

Embryonale Induktion und Differenzierung RNS- und Proteinstoffwechsel in Triturusembryonen

Autor(en): **Tiedemann, H.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Bulletin der Schweizerischen Akademie der Medizinischen
Wissenschaften = Bulletin de l'Académie Suisse des Sciences
Medicales = Bollettino dell' Accademia Svizzera delle Scienze
Mediche**

Band (Jahr): **22 (1966)**

PDF erstellt am: **20.06.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-307640>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Max-Planck-Institut für Meeresbiologie, Wilhelmshaven
Abt. Tiedemann

Embryonale Induktion und Differenzierung RNS- und Proteinstoffwechsel in Triturusembryonen¹

H. TIEDEMANN

Vor einigen Jahren haben wir die Einwirkung von Blausäure auf Amphibienembryonen untersucht (TIEDEMANN und TIEDEMANN 1954). Blausäure hemmt bekanntlich die Cytochromoxydase und damit auch die Atmung. Sie übt deshalb auf die embryonale Entwicklung einen ähnlichen Effekt aus wie Sauerstoffmangel. Bei einer Konzentration von $1 \times 10^{-3} M$ ist die Atmung zu etwa 90% gehemmt, und die Entwicklung kommt vollständig zum Stillstand. Bei einer Hemmung der Atmung um 30%, entsprechend einer Blausäurekonzentration von $0,5 \times 10^{-4} M$, kann sich etwa die Hälfte der Keime weiter entwickeln. Diese Keime zeigen aber eine allgemeine Reduktion ihrer Körpermaße und Mißbildungen wechselnden Grades. Besonders häufig wiesen sie Schwanzdefekte auf. Außerdem traten Synophthalmien und Microcephalien sowie Verbiegungen von Rumpf und Schwanz auf. Der Entwicklungsstörung liegt eine Störung des Stoffwechsels zugrunde. Am stärksten betroffen war neben der Synthese von Proteinen die Nucleinsäuresynthese (TIEDEMANN und BORN 1960). Nach Behandlung von Neurulastadien des Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) mit $1 \times 10^{-3} M$ Blausäure ist nach 3 Std. die Proteinsynthese auf etwa 2% und die Nucleinsäuresynthese auf weniger als 1% der Kontrollwerte abgesunken (Tab. 1). Als radioaktive Vorstufe wurde bei diesen Versuchen $^{14}CO_2$ verwendet, da $^{14}CO_2$ ungehindert in die Keime eindringen kann. Es wird auf bekannten Wegen in Nucleotide und Aminosäuren eingebaut. Diese Versuche gaben einen Hinweis, daß die Neusynthese von Nucleinsäure für die Differenzierung unerläßlich ist, eine Anschauung, die zuerst von BRACHET (1957) geäußert worden war.

Sehr viel spezifischer läßt sich die Synthese von Ribonucleinsäure durch Actinomycin D hemmen. Actinomycin D wird reversibel an Desoxyribonucleinsäure gebunden und hemmt dadurch die DNS-abhängige RNS-Synthese (RAUEN u. Mitarb. 1960; REICH u. Mitarb. 1961). Die Differenzierung von Ganzkeimen läßt sich auch durch sehr hohe Actinomycin-konzentrationen nur wenig hemmen, da Actinomycin D nur langsam in die Keime eindringen kann. Wenn die obere Urmundlippe, also der

¹ Herrn Professor Dr. Franz Büchner in Verehrung gewidmet.

Tabelle 1

Aktivitätsabnahme verschiedener Fraktionen aus Krallenfroschkeimen
nach Hemmung der Atmung mit HCN*

Larvenstadium	HCN-Konz.	Rest-atmung (%)	Versuchsdauer (Std.)	Aktivität (%)		
				Lösliche Fraktion	Proteinfraktion	Nucleinsäurefraktion
Schwanzknospe	$1 \cdot 10^{-4}$	50	2	43	24,0	10,5
Neurula	$1 \cdot 10^{-3}$	10	2	—	1,6	0,65
Neurula	$1 \cdot 10^{-3}$	10	3	31	2,2	0,55
Neurula	$1 \cdot 10^{-3}$	10	10	12	2,5	1,2

* Die Werte geben die im Hemmversuch gemessene Aktivität in % der Aktivität der Kontrollen (= 100%) an. Die Restatmung ist in % der nicht gehemmten Atmung angegeben. Ribonucleinsäure und Desoxyribonucleinsäure wurden nicht getrennt. Die Werte umfassen also beide Nucleinsäuren. Die lösliche Fraktion wurde durch Extraktion mit Methanol gewonnen.

Bereich, welcher bereits zu Chorda und Muskulatur determiniert ist, zusammen mit angrenzendem Ektoderm und Entoderm aber isoliert und dann in der Gewebekultur mit Actinomycin D behandelt wird, so ist die Differenzierung schon nach 2–14stündiger Einwirkung von $2,5 \mu\text{g/ml}$ Actinomycin D fast vollständig gehemmt (HILDEGARD TIEDEMANN, unveröffentlicht). Die Gewebe desaggregieren, und die Zellen kugeln sich ab. Einzelne kleine Gewebestückchen, die erhalten geblieben waren, enthielten eine Chorda und in einem Falle außerdem einige schlecht differenzierte Myoblasten. Bei einer Konzentration von $2,5 \mu\text{g/ml}$ Actinomycin D findet keine Synthese

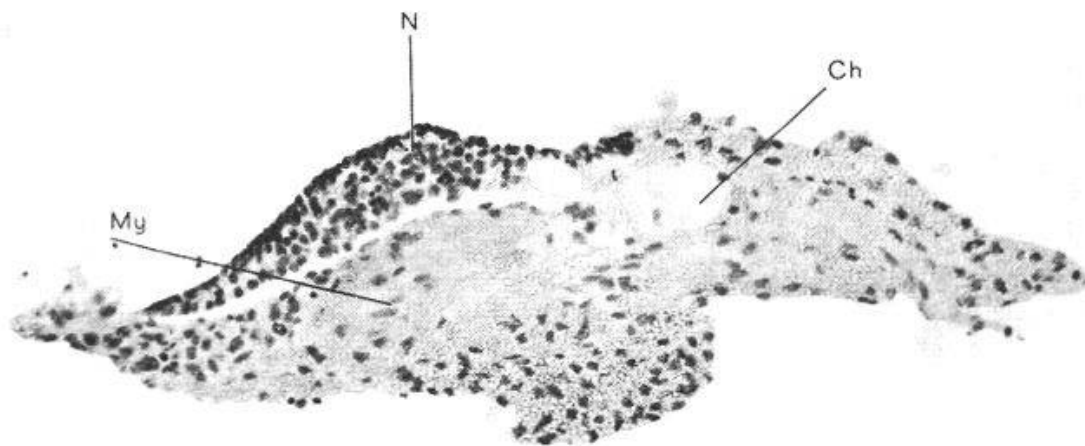


Abb. 1. Obere Urmundlippe von *Ambystoma mexicanum* mit angrenzendem Ektoderm und Entoderm, 7 Tage in Stearnslösung aufgezogen. N = Neuralgewebe, My = Myoblasten, Ch = Chorda.

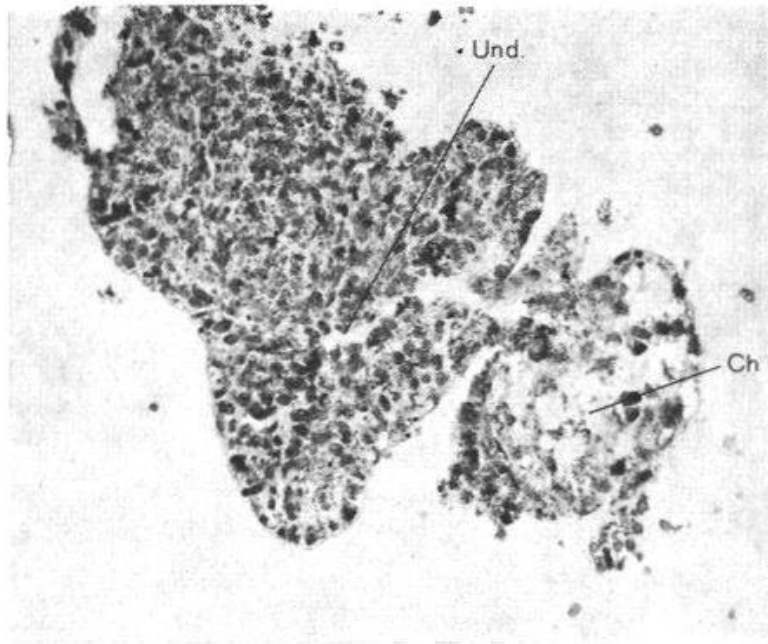


Abb. 2. Obere Urmundlippe von *Ambystoma mexicanum* mit angrenzendem Ektoderm und Entoderm, in der Gewebekultur 14 Std. mit $0,5 \mu\text{g/ml}$ Actinomycin D behandelt, danach 7 Tage in Stearnslösung aufgezogen. Ch = Chorda, Und. = undifferenziertes Gewebe.

von RNS mehr statt, sondern nur ein Austausch von Endgruppen der Transfer-RNS. – Läßt man Actinomycin D in geringer Konzentration ($0,5 \mu\text{g/ml}$) mehrere Stunden auf das isolierte Gewebe einwirken, so bleibt der Gewebezusammenhang zum Teil erhalten. Die histologische Untersuchung der 7–10 Tage alten Explantate zeigte, daß sich Chorda und Myoblasten mehr oder weniger gut differenziert hatten, während neurales Gewebe im Gegensatz zu den Kontrollen, die reichlich induziertes Neuralgewebe enthielten, stark reduziert war (Abb. 1 und 2). – Das *Induktionsvermögen* der oberen Urmundlippe für Neuralgewebe, Muskulatur und Chorda wird – wie separate Versuche zeigten – im Gegensatz zur Differenzierungsleistung durch Behandlung mit Actinomycin D auch bei hoher Actinomycinkonzentration nicht verringert. Induktionsfaktoren sind im frühen Gastrulastadium also schon in genügender Menge vorhanden. Sie können mit Pufferlösung extrahiert werden.

In weiteren Versuchen haben wir die Synthese von RNS im isolierten und in Salzlösung aufgezogenen Gastrulaektoderm und in Keimen des Neurulastadiums verglichen (TIEDEMANN u. Mitarb. 1965). Die Ektodermzellen teilen sich, differenzieren sich aber nicht zu speziellen Geweben, sondern bilden nur epitheliale Stränge. In den Ganzkeimen teilen und differenzieren sich die Zellen. Diese Versuchsanordnung gibt uns also die Möglichkeit, wachsende Gewebe zu vergleichen, von denen das eine sich zu speziellen Geweben differenziert, das andere jedoch nicht. Die beiden Ribosomen-Ribonucleinsäuren (ca. 18 S und 28 S) und Transfer-Ribonucleinsäure (4 S) werden sowohl in Neurulastadien synthetisiert als auch im Ektoderm, das 2 Tage in Salzlösung aufgezogen worden war und damit in seinem Alter Neu-

regeln entspricht. Nach kurzzeitiger Markierung (Pulse-Versuche) wird in Neurulastadien und im Ektoderm in den Zellkernen RNS synthetisiert, die in beiden Fällen heterogen ist und sehr hochmolekulare Komponenten enthält. Die Pulse-RNS aus Neurulastadien hat aber im Vergleich zu Pulse-RNS aus Ektoderm eine $1\frac{1}{2}$ 2mal höhere Aktivität. Es wäre nun möglich, daß die Pulse-RNS im Ektoderm schnell wieder abgebaut wird oder schon vorhandene RNS bei der Synthese von Polypeptidketten nicht in Funktion treten kann. Die in Tabelle 2 zusammengestellten Ergebnisse zeigen aber, daß auch im Ektoderm Protein synthetisiert wird.

Die kurzzeitig markierte RNS enthält wahrscheinlich Vorstufen für Ribosomen-RNS und Messenger-RNS. Wie Messenger-RNS aus Ektoderm und aus Ganzkeimen sich unterscheiden, muß weiter geprüft werden. Die grundlegenden biosynthetischen Prozesse gehen auch im Ektoderm vor sich. Doch werden keine speziellen Gewebeproteine synthetisiert. Es ist also zu erwarten, daß im Ektoderm Messenger-RNS für die Grundausstattung mit Enzymen und Strukturproteinen vorhanden ist, Messenger-RNS für spezielle Gewebeproteine aber fehlt. Alle bisherigen Resultate lassen sich mit dieser Hypothese vereinbaren.

Die Synthese und die Funktion von gewebespezifischer Messenger-RNS wird durch besondere Mechanismen reguliert. In diese Mechanismen greifen auch die Induktionsfaktoren ein. Die embryonalen Induktionseffekte sind von H. SPEMANN und seiner Schule schon vor über 30 Jahren entdeckt worden (SPEMANN 1936). Die Isolierung der Faktoren stieß aber zunächst auf erhebliche Schwierigkeiten. Einen dieser Faktoren, den sogenannten mesodermalen Induktionsfaktor, der Muskel, Chorda sowie Nierenkanälchen induziert, konnten wir nun aus Hühnerembryonen isolieren und etwa 5 000–10 000fach anreichern (TIEDEMANN und TIEDEMANN 1959; TIEDEMANN u. Mitarb. 1965). Auf das Verfahren zur Isolierung des Faktors kann hier im einzelnen nicht eingegangen werden. Es handelt sich um ein Protein von relativ niedrigem Molekulargewicht. Zur annähernden Bestimmung des

Tabelle 2
Proteinsynthese in verschiedenen Keimstadien und im isolierten Ektoderm*

Inkubation (Std.)	Imp./min/mg Protein			
	Gastrula	Neurula	Schwanzkn.	isol. Ektoderm
1,5	680	1.330	2.100	980
24,0	26.200	40.000	63.600	36.500

* Die Keime wurden in Warburg-Gefäßen mit $220 \mu\text{g } ^{14}\text{CO}_2$ (1,68 mg/mC) inkubiert und anschließend mit Phenol extrahiert. Phenolphase und Mittelschicht wurden mit Methanol gefällt und gewaschen. Die gefällten Proteine wurden zur vollständigen Entfernung von Lipiden und RNS 2mal je 5 min mit 5% TCE (95° C), 3mal mit Alkohol-Äther (1:1) und 3mal mit Alkohol gewaschen. Das Ektoderm war im Gastrulastadium isoliert und 2 Tage in Salzlösung gezüchtet worden.

Molekulargewichtes wurde der Faktor in 6 M Harnstoff-0.05 M Tris (pH 7,5) 3 Tage lang im Dichtegradienten (4–12% Saccharose) zentrifugiert (38 000 R. P. M., Spinco SW 39 Rotor, 4° C). Die Sedimentationsgeschwindigkeit wurde mit derjenigen von Eialbumin und Trypsin unter genau gleichen Bedingungen verglichen. Das Molekulargewicht kann dann nach der Formel $\frac{MW_1}{MW_2} = \left(\frac{S_1}{S_2}\right)^{3/2}$ abgeschätzt werden (SCHACHMAN 1959).²

Es ergibt sich für den mesodermalen Faktor ein Molekulargewicht in der Größenordnung von 25 000. Genauere Bestimmungen sind mit dieser Methode nicht möglich, da die Konformation des Proteins nicht gesondert berücksichtigt wird. Die Methode hat aber den großen Vorteil, daß nach der Zentrifugierung die Identität einer bestimmten Komponente mit dem Induktionsfaktor durch Testversuche eindeutig festgestellt werden kann.

In 7–9 Tage alten Hühnerembryonen ist der mesodermale Induktionsfaktor vorwiegend im Cytoplasma, und zwar im desoxycholsäurelöslichen Teil der sogenannten Mikrosomenfraktion enthalten (TIEDEMANN u. Mitarb. 1962). Die Zellkernfraktion enthält nur wenig mesodermalen Faktor. Eine ganz ähnliche Aktivitätsverteilung wurde auch in Homogenaten aus Gastrula- und Neurulastadien von Triturus gefunden (KOCHER-BECKER und TIEDEMANN, unveröffentlicht). Ältere entwicklungsphysiologische Versuche (SPEMANN 1914, zit. in SPEMANN 1936, S. 17) lassen weiterhin den Schluß zu, daß entweder Messenger-RNS für die Synthese von Induktionsfaktoren oder Induktionsfaktoren selbst im Cytoplasma oder der Rinde des befruchteten Eies bereits prälokalisiert sind.

Die Verteilung des Faktors in den Zellen könnte durch die Annahme erklärt werden, daß der Faktor im Cytoplasma synthetisiert wird und ein Teil dann möglicherweise in die Zellkerne wandert. Mit der experimentellen Prüfung dieser Hypothese sind wir beschäftigt.

Zusammenfassung

In früheren Versuchen hatten wir gefunden, daß Hemmung der Atmung durch Blausäure die Entwicklung von Amphibienembryonen stark verzögert. Von allen synthetischen Prozessen ist dabei die Synthese von RNS und DNS am stärksten gehemmt. Einen weiteren Hinweis auf die engen Beziehungen zwischen Differenzierung und RNS-Stoffwechsel brachten Versuche mit Actinomycin D. Bei geeigneter Konzentration und Behandlungsdauer bleiben die Gewebe in der Kultur am Leben, differenzieren sich aber nicht mehr zu allen Organen.

Die Differenzierung zu speziellen Geweben und Organen hängt nicht von der Syntheserate der Gesamt-RNS ab. Auch im isolierten Ektoderm, das nur epitheliale Stränge bildet, wird Ribosomen-RNS und Transfer-RNS

² S_1/S_2 ist die Relation der Wanderungsstrecken für Protein 1 und Protein 2. Für Proteine von gleichem spezifischem Partialvolumen ist sie gleich dem Verhältnis der Sedimentationskonstanten.

synthetisiert. Da im Ektoderm auch Protein synthetisiert wird, ist diese RNS funktionsfähig. Dagegen fehlt im Ektoderm offenbar Informations-(Messenger)-RNS für die Synthese von organspezifischen Enzym- und Strukturproteinen. Die Frage nach der Kontrolle dieser RNS-Fraktion ist zugleich die Frage nach dem molekularen Mechanismus der embryonalen Determination und Induktion. Ein «mesodermale» Gewebe (Muskel, Chorda und Nierensystem) induzierender Faktor konnte aus Hühnerembryonen in hochgereinigter Form gewonnen werden. Der etwa 5000–10 000fach angereicherte Faktor ist ein Protein von relativ niedrigem Molekulargewicht (ca. 25 000–30 000). Der Faktor ist vor allem an cytoplasmatische Strukturen («Mikrosomenfraktion») gebunden.

Résumé

Dans des expériences antérieures, nous avons trouvé qu'une inhibition de la fonction respiratoire par l'acide cyanhydrique ralentit fortement le développement d'embryons d'amphibiens. De toutes les synthèses, ce sont celles du RNA et du DNA qui sont les plus ralenties. L'administration d'actinomycine D a donné une preuve supplémentaire des relations étroites qui existent entre le métabolisme du RNA et la différenciation. A une concentration adéquate et pour une durée d'application suffisante, les cellules de la culture tissulaire restent en vie, mais ne subissent plus de différenciation en organes.

La différenciation en tissus et organes particuliers ne dépend pas de la synthèse quantitative du RNA total. Dans l'ectoderme isolé qui ne contient que des travées épithéliales, se synthétisent le RNA des ribosomes et le RNS de transfert; et comme l'ectoderme synthétise également des protéines, ce RNS peut devenir fonctionnel. Par contre, il semble que dans l'ectoderme il manque la fonction de RNA-d'information (messenger-RNA) qui est nécessaire pour la synthèse de protéines de structure ou d'enzymes spécifiques aux organes. Le problème du contrôle de cette fraction de RNA est en même temps celui du mécanisme moléculaire de la détermination embryonnaire et de l'induction. Il a été possible d'isoler, à l'état de grande pureté, à partir d'embryons de poulets, un facteur «induisant» du tissu mésodermale (muscle, chorde et système rénal). Ce facteur concentré à près de 5000 à 10 000 fois est une protéine de poids moléculaire relativement bas (environ 25 000 à 30 000). Ce facteur est surtout lié à des structures cytoplasmiques («fraction microsomique»).

Riassunto

In occasione di esperimenti anteriori avevamo constatato che l'inibizione della respirazione mediante acido cianidrico ritarda notevolmente lo sviluppo degli embrioni di anfibio. Fra tutti i processi di sintesi è la sintesi dell'acido ribonucleinico e desossiribonucleinico che viene frenata maggiormente. Altri indizi sulla stretta correlazione tra differenziazione e metabolismo dell'acido

ribonucleinico si ottennero con gli esperimenti fatti con l'actomicina D. Se la concentrazione ed il tempo di trattamento sono appropriati, i tessuti di una coltura rimangono in vita ma non si differenziano ulteriormente in modo da formare tutti gli organi.

La differenziazione in tessuti ed organi speciali non dipende dalla sintesi dell'acido ribonucleinico totale. Anche nell'ectoderma isolato che produce soltanto cordoni epiteliali viene sintetizzato l'acido ribonucleinico dei ribosomi come pure l'acido ribonucleinico detto «Transfer». Dato che anche nell'ectoderma viene sintetizzata la proteina, questo acido ribonucleinico è funzionale. Sembra invece che nell'ectoderma, la sintesi o funzione dell'acido ribonucleinico d'informazione (in inglese Messenger) sia interrotta quando si tratta della sintesi di proteine enzimatiche e strutturali, specifiche per i diversi organi.

La questione del controllo di questa frazione dell'acido ribonucleinico è pure una questione che riguarda il meccanismo molecolare della determinazione e dell'induzione embrionale. Un fattore d'induzione per il tessuto «mesodermale» (muscolo, corda dorsale, sistema renale) potè essere estratto da embrioni di pollo purificati. Questo fattore concentrato circa 5000-10 000 volte è una proteina dal peso molecolare relativamente basso (circa 25 000 a 30 000). Questo fattore è legato specialmente a delle strutture citoplasmatiche (frazione di microsomi).

Summary

In earlier experiments we have shown that the inhibition of respiration by hydrocyanic acid strongly delays the development of amphibian embryos. Of all the synthetic processes especially the synthesis of RNA and DNA are most strongly inhibited. A further proof for the close relationship between differentiation and RNA metabolism is given by experiments with actinomycine D. At suitable concentration and time of action, the tissue in the culture remains alive but does not differentiate to all organs.

The differentiation to special tissues and organs does not depend on the rate of synthesis of total RNA. Ribosomal-RNA and transfer-RNA are synthesized in isolated gastrula-ectoderm which only forms epithelial strands. Since also protein is synthesized in ectoderm, this RNA is capable of functioning. But the synthesis or the function of special messenger-RNA for organ-specific enzymes and structural proteins is probably repressed in ectoderm. The question how the synthesis of this messenger-RNA fraction is regulated touches the molecular mechanism of embryonic induction. As is well known special inducing factors are involved in embryonic induction. A factor inducing tissues derived from mesoderm (muscle, notochord and renal system) could be isolated from chick embryos in a highly purified form. The 5,000-10,000 times concentrated factor is a protein of relatively low molecular weight ($\sim 25,000-30,000$). The factor is primarily bound to cytoplasmic structures.

Für die Überlassung von Actinomycin D danken wir Merck, Sharp and Dohme, Rahway, USA. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Unterstützung unserer Untersuchungen durch eine Sachbeihilfe.

- BRACHET J.: Biochemical Cytology. Academic Press, New York 1957.
- RAUEN H. M., KERSTEN H. und KERSTEN W.: Zur Wirkungsweise von Actinomycinen. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 321, 139-147 (1960).
- REICH E., FRANKLIN R. M., SHATKIN A. J. und TATUM E. L.: Effect of Actinomycin D on cellular nucleic acid synthesis and virus production. Science 134, 556-557 (1961).
- SCHACHMAN H. K.: Ultracentrifugation in biochemistry. Academic Press, New York 1959.
- SPEMANN H.: Experimentelle Beiträge zu einer Theorie der Entwicklung. Springer, Berlin 1936.
- TIEDEMANN HEINZ und TIEDEMANN HILDEGARD: Einwirkung von HCN auf die frühen Entwicklungsstadien des Alpenmolches. Z. Naturforsch. 9b, 371-380 (1954).
- TIEDEMANN HEINZ und TIEDEMANN HILDEGARD: Versuche zur Gewinnung eines mesodermalen Induktionsstoffes aus Hühnerembryonen. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 314, 156-176 (1959).
- TIEDEMANN HEINZ und BORN JOCHEN: Vergleichende Untersuchungen über die Protein- und Nucleinsäuresynthese in Tumorzellen, Embryonen und Retina bei Aerobiose und Anaerobiose. Z. Naturforsch. 15b, 380-394 (1960).
- TIEDEMANN H., BORN J. und KOCHER-BECKER U.: Synthese von Ribonucleinsäuren in Ganzkeimen und im isolierten Ektoderm von Triturus alpestris. Z. Naturforsch. 20b, 997-1004 (1965).
- TIEDEMANN H., BORN J., KOCHER-BECKER U. und TIEDEMANN H.: Anreicherung des mesodermalen Induktionsfaktors durch Elektrophorese in Dextrangelen. Z. Naturforsch. 20b, 608-609 (1965).
- TIEDEMANN H., KESSELRING K., BECKER U. und TIEDEMANN H.: Über die Induktionsfähigkeit von Mikrosomen- und Zellkernfraktionen aus Embryonen und Leber von Hühnern. Develop. Biol. 4, 214-241 (1962).

Prof. Dr. H. TIEDEMANN, Max-Planck-Institut für Meeresbiologie, Anton Dohrn-Weg, D 294 Wilhelmshaven.