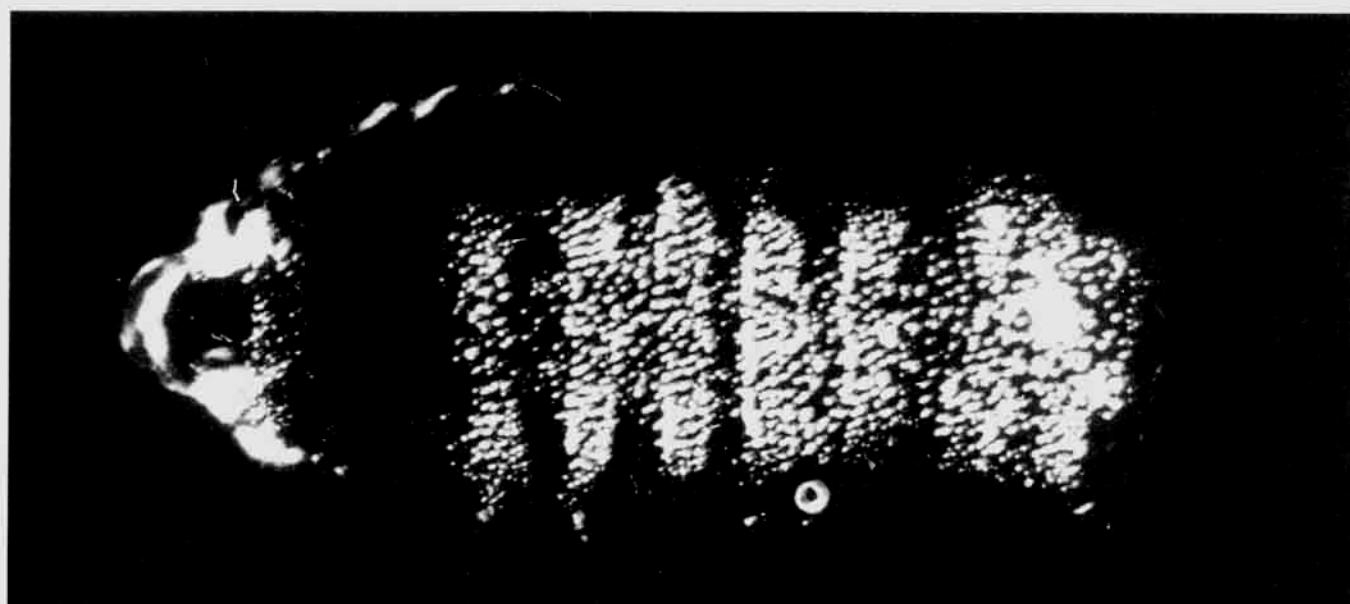


Anhand von Größe und Anordnung der Lücken im Muster von mutierten Embryonen am Ende ihrer Entwicklung können die mutierten Segmentierungsgene in die drei Klassen Gap-, Pair-Rule- und Segmentpolaritätsgene eingeteilt werden. Für jede Klasse ist ein mutiertes Embryo gezeigt.



Von molekularen Mustern zur Morphogenese – die Lehren aus Untersuchungen mit der Fruchtfliege *Drosophila* (Nobel-Vortrag)**

Eric Wieschaus*

Während der Entwicklung sind die Zellen eines Embryos vor zwei Hauptaufgaben gestellt. Erstens müssen sie programmiert werden, spezielle Körperteile zu bilden, und zweitens müssen sie diese Vorgaben umsetzen, indem sie ihre Form, Position und Muster der Genexpression ändern. Beides, die Festlegung der Zelllagen und die damit verbundenen Veränderungen der Zellform, vollzieht sich fortschreitend im Laufe der Entwicklung. Der Organismus, der aus diesem Entwicklungsprozeß resultiert, enthält eine Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen und -funktionen, die in einer komplexen räumlichen Struktur angeordnet sind. In der Fruchtfliege *Drosophila* ist die embryonale Entwicklung bereits 20 Stunden nach der Befruchtung abgeschlossen. Zu diesem Zeitpunkt hat sich bereits eine Larve mit etwa 40 000 Zellen gebildet. Das augenscheinlichste Merkmal einer solchen Larve ist das in Segmenten sich wiederholende Muster von Härchen und Zähnchen, die von der darunterliegenden Epidermis abgesondert werden. Unter diesen hyperdermalen Zellen sind eine Reihe von Muskeln in einem sich ebenfalls segmentweise wiederholenden Muster angeordnet. Im Körper der Larve gibt es weitere mesodermale Gewebe sowie ebenso komplexe Strukturen und Organe endodermalen Ursprungs. Indem nun die Entwicklung der individuellen Zellen genau verfolgt wurde, war es möglich, die Ausgangspunkte der einzelnen Teile der differenzierten Larve bis zu den frühesten zellulären Stadien im Embryo zurückzuverfolgen^{11, 21}. Der *Drosophila*-Embryo ist in diesem Stadium (dem Blastoderm) etwa einen halben Millimeter lang, wobei etwa 100 Zellen entlang der fünfzigen anterior-posterioren Achse und 40 Zellen entlang der dorsal-ventralen Achse angeordnet sind. Die Epidermis wird aus Zellen auf der lateralen Seite des Embryos gebildet, die Muskeln sowie andere mesodermale Auswüchse gehen aus einem Streifen auf der ventralen Seite des Blastoderms und die endodermalen Zellen aus zwei Gruppen von Vorläuferzellen am anterioren und posterioren Ende des Embryos hervor.

Im Blastodermstadium haben alle Zellen die gleiche Größe und Form. Einige Minuten später, zu Beginn der Gastrulation, lösen die mesodermalen Vorläuferzellen eine Veränderung der Zellform aus, wodurch sie in das Innere des Embryos gelan-

gen^[3]. Durch ähnliche Veränderungen in der Zellmorphologie werden dann die endodermalen Zellen internalisiert. Diese morphogenetischen Bewegungen sind die ersten von vielen Beispielen, in denen Zellen eines Embryos ihre Form als Reaktion auf Entwicklungsprogramme verändern, die das Schicksal der jeweiligen Zellen kontrollieren. Die Größe der Zellen sowie die Geschwindigkeit dieser Veränderungen verleihen der Gastrulation einen besonderen visuellen Reiz. Die zellulären Mechanismen der morphogenetischen Bewegungen nutzen viele der in allen Zellen vorhandenen, gleichen Strukturen des Cytoskeletts und der Zelladhäsion. Der Weg von der Entscheidung über die spezielle Zelllage hin zu dem Mechanismus, der die Gestalt der Zelle kontrolliert, wurde allerdings in noch keinem Organismus im Detail untersucht.

In den letzten 15 Jahren wurden beachtliche Fortschritte darüber erzielt, wie veränderte Genaktivität im *Drosophila*-Embryo den Entwicklungsweg der Zellen bestimmt. Diese Fortschritte waren das Ergebnis einer zu dieser Zeit neuartigen Kombination aus Molekularbiologie und klassischer Genetik. Bis heute wurden viele Gene, die die Zelllagen kontrollieren, kloniert und ihre grundlegenden Funktionen bei der Zellentwicklung aufgeklärt. Grundsätzlich bieten diese Erkenntnisse eine ideale Grundlage für die Erforschung wie die Anlage einer Zelle auf ihre Gestalt Einfluß nimmt. Diese Problemstellung hat sich jedoch als sehr schwierig herausgestellt. So wirkt die genetische Methode, die bei der Aufklärung der Zelllagen sehr erfolgreich ist, bei der Untersuchung der Gestalt von Zellen unerwartete Schwierigkeiten auf. Hier möchte ich einen allgemeinen Überblick darüber geben, welches Bild sich aus unserer *Drosophila*-Forschung hinsichtlich der Fragestellungen ergeben hat, wie Gene die Zelllagen im *Drosophila*-Embryo kontrollieren und in welchem Bezug die Aktivität dieser Gene zu der ständig wechselnden Form des Embryos steht.

Das Heidelberger Mutagenese-Experiment

Als Christiane Nüsslein-Volhard und ich unsere Mutagenese-Experimente begannen, beschäftigte uns sowohl die Frage nach den Zelllagen als auch die nach der Zellform. In den 70er Jahren, – zu der Zeit, in der wir unsere Dissertationen in Basel bzw. Tübingen beendeten – war bereits klar, daß die embryonale Entwicklung, wie alle Prozesse in lebenden Zellen, von Genen und Genprodukten abhängt. Es war nicht nur bereits die

[*] Prof. E. Wieschaus

Department of Molecular Biology, Princeton University
Princeton, NJ 08544 (USA)
Telefax: Int. + 609/258-1547

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

Beziehung zwischen DNA, RNA und Protein bekannt, sondern die Analyse einiger bakterieller Operone hatte auch gezeigt, daß die Aktivität von Genen zeitlich und räumlich kontrolliert werden kann. Die vorherrschende Meinung war die, daß eine solche zeitliche und räumliche Kontrolle möglicherweise die Reihenfolge der einzelnen Schritte erklären könnte, die zu embryonalen Mustern führen. Die Analyse solcher Gene erschien allerdings außerordentlich schwierig. Das Klonieren von Genen steckte noch in den Kinderschuhen, und es gab keine einfachen Methoden für die Analyse einzelner Gene in höheren Eukaryonten. Zusätzlich erschwert wurde die Situation durch die enorme Vielfalt von Genen und Genprodukten in einem Embryo. Experimente zur Untersuchung der Komplexität der RNA ließen auf eine Zahl unterschiedlicher RNA-Spezies von 10000 bis 50000 schließen^[4]. Diese RNAs werden im Verlauf der jeweiligen Entwicklungsstadien des Embryos auf unterschiedlichen Niveaus und in sich verändernden Mustern exprimiert. Wie würde man jemals in der Lage sein, die Genprodukte auszusortieren, die für die jeweiligen Entwicklungsschritte entscheidend sind, und die relevanten Gene und Proteine zu identifizieren? Christiane Nüsslein-Volhard und mir schienen die aus der Genetik bekannten Techniken, die im Laufe der letzten 60 Jahre in der *Drosophila*-Forschung etabliert worden waren, hier am besten geeignet.

Die Mutagenese-Strategie, die wir anwendeten, hing von zwei Eigenschaften des *Drosophila*-Genoms ab, die in den frühen 70er Jahren erkannt worden waren. Erstens ließen Mutagenese-Experimente mit kleinen, cytologisch definierten Regionen auf dem Chromosom^[5] vermuten, daß, ungeachtet der molekularen Komplexität des *Drosophila*-Genoms, lediglich etwa 5000 Gene auf der DNA für die Lebensfähigkeit unter Laborbedingungen benötigt werden. Diese Zahl ist somit die Obergrenze der Gene, die für die embryonale Entwicklung wesentlich sind. Zweitens legte eine detaillierte Analyse von Fliegen, die für unterschiedliche Genomregionen monosomisch oder trisomisch sind^[6], die Vermutung nahe, daß, obwohl Fliegen normalerweise diploid sind, eine einzelne Kopie der meisten Gene zur Sicherstellung der Lebensfähigkeit ausreicht. Dies bedeutete, daß die meisten Mutationen, die zum Verlust der Funktion führen, rezessiv sein müßten und daher in heterozygoten Stämmen gehalten werden könnten. Diese beiden Befunde legten nahe, daß die für die embryonale Entwicklung von *Drosophila* benötigten Gene in einem in großem Maßstab durchgeföhrten, aber dennoch begrenzten, Mutagenese-Experiment untersucht werden könnten.

Falls die Transkription eines Genes für die embryonale Entwicklung wesentlich sein sollte, würden sich homozygote Embryonen abnormal entwickeln, sobald dieses Gen ausgeschaltet ist. Spielt das Gen eine spezifische Rolle bei der Musterbildung oder bei der Bestimmung der Zellanlagen, so müßten sich die meisten Komponenten des Embryos normal entwickeln, und Defekte würden lediglich in speziellen Körperregionen oder speziellen Geweben auftreten. Ausgehend von diesen Defekten sollte es möglich sein, die normale Funktion des jeweiligen Gens abzuleiten. Alles was wir somit für eine umfassende Untersuchung des Entwicklungsprozesses benötigten, waren hinreichend viele mutierte Fliegenstämme und die Fertigkeit, die Defekte an den Embryonen zu erkennen.

Da Fliegen normalerweise diploid und die meisten Mutationen rezessiv sind, beinhaltete das von uns angewandte Mutageneschema vor allem die Etablierung von Inzuchtlinien aus einzelnen mutagenisierten Fliegen (Abb. 1). Nach zwei Genera-

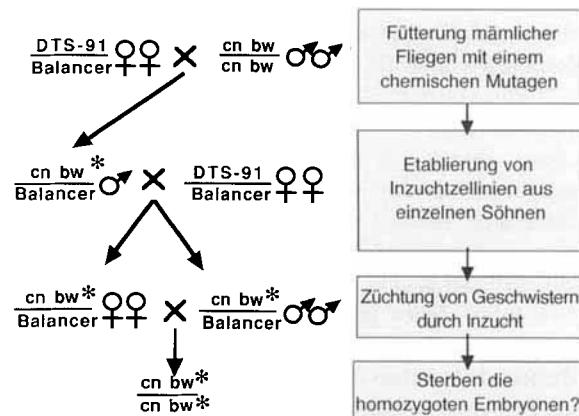
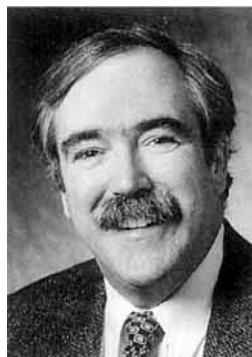


Abb. 1. Mutagenese-Schema, das in Heidelberg zur Identifizierung von den Mutationen auf dem zweiten Chromosom verwendet wurde, die zu einer Letalität in homozygoten Embryonen führen. Ähnliche Kreuzungsschemata wurden auf das dritte und das X-Chromosom angewendet.

tionen ergeben sich durch Inzucht homozygote Fliegen, deren Entwicklung mit der ihrer heterozygoten Geschwister verglichen werden kann. Um Mutanten von möglichst allen Genen des Genoms zu erhalten, mußten wir ausreichend viele mutagenisierte Stämme etablieren, so daß mit hoher Wahrscheinlichkeit die meisten Gene mehrere Male betroffen werden. Zwar hatten wir



Eric Wieschaus wurde am 8. Juni 1947 in South Bend, IN (USA) geboren und wuchs in Birmingham, AL, auf. Er studierte an der University of Notre Dame, Notre Dame, IN, und promovierte an der Yale University, New Haven, CT. Einen erheblichen Teil seiner Forschung als Doktorand und Postdoktorand führte er in Basel und Zürich (Schweiz) durch. 1978 ging er an das European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, wo er mit Christiane Nüsslein-Volhard die Mutagenese-Experimente durchführte, die 1995 mit dem Nobel-Preis für Medizin und Physiologie ausgezeichnet wurden. Er ist Mitglied der American Academy of Arts and Sciences sowie der National Academy of Sciences. Seit 1981 ist er Squibb Professor of Molecular Biology an der Princeton University, Princeton, NJ.

zunächst einige Probeläufe selbst durchgeführt, doch waren die Experimente sehr arbeitsintensiv und wurden mit der Hilfe von Gerd Jürgens und Hildegard Kluding zu Ende geführt^[7–10]. Im Laufe eines knappen Jahres, von Herbst 1979 bis Sommer 1980, etablierten wir 27000 Inzuchlinien. Diese enthielten etwa 18000 voneinander unabhängige Mutationen, die zu einem Zeitpunkt im Laufe des Lebenszyklus einer Fliege zum Tode führen (Tabelle 1). Lediglich etwa ein Viertel dieser letalen

Tabelle 1. Ergebnisse des Heidelberger Mutagenese-Experiments [a].

Gesamtzahl der gebildeten und getesteten Stämme	26978
Zahl der letalen Mutationen	18136
Zahl der Mutationen, die zum Tod des Embryos führen	4332
Zahl der Mutationen, die zu embryonalen Phänotypen führen	580
Zahl der Komplementationstests (Gene)	139

[a] Es sind die Gesamtzahlen der Experimente mit dem X-Chromosom und den zwei Hauptautosomen gezeigt. Die Zahl der Mutationen der verschiedenen Klassen wurde unter Annahme einer Poisson-Verteilung korrigiert, um den Linien, die mehrere Mutationen enthielten, Rechnung zu tragen.

Mutationen verhinderte, daß die homozygoten Embryonen schlüpften, und nur 2.5% verursachten sichtbare Veränderungen der externen Morphologie des Embryos. Diese 580 Mutationen konnten durch Komplementationstests jeweils einem von 139 unterschiedlichen Gene zugeordnet werden. Die geringe Zahl der Gene war ein wichtiges Ergebnis, da dies bedeutete, daß jedes Gen detailliert charakterisiert werden konnte. Durch die Untersuchung der mutierten Embryonen der jeweiligen Stämme, waren wir in der Lage, ein allgemeines Modell aufzustellen, wie die Genaktivität im Embryo die Entwicklung der individuellen Zellen lenkt.

In allen Spezies werden viele der Genprodukte, die im Embryo vorhanden sind, bereits während der Oogenese in der Mutter gebildet. Dazu gehören die meisten RNAs und Proteine, die in frühen Stadien für die normalen Zellfunktionen benötigt werden, sowie einige „Inhomogenitäten“, die bei der Festlegung der Zellachsen benötigt werden. In unserem Experiment stammten die homozygoten Embryonen von Müttern mit einem Wildtyp-Allel. Aus diesem Grund wurden im Heidelberger Mutagenese-Experiment alle maternalen Genprodukte nicht erfaßt. Die 139 identifizierten Gene repräsentieren lediglich solche, deren Produkte durch Transkription im Embryo gebildet werden. Wir nahmen deshalb an, daß die meisten der sehr zahlreichen RNA- und Proteinspezies der Embryonen von der Mutter bereitgestellt werden.

Die Tatsache, daß zygotisch benötigte Transkripte relativ selten waren, ließ vermuten, daß sie möglicherweise eine besondere Funktion in der Entwicklung übernehmen. Die zygotische Transkription könnte somit die Expression einiger Genprodukte in einer bestimmten Zelle (und nicht in unmittelbar benachbarten Zellen) in einem vorgegebenen Zeitintervall steuern. Dies würde nicht zu einer gleichmäßigen Verteilung der Genprodukte führen, wie sie gewöhnlich bei maternalen Transkripten auftritt. Nach dieser Modellvorstellung würde der Embryo die Transkription also dazu nutzen, Unterschiede zwischen benachbarten Zellpopulationen hervorzurufen – Unterschiede, die letztlich die Vielfalt der Zellanlagen und des Zellverhaltens nach dem Blastoderm stadium im Embryo ausmachen.

Die Heidelberger Sammlung von Mutanten: ein Überblick über zygotische Genaktivitäten

Eine glückliche Fügung trug wesentlich dazu bei, daß die Heidelberger Mutagenese-Experimente eine so große Bedeutung erlangten: Es wurden nahezu gleichzeitig molekulargenetische Techniken entwickelt, mit denen Gene bezüglich ihrer chromosomal Position kloniert werden können. Nachdem wir unsere Experimente veröffentlicht hatten, begann man in vielen Laboratorien, in denen man sich mit *Drosophila* beschäftigte, die durch Mutationen identifizierten Gene zu klonieren. Diese Bemühungen wurden in den letzten zehn Jahren weiter fortgesetzt und dauern heute noch an. Von den 139 Linien, die Phänotypen liefern, traten 20 nur einmal auf. Ihre Phänotypen waren nicht klassifizierbar, und sie wurden weder benannt noch näher charakterisiert. Die meisten von ihnen gingen verloren. Eine Durchsicht der *Drosophila*-Datenbank ergab, daß von den restlichen 119 Linien 75 kloniert und ihre Expressionsmuster in Embryonen untersucht wurden. Diese molekulare Analyse verbunden mit den phänotypischen Beschreibungen, die in Heidelberg begannen, haben uns ein zunehmend detaillierter werden des Wissen über die Art der Funktionen vermittelt, die durch zygotische Transkription im *Drosophila*-Embryo angelegt sind.

Allgemein ließen sich die weitreichendsten Erkenntnisse über den Entwicklungsmechanismus gewinnen, als verschiedene Heidelberger Gene in einer Gruppe zusammengefaßt werden konnten, da sie den gleichen Entwicklungsprozeß steuern. Manchmal deuteten Eigenarten der Phänotypen einiger Gene, wie bei den Segmentierungsmutanten^[7], auf die Existenz von Hierarchien bezüglich der Regulation zwischen den Mitgliedern einer Gruppe hin (Abb. 2). In anderen Fällen (z. B. bei *armadillo* und *wingless*^[11]) zeigte sich zwischen schon früher charakterisierten Proteinen eine unerwartete Beziehung, da sie Gruppen mit einheitlichem Phänotyp zugeordnet werden konnten.

Eines der auffallendsten Merkmale der Heidelberger Mutantensammlung war die Spezifität der Phänotypen. Bei einer gege-

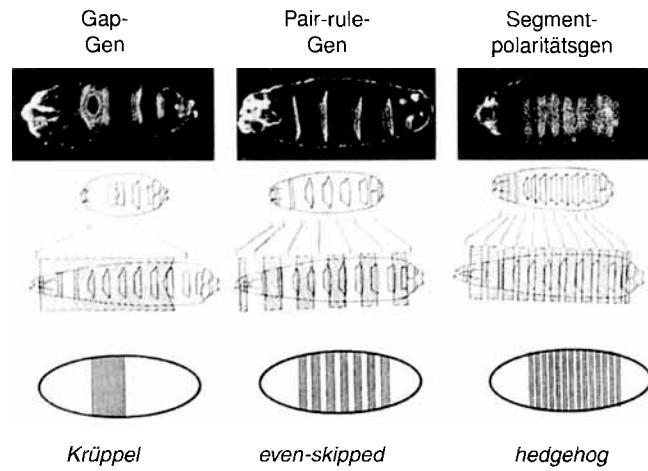


Abb. 2. Phänotypen von Mutationen, die das Segmentmuster betreffen. Anhand der Größe und Anordnung der Lücken im Muster von mutierten Embryonen am Ende der Entwicklung kann auf die Erfordernisse für die Genaktivitäten im Blastodermstadium geschlossen werden. Die Segmentierungsgene können in drei Klassen eingeteilt werden: Mutationen in den Gap-Genen führen zu großen, durchgehenden Lücken und solche in den Pair-rule-Genen zu Lücken in jedem zweiten Segment; Mutationen in den Segmentpolaritätsgenen verursachen Lücken im Muster jedes Segments. Für jede Klasse ist ein Beispiel gezeigt.

benen Linie sind nur einige Zelltypen oder -regionen in der Mutante betroffen, während andere normal sind. Diese phänotypische Spezifität wurde durch die molekularen Daten aus den Klonierungen der Heidelberger Gene untermauert. Die meisten Gene zeigen ausgesprochen regulierte Expressionsmuster, wobei sich Transkripte nur in solchen Regionen und Zelltypen anhäufen, in denen sie gebraucht werden. Die Defekte, die in einem mutierten Stamm auftreten, unterscheiden sich allgemein von denen anderer Stämme, und auch die Expressionsmuster weisen eine entsprechende Diversität auf. Diese beiden Beobachtungen lassen vermuten, daß die meisten Gene eine einzige Rolle in den morphologisch getrennten Entwicklungsschritten spielen.

Die Mutationen betreffen gewöhnlich Regionen des Embryos und weniger spezifische Zelltypen. Diese Regionen entsprechen in der Regel nicht den Unterteilungen, die zu diesem Zeitpunkt bereits sichtbar sind, und waren daher allein auf der Basis morphologischer Betrachtungen nicht erwartet worden. Anschauliche Beispiele für diese regionalen Spezifitäten sind die Gene, die die Segmentierung betreffen: Man hätte weder den Expressionsbereich der Gap-Gene vorhersagen können, noch die Existenz von Pair-rule-Phänotypen und auch nicht die genauen Strukturen, die in den Segmentpolaritätsmutanten dupliziert sind. Da die von einem Gen betroffene Region letztlich zu einer Vielzahl von unterschiedlichen Zelltypen führt, scheinen die Gene eher die Positionen oder räumlichen Koordinaten zu definieren als Gewebetypen oder Organe.

Gene werden häufig mehrfach während der embryonalen Entwicklung gebraucht. Beispielsweise werden die meisten Segmentierungsgene später auch noch im Nervensystem und in anderen Geweben benötigt (z. B. das Gen *Krüppel* in Malpighischen Gefäßen^[12]). Diese Multifunktionalität ist nicht auf Gene begrenzt, die das Segmentierungsmuster kontrollieren. Viele der Gene, die die Bildung des dorsal-ventralen Musters im Blastodermstadium kontrollieren, werden zu bestimmten Zeiten während der Entwicklung nochmals verwendet. Sogar ein Gen wie *twist*, das für die Differenzierung der Muskeln spezifisch zu sein scheint, weist ein komplizierteres, breiteres Expressionsmuster im Blastodermstadium auf. Daraus folgt, daß es bei der Festlegung der gesamten ventralen Anlagen und nicht bei der Festlegung der Zelltypen des Mesoderms eine Rolle spielt. Diese Eigenschaften machen es schwierig, eine Beziehung zwischen den frühen Expressionsmustern bestimmter Gene und der späteren Art der Differenzierung herzustellen. Auch hier bestätigt sich die Funktion der Gene bei der Festlegung der Anlagen und weniger bei der Festlegung der differenzierten Zelltypen.

Mehr als die Hälfte der 75 bisher klonierten Gene kodieren Transkriptionsfaktoren, was sich aus den vorhandenen DNA-Bindungsmotiven oder ihrer Homologie zu bekannten Transkriptionsfaktoren in Wirbeltieren oder Hefe schließen läßt (Abb. 3). Wegen ihrer DNA-Bindungseigenschaften können sie wahrscheinlich die Expression von vielen unterschiedlichen Genen (= Zielgenen) kontrollieren. Falls sie in verschiedenen Entwicklungsstadien und in unterschiedlichen Kombinationen mit anderen Genen gebraucht werden, beeinflussen sie somit möglicherweise eine Vielzahl von Entwicklungswegen. Die meisten der klonierten Gene, die keine Transkriptionsfaktoren sind, sind Signalstoffe der Zelloberfläche oder Rezeptoren. Einige dieser

Signalstoffe könnten eine unmittelbare Wirkung auf das Verhalten der Zelle haben (siehe unten), aber meistens sind die Signale Teil eines Rückkopplungsmechanismus zur Festlegung der Position, haben aber keine direkte Wirkung auf die endgültige Differenzierung der Zelle.

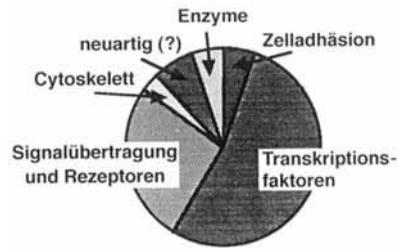


Abb. 3. Zelluläre Funktionen, die bei den Heidelberger Mutationen betroffen wurden. Auf der Grundlage der Sequenz von 75 klonierten Genen ergibt sich, daß die meisten Genloci, die in Heidelberg identifiziert wurden, Transkriptionsfaktoren oder Zellsignale und Rezeptoren kodieren.

Gene, die in den Heidelberger Mutagenese-Experimenten nicht erfaßt wurden: die Kontrolle der Zellform

Zu der Zeit, in der die Zellanlagen festgelegt werden, kommt es im Embryo zu erheblichen morphologischen Veränderungen. Die letzten der schnellen Zellzyklen finden statt, wenn sich der Embryo noch im Syncytium befindet. Sobald die Zahl der Zellkerne auf etwa 6000 angewachsen ist, hören sie auf sich weiter zu teilen, und die Zellmembranen bilden sich zwischen den Kernen. Dieser Prozeß der Zellularisierung geht mit einer umfassenden Reorganisation des embryonalen Cytoskeletts einher und dauert etwa eine Stunde. Danach besteht der Embryo aus 6000 individuellen Zellen, die noch immer morphologisch identisch sind. Molekular unterscheiden sie sich allerdings infolge der Expression vieler der 139 Gene und Transkriptionsfaktoren, die im vorangegangenen Abschnitt beschrieben wurden. Mit Beginn der Gastrulation werden diese Unterschiede in Veränderungen der Zellform übersetzt, die in der Invagination des Mesoderms oder des Endoderms resultieren. Die 90 Minuten von der Beendigung der Kernteilungen bis zur frühen Gastrulation repräsentieren also die maßgebliche Periode morphologischer Transformation im *Drosophila*-Embryo.

Welche Beziehung besteht zwischen diesen morphologischen Veränderungen und den Genen, die wir in den Heidelberger Experimenten identifiziert haben? Als wir Embryonen aus den 139 mutierten Stämmen untersuchten, fanden wir heraus, daß sogar Mutanten mit einem sehr früh sichtbaren Phänotyp keine morphologischen Defekte vor Beginn der Gastrulation aufwiesen. Dies ließ vermuten, daß die Produkte der Heidelberger Gene für die frühen morphologischen Ereignisse der Kernteilung und der Zellularisierung irrelevant sind und lediglich benötigt werden, wenn die Zellen in den unterschiedlichen Regionen der Embryonen beginnen, ihre regionspezifische Zellgestalt zu ändern. Eine Möglichkeit, dies zu testen, besteht darin, die gesamte Synthese neuer RNA zu blockieren, indem jungen Embryonen Verbindungen injiziert werden, die die RNA-Polymerase inhibieren. Zu unserer Bestürzung deuteten die Arbeiten von Arking und Parente^[13] sowie von Edgar et al.^[14] darauf hin, daß eine solche Behandlung eine abnormale Entwicklung der Embryonen zu Beginn der Gastrulation verursachen, d. h. eine Stunde bevor die ersten Defekte bei den Heidelberger Mutanten auftreten. Diese Experimente gaben die ersten Hinweise darauf, daß die Heidelberger Experimente möglicherweise die

früh agierenden, für die Morphologie wichtigen Gene nicht erfaßt hatten.

Um solche Gene zu identifizieren, haben wir ein System von Translokationskreuzungen entwickelt, mit dem wir für definierte Regionen auf dem Chromosom defizierte Embryonen erhalten^[15, 16]. Mit diesem System war es möglich, das gesamte Genom mit wenigen Kreuzungen nach potentiellen Mutanten abzusuchen, die in frühen Entwicklungsstadien sehr geringfügige Abweichungen in ihrer Morphologie aufweisen. So konnten sieben Regionen (oder Gene) identifiziert werden, die zu den Defekten führen, die bei den mit dem RNA-Polymerase-hemmenden Wirkstoff behandelten Embryonen festgestellt worden waren. Diese Gene wurden anhand ihrer Wirkungen auf die frühe Morphologie identifiziert und nicht wegen ihrer Lebensfähigkeit oder ihrer allgemeinen Muster am Ende der embryonalen Entwicklung. Damit repräsentieren sie eine andere Klasse von Genen als die Heidelberger Sammlung. Drei dieser sieben Gene wurden inzwischen kloniert^[17–19]. Anders als die Heidelberger Mutanten kodieren diese drei keine Transkriptionsfaktoren oder Komponenten eines Signalsystems der Zelle, sondern sind Cytoskelett-Proteine des Cytoplasmas^[19, 20].

Gene, die die Morphologie während der Gastrulation beeinflussen, wurden in den Heidelberger Experimenten offensichtlich ebenfalls nicht identifiziert^[3]. So sind die beiden Heidelberger Gene *twist* und *snail* für die Festlegung des Mesoderms unbedingt erforderlich. Beide wurden kloniert, und es wurde nachgewiesen, daß sie Transkriptionsfaktoren kodieren^[21, 22]. Unmittelbar vor der Gastrulation werden diese Gene in den Kernen der mesodermalen Vorläuferzellen auf der ventralen Seite des Blastoderms exprimiert. Wenn eines dieser Gene mutiert ist, wird kein Mesoderm gebildet und es entsteht auch keine ventrale Furche. Folglich bestimmen *twist* und *snail* bei Blastodermzellen nicht nur den mesodermalen Entwicklungsweg, sondern haben auch einen unmittelbaren Einfluß auf das Verhalten der mesodermalen Zellen. Da sie Transkriptionsfaktoren sind, tun sie dies, indem sie die Expression anderer Gene kontrollieren.

Welches sind nun die Zielgene? Wenn die Zielgene Phänotypen bilden würden, die in der Cuticula sichtbar wären, hätten wir sie in den Heidelberger Experimenten entdeckt. Ein Kandidat für ein solches Zielgen ist *folded gastrulation (fog)*. In *fog*-Mutanten sind die Formänderungen der Zellen in der ventralen Furche verspätet und unkoordiniert. Wildtypzellen in der ventralen Furche exprimieren *fog* kurz bevor sie ihre Gestalt verändern^[23]. Wenn *fog* außerhalb der ventralen Furchenanlage exprimiert wird, ist es in der Lage, die gleichen anfänglichen Veränderungen der Zellgestalt herbeizuführen, sogar in Zellen, in denen *twist*, *snail* oder andere Faktoren, die gewöhnlich die mesodermalen Anlagen beeinflussen, fehlen^[24]. Daher ist *fog* ein exzellentes Zielgen für *twist* und *snail*, und zwar eines, dessen Expression möglicherweise für die Veränderungen der Zellgestalt bei der mesodermalen Entwicklung entscheidend ist.

fog ist – abgesehen von *twist* und *snail* – das einzige Heidelberger Gen, das die Bildung der ventralen Furche beeinflußt. Da *fog*-Embryonen langsame, unkoordinierte Invaginationen vollziehen, während *twist*- oder *snail*-Embryonen keine ventrale Furche bilden, kann *fog* nicht das einzige Zielgen von *twist* und *snail* sein. Andere Gene, die in Heidelberg nicht entdeckt wurden, müssen daher für die Unterschiede zwischen den *twist*-,

snail- und *fog*-Phänotypen und für die verzögerte mesodermale Invagination, die bei einer *fog*-Mutante noch auftritt, verantwortlich sein. Diese Zielgene wurden in Heidelberg vielleicht deswegen nicht entdeckt, weil sie möglicherweise für die mesodermale Invagination nicht notwendig sind, so lange der Embryo ein Wildtypallel von *fog* aufweist. Sie hätten allerdings entdeckt werden können, wenn die Mutanten direkt im Hinblick auf morphologische Defekte während der Gastrulation untersucht worden wären. Angesichts der großen Zahl von Stämmen war dies bei den Heidelberger Mutagenese-Experimenten aber nicht möglich. Vielleicht können die relevanten Regionen auf den Chromosomen mit Translokationskreuzungen identifiziert werden, da nur wenige solcher Kreuzungen benötigt werden, um den Einfluß der meisten dieser Regionen zu untersuchen. Die Ergebnisse neuerer Experimente hierzu lassen vermuten, daß es Regionen gibt, die die Bildung einer ventralen Furche in einer Weise bewirken, die mit den Genen der Heidelberger Versuche nicht erklärt werden kann. Die meisten dieser morphologischen Defekte sind vorübergehender Art und ähneln denen in *fog*-Mutanten. Diese Embryonen, denen diese Gene fehlen, internalisieren schließlich ihr Mesoderm. Es ist daher möglich, daß punktmutierte Gene, die diese frühen morphologischen Effekte hervorrufen, möglicherweise keine Letalität verursachen oder leicht sichtbare Wirkungen auf die endgültige Morphologie haben.

Die Beziehung zwischen Zellanlage und Zellform

Die Effizienz, mit der Mutationen, die lediglich die Zellanlage, aber nicht die Zellform beeinflussen, mit Mutagenese-Experimenten identifiziert werden können, deutet darauf hin, daß die beiden Prozesse möglicherweise unterschiedlich kontrolliert werden. Die Existenz von Mutationen, die die Zellanlage betreffen, läßt vermuten, daß Funktionen der Musterbildung nicht redundant sind. Jedes Gen ist für eine normale Entwicklung unbedingt erforderlich. Durch einzelne, nichtredundante Faktoren, die die Zellanlage bestimmen, könnten Doppeldeutigkeiten bei der Festlegung von Zellanlagen vermieden werden. In dieser Hinsicht ist eine präzise Festlegung der Genexpression in jeder einzelnen Zelle möglicherweise nicht so wichtig wie die Existenz von wenigstens einigen Zellen, die eindeutig auf ihren jeweiligen Entwicklungsweg festgelegt sind. Hat eine Auswahl der Zellen stattgefunden, so muß dies auch morphologisch umgesetzt werden. An diesem Punkt besteht möglicherweise ein enormer Vorteil für Redundanz, da mehrere Prozesse sicherstellen könnten, daß eine bestimmte Anlage, sobald sie ausgewählt ist, auch tatsächlich erreicht wird. Diese Redundanz muß nicht vollständig sein; fällt einer dieser Prozesse aus, führt dies möglicherweise zu geringfügigen Abweichungen in der Entwicklung, deren Ausmaß dem von Defekten ähneln könnte, die in den ventralen Furchen der *fog*-Embryonen auftreten. Dementsprechend wären die Veränderungen der Zellgestalt während der Gastrulation die Summe der Effekte unterschiedlicher Prozesse, von denen jeder zwar für die charakteristische Wildtypmorphologie, nicht aber für das Endergebnis notwendig wäre.

Unter den Biologen, die sich mit der Zellentwicklung beschäftigen, interessieren sich die einen besonders für die Zellanlage

und die Musterbildung und andere für die Morphogenese. Diejenigen, die an den Mustern interessiert sind, konzentrieren sich vor allem auf Gene wie *twist* und *snail*, da deren Expression im Blastodermstadium die Entwicklung der ventralen Zellen zu mesodermalen Zellen festlegt (Abb. 4 links). Diesbezüglich wäre

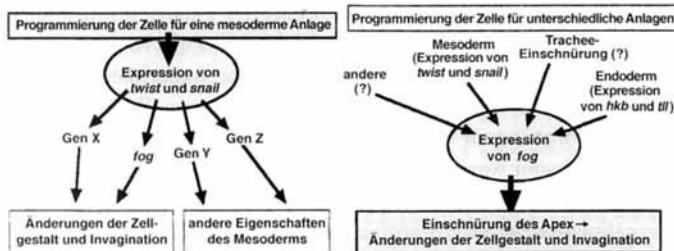


Abb. 4. Unterschiedliche Sichtweisen der Entwicklung. Links steht die Programmierung von Zellen zu speziellen Zellschicksalen im Vordergrund, rechts die zellulären Mechanismen, die Veränderungen in der Morphologie hervorrufen.

ein Gen wie *fog* lediglich einer von vielen nachgeordneten Regulatoren. Doch sind die Veränderungen der Gestalt von mesodermalen Zellen während der ventralen Furchenbildung nicht auf die Gastrulation begrenzt. Darüber hinaus werden Gene wie *fog* in anderen Stadien und anderen Anlagen nicht unter der Kontrolle von *twist* und *snail* exprimiert. Folglich haben – vom Standpunkt der zellulären Morphologie – Gene wie *fog* eine zentrale Rolle in der Forschung (Abb. 4 rechts). *fog*-abhängige Veränderungen der Zellgestalt werden möglicherweise in vielen unterschiedlichen Programmen für die Entwicklung durch eine Reihe unterschiedlicher Gene aktiviert, aber die Bedeutung des *fog*-Gens für die Funktion der Zelle bliebe erhalten.

Schlußfolgerungen: die Stärken und Schwächen des genetischen Ansatzes

Mutagenese-Experimente verlaufen teils zufällig, teils entsprechend den vorgegebenen Bedingungen. Ihr größter Vorteil ist vielleicht, daß wir Wissenschaftler wenig Kontrolle über die Art der resultierenden Mutationen haben. Mutationen ereignen sich zufällig im ganzen Genom, wobei Gene unabhängig davon, ob diese etwas mit den untersuchten Prozessen zu tun haben oder nicht, ausgeschaltet werden. Deshalb hängt die Herstellung von Mutanten normalerweise nicht davon ab, welche Verbindungen beteiligt sind oder welche Mechanismen der Mutation zugrunde liegen. Der Erfolg hängt wesentlich von der Fähigkeit der Experimentatoren ab, die erhaltenen Mutanten durchzusehen und die interessanten Phänotypen zu erkennen und zu interpretieren. Hauptsächlich durch diesen zweiten Schritt wird das System subjektiv beeinflußt, da dieser von der Reaktion des Forschers auf neu entdeckte mutierte Phänotypen und von seiner Fähigkeit abhängt, die Art des Defektes und den richtigen Kontext zu verstehen, in dem er beschrieben werden kann. Da wir ein Diskussionsmikroskop benutzt haben, waren Christiane Nüsslein-Volhard und ich oft gleichzeitig zum ersten Mal mit bestimmten Phänotypen konfrontiert. Es war nicht immer einfach, eine Übereinstimmung über die Defekte zu erzielen

oder zu entscheiden, warum ein bestimmter Stamm interessant war. Unsere endgültigen Beschreibungen profitierten von dieser doppelten Beobachtungsweise, da sie meist das Ergebnis intensiver Diskussionen waren. Wir waren allerdings beider vornehmlich an den räumlichen Mustern und der Gesamtmorphologie der Embryogenese interessiert. Mutationen, die speziellere Aspekte der Zelldifferenzierung betreffen, wurden sicherlich in Heidelberg auch erhalten, aber selbst wenn sie zu einer Sterblichkeit der Embryonen geführt hätten, wären sie verworfen worden.

Zusätzlich zu den subjektiven Einflüssen durch die jeweiligen Forscher sind genetische Experimente inhärent durch den Organismus eingeschränkt. Embryonen von *Drosophila* entwickeln sich schnell, und die meisten Genprodukte werden durch maternale und weniger durch zygotische Transkription bereitgestellt. Die Entwicklung ist stark regulativ, und die Kommunikation zwischen den Zellen stellt sicher, daß eine gleichbleibende Morphologie erreicht wird, sogar wenn die Ausgangssituationen nicht gleich sind. Ein offensichtlicher Mangel der Heidelberger Experimente ist, daß wir, obwohl wir an den allgemeinen Aspekten der Morphologie und den frühen Veränderungen der Zellform interessiert waren, nur das Ergebnis des Differenzierungsprozesses in Form des Cuticulamusters ausgewertet haben. Da die hypodermalen Zellen, die die Cuticula absondern, einen sehr großen Teil des Blastoderms repräsentieren, vermuteten wir, daß es nicht möglich sein würde, morphologische Veränderungen während der Gastrulation zu verursachen, ohne die letztlich resultierende Morphologie zu verändern. Die Ergebnisse unserer späteren Experimente deuten allerdings darauf hin, daß dies möglicherweise nicht richtig ist. Zwar bevorzugten wir weder Mutationen, die die Zellanlage, noch solche, die die Zellform betrafen, doch veränderten die meisten der entdeckten Gene tatsächlich die Zellanlage. Dies ist vielleicht darauf zurückzuführen, daß Effekte hinsichtlich der Zellform in *Drosophila* sich häufig nur kurzfristig auswirken.

Es ist gut möglich, daß wir mit einem anderen Organismus andere Ergebnisse erhalten hätten. So sind wir neugierig, ob Nematoden, die außergewöhnlich konstante Abstammungslinien aufweisen, subtilen Störungen hinsichtlich Bewegung und Positionierung von Zellen stärker ausgesetzt sind als *Drosophila*. Die Entwicklung von Wirbeltieren ist, wie gezeigt wurde, sehr viel variabler hinsichtlich der Zellabstammung und wesentlich regulativer beim Aufbau konstanter Morphologien. Diesbezüglich werden die zur Zeit durchgeföhrten Mutagenese-Experimente mit Zebrafisch- und Maus-Modellen möglicherweise ein Genspektrum liefern, das dem von *Drosophila* ähnlicher ist.

Natürlich ist eine der wichtigen Lehren der Heidelberger Experimente, daß solche Spekulationen allgemein kaum Vorhersagen erlauben. Die Phänotypen und Gene, die man durch ein bestimmtes Mutageneseexperiment erhält, werden erst dann bekannt, wenn die entsprechenden Experimente auch durchgeführt wurden. Die gleichen Folgerungen lassen sich auf die weitere Analyse der Entwicklung von *Drosophila* anwenden. Trotz der enormen Fortschritte, die hinsichtlich des Verständnisses über die Zellanlagen gemacht worden sind, wissen wir noch nicht, wie diese Programme zu einer konstanten Morphologie und Struktur führen. Die Morphologien, die *Drosophila*-Zellen annehmen, ähneln häufig denen der Wirbeltiere. Überdies sind die beteiligten Verbindungen und damit auch der zugrundelie-

gende Mechanismus wahrscheinlich im Laufe der Evolution konserviert worden. Indem wir eine erste Verbindung zwischen Zellanlage und Zellgestalt in *Drosophila* herstellen könnten, können wir möglicherweise auch eine Brücke zu den Forschungsprojekten schlagen, in denen man sich mit der Entwicklung anderer Organismen beschäftigt.

Eingegangen am 4. März 1996 [A 154]

Übersetzt von Christine Brachthäuser und Jörg Großhans, Tübingen

Stichworte: Drosophila · Embryonalentwicklung · Fruchtfliege · Nobel-Vortrag

- [1] „Histogenesis, organogenes and differentiation in the embryo of *Drosophila melanogaster* (Meigen)“: D. F. Poulson, in *Biology of Drosophila* (Hrsg.: M. Demerec), Wiley, New York, **1950**, S. 168–274.
- [2] J. A. Campos-Ortega, V. Hartenstein, *The Embryonic Development of Drosophila melanogaster*, Springer, Berlin, **1985**.
- [3] „Drosophila Gastrulation: from Pattern Formation to Morphogenesis“: M. Leptin, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1995**, *11*, 189–212.
- [4] E. Davidson, *Gene Activity in Early Development*, Academic Press, Orlando, FL, **1986**.
- [5] „The anatomy and function of a segment of the X-chromosome of *Drosophila melanogaster*“: B. H. Judd, M. W. Shen, T. C. Kaufman, *Genetics* **1972**, *71*, 139–156.
- [6] „Segmental aneuploidy and the genetic gross structure of the *Drosophila* genome“: D. L. Lindsley, L. Sandler, B. S. Baker, A. T. C. Carpenter, R. E. Denell, J. C. Hall, P. C. Jacobs, G. L. G. Miklos, B. K. Davis, R. C. Gethmann, R. W. Hardy, A. Hessler, S. M. Miller, H. Nozawa, D. M. Parry, M. Gould-Somero, *Genetics* **1972**, *71*, 157–184.
- [7] „Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*“: C. Nüsslein-Volhard, E. Wieschaus, *Nature* **1980**, *287*, 795–801.
- [8] „Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. I. Zygotic loci on the second chromosome“: C. Nüsslein-Volhard, E. Wieschaus, H. Kluding, *Roux's Arch. Dev. Biol.* **1984**, *193*, 267–282.
- [9] „Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. II. Zygotic loci on the third chromosome“: G. Jürgens, H. Kluding, C. Nüsslein-Volhard, E. Wieschaus, *Roux's Arch. Dev. Biol.* **1984**, *193*, 283–295.
- [10] „Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. III. Zygotic loci on the X-chromosome and the fourth chromosome“: E. Wieschaus, C. Nüsslein-Volhard, G. Jürgens, *Roux's Arch. Dev. Biol.* **1984**, *193*, 296–307.
- [11] „Spatial expression of the *Drosophila* segment polarity gene *armadillo* is post-transcriptionally regulated by *wingless*“: B. Riggleman, P. Schedl, E. Wieschaus, *Cell* **1990**, *63*, 549–560.
- [12] „Spatial and temporal patterns of *Krüppel* gene expression in early *Drosophila* embryos“: D. Knippe, C. Seifert, U. B. Rosenberg, A. Preiss, H. Jäckle, *Nature* **1985**, *317*, 40–44.
- [13] „Effects of RNA inhibitors on the development of *Drosophila* embryos permeabilized by a new technique“: R. Arking, A. Parente, *J. Exp. Zool.* **1980**, *212*, 183–194.
- [14] „Cell cycle control by the nucleo-cytoplasmic ratio in early *Drosophila* development“: B. A. Edgar, C. P. Kiehle, G. Schubiger, *Cell* **1986**, *44*, 365–372.
- [15] „Requirements for autosomal gene activity during precellular stages of *Drosophila melanogaster*“: P. T. Merrill, D. Sweeton, E. Wieschaus, *Development* **1988**, *104*, 495–509.
- [16] „Requirements for X-linked zygotic gene activity during cellularization of early *Drosophila* embryos“: E. Wieschaus, D. Sweeton, *Development* **1988**, *104*, 483–493.
- [17] „The spatial distribution of a blastoderm stage-specific mRNA from the *serendipity* locus of *Drosophila melanogaster*“: A. James, A. Vincent, *Devel. Biol.* **1986**, *118*, 474–479.
- [18] „The *Drosophila* cellularization gene *nullo* produces a blastoderm-specific transcript whose levels respond to the nucleocytoplasmic ratio“: L. S. Rose, E. Wieschaus, *Genes Development* **1992**, *6*, 1255–1268.
- [19] „*bottleneck* acts as a regulator of the microfilament network governing cellularization of the *Drosophila* embryo“: E. D. Schejter, E. Wieschaus, *Cell* **1993**, *75*, 373–385.
- [20] „The *nullo* protein is a component of the actin-myosin network that mediates cellularization in *Drosophila melanogaster* embryos“: M. A. Postner, E. Wieschaus, *J. Cell Science* **1994**, *107*, 1863–1873.
- [21] „The *Drosophila* development gene *snail* encodes a protein with nucleic acid binding fingers“: J.-L. Boulay, C. Dennefeld, A. Alberga, *Nature* **1987**, *330*, 395–398.
- [22] „Sequence of the *twist* gene and nuclear localization of its protein in endomesodermal cells of early *Drosophila* embryos“: B. Thisse, C. Stoezel, C. Gorostiza-Thisse, F. Perrin-Schmitt, *EMBO J.* **1988**, *7*, 2175–2183.
- [23] „A putative cell signal encoded by the *folded gastrulation* gene coordinates cell shape changes during drosophila gastrulation“: M. E. Costa, T. Wilson, E. Wieschaus, *Cell* **1994**, *76*, 1075–1089.
- [24] „*folded gastrulation* is upstream of *concertina* in a pathway that mediates apical flattening and constriction“: P. Morize, M. Costa, S. Parks, E. Wieschaus, noch unveröffentlichte Ergebnisse.