

Forschungsschwerpunkte – Dr. Eileen Furlong

Der Prozess der Embryonalentwicklung ist auf vielen Ebenen erstaunlich. Erstens durch seine Fähigkeit, das Genom auf unterschiedliche Weise zu nutzen, um Zellen und Gewebe mit einer enormen Funktionsvielfalt zu entwickeln; und zweitens durch die inhärente Robustheit: Die Embryogenese verläuft allgemein so, dass sich Embryonen, trotz Unterschieden in segregierenden Mutationen und der embryonalen Umgebung, mit demselben Körperplan entwickeln – ein Prozess, den Waddington „Kanalisation“ nennt. Ein Großteil dieses Prozesses wird durch große, eng miteinander verbundene Transkriptionsnetzwerke gesteuert und gepuffert. Diese wiederum werden durch die Wirkung von Transkriptionsfaktoren reguliert, die über Enhancer-Elemente wirken. Enhancer sind relativ kleine DNA-Abschnitte, die über das gesamte nichtkodierende Genom verstreut sind und die regulieren, wann und wo ein Gen exprimiert wird. Diese „Steuerelemente“ sind daher wesentliche Triebkräfte für die Embryogenese sowie fast alle biologischen Prozesse. Mutationen in Enhancern können zu verheerenden Entwicklungsdefekten führen und werden zunehmend als Schlüsselmutationen bei einer Vielzahl menschlicher Krankheiten entdeckt. Andererseits sind Mutationen in Enhancern auch eine wichtige Triebkraft der Evolution und führen zu Unterschieden in der Artenbildung verschiedener Merkmale.

Mein langjähriges Interesse gilt dem Verständnis beider Eigenschaften (Regulierung und Robustheit), indem ich die grundlegenden Prinzipien der Genomregulierung untersuche. Dazu gehört auch das Verständnis, wie Entwicklungs-Enhancer funktionieren, wie sie im dreidimensionalen Zellkern organisiert sind und wie sie entwicklungsbiologische Programme regulieren. Im Laufe der Jahre haben wir dies hauptsächlich in *Drosophila* in verschiedenen Maßstäben untersucht. Die Fruchtfliege ist ein sehr bekanntes Modellsystem, um sowohl die Embryonalentwicklung als auch die Chromatin-/Transkriptionsregulation zu untersuchen – viele bahnbrechende Entdeckungen für unser Verständnis beider Prozesse wurden zuerst in Fliegen nachgewiesen.

Zum einen haben wir hineingezoomt, um die inhärenten Eigenschaften von Enhancern selbst näher zu beleuchten: Durch die Integration von Genetik, Genomik und computergestützter Modellierung haben wir die Komplexität und Plastizität von Enhancern in der Entwicklung aufgedeckt und Mechanismen entdeckt, die erklären wie einige Enhancer funktionieren. Enhancer werden in der Regel von mehreren Transkriptionsfaktoren gebunden, die ein bestimmtes Muster der Genexpression hervorrufen. Die vorherrschende Meinung war, dass es keine

„eindeutigen Codes für die Bindung von Transkriptionsfaktoren“ für ein bestimmtes Expressionsmuster gibt, sondern dass verschiedene Kombinationen von Transkriptionsfaktoren zu demselben Expressionsmuster führen können. Wie Transkriptionsfaktoren an einen Enhancer binden, einschließlich der additiven oder kooperativen (also direkten oder indirekten) Rekrutierung, ist ebenfalls wichtig für die Aktivität eines Enhancers. Diese Beobachtungen haben zu verschiedenen Modellen der Enhancer-Funktion geführt. Bei der Untersuchung von Transkriptionsfaktoren, die für die Herzentwicklung wichtig sind, entdeckten wir eine alternative Art der kooperativen Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren. Dieses „Transkriptionsfaktor-Kollektiv“-Modell erklärt, wie einige Enhancer selbst dann noch funktionieren können, wenn Mutationen vorliegen – eine Eigenschaft, die auch bei einigen neuronalen Enhancern beobachtet wurde. Durch die Verwendung natürlicher Sequenzvariationen im Rahmen einer Integration von Populationsgenetik und Entwicklungsbiologie haben wir eine Reihe zusätzlicher Eigenschaften aufgedeckt, die die schädlichen Auswirkungen genetischer Variationen auf die Genexpression abfedern. Eine Überraschung war die Feststellung einer weit verbreiteten genetischen Epistase innerhalb von Entwicklungs-Enhancern und -Promotoren, die zeigt, dass Varianten mit großen Auswirkungen durch andere Varianten innerhalb desselben Elements abgeschwächt oder abgepuffert werden. Je mehr wir uns mit den Funktionen von Enhancern befassen, desto mehr Plastizität beobachten wir, einschließlich Elementen, die je nach Kontext eine Doppelfunktion haben, zum Beispiel Enhancer- und Silencer-Aktivität, Enhancer- und Promotor-Aktivität oder Enhancer- und Boundary-Aktivität. Dies ist wahrscheinlich ein Hinweis darauf, wie sich diese miteinander verknüpften Funktionen evolutionär entwickelt haben. Insgesamt unterstreichen diese faszinierenden Merkmale jedoch die Komplexität und die große Herausforderung, die Funktion allein aus der Sequenz vorherzusagen. Mit umfangreicheren Daten durch Perturbation des Systems und ausgefeilteren maschinellen Lernmodellen dürfte es hier in Zukunft spannende Fortschritte geben.

Zum anderen haben wir von einzelnen Enhancern herausgezoomt auf regulatorische Landschaften innerhalb von Chromatindomänen. Jedes Gen hat in der Regel mehrere Enhancer, insbesondere Entwicklungsgene, die sehr komplexe Expressionsmuster aufweisen. Die Enhancer eines Gens können stromaufwärts oder stromabwärts des Gens liegen, das sie regulieren, und befinden sich manchmal sogar in den Introns anderer Gene. Einige Enhancer befinden sich in unmittelbarer Nähe des Gens, das sie regulieren (in linearer genomischer Entfernung), andere dagegen in großer Entfernung. Wie solche entfernten Enhancer mit ihren Startstellen (Promotoren) kommunizieren, ist eine der zentralen Fragen der Genomregulation. Das vorherrschende Modell geht davon aus, dass das Chromatin (wie eine Schnur) in Schleifen gelegt ist, sodass ein Enhancer und ein Genpromotor in räumliche Nähe zueinander

gebracht werden. Wie diese Schleifenbildung während der Embryogenese reguliert wird und wie ein Enhancer seinen richtigen Promotor erkennt, sind zwei Schlüsselfragen, mit denen wir uns beschäftigen. Durch die Kombination von Genetik, Genomik und bildgebenden Verfahren haben wir einige faszinierende und recht überraschende Eigenschaften der Enhancer-Promoter-Kommunikation aufgedeckt.

Enhancer müssen sich in relativer Nähe zu den Promotoren befinden, die sie regulieren, um die Transkription zu aktivieren. Bei einigen Loci ist diese Nähe nur im entsprechenden Zelltyp und zum entsprechenden Zeitpunkt der Embryogenese gegeben, wenn das Gen exprimiert werden muss. Bei der Untersuchung einer großen Anzahl von Entwicklungs-Enhancern in frühen Stadien der Embryogenese entdeckten wir einen weiteren Modus, bei dem sich die Enhancer bereits Stunden vor der Expression des Gens in der Nähe ihrer Promotoren befinden. Diese faszinierende Erkenntnis deutet darauf hin, dass die Topologie der Enhancer-Promotor-Interaktionen, die für die Entscheidung über das Zellschicksal erforderlich sind, bereits in sehr frühen Stadien der Embryogenese angelegt werden, wo sie für die Aktivierung in späteren Stadien vorbereitet zu sein scheinen. Dies deutet auch darauf hin, dass die Nähe, zumindest in dieser Größenordnung, nicht der Auslöser für die Transkription an diesen Loci ist. Um die funktionelle Rolle von chromatintopologischen Domänen und weitreichenden Chromatinschleifen bei der Genregulation zu untersuchen, verwenden wir genomische Umlagerungen und Deletionen in verschiedenen Größenordnungen und nutzen dabei die Vorteile der genetischen Werkzeuge in *Drosophila*. Dazu gehört auch die Verwendung großer, stark umgeordneter Chromosomen (Balancer), um die Genomstruktur zu stören und anschließend die Auswirkungen auf die Chromatin-Interaktionen und die Genexpression systematisch zu untersuchen. Mit einem sehr überraschenden Ergebnis: Obwohl einige Enhancer-Promotor-Interaktionen gestört wurden, war dies bei den meisten nicht der Fall. Die Expression der meisten Gene änderte sich nicht, wenn die Grenzen gestört oder Chromatindomänen fusioniert wurden. Dies deutet darauf hin, dass einige Enhancer Chromatindomänen benötigen, um ihre Funktion einzuschränken und zu verhindern, dass sie fälschlicherweise ein anderes Gen aktivieren, während dies bei anderen Enhancern nicht der Fall ist. Selbst nach der Fusion von TADs, die die Größe einer Domäne verdoppeln und viele weitere Gene in dieselbe Domäne bringen, ignorieren viele Enhancer diese und regulieren weiterhin den Promotor ihres normalen Zielgens. Dies wirft viele interessante Fragen darüber auf, wie diese Elemente ihren korrekten kognitiven Promotor erkennen und warum einige Enhancer (beziehungsweise die Expression einiger Genen von Chromatinumlagerungen betroffen sind, während andere nicht betroffen sind. Dies ist wichtig, da solche chromosomalen Umlagerungen häufig mit Krebs und Entwicklungsstörungen in Verbindung gebracht werden.

Des Weiteren treten wir noch einen Schritt zurück und schauen uns eine weitere Vergrößerung von genregulatorischen Landschaften (oder Chromatindomänen) zu genomweiten Entwicklungsnetzwerken an. Die Bewertung von Entwicklungsnetzwerken wurde durch die Entwicklung von Genomikansätzen ermöglicht. Seit meiner Zeit als Postdoktorandin fühle ich mich von der unvoreingenommenen und systematischen Sichtweise angezogen, die genomische Experimente bieten. Während viele dieser Methoden zunächst in Gewebekulturzellen oder Hefe entwickelt wurden, habe ich versucht, die Leistungsfähigkeit dieser Methoden zu nutzen, um der Komplexität der Embryonalentwicklung gerecht zu werden. Meine Gruppe optimiert genomische Methoden und entwickelt solche manchmal auch selbst, um zu verstehen, wie sich multizelluläre Embryonen entwickeln. Die Anwendung dieser Methoden vor mehr als 15 Jahren ergab einige der ersten globalen Ansichten der dynamischen Belegung von Transkriptionsfaktoren und der Funktion von Enhancern während der Entwicklung eines Embryos, wobei Veränderungen der Bindung von Transkriptionsfaktoren, des Chromatinzustands und der Expression im Laufe der Entwicklung eines Gewebes aufgezeichnet wurden. Zuvor stützten sich die Konzepte auf eine Handvoll gut untersuchter Modell-Loci. Diese ersten genomweiten Ansichten haben mich damals unglaublich fasziniert, da sie das enorme Ausmaß, die Komplexität und die Interkonnektivität von Entwicklungsnetzwerken zeigten. Durch die Kombination mit Mutanten wurden in den folgenden Jahren funktionelle Regulationsprogramme aufgedeckt, insbesondere während der Spezifizierung des Mesoderms zu verschiedenen Muskelgeweben. In unserer aktuellen und zukünftigen Arbeit treiben wir dies auf der Ebene einzelner Zellen voran. Wir haben vor Kurzem gezeigt, dass die Ansicht von offenem Chromatin in einzelnen Zellen zelltypspezifische Enhancer identifizieren und vorhersagen kann, in welchen Stadien und Geweben sie aktiv sind. Darüber hinaus ist es möglich Zelltypen zu identifizieren und ihre Entwicklungswege während der Embryogenese zu verfolgen. Die Anwendung dieses Ansatzes in einem engen Zeitverlauf der Entwicklung eines Gewebes lieferte einen sehr umfassenden Überblick sowohl über die Enhancer als auch über die Transkriptionsfaktoren, die bei jedem Übergang aktiv sind. Die Kombination mit ähnlichen Daten aus einzelnen Zellen mutierter Embryonen zeigte die wahre Stärke des Systems, um mutierte zelluläre Phänotypen *de novo* zu identifizieren und gleichzeitig die molekulare Funktion des Transkriptionsfaktors aufzudecken. In Zukunft werden wir diesen Ansatz ausweiten, um mehr genetische Mutanten und eine größere Vielfalt in die molekularen Messungen einzubeziehen. Langfristiges Ziel ist es zu verstehen, wie Entwicklungsprogramme während der Embryonalentwicklung reguliert und interpretiert werden.

Unsere Forschung befindet sich daher an der Schnittstelle zwischen Transkriptions-/Chromatinbiologie und Entwicklungsbiologie. Wir streben an, allgemeine Prinzipien der Regulierung und Nutzung des Genoms aufzudecken, die Auswirkungen auf die Bereiche Entwicklungsbiologie, Evolutionsbiologie und menschliche Krankheiten haben.

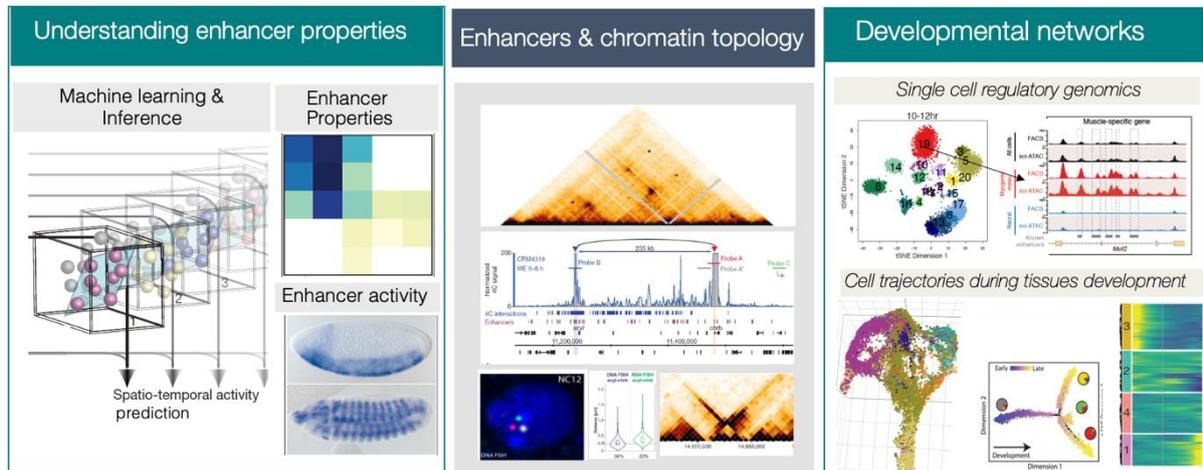


Abbildung 1:

Links: Die Integration von Ansätzen aus der Genomik, der Informatik und der Genetik hat eine Reihe überraschender Merkmale über die Funktionsweise von Enhancern aufgedeckt. Dargestellt ist eine Arbeit, bei der ein Ansatz des maschinellen Lernens zur Vorhersage der Aktivität von Enhancern aus genomweiten Daten über die Besetzung von Transkriptionsfaktoren verwendet wird.

Mitte: Mithilfe von Genomik, Bildgebung und Genetik wird untersucht, wie Enhancer mit bestimmten Promotoren kommunizieren, um die Genexpression zu regulieren, und wie sich dies im Laufe der Embryonalentwicklung verändert.

Rechts: Mithilfe der regulatorischen Einzelzellgenomik können wir Entwicklungsverläufe verfolgen, Identitäten einzelner Zellen sowie gewebespezifische Enhancer vorhersagen. Dies ist ein sehr leistungsfähiger Ansatz, wenn er mit Mutanten kombiniert wird, da wir die Phänotypen von Mutanten de novo sowohl auf zellulärer als auch auf molekularer Ebene identifizieren und diese Informationen für viele Mutanten integrieren können, um funktionelle Entwicklungsnetzwerke aufzubauen.