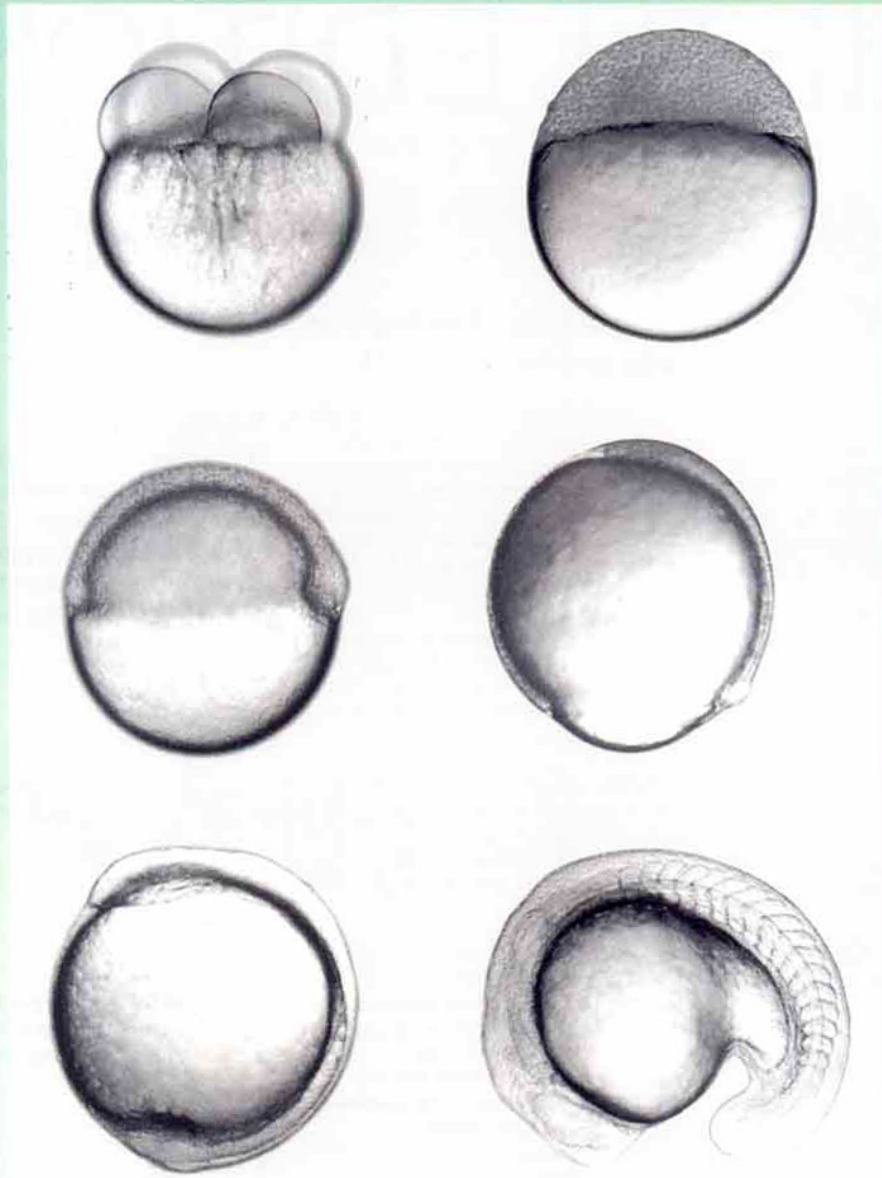


Entwicklungsstadien des Zebrafischs
bis zum Alter von 19 Stunden –



Die Identifizierung von Genen, die die Entwicklung bei Fliegen und Fischen steuern (Nobel-Vortrag)**

Christiane Nüsslein-Volhard*

Im Lebenszyklus von Tieren kommt es zu einem Wechsel zwischen komplexen und einfachen Formen. Ein Tier entwickelt sich aus einer einfach strukturierten Eizelle, die keine Ähnlichkeit mit der hochorganisierten Gestalt der Larve oder der Adultform zeigt. Der Prozeß der Embryonalentwicklung, bei dem wohlgeordnete Zunahme an Komplexität mit perfekter Reproduzierbarkeit einhergeht, wird nur von einem kleinen Teil aller Gene gesteuert. Tiere haben eine sehr große Zahl von Genen, die genaue Zahl kennt man jedoch bei keinem multizellulären Organismus. Ebensowenig ist bekannt, wie viele und welche Gene für die Entwicklung von Komplexität, Form und Gestalt während der Embryogenese erforderlich sind. Ein Hauptanliegen der biologischen Forschung ist es, diese Gene zu identifizieren und ihre Funktionen zu verstehen.

Gene können durch Mutationen entdeckt werden, durch Änderungen also, die ihre Funktion beeinträchtigen. Verglichen mit anderen experimentellen Ansätzen ist die Analyse von Mutationen ganz besonders leistungsfähig, wenn die Rolle einzelner Komponenten in der Entwicklung zu untersuchen ist: Nur eine Komponente, das Genprodukt, entfällt oder wird verändert, während der übrige Organismus intakt bleibt. Aus dem Phänotyp der Mutante kann auf die Funktion des Gens geschlossen werden, da man anhand der Mutante studieren kann, wie sich das Tier ohne das primäre Genprodukt entwickelt. Der mutante Phänotyp ist damit sehr wichtig für das Verständnis der Funktion eines Gens. Gene mit ähnlichem Phänotyp haben oft ähnliche Funktionen zu erfüllen, und ihre Produkte nehmen meist an dem gleichen Entwicklungsprozeß teil.

Mutationen treten selten spontan auf, ihre Häufigkeit kann jedoch durch den Einsatz von Röntgenstrahlen oder Chemikalien, die die DNA-Sequenz verändern, gesteigert werden. Diese Eigenschaft wurde zuerst genutzt, um systematisch nach Mutationen zu suchen, die einige Prozesse bei Bakterien und Pilzen beeinflussen^[1-3]. Mutationen, die sich auf Entwicklungsprozesse bei *Drosophila melanogaster* auswirken, wurden zunächst mehr oder weniger zufällig gefunden, erstmalig 1922, als Bridges die Mutante *bithorax* entdeckte^[4]. Zudem war eine kleine Zahl

embryonaler Mutanten, z. B. *notch*, von Poulson und Mitarbeitern detailliert beschrieben worden^[5]. In den siebziger Jahren wurde begonnen, systematischer nach Mutanten zu suchen. Brenner identifizierte beim Fadenwurm *C. elegans* Mutationen, die das stereotype Entwicklungsmuster der postembryonalen Entwicklung verändern^[6]. Lewis am California Institute of Technology fand Mutationen, die homöotische Transformationen im adulten und im Larvenstadium von *Drosophila* hervorrufen^[7]. 1979 hatten Eric Wieschaus und ich am European Molecular Biology Laboratory (EMBL) in Heidelberg Methoden entwickelt, um im großen Maßstab nach embryonal letalen Mutationen bei *Drosophila* zu suchen. Dabei konzentrierten wir uns vor allem auf das segmentierte Muster der larvalen Epidermis^[8]. In diesen und späteren Mutagenese-Experimenten wurden eine Reihe von Genen entdeckt, die schon in einem frühen Stadium der Embryonalentwicklung eine Funktion haben und für die Bildung einer morphologisch normalen Larve notwendig sind^[9-11]. Ähnliche Experimente in anderen Labors führten zur Identifizierung von Genen, die maternal exprimiert werden und deren Produkte schon im noch unbefruchteten Ei vorhanden sind und die Expression zygotischer Gene kontrollieren^[12-16]. Die anschließende Analyse der Phänotypen, die molekulare Klonierung vieler dieser Gene und die Untersuchung der Wechselwirkungen ihrer Produkte führten zu einem inzwischen relativ vollständigen Gesamtbild der Mechanismen, die die anteroposteriore und die dorsoventrale Achse des frühen Embryos bestimmen^[17-19]. Diese Mechanismen sind ein nützliches Paradigma für die Entwicklung komplexer Formen aus einer einfachen Eizelle.

Drosophila ist eine Fliege und hat als solche ganz besondere Eigenschaften. Sie ist nicht mehr oder weniger „speziell“ als ein Wurm oder ein Frosch, aber in vielerlei Hinsicht sehr verschieden von diesen Lebewesen. So war es nicht von vornherein klar, in welchem Maß die bei *Drosophila* gewonnenen Erkenntnisse verallgemeinert werden könnten und welche dieser Erkenntnisse uns beim Verständnis der Entwicklung anderer Tiere, insbesondere der von Wirbeltieren, weiterhelfen würden. Unser Wissen über die Wirbeltier-Embryogenese basierte hauptsächlich auf Experimenten mit Fröschen^[20] und Hühnern und nur zu einem kleinen Teil auf genetischen Ansätzen. Wegen ihrer geringen Größe und des erforderlichen osmotischen Innendrucks, unter dem sich *Drosophila*-Embryonen entwickeln, sind Gewebetransplantationen, wie sie bei Frosch- und Hühnerembryonen durchgeführt wurden, bei *Drosophila* fast unmög-

[*] Prof. C. Nüsslein-Volhard
Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie, Abteilung Genetik
Spemannstraße 35, D-72076 Tübingen
Telefax: Int. + 7071/601-384
E-mail: devbio3@fserv1.mpib-tuebingen.mpg.de

[**] © The Nobel Foundation 1996. – Wir danken der Nobel-Stiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Druck einer deutschen Fassung des Vortrags.

lich. Eine systematische Suche nach Mutanten, die für die Analyse komplexer Prozesse sehr wünschenswert ist, ist dagegen bei den meisten Wirbeltieren sehr problematisch. Deshalb waren Beschreibung und Verständnis der Entwicklung von Tieren bei diesen beiden Stämmen – Arthropoden wie *Drosophila* sowie Wirbeltieren wie Frosch, Huhn, Maus und Mensch – auf so unterschiedlichem Niveau, daß lange Zeit ein Vergleich zwischen ihnen fast sinnlos schien. Die Entwicklung der Methode mit rekombinanter DNA und damit das Klonieren von Genen im großen Stil ermöglichte dann aber den Vergleich von Genen aus unterschiedlichen Organismen auf der Grundlage von DNA- oder Proteinsequenzen. Zwei wichtige Erkenntnisse resultierten aus diesen Untersuchungen:

1. Die biochemische Funktion der *Drosophila*-Genprodukte konnte in vielen Fällen abgeleitet werden, indem man ihre Aminosäuresequenzen mit denen verwandter und gut charakterisierter Proteine aus anderen Organismen, wie Säugetieren, Bakterien oder Hefen verglich. Dabei wurde klar, daß viele der Komponenten, die die Entwicklung kontrollieren, zu gut bekannten Proteinklassen, wie Transkriptionsfaktoren, Protein-kinasen, sekretierten Signalmolekülen oder Rezeptoren, gehören.

2. In vielen Fällen war die Ähnlichkeit zwischen den Proteinen von *Drosophila* und denen von Wirbeltieren nicht nur auf ihre biochemischen Eigenschaften beschränkt, sondern erwies sich als eine echte Funktionshomologie innerhalb der Entwicklung. Diese Homologie zeigt sich sowohl in ähnlichen Expressionsmustern als auch in den Phänotypen, die man nach Ausschalten der Genfunktion durch homologe Rekombination bei Mäusen erhielt. Diese Untersuchungen führten zu dem überraschenden Schluß, daß die grundlegenden Merkmale der Körperorganisation, z. B. die Spezifizierung entlang der anteroposterioren Achse und die Polarität der Gastrulation, in Organismen unterschiedlicher Tierstämme offensichtlich konserviert sind^[21, 22]. Diese Konservierung deutet auf die Existenz eines gemeinsamen Grundbauplans hin, der von gemeinsamen Vorfahren, den in der Evolution ersten bilateralsymmetrisch aufgebaut Organismen, stammt.

Die Untersuchung von Genen, die wegen ihrer Homologie zu *Drosophila*-Genen entdeckt wurden, ist mittlerweile einer der erfolgreichsten Ansätze, um die Kontrolle der Vertebratenentwicklung auf genetischem Niveau zu verstehen. Obwohl die elegante Methode der homologen Rekombination bei Mäusen die Einführung von Mutationen in die chromosomale Kopie jedes zuvor klonierten Gens ermöglicht^[23], kann man nicht vorhersa-

gen, welche Gene in der Entwicklung unverzichtbar sind und einen informativen Phänotyp bei „Knock-out“-Mäusen ergeben. Ein wichtiger Grund für den Erfolg der Homologie-Untersuchung ist, daß die relevanten Gene von *Drosophila* nur eine kleine Auswahl der Gene eines Tieres sind, die durch Mutagenese-Experimente selektiert und als wichtig und unverzichtbar für die Entwicklung erkannt wurden. Ihre Homologen bei Wirbeltieren haben, wie bei Mäusen gezeigt, ebenfalls häufig nicht-redundante Funktionen^[24].

Verfahren, die auf der Homologie zwischen Invertebraten und Vertebraten beruhen, konzentrieren sich auf konservierte Eigenschaften, wobei gegen Merkmale, in denen sich diese Tiere unterscheiden, selektioniert wird. Wirbeltiere haben während der Evolution spezifische Strukturen und neue Mechanismen erworben. Um Gene zu identifizieren, die für solche Funktionen benötigt werden, ist es notwendig, Mutagenese-Experimente direkt an einem Vertebratenorganismus vorzunehmen. In vielen Labors wurden deshalb Methoden erarbeitet, um mit dem Zebrafisch als Modellorganismus die genetische Kontrolle der Embryonalentwicklung bei einem Wirbeltier zu analysieren^[25–28].

In diesem Vortrag möchte ich die *Drosophila*-Mutagenesen und ihre wichtigsten Ergebnisse, aber auch ihre Grenzen diskutieren. Ich möchte diese mit den Ergebnissen einer groß angelegten, von uns kürzlich durchgeführten Suche nach Mutationen, die die Entwicklung des Zebrafisches beeinflussen, vergleichen.

Die Suche nach Mutanten bei *Drosophila*

Drosophila hat als Modellorganismus für genetische Studien der Entwicklung eine lange Tradition und ist eines der am besten erforschten Tiere^[30]. Außerdem hat sich *Drosophila* für das Studium der Embryonalentwicklung als sehr gut geeignet erwiesen. Einige Eigenschaften von *Drosophila* sind in Tabelle 1 aufgelistet. Die kleine Zahl an Chromosomen ermöglichte die Entwicklung vieler genetischer Hilfsmittel, z. B. von Balancer-Chromosomen mit vielfältigen Inversionen, die die Rekombination verhindern, von sichtbaren Markern, die die Suche nach vorhandener oder nichtvorhandener mutanter Nachkommenschaft erlauben, und von konditional letalen oder sterilen Mutationen, die Selektionssysteme möglich machen. Diese Hilfsmittel waren in der systematischen Suche nach Mutationen, die zur Letalität oder Sterilität führen, unschätzbar (Abb. 1). In Verbindung mit unserem Wissen über Riesenchromosomen, die ein physikalisches Maß für die Zahl von Genen



Christiane Nüsslein-Volhard begann ihre akademische Laufbahn mit dem Studium der Biochemie. Nach Untersuchungen zur Transkription bei Bakterien wandte sie sich Mitte der siebziger Jahre an der Universität Basel der Taufeliege *Drosophila* zu. 1978 arbeiteten sie und Eric Wieschaus als Gruppenleiter am European Molecular Biology Laboratory in Heidelberg, wo sie Gene untersuchten, die die embryonale Musterbildung betreffen. Seit zehn Jahren ist C. Nüsslein-Volhard Direktorin der Abteilung für Genetik am Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie in Tübingen. Sie hat zahlreiche wissenschaftliche Auszeichnungen erhalten und teilte sich im letzten Jahr den Nobel-Preis für Physiologie und Medizin mit Eric Wieschaus und dem *Drosophila*-Genetiker Edward B. Lewis.

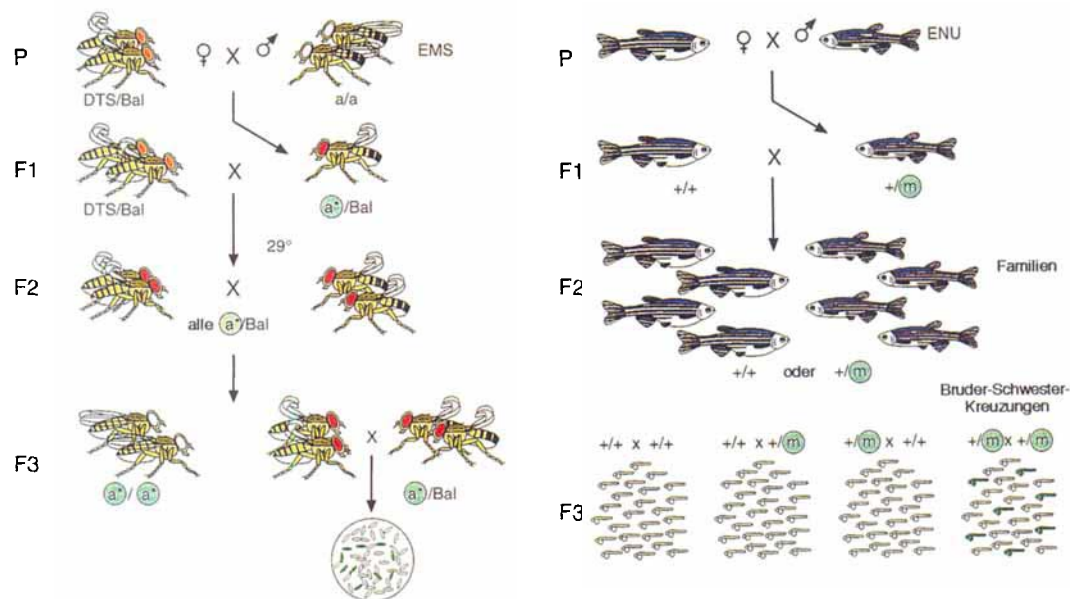


Abb. 1. Die Kreuzungsschemata zur Isolierung von Mutanten mit einem sichtbaren embryonalen Phänotyp bei *Drosophila melanogaster* (links) und *Danio rerio* (rechts). EMS: Ethylmethylsulfonat-Behandlung von Spermien, ENU: Ethylnitrososulfonat-Behandlung von Spermatogonien, DTS: dominant temperatursensitiv, Bal: Balancer-Chromosomen. Bei *Drosophila* sind Augenfarbe und Flügelgröße nützliche Marker, um heterozygote Tiere von nichtheterozygoten zu unterscheiden. Diese treten unweigerlich in den Kreuzungen auf, die man für Inzucht benötigt. Die Marker sind außerdem nützlich, um festzustellen, ob eine letale Mutation induziert worden ist (Fehlen von weißäugigen Nachkommen in der F3-Generation). Methoden zur Markierung und für die Selektion, wie Balancer-Chromosomen, rezessive Mutationen und dominant temperatursensitive Mutanten, gibt es für jedes der Hauptchromosomen; allerdings ist es nicht einfach, Mutagenesen für das gesamte Genom auf einmal durchzuführen, weil eine Kombination von vielen Markern die Lebensfähigkeit stark herabsetzt. *Drosophila*-Larven schlüpfen mechanisch, ein Prozeß, der gegenüber Störungen sehr empfindlich ist. Das Schlüpfen wird von einem großen Teil der letalen Mutationen verhindert, obwohl die meisten von ihnen keine sichtbaren Auswirkungen auf das embryonale Muster haben. Mutante Embryonen, die nicht schlüpfen, können von ihren Wildtyp-Geschwistern anhand dieses Kriteriums unterschieden werden. Beim Zebrafisch ist die Entwicklung solcher Markierungsmethoden wegen der großen Zahl der Chromosomen nicht praktikabel. Statt dessen wird immer das gesamte Genom auf einmal untersucht, und in jeder Generation müssen heterozygote Tiere dadurch identifiziert werden, daß sie mutante Nachkommen mit einem sichtbaren Phänotyp hervorbringen. Mutationen, die ohne erkennbaren mutanten Phänotyp zur Letalität führen, können nicht leicht identifiziert werden. In der F3-Generation entstehen nur durch ein Viertel der Kreuzungen mutante Embryonen (25% aller Embryonen einer solchen Kreuzung), weil nur die Hälfte der F2-Fische eine bestimmte Mutation aufweist. Es gibt keine Möglichkeit, heterozygote von nichtheterozygoten Tieren zu unterscheiden.

Tabelle 1. Eigenschaften von *Drosophila melanogaster* und *Danio rerio* für genetische und embryonale Untersuchungen.

	<i>Drosophila</i>	<i>Danio</i>
Größe	4 mm	40 mm
Platzbedarf	1000 pro Liter	10 pro Liter
Generationszeit	14 Tage	3 Monate
Lebenserwartung	6 Wochen	1–2 Jahre
Eigröße	0,15 × 0,5 mm	0,8 mm
Dauer der Embryonalentwicklung	24 h	48 h
Fruchtbarkeit	50 Eier pro Tag und Weibchen	200 Eier pro Woche und Weibchen
Chromosomenzahl	4	25
Vorteile für genetische Untersuchungen	polytäre Chromosomen Marker-Mutanten Balancer-Chromosomen konditional letale Mutanten	In-vitro-Befruchtung haploide Entwicklung homozygote Fische Einfrieren von Spermien
Vorteile für embryonale Untersuchungen	mechanisches Schlüpfen Cuticula-Präparate externe Segmentierung	externe Befruchtung synchrone Entwicklung durchsichtige Embryonen

sind, kann man bei *Drosophila* relativ genau die Zahl der Gene bestimmen, die für Überleben und Fruchtbarkeit benötigt werden. Mutationen in ungefähr 5000 Genen sind für den Organismus letal. Die für die Fruchtbarkeit notwendige Zahl an Genen ist nicht so genau bestimmt, ist aber wahrscheinlich nicht größer als 1000. Die Gesamtzahl aller Gene, definiert als Transkriptionseinheiten, ist dagegen viel größer und liegt bei ungefähr 20 000. Das bedeutet, daß bei *Drosophila* die meisten Gene keine

unverzichtbaren Funktionen haben. Ungefähr ein Drittel aller letalen Mutationen führt dazu, daß Embryonen nicht schlüpfen können (embryonale Letalität), doch nur ungefähr 10% aller embryonal letalen Mutationen führen zu einem leicht sichtbaren und spezifischen morphologischen Phänotyp der nicht geschlüpften, aber schon ausdifferenzierten Larven.

Die *Drosophila*-Larve weist eine klar erkennbare Organisation der Achsen mit vielen deutlichen Zeichen von Zellposition und Polarität auf, die durch die externe Cuticulahülle der larvalen Epidermis geliefert werden (Abb. 2). Die Epidermis der Larve nimmt einen großen Teil des embryonalen Anlagenplans ein, während das übrige Blastoderm vor allem zu inneren Organen wird, die im lebenden Embryo weniger deutlich sichtbar sind. Während für die larvale Epidermis eine sehr gute und einfache Fixierungsmethode zur Verfügung steht, gab es zum Zeitpunkt der Mutagenese-Experimente keine effiziente Methode, um die durch den opaken Dotter verdeckten inneren Organe sichtbar zu machen. Dieses Problem ist inzwischen überwunden, da eine große Zahl molekularer Sonden und Antikörper entwickelt worden ist, die dazu genutzt wurden, Mutanten zu suchen, wenn auch in jedem dieser Mutagenese-Experimente nur nach einem relativ beschränkten Spektrum von Phänotypen gesucht werden konnte. Die Eigenschaften von *Drosophila* und ihre Vorzüge für die genetische Analyse der embryonalen Musterentwicklung sind in Abbildung 1 zusammengefaßt.

Durch die Mutagenesen, die in Heidelberg durchgeführt wurden^[9–11], identifizierten wir Mutanten, die durch einige, signifi-

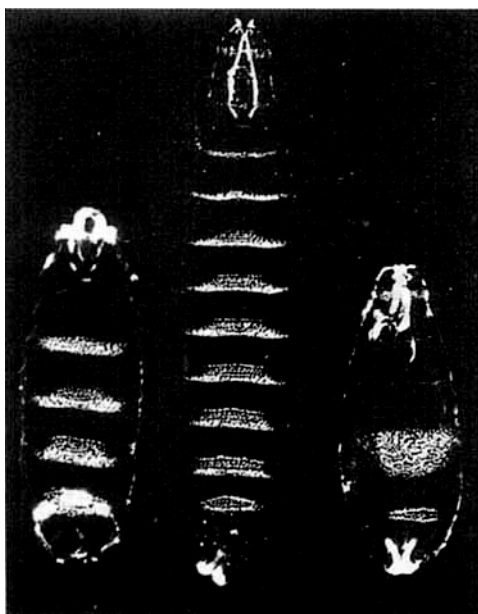


Abb. 2. Das Cuticulamuster einiger Segmentierungsmutanten. Die Abbildung zeigt die Ventralansichten einer Wildtyp-Larve (Mitte) sowie einer mutanten *paired*- (links) und einer *knirps*-Larve (rechts). *paired* ist ein Pair-rule-Gen, und mutante Embryonen haben nur ungefähr die Hälfte der normalen Segmentzahl, wobei jedes zweite Segment fehlt. *knirps* gehört zur Klasse der Gap-Segmentierungsgene. Die meisten der Abdominalsegmente, die bei einer normalen Larve durch die auffälligen Zähnchenbänder gekennzeichnet sind, fehlen in mutanten Embryonen. (Anterior ist im Bild oben.)

kante Abweichungen vom normalen Muster der Cuticula erkennbar waren. Diese Mutanten definierten in ergänzenden Tests ungefähr 130 Gene, die statistisch auf den drei Hauptchromosomen verteilt waren. Unter Verwendung ähnlicher Kriterien wurden in mehreren Labors maternale Mutanten gefunden, die etwa 30 Gene definieren^[12–16]. Ohne molekulare Marker konnten zu diesem Zeitpunkt die meisten mutanten Phänotypen nur schwer analysiert und interpretiert werden. Wir nutzten deshalb pragmatische Kriterien für das Screening und die Charakterisierung der embryonalen Mutanten. Anhand der Ähnlichkeit mancher Phänotypen konnten mehrere Gruppen von Genen erkannt werden, die wahrscheinlich die gleichen oder verwandte Entwicklungsprozesse beeinflussen. Spätere phänotypische und genetische Analysen, gefolgt von der molekularen Klonierung der Gene, bestätigten in vielen Fällen diese Annahme. Die durch das Screening der Mutanten identifizierten Gengruppen sind in Tabelle 2 gezeigt.

Während unserer Mutagenese-Experimente legten wir großen Wert auf Vollständigkeit, d. h. wir versuchten, das Genom mit Mutanten zu sättigen, die wir gemäß unserer Kriterien auffinden konnten. Hinweise, wie die Allelhäufigkeit und der Vergleich mit Phänotypen von Deletionsmutanten, bestätigten unsere Vermutung, daß die Mehrzahl der Gene, deren Mutation zu einem in der larvalen Cuticula sichtbaren Phänotyp führt, in unseren Mutagenese-Experimenten auch gefunden worden war. Die Suche nach maternalen Mutanten war aufwendiger und schwieriger als die nach embryonal letalen Mutanten, da eine zusätzliche Generation durch Inzucht hergestellt werden mußte. Daher ist es wahrscheinlich, daß der Grad der Saturierung für maternale Gene nicht so hoch war wie der für zygotisch exprimierte Gene. Obwohl durch die Mutagenese-Experimente

Tabelle 2. Die Genklassen bei *Drosophila*.

Klasse	Unterklasse	Gene	kloniert	Vertebraten-Homologe
maternal	anterior	4	4	0
	posterior	8	6	2
	terminal	6	3	1
	dorsoventral	12	12	3
zygotisch	Gap	9	7	1
	Pair-rule	8	8	4
	Segmentpolarität	13	8	6
	homöotisch	11	9	7
	Kopfmorphologie	10	4	0
	dorsalisiert	4	4	3
	ventralisiert	6	5	2
	dorsale Läsionen	8	6	3
	andere	8	2	0
	neuralisiert	6	6	2
	Mittellinie	5	5	1
	Epithelien	4	2	2
	Zelcyclus	6	4	0
	Dentikel und Haare	4	1	0
	Pigmentierung	5	3	1
	Tracheen	2	0	0
	hyperaktiv	4	1	0

viele wichtige Gene identifiziert worden waren und obwohl die Untersuchung weiterer Linien die Zahl der entdeckten Gene nicht signifikant erhöht hätte, waren wir uns doch bewußt, daß unser Ansatz eine Reihe nicht unerheblicher, intrinsischer Beschränkungen aufwies.

Genetische Redundanz

Zur damaligen Zeit hielten die meisten *Drosophila*-Genetiker Gene, deren Mutation nicht zur Letalität oder Sterilität führen, für nicht erforschenswert. Man nahm an, daß die Mehrzahl aller Gene für Überleben und Fruchtbarkeit notwendig wären. Redundanz und duplizierte Gene wurden erst später zu einem Diskussionsthema, weil sie die physikalische Isolierung eines Gens durch Klonieren voraussetzten, während in der „Vorklonier-Epoche“ ein Gen nur dann auffindbar war, wenn die Mutation einen Phänotyp hervorbringt. Dennoch berücksichtigten wir Redundanz als Möglichkeit. In der Klasse der Segmentierungsgene wurden in einigen Fällen zufällig Genduplikationen während molekularer Analysen entdeckt. Da Methoden der reversen Genetik nicht generell bei *Drosophila* anwendbar sind, kann der Anteil redundanter Gene nur schwer festgestellt werden. Es ist völlig unklar, warum manche Gene dupliziert werden und andere nicht.

Maternaler und zygotischer Anteil von Genen

Eine weitere Einschränkung, die wir für wesentlicher hielten, war, daß Gene, deren Produkte sowohl maternal als auch zygotisch erforderlich sind, bei Mutagenesen schwierig zu entdecken sein würden. Ist das Genprodukt maternal vorhanden, wäre es möglich, daß der zygotische Phänotyp nicht den vollständigen Funktionsmangel aufweist. Dieses Problem gab es besonders bei den maternalen Mutanten: In Fällen zusätzlicher Funktionen im Embryo könnten Mutationen in Genen mit wichtigen

maternalen Funktionen zygotisch letal und deshalb in maternalen Mutagenese-Experimenten nicht auffindbar sein. Dies bestätigte sich in manchen Fällen. Auch heute noch lassen sich Gene, die sowohl maternal als auch zygotisch erforderlich sind, nicht leicht genetisch identifizieren.

Achsenbestimmung bei *Drosophila*

Ein großer Teil der Gene, die sowohl bei den maternalen als auch bei den zygotischen Mutagenesen identifiziert wurden, beeinflussen entweder die anteroposteriore oder die dorsoventrale Achse. Das Muster der Larve besteht aus einer Reihe von Segmenten, die sich von der anterioren nach der posterioren Seite allmählich ändern. An beiden Enden gibt es nichtsegmentierte, terminale Strukturen. Das larvale Muster weist auch deutliche Unterschiede entlang der dorsoventralen Achse auf, auch wenn sich die ventralsten (Mesoderm) und dorsalsten Strukturen (Amnioserosa) des embryonalen Anlagenplans nicht im epidermalen Muster wiederfinden.

Die anteroposteriore Achse

Wir definierten drei Klassen zygotischer Segmentierungsgene, die wir Gap-, Pair-rule- und Segmentpolaritätsgene nannten^[8]. Bei Gap-Gen-Mutanten fehlen jeweils große Bereiche des Embryos. In Pair-rule-Mutanten sind homologe Regionen in jedem zweiten Segment der Larve betroffen (Abb. 2), während bei Mutanten der Segmentpolaritätsklasse Defekte in jedem Segment der Larve auftreten. Diese Phänotypen zeigten, daß der Prozeß der Segmentierung in mindestens drei Stufen abläuft: Zuerst werden durch Prozesse, die während der Oogenese beginnen, große Bereiche definiert, die die Funktion der Gap-Gene benötigen. Die Gap-Gene wiederum kontrollieren ein sich wiederholendes Muster periodisch aufeinanderfolgender Doppelsegmente. Anschließend, als Folge der Aktivität der Pair-rule-Gene, werden die einzelnen Segmente als definierte Einheiten innerhalb der Entwicklung festgeschrieben^[8].

Die molekulare Analyse der Eigenschaften und Funktionen der Segmentierungsgene wurde in vielen Labors durchgeführt. Bei diesen Untersuchungen erwies sich die von Alan Spradling und Gerald Rubin entwickelte Methode zur Herstellung transgener Fliegen durch P-Element-induzierte Keimbahn-Transformationen als ein sehr vielseitig verwendbarer Ansatz^[31]. Viele der Segmentierungsgene kodieren Transkriptionsfaktoren, die die Expressionsdomänen anderer Segmentierungsgene kontrollieren, und zwar innerhalb derselben oder innerhalb einer der nachgeschalteten (downstream) Genklassen. Das Expressionsmuster vieler Segmentierungsgene ähnelt dem Deletionsmuster, das sich in der Cuticula widerspiegelt^[18]. Während der frühen Embryogenese wird eine Reihe solcher molekularer Vormuster gebildet, die aus den Expressionsdomänen von Transkriptionsfaktoren, Produkten der Segmentierungsgene, zusammengesetzt sind. Die Gap-Gene werden während der frühen Embryogenese in großen definierten Bereichen exprimiert; ihr Expressionsmuster wird von maternalen Transkriptionsfaktoren bestimmt^[18]. Das früheste metamere Muster, das der Pair-rule-Gene, zeigt 7 Streifen, von denen jeder durch die

Wirkung und Wechselwirkung einer Kombination aus Gap-Gen-Produkten festgelegt wird^[32, 33]. Die Pair-rule-Gene kontrollieren das Muster der mehr als 14 Streifen, die der Bildung des morphologischen Musters, d. h. der Segmente, vorausgehen (Abb. 3)^[34].

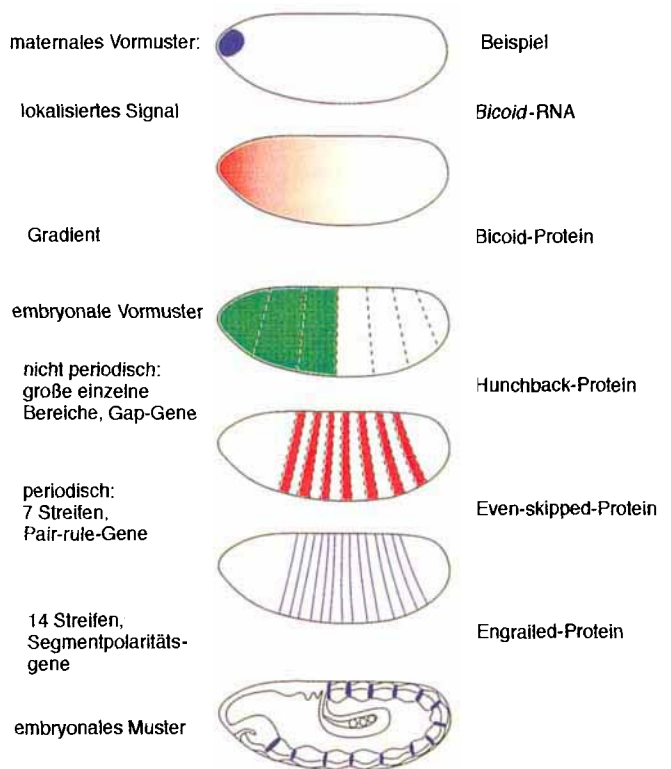


Abb. 3. Die Hierarchie der Gene, die das Muster der anteroposterioren Achse bei *Drosophila melanogaster* bestimmen. In jeder Reihe ist die Verteilung des Proteinprodukts eines Repräsentanten der jeweiligen Genklassen farbig dargestellt. Anterior ist in allen Bildern links, die Ventralseite unten.

Identifizierung und Analyse der maternalen Gene, die das Segmentierungsmuster bestimmen, ergaben, daß die anteroposteriore Achse von drei Gengruppen kontrolliert wird. Jede dieser Gruppen legt, unabhängig von den beiden anderen, nur einen Teil des Musters fest: entweder die segmentierten, anterioren oder posterioren Teile oder die nichtsegmentierten, terminalen Bereiche des Embryos^[35–37]. Obwohl die molekularen Mechanismen, durch die diese drei Gengruppen ihre Funktion ausüben, sich zum Teil stark unterscheiden, haben sie auch einige Gemeinsamkeiten: Ein Beispiel hierfür ist die Entstehung lokaler Signale, die sowohl am anterioren als auch am posterioren Pol des Eis lokalisiert sind. Außerdem führt in jeder Gruppe eine Reihe molekularer Wechselwirkungen zur Bildung eines Transkriptionsfaktor-Gradienten, der die höchste Konzentration an der Stelle des lokalisierten Signals aufweist und einen beträchtlichen Teil der Eilänge einnimmt (Abb. 2)^[38]. Diese Transkriptionsfaktor-Gradienten legen die Expression der Gap-Gene in einer konzentrationsabhängigen Weise fest und führen dadurch zu einer ersten Untergliederung des Embryos.

Die Dorsoventral-Achse

Zwei Klassen zygotischer Gene wurden identifiziert, bei denen Mutationen zu einem dorsalisierten oder ventralisierten Phänotyp führen^[39]. Bei *Drosophila* entsteht das Mesoderm während der Gastrulation im ventralen Bereich des Eis. Die Mesodermbildung hängt von der Expression zweier zygotischer Transkriptionsfaktoren ab. Anders als bei der Reihe von Vormustern von Transkriptionsfaktoren, die man entlang der anteroposterioren Achse beobachtet, findet die Feinunterteilung auf der dorsalen Seite des dorsoventralen Musters durch einen weitreichenden Signalübertragungsprozeß statt^[40]. Die maternale Kontrolle des dorsoventralen Musters wird von nur einer Gruppe von Genen ausgeübt, die die Bildung eines Gradienten der Kernlokalisierung eines Transkriptionsfaktors bewirken. Dieser Transkriptionsfaktor, der sowohl als Repressor von dorsal exprimierten Genen als auch als Aktivator von ventral exprimierten Genen fungiert, ist am stärksten in ventralen Kernen angereichert^[17, 19]. Dieses erste zygotische Expressionsmuster unterteilt den Embryo in mindestens drei Domänen entlang der dorsoventralen Achse.

Die molekularen Mechanismen der Musterbildung

Trotz der bereits angesprochenen Einschränkungen bei der Suche nach Mutanten scheint die Sammlung identifizierter Gene in einer phänotypischen Klasse und damit in einer Entwicklungskaskade vollständig zu sein. In einigen Fällen wurden die molekularen Wechselwirkungen der Komponenten in einer Signalkaskade oder zwischen unterschiedlichen Signalwegen detailliert aufgeklärt. Diese Beispiele haben gezeigt, wie komplexe Muster als Folge einer kleinen Zahl unabhängig voneinander lokalisierter Signale entstehen können. Ein prinzipieller Mechanismus, durch den das Maß an räumlicher Komplexität erhöht werden kann, basiert auf Konzentrationsgradienten von Morphogenen, Substanzen, die je nach Konzentration unterschiedliche Antworten hervorrufen können. Ein solcher Mechanismus wurde entdeckt, als die maternale Kontrolle des Expressionsmusters des Gap-Gens *hunchback* durch das Protein Bicoid untersucht wurde^[41–43]. Bicoid ist der Transkriptionsfaktor, der die anteriore Musterbildung bestimmt. Im Ei ist Bicoid als Konzentrationsgradient verteilt, mit maximalen Mengen am anterioren Pol des Eis. Das Bicoid-Protein kontrolliert dort die Transkription unterschiedlicher Zielgene in konzentrationsabhängiger Weise. Solche Morphogengradienten können durch Diffusion eines Proteins entstehen, wobei das Protein von einer lokalisierten mRNA-Quelle translatiert wird. Beispiele hierfür sind die anterioren und posterioren maternalen Gradienten (Abb. 2)^[35, 37]. In anderen Fällen entstehen Gradienten offensichtlich durch Diffusion von Molekülen im extrazellulären Bereich^[44]. Durch einen Signaltransduktionsmechanismus, der auf einer Liganden-Rezeptor-Wechselwirkung beruht^[45], wird die räumliche Verteilung des Gradienten an das Innere der Eizelle weitergegeben. Im Fall der dorsoventralen Achse führt dies dazu, daß ein Gradient des ursprünglich gleichmäßig verteilten Transkriptionsfaktors Dorsal in Zellkernen aufgebaut wird^[46, 47]. Während der Segmentierungsphase entwickelt sich eine ganze Reihe von Vormustern mit zunehmender räumlicher

Komplexität. Diese Muster entstehen durch konzentrationsabhängige Aktivierung oder Inaktivierung der Transkription, wobei oft Kombinationen aus Transkriptionsfaktoren eine Rolle spielen^[18]. Die Festlegung des endgültigen molekularen Vormusters hängt von lokal begrenzten Signalprozessen zwischen benachbarten Zellen ab^[34, 48]. Dieses Vormuster ist die direkte Vorstufe zu den ersten morphologisch sichtbaren Veränderungen, die während der Segmentdifferenzierung stattfinden.

Problematik der *Drosophila*-Mutagenesen

Zum jetzigen Zeitpunkt gehören die Mechanismen, durch die die Achsen bei *Drosophila* festgelegt werden, zu den am besten verstandenen Beispielen für Musterbildung. Wegen einiger Besonderheiten der Frühentwicklung im *Drosophila*-Embryo existieren allerdings nicht immer enge Parallelen zu anderen Tierstämmen. Diese Einschränkung gilt besonders für Prozesse, die die Diffusion in einem synzytialen Embryo erfordern, wie die Bildung des Bicoid-Gradienten. Doch könnten bei *Drosophila* Analogien zu Musterbildungsprozessen in vielzelligen Geweben bestehen: Mögliche Beispiele hierfür sind die Bildung von Gradienten durch Diffusion in den Zellzwischenräumen, Prozesse der Signalübertragung und die Bildung eines Kernlokalisierungs-Gradienten, wie im Fall von Dorsal. Die genetische Analyse der Musterbildung bei *Drosophila* hat uns Informationen über den Ablauf der Musterbildung in einem komplexen System geliefert. Sie hat auch zur Aufdeckung einiger grundlegender Mechanismen geführt, die eine Zunahme an Komplexität während der Entwicklung multizellulärer Organismen ermöglichen. Doch sind viele Aspekte der Entwicklung bei Tieren, besonders die Bildung von Organen und deren Funktionen, bei *Drosophila* nicht sehr genau untersucht worden. Der Grund hierfür ist, daß wir bei unseren Mutagenesen das epidermale Cuticulamuster beim Auswerten mutanter Phänotypen nutzten. Zwar war uns diese Einschränkung bewußt, doch war sie auch von Vorteil, weil sie durch strenge Kriterien die Zahl der Gene begrenzte, mit denen wir uns auseinandersetzen mußten. Viele Mutationen konnten aber durch das Auswerten des Cuticulamusters allein nicht gefunden werden. So ist bis heute bei *Drosophila* kein systematisches Screening nach Mutanten mit Defekten der inneren Organe durchgeführt worden. Jedoch wurde eine Reihe von Genen, die Funktionen bei der Bildung der inneren Organe haben, in speziellen Mutagenesen mit spezifischen molekularen Sonden identifiziert^[49] oder auch durch andere Methoden, wie die sehr wichtigen „Enhancer-trap“-Ansätze^[50, 51]. Tabelle 2 zeigt eine grobe Klassifizierung der *Drosophila*-Gene, die im Laufe der in Heidelberg durchgeführten Mutagenesen gefunden wurden. Bis heute wurden mehr als 60 % dieser Gene kloniert.

Viele *Drosophila*-Gene haben Vertebraten-Homologe. Die Homologie beschränkt sich nicht auf die Aminosäuresequenz und auf die biochemische Funktion der Proteine, sondern umfaßt auch die biologische Rolle, die die Proteine während der Entwicklung spielen. Diese bemerkenswerte Konservierung war völlig überraschend und war weder vorhergesagt noch erwartet worden. Einen der ersten Hinweise lieferte die Entdeckung der *hox*-Gen-Komplexe bei Wirbeltieren und die Konservierung der Colinearität ihrer Expressionsdomänen mit ihrer Lage auf den

Chromosomen^[22, 52]. Schon bald wurden die Vertebraten-Homologe anderer Homöobox-Gene identifiziert, und inzwischen scheint es wahrscheinlich, daß ein großer Teil der *Drosophila*-Gene, die wir während unserer Mutagenesen gefunden haben, Homologe bei Wirbeltieren haben. Der genaue Anteil läßt sich bisher nur schwer abschätzen, weil nicht in allen Fällen nach Homologen gesucht wurde, doch könnte es von Bedeutung sein, daß bis jetzt von maternalen Genen nur sehr wenige Vertebraten-Homologe gefunden wurden (Tabelle 2). Dies könnte die großen Unterschiede widerspiegeln, die man während der Frühentwicklung von Vertebraten und Invertebraten beobachtet.

Viele der Vertebraten-Homologe von *Drosophila*-Genen spielen eine wichtige Rolle bei der Musterbildung der Maus. Wichtige Signalwege scheinen konserviert zu sein, wie der Signaltransduktionsweg der TGF- β -ähnlichen Wachstumsfaktoren und der der Homologen der Gene *hedgehog* und *wingless*^[21, 53, 54]. Die meisten der Komponenten solcher Signalwege wurden identifiziert, weil sie einen im segmentierten Muster der *Drosophila*-Larve sichtbaren Phänotyp haben. Bei der Bildung des Wirbeltierkörpers wirken diese Gene aber nicht immer im gleichen Zusammenhang. So nehmen Gene, die bei der Segmentierung von *Drosophila* eine Rolle spielen, sowohl bei *Drosophila* als auch bei Vertebraten an der Musterbildung des Gehirns und der Extremitäten teil. Obwohl die Gesamtheit der *Drosophila*-Gene, die eine Rolle bei der Musterbildung spielen, eine wichtige Quelle für die Untersuchung einiger Aspekte der Vertebratenentwicklung ist, handelt es sich um eine ausgewählte Gruppe, die wahrscheinlich nur einen kleinen Teil der Gene enthält, die die Musterbildung im Wirbeltierembryo kontrollieren. Will man eine möglichst vollständige Sammlung dieser Gene erhalten, muß man direkt bei einem Wirbeltier Mutagenesen durchführen und nach Mutationen suchen.

Mutagenesen beim Zebrafisch

Der Zebrafisch *Danio rerio* wurde vom inzwischen verstorbenen George Streisinger als potentieller Modellorganismus für genetische Untersuchungen gewählt^[28]. In den letzten zwanzig Jahren wurde eine ganze Reihe nützlicher Methoden entwickelt, einerseits um die Haltung und genetische Analyse des Zebrafisches zu ermöglichen, andererseits um seine Embryonalentwicklung zu untersuchen^[25–27]. Es ist interessant, Fliegen und Fische in ihren Eigenschaften für genetische und embryonale Untersuchungen zu vergleichen. Die lange Generationszeit und der Platzbedarf zur Aufzucht von Zebrafischen machen es schwierig, groß angelegte Mutagenese-Experimente durchzuführen. Außerdem ist das Halten von Fischen wegen technischer und logistischer Probleme beim Betreiben einer großen Zahl von Aquarien teurer und arbeitsintensiver als das von Fliegen. Doch haben Zebrafische gegenüber Mäusen, den für genetische Untersuchungen traditionell verwendeten Wirbeltierorganismen, den Vorteil der extrauterinen Entwicklung und der hohen Nachkommenzahl. Bei Fischen sind außerdem In-vitro-Befruchtungen, die Entwicklung haploider Embryonen bis zum Larvalstadium, Diploidisierung und auch das Einfrieren von Spermaproben möglich (Tabelle 1). Diese Techniken, die es für die Fliege nicht gibt, sind unschätzbar bei der Haltung

und der Untersuchung einer großen Zahl an Mutanten. Der größte Vorteil des Zebrafisches liegt aber in der Art seiner Embryonalentwicklung. Zebrafischeier werden synchron befruchtet, durchlaufen eine sehr schnelle Entwicklung außerhalb des Mutterleibs und sind, was am wichtigsten ist, zu Beginn ihrer Entwicklung vollkommen durchsichtig. Dieser Umstand ermöglicht die direkte Beobachtung vieler sich entwickelnder Gewebe und Organe im lebenden Embryo und während späterer Entwicklungsphasen, ohne daß der Embryo fixiert, geklärt oder gefärbt werden müßte (Abb. 4)^[55].

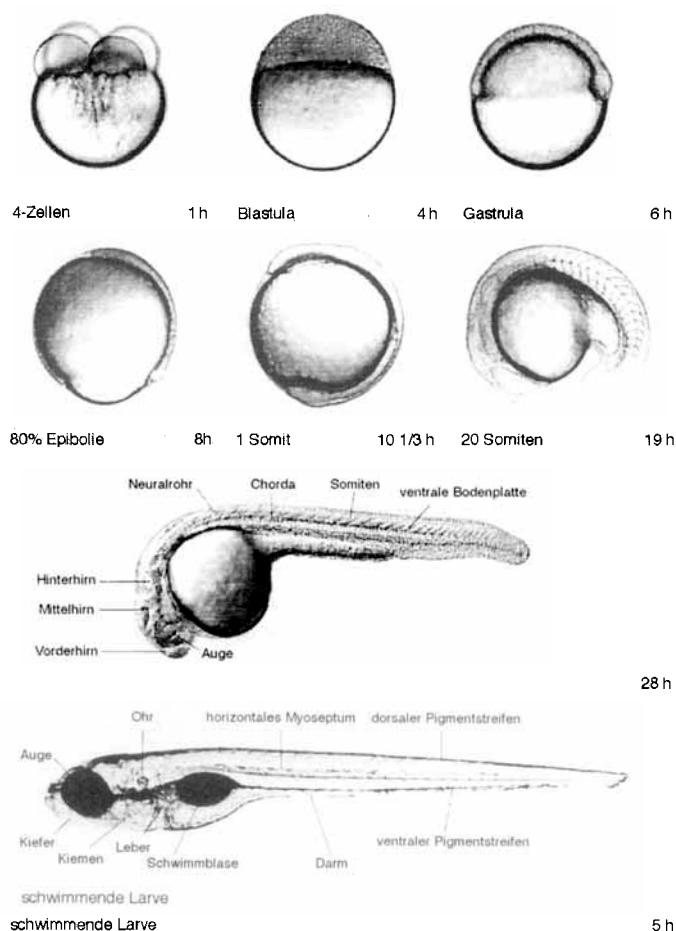


Abb. 4. Die Embryonalentwicklung des Zebrafisches. Gezeigt sind Fotos lebender Embryonen unterschiedlicher Entwicklungsstadien. Bei allen Embryonen, mit Ausnahme der schwimmfähigen Larve, wurde das Chorion entfernt, das die Embryonen umgibt. Bei den frühen Embryonen ist die dorsale Seite im Bild rechts. Bei der Pharyngula und der schwimmfähigen Larve sind dorsal oben und anterior links. Charakteristische Strukturen, die während der Mutantensuche analysiert wurden, sind bezeichnet. Die Stadien wurden gemäß Lit. [55] eingeteilt.

Die frühe Embryonalentwicklung des Zebrafisches ist ganz anders als die der Fliege. Beim Zebrafisch führt eine Phase schneller, synchroner Teilungen zur Bildung einer dreidimensionalen Zellmasse, die sich wesentlich vom zweidimensionalen Blastoderm des *Drosophila*-Embryos unterscheidet. Beim Fisch kommt es während der Gastrulation zu mehreren morphogenetischen Bewegungen, z. B. der Involution mesodermaler Regionen und der dorsalen Konvergenz^[55]. Diese Bewegungen könnten, so unterschiedlich sie auf den ersten Blick auch sind, mit der Invagination mesodermaler und endoderma-

ler Anlagen sowie der ventralen Kondensation und dem Ausstrecken des Keimstreifens im *Drosophila*-Embryo in Beziehung stehen. Die Gastrulationsbewegungen führen letztlich zur Bildung eines mehrschichtigen Fischembryos, der Pharyngula, der der typischen Organisation des Wirbeltierkörpers entspricht und deshalb auch phylotypisches Stadium genannt wird (Abb. 4).

Untersuchungen des Anlagenplans von *Drosophila*-Embryonen in frühen Gastrula-Stadien haben zur Erstellung zweidimensionaler Pläne geführt, die nichtüberlappende und klar abgegrenzte Anlageregionen zeigen. Beim Fisch ist das Zellschicksal innerhalb definierter, räumlicher Bereiche der Gastrula viel weniger genau vorhersagbar. Die Fischgastrula besteht aus mehreren Zellschichten: Große Bereiche, aus denen sich unterschiedliche Gewebe oder Organe entwickeln, sind nicht klar voneinander getrennt und liegen zum Teil übereinander. Dieser Unterschied könnte bedeuten, daß verschiedene Mechanismen das Schicksal von Zellen im Fisch- und Fliegenembryo während der Entwicklung bestimmen. Ein Vergleich der Anlagenpläne von Fliege und Fisch zeigt außerdem gravierende Unterschiede in den relativen Größen der Bereiche, die von den Anlagen der einzelnen Organe in Anspruch genommen werden: So ist die Anlage der Hirnstrukturen in der Fischgastrula sehr groß, während die Epidermisanlage, die im Anlagenplan der Fliegenembryonen dominiert, beim Fisch relativ klein ist. Bis zu einem gewissen Grad spiegeln die Anlagengrößen die Bedeutung und die Sichtbarkeit der Strukturen wider, nach denen man sich bei der Suche nach Mutanten richten kann.

Abbildung 1 zeigt das Kreuzungsschema zur Herstellung von Mutanten, die einen sichtbaren Phänotyp im Embryo oder der frühen Fischlarve zeigen. Bei Fischen wurde bei Ethylnitrososulfon (ENU)-Behandlung von Spermatogonien eine Mutagenese-Frequenz erreicht, die der von Fliegenspermien nach (Ethylmethylsulfonat (EMS)-Behandlung ähnelt (etwa eine Mutation pro Gen in 1000 Genomen)^[26]. Im Unterschied zu den Fliegenmutagenesen können bei Fischen keine Marker genutzt werden, um in der F₂-Generation Träger- von Nicht-Trägerfischen zu unterscheiden. Um eine Mutation zu finden, die in Männchen der vorherigen Generationen induziert wurde, müssen daher eine ganze Reihe von Kreuzungen angesetzt werden, von denen dann im Schnitt nur 25 % solche Nachkommen hervorbringen, die homozygot für die Mutation sind. Da Fische mit Hilfe eines Enzyms schlüpfen, schlüpfen auch die meisten homozygot mutanten Embryonen und können deshalb, von wenigen Ausnahmen abgesehen, nicht als „Nicht-Schlüpfer“ erkannt werden; dagegen ermöglichte diese Methode bei *Drosophila*-Mutagenesen, mutante Embryonen zu identifizieren. Mutante Fischembryonen kann man nur an ihrem Phänotyp erkennen. Dieser Mangel an Markern und Kriterien zur Vorselektion wird teilweise dadurch ausgeglichen, daß das gesamte Genom auf einmal nach Mutanten abgesucht werden kann und nicht jedes Chromosom einzeln analysiert werden muß. Bei *Drosophila* wurden drei unabhängige Screens in 20 000 Inzucht-Familien durchgeführt, wobei ungefähr 600 Mutationen in 130 Genen erhalten wurden^[9–11]. Beim Fisch wurden 3100 Familien und 4.2 Kreuzungen pro Familie untersucht, was der Analyse von 3800 Genomen entspricht (Abb. 1)^[29]. Da das Halten einer so großen Zahl von Fischfamilien notwendig war, um einen zufriedenstellenden Saturierungsgrad für jeden beliebigen

Phänotyp zu erhalten, wurde das Screening bei Fischen von zwölf Wissenschaftlern in einer gemeinschaftlichen Arbeit durchgeführt. Wir nutzten alle phänotypischen Merkmale, die wir effektiv und sicher erkennen konnten. Es wurden insgesamt 1200 Mutanten isoliert, von denen bis jetzt ungefähr 900 sowohl phänotypisch als auch genetisch charakterisiert worden sind. Sie definieren 350 Gene, von denen 150 mehr als ein Allel haben^[29].

Die einzelnen Eigenschaften der Fischembryonen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung untersucht, da die Strukturen und Organe jeweils erst von einem bestimmten Alter an sichtbar werden (Abb. 4). Am zweiten Tag der Entwicklung wurden die Somiten, die Chorda und das Gehirn untersucht, Herz, Blut, Muskulatur, Flossen, Augen, Ohren und weitere Merkmale erst nach dem Schlüpfen. Die Fischlarven haben im Alter von fast einer Woche (als sie zuletzt untersucht wurden) einen vollständigen Satz innerer Organe, wie Leber, Darm, Pankreas und Niere, können sehen und auf Reize reagieren und haben drei Arten von Pigmentzellen. Sie weisen ein Pigmentierungsmuster auf, das immer noch für das Larvenstadium charakteristisch ist, und der Aufbau der Flossen entspricht noch nicht ganz dem bei erwachsenen Fischen (Abb. 4). Es gibt Strukturen beim Fisch, die sicher und leicht erkannt werden können, während andere weniger offensichtlich sind; demzufolge wurden Defekte in ihnen vielleicht nicht immer von uns entdeckt. Bei Fischen ermöglicht der hohe Grad an Komplexität, der bei weitem größer ist als der des Musters der larvalen Fliegencuticula, die Untersuchung eines viel breiteren Spektrums an Organen und Geweben, aber er stellt auch beträchtliche Anforderungen an das Geschick und die Fähigkeiten des Experimentators. Das Erkennen eines Phänotyps wird wesentlich erleichtert, wenn eine unmittelbare Interpretation des Phänotyps möglich ist oder eine ähnliche Mutante mit ähnlichem Phänotyp bereits früher isoliert wurde. Viele Mutanten haben relativ unspezifische Defekte und wurden nicht für weitere Analysen aufbewahrt^[29]. Mutanten mit komplexen oder nur sehr schwach ausgeprägten Phänotypen, die relativ unspezifischen Defekten ähneln, wurden sicherlich nicht immer als interessant erachtet oder richtig interpretiert. Das bedeutet auch, daß sich der Grad der Saturierung innerhalb unterschiedlicher Phänotypklassen unterscheidet (Tabelle 3). Im Mittel ist er bei Fischen mit Sicherheit geringer als der, der bei Fliegenmutagenesen erreicht wurde.

Anhand ihrer markantesten phänotypischen Merkmale wurden Gene mit verwandtem Phänotyp in Gruppen zusammengefaßt. Die Klassifizierung jeder Mutante hängt von der auf ihrem Phänotyp basierenden Interpretation ab und diese davon, wie gut der Phänotyp analysiert werden kann. Beim Fisch gibt es eine Reihe molekularer Sonden, die zu bestimmten Entwicklungszeiten als Marker für einige Regionen dienen können. Die Expressionsmuster solcher stadienspezifischer Marker war bei der Charakterisierung vieler mutanter Phänotypen sehr nützlich. Die unterschiedlichen Klassen der anhand ihres Phänotyps identifizierten Gene sind in Tabelle 3 gezeigt. Einige wenige dieser Klassen zeigen Parallelen zu Gruppen von Fliegenegenen, während der Großteil der Phänotypen neu ist. Die Gesamtheit der Fischgenklassen ist so verschieden von der der Fliegenegenen, daß ein Vergleich nur in wenigen Fällen sinnvoll ist. Betrachtet man aber die bekanntesten Klassen der Fliegenegenen, die der

Tabelle 3. Die Genklassen beim Zebrafisch.

Klasse	Unterklasse	Gene	Allele	Allele/Gen
frühe Phänotypen	Epibolie, Arretierung der Entwicklung	11	16	1.5
	ventralisiert	2	4	2
	dorsalisiert	5	16	3
	andere	13	19	1.5
Mesoderm	Chorda	15	67	4.5
	Somiten	8	26	3.2
ZNS	Gehirn	19	37	1.9
	Mittellinie	10	19	1.9
Organe	Blut	9	23	2.6
	Herz und Gefäße	22	28	1.4
	Leber und Darm	6	6	1
	Muskeln	18	63	3.5
	Auge	8	11	1.4
	Ohr	19	46	2.3
	Flossen	13	60	4.6
Neuralleiste	Pigmentmuster	10	39	3.9
	Pigmentzellen	61	150	2.5
	Kiefer und Kiemenbögen	17	30	1.8
Bewegung	reduziert	15	50	3.3
	abnormal	15	53	3.5

Gastrulations- und Segmentierungsgene, könnte eine kleine Zahl von Fischgenen für ähnliche Prozesse verantwortlich sein wie bei Fliegen.

Die Gengruppen beim Zebrafisch

Gastrulationsdefekte findet man bei zwei Gengruppen, deren Phänotypen zu einer teilweisen Dorsalisierung oder Ventralisierung des Embryos führen^[56, 57]. Bei mutanten *dino*-Embryonen sind dorsoanteriore Strukturen verkleinert, ventrale und posteriore dagegen vergrößert, so daß Embryonen mit kleinen Köpfen und vergrößerten Schwänzen gebildet werden. Der Defekt ist am ausgeprägtesten bei Strukturen, die sich von der ventralsten Position des Anlagenplans ableiten: beim blutbildenden Gewebe und bei der ventralen Schwanzflosse, die in *dino* vervielfacht sind. Mit molekularen Markern, die noch vor Gastrulationsbeginn polar exprimiert werden, konnte gezeigt werden, daß der Anlagenplan bereits zu einem frühen Zeitpunkt der Embryonalentwicklung verändert ist (Abb. 5A). Wie die charakteristische Verdopplung der ventralen Schwanzflosse in mutanten *mercedes*-Embryos nahelegt, spielt dieses Gen eine Rolle im gleichen Prozeß (Abb. 5K)^[56]. Der Phänotyp von Mutanten, die Gene mit dorsalisiertem Phänotyp enthalten, ist zu dem von *dino* und *mercedes* komplementär. *Swirl*-Embryonen z. B. haben ein stark verbreitertes paraxiales Mesoderm, und die sich bildenden Somiten umgeben den ganzen Embryo (Abb. 5F). Ventrale Strukturen, wie Blut und die ventrale Schwanzflosse, sind verkleinert oder fehlen ganz^[57]. Diese Gengruppen erinnern an jene mit dorsalisierten oder ventralisierten Phänotypen in *Drosophila*. Bei Fröschen und Fischen wurden Gene kloniert, die zu den *Drosophila*-Genen der ventralisierten und dorsalisierten Gruppen homolog sind und in gegenüberliegenden Regionen der Blastula exprimiert werden^[58–61]. Diese und andere Befunde führten dazu, daß eine alte Theorie wieder aufgegriffen wurde: Diese postuliert, daß die Orientierung der dorsoventra-

len Achse bei Invertebraten, verglichen mit der der Wirbeltiere, invertiert ist^[62–64]. Die Fischgene sind wahrscheinlich Teil dieser konservierten Genkaskaden.

Das Interesse am Mechanismus der Segmentierung bei Wirbeltieren war ein wichtiger Anreiz für die Suche nach Mutanten bei Fischen. Im Unterschied zu Fliegen, deren Ektoderm klar segmentiert ist, ist bei Vertebraten in erster Linie das Mesoderm in einem metameren Muster organisiert. Beim Fisch fanden wir nur wenige Gene, die den Segmentierungsgenen bei Fliegen ähnlich sind. Am ähnlichsten sind Mutanten, bei denen die Somiten fusioniert sind; Somiten sind die im Fischembryo am frühesten erkennbaren repetitiven Strukturen, die sich nach zehn Stunden Embryonalentwicklung zu bilden beginnen. Fünf Gene haben einen Phänotyp mit fusionierten Somiten (Abb. 5B, M, N)^[65]. Das Segmentmuster der Somiten im Fischembryo ist viel weniger komplex als das der *Drosophila*-Larve. Die in postlarvalen Stadien entstehenden Wirbelkörper zeigen in einigen mutanten Fischen charakteristische, spiegelbildliche Verdopplungen (Abb. 5N), auch wenn diese weniger auffällig und regelmäßig sind als die der Phänotypen der Segmentpolaritätsgene, mit denen diese Fischmutanten am ehesten verglichen werden können. Bei unseren Fischmutagenesen konnten wir keine Gene identifizieren, die deutliche Ähnlichkeiten zu den Gap- oder Pair-rule-Genen aufweisen. Auch mit molekularen Ansätzen sind bis jetzt keine Homologen der Gap-Gene gefunden worden, und die Homologen der Pair-rule-Gene scheinen nicht in einer für Pair-rule-Gene typischen Weise exprimiert zu werden^[59]. Der Umstand, daß wir beim Fisch keine Gap- und Pair-rule-ähnlichen Mutationen gefunden haben, könnte bedeuten, daß sich die Bildung der metameren Muster bei *Drosophila* von der der meisten anderen Tiere unterscheidet. Doch könnte dies auch auf Redundanz beruhen.

Andere Mutationen betreffen die Unterteilung der Somiten entlang der dorsoventralen Achse durch das horizontale Myoseptum. Einigen dieser Mutanten fehlt auch die Chorda, die bei anderen normal zu sein scheint. Die Chorda ist eine Vertebraten-spezifische Struktur. Das Gen *no tail*, ein Fischhomologes des *Brachyury*- oder *T*-Gens der Maus, wird in der Chorda exprimiert (Abb. 5C)^[66, 67] (ein *Drosophila*-Homologes wird im Hinterdarm exprimiert^[68]); wir haben Mutationen sowohl in *no tail* als auch in drei anderen Genen identifiziert, die für die Bildung der Chorda notwendig sind (Abb. 5C)^[69, 70]. Die Somitenstruktur bei Fischen hängt wahrscheinlich von Signalen ab, die von der Chorda ausgehen. Gene, die die Unterteilung der Somiten durch das horizontale Myoseptum beeinflussen, könnten an diesen Signalprozessen beteiligt sein (Abb. 5G). Ihre Proteinprodukte sind möglicherweise am Aussenden oder am Empfang dieser Signale beteiligt^[65]. Für diese Gene gibt es offensichtlich keine homologen Prozesse bei *Drosophila*.

Eine große Zahl von Fischgenen beeinflusst Strukturen und Funktionen des zentralen Nervensystems (ZNS) und der Sinnesorgane (Tabelle 3). Diese Genklasse ist bei Fliegen nicht sehr groß. Bei Fischen wurden unterschiedliche Aspekte der ZNS-Entwicklung untersucht. Homologe der neurogenen *Drosophila*-Gene, z. B. *notch* und *delta*, wurden bei Wirbeltieren durch molekulare Methoden identifiziert^[71], und während unserer Mutagenese wurde zumindest ein Gen mit neurogenen Eigenschaften, *white tail*, entdeckt. Bei mutanten Embryonen tritt eine beträchtliche Vervielfältigung primärer Neurone auf Kosten

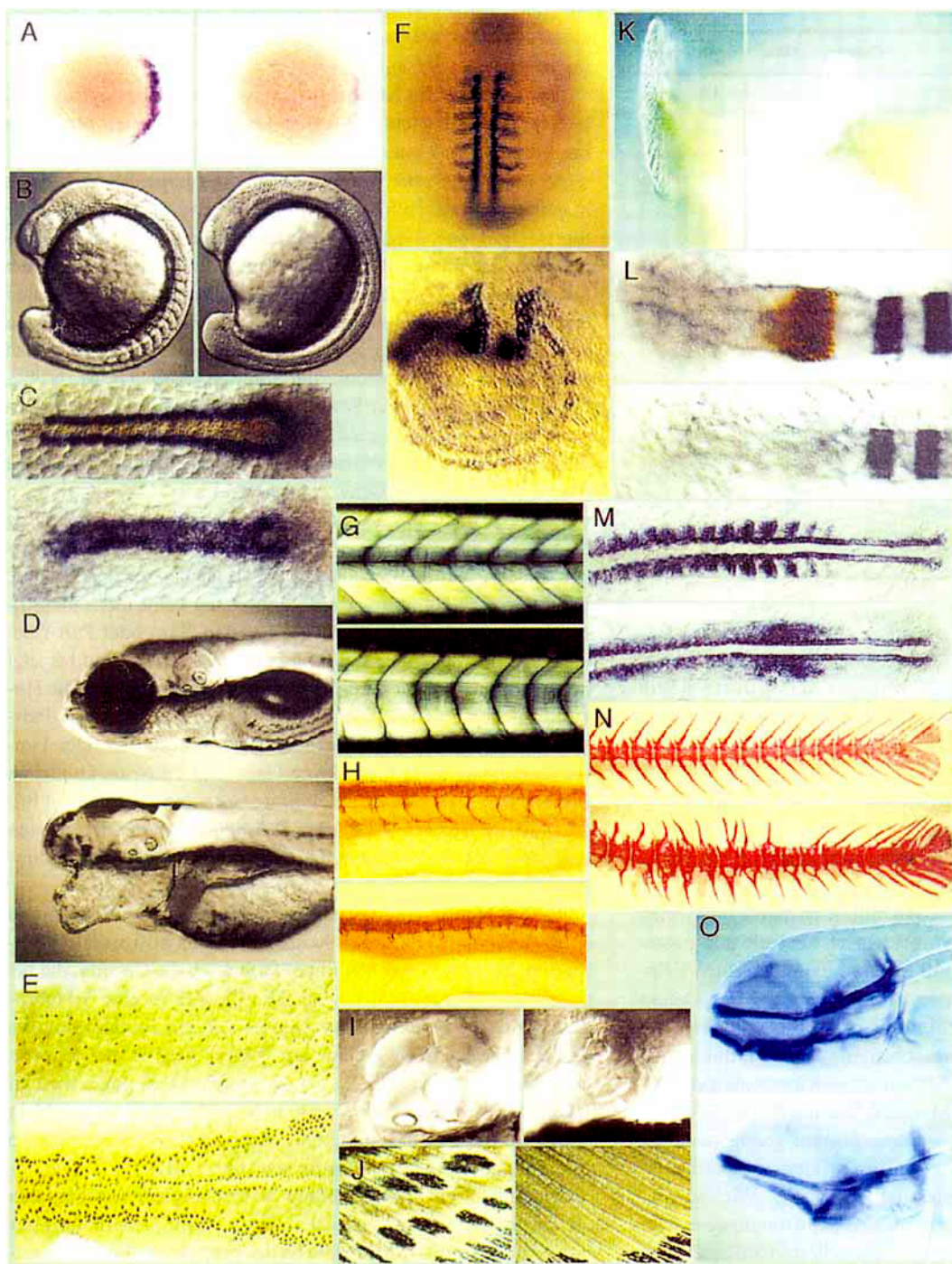


Abb. 5. Zebrafischmutanten. In den Abbildungspaaren sind jeweils ein Wildtyp- und ein mutantes Embryo gezeigt. Die Mutante ist entweder rechts vom oder unter dem Wildtyp abgebildet. Wenn nicht anders vermerkt, ist die anteriore Seite links und die dorsale oben. A) *dino*, *lkd-3*-In-situ-Hybridisierung, Embryonalschildstadium, optischer Schnitt durch den Keimring, dorsal ist rechts im Bild [56]. B) Fusionierte Somiten, Lebendaufnahmen, 12-Somiten-Stadium [65]. C) *floating head*, *myoD*-In-situ-Hybridisierung. Die braune Färbung im Wildtyp verdeutlicht das Chorda mit einem Antikörper gegen Ntl, dorsale Ansicht [69]. D) *masterblind*, Lebendaufnahme einer schwimmfähigen Larve [76]. E) *white tail*, Insekt, 1 Antikörper, 8-Somiten-Stadium, Dorsalansicht [72]. F) *swirl*, *myoD*-In-situ-Hybridisierung, 8-Somiten-Stadium, anterior ist oben [57]. G) *you*, Lebendaufnahme einer schwimmenden Larve [65]. H) *diwanka*, *znp-1*-Antikörper, Pharyngulastadium [78]. I) *van gogh*, Lebendaufnahme einer schwimmenden Larve [79]. J) *leopard*, *obelix*, Flosse eines erwachsenen Fisches [29]. K) *mercedes*, schwimmende Larve, Ansicht der Schwanzflosse [56]. L) *no isthmus*, braun: 4D9(Eng)-Antikörper, blau: Krox 20, 8-Somiten-Stadium, dorsale Ansicht [80]. M, N) Fusionierte Somiten: M) *myoD*-In-situ-Hybridisierung, 14-Somiten-Stadium, Dorsalansicht. N) Skelettfärbung eines erwachsenen Fisches [65]. O) *sucker*, Alcian-Blau-Färbung des Knorpels einer schwimmenden Larve [81].

sekundärer Neurone und einiger Arten von Gliazellen auf (Abb. 5E)^[72]. Eine andere Gruppe von Genen beeinflusst Strukturen in allen drei Keimblättern entlang der Mittellinie des Embryos. In Mutanten sind oft die Augen fusioniert. Außerdem fehlen mutanten Embryonen manche Strukturen, die vom axia-

len Mesoderm und von ventralen Bereichen des ZNS oder des Gehirns stammen. In einigen Mutanten ist das korrekte Auswachsen der Nerven über die Mittellinie hinaus gestört. Der wichtigste und am längsten bekannte Repräsentant dieser Klasse ist das Gen *cyclops*^[73]. Mutante *cyclops*-Embryonen haben

anterior fusionierte Augen, und die Bodenplatte, der ventralste Bereich des ZNS, fehlt. Neu identifizierte Gene dieser Klasse sind z. B. *schmalspur* und *chameleon*^[74]. Es wird interessant sein zu sehen, ob Mutationen, wie *spitz* und andere^[75], die die Strukturen der Mittellinie bei *Drosophila* (ventrale Regionen des Neuroektoderms und des Kopfs) deletieren, den Genen homolog sind, die die Mittellinie bei Fischen beeinflussen.

Die Morphologie des Gehirns ist bei einer Reihe von Mutanten betroffen, von denen nur einige hier erwähnt werden. Das Vorderhirn, einschließlich der Riechplakoden und der Augen, fehlt völlig in der Mutante *masterblind* (Abb. 5D). Die Analyse durch molekulare Marker ergab, daß die Region, die sich normalerweise zum Vorderhirn entwickelt, statt dessen zu stärker posterioren Strukturen wird, ähnlich einer homöotischen Transformation^[76]. Die Mittelhirn-Hinterhirn-Grenze fehlt bei Mutanten der beiden Gene *no isthmus* und *acerebellar*. Das Gen *no isthmus* (Abb. 5L), das auch für die Bildung der Niere notwendig ist, ist einem der *pax*-Gene homolog, die ursprünglich bei Mäusen wegen ihrer Homologie zu dem *Drosophila*-Gen *paired* entdeckt wurden^[77].

Viele der Zebrafisch-Genklassen zeigen keine Parallelen zu denen unserer *Drosophila*-Mutanten und werden an dieser Stelle nur zusammenfassend erwähnt. Von besonderem Interesse angesichts ihrer Bedeutung für die medizinische Forschung sind Mutanten, bei denen innere Organe betroffen sind. Wir identifizierten eine Reihe von Genen, die an der Bildung des Bluts, des Kreislaufs und des Herzens beteiligt sind, die in den ersten beiden Tagen der Fischembryonalentwicklung sehr einfach untersucht werden können. Mutanten, bei denen die sich später entwickelnden Organe, z. B. Leber, Pankreas und Niere, betroffen sind, wurden weniger häufig gefunden. Mutationen anderer Gene führen zu Differenzierungsdefekten oder Degenerationerscheinungen der Muskulatur sowie der Sinnesorgane (Auge und Ohr; Abb. 5I). Eine große Zahl von Genen ist zur Bildung von Strukturen nötig, die von Neuralleistenzellen stammen. Die größte Klasse dieser Gene ist für die Pigmentierung erforderlich, d. h. für die Bildung der Pigmentzellen und des Pigmentmusters. Einige Gene wirken sich auf Teile des Kiefers (Abb. 5O) oder der Kiemenbögen aus, die jeweils nur bei Wirbeltieren vorkommen (Tabelle 3). Wir isolierten auch Mutanten, die spezifische Bewegungsdefekte der Larve aufweisen. Mutante Larven reagieren nicht auf Berührung, bewegen sich wenig oder gar nicht, zeigen ein spastisches oder kreiselndes Bewegungsverhalten und haben Defekte in der reziproken Inhibierung der Muskelkontraktionen über die Körpermittellinie. Bei einigen wenigen Mutanten wurden Defekte beim Auswachsen der Motoneurone beobachtet^[78]. Bei *Drosophila* konnten Bewegungsmutanten nicht durch unsere Mutagenesen identifiziert werden, obwohl bewegungsunfähige larvale Phänotypen prinzipiell anhand einer anomalen Verdrehung der larvalen Cuticula im ungeschlüpften Embryo erkannt werden können. Eher zufällig wurde bei Larven, die ein hyperaktives Verhalten zeigten und sich manchmal in ihrer Eihülle umdrehen, eine kleine Gruppe von vier *Drosophila*-Genen entdeckt (Tabelle 2)^[9–11]. Diese Phänotypen weisen darüber hinaus eine defekte Differenzierung des Kopfskeletts aus, sind aber bis heute nicht genauer untersucht.

Zusammenfassung

Die genetische Untersuchung der embryonalen Achsenfestlegung bei *Drosophila* hat zum wahrscheinlich vollständigsten Verständnis eines Musterbildungsprozesses bis heute geführt. Die Eleganz und Effizienz, mit der bei diesem Organismus Mutationen isoliert und Gene manipuliert werden können, werden weitere wichtige Entdeckungen hinsichtlich einer Reihe grundlegender Prozesse der Zell- und Entwicklungsbiologie ermöglichen. Jedoch sind manche Mechanismen bei der Fliege wahrscheinlich einzigartig für diesen speziellen Organismus. Die Verwendung von Fliegen Genen ist ein sehr wichtiger Ansatz zur Identifizierung homologer Gene bei Vertebraten, der sich auf die Ähnlichkeiten zwischen diesen so offensichtlich unterschiedlichen Organismen stützt. Um die Entwicklung von Wirbeltieren zu verstehen, müssen zusätzlich zu den Genen, die Fliegen und Fischen gemeinsam sind, vor allem die Wirbeltier-spezifischen Gene untersucht werden. Um Unterschiede zu finden und um sie erklären zu können, sind die beim Zebrafisch gefundenen Mutanten ein wichtiger Ausgangspunkt, von dem aus fundamentale biologische und medizinische Probleme mit genetischen Mitteln untersucht werden könnten.

Ich möchte meinen Mitarbeitern für ihr Mitwirken danken: für ihr Geschick, ihr Verständnis, für ihre Gedanken und ihr großes Können, für ihre Geduld, ihren Enthusiasmus und für ihre Unterstützung. Auch möchte ich Siegfried Roth, Stefan Schulte-Merker, Stefan Meyer, Darren Gilmour, Nancy Hopkins, Peter Overath, Michael Granato und Judith Kimble für Kritik und Hilfe bei der Fertigstellung dieses Manuskripts danken.

Eingegangen am 25. April 1996 [A 165]
Übersetzt von Dr. Stefan Schulte-Merker, Tübingen

Stichworte: *Drosophila* • Fruchtfliegen • Gene • Nobel-Vortrag

- [1] D. J. Beadle, E. Tatum, Nobel-Vortrag, 1958.
- [2] L. Hartwell, *J. Cell Biol.* **1978**, 77, 627–637.
- [3] F. Jacob, J. Monod, *J. Mol. Biol.* **1961**, 3, 318–356.
- [4] D. L. Lindsley, E. H. Grell, *Genetic variations of Drosophila melanogaster*, Carnegie Inst. Wash., Publ. 627, Washington, 1968.
- [5] T. R. F. Wright, *Adv. Genet.* **1970**, 15, 262–395.
- [6] S. Brenner, *Genetics* **1974**, 77, 71–94.
- [7] E. B. Lewis, *Nature* **1978**, 276, 565–570.
- [8] C. Nüsslein-Volhard, E. Wieschaus, *Nature* **1980**, 287, 795–801.
- [9] G. Jürgens, E. Wieschaus, C. Nüsslein-Volhard, H. Kluding, *Wilhelm Roux's Arch. Dev. Biol.* **1984**, 193, 283–295.
- [10] C. Nüsslein-Volhard, E. Wieschaus, H. Kluding, *Wilhelm Roux's Arch. Dev. Biol.* **1984**, 193, 267–282.
- [11] E. Wieschaus, C. Nüsslein-Volhard, G. Jürgens, *Wilhelm Roux's Arch. Dev. Biol.* **1984**, 193, 296–307.
- [12] K. V. Anderson, C. Nüsslein-Volhard, *Nature* **1984**, 311, 223–227.
- [13] M. Gans, C. Audit, M. Masson, *Genetics* **1975**, 81, 683–704.
- [14] C. Nüsslein-Volhard, H. G. Frohnhofer, R. Lehmann, *Science* **1987**, 238, 1675–1681.
- [15] C. Nüsslein-Volhard, G. Jürgens, R. Lehman, K. Anderson, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [16] T. Schüpbach, E. Wieschaus, *Genetics* **1989**, 121, 101–117.
- [17] a) R. Chasan, K. V. Anderson in Lit. [17b], S. 387–424; b) *The Development of Drosophila melanogaster*, Vol. 1 (Hrsg.: M. Bate, A. Martinez-Arias), CSH Laboratory Press, New York, 1993.
- [18] M. J. Pankratz, H. Jäckle in Lit. [17b], S. 467–516.
- [19] D. St. Johnston, C. Nüsslein-Volhard, *Cell* **1992**, 68, 201–219.
- [20] H. Spemann, Nobel-Vortrag 1933.
- [21] B. L. M. Hogan, M. Blessing, G. E. Winnier, N. Suzuki, M. C. Jones, *Development (Cambridge, UK) (Suppl.)* **1994**, 53–60.
- [22] J. R. Manak, M. P. Scott, *Development (Cambridge, UK) (Suppl.)* **1994**, 61–77.

- [23] S. L. Mansour, K. R. Thomas, M. R. Capecchi, *Nature* **1988**, 336, 348–352.
- [24] R. Nusse, H. E. Varmus, *Cell* **1992**, 69, 1073–1087.
- [25] C. B. Kimmel, *Trends Genet.* **1989**, 5, 283–288.
- [26] M. C. Mullins, M. Hammerschmidt, P. Haffter, C. Nüsslein-Volhard, *Curr. Biol.* **1994**, 4, 189–202.
- [27] L. Solnica-Krezel, A. F. Schier, W. Driever, *Genetics* **1994**, 136, 1401–1420.
- [28] G. Streisinger, C. Walker, N. Dower, D. Knauber, F. Singer, *Nature* **1981**, 291, 293–296.
- [29] P. Haffter, M. Granato, M. Brand, M. C. Mullins, M. Hammerschmidt, D. A. Kane, J. Odenthal, F. J. M. van Eeden, Y.-J. Jiang, C.-P. Heisenberg, R. N. Kelsh, M. Furutani-Seiki, E. D. Vogelsang, U. Schach, C. Fabian, C. Nüsslein-Volhard, *Development (Cambridge, UK)* **1996**, 123, 1–36.
- [30] T. H. Morgan, Nobel-Vortrag, **1933**.
- [31] A. C. Spradling, G. M. Rubin, *Science* **1982**, 218, 341–347.
- [32] K. Howard, P. Ingham, C. Rushlow, *Genes & Dev.* **1988**, 2, 1037–1046.
- [33] S. Small, R. Kraut, T. Hoey, R. Warrior, M. Levine, *Genes & Dev.* **1991**, 5, 827–839.
- [34] A. Martinez-Arias in Lit. [17b], S. 517–608.
- [35] W. Driever in Lit. [17b], S. 301–324.
- [36] F. Sprenger, C. Nüsslein-Volhard in Lit. [17b], S. 365–386.
- [37] D. St. Johnston in Lit. [17b], S. 325–363.
- [38] C. Nüsslein-Volhard, *Development (Cambridge, UK)* (Suppl.) **1991**, 1–10.
- [39] K. Arora, C. Nüsslein-Volhard, *Development (Cambridge, UK)* **1992**, 114, 1003–1024.
- [40] E. L. Ferguson, K. V. Anderson, *Cell* **1992**, 71, 451–461.
- [41] W. Driever, C. Nüsslein-Volhard, *Cell* **1988a**, 54, 83–93.
- [42] W. Driever, C. Nüsslein-Volhard, *Cell* **1988b**, 54, 95–104.
- [43] G. Struhl, K. Struhl, P. M. Macdonald, *Cell* **1989**, 57, 1259–1273.
- [44] D. Stein, S. Roth, E. Vogelsang, C. Nüsslein-Volhard, *Cell* **1991**, 65, 725–735.
- [45] D. Morisato, K. V. Anderson, *Cell* **1994**, 76, 677–688.
- [46] S. Roth, D. Stein, C. Nüsslein-Volhard, *Cell* **1989**, 59, 1189–1202.
- [47] C. A. Rushlow, K. Han, J. L. Manley, M. Levine, *Cell* **1989**, 59, 1165–1177.
- [48] P. W. Ingham, A. Martinez-Arias, *Cell* **1992**, 68, 221–235.
- [49] D. Van Vactor, H. Sink, D. Fambrough, R. Tsao, C. S. Goodman, *Cell* **1993**, 73, 1137–1153.
- [50] H. J. Bellen, C. J. O'Kane, C. Wilson, U. Grossniklaus, R. K. Pearson, W. J. Gehring, *Genes & Dev.* **1989**, 3, 1288–1300.
- [51] Y. N. Jan, L. Y. Jan, *Trends Neurosci.* **1990**, 13, 493–498.
- [52] S. J. Gaunt, P. T. Sharpe, D. Duboule, *Development (Cambridge, UK)* (Suppl.) **1988**, 169–179.
- [53] S. Krauss, J.-P. Concordet, P. W. Ingham, *Cell* **1993**, 75, 1431–1444.
- [54] R. W. Padgett, R. D. St. Johnston, W. M. Gelbart, *Nature* **1987**, 325, 81–84.
- [55] C. B. Kimmel, W. W. Ballard, S. R. Kimmel, B. Ullmann, T. Schilling, *Dev. Dyn.* **1995**, 203, 253–310.
- [56] M. Hammerschmidt, F. Pelegri, D. A. Kane, M. C. Mullins, G. Beuchle, M. Brand, M. Furutani-Seiki, M. Granato, P. Haffter, C.-P. Heisenberg, Y.-J. Jiang, R. N. Kelsh, J. Odenthal, F. J. M. van Eeden, R. M. Warg, C. Nüsslein-Volhard, *Development (Cambridge, UK)* **1996**, 123, 143–151.
- [57] M. C. Mullins, M. Hammerschmidt, D. A. Kane, J. Odenthal, M. Brand, M. Furutani-Seiki, M. Granato, P. Haffter, C.-P. Heisenberg, Y.-J. Jiang, R. N. Kelsh, F. J. M. van Eeden, C. Nüsslein-Volhard, *Development (Cambridge, UK)* **1996**, 123, 81–93.
- [58] L. Dale, G. Howes, J. C. Smith, *Development (Cambridge, UK)* **1992**, 115, 573–585.
- [59] J. S. Joly, C. Joly, S. Schulte-Merker, H. Boulekbache, H. Condamine, *Development (Cambridge, UK)* **1993**, 119, 1261–1275.
- [60] C. M. Jones, K. M. Lyons, P. M. Lapan, C. V. E. Wright, B. L. M. Hogan, *Development (Cambridge, UK)* **1992**, 115, 639–647.
- [61] Y. Sasai, B. Lu, H. Steinbeisser, D. Geissert, L. K. Gont, E. M. De Robertis, *Cell* **1994**, 79, 779–790.
- [62] D. Arendt, K. Nübler-Jung, *Nature* **1994**, 371, 26.
- [63] E. Geoffroy St.-Hilaire, *Mem. Mus. Hist. Nat.* **1822**, 9, 89–119.
- [64] S. Holley, P. Jackson, Y. Sasai, B. Lu, E. M. De Robertis, F. Hoffmann, E. Ferguson, *Nature* **1995**, 376, 249–253.
- [65] F. J. M. van Eeden, M. Granato, U. Schach, M. Brand, M. Furutani-Seiki, P. Haffter, M. Hammerschmidt, C.-P. Heisenberg, Y.-J. Jiang, D. A. Kane, R. N. Kelsh, M. C. Mullins, J. Odenthal, R. M. Warg, M. L. Allende, E. S. Weinberg, C. Nüsslein-Volhard, *Development (Cambridge, UK)* **1996**, 123, 153–164.
- [66] M. E. Halpern, R. K. Ho, C. Walker, C. B. Kimmel, *Cell* **1993**, 75, 99–111.
- [67] S. Schulte-Merker, F. J. M. van Eeden, M. E. Halpern, C. B. Kimmel, C. Nüsslein-Volhard, *Development (Cambridge, UK)* **1994**, 120, 1009–1015.
- [68] A. Kispert, B. G. Herrmann, M. Leptin, R. Reuter, *Genes & Dev.* **1994**, 8, 2137–2150.
- [69] J. Odenthal, P. Haffter, E. Vogelsang, M. Brand, F. J. M. van Eeden, M. Furutani-Seiki, M. Granato, M. Hammerschmidt, C.-P. Heisenberg, Y.-J. Jiang, D. A. Kane, R. N. Kelsh, M. C. Mullins, R. M. Warg, M. L. Allende, E. S. Weinberg, C. Nüsslein-Volhard, *Development (Cambridge, UK)* **1996**, 123, 103–115.
- [70] W. S. Talbot, B. Trevarrow, M. E. Halpern, A. E. Melby, G. Farr, J. H. Postlethwait, T. Jowett, C. B. Kimmel, D. Kimelman, *Nature* **1995**, 378, 150–157.
- [71] C. Bierkamp, J. A. Campos-Ortega, *Mech. Dev.* **1993**, 43, 87–100.
- [72] Y.-J. Jiang, M. Brand, C.-P. Heisenberg, D. Beuchle, M. Furutani-Seiki, R. N. Kelsh, R. M. Warg, M. Granato, P. Haffter, M. Hammerschmidt, D. A. Kane, M. C. Mullins, J. Odenthal, F. J. M. van Eeden, C. Nüsslein-Volhard, *Development (Cambridge, UK)* **1996**, 123, 205–216.
- [73] K. Hatta, C. B. Kimmel, R. K. Ho, C. Walker, *Nature* **1991**, 350, 339–341.
- [74] M. Brand, C.-P. Heisenberg, R. M. Warg, F. Pelegri, R. O. Karlstrom, D. Beuchle, A. Picker, Y.-J. Jiang, M. Furutani-Seiki, F. J. M. van Eeden, M. Granato, P. Haffter, M. Hammerschmidt, D. A. Kane, R. N. Kelsh, M. C. Mullins, J. Odenthal, C. Nüsslein-Volhard, *Development (Cambridge, UK)* **1996**, 123, 129–142.
- [75] U. Mayer, C. Nüsslein-Volhard, *Genes & Dev.* **1988**, 2, 1496–511.
- [76] C.-P. Heisenberg, M. Brand, Y.-J. Jiang, R. M. Warg, D. Beuchle, F. J. M. van Eeden, M. Furutani-Seiki, M. Granato, P. Haffter, M. Hammerschmidt, D. A. Kane, R. N. Kelsh, M. C. Mullins, J. Odenthal, C. Nüsslein-Volhard, *Development (Cambridge, UK)* **1996**, 123, 191–203.
- [77] U. Deutsch, G. R. Dressler, P. Gruss, *Cell* **1988**, 53, 617–625.
- [78] M. Granato, F. J. M. van Eeden, U. Schach, T. Trowe, M. Brand, M. Furutani-Seiki, P. Haffter, M. Hammerschmidt, C.-P. Heisenberg, Y.-J. Jiang, D. A. Kane, R. N. Kelsh, M. C. Mullins, J. Odenthal, C. Nüsslein-Volhard, *Development (Cambridge, UK)* **1996**, 123, 399–413.
- [79] T. T. Whitfield, M. Granato, F. J. M. van Eeden, U. Schach, M. Brand, M. Furutani-Seiki, P. Haffter, M. Hammerschmidt, C.-P. Heisenberg, Y.-J. Jiang, D. A. Kane, R. N. Kelsh, M. C. Mullins, J. Odenthal, C. Nüsslein-Volhard, *Development (Cambridge, UK)* **1996**, im Druck.
- [80] M. Brand, C.-P. Heisenberg, Y.-J. Jiang, D. Beuchle, M. Furutani-Seiki, M. Granato, P. Haffter, M. Hammerschmidt, D. A. Kane, R. N. Kelsh, M. C. Mullins, J. Odenthal, F. J. M. van Eeden, C. Nüsslein-Volhard, *Development (Cambridge, UK)* **1996**, 123, 179–190.
- [81] T. Piotrowski, T. F. Schilling, M. Brand, Y.-J. Jiang, C.-P. Heisenberg, D. Beuchle, H. Grandel, F. J. M. van Eeden, M. Furutani-Seiki, M. Granato, P. Haffter, M. Hammerschmidt, D. A. Kane, R. N. Kelsh, M. C. Mullins, J. Odenthal, R. M. Warg, C. Nüsslein-Volhard, *Development (Cambridge, UK)* **1996**, 123, 345–356.