

ENTWICKLUNGSBIOLOGIE

Wie die Zygote aus den Startlöchern kommt

Damit sich eine befruchtete Eizelle – die Zygote – zum Embryo entwickeln kann, müssen im Genom die Weichen neu gestellt werden. Kürzlich wurden zwei Pionierfaktoren identifiziert, denen im Stellwerk der embryonalen Genexpression eine Schlüsselfunktion zukommt.

Die Entwicklung der Zygote zum Embryo erfordert umfangreiche Veränderungen bezüglich der Genregulation. Denn unmittelbar nach der Befruchtung wird das in den beiden Pronuklei getrennt vorliegende Erbgut beider Eltern noch nicht abgelesen; stattdessen dominieren die von der Eizelle in die Zygote eingebrachten mütterlichen Boten-RNAs und Proteine das Geschehen in der Zelle. Besonders das väterliche Chromatin ist äußerst dicht gepackt, da während der Spermatogenese die mit der DNA assoziierten Histone durch Protamine (kleine, argininreiche, globuläre Proteine) ersetzt wurden. Um eine gleichwertige Expression des mütterlichen und väterlichen Genoms sicherzustellen, muss dieser Austausch kurz nach der Befruchtung rückgängig gemacht werden. Außerdem sind

Eizelle und Spermium hoch spezialisierte Zellen, deren Eigenschaften während der Differenzierung durch epigenetische Modifizierungen wie Methylierungen der Nukleobasen festgelegt wurden. Erst wenn auch diese Veränderungen rückgängig gemacht wurden, erlangt die Zygote die für die Embryonalentwicklung erforderliche Totipotenz und kann einen kompletten Organismus mit all seinen Geweben bzw. Organen bilden. Das „Ausradieren“ der Keimzell-spezifischen epigenetischen Modifizierungen im Genom wird als Reprogrammierung bezeichnet und geschieht im Zusammenspiel von DNA-Replikation und Demethylasen. Die Reprogrammierung setzt bereits in der Zygote ein und ist auf dem Zwei-Zell-Stadium abgeschlossen [1].

Nach neuesten Erkenntnissen an Mäusen werden väterliche Gene

erstmalig während der S/G2-Phase der Zygote transkribiert (Abbildung 1). Zu diesem Zeitpunkt bedingt die Zusammensetzung der Nukleosomen eine vergleichsweise lockere Packung des Chromatins, so dass eine große Bandbreite von Genen leicht für die Transkriptionsmaschinerie zugänglich ist. Diese erste Phase der zygotischen Genaktivierung (*minor zygotic gene activation*) ist nur von kurzer Dauer, denn im Zwei-Zell-Stadium ändert sich die Zusammensetzung der Nukleosomen erneut. Die dann dominierenden Histon-Varianten fördern eine dichtere Packung des Chromatins und erschweren so die Transkription. Infolgedessen erfordert die zweite Phase der zygotischen Genaktivierung (*major zygotic gene activation*) besondere Transkriptionsfaktoren, die in der Lage sind, die Chromatinstruktur lokal zu lockern und der Transkriptionsmaschinerie Zutritt zu den Promotoren zu verschaffen: die so genannten Pionierfaktoren [2]. Beim Zebrafisch und bei Fröschen scheint es sich um bekannte Faktoren zu handeln, die auch eine eingeschränkte Differenzierungsfähigkeit von Stammzellen, die Pluripotenz, aufrechterhalten. Bei Säugetieren dagegen sind die Pluripotenz-Faktoren Oct4 und Nanog nicht an der zygotischen Genaktivierung beteiligt.

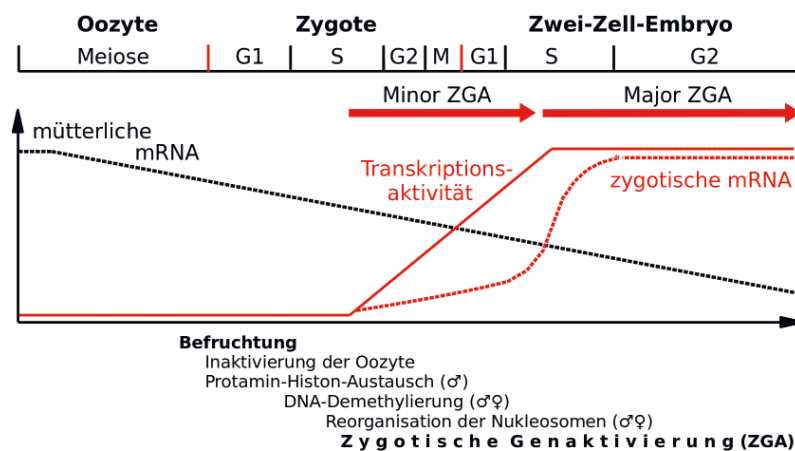


ABB. 1 Stark vereinfachtes Schema der Regulationsmechanismen, die nach der Befruchtung der Eizelle zur zygotischen Genaktivierung (ZGA) führen [1, 2]. Die zweite Phase der zygotischen Genaktivierung (Major ZGA) erfordert den Pionierfaktor Nr5a2, der an Enhancer-Elemente im Bereich der sog. *Short Interspersed Nuclear Elements (SINE) B1* bindet und das Chromatin öffnet [3].
 Grafik: A. Hille-Rehfeld.

Retrotransposon-ähnliche Segmente ...

Pionierfaktoren bei Säugetieren zu identifizieren, war das Ziel einer Kooperation von Wissenschaftlern des Max-Planck-Instituts für Biochemie in Martinsried und vom Biozentrum in Wien [3]. Sie analysierten zunächst systematisch die Basensequenzen in der Umgebung von mehr als 2500 Genen, die spezifisch während des Zwei-Zell-Stadiums von Mausembryonen exprimiert werden. Etwa 8 kb stromaufwärts des kodierenden Bereichs fanden sie fast zweimal häufiger als bei den übrigen Genen eine Konsensus-Sequenz mit großer Ähnlichkeit (90 %) zu einer

Familie von Retrotransposons, die bei der Maus als „*Short Interspersed Nuclear Element (SINE) B1*“ bezeichnet wird und mit den Alu-Sequenzen des Menschen verwandt ist.

Im Umfeld dieser Konsensus-Sequenz war zweierlei bemerkenswert: Die Gene in der Nähe der Konsensus-Sequenz waren während der zygotischen Genaktivierung vergleichsweise leicht für die Transkriptionsmaschinerie zugänglich und der Grad der Histon-Acetylierung des Chromatins war in diesem Bereich erhöht. Weiterhin fielen innerhalb der Konsensus-Sequenz bekannte Motive auf, an die bestimmte Kernrezeptoren binden. Von diesen könnten Nr5a2 und Esrrb während der zygotischen Genaktivierung bedeutsam sein, denn bei Ausschaltung jedes einzelnen dieser Rezeptoren sterben homozygot-negative Embryonen während der Implantationsphase ab. Außerdem sind beide Rezeptoren in der mütterlichen Boten-RNA repräsentiert und als Proteine bereits während des Zwei-Zell-Stadiums nachweisbar.

Nr5a2 lässt sich durch eine Pyrimidin-haltige niedermolekulare Substanz (SR1848) hemmen. Unter Einwirkung von SR1848 konnten Embryonen keine Blastocysten bilden, sondern fragmentierten und starben wenige Tage nach der Befruchtung. Die Autoren werteten dies als ersten Hinweis darauf, dass Nr5a2 für die Etablierung von Pluripotenz bedeutsam ist.

... binden den Pionierfaktor Nr5a2

Weiterhin zogen die Wissenschaftler im Experiment durch einen Trick das Nr5a2-Protein aus dem Verkehr. Dafür injizierten sie Antikörper gegen Nr5a2 in embryonale Zellen,

zusammen mit einer an den Fc-Rezeptor gekoppelten E3-Ubiquitin-Protein-Ligase, die spezifisch das mit Antikörpern markierte Nr5a2-Protein ubiquitiniert und so dem Abbau am Proteasom zuführt. Infolgedessen verringerte sich die Menge der während der zygotischen Genaktivierung gebildeten Transkripte etwa auf die Hälfte des Kontrollwerts. Auch die Ausschaltung von Nr5a2 durch *Silencing* mittels siRNA verringerte die Transkription während der zygotischen Genaktivierung, wenngleich mit geringerer Effizienz. Das Spektrum der Gene, deren Expression Nr5a2 erfordert, repräsentierte 72 Prozent der während der zygotischen Genaktivierung gebildeten Transkripte.

An welchen Stellen im Genom der Rezeptor Nr5a2 im Zwei-Zell-Stadium bindet, ermittelten die Wissenschaftler durch Markierung des Rezeptors mit spezifischen Antikörpern, anschließende Fragmentierung der DNA und Sequenzierung der durch die Antikörper erkenntlichen Fragmente mit gebundenem Rezeptor. Dabei bestätigte sich, dass Nr5a2 tatsächlich im Bereich der oben genannten Konsensus-Sequenz bindet, und zwar bevorzugt in der Nähe des Transkriptionsstartpunkts von Genen, die während der zygotischen Genaktivierung verstärkt exprimiert werden und durch die Ausschaltung des Rezeptors betroffen sind.

Ein Abgleich mit früher publizierten Daten zum Chromatin im Zwei-Zell-Embryo zeigte, dass die Bindestellen von Nr5a2 in Regionen von offenem Chromatin liegen und als Enhancer-Elemente fungieren. Dabei handelt es sich nicht um eine bloße Koinzidenz, denn die Ausschaltung des Rezeptors Nr5a2 führte dazu, dass das Chromatin der Zwei-Zell-Embryonen weniger zugänglich für DNA-Insertionen durch

das Enzym Transposase 5 war. Die Autoren schlossen daraus, dass die Bindung von Nr5a2 eine Öffnung des Chromatins bewirkt. Reagenzglasversuche zeigten, dass die Bindung bevorzugt an der Stelle erfolgt, an der die beiden Enden des jeweils ein Nukleosom umwickelnden DNA-Fadens zusammentreffen. An dieser Stelle bindet auch der Pluripotenzfaktor Oct4. Demnach ist Nr5a2 tatsächlich als Pionierfaktor einzuordnen, der durch Öffnung des Chromatins die Genexpression erleichtert.

Auch die Bindung von Esrrb ist für die zygotische Genaktivierung bedeutsam, wie entsprechende Experimente zeigten. Allerdings bindet dieser Rezeptor neben Enhancer-Elementen auch an den Promotorbereich von Genen, während sein Einfluss auf die zygotische Genaktivierung verglichen mit dem von Nr5a2 weniger ausgeprägt erschien.

Damit wurden am Beispiel der Maus erstmals Pionierfaktoren identifiziert, die für die zygotische Genaktivierung bei Säugetieren erforderlich sind. Da Nr5a2 ein bei allen bislang untersuchten Metazoa konserviertes Protein darstellt, darf man gespannt sein, welche Funktion ihm bei anderen Organismen zukommt. Zwar sind die in der vorliegenden Publikation gefundenen Bindungsmotive spezifisch für die Maus, doch spekulieren die Autoren, ob die damit verwandten Alu-Sequenzen beim Menschen ebenfalls eine Pionierfunktion von Nr5a2 vermitteln können.

Literatur

- [1] R. Fraser, C. J. Lin (2016). *Reproduction* 152, R211–R222.
- [2] F. Aoki (2022). *J. Reprod. Dev.* 68, 79–84.
- [3] J. Gassler et al. (2022). *Science* 378, 1305–1315.

Annette Hille-Rehfeld, Stuttgart