

Habilitierte stellen sich vor

Die Extrazelluläre Matrix und die Entwicklung zur Vielzelligkeit

Armin Hallmann, Lehrstuhl für Biochemie I, Universität Regensburg

► Bei den Grünalgen der Ordnung Volvocales ist es möglich den Übergang vom Einzeller zum Vielzeller innerhalb einer phylogenetisch eng verwandten Gruppe zu untersuchen. Die Komplexität der Morphologie nimmt dort vom Einzeller *Chlamydomonas* über die Mehrzeller *Gonium*, *Pandorina*, *Eudorina* und *Pleodorina* bis hin zu *Volvox* ständig zu. *Volvox* ist ein echter Vielzeller mit einer vollständigen Arbeitsteilung zwischen zwei Zelltypen, somatischen und reproduktiven Zellen (umfangreiche Datensammlung über *Volvox* in [1]). *Volvox* ist somit einer der einfachsten, wenn nicht der einfachste Vielzeller überhaupt, und trotzdem teilt sich *Volvox* eine Vielzahl von Eigenschaften mit viel komplexeren Organismen. Der Übergang von der Einzelligkeit zur Vielzelligkeit fand in der Ordnung der Volvocales vor etwa 50-75 Millionen Jahre statt und stellt damit ein recht junges Ereignis in der Evolution dar.

Eine der wichtigsten Grundvoraussetzungen für die Realisation des Übergangs zur Vielzelligkeit war die Entwicklung einer komplexen Extrazellulären Matrix (ECM), ausgehend von einer einfachen Zellwand. Die ECM eines Vielzelllers ist ein komplexes Organell, das strukturelle und enzymatische Aufgaben besitzt, viele Entwicklungsantworten einschließlich der Regulation von Wachstum, Differenzierung, Wundheilung und Pathogenabwehr vermittelt und auch eine wichtige Rolle bei der Antwort auf Stresssituationen und bei der Anpassung auf Veränderungen in der Umgebung des Organismus spielt. Es stellt sich die Frage, welche Veränderungen auf molekularer Ebene nötig waren um eine derartige Entwicklung hin zu einer komplexen ECM zu ermöglichen.

Biochemie der Volvox-ECM: Hydroxyprolin-reiche Glykoproteine mit einem modularen Aufbau

Die ECM von *Volvox carteri* wurde in den vergangenen Jahren morphologisch und biochemisch intensiv untersucht. Mittels licht- und elektronenmikroskopischer Untersuchungen haben David Kirk und Mitarbeiter [2] die ECM-Architektur analysiert und eine Nomenklatur der komplexen ECM-Strukturen erarbeitet. Die *Volvox*-ECM be-

steht aus einer Vielzahl anatomisch verschiedener Strukturen mit einer definierten Raumverteilung im Organismus. Auf molekularer Ebene konnten mittlerweile bereits über fünfzehn ECM-Proteine von *Volvox* charakterisiert und kloniert werden (zusammengefasst in [3]; darüber hinaus [4-6]). Dabei zeigte sich, dass der Aufbau der ECM-Proteine aus *Volvox* meist modular ist, wobei Hydroxyprolin-reiche Abschnitte mit Hydroxyprolin-freien Modulen alternieren (Abb. 1, A). Die ECM-Proteine von *Volvox* sind also ebenso modular aufgebaut wie die Proteine tierischer ECMs.

Was initiiert die ECM-Biosynthese in *Volvox* und wie läuft sie ab? Die ECM-Synthese beginnt am Ende der Embryonalentwicklung unmittelbar nach einem morphogenetischen Prozess bei dem sich der Embryo durch eine Serie von Zellbewegungen komplett umstülpt, wodurch er die Konfiguration des erwachsenen Organismus erlangt, ein Vorgang den man Inversion nennt. Die Zellbewegungen der Inversion ähneln denen der Gastrulation beim tierischen Embryo.

Mit biochemischen und immunoelektronen-mikroskopischen Untersuchungen konnte ein ECM-Glykoprotein identifiziert werden, das wohl die erstaunlichsten Eigenschaften unter all den bislang identifizierten ECM-Komponenten aus *Volvox* besitzt: das ISG (inversionspezifisches sulfatiertes Glykoprotein) [7, 8]. Das ISG wird nur für ca. 10 Minuten während der Inversion synthetisiert und legt den Grundstein der ECM-Biosynthese.

Die Embryonalentwicklung: ein stark reguliertes Protein organisiert die ECM-Biosynthese

Das Glykoprotein ISG besteht aus einer N-terminalen globulären Domäne und einer C-terminalen, stäbchenförmigen Extensin-ähnlichen Domäne mit zahlreichen Ser-(Hyp)_{4,6} Wiederholungen. Über die N-terminale Domäne können sich ISG-Moleküle zu sternförmigen Partikeln zusammenlagern [7].

Obwohl das ISG nur für 10 Minuten im 48-Stunden-Lebenszyklus von *Volvox* syn-

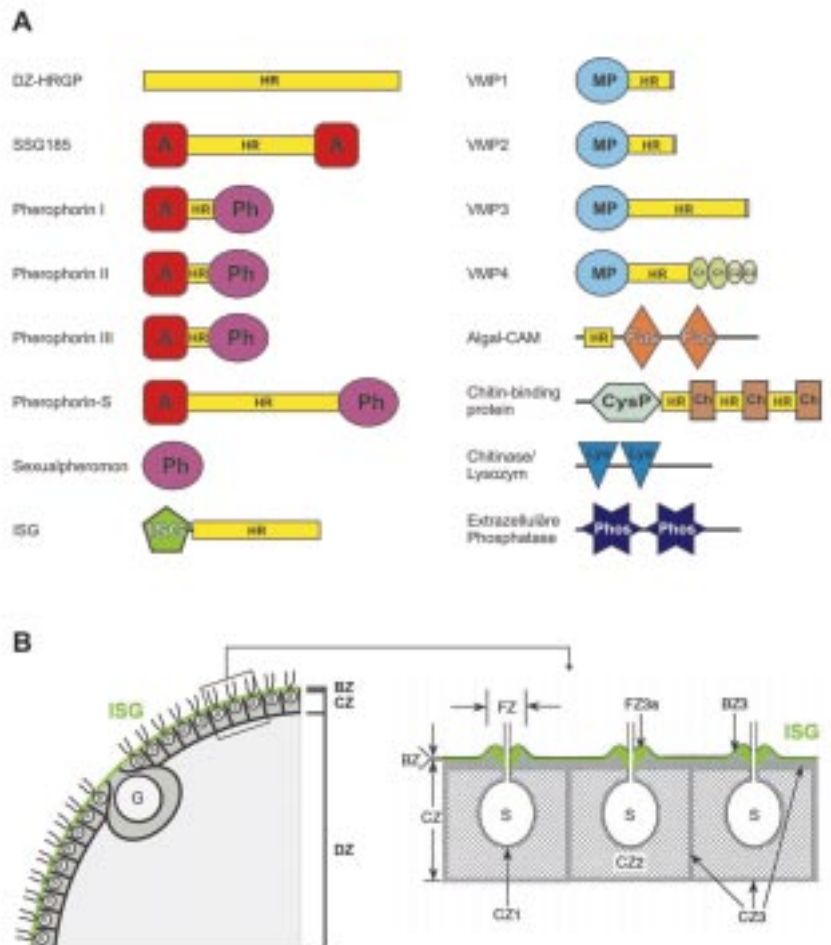


Abb. 1:

A) Modularer Aufbau bekannter Volvox ECM-Proteine.

DZ-HRGP:

Protein aus der ECM-Zone DZ; besteht fast nur aus Hydroxyprolinen, die eine Polyhydroxyprolinhelix bilden.

SSG185:

Hauptkomponente der ECM-Zone CZ; enthält Phosphodiesterbrücken.

Pherophorin I:

Hauptkomponente der ECM-Zone CZ.

Pherophorin II:

Protein aus der ECM-Zone CZ; Ph-Domäne wird unter Einfluss des Sexualpheromons abgespalten.

Pherophorin III:

Komponente aus der ECM-Zone CZ.

Pherophorin-S:

bislang einziges Pherophorin aus der ECM-Zone DZ; enthält Phosphodiesterbrücken.

Sexualpheromon:

Glykoprotein-Pheromon das die sexuelle Entwicklung in asexuellen reproduktiven Zellen noch in einer Konzentration von 10^{-16} M auslöst.

ISG:

ECM-Glykoprotein aus den ECM-Zonen BZ und FZ (siehe unter B); Protein organisiert die ECM-Biosynthese; stark entwicklungsabhängige Expression.

VMPs 1-4:

Zink-abhängige ECM-Metalloproteinasen.

Algal-CAM:

ist an Zell-Zell-Kontakten lokalisiert; Zelladhäsionsmolekül mit Homologie zu Fasciclin I.

Chitin-binding protein:

Protein aus der ECM-Zone DZ; wird als Antwort auf Verwundung synthetisiert.

Chitinase/Lysozym:

Protein aus der ECM-Zone DZ; wird als Antwort auf Verwundung synthetisiert.

Extrazelluläre Phosphatase:

induzierbare, alkalische Phosphatase; strikt Kalzium-abhängig.

Beschreibung der einzelnen Module:

- HR** = Hydroxyprolin-reiches, stäbchenförmiges Modul (Polyhydroxyprolinhelix)
- A** = A-Typ Domäne
- Ph** = Pheromon-ähnliche Domäne
- ISG** = globuläre ISG-Domäne
- MP** = Metalloproteinase-Domäne
- C1 und C2** = Domänen mit unbekannter Funktion
- Fas** = Fasciclin I-ähnliche Domäne
- CysP** = Cystein-Proteinase
- Ch** = Chitin-bindende Domäne
- Lys** = Lysozym-Domäne
- Phos** = Phosphatase-Domäne

B) Schematische Darstellung eines Ausschnitts von Volvox carteri mit Lokalisation des ECM-Glykoproteins ISG.

ECM-Zonen:

- FZ** „flagellar zone“
- BZ** „boundary zone“
- CZ** „cellular zone“
- DZ** „deep zone“
- G** Gonidium = reproduktive Zelle
- S** somatische Zelle

thetisiert wird, bleibt es doch für mindestens 24 h stabil. Mit Immunogold-Transmissions-elektronenmikroskopie konnte das ISG in Volvox-Embryonen lokalisiert werden: es befindet sich auf der Oberfläche der somatischen Zellen und dort insbesondere an den Basen der Flagellen. Das ISG ist offensichtlich die erste ECM-Komponente die gebildet wird. Es wurden transgene Algen erzeugt, die eine N-terminal verkürzte Form des ISG exprimieren. Mit einer defekten oder fehlenden N-terminalen Domäne können ISG-Moleküle nicht miteinander in Wechselwirkung treten. Die transgenen Organismen zeigen somit eine völlig desorganisierte ECM, in die die Zellen in chaotischer Weise eingebettet sind, was auch ein koordiniertes Schwimmen der Organismen unmöglich macht^[8]. Einen ähnlichen Effekt verursacht auch ein Dekapeptid, das der C-terminalen Sequenz des ISG entspricht, allerdings nur wenn es während oder kurz nach der embryonalen Inversion in geringerer Konzentration zu den Embryonen gegeben wird, was darauf hindeutet, dass die Bindungsstelle eines Reaktionspartners des ISG durch das Dekapeptid abgesättigt wird.

Fasst man alle Ergebnisse zusammen, so ergibt sich folgendes Bild: unmittelbar nach der embryonalen Inversion wird ein auf dem ISG basierender ECM-Komplex synthetisiert, der ein primäres Netzwerk bildet, das die somatischen Zellen über ihre Flagellen verankert; gleichzeitig dient dieser ISG-Komplex als Gerüst auf dem der Rest der ECM aufgebaut wird. Durch die weitere ECM-Biosynthese wird dieses ISG-Netzwerk immer weiter nach außen verlagert, bildet aber immer die äußerste ECM-Schicht und damit die Grenze zum umgebenden Medium (Abb. 1, B).

Das ISG ist essentiell, da ohne den primären ISG-ECM-Komplex ein völlig desorganisierter Organismus entsteht, der unfähig ist zu schwimmen und so in der Natur nicht überleben könnte.

Mit zunehmenden Informationen über die biochemischen Grundlagen der ECM-Biosynthese bei Volvox stellt sich nun die Frage nach den Unterschieden zur Zellwand des nahe verwandten Einzellers Chlamydomonas. Erste Vergleiche von Volvox-ECM-Glykoproteinen mit Proteinen aus der Zellwand von Chlamydomonas lassen vermuten, dass im Laufe der Evolution einzelne Module der Zellwand/ECM-Glykoproteine durch andere Module ausgetauscht wurden. Eine weitere interessante Frage für die Zukunft wird somit sein, welche Funktionen den einzelnen Modulen zukommen. Und letztendlich: Was ist notwendig, um aus dem Einzeller Chlamydomonas eine vielzellige Volvox-Alge zu machen?

Literatur

[1] Kirk, D. L. (1998): Volvox: Molecular-genetic Origins of Multicellularity and Cellular Differentiation. Cambridge University Press, Cambridge.

[2] Kirk, D. L., Birchem, R., King, N. (1986): The extracellular matrix of Volvox: a comparative study and proposed system of nomenclature. *J. Cell Sci.* 80: 207-231.

[3] Sumper, M., Hallmann, A. (1998): Biochemistry of the extracellular matrix of Volvox. *Int. Rev. Cytol.* 180: 51-85.

[4] Hallmann, A. (1999): Enzymes in the extracellular matrix of Volvox: an inducible, calcium-dependent phosphatase with a modular composition. *J. Biol. Chem.* 274: 1691-1697.

[5] Ender, F., Hallmann, A., Amon, P., Sumper, M. (1999): Response to the sexual pheromone and wounding in the green alga Volvox: induction of an extracellular glycoprotein consisting almost exclusively of hydroxyproline. *J. Biol. Chem.* 274: 35023-35028.

[6] Hallmann, A., Amon, P., Godl, K., Heitzer, M., Sumper, M. (2001): Transcriptional activation by the sexual pheromone and wounding: a new gene family from Volvox encoding modular proteins with (hydroxy) proline-rich and metalloproteinase homology domains. *Plant J.* 26: 583-593.

[7] Ertl, H., Hallmann, A., Wenzl, S., Sumper, M. (1992): A novel extensin that may organize extracellular matrix biogenesis in Volvox carteri. *EMBO J.* 11: 2055-2062.

[8] Hallmann, A., Kirk, D. L. (2000): The developmentally regulated ECM glycoprotein ISG plays an essential role in organizing the ECM and orienting the cells of Volvox. *J. Cell Sci.* 113: 4605-4617.

Korrespondenzadresse:

PD Dr. Armin Hallmann
 Universität Regensburg, Lehrstuhl für Biochemie I
 Universitätsstrasse 31, 93053 Regensburg
 Tel.: (0941) 943 2835, Fax: (089) 2443 54854
 eMail: armin.hallmann@gmx.de
 www.biologie.uni-regensburg.de/Biochemie/Hallmann



Armin Hallmann

Jahrgang 1965, von 1986 bis 1991 Biologiestudium an der Universität Regensburg. 1992-1995 Förderung durch Stipendien der Richard-Winter-Stiftung und der Nissen-Stiftung. 1995 Promotion an der Universität Regensburg bei Prof. Dr. M. Sumper. 1996 Kulturpreis Ostbayern (Promotion).

1995 bis 1999 Wissenschaftlicher Assistent und Arbeitsgruppenleiter bei Prof. Dr. M. Sumper am Lehrstuhl Biochemie I der Universität Regensburg. 1999 „Visiting Scientist“ bei Prof. Dr. D. L. Kirk, Washington University, Department of Biology und 2000 „Assistant Professor“ in dieser Arbeitsgruppe. 1999-2000 Stipendiat der Junkmann-Stiftung. Seit 2001 Oberassistent und Arbeitsgruppenleiter an der Universität Regensburg, 2001 Habilitation für das Fach Biochemie.