure Matrixmaterial, ähnlich wie Heparin bei tierischen Zellen, den basischen Induktor bindet und an die Zellen heranbringt. Tatsächlich läßt sich der Induktor durch Matrixmaterial „titrieren“, wie der durch *Abb. 4* illustrierte Versuch beweist.

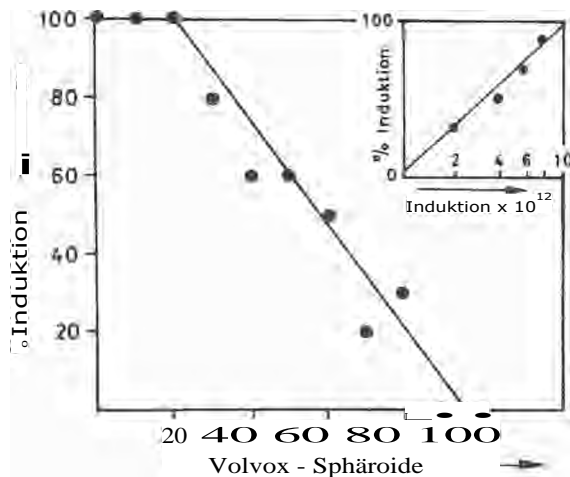


Abbildung 4

Bindung des Induktors durch Polvox-Sphäroide

eingesetzt: Konzentrationsabhängigkeit der Induktion

In diesem Fall wäre eine Konzentration aus dem Medium um das bis zu 1000-fache zu erwarten.

Mit Hilfe von neu ausgearbeiteten quantitativen Bestimmungsverfahren für cAMP, von denen eines ein RIA (ELISA) mit monoklonalen Antikörpern gegen das succinylierte Molekül ist, das andere ein fluorome-

Tabelle V:

Induktion „nackter“ Gonidien von *Volvox carteri*

Bedingungen	Induktion (%)	Bedingungen	Induktion (%)
<i>Kontrolle</i>		<i>Versuch 1</i>	
Komplette Sphäroide		Isolierte, gewaschene Gonidien plus gewaschene Hüllen	
auf Stärke-Gel	100	auf Stärke-Gel	80
in 1 ml SVM	100	in 1 ml SVM	50
in 10 ml SVM	100	in 10 ml SVM	40
<i>Versuch 2</i>		<i>Versuch 3</i>	
Isolierte, gewaschene Gonidien		Isolierte, gewaschene Gonidien plus isolierte Hüllen, belüftet	
auf Stärke-Gel	50	in 1 ml SVM	0
in 1 ml SVM	20	in 10 ml SVM	0
in 10 ml SVM	5	in 1 ml SVM, alle 2 h gewechselt	5

SVM = Standard-*Volvox* Medium

trisches HPLC-Verfahren^{*}, wurde gezeigt, daß cAMP sowohl in den Zellen wie in der Matrix und sogar im (axenischen) Medium enthalten ist.¹⁶

Die Konzentrationsänderungen im Lauf der Entwicklung sind nach den bisherigen Versuchen in *Abb. 6* dargestellt. Man erkennt kurz vor dem Einsetzen der Teilungsphase II einen raschen und hohen Anstieg des „second messenger“ in den induzierenden Zellen, nicht jedoch in den sich vegetativ entwickelnden, in denen der cAMP-Spiegel ziemlich konstant bleibt. In Gegenwart des Induktors dagegen steigt in Stunde — 4 das Ni-

* Der RIA benutzt ausreichend bindende Antikörper (IC_{50} [cAMP]: $1.8 \times 10^{-8}M$ [Succinyl-cAMP]: $3.5 \times 10^{-9}M$), gibt aber im Routineverfahren zuverlässige Werte erst ab $1 \times 10^{-8}M$ cAMP, linear bis zum 100-fachen (*Abb. 5*).⁵ Er ist damit im gleichen Bereich, wie das Fluoreszenz-HPLC-Verfahren nach Umwandlung der Adenin-Derivate in fluoreszierende Ethenium-Verbindungen mittels Chloracetaldehyd.¹⁶ Bindeproteine der Zellextrakte interferieren in unterschiedlichem Maß, so daß beide Verfahren zur gegenseitigen Kontrolle verwendet werden.

veau auf das 5- bis 8-fache an. Auch hier ist unbeantwortet, ob dies im direkten ursächlichen Zusammenhang steht und ob es auf einer vermehrten Neusynthese oder einer verminderten Spaltung beruht.

Nehmen wir den Sexualzyklus als eine Reaktion einer Not- oder Streßsituation an (die Norm der Natur) und den vegetativen Zyklus als eine Luxus-Reaktion, läge die Erhöhung des cAMP-Spiegels in der Linie, die man auch von Bakterien kennt, bei denen cAMP ein Krisensignal der Nährstoffknappheit zur Umschaltung auf zusätzliche Ressourcen darstellt. Die für die Reaktionskette notwendige, schwer direkt nachzuweisende Adenylatcyclase ist membrangebunden;⁷ sie bildet aus ATP cAMP, auch mit isolierten und intakten, für die Substratnukleotide undurchlässigen Zellen. Die relative Konzentration ist in den Membranen somatischer Zellen etwa das Dreifache der Gonidienmembranen in vegetativen Sphäroiden; etwa das 20-fache nach Induktion. Durch Zellaufschluß gewonnene Membranpräparate, die den Substraten besser zugänglich sind, haben entsprechend höhere Aktivität; solubilisiert man das Enzym durch 0.2% Lubrol, sinkt seine Aktivität stark. Das isolierte und durch Affinitäts- und hydrophobe Chromatographie auf das 80-fache angereicherte Enzym ist lediglich der katalytisch aktive, unregelte Anteil. Keiner der charakteristischen Aktivatoren hat einen Effekt, mit Ausnahme von GTP in Gegenwart eines hitzestabilen, niedermolekularen Faktors aus dem Zellüberstand. Es ist also nicht ausgeschlossen, daß die katalytische Untereinheit auch der Adenylatcyclase aus *Polvox* mit einem regulatorischen G-Protein zusammenarbeitet. Die gereinigte

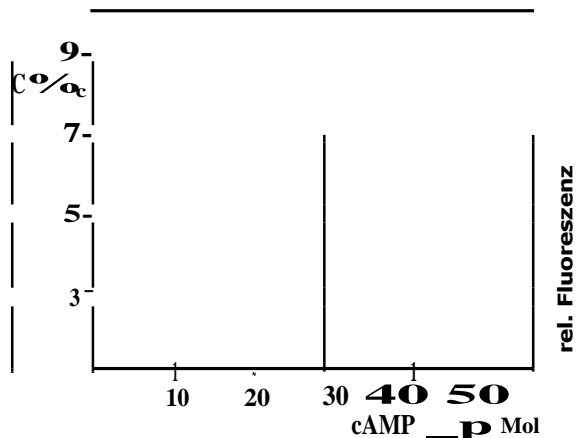
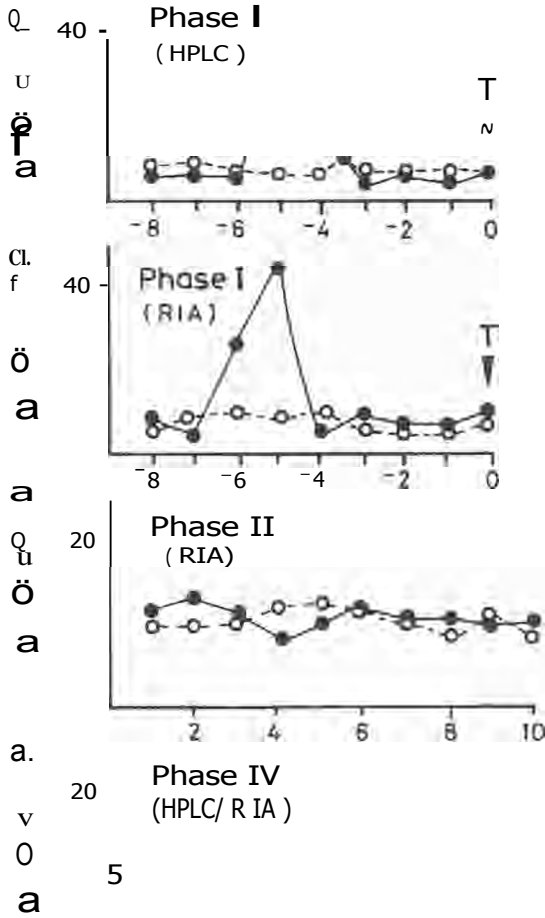


Abbildung 5

Eichkurve des Radioimmuno-Assay für cyclisches AMP (cAMP)



S - Schlüpfen T= Teilungsbeginn
 Mengen in 10^5 Sphäroiden

Abbildung 6
 Konzentrationsänderungen von cyclischem Adenylat (cAMP) während der Entwicklung und Induktion von *Volvox carteri*
 (Phasen s. Fußnote S. 6)

Cyclase ist (als Detergenskomplex) ein ungewöhnlich großes Molekül ($M_r = 198 \pm 10$ kDa), recht labil, mit konformativen SH-Gruppen, pH-Optimum im schwach Sauren und in Gegenwart von Mn^{2+} -Ionen 16-mal aktiver als bei Mg^{2+} -Ionen. Der Umsatz ist langsam (ca. 0.01 bis 0.2 pMol ATP/Mol Enzym/min) und die Affinität nicht hoch ($K_m = 0.5$ bis 1.5 mMol/L), jedoch im Bereich der entsprechenden Enzyme aus anderen Protisten und der löslichen Cyclase aus Rattenleber. Der Induktor hat keinen unmittelbaren Effekt; induzierte Sphäroide haben um etwas über 50% erhöhte Adenylatcyclase-Gesamtaktivität. Konstante Phosphodiesteraseaktivität vorausgesetzt, ist damit bei ihnen die Zulieferung von cAMP vermehrt, und das StreBsignal steigt auf das die inäquale Teilung im 16-Zellstadium (d. h. den vegetativen Zyklus) unterdrückende Niveau.¹⁶

Unter den zur Proteinphosphorylierungs-Kaskade obligaten Enzymen wurde die Phosphodiesterase sowohl in den Zellen wie in der Matrix nachgewiesen. Sie ist hier wohl kein Artefakt, das aus während der Aufarbeitung zerstörten oder leckgewordenen Zellen stammt, da z. B. der Chlorophyll-Austritt in den Matrixpräparaten nur gering ist. Die 3':5'-cyclo-Phosphodiesterase des Cytosols (in ihm kommt auch eine 2':3'-cyclo-Phosphodiesterase für Abbauprodukte der Ribonukleinsäure vor) hat nach den bisherigen Messungen einige auffallende Eigenschaften, die sie allerdings von den signal-geregelten Phosphodiesterasen der Tierzellen absetzt: Sie hat die sehr niedrige Molekularmasse von 17 kDa, einen sehr sauren pI (5.0) und ist sehr instabil. Das Enzym benötigt Mg^{2+} - oder Mn^{2+} -Ionen (wird aber nicht durch EDTA gehemmt). IMBX blockiert (0.4 mM = 85%), und tatsächlich wurde auch *in vitro* nachgewiesen, daß in Gegenwart dieses typischen PDE-Hemmstoffes die stationäre cAMP-Konzentration in den Zellen auf das bis zu 8-fache ansteigt.¹⁹ Die Bindungskonstante des Enzyms für cAMP ist mit 10^{-7} M für die 1. Stufe angegeben. Die Enzymaktivität ist weder vom Induktionszustand abhängig noch mit der cAMP-Konzentration der Extrakte korreliert.¹⁶ Mit allen diesen Eigenschaften ist die *Volvox-PDE* ein - nicht nur bei Pflanzen-neuartiges Enzym, das weiteres Studium lohnt. Sie scheint jedoch wenig mit dem Induktionsvorgang an sich zu tun zu haben.

Für eine Ca^{2+} -abhängige Proteinkinase, die Beteiligung von Inositol-Pollakisphosphaten oder Diacylglycerin an den Entwicklungs- und Induktionsvorgängen und noch weiterreichende Parallelen zu den zunehmend bei höheren Organismen beschriebenen Regelketten über Inositolphosphatide und deren Spaltprodukte fehlt jede Evidenz. Dagegen ist Calmodulin in den Gesamtvorgang der Induktion eingebunden;³ jedoch greifen Ca^{2+} -Ionen weder direkt noch indirekt an der Adenylatcyclase oder der Phosphodiesterase an.

Funktion der Signalkette

Wenn die Signalkette in der angedeuteten Richtung: Bindung des Induktors — Aktivierung einer second-messenger-Kette — Weitergabe des Signals durch die Stufen von Proteinmodifikationen bis in den Kern — Abrufen der Information — Umwandlung in spezifische Makromolekülsynthese — Ausbilden entsprechender Genprodukte — Ausdruck in phänotypische Erscheinungen — zellphysiologisches Ereignis abläuft, können wir hier einem ganz grundlegenden zellbiologischen Vorgang der Differenzierung folgen: Eine hochspezifische, aus dem Donator in das Medium abgegebene identifizierte Substanz wird von darauf genau eingestellten Empfänger-Molekülen an der Außenseite der Acceptorzelle gebunden. Dadurch wird eine Verstärkungs- und Transformationskaskade innerhalb der Zelle in Gang gesetzt, durch die ein bestimmter Teil des Genoms abgerufen (oder stillgelegt) wird, der diese Zelle zu ihrer Funktion in Ort und Zeit reguliert. Man bezeichnet einen derartigen hormonartigen Stoff, der, von einem Individuum der jeweiligen Spezies abgegeben, durch den Raum diffundiert und ein anderes der gleichen Spezies funktionell prägt, als ein Pheromon. Der Sexualinduktor von *Volvox carteri* ist somit ein typisches Sexualpheromon. Er ist hochspezifisch, insofern er nur die jeweilige Subspezies, in diesem Fall die Form *nageriensis*, induziert, d. h. von ihren Rezeptoren aufgenommen, sie zum Phänotyp: Weibchen mit Eiern, bzw. Männchen mit Spermienpaketen umwandelt. Es hat damit eine wichtige synchronisierende Funktion im Lebenszyklus dieser Form innerhalb des Habitats, denn seine Wirksamkeit ist so hoch, daß ein einziges der mit hoher Frequenz entstehenden spontanen Männchen ausreichend Pheromon beim Zerfall seiner Spermienpakete freiläßt, daß seine Konzentration genügt, um die übrigen Individuen dieser Art in einigen Kubikmetern Wasser zu induzieren. Sie reifen in der nächsten Generation sexuell, kopulieren und bilden die Zygote. Die morphologisch sehr nahestehende Form *weismanniibildet* ebenfalls einen ganz ähnlichen Induktor,²⁰ der aber wiederum nur für diese Form als Signal anerkannt wird, so daß sich beide Formen nicht kreuz-induzieren. Wir wissen über die Art der Bindung nichts. Die Hemmung der Induktion durch sehr geringe Mengen des (Manno- oder Gluko)glykoprotein-bindenden Lectins Convanavalin A²¹ läßt vermuten, daß Zuckergruppen entweder des Liganden oder des bindenden Makromoleküls für die Erkennung und Bindung nötig sind. Auch die Präinkubation des Induktors mit diesem Lektin blockiert die Induktion; jedoch kann man daraus nicht auf unmittelbare Inaktivierung des Induktors schließen, da es auch möglich ist, daß Concanavalin als vernetzendes Molekül (etwainder Arteines Antigen/Antikörperkomplexes) in den Komplex mit dem Rezeptor eintritt.

Wenn die Elemente der Proteinphosphorylierungskaskade, die wir in den Zellen nachgewiesen haben, mit dem Induktionsvorgang auslösend oder ursächlich zusammenhängen, müßten sich Konzentrationsänderungen im Lauf der Differenzierung in Abwesenheit des Induktors zeigen. Dies ist uns aber bisher nur im Fall des cyclischen Adenylats gelungen, wobei aber die sehr charakteristische Steigerung des „second messenger“ zu einem unerwartet frühen Zeitpunkt, nämlich etwa 4 h vor Einsetzen der Zellteilung beobachtet wird, während sie zu Beginn der Teilungsphasen wieder auf den Ausgangswert zurückgenommen ist. Es ist also zu früh, hierin bereits das Auslösesignal zu sehen, obgleich z. B. bei *Chlamydomonas eugametos* gefunden wurde, daß die Flagellenglutination mit einem sehr kurzen cAMP-Stoß einhergeht.

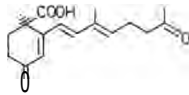
Auch eine andere Möglichkeit, Einblick in molekulare Vorgänge bei der Differenzierung und Induktorwirkung zu erhalten, haben wir in Angriff genommen: Da anzunehmen ist, daß während dieser Lebensfunktionen neue Proteine, Enzyme, Faktoren oder Strukturen entstehen, die als Genprodukte ihre eigentümliche messenger-Ribonukleinsäure erfordern, haben wir sowohl Zellextrakte als auch aus den Zellen extrahierte mRNA und ihre Translations-Produkte durch gelelektrophoretische Analyse zu differenzieren versucht,¹⁹ jedoch bisher keinerlei auffallende Parallelität zu irgendeinem der phänotypischen Ereignisse feststellen können. Es ist allerdings auch nicht zu erwarten, daß sich unmittelbar hervorstechende Änderungen der Makromolekülproduktion zeigen. Daher werden diese Untersuchungen fortgesetzt, verfeinert und erweitert, wobei wir auch bis in das Genom hinein analysieren wollen.

Induktion der Sexualdifferenzierung bei anderen Protisten

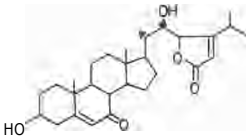
Aus solchen Analysen allgemeintypischer Gene und Genprodukte (snRNA, Actin)²³ ist geschlossen worden, daß *Volvox* nicht in einer direkten, aufsteigenden Linie zu höheren Pflanzen und Tieren steht, sondern eine Sonderentwicklung darstellt.²⁴ Trotzdem ist er ein Objekt, das den biologischen Grundregeln zu folgen hat und dessen genauere molekularbiologische und molekularphysiologische Untersuchung sich als Ausgangs- und Vergleichspunkt für das Verständnis der Differenzierungsvorgänge hochentwickelter und spezialisierter Organismen lohnt. Denn Induktion von Sexualität ist ein grundsätzlicher Vorgang. Wir finden ihn, wie gezeigt, bereits bei den Protisten, unter denen ein anderes, tierisches Beispiel die Induktionskette bei dem Ciliaten *Blepharisma japonicum* ist.²⁵ Von den beiden morphologisch identischen Formen scheidet die Form I ein Glykoprotein aus, das Gamon I; dies wird vom Stamm II aufgenommen, der dadurch veranlaßt wird, in den Ge-

schlechtszustand überzugehen, was mit einer Umstellung des Tryptophan-Stoffwechsels einhergeht, durch den über 5-Hydroxytryptophan und eine Indolring-öffnende Oxygenierung, sowie Desaminierung das Gamon II, Blepharison, gebildet wird.²⁶ Dies wird wiederum vom Stamm I als Signal „verstanden“, die Sexualzyklus-spezifische Veränderungen der Mundpartie durch Fimbrien auszubilden, mit denen die beiden Geschlechtspartner verkleben, um kopulieren und Kernmaterial austauschen zu können. Analog ist das eingehend analysierte System bei dem verwandten Flagellaten *Euplotes*,²⁷ aber in beiden sind die Einzelschritte biochemisch noch nicht aufgeklärt.

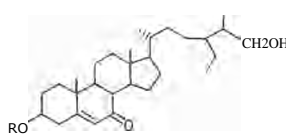
Bei den Pilzen finden wir Sexualpheromone auf der Basis von Sesquiterpen bei den Mucorales (Zusammenfassung in²⁸). Die als Vorläufer von den Hyphen des (+)- und (—)-Stamms des Pilzes *Blakeslea* ausgetrennten Retinol-Abkömmlinge werden durch die jeweils komplementierenden Enzyme in das Zygophoren-ausprägende Hormon Tripsorsäure umgewandelt. Es scheint, daß die ungeschlechtlichen Hyphen komplementäre Defektmutanten in diesem Stoffwechselweg darstellen.²⁹ Das eigentliche Sichtreffen der Zygophoren wird durch Lockstoffe gelenkt.



Tripsorsäure
(*Blakeslea trispora*)

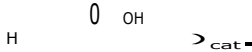


Antheridiol



Oogoniol

(Q *Achlya ambisexualis* Cr)



Blepharison
(*Blepharisma japonicum*)

Abbildung 7

!nitiierungs-Pheromone von Protisten und Thallophyten

Der Wasserpilz *Achlya* hat ein Induktionssystem, das sogar bereits wie bei Wirbeltieren, auf Steroiden basiert.³⁰ Die vegetativen männlichen Hyphen produzieren den vom Sitosterin abgeleiteten Alkohol Oogoniol, der die weiblichen Hyphen veranlaßt, Oogonien und das, ebenfalls ein Sitosterin-Derivat darstellende, Laktan Antheridiol zu bilden, das wiederum die Antheridienbildung bei den Männchen auslöst, so daß in den Geschlechtszyklus eingetreten werden kann. Auch hier werden die Geschlechtshyphen vermutlich durch Lockstoffe aufeinander gerichtet, so daß es zur Verschmelzung von Antheridium und Oogonium und danach zur Befruchtung der Tetrade der Eier kommt.

Bei höheren Pflanzen³¹ und Tieren³² sind bekanntlich die Ausprägungen der Geschlechtsorgane außerordentlich fein und komplex durch Hormone und neurophysiologische Transmitter-Vorgänge gesteuert. Auch die Befruchtungsfähigkeit ist — meist wohl auf der Grundlage von Glykoproteinen — kontrolliert.

Lockstoffe der einzelligen Gameten oder der gesamten Organismen sind in Geschlechtsvorgängen, wie bereits erwähnt, von den Protisten und den Gameten der Thallophyten³³ bis zu den Primaten ganz allgemein. Nur in wenigen Fällen allerdings kennt man die Struktur, in noch weniger die Mechanismen und Folgevorgänge auch nur einigermaßen.

Die Kommunikationssysteme sind aber häufig so spezifisch und so empfindlich, daß sie sich als Modelle für die Untersuchung der Biochemie der Sinnesvorgänge anbieten. Dies auch ist Ausgangspunkt und Ziel dieser Arbeiten.

Literatur

- 1 R. C. Starr, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 59, 1082 (1968).
- 2 R. C. Starr, L. Jaenicke, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 1050 (1974).
- 3 L. Jaenicke, R. Gilles, Differentiation 29, 199 (1985).
- 4 R. Gilles, D. Balshüsemann, L. Jaenicke in: *Algal Development (Molecular and Cellular Aspects)*, Ed. W. Wiesner, D. G. Robinson, R. C. Starr, pp. 50, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag 1987.
- 5 D. Balshüsemann, Diplomarbeit, Köln 1985.
- 6 R. Gilles, C. Gilles, L. Jaenicke, Naturwissenschaften 70, 571 (1983).
- 7 T. Müller, E. Bause, L. Jaenicke, Eur. J. Biochem. 138, 153 (1984).
- 8 E. Bause, R. Günther, L. Jaenicke, FEBS Letters 221, 193 (1987).
- 9 R. Günther, Dissertation, Köln 1987.
- 10 U. W. Goodenough, J. E. Heuser, J. Cell. Biology 101, 1550 (1985).
- 11 R. Gilles, C. Gilles, L. Jaenicke, Z. Naturforsch. 39c, 584 (1984).

-
- 12 D. L. Kirk, M. M. Kirk, *Science* 231, 51 (1986).
 - 13 R. C. Starr, L. Jaenicke, *Sexual Plant Repr.* 128 (1988).
 - 14 R. Gilles, Dissertation, Köln 1982.
 - 15 C. Colling, Diplomarbeit, Köln 1986.
 - 16 R. Moka, Diplomarbeit, Köln 1984, Dissertation, Köln 1988.
 - 17 B. Witte, Diplomarbeit, Köln 1987.
 - 18 G. Jahn, Diplomarbeit, Köln 1986.
 - 19 D. Sucharzewska, pers. Mitteilung.
 - 20 G. Kochert, I. Yates, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 1211(1974).
 - 21 L. Jaenicke in: *Molecular Mechanisms of Biological Recognition*, Ed. M. Balaban, p. 413, Amsterdam: Elsevier/North Holland, 1979.
 - 22 H. L. A. Pijst, R. van Driel, P. M. W. Janssens, A. Musgrave, H. van den Ende, *FEBS Letters* 174, 132 (1984).
 - 23 W. Mages, M. Salbaum, J. Harper, R. Schmitt, in Vorber.
 - 24 L. Kirk, *Trends in Genetics*, im Druck.
 - 25 A. Miyake in: *Biochemistry and Physiology of Protozoa*, 2nd ed., Vol. 4, p. 126, New York: Academic Press, 1981.
 - 26 M. Entzeroth, L. Jaenicke, *Z. Naturforschung* 36c, 180 (1981).
 - 27 A. Weischer, M. Freiburg, K. Heckmann, *FEBS Letters* 191, 176 (1985).
 - 28 H. van den Ende, *Sexual Interactions in Plants—The Role of Specific Substances in Sexual Reproduction*, London—New York—San Francisco: Academic Press, 1976.
 - 29 M. L. Miller, R. P. Sutter, *J. biol. Chem.* 259, 6420 (1984).
 - 30 R. M. Riehl, D. O. Toil, *J. biol. Chem.* 259, 15324 (1984).
 - 31 K. V. Thimann, *Hormone Action in the Whole Life of Plants*, Amherst: The Univ. of Massachusetts Press, 1977.
 - 32 E.-E. Baulieu, *Hormones*, Paris: Hermann, 1978.
 - 33 L. Jaenicke, W. Boland, *Angew. Chem.* 94, 659 (1982) (*Int. Ed.* 21, 643 [1982]).