

Wie kommt es, dass Kinder so aussehen wie ihre Eltern? Woher weiß eine Zelle im Embryo, ob sie zu einer Augen- oder Muskelzelle werden soll? Wie überhaupt wirken die Gene bei der Entstehung der Vielfalt des Lebens?

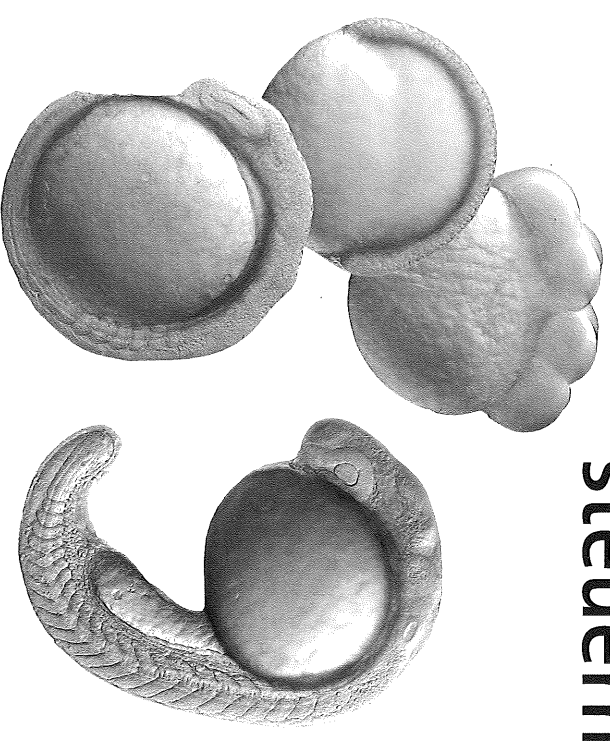
Christiane Nüsslein-Volhard, ausgezeichnet mit dem Nobelpreis für Medizin, gibt hier einen ebenso verständlichen wie anschaulichen Überblick über Evolution, Genetik, Molekularbiologie und Embryologie und diskutiert aktuelle Themen der menschlichen Biologie und Biopolitik.

Nüsslein-Volhard
Das Werden des Lebens

Christiane
Nüsslein-Volhard

Das Werden des Lebens

Wie Gene die Entwicklung steuern



«Leben ist das Faszinierendste, was es gibt. Innerhalb von kurzer Zeit entsteht in einem Ei, das aus nicht viel mehr als einem Säckchen Dotter besteht, umhüllt von einer schützenden Schale, ein Küken, das laufen, sehen und essen kann. ...» Mit diesen Worten beginnt eine spannende Reise durch die Geschichte der Entwicklungsbiologie, auf der der Leser die wunderbar anmutenden Vorgänge der Gestaltbildung kennen lernt. Er erfährt, welche Fragestellungen, Experimente und Antworten zu dem heutigen Wissen über das Werden des Embryos geführt haben, welche Mechanismen die fein aufeinander abgestimmten Formen eines Tieres entstehen lassen und welche Rolle die Gene bei der Entwicklung eines Organismus spielen.

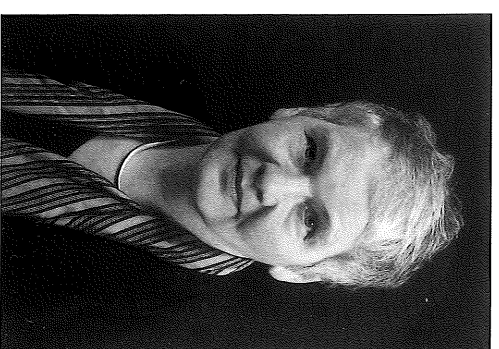
Das Buch handelt von Genen und Embryonen vielzelliger Tiere bis hin zum Menschen. Wie kommt es, dass Kinder so aussehen wie ihre Eltern? Woher weiß eine Zelle im Embryo, zu welcher Struktur sie sich entwickeln soll, beispielsweise zu einer Augen- oder einer Muskelzelle? Wie überhaupt wirken die Gene bei der Entstehung der Vielfalt des Lebenden?

Christiane Nüsslein-Volhard gibt einen verständlichen, mit zahlreichen eigenen Zeichnungen anschaulich gemachten Überblick über Evolution, Genetik, Molekularbiologie und Embryologie und diskutiert aktuelle Themen der menschlichen Biologie und Biopolitik.

Umschlaggestaltung: Uwe Göbel, München
Umschlagbilder: © Darren Gilmour

Verlag C. H. Beck München

www.beck.de



Christiane Nüsslein-Volhard, Studium in Frankfurt/M., Diplom in Biochemie Tübingen (1968), Promotion Tübingen (1973), Postdoc in Basel und Freiburg, Gruppenleiterin am Europäischen Labor für Molekularbiologie in Heidelberg (1978–1981) und am Friedrich-Miescher-Laboratorium in Tübingen (1981–1984). Seit 1985 ist sie Direktorin am Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie (Tübingen).

Für ihre Entdeckungen von Genen, die die Entwicklung von Tier und Mensch steuern, erhielt sie zahlreiche Auszeichnungen und Preise, unter anderem den *Leibnizpreis* (1986), den *Albert Lasker Award* (1991) und den *Nobelpreis für Medizin* (1995). Sie ist Mitglied der Royal Society (GB), der National Academy (USA) und des Ordens pour le mérite (BRD). Seit 2001 gehört sie dem nationalen Ethikrat der deutschen Bundesregierung an.

Verlag C. H. Beck München

www.beck.de

III. Gene und Proteine

Mendel hat den Begriff Gen noch nicht benutzt. Er sprach von Merkmalen sowie von Elementen, die unseren heutigen Begriffen von Phänotyp und Gen nahe kommen. Gene sind die Einheiten der Vererbung, deren Existenz man eigentlich nur dann erkennt, wenn sie in verschiedenen Zuständen oder Allelen vorliegen, die zu unterschiedlichen Merkmalen führen. Mendel hat sich bei seinen Experimenten bewusst auf einfache Fälle beschränkt, bei denen es jeweils zwei klar unterscheidbare Allele gab, nämlich die Wildform und eine Mutante. Dadurch konnte er die Gesetzmäßigkeiten erkennen, die die Schlussfolgerung erlaubten, dass jedes Gen doppelt vorkommt, einmal von der Mutter, einmal vom Vater, und dass diese ungeteilt und intakt von einer Generation zur nächsten weitergegeben werden. Zunächst wurden seine Regeln ausschließlich an Pflanzen bestätigt, und zwar im Jahre 1900 und gleichzeitig mehrmals. Kurz darauf erkannte man den Zusammenhang zwischen den Mendelschen Elementen und den Chromosomen.

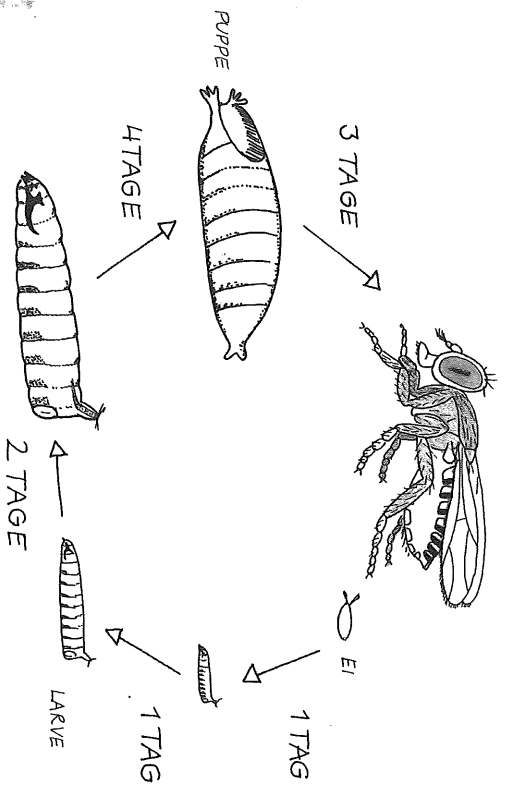
Die Begriffe Genetik, Gen und Genotyp wurden im ersten Jahrzehnt des 20. Jahrhunderts eingeführt, wobei man sich aber noch nicht über eine stoffliche Natur der Gene im Klaren war. Das lag daran, dass man Gene nicht sehen, sondern ihre Eigenschaften nur indirekt aus den Kreuzungen zwischen Individuen mit verschiedenen Merkmalen schließen konnte. Für die Aufklärung der genauen Zusammenhänge bei der Weitergabe der Gene von einer Generation zur nächsten und der Anordnung der Gene auf Chromosomen erwies sich die Tauffliege *Drosophila melanogaster* als besonders geeignet. Auch bei *Drosophila* wurde sich zunächst auf die Mutanten mit einem klaren Phänotyp konzentriert, der in der adulten Fliege sichtbar ist und sich leicht verfolgen lässt. Hier gelang es, die Mendelschen Regeln auch für Tiere zu bestätigen und damit ihre uni-

verselle Gültigkeit zu zeigen. Das Geschlechtschromosom sowie Genkoppelung und Rekombination wurden entdeckt und die ersten Chromosomenkarten aufgestellt.

Der Frage, was ein Gen denn nun genau bewirkt, war aber nicht sehr leicht beizukommen. Die Phänotypen, die auf Grund von Mutationen auftreten, geben zwar eine Auskunft über die Funktion eines Gens. Zum Beispiel führt eine Mutation im Gen *white* der Fliege zu weißen statt roten Augen. Das zeigt, dass das Gen *white* eine Funktion bei der Bildung des roten Augenfarbstoffes hat, die durch die Mutation zerstört wurde. Die Augenfarbe wird aber nicht nur durch *white*, sondern durch eine ganze Reihe weiterer Mutationen in verschiedenen Genen, wie *pink*, *claret*, *scarlet*, *cinnabar* und *brown* geändert. Ein bestimmtes Merkmal wird also durch viele verschiedene Gene beeinflusst. Umgekehrt führen Mutationen in den meisten Genen zu komplexen Phänotypen, was bedeutet, dass ein Gen nicht nur ein Merkmal, sondern mehrere Merkmale betrifft. Die Gene, deren Funktion zum Überleben notwendig ist – und das ist die Mehrzahl –, waren bei *Drosophila* schwierig zu erforschen. So wurden die molekulare Natur der Gene und ihre biochemische Funktion schließlich an den viel einfacher gebauten einzelligen Organismen aufgeklärt.

1. *Drosophila*-Genetik

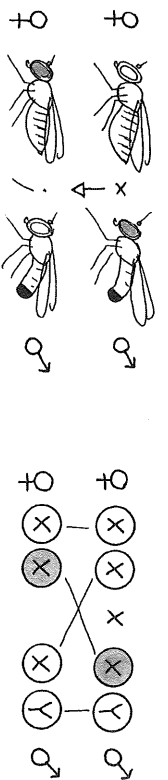
Drosophila, die wir als Obstfliege kennen, wurde zu Beginn des 20. Jahrhunderts von dem amerikanischen Biologen Thomas Hunt Morgan als ideales Objekt der Genetik entdeckt. *Drosophila* hat als Insekt ein Außenskelett aus einem Kutikulapanzer, der wie bei allen Gliedertieren reich mit Borsten und Haaren ausgestattet ist, die in einem konstanten Muster angeordnet sind. Dazu gibt es eine Vielzahl unter der Lupe gut zu erkennender Merkmale, rote Augen, brauner Körper, Fühler, Flügel. Das erlaubt, auch geringfügige Änderungen durch Mutationen sicher zu erkennen. Die Generationszeit ist kurz, und aus einer Kreuzung erhält man viele Nach-



10 *Lebenszyklus von Drosophila*. Die Obstfliege, die jeder kennt, ist einige Millimeter lang. Sie legt ihre zahlreichen Eier in reifes Obst, von dem die sehr einfach gebauten, kopf- und beinlosen Larven sich schnell ernähren. Zur Verpuppung begeben sie sich an eine trockene Stelle, und die erwachsene Fliege, mit Beinen, roten Komplexaugen, Fühlern und Flügeln, steigt heraus und fliegt davon.

kommen. *Drosophila* hat nur vier Chromosomen, von denen eins sehr klein ist. Im Ei entwickelt sich eine Larve (im Volksmund Made), ein segmentiertes, wurmartiges Wesen, die viel einfacher gebaut ist als die Fliege. Die Larve wächst, häutet sich zweimal und verpuppt sich schließlich. Während der Puppenruhe wird die Imago, die erwachsene Fliege, gebildet, die nach 12 Tagen der Entwicklung aus der Puppenhülle steigt (Abb. 10).

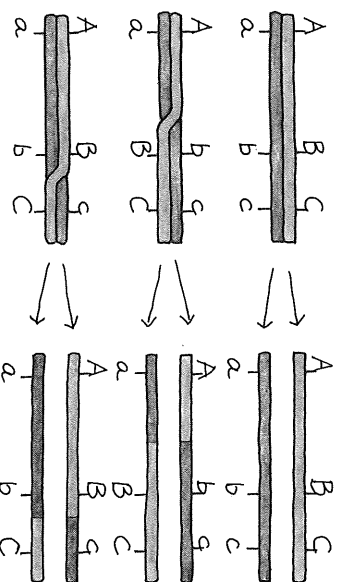
Geschlechtschromosomen. Im Jahre 1910 wurde von Morgan eine Mutante beschrieben, *white* genannt, bei der die Augen weiß statt rot sind. Das Allel für rot, die Augenfarbe der normalen Fliege, ist dominant. Experimente mit diesen Mutanten ergaben ungewöhnliche Resultate: Kreuzt man nämlich homozygote *white*-Weibchen mit rotäugigen Männchen, so sollte man nach dem Mendelschen Uniformitätsgesetz erwarten, dass alle Kinder rotäugig sind. Rot-



11 *X-Chromosom*. Weißäugige Fliegenweibchen gekreuzt mit rotäugigen Männchen ergeben rotäugige Weibchen und weißäugige Männchen. Die Erklärung ist, dass die Mutation im *white*-Gen auf dem X-Chromosom liegt, das in Männchen nur einmal vorkommt. Männchen erhalten das X-Chromosom ausschließlich von ihren Müttern und dazu ein Y-Chromosom von ihrem Vater.

äugig sind aber nur die Weibchen, während die Männchen alle weißäugig sind (Abb. 11). Es stellte sich dann heraus, dass das Chromosom, das das Gen *white* trägt, in Weibchen doppelt, aber in Männchen nur einmal vorkommt. Das ist das X-Chromosom. Männchen haben statt dem zweiten X-Chromosom ein Y-Chromosom, das aber nur wenige Gene trägt. Die Männchen bekommen ihr X-Chromosom ausschließlich von der Mutter. Dadurch ist der Phänotyp einer rezessiven Mutation auf dem X-Chromosom in den Männchen leicht zu erkennen. Das Y-Chromosom ist nicht homolog zum X-Chromosom, aber es paart sich mit diesem bei der Meiose, so dass die Spermien entweder ein X- oder ein Y-Chromosom erhalten (Abb. 11). Obwohl auch beim Menschen die Konstitution XX und XY mit weiblich und männlich einhergeht, ist das nicht allgemein der Fall: Zum Beispiel haben bei Vögeln die Männchen zwei und die Weibchen nur ein Geschlechtschromosom. Bei einigen Tierarten wie Krokodilen werden die Geschlechter nicht von den Chromosomen, sondern von der Temperatur bestimmt. Es ist leicht zu sehen, dass bei der Bestimmung des Geschlechts durch Chromosomen im Durchschnitt die gleiche Zahl von männlichen und weiblichen Tieren auftritt und bei der Temperatur nicht.

Rekombination. Bald wurden viele weitere neue Mutationen gefunden, die verschiedene Eigenschaften des Körpers der Fliege betrafen, wie Länge der Flügel, Körperfärbung, Zahl und Position der



12 *Rekombination*. Bei der Paarung der Chromosomen zu Beginn der Meiose finden Überkreuzungen statt, die manchmal zu Brüchen und verkehrter Verheilung führen. In solchen Fällen werden Allele auf den ursprünglich mütterlichen und väterlichen Chromosomen neu kombiniert. Rekombination findet häufiger zwischen A und B als zwischen B und C statt. Die Häufigkeit der Rekombination zwischen zwei Genen ist somit ein Maß für deren Abstand auf dem Chromosom (siehe auch Abb. 39).

Borsten, Aufbau der Augen. Durch geeignete Kreuzungen konnten die meisten Mutationen den drei großen Chromosomen zugeordnet werden. Dabei fand man bald weitere Abweichungen von den Mendelschen Regeln: Liegen Gene auf dem gleichen Chromosom, so werden die Merkmale nicht unabhängig, sondern miteinander, also gekoppelt, vererbt. Das war bis dahin übersehen worden, da die meisten Organismen ziemlich viele Chromosomenpaare haben, der Seeigel von Boveri zum Beispiel 18, der Zebrafisch 25, der Mensch 23, aber *Drosophila* nur vier. Betrachtet man zwei verschiedene Gene, so ist die Wahrscheinlichkeit, dass sie auf dem gleichen Chromosom liegen, beim Menschen sehr gering, bei der Fliege hingegen recht hoch.

Es wurden allerdings bald auch von dieser Regel Abweichungen beobachtet, indem zwei Mutationen auf dem gleichen Chromosom nicht immer gekoppelt in den Nachkommen einer Kreuzung auftraten. Das nennt man Rekombination. Das ließ darauf schließen, dass während der Meiose bei der Paarung der homologen väterlichen und mütterlichen Chromosomen vor der Reduk-

tionsteilung ein Austausch von Chromosomenabschnitten (Cross-over) stattfindet. Dadurch erhalten die haploiden Eizellen gemischte Chromosomen. Diese Überkreuzungen geschehen zufällig. Je näher zwei Gene beieinander liegen, desto seltener findet ein Crossover zwischen ihnen statt. So kann die Häufigkeit der Koppelung zweier Merkmale als Maß für ihren Abstand auf dem Chromosom genommen werden (Abb. 12). Auf diese Weise konnten Genkarten aufgestellt werden, die Gene auf den Chromosomen der Reihe nach anordnen. Diese Ergebnisse waren sehr wichtig, denn sie bedeuten, dass die Gene in den Chromosomen linear, also zweidimensional, angeordnet sind und nicht etwa in einer Ansammlung aus einzelnen getrennten Strukturen. Die Überkreuzung von Chromosomen während der Meiose geschieht allgemein bei Tieren und Pflanzen. Sie war schon früher, als Chiasma, in Zellen der Keimbahn, aus denen die Keimzellen hervorgehen, mikroskopisch beobachtet worden. Der Austausch von Chromosomenabschnitten bedeutet, dass es noch viel mehr Möglichkeiten der Kombination verschiedener Merkmale in den Keimzellen und damit in den Zygoten gibt, als durch die Zahl der Chromosomen vorgegeben ist.

Riesenchromosomen. Fliegen haben die Eigenschaft, dass bei der Entwicklung der Larve das Wachstum nicht durch Zellvermehrung, sondern durch das Größerwerden der einzelnen Zellen erfolgt. Die Chromosomen verdoppeln sich wie sonst in regelmäßigen Abständen, und das Zytoplasma nimmt entsprechend an Volumen zu,



13 *Riesenchromosomen*. Gezeigt sind die Banden der Spitze des X-Chromosoms, die von Calvin Bridges beschrieben und nummeriert wurden. Hier sind etwa 150 der 5000 Banden des *Drosophila*-Genoms dargestellt. Die Lage einzelner Gene ist in dieser Karte sichtbar gemacht.

aber es erfolgt keine Zellteilung. Die Zellen werden polyploid und riesig. Bei Fliegen bleiben die vervielfältigten Chromosomen in dicken Bündeln beieinander und bilden so genannte Riesenchromosomen aus. Diese sind besonders in den Speicheldrüsen gut entwickelt und weisen ein charakteristisches Bandenmuster auf, das durch unterschiedliche Kondensierung der Gene zustande kommt. Obwohl die Banden nicht direkt den einzelnen Genen entsprechen, können diese Bandenmuster als eine Art Landkarte des Genoms dienen. Hier konnte man den Genkarten, die durch Rekombination bestimmt wurden, Strukturen zuordnen und Gene eigentlich erstmals sichtbar machen (Abb. 13).

2. Mutationen

Die erbliche Veränderung eines Gens nennt man Mutation, und Tiere, die solche mutierten Gene tragen, heißen Mutanten. Der Zustand der Allele eines oder mehrerer Gene heißt Genotyp, und das entsprechende Erscheinungsbild im Organismus nennt man Phänotyp. Er gibt Auskunft über die Funktion eines Gens.

Mutationen treten spontan nur selten auf. Ihre Häufigkeit hängt von verschiedenen Faktoren ab, z.B. verursachen Röntgenstrahlen Brüche in den Chromosomen, die oft fehlerhaft verheilen. Durch sie können gegebenenfalls Verluste von ganzen Chromosomenabschnitten auftreten (Deletionen). In den Riesenchromosomen lässt sich das Ausmaß solcher Deletionen genau bestimmen. Bestimmte Chemikalien können die Mutationshäufigkeit erhöhen. Bei den meisten dieser Mutationen ist nur ein Gen geschädigt, und zwar so, dass es seine normale Funktion nicht mehr erfüllen kann. Solche «minus»-Mutationen verhalten sich dann, als wäre das Gen ganz verloren gegangen, also wie eine Deletion. Abweichend von Mendels Geflogenheit, verwendet man allgemein die Bezeichnung «plus» für den «Wildtyp» und «minus» für die Ausfallmutation. Ein Gen wird stets nach dem Phänotyp der Mutation benannt und nicht nach der Normalform. Der Grund dafür ist, dass es verschiede-

ne Gene gibt, die die gleiche Struktur betreffen: Zum Beispiel sind bei white-Fliegen die Augen weiß, bei pink-Fliegen rosa statt rot. Das Allel des Wildtyps ist meistens dominant, und minus-Mutationen werden rezessiv vererbt. Das heißt, dass eine intakte Kopie des Gens statt zweien völlig ausreicht, um die normale Funktion des Gens zu erfüllen. Eine Fliege des Genotyps w^+ , w^- ist also rotäugig. Es gibt auch «schwache» Mutationen, bei denen noch eine Restfunktion des Gens bestehen bleibt. Es ist das Privileg des Entdeckers der ersten Mutante eines Gens, das Gen zu benennen. Dabei wird meist eine einfache Beschreibung des Phänotyps gewählt.

Mutationen in den meisten Genen beeinträchtigen die Lebensfähigkeit des Tieres merklich, und in etwa einem Drittel der Gene der Fliege (das sind etwa 5000) überleben homozygot mutante Individuen nicht. Das heißt, dass die Entwicklung im embryonalen, larvalen oder pupalen Stadium abbricht, wenn beide Kopien des Gens defekt sind. Dagegen ist die Zahl der Gene, die zu sichtbaren Phänotypen mutieren und die Lebensfähigkeit kaum einschränken, wie white oder yellow (das den Körper erblassen lässt), vergleichsweise gering.

Sehr selten wird durch Mutation die Funktion eines Gens nicht ausgelöscht, sondern geändert; zum Beispiel gelangt es unter die Kontrolle eines anderen Gens und wird dadurch in einem anderen Kontext aktiv als normal. Bei Fliegen führt eine solche Mutation, Antennapedia, zu der Ausbildung von Beinen anstelle von Antennen. Mutationen, die zu Krebs führen, gehören häufig zu diesem Typ.

Mutationen in mehr als der Hälfte der Gene sind «still», das heißt, dass bei Fehlen des Gens in mutanten Tieren kein deutlich merklicher Phänotyp auftritt. Das gilt nicht nur für Fliegen, sondern ist z.B. auch für Mäuse gezeigt. Trotzdem ist es sehr wahrscheinlich, dass auch diese Gene eine wichtige Funktion im Leben des Tieres erfüllen. Sie ist aber in der geschützten Umgebung des Labors entbehrlich. Vielleicht sind Mutationen in solchen Genen ein Grund für die bei vielen Tierarten immer wieder gemachte Beobachtung, dass Inzucht, wenn nicht zu deutlichen Krankheits-

bildern, so doch zu einer sehr signifikanten Beeinträchtigung der allgemeinen Lebensfähigkeit, der Fitness, führt. Bei den meisten Tieren und Pflanzen existieren Mechanismen, sei es im Verhalten, sei es in der Morphologie und Physiologie der Sexualität, die Inzucht verhindern.

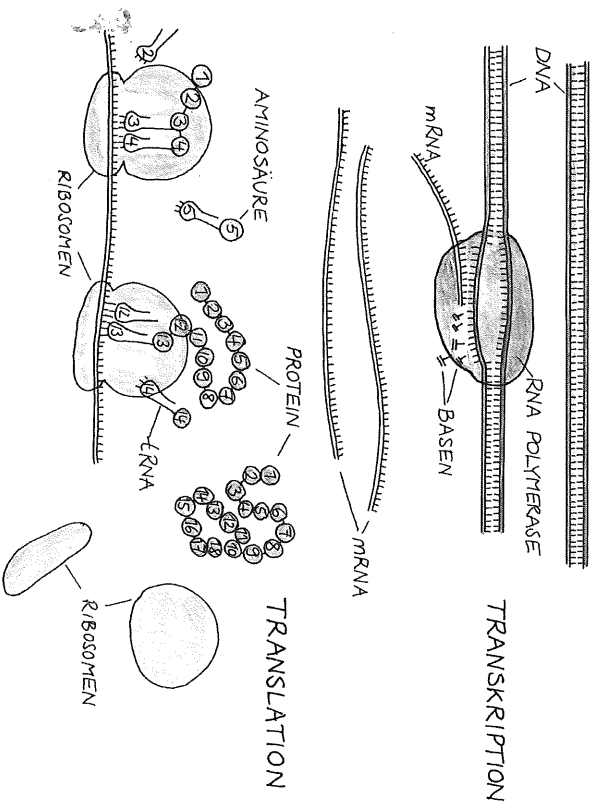
Praktisch alle Mutanten mit sichtbarem Phänotyp sind in ihrer Lebensfähigkeit den normalen, den Wildformen unterlegen. Für die Evolution spielen solche Mutationen, die häufig drastische Phänotypen zur Folge haben, kaum eine Rolle, da die mutanten Individuen wegen ihrer Auffälligkeit in der Natur schnell verschwinden. Allerdings war *Drosophila* für die Aufklärung der Frage, was ein Gen denn nun molekular ist und was es biochemisch bewirkt, nicht besonders gut geeignet. Der biochemische Zusammenhang zwischen Gen und Phänotyp wurde an Stoffwechselwegen von Pilzen und schließlich Bakterien aufgeklärt.

3. Die molekulare Natur der Gene

Schimmelpilze und Bakterien sind haploid, haben also jedes Gen nur einmal. Der Phänotyp eines Gens prägt sich dadurch direkt in der mutanten Zelle aus. Das ist für die Untersuchung der biochemischen Funktionen von Genen praktisch. Die Zellen lassen sich in flüssigen Nähmedien leicht züchten. Bei der Untersuchung von Stoffwechselwegen stieß man auf Mutanten, die sich nur vermehren konnten, wenn den Medien bestimmte Faktoren, zum Beispiel Nährstoffe wie Glukose oder Zwischenprodukte einer biochemischen Synthesekette, zugesetzt wurden. Es hat sich dann herausgestellt, dass in solchen Mutanten bestimmte Enzyme, die für einzelne Schritte im Stoffwechsel verantwortlich waren, fehlten. Das heißt, dass das Gen ein Enzym bestimmt. Die gezielte Suche nach solchen Mutanten hat dann entscheidend dazu beigetragen, komplexe Stoffwechselwege aufzuklären. Die Theorie hieß damals: Jedes Gen macht ein Enzym; verallgemeinert bedeutet das: Proteine werden durch Gene bestimmt.

Die chemische Natur der Gene blieb bis gegen die Mitte des 20. Jahrhunderts im Dunkeln. Lange wurde debattiert, ob Gene aus Proteinen bestehen oder Nukleinsäuren, die charakteristisch im Zellkern vorkommen. Schließlich bewiesen der Bakteriologe Oswald Avery und seine Kollegen 1944 an der Rockefeller-Universität in New York mit Bakterien, dass das genetische Material aus Desoxyribonukleinsäure, DNA, besteht. Das Experiment war das Folgende: Zwischen Bakterien lassen sich Gene einfach durch zellfreie Extrakte übertragen. Im Falle der Pneumokokken sind dies Allele, die die Eigenschaft, glatte oder raue Kolonien zu bilden, verleihen. Die Anreicherung der Gene ergab, dass diese nicht durch Enzyme, die Proteine angreifen, inaktiviert werden konnten. Dagegen wurden die Gene sofort zerstört, wenn dem Extrakt das DNA abbauende Enzym DNase zugesetzt wurde. Ein Experiment der amerikanischen Biologen Alfred Hershey und Martha Chase (1952) zeigte, dass bei der Infektion von Bakterien durch Viren nur die DNA, aber nicht das Protein des Virus in die Zelle eindringt. DNA war bereits lange bekannt und von ihrer chemischen Zusammensetzung her relativ einfach. Deshalb überraschte es, dass sie das Material sein sollte, aus dem Gene sind. DNA ist ein Kettenmolekül, von dem Schweizer Friedrich Miescher bereits 1869 in Tübingen entdeckt, das aus nur vier verschiedenen Bausteinen zusammengesetzt ist. Die Bausteine bestehen aus den Basen Adenin (A), Thymin (T), Guanin (G) und Cytosin (C), die über eine Zucker-Phosphat-Kette verbunden sind.

Die DNA-Doppelhelix. Der interessante Aspekt der DNA ist nicht ihre chemische Zusammensetzung, sondern ihre Struktur, der dreidimensionale Aufbau des Moleküls. Diese Struktur der DNA, die berühmte DNA-Doppelhelix, wurde 1953 von dem Biologen James Watson und dem Physiker Francis Crick im Cavendish Laboratory, Cambridge, England, aufgeklärt. Ihr Modell beruhte auf Messungen der britischen Chemikerin Rosalind Franklin am King's College, London. Die DNA-Kette setzt sich aus zwei gegenläufigen umeinander gewundenen Strängen zusammen, die zueinander komple-



15 *Transkription und Translation.* Bei der Transkription wird der DNA-Strang entwirrt, und durch ein Enzym, RNA-Polymerase, werden passende Basen zur Synthese einer mRNA eingebaut. Diese mRNA-Moleküle dienen als Matrize zur Synthese von Proteinen (unten). An den großen Strukturen der Ribosomen mit zwei Untereinheiten werden die Komponenten, nämlich tRNA, beladen mit der zum Kodon passenden Aminosäure (durch entsprechende Nummern dargestellt) sowie die mRNA angeordnet. Die nötigen Enzyme verknüpfen die Aminosäuren zu einem Protein. Am Ende lösen sich die Ribosomen ab, um neu verwendet zu werden.

Der genetische Kode. Die Reihenfolge, die Sequenz der Basen in der RNA-Kopie der DNA, bestimmt also in verschlüsselter (kodierter) Form die Zusammensetzung von Proteinen. Diese sind aus zwanzig verschiedenen Bausteinen aufgebaut, den Aminosäuren, die chemisch sehr unterschiedliche Eigenschaften haben. Die Übersetzungsregel besteht darin, dass jeweils drei Basen der RNA (Tripletts) eine Aminosäure im Protein bestimmen. Bei zwei Basen würden sich nur 16 verschiedene Kombinationen ergeben. Bei dreien gibt es 64 Möglichkeiten solcher Tripletts, von denen nicht alle eine an-

dere Aminosäure bedeuten: Tripletts, die sich nur in der dritten Base unterscheiden, stehen häufig für die gleiche Aminosäure. Zusätzlich gibt es noch Tripletts für das Ende des Proteins, so genannte Stopp-Kodons. Das nennt man den genetischen Kode. Damit wird die einfache Struktur der DNA in Proteine, die eine nahezu unendliche chemische Vielfalt zeigen können, umgesetzt. Es sind die Proteine, nicht die Gene, die die eigentlichen Bau- und Wirkstoffe der Zellen darstellen. Ihre biochemischen Eigenschaften sind durch die Zusammensetzung und die Reihenfolge der Aminosäuren sowie die Faltungsstruktur gegeben. Proteine bedingen letztendlich die Eigenschaften, die das Leben ausmachen.

Transkriptionskontrolle. Wenn in einer Zelle von einem Gen das entsprechende Protein hergestellt wird, so sagt man, das Gen sei aktiv. Die Kontrolle der Genaktivität geschieht meistens dadurch, dass die Transkription des Gens entweder blockiert oder erlaubt wird. Die Synthese der mRNA des Gens führt dann meist automatisch auch zur Synthese des Proteins.

Am Anfang jedes Gens gibt es eine besondere Kontrollregion in der DNA, Promotor genannt, an die ein Enzym, RNA-Polymerase, bindet und von dort aus die Transkription startet. An die Nähe der Startregion binden auch andere Proteine, so genannte Transkriptionsfaktoren. Diese können die Transkription des Gens durch ihre Bindung entweder blockieren (reprimieren) oder stimulieren (aktivieren). Solche Kontrollregionen und die daran bindenden Proteine wurden bei Bakterien von den französischen Biologen François Jacob und Jacques Monod 1962 entdeckt. Ein Protein, das die RNA-Polymerase am Start hindert, heißt Repressor. Andere Transkriptionsfaktoren wirken als Aktivatoren. In Bakterien sind die Kontrollregionen, verglichen mit der Größe des Gens, kurz. In vielzelligen Organismen sind sie dagegen in der Regel aus mehreren Elementen zusammengesetzt. Diese bilden Bindungsstellen für eine Reihe von Transkriptionsfaktoren, die eine komplexe Genkontrolle ermöglichen. Der Kontrolle der Genaktivität und damit den Transkriptionsfaktoren

kommt bei allen Lebensvorgängen in Raum und Zeit eine zentrale Bedeutung zu.

5. DNA-Replikation

Die Komplementarität der beiden gegenläufigen DNA-Stränge legt sofort nahe, wie die identische Verdoppelung von Genen, wie sie bei jeder Zellteilung stattfindet, funktionieren muss: Die Stränge trennen sich, und an jedem Einzelstrang wird eine komplementäre Kopie angelegt. Dabei bleibt einer der beiden Stränge vollständig erhalten, während der andere ganz neu ist (siehe Abb. 14). Man nennt das semikonservative Replikation. Dieser Mechanismus wurde in einem eleganten Experiment von den Amerikanern Matthew Meselson und Franklin Stahl 1958 bewiesen. Ganz so einfach wie auf dem Papier sind die Mechanismen der Replikation jedoch nicht, denn dabei müssen sich die Stränge entwinden, wie bei dem Aufzwingen eines Wollfadens. Dazu muss das DNA-Molekül in regelmäßigen Abschnitten aufgeschnitten und später wieder ordentlich verschweißt werden. Manchmal treten Fehler auf, und es gibt zahlreiche Enzyme, die während der Replikation die DNA abstrafen und solche Fehler reparieren. Wenn sie nicht repariert werden, können sie sich später als Mutationen auswirken. Die Variation, die Darwin als Grundvoraussetzung der Evolution erkannte, beruht zum größten Teil auf zufälligen Fehlern bei der DNA-Replikation. Ableserfehler können zur Änderung einer Aminosäure in einem Protein führen oder zum Abbruch der Proteinsynthese, wenn ein Stopp-Kodon entstanden ist. Wenn eine Base fehlt oder zusätzlich eingebaut wird, ergibt sich eine Rasterverschiebung bei der Proteinsynthese, und von da an sind alle Kodons falsch. Es können auch ganze DNA-Stücke in Gene eingebaut, verdoppelt oder verloren werden.

6. Gentechnik

Nach der Entdeckung der Struktur der DNA wurden der genetische Kode, die Mechanismen der Proteinsynthese und der DNA-Replikation in sehr kurzer Zeit und ganz überwiegend an den einfachsten Organismen, an Bakterien und ihren Viren, den Bakteriophagen, aufgeklärt. In seinem berühmten Buch «Molecular Biology of the Gene» (1965) lässt James Watson seine große Befriedigung erkennen, die wichtigsten Prinzipien des Lebens verstanden zu haben. Aber nur Leben in seiner einfachsten Form, denn höhere Organismen, die aus vielen verschiedenen Zellen aufgebaut sind und die sich entwickeln, kommen darin praktisch nicht vor. Allerdings war klar, dass das «Dogma» der Molekularbiologie, nämlich *DNA macht RNA macht Protein* auch für vielzellige Organismen gilt und natürlich auch der genetische Kode. *What is true for E. coli, is true for the elephant*, wie Jacques Monod es ausdrückte.

Viele der Ergebnisse der molekularen Genetik wurden durch In-vitro-Experimente gewonnen: Enzyme, die DNA ablesen, sie zerschneiden, reparieren, transkribieren, wurden isoliert und charakterisiert, und viele Prozesse ließen sich im zellfreien Extrakt oder gar in einer definierten enzymatischen Reaktion im Reagenzglas durchführen. Für die Entschlüsselung der Funktion einzelner Gene war aber die enorme Länge der DNA-Moleküle ein riesiges Problem. Die einfachsten DNA-Moleküle sind zirkuläre Plasmide mit nur wenigen Genen, die sich in Bakterien vermehren können. Aber auch sie enthalten tausende von Basenpaaren, die mehrere Gene definieren. Ein Auftrennen von Genen nach ihren chemischen Eigenschaften, wie man es etwa bei Proteinen machen kann, ist nicht möglich, da Gene chemisch nahezu gleich sind und außerdem nahtlos an Nicht-Genregionen und weitere Gene gekettet sind. Die DNA höherer Organismen besteht aus ungeheuer langen Molekülen, die nicht bruchfrei isoliert werden können.

Hybridisierung. Allerdings gab es bereits Verfahren, Nukleinsäuren auf Grund von Sequenzähnlichkeiten zu vergleichen, ohne ihre Sequenzen selbst zu kennen. DNA-Doppelstränge sind bei höheren Temperaturen nicht stabil, sondern die Stränge trennen sich. Bei Abkühlung können sie wieder richtig zusammenkommen. Einzelsträngige DNA- oder RNA-Moleküle haben die Fähigkeit, wenn sie zueinander komplementär sind, hybride Doppelstrangmoleküle zu bilden. Mischt man nun DNA oder RNA verschiedener Herkunft, so können sich auf Grund von Sequenzähnlichkeiten auch nicht genau passende Stränge zu gemischten, hybriden Doppelsträngen verbinden. So lässt sich wenigstens feststellen, ob in zwei Nukleinsäurepräparationen unterschiedlicher Herkunft ähnliche Sequenzen enthalten sind.

Rekombinante DNA. Vor etwa 35 Jahren wurden Enzyme entdeckt, die es erlauben, DNA sauber in Abschnitte zu zerschneiden und mit einer anderen DNA, die nicht aus dem gleichen Organismus stammen muss, wieder zusammenzufügen (*rekombinante DNA*). Solche DNA-Abschnitte können in die DNA von Plasmiden eingebaut werden. Werden Bakterien mit solchen Plasmiden, die verschiedene DNA-Abschnitte enthalten, einzeln infiziert, so werden auch die eingefügten DNA-Abschnitte in diesen Bakterien vermehrt. Eine Bakterienkolonie, die von einem einzelnen Bakterium abstammt, das einen solchen Genabschnitt enthält, ist ein Klon, deshalb nennt man das Verfahren, Gene einzeln in Bakterien zu vermehren, klonieren. Um ein bestimmtes Gen oder einen Genabschnitt aus der DNA eines Organismus zu isolieren, stellt man Sammlungen solcher Bakterien her, die so umfangreich sind, dass statistisch gesehen, jedes Gen des Organismus in mehreren Bakterienkolonien enthalten ist. Man spricht dann von Genbibliotheken oder Genbanken. Das gewünschte Gen in zigtausenden solcher Kolonien zu finden, stellt ein Problem dar, das je nach der Situation zu lösen ist. Mit Hybridisierungsverfahren lassen sich Klone, die bestimmte Gene tragen, aus Genbibliotheken fischen. Ist man bereits im Besitz eines kleinen Genschnipsels, so können größere Fragmente, die

mit diesem überlappende Sequenzen haben, durch Hybridisierung erkannt werden. Auf diese Weise lassen sich große zusammenhängende DNA-Regionen, die mehrere Gene abdecken können, zusammenbauen. Auf jeden Fall kann ein einmal kloniertes Gen nach Vervielfältigung in Bakterien leicht in hoher Kopienzahl isoliert werden. Mit einem neuen Verfahren (Polymerase Chain Reaction, PCR, genannt) lassen sich bereits bekannte Genabschnitte heute sogar *in vitro* mit Enzymen vermehren, also ohne den Umweg über Bakterien.

Proteinsequenz und -struktur. In solchen reinen Populationen von DNA-Stücken kann die Reihenfolge der Basen bestimmt und mit Hilfe des genetischen Kodes die Zusammensetzung und Reihenfolge der Aminosäuren abgeleitet werden, ohne die viel schwierigere direkte Proteinanalyse durchführen zu müssen. Der biologischen Forschung hat die Möglichkeit, Proteinsequenzen auf dem Weg über die Genisolierung zu bestimmen, ungeheuren Aufschwung gegeben. Auf diesem Wege konnte die Zusammensetzung vieler wichtiger Proteine der Zelle aufgeklärt werden. Auch Proteine, die in winzigen Mengen vorkommen und deren Isolierung als schwierig bis aussichtslos galt, waren nun zugänglich.

Hat man die einzelnen Gene isoliert, so lassen sich auch die dazugehörigen Proteine in Bakterien oder Zellkulturen in großem Maßstab herstellen. Man macht sich dabei die Maschinerie der DNA- und Proteinsynthese der Wirtszellen zunutze. Seltene Proteine, zum Beispiel Hormone, Blutfaktoren, Enzyme und Antikörper, können so in besonders reiner Form und in großen Mengen gewonnen werden, ohne sie aus tierischen oder menschlichen Zellen isolieren zu müssen.

Durch diese Möglichkeit, große Zahlen von Proteinen zu analysieren, hat man gelernt, bestimmte Bereiche, Domänen, in der Proteinsequenz zu erkennen, die in Proteinen mit ähnlicher Funktion immer wieder vorkommen. So gibt es bei Transkriptionsfaktoren solche, die eine so genannte Homöodomäne enthalten, eine Region von 60 Aminosäuren, die spezifisch an DNA-Regionen bindet. Sie

wurde zuerst in einer bestimmten Genklasse (den homöotischen Genen) bei *Drosophila* gefunden, kommt aber auch in anderen Transkriptionsfaktoren vor. Andere Transkriptionsfaktoren haben andere derartige Domänen, zum Beispiel zinkhaltige Schleifen. Manche Domänen kommen im Tandem wiederholt in einem Protein vor, wie die 110 Aminosäuren lange Immunglobulin-domäne der Antikörper und vieler anderer Proteine. Proteine, die aus der Zelle ausgeschleust werden, tragen eine charakteristische Sequenz von Aminosäuren an ihrem Anfang, und Membranproteine enthalten Regionen aus fettlöslichen Aminosäuren, die sie in der Membran verankern. Mit geeigneten Suchmethoden lassen sich auch mit dem Computer Domänen erkennen, deren Funktion noch nicht klar ist, die aber auffallen, da sie immer wieder gefunden werden. Sie helfen, Proteine in ähnliche Klassen einzuteilen und gegebenenfalls ihre Funktion wenigstens dann teilweise zu erraten, wenn sie bei einem der Träger einer solchen Domäne erkannt worden ist.

7. Gene vielzelliger Organismen

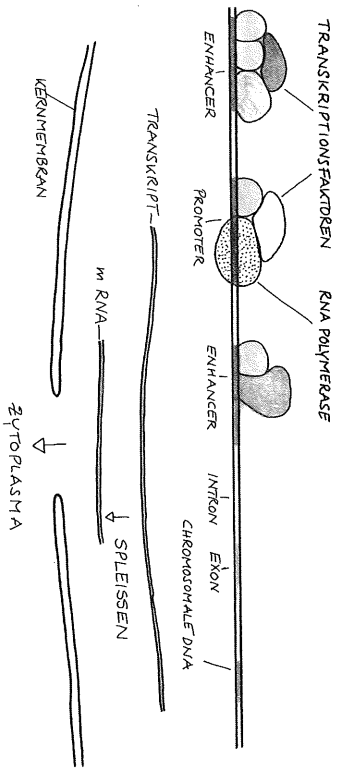
Obwohl die Prinzipien der Wirkungsweise der Gene, also die Komplexität der DNA-Stränge, der genetische Kode, Transkription, Translation an Ribosomen, für alle Organismen gelten, gibt es doch einige wesentliche Strukturmerkmale der Gene höherer Organismen, die sie von denen der Bakterien und Viren unterscheiden. Es wurde bereits erwähnt, dass bei Bakterien und Viren der Großteil der DNA kodierend ist, also in Proteine übersetzt wird. Bei Eukaryoten (das sind alle Organismen, einzeller wie Vielzeller, die einen Zellkern mit Kernmembran haben) ist das nicht so: Ein großer Teil der DNA besteht aus Regionen, die nicht in Proteine übersetzt werden können, sie sind «nicht kodierend». Dazu kommt, dass die DNA nicht frei zu Tage liegt, sondern mit besonderen Proteinen, Histonen, assoziiert ist, die sie zu einer kondensierten Struktur verpacken. Das bewirkt durch eine übergeordnete Spirali-

sierung die Verkürzung und Verdichtung der ungeheuer langen DNA-Ketten, aus denen das Genom vielzelliger Organismen aufgebaut ist. Man nennt die verpackte Form der DNA Chromatin. Ein großes Problem ist, wie vor der Zellteilung die Verpackung erst aufgelöst wird, um die DNA replizieren zu können, und wie die DNA dann in gleicher Weise wieder eingepackt wird. Die Verpackung ist an vielen Stellen so dicht, dass eine Transkription der Gene nicht mehr möglich ist. Diese Regionen sind, zum Beispiel in endgültig differenzierten Zellen, dauerhaft stillgelegt.

Kodierende Regionen, also DNA-Abschnitte, die in Protein übersetzt werden, kann man daran erkennen, dass auf längeren Strecken keine Stopp-Kodons vorkommen, während Regionen, die nicht für ein Protein kodieren, der statistischen Wahrscheinlichkeit entsprechend Stopp-Kodons enthalten. Solche Regionen sind besonders lang, wenn sie zwischen den Genen liegen. Es gibt aber auch solche, die proteinkodierende Sequenzen eines Gens unterbrechen. Diese Regionen nennt man Introns und jene, die in Protein übersetzt werden, Exons. Manche Gene höherer Organismen haben sehr viele Introns, und ihre Exons sind auf große DNA-Regionen verteilt.

Die Gene werden im Zellkern transkribiert. Dabei entsteht zunächst die gesamte Länge an RNA inklusive Introns. Die RNA-Moleküle werden dann mit besonderen Enzymen, die die Fähigkeit haben, die Exon-Intron-Grenzen zu erkennen, zurechtgeschnitten, «gespleißt»: Die Introns werden herausgeschnitten, und die mRNA wird ins Zytoplasma transportiert und dort erst an Ribosomen translatiert (Abb. 16).

Die Regionen, die zwischen Genen liegen, sind bei einzelligen Organismen, wie Hefe, kurz, aber bei Säugern häufig um ein Vielfaches länger als die transkribierten Regionen. Sie enthalten Kontrollregionen, an die Transkriptionsfaktoren binden, die die Genaktivität steuern. Zusätzlich zum Promotor, wie man die Kontrollregion bezeichnet, die den Start der Transkription enthält, gibt es solche, die über große Distanzen wirken und dann Enhancer heißen. Manchmal sind Enhancer auch in den Introns zu finden. An die

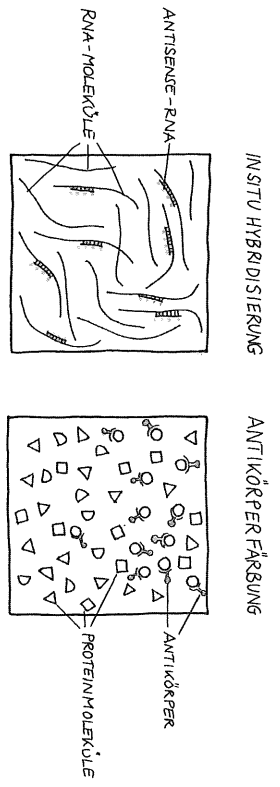


16 *Genstruktur von Eukaryoten.* Die Transkription wird durch zahlreiche Proteine, die als Repressoren oder Aktivatoren wirken, gesteuert. Diese binden nahe am Start der Transkription, dem Promotor, aber auch an Regionen, die häufig sehr weit weg vom Startpunkt liegen (Enhancer). Die RNA, die entsteht, enthält auch Kopien von Genregionen, die später nicht in Protein translatiert werden (Introns). Diese werden nach der Transkription herausgespleißt, so dass die fertige mRNA nur aus Kopien der Exons zusammengesetzt ist. Die mRNA wird ins Zytoplasma transportiert, um dort als Matrice für die Proteinsynthese zu dienen.

Kontrollregionen, Promotoren und Enhancer, binden sich Transkriptionsfaktoren, die kontrollieren, ob Gene in ihrem Einflussbereich transkribiert werden können.

Die Transkription der Gene, die ganz allgemeine Zellfunktionen erfüllen, ist häufig auf sehr einfache Weise reguliert, sie sind in allen Zellen aktiv. Bei anderen, besonders bei Genen, die die Entwicklung steuern, gibt es sehr komplexe Kontrollregionen, an die viele verschiedene Transkriptionsfaktoren binden können. Diese wirken sowohl aktivierend als auch hemmend. In solchen Fällen kann auch ein Wettstreit um die gleiche Bindestelle stattfinden, bei dem der Faktor gewinnt, der in der höheren Konzentration vorliegt oder stärker bindet.

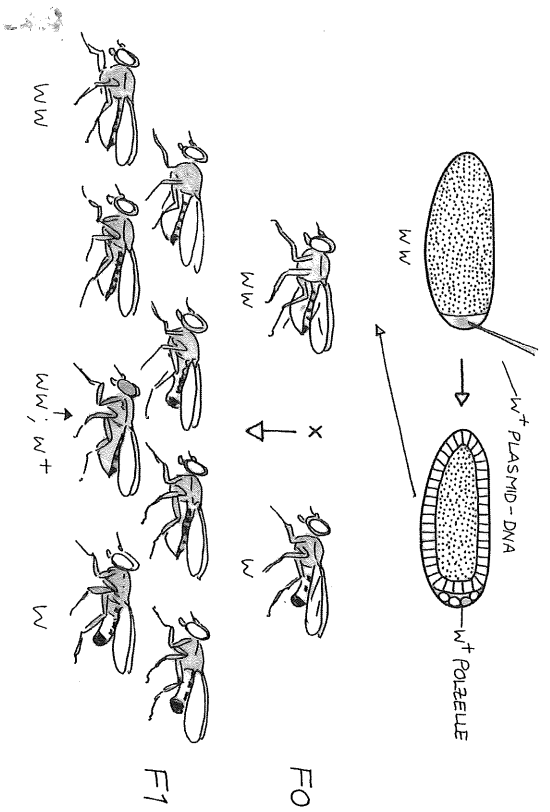
Verteilung von RNA und Protein. Mit molekularen Sonden lassen sich die Genprodukte, sowohl die mRNA des Gens als auch das Protein, im Organismus sichtbar machen. Um die mRNA eines Gens



17 *In-situ-Hybridisierung/Antikörperfärbung.* Um die Verteilung von bestimmten Molekülen im Gewebe sichtbar zu machen, stellt man spezifische, farblich markierte RNA- oder Proteinmoleküle her. Die RNA, die komplementär zu der mRNA eines bestimmten Gens ist, bindet an die entsprechende mRNA und kann diese dadurch markieren. Regionen im Embryo, die diese mRNA enthalten, erscheinen dadurch farblich. Antikörperproteine erkennen und binden an ganz besondere Moleküle, zum Beispiel die Proteinprodukte bestimmter Gene. Sind sie farblich markiert, so kann die Verteilung dieser Proteine im Embryo sichtbar gemacht werden. Beispiele für die Anwendung dieser Techniken sind unter anderem in Abb. 26, 27, 31 und 50 dargestellt.

nachzuweisen, wird eine komplementäre RNA-Kopie des Gens *in vitro* hergestellt. Sie ist durch angekoppelte Farbstoffe markiert. Man lässt die markierte RNA in das Gewebe eindringen und mit etwa vorhandener mRNA hybridisieren. In den Zellen, in denen mRNA des Gens vorliegt, wird diese «antisense»-RNA durch Hybridisierung festgehalten, an anderen Orten kann sie fortgespült werden. Auf ähnliche Weise lässt sich die Verteilung der Proteine mit markierten Antikörpern sichtbar machen. Antikörper sind Proteine, die die Eigenschaft haben, sehr spezifisch einzelne Moleküle zu erkennen und an sie zu binden. Antikörper können, wie Nucleinsäuren, durch Kopplung an ein farbiges oder fluoreszierendes Molekül markiert werden (Abb. 17).

Transgene Tiere. Drosophila war einer der ersten höheren Organismen, bei denen sich isolierte Gene in den Organismus einschleusen ließen, das geht aber inzwischen auch beim Wurm *C. elegans*, bei Zebrafischen und Mäusen. Das Verfahren heißt Transformation.



18 *Transgene Fliegen*. Eine Lösung von Plasmid-DNA, die das Gen enthält, das in das Genom der Fliege eingeführt werden soll, wird in das Polplasma injiziert. Um den Einbau verfolgen zu können, ist zusätzlich ein white-plus-Gen (w^+) in dem Plasmid enthalten, und das Experiment wird mit white-Fliegen durchgeführt. Manchmal kommt es zum Einbau eines Plasmids in das Genom der Polzelle. Dann entsteht eine Fliege, die einzelne Keimzellen hat, die white-plus sind. Sie bilden Gameten, die das Gen an die nächste Generation weitergeben. Die transgenen F1-Fliegen sind white-plus und werden an den roten Augen erkannt, sie tragen dann auch das gewünschte Gen in allen Soma- und Keimzellen.

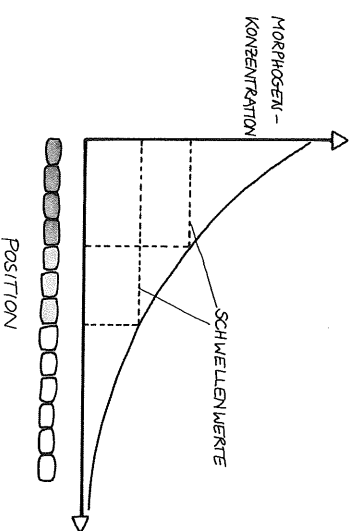
Die Tiere, die ein zusätzliches Gen tragen, sind transgen. Zur Herstellung von transgenen Fliegen wird eine Lösung von Plasmid-DNA, die in Bakterien synthetisierte Kopien des isolierten Gens enthält, direkt in das Eiplasma am Hinterpol injiziert (Abb. 18). Dieses Plasma wird später in die Polzellen, aus denen sich die Keimbahn entwickelt, eingeschlossen. Wenige Fliegen, die sich aus solchen injizierten Eiern entwickeln, haben das Gen in das Genom einiger ihrer Keimzellen eingebaut. Aus diesen Keimzellen entstehen Nachkommen, die dann in allen Zellen das Gen heterozygot tragen. Es braucht geeignete Markierungen, um diese Nachkommen zu erkennen und von den erfolglosen Geschwistern zu unter-

scheiden und auszuwählen. Bei Fliegenmutanten kann durch Transformation mit einem intakten Gen der Phänotyp «geheilt» werden. Damit lässt sich prüfen, ob das richtige Gen isoliert worden war und ob es alle Kontrollregionen enthält, die für die normale Funktion nötig sind. Die eingeführten Gene können aber auch aus anderen Organismen stammen oder aus Bruchstücken verschiedener Gene zusammengesetzt sein. Das erlaubt es, Aufschluss über die Funktion von bestimmten Genregionen zu erhalten. In transgenen Tieren lässt sich vielerlei über die normale Funktion des Gens sowie seiner Kontrolle im Organismus erfahren. Durch Kombination eines Gens mit einer fremden Kontrollregion lässt sich der Einfluss von Überproduktion oder Produktion an der falschen Stelle oder zur falschen Zeit testen. Es gibt vielfältige und sehr leistungsfähige Verfahren, die auf transgenen Tieren beruhen und hier nur angedeutet werden können.

IV. Entwicklung und Genetik

Neben den aufregenden Fortschritten der klassischen und molekularen Genetik waren die Fragen der Entwicklung in den Hintergrund getreten. Und in der Tat ist auf diesem Gebiet nach Speemanns großem Versuch bis in die 70er Jahre hinein kaum ein echter Fortschritt erzielt worden. Induktion, die Beeinflussung einer Nachbarregion durch das Aussenden von hypothetischen Botenstoffen (Signalen), wurde in verschiedenen Zusammenhängen beschrieben, aber die Wirkmoleküle widerstanden ihrer Aufklärung. Die Verwirrung war immer noch groß, bot allerdings Raum für die Entwicklung von theoretischen Konzepten. Diese waren durchaus hilfreich, da sie Vorstellungen anboten, wie es denn schließlich sein könnte.

Der britische Biologe Lewis Wolpert, geleitet von Beobachtungen an regenerierenden Organismen wie dem Süßwasserpolyphen Hydra, machte darauf aufmerksam, dass Zellen sich im Embryo, der sich entwickelt, gemäß ihrer Position verhalten. Sein Konzept der Positionsinformation nimmt an, dass der Abstand von einem Organisationszentrum folgendermaßen gemessen werden kann: Wenn sich eine Substanz von dort ausbreitet, nimmt ihre Konzentration ab, je weiter von der Quelle weg die Zelle sich befindet. Um einen bestimmten Zustand anzunehmen, braucht die Zelle eine Mindestkonzentration der Substanz. Dadurch entsteht eine Unterteilung in zwei Zonen in dem Zellverband. Man nennt die allmähliche Konzentrationsänderung Gradient und die Mindestkonzentration Schwellenwert (Abb. 19). Durch unterschiedliche Schwellenwerte kann ein und dieselbe Substanz, Morphogen genannt, mehrere Zustände bestimmen. Indem also verschiedene Mengen eines Morphogens mehrere Qualitäten bestimmen, kann ein zunächst homogenes Feld in mehrere Zonen unterteilt werden. Im Grunde hatte



19 *Morphogen-Gradient*. Eine Substanz, die bei unterschiedlichen Konzentrationen verschiedene Wirkungen hat, nennt man Morphogen. Die Mindestkonzentration, die für einen bestimmten Zustand notwendig ist, heißt Schwellenwert. Im Beispiel braucht es für die Differenzierung der grauen Zellen eine höhere Konzentration, einen höheren Schwellenwert, als für die der roten Zellen.

bereits Boveri eine ähnliche Idee, die auch von Theoretikern aufgegriffen wurde, die in Modellrechnungen den Biologen vorschlugen, wie solche Morphogengradienten entstehen könnten. Trotzdem blieb die Suche nach Morphogenen mit konventionellen Methoden der embryologischen Forschung erfolglos, was dazu führte, dass Gradientenmodelle nicht sehr populär und auch umstritten waren.

Wie aber findet man die Faktoren, die die entscheidenden Schritte bei der Entwicklung eines Embryos lenken? Welch ein Molekül ist der Spermatische Organisationsfaktor oder das «Erwas», das Boveri beschrieb, das im Ei von oben nach unten zu- oder abnimmt? Gibt es Morphogene tatsächlich? Wie sehen sie aus? Versuche, solche Faktoren mit biochemischen Methoden anzureichern, waren erfolglos, da die Mengen zu gering und die Tests, sie nachzuweisen, zu unsicher waren. Wenn es aber solche Faktoren gibt, sollte es auch Gene geben, die dafür kodieren. Mutante Embryonen, denen das Gen des Spermatischen Organisationsfaktors fehlt, sollten daran zu erkennen sein, dass sie keine Körperachse mehr ausbilden können. Bei Bakterien sind auf dem Wege der systematischen Suche nach

Mutanten, die bestimmte Substanzen nicht mehr bilden konnten, nicht nur Stoffwechselwege aufgeklärt worden, sondern auch die entscheidenden Faktoren der Genregulation, Promotor und Repressor, entdeckt worden. Von der Leistungsfähigkeit der bakteriellen Genetik beeindruckt, wurde versucht, ähnliche Ansätze zur Erforschung komplexer Lebensvorgänge zu verfolgen und durch Mutationen die Gene aufzuspüren, die wichtige Funktionen bei der Gestaltbildung eines Organismus haben. In den 70er Jahren entstand eine neue Forschungsrichtung, die Entwicklungsgenetik. Ihr gelang es schließlich, solche Morphogene und auch Signale der Induktion nachzuweisen und, in Kombination mit der etwa gleichzeitig entwickelten Gentechnik, ihre molekulare Natur und Wirkungsweise aufzuklären.

1. Modellorganismen

Genetische Untersuchungen verlangen eine sorgfältige Wahl des Studienobjektes und müssen innerhalb einer Art durchgeführt werden, weil Mutanten in einem Tier sich nicht mit solchen einer anderen Art kreuzen lassen. Der Frosch ist für genetische Versuche denkbar ungeeignet, da er und seine Kinder viel Platz brauchen und er eine Generationszeit von zwei Jahren hat. Seeigel lassen sich nicht im Labor züchten. Dagegen bot sich wieder die Fliege *Drosophila* an, um an ihr systematisch nach Genen zu suchen, die die Entwicklung in spezifischer und charakteristischer Weise beeinflussen. In den 70er Jahren kam ein weiterer Organismus als Forschungsobjekt hinzu: Der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* wurde von Sydney Brenner in Cambridge, England, ausgesucht als ein Tier, das so einfach wie möglich strukturiert ist, aber doch erlaubt, wie bei Bakterien genetische Analysen anzuwenden. Dieser kleine Wurm hat als Besonderheit am Ende der Embryonalentwicklung eine konstante Zellzahl von 959 somatischen Zellen, die in einem strengen Ablauf von Zellteilungen entstehen, die man in- zwischen alle genau beschrieben hat. Das erlaubt besonders das

Studium subtiler Details der Differenzierung einzelner Zellen und von Wechselwirkungen zwischen bestimmten Zellen. Sowohl Fliege als auch Wurm haben sich für die Forschung als großartige Objekte erwiesen, die unterschiedliche Vorteile haben.

Damals war zwar die Embryonalentwicklung der Fliege viel weniger gut bekannt als die des Frosches, es hat sich aber bald herausgestellt, dass sie hervorragend geeignet ist, Gestalt bildende Prozesse im Embryo mit genetischen Methoden zu untersuchen. Für das Studium der Entwicklung ist zunächst die Bildung der Strukturen der Larve von Interesse, denn die Larve ist das Produkt der Embryonalentwicklung und nicht die erwachsene Fliege. Deshalb ist zu erwarten, dass bei Mutationen in Genen, die die Entwicklung des Embryos steuern, bereits die Larven deutliche Phänotypen zeigen.

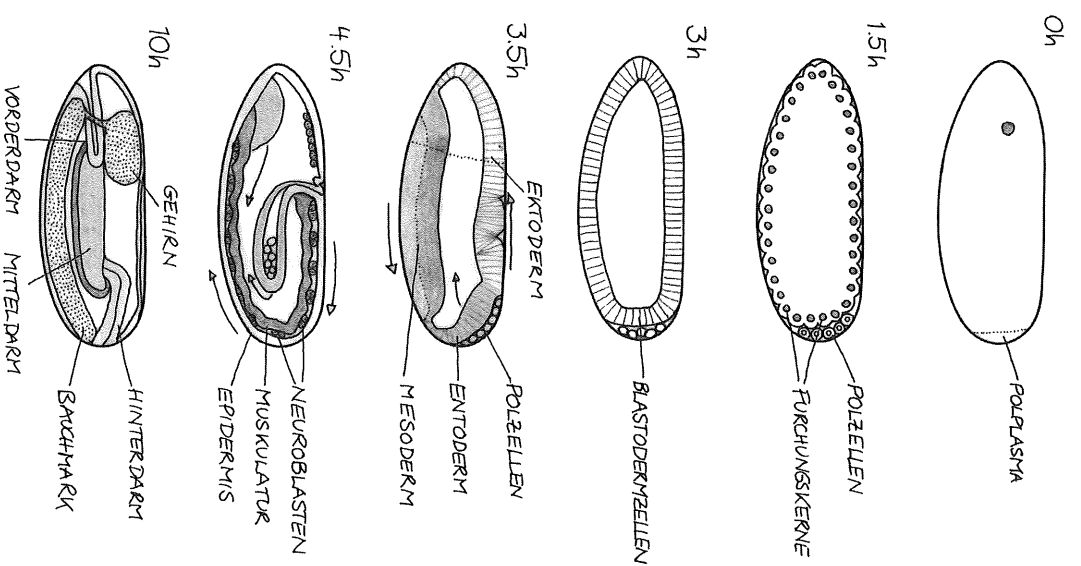
Wie die Fliege ist die Larve mit einem Außenskelett, der von den Hautzellen gebildeten Kutikula (= Häutchen), umgeben, das eine Vielzahl von leicht erkennbaren Merkmalen auszeichnet. Auf der Bauchseite markieren Zähnchenbänder, mit denen die Larve sich fortbewegt, die Vorderränder der Segmente. Die Rückenseite ist charakteristisch behaart. Segmentgruppen des Thorax – vorn – und des Abdomens – hinten – können leicht unterschieden werden. Am Kopfende befinden sich zahlreiche Sinnesorgane und Mundwerkzeuge, und auch das nicht segmentierte Hinterende hat charakteristische Strukturen.

2. Die Entwicklung von *Drosophila*

Eihildung. Das Ei ist, gemessen an der Fliege, sehr groß, etwa $1/2$ mm lang. Ein Vorn und Hinten, Oben und Unten ist an der Form der Eihäute leicht zu sehen. Das Ei wird im mütterlichen Organismus aus zwei Zelltypen aufgebaut, aus den Keimbahnzellen, die die Nährzellen und die Eizelle bilden, und aus den somatischen Follikelzellen, die später die Eihüllen bilden werden. Nährzellen und Follikelzellen transportieren Stoffe wie Proteine und Fette in die wachsende Eizelle, die als Dotter der Ernährung des Embryos bis

zum Schlupf dienen. Die Eizelle, die gerade befruchtet wurde (durch ein Spermium, das die Mutterfliege seit der Kopulation in einer Samentasche aufbewahrt hatte), ist eine riesige Zelle. In ihrem Zytoplasma lassen sich aber kaum Strukturen unterscheiden, mit der Ausnahme einer klaren Region am Hinterpol. Das ist das Polplasma. Es wird in die ersten sich bildenden Zellen des Embryos eingeschlossen, und diese Polzellen sind die zukünftigen Keimzellen.

Embryonalentwicklung. Im frisch abgelegten Ei befindet sich in der vorderen oberen Hälfte der befruchtete Kern der Eizelle. In der ersten Stunde teilen sich die Kerne, ohne dass sich das Zytoplasma teilt. In schnell aufeinander folgenden, gleichzeitig stattfindenden Mitosen entstehen viele Kerne, die an die Oberfläche wandern und sich dort weiter teilen. Der Embryo besteht damit aus einer sehr großen Zelle mit vielen Kernen (man nennt das Synzytium), in der sich Stoffe ungehindert durch Zellwände ausbreiten können. Erst nach drei Stunden werden zwischen den jetzt 6000 Kernen Zellwände gezogen, und das Stadium des zellulären Blastoderms ist erreicht. Noch sehen alle Zellen gleich aus. Das ändert sich schnell während des Prozesses der Gastrulation. Zellgruppen wandern ein oder stülpen sich in den Embryo. Dadurch bilden sie die so genannten Keimblätter, Ektoderm (außen, daraus werden später Haut und Nervensystem), Entoderm (innen, es bildet die Darmanlagen mit dem, was dazugehört) und Mesoderm (das mittlere Blatt, aus dem Muskulatur, Herz, Blut und andere innere Organe hervorgehen). Bei der Gastrulation entsteht eine Längsfurche auf der zukünftigen Bauchseite des Embryos, die die Zellen des Mesoderms in das Innere des Embryos bringt. Zellgruppen am vorderen und hinteren Ende des Embryos beginnen ebenfalls, sich als Darmanlagen (Entoderm) einzustülpen. Dabei streckt sich der Embryo auf der Rückenseite nach vorne. Im ausgestreckten Zustand teilen sich die embryonalen Zellen, das Nervensystem wird angelegt, und es findet die Organisation der Organ- und Segmentanlagen statt (Abb. 20). Die spätere Entwicklung ist gekennzeichnet

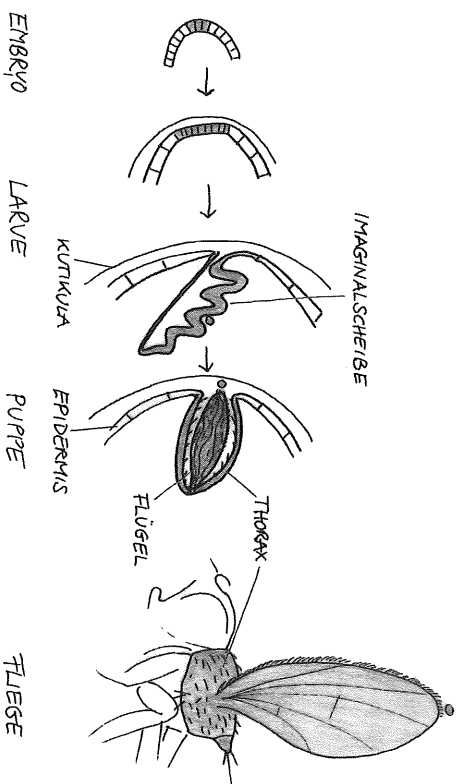


20 **Embryonalentwicklung von *Drosophila*.** Während der Furchung entsteht zunächst das synzytiale Blastoderm (1.5 h), dann das zelluläre Blastoderm (3 h). Im Prozess der Gastrulation (3.5 h) gelangen Zellgruppen in das Innere. Die weitere Entwicklung ist von einer Streckung des Embryos (4.5 h) begleitet, die später wieder rückgängig gemacht wird. Die Pfeile helfen, diese Bewegung zu verfolgen. Die Darmanlagen (rot) sind nun in der Mitte verbunden. Anterior links, ventral unten.

durch weitere Bewegungen, die die Strukturen und Organe an ihre endgültigen Plätze bringen. Schließlich erfolgt die Differenzierung, das Spezialisieren der einzelnen Zellen in den verschiedenen Organen auf ihre Funktion hin. Nach etwa 24 Stunden schlüpft die Larve.

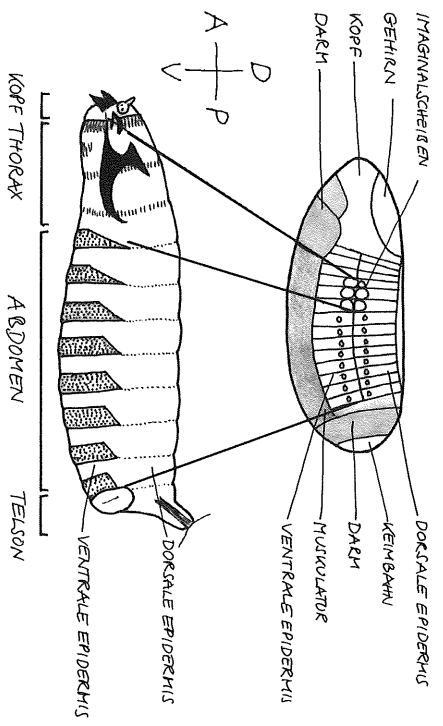
Das Herz der Larve entsteht auf der Rückenseite, die Organe schwimmen im farblosen Blut, das Nährstoffe und Hormone transportiert, es gibt also keine Adern. Die Versorgung mit Sauerstoff geschieht nicht über das Blut, sondern durch ein Netz von luftgefüllten Röhren, den Tracheen, die vorne und hinten mit der Außenluft verbunden sind. Das zentrale Nervensystem der Larve besteht aus dem Gehirn sowie einem strickleitertartig angelegten Bauchmark. Das entsteht aus einzelnen Zellen, den Neuroblasten. Diese sondern sich von den übrigen Zellen des Ektoderms in einem charakteristischen Muster ab, begeben sich nach innen und ordnen sich zu Nervenknotten und -strängen an.

Imaginalscheiben. Die Larve wächst, wie bereits erwähnt, im Wesentlichen durch Größerwerden der Zellen, nicht durch Zellteilung. Dabei häutet sie sich zweimal und verpuppt sich schließlich. Fliegenlarven haben im Vergleich zu den Larven anderer Insekten eine extrem vereinfachte Struktur: Sie haben keine Beine, und auch der Kopf ist stark reduziert. Dadurch verlaufen die Häutungen relativ problemlos. Diese müssen durchgeführt werden, da der äußere Kutikulanpanzer der Ausdehnung Grenzen setzt. In der Puppenruhe geschieht die Metamorphose zum Körper der erwachsenen Fliege, die nach drei Tagen durch das Vorderende der Puppe schlüpft. Die äußeren Strukturen der Fliege gehen nicht direkt aus denen der Larve hervor, sondern sie werden neu aus undifferenzierten Zellgruppen, den Imaginalscheiben, gebildet. Die Fliege wird wie ein Mosaik aus mehreren solcher Imaginalscheiben zusammengesetzt, die paarweise (eine für die rechte, eine für die linke Seite) vorliegen. Es gibt 3 Paare für die 6 Beine, 2 Paare für die Flügel und den Thorax, den Mittelteil, 2 für den Kopf mit Augen und Antennen und noch einige kleinere, die unter anderem Teile



21 **Imaginalscheiben.** Die Imaginalscheiben entstehen aus Gruppen von Zellen im Ektoderm, die sich weiter teilen, um die Strukturen der adulten Fliege zu bilden. Es entstehen sackartige faltige Einstülpungen (hier im Querschnitt gezeigt), die bei der Metamorphose unter dem Einfluss des Hormons Ecdyson die Strukturen der erwachsenen Fliege ausbilden und sich dann ausstülpen. Die Fliege ist wie ein Mosaik aus Abkömmlingen verschiedener getrennter Imaginalscheiben zusammengesetzt. Im Bild die Flügelscheibe, die sowohl den Thorax als auch (im Zentrum, grau) den Flügel bildet. Der rote Punkt markiert die Flügelspitze.

des Hinterleibs und des Kopfes bilden. Jede Imaginalscheibe wächst während der Larvenentwicklung aus einer kleinen Gruppe von 3–10 Zellen heran, die im Embryo sozusagen beiseite gelegt wurden. Diese Zellen teilen sich regelmäßig, so dass die ausgewachsenen Imaginalscheiben aus Schichten von bis zu 40000 Zellen bestehen (Abb. 21). Unter dem Einfluss des Hormons Ecdyson, das die Metamorphose auslöst, differenzieren während der Puppenruhe die vielfältigen kutikulären Strukturen: Borsten, Haare, Komplexaugen, äußere Geschlechtsorgane, Flügel. Kurz vor dem Schlüpfen stülpen sie sich aus und fügen sich zusammen. So lassen sie nahtlos den Körper der Fliege entstehen.



22 Anlagenplan des *Drosophila*-Embryos. Er gibt an, welche Strukturen aus Regionen des Blastoderms werden. Der segmentierte Bereich, der den Körper der Larve von vorne bis hinten bedeckt, kommt aus einer großen Region in der Mitte des Embryos, wobei jedes Segment einen schmalen, nur drei Zellen breiten Streifen darstellt. Die meisten übrigen Regionen werden zu inneren Organen. A = anterior, P = posterior, D = dorsal, V = ventral.

Anlagenplan. Durch Markierung von Zellen des Blastoderms lässt sich die Herkunft verschiedener Strukturen des larvalen oder adulten Körpers der Fliege bestimmen. Man erkennt an solch einem Plan, dass der Bauplan der Larve erst einmal zweidimensional ist, mit einem klaren Koordinatensystem von zwei rechtwinklig aufeinander stehenden Achsen: Vorne – Hinten oder Anterior – Posterior und Rücken – Bauch oder Dorsal – Ventral. Die Kutikula geht aus einer großen Region hervor, die etwa die Hälfte der Eilänge ausmacht. Jede Segmentanlage entsteht aus einem schmalen Streifen, der nur 3–4 Zeldurchmesser breit ist. Innerhalb dieser Streifen stellen die Anlagen der Imaginalscheiben kleine Zellgruppen in den vorderen Segmenten dar. Die Anlagen der inneren Organe bestehen aus einem Längsstreifen auf der Bauchseite, der die Mesodermanlage darstellt, sowie aus großen Bereichen vorne und hinten, die nach innen gelangen werden, um Gehirn sowie Darmanlagen zu bilden (Abb. 22).

3. Die Suche nach Entwicklungsgenen

Wie kommt der Anlagenplan zustande? Ist er etwa bereits unsichtbar molekular im Ei enthalten, wie es die Präformationstheorie fordert? Oder entsteht er neu, wie es unsere Logik sagt? Wie viele Informationen, welche Gestalt bildenden Stoffe sind denn im gerade befruchteten Ei schon vorhanden, welche entstehen später?

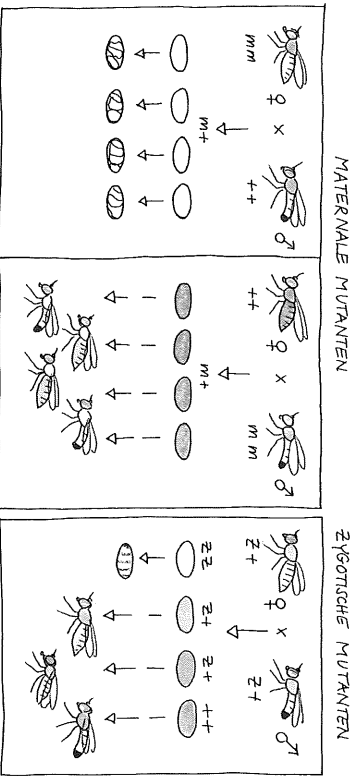
Stoffe, die die Entwicklung steuern, gehen immer auf Gene zurück. Wie bereits erwähnt, hat *Drosophila* etwa 5000 Gene, die für die Entwicklung und das Überleben unbedingt erforderlich sind. Die meisten produzierten Proteine, die für allgemeine Zellvorgänge gebraucht werden und am Zellhaushalt beteiligt sind. Viele werden aktiv, wenn Zellen wachsen und sich teilen und neue Bausteine der Zellen gebildet werden müssen. Im frisch abgelegten Ei der Fliege sind solche Komponenten bereits gespeichert. Die Gene waren also bereits während der Eireifung, also vor der Befruchtung, aktiv. Diese Gene werden häufig während der Embryogenese nicht dringend gebraucht, da ja ihre Produkte, RNA oder Protein, bereits als Vorrat zur Verfügung stehen. Mutationen führen dazu, dass die Entwicklung irgendwann abbricht, wenn der Vorrat aufgebraucht ist. Mutanten in diesen Genen zeigen häufig keinen deutlichen, sichtbaren Phänotyp – alle Organe und Gewebe sind vorhanden und am richtigen Platz, der Körper ist normal gegliedert.

Bei einem kleinen Teil der Gene ist das nicht der Fall. Es sind die, die besondere Funktionen bei der Ausbildung der Gestalt der Larve oder der Fliege erfüllen. Diese Entwicklungsgene sind in der Regel nur zu bestimmten Zeiten und nur in bestimmten Regionen des Tieres aktiv und bewirken, dass eine räumliche Organisation entsteht, sich entwickelt und ausprägt. Mutanten von Entwicklungsgenen zeigen einen sichtbaren Phänotyp: Der Larve fehlen Strukturen, oder sie sind falsch angeordnet oder falsch geformt.

Die ersten Entwicklungsschritte werden durch Faktoren bestimmt, die bereits im frisch abgelegten Ei vorhanden sind. Diese sind von mütterlichen Genen abhängig. Mutante Weibchen, in

denen ein Gen für einen solchen Faktor defekt ist, produzieren Eier, in denen sich zwar Larven entwickeln können. Sie sind aber nicht normal aufgebaut. Der Phänotyp solcher maternalen Entwicklungsmutanten drückt sich also erst in den Nachkommen aus und ist vom väterlichen Genotyp nicht beeinflusst (Abb. 23). Später, etwa ab der Bildung des Blastoderms, übernimmt das embryonale Genom die Regie, und der Phänotyp ist direkt durch den embryonalen Genotyp bestimmt. Mutanten dieser Entwicklungsgene heißen zygotisch, da es bei ihnen auf den Genotyp der Zygote ankommt, ob der Phänotyp sich ausprägt. Mutanten beider Klassen waren vereinzelt gefunden worden, die überwiegende Zahl von ihnen entdeckte man aber erst in speziell dafür ausgerichteten Experimenten, denn ihre Erkennung erfordert, dass die Larve und nicht die erwachsene Fliege genau betrachtet wird.

Um Mutanten zu finden, werden männliche Fliegen mit einer Chemikalie, die die Fehlerrate der DNA-Replikation erhöht, gefüttert. Dann werden Familien gezüchtet, die jeweils von einem ein-



23 *Maternale und zygotische Mutanten.* Bei maternalen Mutanten produzieren Weibchen, die homozygot für die Mutation (mm) sind, Eier, denen etwas fehlt, was sie zur normalen Entwicklung brauchen, auch wenn das väterliche Genom ein normales Allel des Gens beisteuert. Es kommt also auf den Genotyp der Mutter, nicht auf den des Embryos an, der in den beiden Kreuzungen gleich ist (links). In zygotischen Mutanten (z) tritt ein Phänotyp nur in den homozygoten Embryonen auf (zz). Sie entstehen aus Kreuzungen zwischen heterozygoten ($z+$) Eltern.

zigen mutierten Spermium abstammen und in denen schließlich nach mehreren Generationen Inzucht auch homozygote Individuen entstehen. Um möglichst Mutationen in allen Genen erfassen zu können, müssen große Zahlen solcher Inzuchtfamilien untersucht werden. Diese Zahlen sind durch die Trefferhäufigkeit der verwendeten Chemikalie vorgegeben. Bei Fliegen gibt es, dank der ausgezeichneten genetischen Vorgeschichte, zahlreiche Marker-mutationen und andere Kniffe, die es erleichtern, viele solcher Familien herzustellen und die Larven durchzumustern. Dafür eignet sich das Muster der Kurikula sehr gut, die als ausgeschiedene leblose Struktur den Zerfall der Zellen und Gewebe überdauern. Sie wird durch die den gesamten Körper umgebende Haut gebildet, und an ihr können auch subtile Veränderungen der Larvengestalt entdeckt werden.

In systematischen Suchen wurden Gene beider Klassen gefunden, also maternale und zygotische, bei denen die mutanten Larven eine defekte Ausbildung und Anordnung der Strukturen des Larvenkörpers zeigten. Die Zahl solcher Gene, die ganz spezifisch nur die Gestaltbildung (und nicht etwa auch andere allgemeinere Zellfunktionen) betreffen, ist erstaunlich klein: Etwa 40 maternal und 120 zygotisch wirkende Gene wurden bei *Drosophila* auf diese Weise entdeckt. Das entspricht nur einem sehr kleinen Bruchteil des Genoms.

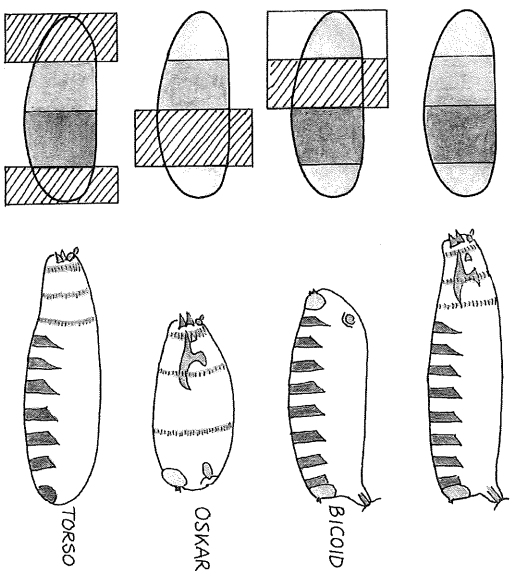
4. Die Logik der Gene

Eine Mutante definiert ein Gen. Für die Funktion eines Gens ist der Phänotyp sehr aufschlussreich, der sich in mutanten Tieren zeigt, in denen nur dieses Gen defekt ist, während alle anderen normal sind. Welche Strukturen sind betroffen, welche nicht? Wie früh und woran zeigt sich die Abweichung von der Normalentwicklung? Der Wert der Fliegenmutanten für das Studium der Gestaltbildung liegt darin, dass die Sammlung der Gene annähernd vollständig ist, man also die meisten Stücke eines Puzzles in der Hand hat und nun sehen muss, wie sie zusammengesetzt werden.

Wie sehen die Phänotypen aus? Man findet keineswegs alles, was man sich so denken kann. Sehr selten bestimmt ein Gen nur eine einzige Struktur, wie man es vielleicht erwarten könnte – es gibt also nicht ein Gen für jedes Segment, jedes Bein, jeden Körperabschnitt, jedes Organ oder gar jedes Sinneshaar. Die Logik der Gene folgt damit offenbar nicht den morphologisch sichtbaren Unterteilungen. Der Anlagenplan kann also nicht direkt durch lokalisierte Genprodukte, die für bestimmte Strukturen stehen, erklärt werden, wie es eine Präformation verlangen würde. Dazu ist auch die Zahl der Gene und erst recht die Zahl der unterschiedlichen Phänotypen viel zu klein.

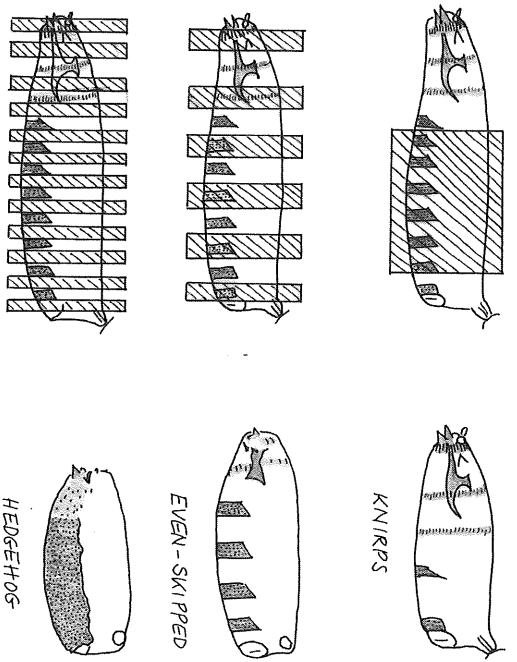
Was ist die Logik, was sagen die Phänotypen? Häufig sind sich die Phänotypen verschiedener Mutanten ähnlich. Dabei handelt es sich manchmal um verschiedene Allele desselben Gens, öfter aber auch um Mutanten in verschiedenen Genen, die offenbar ähnliche Funktionen haben. Die ähnlichen Phänotypen der Mutanten erlauben eine Einteilung in Gruppen von Genen. Es liegt nahe, dass die Produkte der Gene einer solchen Gruppe in einem gemeinsamen Prozess mitwirken. Es scheint ähnlich wie bei Stoffwechselwegen zu sein: Eine Kette von biochemischen Reaktionen, die von einzelnen Enzymen ausgeführt werden, führt zur Synthese eines Produktes, zum Beispiel einer Aminosäure. Bei manchen Prozessen der Gestaltbildung führt eine Mutation in jedem der Gene einer Kette zum ähnlichen Phänotyp, beispielsweise zum Ausfall einer bestimmten Körperregion.

Mutationen der maternalen Gene führen zu besonders dramatischen Abweichungen von der normalen larvalen Form. Das ist einleuchtend, denn es sind ja die frühesten Funktionen der Gestaltbildung betroffen. In Embryonen von mutanten Fliegenweibchen fehlen große Körperbereiche. Interessant ist, dass es hier nur eine kleine Zahl von Möglichkeiten gibt, wie die Abweichung aussehen kann: Entweder ist das Muster entlang der Vorne-Hinten-(Anterior-Posterior, AP-)Achse oder der Rücken-Bauch-(Dorsal-Ventral, DV-)Achse geändert. Das zeigt, dass die beiden Achsen unabhängig voneinander bestimmt werden. Bei den meisten Mutanten der DV-



24 *Maternale Gengruppen der antero-posterioren Achse.* In Embryonen, die von maternal-mutanten Weibchen produziert werden, fehlen charakteristische Bereiche des Segmentmusters: Bei bicoid fehlen alle Strukturen, die normalerweise von der vorderen Hälfte kommen, bei oskar das Abdomen und bei torso sowohl das hintere wie das vordere Ende. Es gibt eine Gruppe von Genen, bei denen mutante Embryonen wie bei oskar aussehen, das Gleiche gilt für torso. Gene einer solchen Gruppe wirken häufig nacheinander im gleichen Prozess. Eine vierte maternale Gengruppe bestimmt die dorso-ventrale Achse (nicht dargestellt).

Achse fehlen die Bauchstrukturen, der Embryo bildet stattdessen überall Rückenstrukturen. Die Aufteilung der Längsachse in Segmente ist aber nicht betroffen. Innerhalb der Gene der Längsachse gibt es wiederum drei Gruppen, die für Unterabschnitte in der Vorder- oder Hinterhälfte und noch einmal extra für die unsegmentierten Enden am vorderen und hinteren Eipol verantwortlich sind (Abb. 24). Das maternale Entwicklungsprogramm ist also aufgeteilt in vier unabhängige Prozesse, die jeweils nur einen Aspekt oder Teil des Musters determinieren. Umgekehrt hängt die normale Ausprägung einer bestimmten Struktur von mehr als einem dieser Prozesse ab.



25 Zygotische Segmentierungsgene. Kniips gehört zu den Gap-Genen, bei denen große zusammenhängende Regionen ausfallen, hier fast das gesamte Abdomen. Bei Paarregel-Mutanten, wie even-skipped, fallen Partien in jedem zweiten Segment aus, während bei Segmentpolaritätsgenen wie hedgehog in jedem Segment die nackte Kutikula fehlt.

Bei den zygotischen Genen ist die Vielfalt der Phänotypen größer als bei den maternalen. Generell sind die Ausfallregionen kleiner, und die Abweichung von der Normalentwicklung lässt sich (mit wenigen Ausnahmen) erst nach der Gastrulation erkennen. Auch hier gibt es Gruppen von Genen mit ähnlichem oder gleichem Phänotyp. Eine dieser Gruppen von Genen betrifft die Bildung von Strukturen entlang der Dorso-Ventral-Achse des Embryos, ähnlich wie die entsprechende Gruppe der maternalen Gene. Die Musterausfälle sind aber weniger vollständig und betreffen nur Teile des Musters. Bei etlichen Mutanten ist die Zahl der Segmente verringert. Zusätzlich zu den maternalen Genen, bei denen in Mutanten große Regionen ausfallen, gibt es drei Gruppen von zygotischen Genen, die die Segmentierung betreffen. Die Phänotypen der ersten Gruppe, der Gap-Genen (gap = Lücke), sind denen der mater-

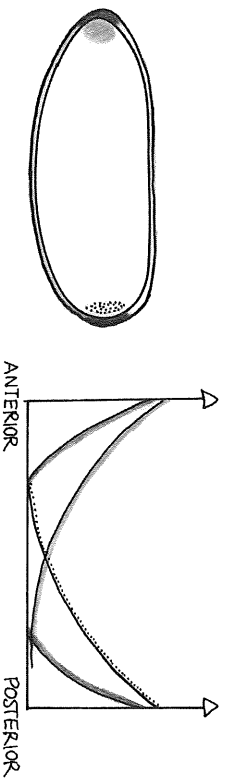
nalen Gene ähnlich, in dem große zusammenhängende Regionen fehlen, nur sind diese Regionen kleiner. Der Phänotyp des maternalen Gens oskar (Abb. 24) zum Beispiel ist dem des zygotischen Gens kniips (Abb. 25) sehr ähnlich. In den beiden anderen Gruppen sind periodisch mehrere Segmente betroffen: Bei den Paarregel-Genen fehlen entsprechende Strukturen in jedem zweiten Segment, und schließlich ist bei den Segmentpolaritätsgenen jedes Segment betroffen. Das deutet auf eine schrittweise Unterteilung des Embryos von größeren zu kleineren Einheiten hin.

Die Phänotypen zeigen durch das unterschiedliche räumliche Ausmaß der Störungen oft eine hierarchische Funktion der Gene an: Früh wirkende Gene kontrollieren innerhalb eines Prozesses die Aktivität der nachfolgenden Gene und so fort. Die Unterteilung des Eies erfolgt in Stufen, die anfänglich grobe, später feinere Regionen festlegen. Um diese komplizierten Gestalt bildenden Prozesse besser zu verstehen, ist es notwendig, die biochemische Natur der Produkte der einzelnen Gene zu kennen. Das erlaubt, ihre Kontrolle und ihre Wechselwirkungen zu untersuchen, um schließlich den molekularen Mechanismen, die bei der Unterteilung und Entwicklung des Embryos am Werke sind, auf die Spur zu kommen. Die Klonierung und Einzifferung der Entwicklungsgene ergaben, dass viele von ihnen für Transkriptionsfaktoren kodieren. Das heißt, dass sie die Aktivität anderer Gene kontrollieren.

V. Molekulare Vormuster

Bei Drosophila ist die Frühentwicklung dadurch gekennzeichnet, dass zwischen den Kernen noch keine trennenden Zellmembranen bestehen. Die Furchungskerne, die außen angeordnet sind, haben also ein gemeinsames Zytoplasma, in dem sich Proteine ungehindert ausbreiten können. Das Ei besteht so aus einer riesigen Zelle mit vielen Kernen, und in ihm schwimmen die verschiedenen maternalen, später auch zygotischen Faktoren, die sich zunächst von der Peripherie und später von bestimmten Zonen her ausbreiten.

Unter der Kontrolle der vier maternalen Gengruppen werden bereits vor der Befruchtung an der Peripherie des Eis, an Vorder- und Hinterpol sowie an der Bauchseite, vier lokalisierte Substanzen verankert. Diese wirken als Signale und steuern die Transkription der ersten zygotischen Gene (Abb. 26). Die frühen zygotischen Gene kodieren für Transkriptionsfaktoren, die als Aktivatoren oder



26 *Maternales Vormuster der antero-posterion Achse.* Einige Genprodukte der maternalen Gruppen sind im Ei bereits bei der Ablage lokalisiert und stellen Signale dar, die von der Peripherie aus die Entwicklung des Embryos steuern. Vorne (links) ist die bicoid-mRNA, hinten die von oskar lokalisiert. Das torso-Protein ist ein Rezeptorprotein, das an den beiden Polen in der Membran aktiviert wird. Ausgehend von diesen Signalen entstehen Gradienten, im einfachsten Fall der des bicoid-Proteins. Die torso-Aktivierung führt zu zwei Gradienten mit kurzer Reichweite an den Eipolen.

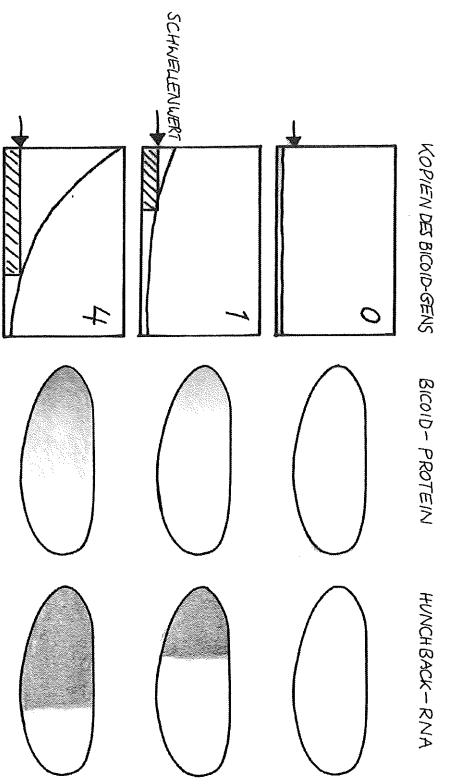
Repressoren wirken und instabil sind. Diese Proteine entstehen in breiten Regionen und wirken durch Diffusion über den Bereich ihrer Entstehung hinaus. Treffen diese Proteine auf passende Enhancer in den Kernen, so steuern sie die Aktivität der betreffenden Gene. Neue Proteine entstehen (darunter wiederum Transkriptionsfaktoren), die sich ausbreiten und ihre Wirkung entfalten. Durch gegenseitige Hemmung und Aktivierung entsteht eine Serie sich schnell verändernder und immer komplexer werdender molekularer «Vormuster». Das letzte Vormuster bedingt schließlich die Formveränderungen der inzwischen entstandenen Zellen, die nun endlich das eigentlich sichtbare Muster bilden.

Bei der Entstehung der molekularen Vormuster sind zwei Prinzipien wichtig: die Abhängigkeit der Wirkung eines Faktors von seiner Konzentration (Gradient) und die Kombination mehrerer Faktoren. Gradienten mit verschiedenen Schwellenwerten führen zur Unterteilung in mehrere Zonen, und Kombinationen zweier Faktoren können einen dritten, neuen Zustand hervorrufen. Beide Prinzipien spielen eine große Rolle bei der Entstehung von Komplexen aus einfachen Strukturen während der Entwicklung des Embryos.

Später, wenn sich Zellen gebildet haben, kann die Ausbreitung von Faktoren von Zelle zu Zelle nicht mehr einfach durch Diffusion erfolgen. Dann werden Signalmoleküle aus der Zelle ausgeschleudert, die sich im extrazellulären Raum ausbreiten und benachbarte Zellen aktivieren.

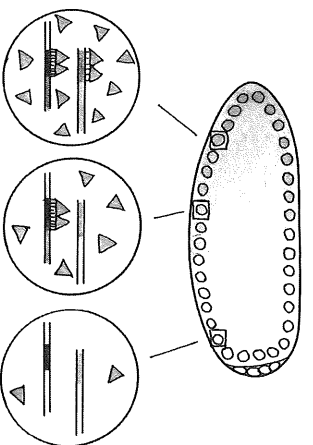
1. Gradienten

Als Gradient bezeichnet man eine kontinuierliche Änderung einer Eigenschaft im Raum. Diese kann in mehrere verschiedene Zustände übersetzt werden. Die verschiedenen Gürtel der Gebirgsflora zum Beispiel beruhen auf Temperaturgradienten, die durch die unterschiedlichen Höhen bedingt sind. Es gibt auch Dichtegradierten oder Farbgradienten. Bei der embryonalen Entwicklung sind Konzentrationsgradienten einer biologisch aktiven Substanz wich-



27 *Konzentrationsabhängigkeit der hunchback-Aktivierung.* Der bicoid-Gradient kann dadurch geändert werden, dass mehr oder weniger mRNA im Ei lokalisiert ist. Heterozygote Weibchen haben nur eine intakte bicoid-Kopie, während Weibchen, die als Transgene zwei zusätzliche Kopien des bicoid-Gens haben, viermal so viel RNA in das Ei einlagern. Entsprechend ändert sich der Gradient, und damit verschiebt sich die Position, bei der die Schwellenwertkonzentration vorliegt. Sie bestimmt den Bereich, in dem hunchback transkribiert wird.

tig. Der erste Fall eines Gradienten, bei dem die Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung eines Moleküls gezeigt werden konnte, ist der bicoid-Gradient im frühen Embryo von Drosophila. Das Gen bicoid gehört zu den maternalen Genen, die für die Entwicklung der Vorderhälfte zuständig sind. Ist das Gen defekt, so fehlen den Embryonen aus Eiern des mutanten Weibchens alle Strukturen, die normalerweise von der vorderen Eihälfte gebildet werden, also Kopf und Thorax. Die bicoid-mRNA ist im frisch abgelegten Ei am Vorderpol verankert. In den ersten Stunden nach der Befruchtung entsteht durch Translation der lokalisierten RNA das bicoid-Protein. Dieses breitet sich nach hinten in einem Konzentrationsgradienten aus, der bis über die Eimitte hinausreicht (Abb. 26). Das bicoid-Protein ist ein Transkriptionsfaktor, der als DNA bindende Domäne eine Homöodomäne enthält, die spezifische Bindungsstel-



28 *Verschiedene Schwellenwerte der Genaktivierung.* Ein Promotor, den das bicoid-Protein mit hoher Affinität bindet (hier schwarz), wird bereits bei relativ niedrigen Konzentrationen, die sich in der Mitte des Eis befinden, vollständig besetzt und dadurch aktiviert. Ein zweites Gen, hier grau dargestellt, wird ebenfalls durch bicoid aktiviert, aber erst bei höheren Konzentrationen. Diese beiden Gene haben also verschiedene Schwellenwerte der Aktivierung durch bicoid. Dadurch kann der bicoid-Gradient mehr als eine Position im Ei bestimmen.

len im Promotor verschiedener Segmentierungsgene erkennt, unter anderen die im Promotor des Gens hunchback.

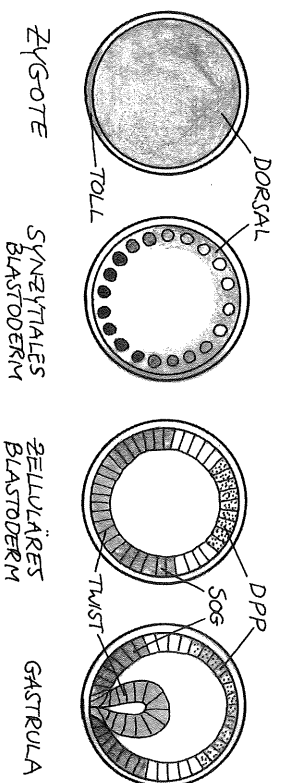
Das Gen hunchback wird in der vorderen Eihälfte transkribiert. Fehlt bicoid-Protein, so wird auch das hunchback-Gen nicht transkribiert. Ist mehr oder weniger bicoid-Protein als normal vorhanden, so ist der Gradient steiler und höher oder flacher und niedriger (Abb. 27). Entsprechend verschiebt sich die Schwelle, ab der das hunchback-Gen transkribiert wird, nach vorne oder nach hinten. Das zeigt, dass eine Mindestkonzentration von bicoid-Protein gebraucht wird, um das hunchback-Gen zu aktivieren. Diese ist normalerweise in der vorderen Eihälfte vorhanden. Ein Gen, dessen Promotor weniger stark an bicoid-Protein bindet, wird erst bei höheren Konzentrationen, also mit Schwellen, die weiter vorne im Ei liegen, transkribiert. In diesem Fall entstehen drei verschiedene Zonen: Bei hoher Konzentration sind beide Zielgene aktiviert, bei mittlerer nur eins oder schließlich keins (Abb. 28).

Man sieht an diesem Beispiel, wie aus einer lokalen Quelle über die Ausbreitung eines Morphogens eine Unterteilung des Eies in

mehrere Zonen erfolgen kann. Hier geschieht die Ausbreitung des Morphogens wahrscheinlich ganz einfach durch Diffusion eines kontinuierlich entstehenden Proteins von der am vorderen Eipol verankerten Quelle weg. Wäre das Protein stabil, so könnte kein Gradient entstehen, denn das Ei wäre bald voll gelaufen. Das Protein zerfällt aber ständig, wobei die Geschwindigkeit des Abbaus offenbar der Synthese so entgegenwirkt, dass eine Ungleichverteilung gewährleistet ist.

Im frühen Embryo entstehen unter der Kontrolle der vier maternalen Gengruppen verschiedene Gradienten, die von den Polen ausgehen: der bicoid-Gradient, der seinen Höhepunkt am Vorderpol hat und sich bis zum hinteren Eidrittel auswirkt, sowie zwei Gradienten mit kurzer Reichweite, die vom Vorder- und Hinterpol ausgehen (Abb. 26). Eine lokalisierte RNA befindet sich auch am Hinterpol: die oskar-RNA. Oskar ist für die Bildung des Polplasmas verantwortlich, in dem die Keimbahnzellen entstehen. Von diesem Plasma geht auch ein Gradient aus, der nach vorne reicht und notwendig für die Transkription von knirps und die Entwicklung des Abdomens ist (siehe Abb. 24, 25). Die maternalen Gradienten regeln die Transkription der ersten zygotischen Gene, der Gap-Gene, entlang der Anterior-Posterior-Achse. Ein weiterer maternaler Gradient bewirkt die Unterteilung des Embryos entlang der Dorso-Ventral-Achse.

Der «dorsal»-Gradient. Ein Gradient des Transkriptionsfaktors dorsal überspannt die Querachse mit einem Höhepunkt auf der künftigen Bauchseite. Das lokalisierte Signal der Dorso-Ventral-Achse ist nicht die mRNA des Gradientenmoleküls, sondern ein überall in der Eimembran verankertes Protein, der Rezeptor Toll. Er wird aber nur auf der zukünftigen Ventralseite aktiviert. Das dorsal-Protein ist zunächst im Ei gleich verteilt, jedoch führt die Aktivierung von Toll auf der Ventralseite nur dort zur Aufnahme des dorsal-Proteins in die Kerne, während es auf der Dorsalseite im Zytoplasma bleibt. Dadurch entsteht ein Gradient von dorsal-Protein in den Kernen, der seinen Höhepunkt auf der künftigen Ventralseite hat. Das dor-



29 *Der dorsal-Gradient.* Der dorsal-Gradient entsteht dadurch, dass das zunächst gleichmäßig verteilte Protein (grau) auf der zukünftigen Ventralseite in die Kerne aufgenommen wird und dadurch wirken kann, während es auf der Dorsalseite draußen bleibt. Dieser Mechanismus wird durch eine Signalübertragung bewirkt, bei der das Toll-Protein der Rezeptor in der Membran der Zygote ist, der von einem Signal von außen aktiviert wird (rot). Der Gradient des Transkriptionsfaktors dorsal wirkt ähnlich wie bicoid, in dem bei unterschiedlichen Konzentrationen von dorsal-Protein verschiedene Gene aktiviert oder reprimiert werden. Dadurch entsteht das twist-Produkt auf der Ventralseite, seitlich davon sog und Dpp auf der Dorsalseite.

sal-Protein aktiviert bei hoher Konzentration Gene wie twist. Bei geringerer Konzentration werden in einer seitlichen Zone weitere Gene angeschaltet. Das dorsal-Protein wirkt auch als Repressor auf andere Gene, die dadurch nur auf der dorsalen Seite aktiviert werden können. Durch diesen Gradienten kommt eine Unterteilung des Eis in vier Längsstreifen zustande. Einige bestimmen unmittelbar Formveränderungen der Zellen. So stülpen sich die Zellen, die twist-Protein haben, auf der Bauchseite ein, um die Anlage des Mesodermis zu bilden. Der seitlich angrenzende Streifen bestimmt das ventrale Ektoderm, aus dem auch das Nervensystem hervorgeht (Abb. 29).

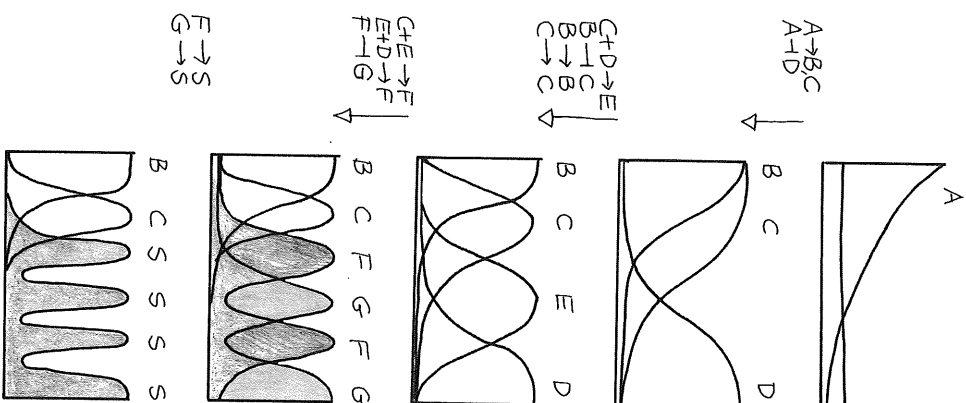
Die Unterteilung der Längsachse ist komplizierter und erfolgt durch die Bildung einer Serie vorübergehender Vormuster, die schließlich in das bleibende sichtbare Muster übergehen.

2. Kombinatorik

Theoretisch ist es möglich, dass ein Morphogen in verschiedenen Konzentrationsbereichen eine Reihe von mehreren Zuständen bewirkt. Meistens kommen aber noch weitere Einflüsse hinzu. Dadurch entstehen Überlagerungen, Kombinationen mehrerer Faktoren, die gleichzeitig in einem Kern vorhanden sind. Diese können neue Zustände hervorrufen. Bewirkt zum Beispiel Faktor a den Zustand A und Faktor b den von B, so kann die Kombination von beiden Molekülen einen dritten Zustand C bewirken. Oft gibt es einen Wettstreit zwischen einem Aktivator und einem Repressor, die gleichzeitig an einen Enhancer oder Promotor binden. Oder die Kombination zweier Faktoren kann reprimieren, während einer allein aktiviert. Ob ein bestimmtes Gen nun an- oder abgeschaltet wird, entscheidet in der Regel die Konzentration der jeweiligen Faktoren.

Gap-Gene. Die maternalen Gradienten regulieren die Gap-Gene. Es gibt mindestens sechs solcher Gene. Sie werden jeweils in einem oder zwei breiten Streifen transkribiert. Die grobe Lage der Streifen wird zunächst durch die maternalen Gradienten bestimmt, später beeinflussen sich die Gap-Gene gegenseitig, denn sie kodieren sämtlich für Transkriptionsfaktoren. Diese diffundieren im Zytoplasma und bilden so glockenförmige Verteilungen, also ebenfalls Gradienten mit räumlich unterschiedlichen Konzentrationen. Im Bereich der Synthese der RNA des Gap-Gens ist die jeweilige Proteinkonzentration am höchsten, und das Protein wirkt als Repressor der Transkription anderer Gap-Gene. An den Rändern nimmt die Konzentration ab, und unterhalb eines Schwellenwerts wirkt das Protein als Aktivator eines oder mehrerer Gap-Gene. Dadurch wird erreicht, dass benachbarte, aber nicht überlappende Zonen entstehen, die das Ei überziehen.

Wichtig ist, dass die Gap-Gene, die im frühen Embryo unter der Kontrolle der maternalen Gradienten aktiviert werden, mit der

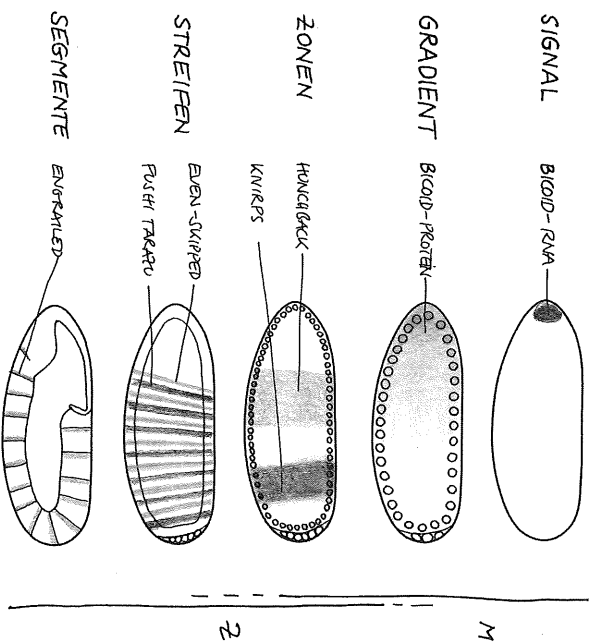


30 Die Entstehung der molekularen Vormuster. Die Proteine der Gap- und Paaregel-Gene sind Transkriptionsfaktoren. Im frühen Drosophila-Embryo können diese ungehindert diffundieren und die Transkription anderer Gene beeinflussen. Dadurch entsteht eine Serie immer komplexer werdender molekularer Muster. Sie bestimmen schließlich das periodische Muster, das der Segmentierung vorausgeht. Hier ist (stark vereinfacht) eine hypothetische Serie solcher Vormuster dargestellt. Die Veränderung der Muster von Stufe zu Stufe geschieht durch die Kombination verschiedener Faktoren, die gemeinsam in den gleichen Zellkernen wirken, durch Aktivierung und Hemmung sowie Selbstverstärkung: → bedeutet Aktivierung; -| Hemmung.

Verteilung ihrer Produkte eine Serie von Zonen, ein einfaches molekulares Vormuster, bewirken. Die Zonen sind zunächst unscharf, und sie verändern sich schnell, da die Faktoren vom Ort ihrer Entstehung weg diffundieren und ihre Transkription wechselseitig beeinflussen. Dabei kommt es sowohl auf die Konzentration an als auch auf die Kombination verschiedener Faktoren, die gleichzeitig an die Kontrollregion eines Gens binden können. Häufig aktivieren Transkriptionsfaktoren ihre eigene Transkription. Das führt zu einer Selbstverstärkung und Verschärfung der anfänglich verwischten Ränder der Zonen. In Abbildung 30 ist das an einem hypothetischen Beispiel dargestellt.

Periodizität. Das erste zygotische Vormuster, das durch die Produkte der Gap-Gene gebildet wird (Abb. 30 Mitte), ist schon sehr viel detaillierter als das maternale, aber ein wesentlicher Aspekt des Mutters des Embryos fehlt noch, die Einteilung in sich wiederholende Einheiten, die Periodizität der Segmente. Es ist Aufgabe der Gap-Gene, die Paarregel-Gene zu aktivieren. Diese werden in einem einfachen periodischen Muster, das aber bereits an das zukünftige Segmentmuster erinnert, transkribiert. Jedes Paarregel-Genprodukt bildet sieben regelmäßige Streifen in einem Abstand, der etwa zwei Segmentanlagen entspricht. Das erklärt ihren Phänotyp, bei dem Defekte in jedem zweiten Segment auftreten. So fehlen in Mutanten von even-skipped (Abb. 25) die Zahnchenbänder der geradzähligen Segmente und bei fushi-tarazu die der ungeradzähligen.

Die sieben Streifen entstehen nicht etwa durch einen periodisch sich wiederholenden molekularen Prozess wie eine Welle, sondern überraschenderweise unabhängig voneinander und auf unterschiedliche Weise. Das periodische Muster wird also aus seinen Einzelteilen zusammengestückt. Die Position jedes der Streifen wird durch verschiedene Kombinationen von Gap-Genen bestimmt. Im hypothetischen Beispiel in Abbildung 30 wird F sowohl durch die Kombination von C und E als auch D und E bestimmt. Sind einmal sieben Streifen vorhanden, so entstehen zwischen ihnen weitere sieben, denn even-skipped hemmt fushi-tarazu, so dass dessen sie-



31 **Molekulare Vormuster.** Dargestellt ist die Verteilung der Protein- oder RNA-Produkte der angegebenen Gene. In Wirklichkeit sind diese Vormuster zu jedem Stadium um ein Vielfaches reicher und komplexer. Für jedes Stadium gilt ein neuer Farbkode. M = maternal, Z = zygotisch.

ben Streifen zwischen den even-skipped-Streifen entstehen. Das Prinzip der Entstehung der periodischen Muster ist in Abbildung 30 mit nur vier Streifen dargestellt.

Unter der Kontrolle der jeweils sieben Streifen der Gene even-skipped und fushi-tarazu entstehen schließlich 14 Streifen des Produkts des Gens der nächsten Stufe, engrailed, das sowohl von fushi-tarazu als auch von even-skipped aktiviert wird. Diese 14 Streifen nehmen bereits das endgültige Muster von 14 Segmenten vorweg. Zu diesem Zeitpunkt sind zwischen den Kernen des Blastoderms bereits Zellmembranen gebildet worden. Engrailed gehört, wie hedgehog (Abb. 25), zu der Gruppe der Segmentpolaritätsgene, von denen viele ebenfalls in 14 Streifen transkribiert werden. Die Zellreihe, in der engrailed transkribiert wird, wird später zum hinteren Teil jedes Segments (Abb. 31).

Selektor-Gene. Die Verfeinerung der Vormuster führt schließlich zu der Unterteilung des Eies in segmentale Einheiten. Aber die Zellen «wissen» dadurch noch nicht, welche Strukturen sie bilden sollen: die schmalen Zähnnchen der vorderen oder die breiten Bänder der hinteren Segmente oder Strukturen des Kopfes. Unabhängig von der räumlichen Unterteilung bewirkt eine weitere Gruppe von Genen das Verschiedenwerden der Zellen. Man nennt Gene, die bestimmen, welche Strukturen sich entwickeln, Selektor-Gene. Diese kodieren allgemein für Transkriptionsfaktoren, die ganze Gruppen von nachgeschalteten Genen aktivieren. Ein Beispiel ist engrailed, das für die Eigenschaft «hinten» innerhalb jedes Segments steht. Andere Selektor-Gene bewirken die Differenzierung der Zellen in bestimmte Organe. Dazu gehören als Beispiel die Gene *eyeless* für Augen, *twist* für Muskulatur und *tinman* für Herz. Die Zellen, die das *eyeless*-Protein bilden, entwickeln sich zu Augenstrukturen, auch wenn sie experimentell am falschen Ort entstehen. Das Gen *twist* bestimmt alle Zellen des Mesoderms, die später Muskulatur bilden werden. In einer Untergruppe dieser Zellen wird das Gen *tinman* aktiviert, diese Zellen bilden dann die Herzmuskulatur.

In Fliegen wurde schon in den dreißiger Jahren von Ed Lewis eine Gruppe von Genen entdeckt, die die Ausbildung der charakteristischen Merkmale des Körpers von vorn nach hinten bestimmen, die so genannten homöotischen Gene. Mutationen führen bei Fliegen zur Ausbildung von Strukturen, die eigentlich zu einem anderen Segment gehören, zum Beispiel von Flügelstrukturen in Segmenten, die normalerweise keine Flügel tragen. Viele sind letal, und in den Larven entstehen in manchen Segmenten Strukturen, die typisch für ein anderes Segment sind. Bei Fliegen gibt es acht solche Gene, die in zwei Genkomplexen, dem Antennapedia- und dem Bithoraxkomplex, benachbart vorliegen. Es ist bemerkenswert, dass die Reihenfolge dieser Gene im Genom der Reihenfolge entspricht, nach der sie die Körperregionen von vorne nach hinten beeinflussen. Ihre Produkte wirken kombinatorisch – in vorderen Bereichen sind nur ein, dann zwei Gene aktiv, aber je weiter nach hinten im Tier, desto mehr Gene des Komplexes sind angeschaltet.

Sie legen den Charakter der einzelnen Segmente von vorne nach hinten im Körper der Tiere fest.

Diese Gene kodieren für Transkriptionsfaktoren mit einer Homöodomäne. Die DNA-Region, die für die Homöodomäne kodiert, heißt Homöobox. Es gibt mehrere interessante Aspekte der Entwicklung, die man an diesen «Hox»-Genen entdeckt hat. Die Regionen der Aktivierung und Repression der Hox-Gene werden früh in der Entwicklung durch das Wechselspiel der Segmentierungsgene, besonders der Gap-Gene, festgelegt. Die Aktivierung der Hox-Gene ist aber stabil, während die Gap-Gene nur vorübergehend aktiv sind. Es gibt besondere Mechanismen, diesen Zustand der zellulären Determination über viele Zellteilungen hinweg weiterzugeben.

Die Gruppe der Hox-Gene kommt in abgewandelter Form in bisher allen untersuchten vielzelligen Tieren vor, sogar in Würmern. In Wirbeltieren gibt es 13 verschiedene Hox-Gene, die in nur einem zusammenhängenden Komplex vorliegen, der aber viermal im Genom vorkommt. Auch hier entsprechen die Positionen, an denen ihre Produkte im Tier auftreten, denen der Gene entlang dem Chromosom. Im Falle der Hox-Gene wurden diese ersten Himmelsegmente auf deutliche Verwandtschaften zwischen den großen Tierstämmen bereits Anfang der 80er Jahre entdeckt.

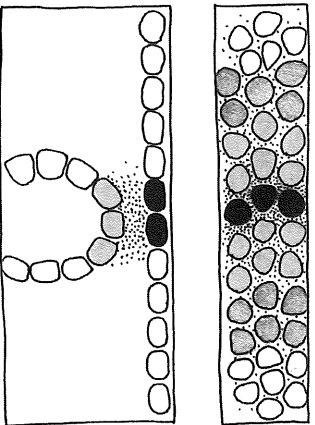
3. Induktion und Signalübertragung

Sobald Zellwände gebildet sind, kann die Ausbreitung von Transkriptionsfaktoren nicht mehr einfach durch Diffusion erfolgen. Jetzt werden Stoffe aus der Zelle ausgeschieden, die von der oder den Nachbarzellen über bestimmte Rezeptorproteine, die in der Zellwand sitzen, erkannt und gebunden werden. Diese geben Signale an das Innere der Zellen weiter, was schließlich zur Aktivierung oder Hemmung von Transkriptionsfaktoren führt und damit in Änderung der Genaktivität umgesetzt wird. Diesen Prozess nennt man Induktion. Eine Signalübertragung kann entweder auf

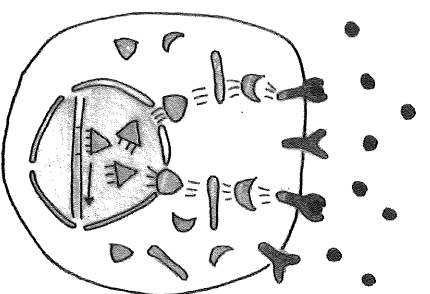
unmittelbar benachbarte Zellen oder auch über größere Distanzen hinweg erfolgen. Sie findet auch bei der Bildung von regelmäßigen zellulären Mustern statt, die auf der Wechselwirkung zwischen Nachbarzellen beruhen.

In der Entwicklung kommt es häufig vor, dass zwei Zellschichten nebeneinander zu liegen kommen und die eine ein Signalmolekül aussendet, das von der anderen aufgenommen wird und dadurch in dieser einen neuen Zustand induziert. In anderen Fällen breiten sich Signalmoleküle innerhalb einer Zellschicht von einem Zentrum her aus. Sie bilden Gradienten und beeinflussen als Morphogene das Schicksal der Zellen in konzentrationsabhängiger Weise (Abb. 32). Häufig erreichen mehrere Signale dieselbe Zelle, und es kommt zu einem Wettstreit oder zu kombinatorischen Antworten.

Im einfachsten Fall kann das Signalmolekül durch die Zellmembran dringen und direkt an einen Transkriptionsfaktor binden und ihn dadurch aktivieren. In diesen Fällen, häufig bei Hormonen,



32 *Induktion.* Ein morphogenetischer Gradient kann dadurch entstehen, dass das Morphogen in einer Zellgruppe (hier die schwarzen Zellen) produziert und ausgeschieden wird. Es diffundiert im extrazellulären Raum und beeinflusst benachbarte Zellen von außen in konzentrationsabhängiger Weise (oben). Durch unterschiedliche Schwellenwerte der Antwort entstehen mehrere Zonen. Das ausgeschiedene Morphogen kann auch benachbarte Zellgruppen von außen erreichen und so induzieren (unten). Auf die hier dargestellte Weise wirkt zum Beispiel das Morphogen Dpp in vielen Geweben nicht nur bei Fliegen, sondern auch bei Wirbeltieren.



33 *Signalübertragung.* Ein Signal, z.B. ein Morphogen, bindet an Rezeptorproteine in der Zellmembran, die dadurch aktiviert werden (rot). Sie geben diese Aktivierung an andere Proteine weiter, die dadurch nacheinander ebenfalls aktiviert werden. Der letzte Schritt ist die Aktivierung eines Transkriptionsfaktors, der im Zellkern seinerseits eine Änderung der Transkription eines oder mehrerer Gene bewirkt. Fällt eine der verschiedenen Komponenten dieses Signalübertragungsweges aus, zum Beispiel das Signal, aber auch der Rezeptor oder ein intrazellulärer Faktor, bricht der gesamte Weg zusammen. Daher kommt es, dass Mutanten in Komponenten solcher Signalwege oft sehr ähnliche Phänotypen haben, wie zum Beispiel Delta und Notch (Abb. 34) sowie hedgehog, wingless und Ci (siehe Abb. 35).

sind die Signalmoleküle fettähnlich oder fettlöslich. Aber meistens sind die Signalmoleküle Proteine, die zu groß sind, um durch die Membran zu dringen. Sie werden als Ligand von passenden Rezeptorproteinen auf der Zellmembran gebunden. Diese Rezeptorproteine reichen durch die Membran ins Zellinnere und leiten die Information, die durch die Bindung des Liganden entstanden ist, an den Zellkern weiter. Dieser Prozess heißt Signalübertragung (Abb. 33).

Bei der Übertragung des Signals in den Zellkern ist eine Reihe von nachgeschalteten Proteinen beteiligt. Sie existieren in zwei Zuständen, die man als aktiv und inaktiv bezeichnet. Aktivierung besteht allgemein in einer Veränderung der Molekülstruktur. Die

Bindung des Liganden an den Rezeptor bewirkt dessen Aktivierung. Diese kann zum Beispiel in einer Dimerisierung, der Bindung von zwei Rezeptormolekülen aneinander, bestehen. In vielen Fällen erfolgt daraufhin die Übertragung einer Phosphatgruppe auf eine bestimmte Aminosäure des Proteinanteils des Rezeptors, der in die Zelle hineinragt. Durch Bindung eines weiteren Proteins an diese phosphorylierte Aminosäure kommt es zu dessen Aktivierung, indem es ebenfalls eine Phosphatgruppe aufnimmt, und so fort. Proteine, die Phosphatgruppen übertragen, nennt man Kinasen. Schließlich landet das Signal bei einem Transkriptionsfaktor, der im Zellkern ein oder mehrere Gene aktiviert oder auch unterdrückt. Nicht immer besteht eine solche Signalübertragungskette nur aus Aktivierungen, sondern häufig wird das Ziel auch durch Hemmung eines sonst von selbst ablaufenden Prozesses erreicht. Im einfachsten Fall ist der Weg von Signal zu Transkriptionsfaktor geradlinig. An jedem Schritt kann aber eine Verzweigung oder Modifikation auftreten, durch die der Prozess einer bestimmten Situation angepasst wird. Für viele dieser Signalübertragungsketten kommt eine große Zahl möglicher Varianten vor.

Es gibt eine begrenzte Zahl solcher Signalübertragungsketten, die im gleichen Organismus in verschiedenen Prozessen wiederholt benutzt werden, um Verschiedenheiten zu bewirken: Sie induzieren Gewebe, bilden Muster, leiten Wachstum ein. Beispiele, nach den Signalmolekülen benannt, sind Decapentaplegic, Delta, wingless und hedgehog. Diese Signalmoleküle sind sowohl früh während der Gastrulation aktiv als auch bei späteren Prozessen wie zum Beispiel der Musterbildung in den inneren Organen, den Sinnesorganen und den Imaginalscheiben. Die Signalübertragungsketten unterscheiden sich in der Reichweite des Signalmoleküls und in der Art und Weise, mit der das Signal an den Zellkern weitergegeben wird. Auch werden sie mit unterschiedlicher Häufigkeit und Vielseitigkeit im Organismus angewendet.

Viele Komponenten solcher Signalketten sind bei *Drosophila* durch die Gengruppen mit ähnlichem oder gleichem Phänotyp gefunden worden. Eine der bemerkenswertesten Entdeckungen

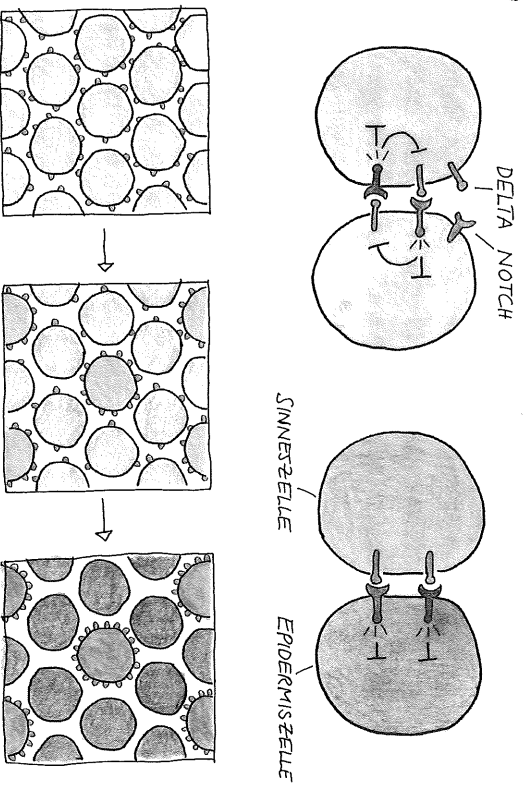
durch die Genforschung war, dass diese Signalketten im Tierreich hoch konserviert sind und in ähnlicher Form sowohl bei Wirbeltieren als auch bei Gliederfüßern wie *Drosophila* ähnliche Funktionen übernehmen. Ein Beispiel wurde bereits genannt: die maternale Dorso-Ventral-Gruppe mit Toll als Rezeptor und dorsal als Transkriptionsfaktor. In diesem Falle sind mehr als zehn Gene mit gleichem Phänotyp beteiligt, deren Proteine entweder das Signal, das Toll aktiviert, aufbereiten oder im Inneren an dorsal weiterreichen. Interessanterweise wird der Signalweg mit Toll-Proteinen als Rezeptoren in sehr ähnlicher Form bei der Abwehr von pathogenen Organismen in Fliegen wie in Wirbeltieren benutzt. Auch die folgenden Beispiele aus der Entwicklung der Fliege, die Signale Dpp, wingless, hedgehog, Delta, sind weit verbreitet und spielen in zahlreichen Gestalt bildenden Prozessen wichtige Rollen. Bei Wirbeltieren sind häufig die Namen etwas anders, so heißt wingless hier *wnt*, und hedgehog ist zu *sonic hedgehog* geworden. Homologe Proteine waren zum Teil aus anderen Zusammenhängen bereits bekannt, wie das Krebsgen *int*, das wingless ähnlich ist. Auch etliche Proteine, die als Wachstumsfaktoren oder deren Rezeptoren bei Wirbeltieren gefunden wurden, haben sich als homolog zu Produkten von Entwicklungsgenen bei *Drosophila* herausgestellt.

Drei Beispiele:

Decapentaplegic. Dpp ist die Abkürzung für *Decapentaplegic*, übersetzt bedeutet dies: «15 Missgeschicke». Der Name illustriert den Phänotyp, der je nach Stärke der Mutation vielerlei Strukturen der Larve und Fliege betreffen kann. Das Dpp-Gen kodiert ein Protein, das zu einer sehr wichtigen und weit verbreiteten Klasse von Wachstumsfaktoren gehört, die aus der Zellbiologie und Krebsforschung bereits bekannt waren: TGF β s – *Transforming Growth Factor* β – und BMP – *Bone Morphogenetic Protein*. Im *Drosophila*-Embryo entsteht das Dpp-Protein auf der Dorsalseite und breitet sich nach ventral außerhalb der Zellen aus (siehe Abb. 29). Weiter ventral wird Dpp durch das short-gastrulation-Protein gehemmt, wodurch ein Dpp-Protein-Gradient mit dorsalem Maximum entsteht, der das

Muster auf der Rückenseite der Larve bestimmt. Nach der Einstülpung der Mesodermanlagen signalisiert das Dpp-Protein auch nach innen und bewirkt in den der dorsalen Epidermis benachbarten Mesodermzellen die Entwicklung des Herzens. Auch später, in den Imaginalscheiben, ist Dpp ein wichtiges Morphogen. Die verschiedenen Wirkungsweisen von Dpp als Morphogen und Induktor sind in Abbildung 32 illustriert.

Delta-Notch. In diesem System signalisiert eine Zelle zu ihren Nachbarzellen. Die Ausbreitung erfolgt diesmal nicht durch Diffusion, sondern das Signalmolekül Delta ist wie der Rezeptor Notch in der Zellmembran verankert. Die zwei Zellen fassen sich sozusagen an.



34 **Delta-Notch.** In diesem Fall sind sowohl Rezeptor als auch Ligand in der Membran verankert. Eine Aktivierung des Rezeptors Notch führt zur Hemmung des Liganden Delta. Ausgehend von einer Gleichverteilung von Notch und Delta in den Membranen benachbarter Zellen (unten nur Delta dargestellt), kommt es nach geringem Anfangsvorteil zu einer Selbstverstärkung, bis schließlich benachbarte Zellen entweder Notch oder Delta haben. So entstehen «Salz und Pfeffer»-Muster, bei denen einzelne Zellen in einer Zellschicht ausgedrückt werden, also zum Beispiel die Neuroblasten oder Sinneszellen.

Beide Zellen haben Delta und Notch an ihrer Oberfläche. Die Aktivierung von Notch bewirkt, dass in dieser Zelle weniger Delta entsteht. Dadurch wird auch weniger zurücksignalisiert und deshalb in der Nachbarzelle mehr Delta gebildet. Dieser Rückkopplungsmechanismus bewirkt, dass bei anfänglicher Fast-Gleichverteilung sich Delta in der einen Zelle aufbaut, während es in der Nachbarzelle unterdrückt wird (Abb. 34). Bei der Bildung des Nervensystems entstehen in einem anfänglich homogenen Zellverband in einem ganz bestimmten Muster einzelne Sinneszellen oder Neuroblasten. Diese bilden viel Delta, und die mit viel Notch werden Epidermiszellen.

Hedgehog und wingless. Während der Aufteilung der Längsachse im Segment wird eine Reihe von vorübergehenden, instabilen Vorstufen produziert, bis schließlich das erste segmentale Muster auftritt. Die Paarregel-Gene aktivieren den Transkriptionsfaktor engrailed in 14 Streifen, die nur je eine Zelle breit sind. Inzwischen sind Zellmembranen gebildet worden, so dass von nun an der Kontakt zwischen Zellen durch Signalübertragung erfolgen muss. Dabei sind eine Reihe von Genen beteiligt, die als Segmentpolaritätsgene mit sehr ähnlichem Phänotyp entdeckt worden waren: hedgehog, wingless und Ci. Die Proteine von hedgehog und wingless werden aus der Zelle ausgeschieden. Die Synthese des hedgehog-Proteins wird von engrailed aktiviert, es diffundiert und wird von den Zellen der angrenzenden Reihe aufgenommen. Diese produzieren daraufhin den Transkriptionsfaktor Ci, der wiederum die Synthese von wingless-Protein anregt. Wingless wirkt zurück auf die engrailed-Produktion. Diese Wechselwirkungen bilden eine positive Rückkopplung, die die Synthese von Ci bzw. engrailed in den beiden benachbarten Zellreihen gewährleistet. Dieses Muster ist stabil und bleibt bis zur Bildung der adulten Fliege erhalten (Abb. 35).

Wie erwähnt, entstehen die Beine und Flügel der Fliege aus Zellgruppen, die früh in der Entwicklung innerhalb der segmentalen Anlagen abgesondert werden und die Imaginalscheiben bilden.

