Zeitschrift: Bulletin de la Société Fribourgeoise des Sciences Naturelles = Bulletin der Naturforschenden Gesellschaft Freiburg

Herausgeber: Société Fribourgeoise des Sciences Naturelles

Band: 62 (1973)

Heft: 1

Artikel: Genkonstanz und Zelldifferenzierung

Autor: Tobler, Heinz

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-308493

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 11.01.2026

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Genkonstanz und Zelldifferenzierung

von Heinz Tobler
Zoologisches Institut der Universität Freiburg, Schweiz

1. Einleitung

Das zentrale, jedoch noch ungelöste Problem der Entwicklungsbiologie stellt zweifellos die zelluläre Differenzierung dar. Unter Zelldifferenzierung verstehen wir das Verschiedenwerden von Zellen im Verlauf der Entwicklung eines mehrzelligen Organismus aus einer einzigen Zelle, der befruchteten Eizelle. So einfach die Definition ist, so komplex scheinen die Vorgänge und Mechanismen zu sein, die zur zellulären Differenzierung führen. Das Problem wird wohl kaum allein von der Forschungsrichtung Entwicklungsbiologie gelöst werden können. Andere biologische Disziplinen, wie die Genetik, Zellbiologie, Cytologie, Ultrastrukturforschung, Molekularbiologie und Biochemie haben ihren Beitrag zur Beantwortung spezifischer Teilprobleme zu leisten. Eine Lösung des Differenzierungsproblems ist nicht nur von allgemein wissenschaftlichem, sondern ebenso von medizinischem Interesse, weil von der Entschlüsselung des Differenzierungsproblems ein Zugang zum Krebsproblem erwartet werden darf. Wie sollen wir verstehen, daß differenzierte, sich nicht mehr teilende Zellen plötzlich entarten und sich unkontrolliert vermehren, wenn uns die Ursachen und Mechanismen noch verborgen sind, die während der Normalentwicklung aus der befruchteten Eizelle die verschiedenen, den adulten Organismus aufbauenden Zelltypen hervorgehen lassen?

Ein so kompliziertes Phänomen, wie es die Zelldifferenzierung darstellt, kann möglicherweise nur dann mit Erfolg analysiert werden, wenn einfachste Organismen, z.B. Bakterien und Viren, als Versuchsobjekte gewählt werden. Diese Methode hat sich als außerordentlich fruchtbar erwiesen. Die großartigen Erfolge der Molekularbiologie seit Mitte unseres Jahrhunderts, vor allem die Aufklärung der Struktur und Wirkungsweise der Erbsubstanz, wären ohne Mikroorganismen als Versuchsobjekte unmöglich gewesen. Dabei wurde bis heute glänzend bestätigt, daß die fundamentalen Gesetzmäßigkeiten des Lebens für die einfacheren Mikroorganismen genauso gelten wie für die höheren Lebewesen.

Nun gibt es aber zwischen Bakterien und Viren einerseits und höheren Organismen andererseits trotzdem sehr wesentliche Unterschiede. Bakterien sind einzellig, enthalten wenige Membranen und Zellorganellen, und ihre Erbsubstanz liegt in Form eines einfachen DNA [1]-Fadens vor. Höhere Organismen jedoch sind mit Ausnahme der Protozoen vielzellig. Alle ihre Zellen sind aus einem komplizierten System von Membranen und Organellen aufgebaut. Die

[1] DNA = Abkürzung für den englischen Ausdruck «Deoxyribonucleic acid». Deutsch: Desoxyribonukleinsäure = DNS.

DNA ist mit Proteinen und RNA [2] zusammen in Chromosomen lokalisiert, die ihrerseits im Zellkern eingeschlossen sind. Für die folgende Problemstellung interessiert uns vorerst nur die Tatsache, daß Bakterien einzellig, höhere Organismen, deren Differenzierungsgeschehen wir hier analysieren wollen, jedoch mehrzellig sind. Wenn sich *einzellige* Lebewesen im Verlaufe ihres Lebenszyklus morphologisch verändern (differenzieren), so kann dies wohl nur darauf beruhen, daß in den verschiedenen Entwicklungsphasen verschiedene Gene zum Einsatz kommen. Oder anders ausgedrückt: Die zelluläre Differenzierung beruht auf differentieller Genaktivität, wobei jedoch jede Zelle über ein vollständiges Gensortiment verfügt. Es ist keineswegs selbstverständlich, daß bei höheren *vielzelligen* Organismen die Zelldifferenzierung auf denselben Mechanismen beruht. Durch fortschreitende Zellteilungen während der Embryonalentwicklung eines vielzelligen Organismus werden ganz andere Voraussetzungen geschaffen, als sie bei Einzellern und Bakterien vorliegen. Bereits im Jahre 1885 hat der große Theoretiker August Weismann durch eine einfache aber bestechende Theorie die Ursache der zellulären Differenzierung bei vielzelligen Organismen zu erklären versucht. Nach seiner Hypothese werden bei jeder Kern- und anschließenden Zellteilung «spezifische Determinanten des Kerns» – wir würden sie heute Gene nennen – *ungleich* auf die beiden Tochterzellen verteilt (Gensegregation). Nur die Zellen der Keimbahn, aus denen die Eier oder Spermien des adulten Tieres hervorgehen, würden dabei alle Gene erhalten. All diejenigen Zellen jedoch, die den Körper aufbauen (Somazellen), erhielten als Folge der ungleichen Verteilung nur jene Gene, welche in den betreffenden Zellen auch wirklich benötigt werden. So müßten schließlich nach fortgesetzten Teilungen Zellen entstehen, deren Kerne z.B. nur noch Gene für Zellen des Knochengewebes oder für Lichtsinneszellen im Auge enthielten.

Die Weismannsche Lehre wurde, wie wir im nächsten Abschnitt zeigen werden, mindestens in ihrer ursprünglichen Form bald durch schlüssige Experimente widerlegt. Doch darf mit Recht behauptet werden, daß sie eine der wichtigsten entwicklungsbiologischen Theorien darstellt. So hat sie entscheidend beigetragen, das Forschungsgebiet der experimentellen Embryologie oder Entwicklungsmechanik zu begründen.

2. Klassische Experimente zum Problem der Genkonstanz embryonaler Zellen

Der Biologe Wilhelm Roux gilt als der eigentliche Begründer der experimentellen Embryologie (1888). Im Zweizellstadium des sich entwickelnden Froschkeimes tötete er die eine Zelle mit einer heißen Nadel ab und fragte sich, zu welcher Entwicklungsleistung die überlebende Zelle noch fähig sei. Wenn auch, wie sich später herausstellte, seine Interpretation der Resultate nicht richtig war, so ist es doch sein großes Verdienst, erstmals kausalanalytische Kriterien zur Lösung spezifischer Probleme in die embryologische Forschung eingeführt

[2] RNA = Ribonukleinsäure

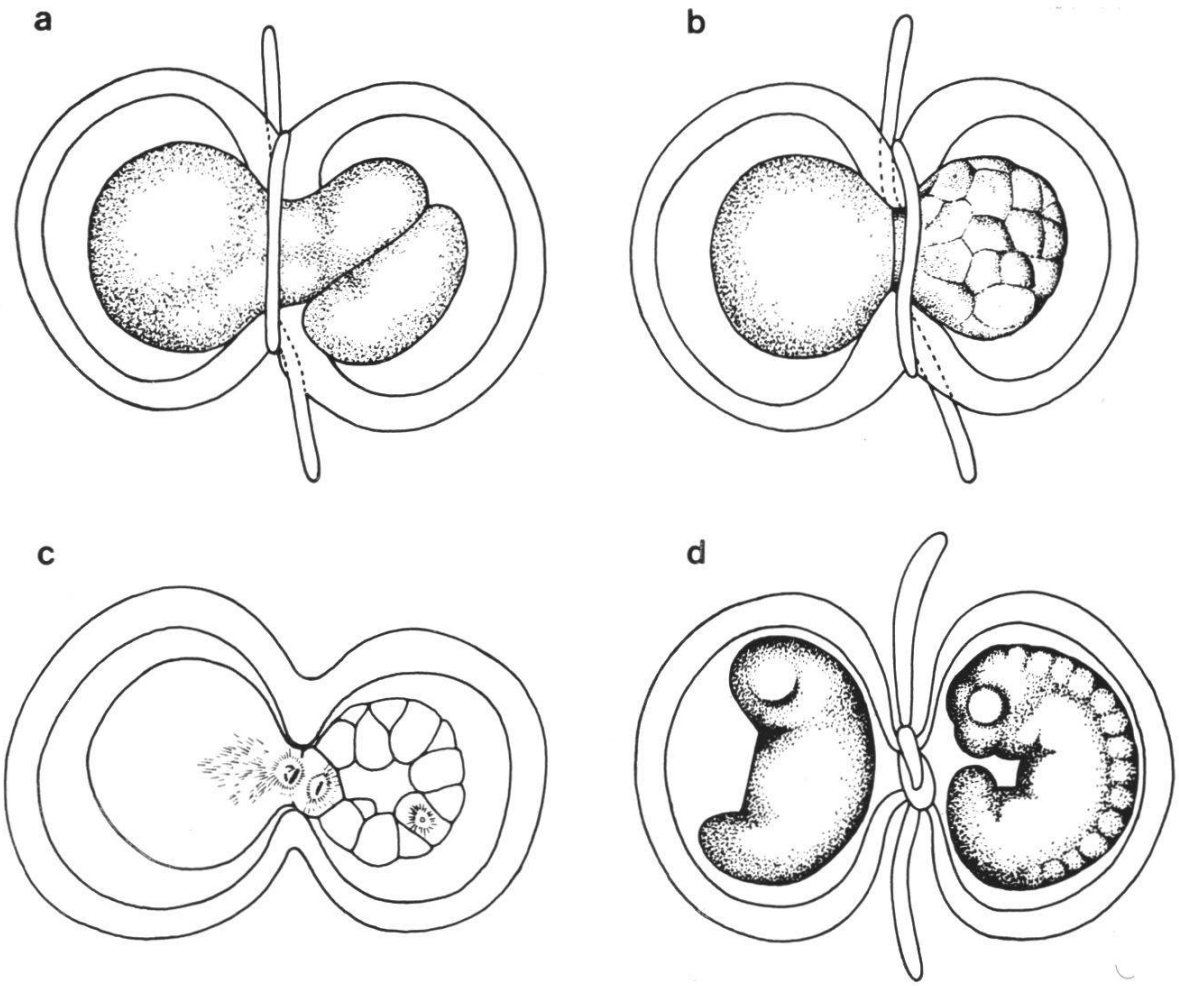

Abb. 1: Verzögerte Kernversorgung bei einem geschnürten Molchei.
a) 2-Zellstadium der kernhaltigen Hälfte. b) 16-Zellstadium, wobei ein Kern in die ungeteilte Eihälfte gelangt ist. c) gleiches Stadium im Schnitt. d) zwei normale Embryonen, der linke befindet sich lediglich noch in einem früheren Entwicklungsstadium als der rechte (nach Spemann, 1914).

zu haben. Im Jahre 1891 gelang Hans Driesch beim Seeigel die richtige Interpretation: Werden die beiden Zellen des Zweizellstadiums experimentell voneinander getrennt, so entwickeln sich aus ihnen zwei vollständige und nicht zwei halbe Seeigellarven. Dies kann nur bedeuten, daß im Zweizellstadium beiden Zellen ein komplettes Gensortiment zugeteilt worden ist und nicht nur ein halbes, wie auf Grund der Weismannschen Lehre zu erwarten gewesen wäre.

Besonders elegant wurde die Weismannsche Theorie experimentell auch durch Hans Spemann (1914) widerlegt (Abb. 1). Ein befruchtetes Molchei wird mit einem feinen Haar hantelförmig eingeschnürt. Dabei wird jedoch die Schlinge nicht ganz zugezogen, so daß die beiden geschnürten Hälften durch eine schmale Cytoplasmabrücke miteinander verbunden bleiben. Der Kern der

befruchteten Eizelle befindet sich in der einen Hälfte, der anderen ist nur Cytoplasma zugeteilt worden. Bald darauf beginnt sich das kernhaltige Fragment zu teilen, wobei die Entwicklung bis zum 16-Zellstadium fortschreitet (Abb. 1a, b). Die kernlose Hälfte hingegen bleibt ungeteilt. Nun mag es geschehen, daß im 16-Zellstadium bei der Kernteilung ein Tochterkern durch die Cytoplasmabrücke in die ungeteilte Hälfte ausweicht (Abb. 1c). Kurz darauf beginnt sich diese Hälfte, wenn auch verspätet, ebenfalls zu teilen. Durch vollständiges Zuziehen der Schlinge werden nun die beiden ursprünglichen Hälften ganz voneinander getrennt. Das Resultat ist erstaunlich: Beide Keimteile können sich zu völlig normalen Larven entwickeln (Abb. 1d)! Dieses Experiment beweist eindeutig, daß im 16-Zellstadium immer noch Kerne vorhanden sein müssen, welche die komplette genetische Information zur Bildung eines einheitlichen Ganzen enthalten. Wäre jedoch Weismanns Hypothese richtig, so hätten wir erwarten müssen, daß im 16-Zellstadium jeder Kern nur noch über beschränkte Potenzen verfügt.

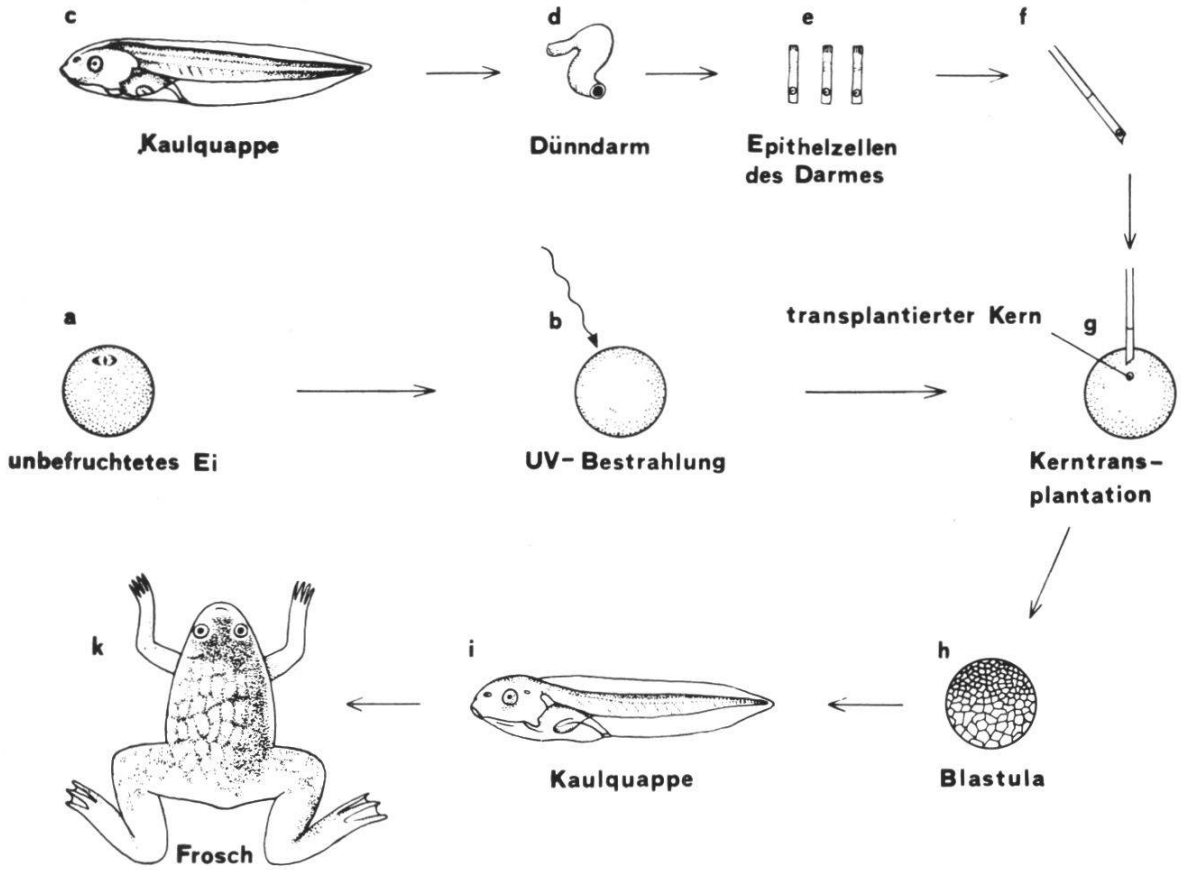

Abb. 2: Kerntransplantation beim Krallenfrosch *Xenopus laevis*.
a-b) UV-Bestrahlung eines unbefruchteten Eies. c-f) aus differenzierten Darmepithelzellen der Kaulquappe wird ein Kern entnommen und in eine Mikropipette aufgesogen. g) Transplantation des Kerns in die Eizelle. h-k) Entwicklung eines normalen Frosches (nach Gurdon, 1968).

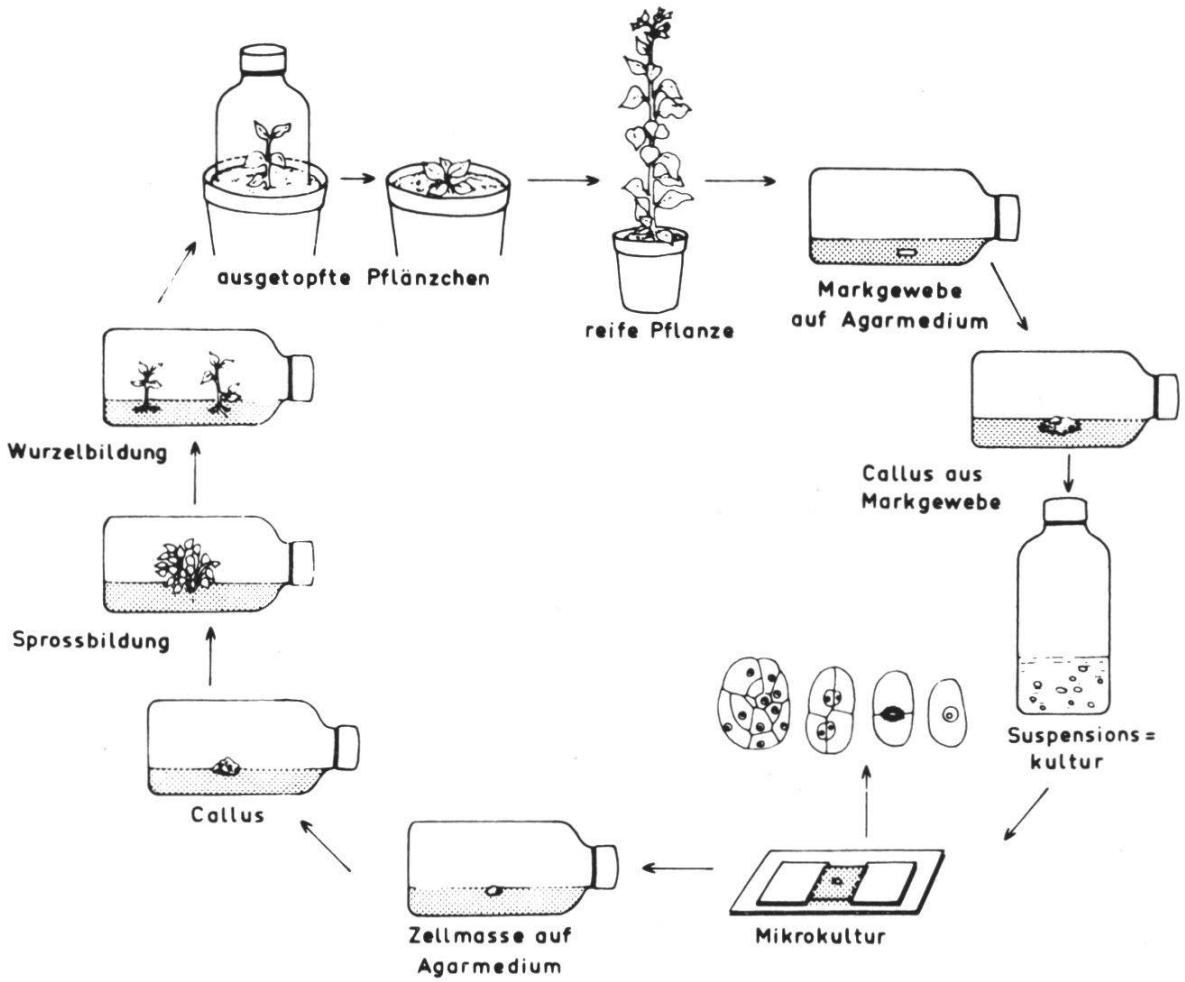

Abb. 3: Entwicklung einer normalen Tabakpflanze aus einer isolierten Einzelzelle. Diese Zelle stammt aus differenziertem Markgewebe der Sproßachse einer ausgewachsenen Pflanze (nach Vasil und Hildebrandt, 1967).

3. Neuere entwicklungsphysiologische Experimente zur Frage der Genkonstanz adulter Zellen

Spemanns Experimente haben wohl gezeigt, daß Zellkerne aus sehr frühen Entwicklungsstufen noch ein vollständiges Gensortiment enthalten, doch geben sie keinen Aufschluß darüber, ob spätere Stadien oder gar Zellkerne aus adulten Geweben nicht doch als Folge einer Gensegregation entstanden sind. Mit Hilfe der von Briggs und King (1952) entwickelten *Kerntransplantationstechnik* gelang es, diese Frage anzugehen.

Zunächst wird der Eikern eines unbesamten Froscheies mit ultraviolettem Licht abgetötet (Abb. 2a-b). Anschließend wird dem Darmepithel einer Kaulquappe eine differenzierte Zelle entnommen (Abb. 2c-f) und in eine feine Mikropipette eingesogen. Dabei bricht die Zellmembran auf, wodurch der Zellkern teilweise vom Cytoplasma befreit wird. Nun wird der Kern in die entkernte

Eizelle injiziert (Abb. 2g), die sich bald darauf zu teilen beginnt. So kann aus dem Zusammenwirken zwischen dem fremden Zellkern und dem Cytoplasma der Eizelle ein vollständig normaler Frosch entstehen (Abb. 2h-k). Dieses erstaunliche Resultat beweist, daß im Kern einer Darmzelle noch alle Entwicklungspotenzen, d.h. ein vollständiges Gensortiment, enthalten sind. Die Differenzierung kann damit nicht auf einer erbungleichen Teilung im Sinne der Weismannschen Theorie beruhen.

Eine noch erstaunlichere Leistung als der Kern einer Darmzelle des Frosches vermag eine einzelne differenzierte Pflanzenzelle zu vollbringen. So kann z.B. aus einer einzigen Zelle, die von differenziertem Markgewebe aus der Sproßachse einer Tabakpflanze abstammt, unter geeigneten Kulturbedingungen wiederum eine ganze Pflanze entstehen (Abb. 3). Dieses Ergebnis beweist nicht nur, daß differenziertes Pflanzengewebe die vollständige genetische Information zur Bildung einer ganzen Pflanze enthalten muß, sondern offenbart zugleich ein höchst bemerkenswertes Regenerationsvermögen einer Einzelzelle.

Regenerationsexperimente bei Tieren haben in einigen wenigen Fällen ebenfalls zur Klärung des Problems der genetischen Identität differenzierter Zellen beigetragen. Unter Regeneration verstehen wir den Ersatz bereits differenzierter Teile. Das wohl bekannteste Beispiel liefert das Regenerationsvermögen bei Amphibienlarven. Wird z.B. einem Molch ein Bein amputiert, so ist das Tier fähig, den Verlust zu ersetzen. Hier soll jedoch eine andere Regenerationsleistung eingehender erörtert werden, nämlich die sogenannte Wolffsche Linsenregeneration. Ein Molchauge, dem die Linse experimentell entfernt wurde, vermag aus dem Material des oberen Irisrandes eine neue Linse zu bilden. Dieses Regenerationsgeschehen ist in neuerer Zeit von Yamada (1967) sehr gründlich untersucht worden: Nach der künstlichen Entfernung der Linse verlieren differenzierte Zellen des oberen Irisrandes ihre Pigmentkörner, durchlaufen wenige Zellteilungen und redifferenzieren zu Linsenfaserzellen, wobei linsenspezifische Proteine synthetisiert werden. Auf unser Problem bezogen, bedeutet dies, daß Iriszellen auch noch die genetische Information für die Bildung von Linsenzellen enthalten müssen, obschon diese Gene in den Iriszellen normalerweise im Leben eines Molches nie zum Einsatz kommen.

Die Entdeckung der *Transdetermination* in Imaginalscheiben der Taufliege *Drosophila melanogaster* (Hadorn, 1965) stellt ein weiteres Beispiel für die Genkonstanz dar. In *Drosophila*-Larven finden sich neben den Zellen, die für die Aufrechterhaltung der larvalen Funktionen besorgt sind, auch solche, die «beiseite» gelegt werden und erst während der pupalen Metamorphose in Aktion treten, wenn aus ihnen der Körper der Imago aufgebaut wird. Diese Zellen sind zu sogenannten Imaginalscheiben zusammengefaßt. So entsteht zum Beispiel das rechte Vorderbein der Fliege aus einer ganz bestimmten Imaginalscheibe, die auf Grund ihrer Lage und Form in der Larve eindeutig identifizierbar ist. Transplantationsexperimente haben gezeigt, daß Imaginalscheiben zur Differenzierung bestimmter Organe und Strukturen determiniert sind. Wird jedoch Imaginalscheiben oder Fragmenten vor der Metamorphose genügend Zeit zur

Zellproliferation zur Verfügung gestellt, so kann es geschehen, daß z.B. aus einer Imaginalscheibe, die nur Beinstrukturen bilden sollte, auch Flügel- oder Antennenstrukturen entstehen. Somit ist ein Wechsel im Determinationszustand, eine Transdetermination, eingetreten. Dies kann nur bedeuten, daß Zellen, die zur Bildung von Beinstrukturen determiniert waren, ebenfalls noch über die genetische Information zur Bildung von Flügel- und Antennenstrukturen verfügen müssen.

4. Cytologische Evidenzen für die genetische Identität adulter Zellen

Für die Annahme, daß alle Zellen eines Organismus die gleiche genetische Information in ihren Zellkernen enthalten, sprechen die folgenden cytologischen Befunde:

1. Sämtliche Zellen, die den adulten Organismus aufbauen, stammen von einer einzigen Zelle (der befruchteten Eizelle) ab, wobei ein exakter Teilungsmodus (Mitose) bei jeder Zellteilung für eine gleichmäßige Verteilung der Chromosomen und damit ihrer Gene auf die beiden Tochterkerne sorgt.
2. DNA-Messungen verschiedener somatischer Zellen eines Organismus haben ergeben, daß alle Zellkerne, abgesehen von wenigen Ausnahmen, denselben DNA-Gehalt aufweisen (Vendrely, 1955). Diese Ausnahmen betreffen ei-

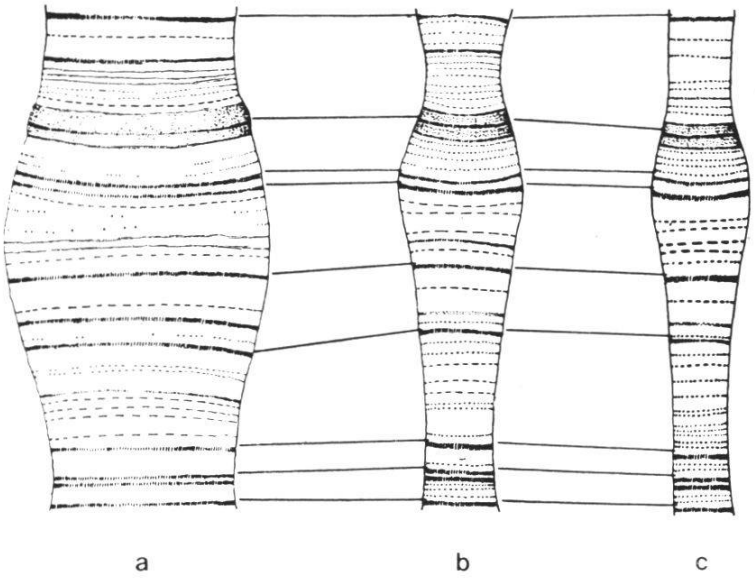

Abb. 4: Ausschnitt aus der gleichen Region von polytänen Chromosomen der Zuckmücke *Chironomus tentans* in verschiedenen Geweben: a) Speicheldrüse, b) Malpighische Gefässe, c) Enddarm. Während die Dicke der Chromosomen beträchtlich variiert, ist das Bändermuster annähernd konstant (aus Fischberg und Blackler, 1961, nach Beermann, 1952).

nerseits die Polyploidie, andererseits die Polytänie. Während bei der Polyploidie eine Vervielfachung des ganzen Chromosomensatzes und damit der Chromosomenzahl erfolgt, bleibt bei der Polytänie die ursprüngliche Chromosomenzahl erhalten, dafür tritt eine beträchtliche Vergrößerung der einzelnen Chromosomen ein. Beiden Prozessen scheint jedoch gemeinsam zu sein, daß der erhöhte DNA-Gehalt der Zellkerne die Folge einer Replikation des Gesamtgenoms darstellt. Solche Zellen unterscheiden sich deshalb lediglich bezüglich ihres quantitativen Gengehaltes von normalen diploiden Zellen.

3. Polytäne Chromosomen aus verschiedenen Geweben desselben Individuums weisen das gleiche charakteristische Bändermuster auf (Abb. 4). Da es nun aber in einigen Fällen gelungen ist, gewissen Bändern bestimmte Gene zuzuordnen, darf – etwas verallgemeinernd – angenommen werden, daß die Bänder der Riesenchromosomen Genorte darstellen. Somit müßten gleiche Bänderstruktur und -zahl in so verschiedenen Geweben wie Speicheldrüsen, Malpighischen Gefäßen, Darm oder Fettkörper gleiche Genreihenfolge und Genzahl bedeuten.

Ein sorgfältiger cytologischer Vergleich eines Gewebes in verschiedenen Entwicklungsstadien oder verschiedener Gewebe des gleichen Entwicklungsstadiums hat nun aber doch Unterschiede in der Erscheinungsform der Bänder erkennen lassen. Dabei verändert sich das Chromosom an spezifischen Stellen derart, daß die Bänderstruktur undeutlich wird und das Chromosom anschwillt; ein sogenannter «Puff» hat sich gebildet. Der Einbau von radioaktiv markierten Vorstufen läßt auf eine lokale RNA-Synthese schließen. Sowohl das stadien- und das gewebespezifische Puff-Muster als auch die Tatsache, daß in den Puffs RNA synthetisiert wird, legen den Schluß nahe, beim «Puffing» handle es sich tatsächlich um sichtbare Genaktivitäten.

5. Molekularbiologische Analyse der Zelldifferenzierung

Bevor wir die molekularbiologischen Experimente besprechen, die über den Mechanismus der Zelldifferenzierung Aufschluß geben sollen, seien einige kurze Erläuterungen über den Bau und die Funktion der DNA (= Erbsubstanz) vorangestellt. Wie die Abb. 5 zeigt, besteht die DNA aus zwei langen, unverzweigten Molekülen, die sich in Form einer Doppelhelix umeinander winden. Als vereinfachtes Modell kann man sich eine verdrillte Strickleiter vorstellen. Die seitlichen Stricke werden dabei abwechslungsweise durch Desoxyribose (D)- und Phosphorsäure (P)- Moleküle gebildet, während die Basenpaare den Sprossen entsprechen. In der DNA kommen nur 4 verschiedene Basen vor, nämlich Adenin (A), Thymin (T), Guanin (G) und Cytosin (C). Infolge sterischer Gründe paaren sich jeweils Adenin nur mit Thymin und Guanin nur mit Cytosin, wobei die Basenpaare durch Wasserstoffbrücken zusammengehalten werden.

Zwei Hauptforderungen sind an die Erbsubstanz zu stellen: Erstens muß sie eine große Variabilität aufweisen, damit der Informationsgehalt für alle

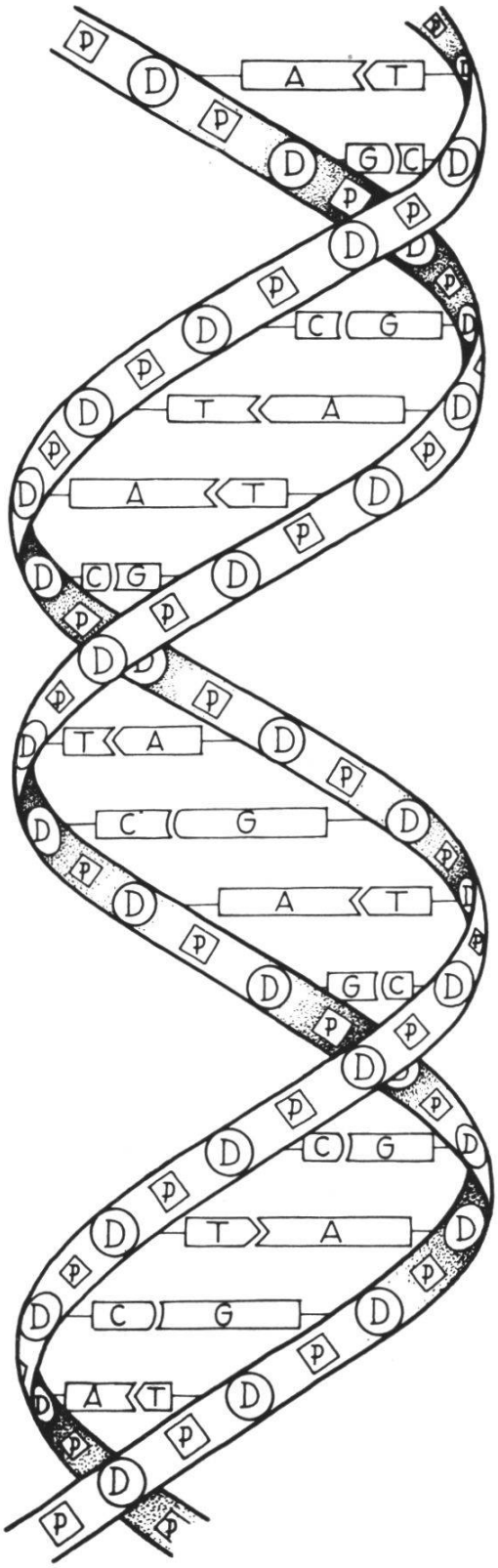

Abb. 5: Struktur der DNA-Doppelhelix. Die beiden seitlichen Bänder bestehen aus Desoxyribose (D) – Phosphat (P)-Ketten. Sie werden entweder durch ein Thymin (T) – Adenin (A) oder Cytosin (C) – Guanin (G)-Basenpaar zusammengehalten.

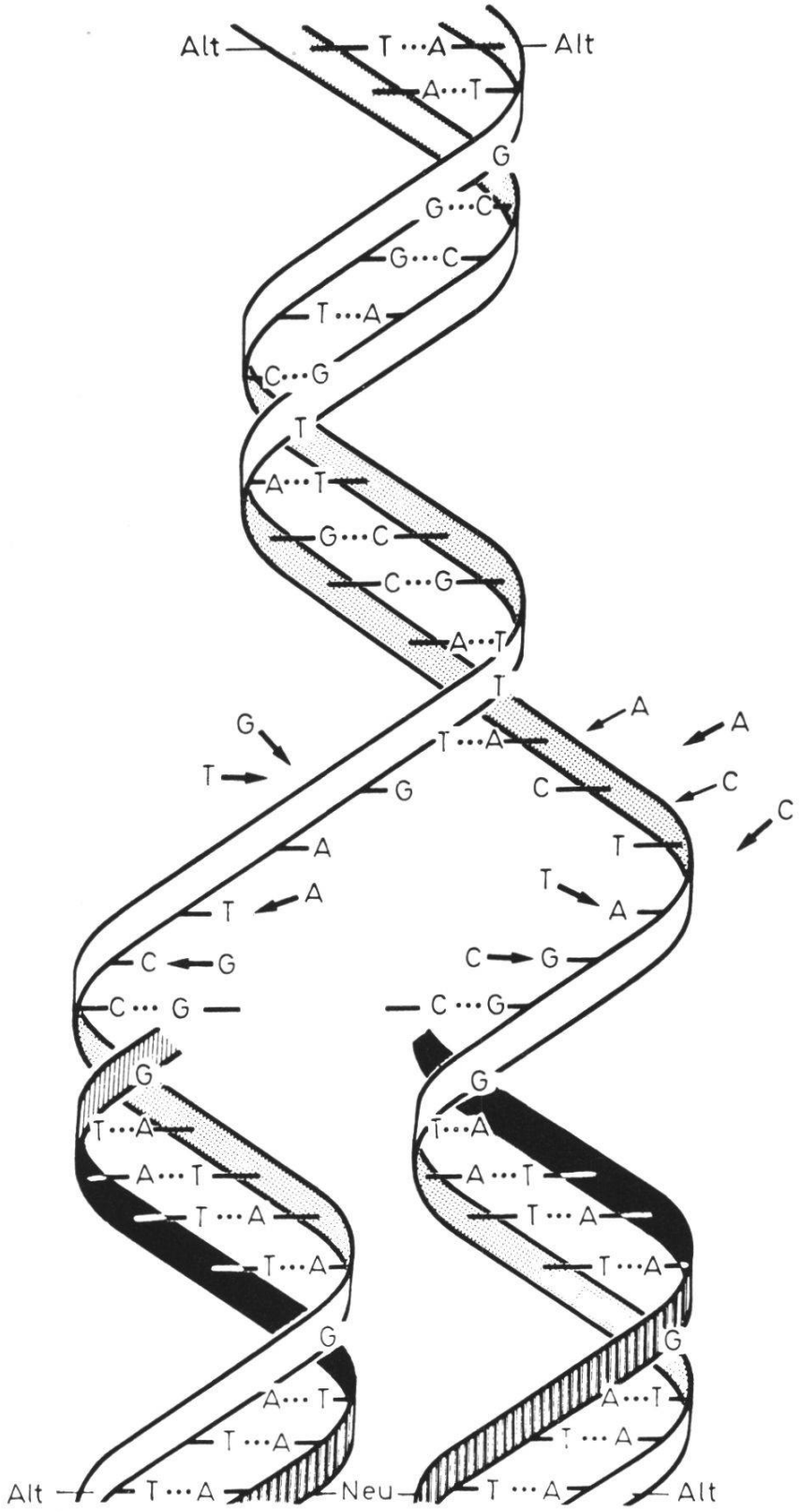

Abb. 6: Replikation der DNA. Alte Stränge hell, neue Stränge dunkel (aus Hadorn und Wehner, 1972).

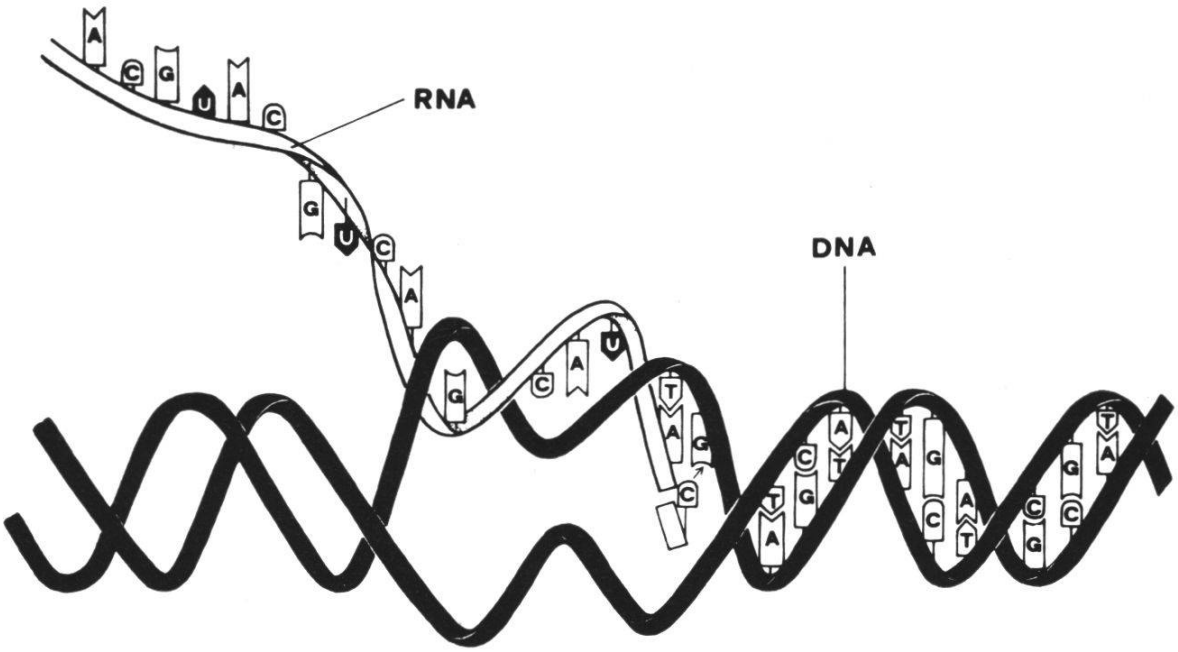

Abb. 7: RNA-Synthese an einem Strang der geöffneten DNA-Doppelhelix. An Stelle von Thymin in der DNA wird Uracil in die RNA eingebaut (nach Hadorn und Wehner, 1972).

Gene aller Lebewesen ausreicht, und zweitens soll sie sich bei jeder Teilung identisch replizieren können. Nehmen wir die zweite Forderung voraus: In Abb. 6 ist die Replikation der DNA schematisch aufgezeichnet. Auf Grund der Paarungsregel A mit T und G mit C entstehen auf einfache Art zwei identische Tochterstrukturen. Die geforderte große Variabilität wird erfüllt, indem der genetische Code in der *Reihenfolge* der vier verschiedenen Basen verschlüsselt liegt. Da jedes Gen eine bestimmte Längenausdehnung hat, ergibt sich schon bei kurzen Genen eine sehr große Anzahl verschiedener Kombinationsmöglichkeiten. Wird ein Gen aktiv, so muß am richtigen der beiden Stränge nach Vorschrift der DNA eine Kopie gebildet werden; diese Kopie besteht aber nicht aus DNA, sondern aus RNA (Abb. 7). Der chemische Unterschied zur DNA

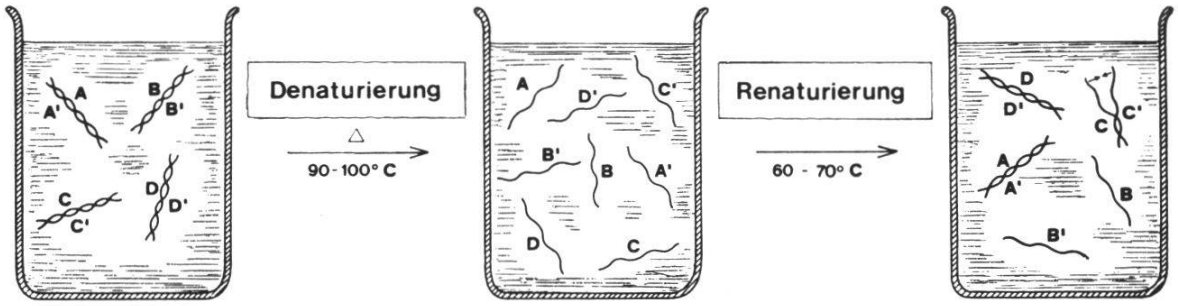

Abb. 8: Denaturierung und Renaturierung von DNA.

liegt darin, daß an Stelle der Desoxyribose Ribose vorkommt und die Base Thymin durch Uracil (U) ersetzt ist. Die Paarungseigenschaften der Basen bleiben sich jedoch gleich: G paart spezifisch mit C, A jetzt neu spezifisch mit U in der RNA. Die nach Vorschrift der DNA gebaute RNA verläßt nun den Zellkern, gelangt ins Cytoplasma, wo gemäß ihrem Informationsgehalt und mit Hilfe der Ribosomen spezifische Proteine synthetisiert werden. Für das Verständnis der folgenden Experimente ist es wesentlich, daß (1.) RNA nur gebildet wird, wenn ein Gen aktiv ist und (2.) diese RNA eine komplementäre Basensequenz zu einem der beiden DNA-Stränge aufweist.

Die DNA-Doppelhelix läßt sich auch experimentell in die beiden komplementären Einzelstränge zerlegen, worauf nachträglich unter geeigneten Bedingungen eine Wiederherstellung der ursprünglichen Struktur möglich ist. In Abb. 8 sind die Verhältnisse etwas vereinfacht dargestellt. Doppelsträngige native DNA wird zunächst in ungefähr gleich große Stücke fragmentiert und anschließend auf 90–100° C erhitzt, so daß sich die Wasserstoffbrücken lösen, welche die komplementären Basen zusammenhalten (Denaturierung). Die nun freien Einzelstränge bewegen sich wahllos und ungerichtet in der Lösung, was zwangsläufig zu Kollisionen zwischen ihnen führt. Treffen sich zufällig bei

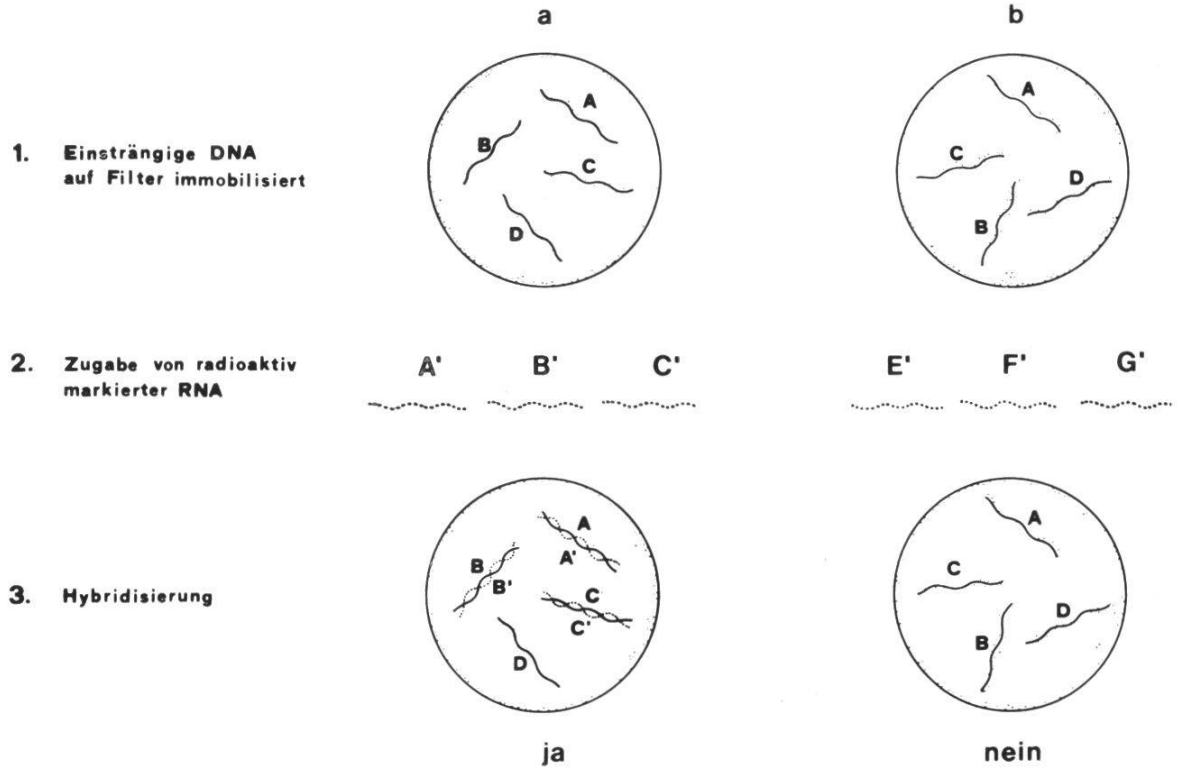

Abb. 9: RNA-DNA- Hybridisierung. a) Die RNA-Sequenzen A', B' und C' hybridisieren mit den komplementären DNA-Sequenzen A, B und C. b) RNA-Sequenzen E', F' und G' sind nicht komplementär zu den DNA-Sequenzen A, B, C und D und können deshalb keine Hybridstruktur eingehen.

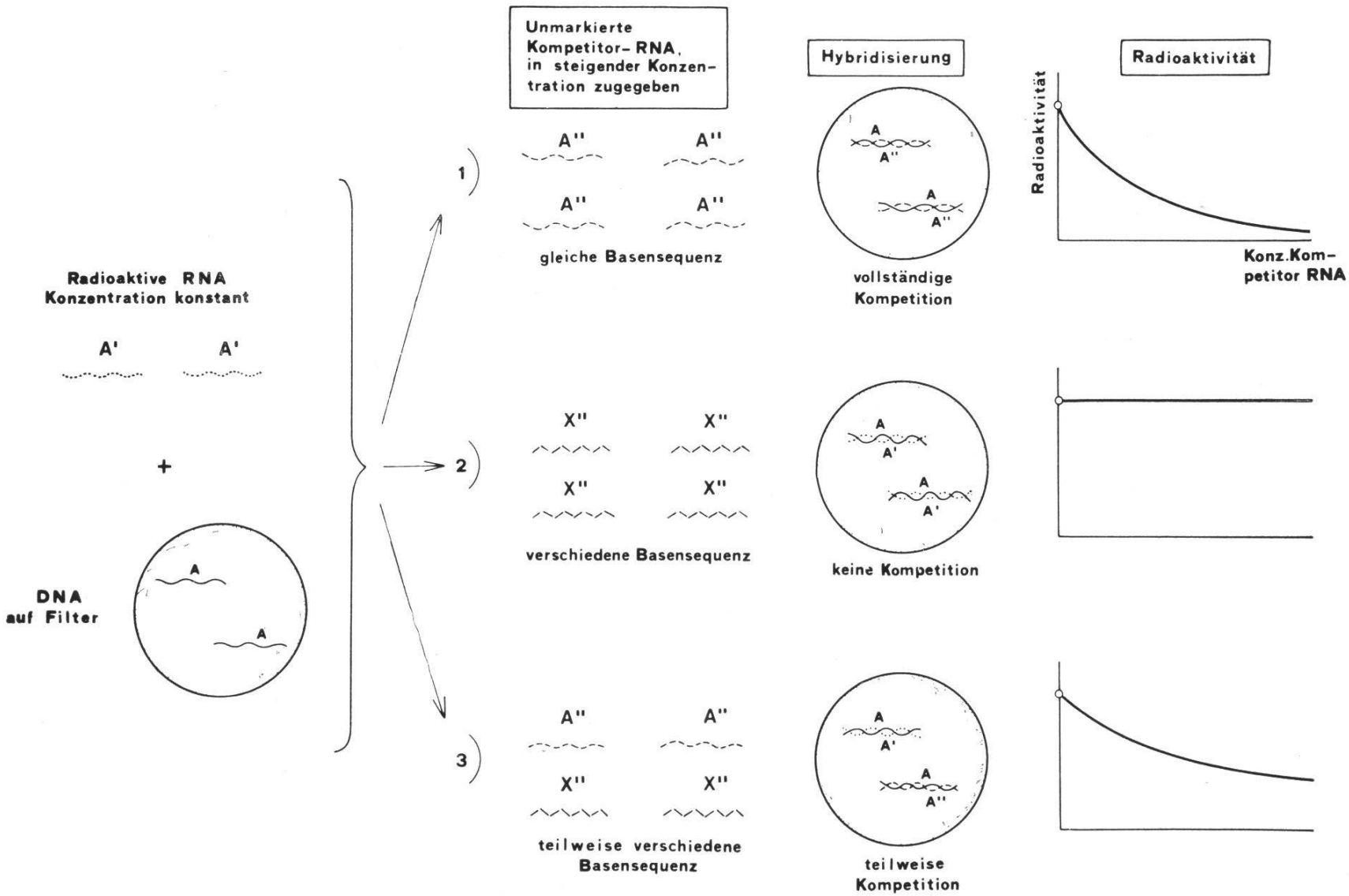

Abb. 10: RNA-DNA-Kompetitions-Hybridisierung. Erklärung im Text.

erniedrigter Temperatur (60–70° C) zwei Stränge mit komplementärer Basensequenz, so vermögen sie die ursprüngliche, doppelsträngige DNA-Struktur wieder herzustellen (Renaturierung). Da sich doppelsträngige und einfachsträngige DNA mit biochemischen und physikalischen Methoden unterscheiden lassen, ist das Ausmaß der De- oder Renaturierung jederzeit meßbar.

Auch die von einem DNA-Strang synthetisierte RNA kann im Experiment zufällig ihren komplementären DNA-Strang finden. Dabei entsteht eine DNA-RNA-Hybridstruktur. Diese Technik der *molekularen Hybridisierung* hat sich als außerordentlich erfolgreich erwiesen, so daß sie zunächst am Modell eingehend besprochen werden soll. Wie die Abb. 9a zeigt, wird einsträngige DNA an ein inertes Substrat (z.B. Nitrocellulosefilter) adsorbiert. Anschließend gibt man radioaktiv markierte RNA zum Filter. Sofern diese RNA zur immobilisierten DNA komplementäre Nukleotidsequenzen aufweist, wird sie hybridisieren und stabile Doppelstrukturen eingehen. Die Menge der hybridisierten RNA läßt sich dabei aus der Radioaktivität auf dem Filter direkt bestimmen. Sind jedoch die Nukleotidsequenzen der zugegebenen RNA und der filtergebundenen DNA verschieden, so können keine Hybriden entstehen (Abb. 9b). Dies tritt dann ein, wenn die zu untersuchende RNA von einer anderen DNA synthetisiert worden ist.

Besonders elegant ist die Technik der *Kompetitions-Hybridisierung* (Abb. 10), da sie eine Antwort auf die Frage erlaubt, ob zwei RNA-Moleküle in ihrer Basensequenz identisch sind oder nicht. Zu einer konstanten Menge einfachsträngiger DNA auf dem Filter wird eine konstante Menge radioaktiv markierter RNA gegeben. Aus der Radioaktivität auf dem Filter läßt sich wiederum die Menge der hybridisierten RNA berechnen. Nun werden zunehmende Mengen von unmarkierter RNA unbekannter Basensequenz (= Kompetitor) in Gegenwart der konstanten Menge radioaktiv markierter RNA zugegeben. Weist nun wie im Fall 1) (Abb. 10), die Kompetitor-RNA (A'') die gleiche oder eine sehr ähnliche Basensequenz auf wie die radioaktive RNA (A'), so vermag sie mit steigender Konzentration die RNA (A') erfolgreich an der Hybridisierung mit dem DNA-Strang (A) zu hindern. Dies äußert sich in einem steilen Abfall der Radioaktivität des Filters mit zunehmender Konzentration des Kompetitors (A''). Ist jedoch die Basensequenz der Kompetitor-RNA (X'') völlig verschieden von derjenigen der radioaktiven RNA (A'), so kompetitiert sie die Hybridisierung zwischen (A') und (A) gar nicht, was sich in einer gleichbleibenden Radioaktivität trotz zunehmender Konzentration der RNA (X'') äußert (Fall 2, Abb. 10). Schließlich ist es möglich, daß die unmarkierte RNA sowohl die Basensequenzen (A'') als auch (X'') enthält. In diesem Fall 3) (Abb. 10) ist zu erwarten, daß diese RNA die radioaktiv markierte RNA nur teilweise kompetitiert, was in einem mittleren Kurvenverlauf zum Ausdruck kommt. Dieselben experimentellen Befunde ergeben sich, wenn fragmentierte DNA als Kompetitor verwendet wird.

Nach diesen theoretischen Überlegungen wollen wir uns nun den Resultaten zuwenden. McCarthy und Hoyer (1964) haben *RNA* aus Niere, Milz und Leber der Maus isoliert und als Kompetitoren in der Hybridisierungsreaktion zwischen

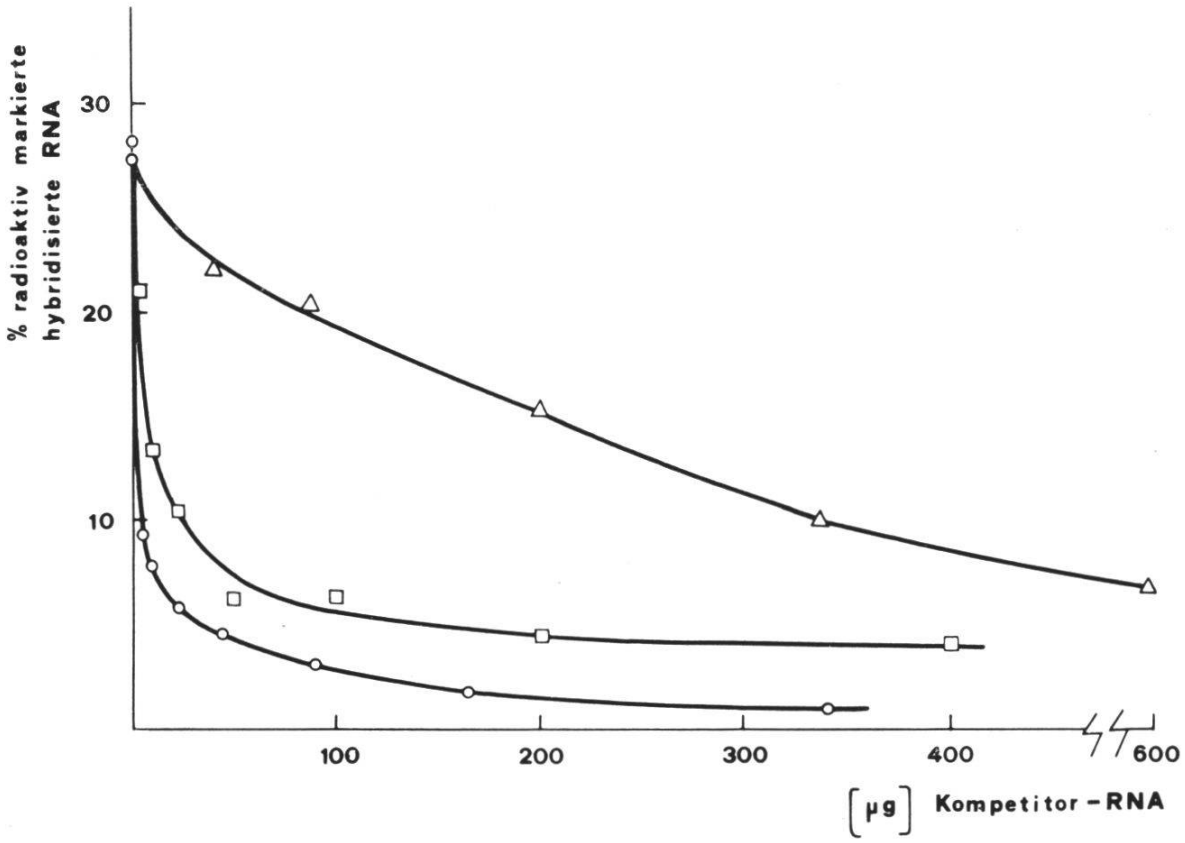

Abb. 11: Kompetition der Hybridisierungsreaktion zwischen radioaktiv markierter RNA aus der Niere und DNA aus Embryonen der Maus durch unmarkierte RNA aus Leber (△), Milz (□) und Niere (○). RNA aus der Niere ist ein besserer Kompetitor als RNA aus Milz oder Leber (aus McCarthy und Hoyer, 1964).

DNA und radioaktiv markierter RNA der Niere verwendet (Abb. 11). Dabei erwies sich RNA aus der Niere als ein sehr guter, RNA aus Milz und Leber jedoch als schlechtere Kompetitoren. Dieses Ergebnis muß so interpretiert werden, daß in Milz und Leber RNA-Moleküle vorkommen, die nicht in der Niere vorhanden sind. Wird jedoch *DNA* aus den verschiedensten Geweben, wie Niere, Gehirn, Thymus, Milz oder Leber isoliert und als Kompetitoren in der Hybridisierungsreaktion zwischen radioaktiv markierter Maus-DNA aus einer Zellkultur und immobilisierter DNA aus Embryonen eingesetzt, so erweisen sich alle DNA-Moleküle als gleich gute Kompetitoren (Abb. 12). Lediglich DNA aus dem Bakterium *Escherichia coli* vermag die Hybridisierung zwischen Maus-DNA nicht zu kompetitieren, was nur bedeuten kann, daß keine gemeinsamen DNA-Sequenzen im Genom der beiden Organismen nachweisbar sind.

Diese experimentellen Befunde galten als Beweis für eine genetische Identität der verschiedenen Zelltypen eines adulten Organismus und für die Theorie, daß die Zelldifferenzierung auf differentieller Genaktivität beruht.

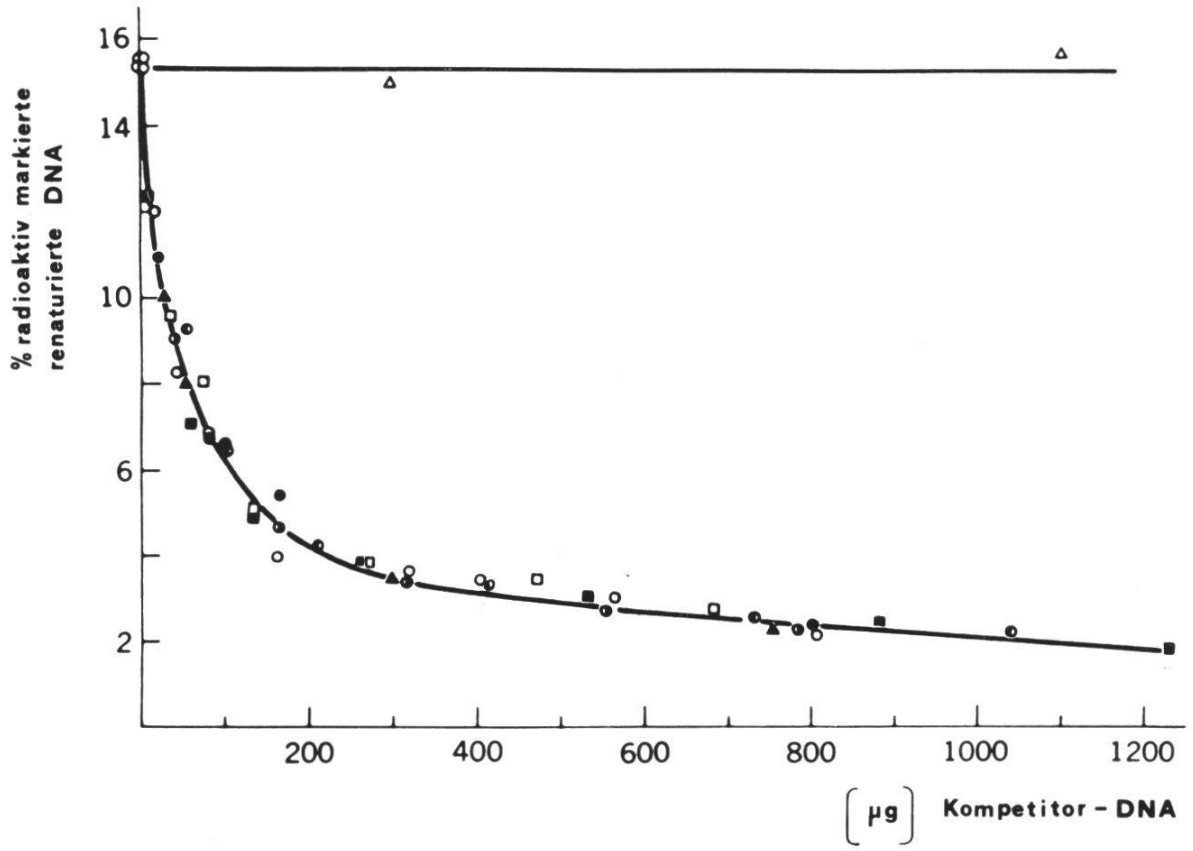

Abb. 12: Kompetition der Hybridisierungsreaktion zwischen radioaktiv markierter DNA aus einer Zellkultur und DNA aus Embryonen der Maus durch unmarkierte DNA-Fragmente. Die Kompetitor-DNA stammt aus dem Bakterium *B. subtilis* (△), aus Embryonen (●) oder verschiedenen Geweben der Maus: Niere (■), Gehirn (□), Thymus (◑), Milz (◐), Leber (▲) oder Zellkultur (○). DNA von *B. subtilis* vermag die Hybridisierungsreaktion nicht zu kompetitieren, während alle DNA-Fragmente aus den verschiedenen Geweben der Maus gleich gute Kompetitoren sind (aus McCarthy und Hoyer, 1964).

6. Kritik des Dogmas der genetischen Identität differenzierter Zellen

Aus allen bisher besprochenen Experimenten und Beobachtungen muß geschlossen werden, daß differenzierte Zellen eines höheren Organismus genetisch identisch sind. Diese Aussage erhielt annähernd den Status eines biologischen Dogmas. Im folgenden soll nun an der Allgemeingültigkeit dieses Dogmas Kritik geübt werden.

Zunächst gilt es, die Interpretation der Kompetitions-Hybridisierungsexperimente zu analysieren. Es zeigte sich bald, daß die von McCarthy und Hoyer (1964) verwendete Hybridisierungs-Technik nicht sehr empfindlich ist, da es mit dieser Methode nicht gelingt, DNA-Sequenzen von verschiedenen, jedoch nahe verwandten Species voneinander zu unterscheiden (Hoyer et al.,

1965). Außerdem haben Britten und Kohne (1968) sehr deutlich nachweisen können, daß im Genom höherer Organismen gewisse DNA-Sequenzen in vielen Kopien (repetitive DNA-Sequenzen) vorhanden sind. So enthält z.B. das Genom der Maus ca. 10 % DNA-Sequenzen, die ungefähr eine Million mal in jedem Zellkern von Körperzellen vorkommen (Abb. 13). Weitere 15 % der Gesamt-DNA sind in 1000 bis 100 000 ähnlichen Kopien vorhanden. Der größte Teil des Genoms (ca. 70 %) ist aus nicht-repetitiven DNA-Sequenzen aufgebaut. Sie entsprechen sehr wahrscheinlich Genen, die in einer einzigen Kopie vorkommen.

In den Experimenten von McCarthy und Hoyer (1964) sind die Versuchsbedingungen so gewählt worden, daß lediglich die repetitiven DNA-Sequenzen erfaßt worden sind. Somit muß ihre damalige Interpretation eingeschränkt werden. Die Aussage, daß Zellen aus verschiedenen Geweben desselben Organismus qualitativ identisch sind, gilt damit nur noch für die repetitiven DNA-Sequenzen. Dabei ist es durchaus möglich, daß qualitative Unterschiede in den nicht-repetitiven DNA-Sequenzen zwischen Zellen verschiedener Gewebe bestehen.

Ebenso sind die Resultate der cytologischen Untersuchungen kritisch zu interpretieren. Die meisten DNA-Bestimmungen basieren auf cytophotometrischen Messungen gefärbter Zellkerne. Leider ist auch hier die Methode

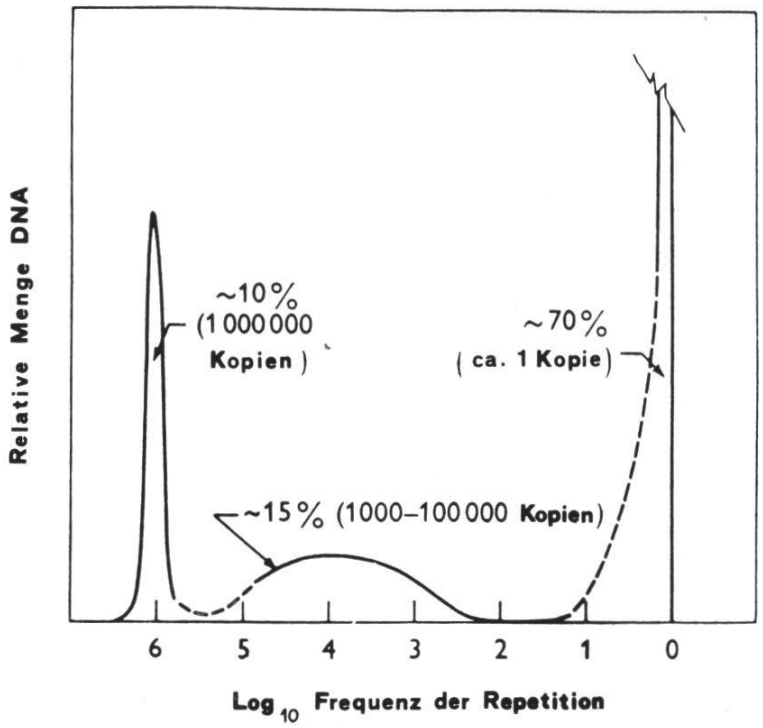

Abb. 13: Repetitive und nicht-repetitive DNA-Sequenzen bei der Maus. Die relative Menge der DNA ist gegen den Grad der Repetition (log) aufgetragen. Gestrichelte Linien kennzeichnen Regionen grosser Unsicherheit (aus Britten und Kohne, 1968).

nicht sehr sensitiv, und kleine Unterschiede im DNA-Gehalt verschiedener Zellkerne werden nicht registriert. Bereits bekannte Ausnahmen von der Regel der DNA-Konstanz differenzierter Zellen stellen die Polyploidie und Polytänie (S. 30) dar. Eine solche zusätzliche DNA-Synthese könnte auch nur selektiv einzelne Gene betreffen (Genamplifikation); sie wäre jedoch mit den heute verfügbaren cytologischen Techniken kaum nachweisbar.

Die besten Evidenzen für die qualitative Identität des genetischen Materials verschiedener Zelltypen eines Organismus stammen zweifellos aus der experimentellen Embryologie. Wenn eine einzelne Pflanzenzelle aus differenziertem Gewebe wiederum eine ganze Pflanze bilden kann, oder wenn beim Krallenfrosch aus einem Zellkern des Dünndarms, der in eine entkernte Eizelle injiziert worden ist, ein normaler Frosch entsteht, so kann dies nur bedeuten, daß ein differenzierter Kern noch alle genetische Information enthält, die für die Entwicklung eines normalen Organismus benötigt wird. Diese Experimente schließen jedoch keineswegs eine *quantitative* Veränderung des Genoms einzelner Zellen im Verlauf der Entwicklung aus. Auch ist es durchaus möglich, daß das genetische Material während der Differenzierung reversibel verändert wird; nur eine *irreversible* Veränderung der DNA läßt sich nicht mit den experimentellen Befunden in Einklang bringen.

Der Beweis, daß eine differenzierte Zelle oder deren Zellkern *qualitativ* noch die gesamte genetische Information enthält, ist bisher nur für wenige Arten erbracht worden. Bei Pflanzen wurde dies für die Karotte, den Tabak und ein paar andere Arten gezeigt. Im Tierreich ist dieser Nachweis bis jetzt nur beim afrikanischen Krallenfrosch *Xenopus laevis* gelungen, jedoch nie – trotz ausgedehnter Versuche – bei anderen Froscharten. So bleibt vorläufig die Frage noch unbeantwortet, ob die Verhältnisse, die bei *Xenopus* gelten, verallgemeinernd für alle Arten gültig sind, oder ob *Xenopus* nur eine Ausnahme darstellt.

Offensichtliche Ausnahmen von der Regel, daß alle differenzierten Zellen eines Organismus qualitativ und quantitativ denselben Gengehalt aufweisen, sind teilweise schon lange bekannt. Es betrifft dies Genamplifikation, Chromatindiminution und vollständiger Genverlust; sie sollen nun abschließend besprochen werden.

7. *Genamplifikation*

In Oocyten von Amphibien und einigen anderen Organismen wurde mit Hilfe der Hybridisierungstechnik eine selektive Vermehrung von Genen festgestellt, die für die Synthese von ribosomaler RNA (rRNA) verantwortlich sind (Brown und Dawid, 1968; Gall, 1969). Diese spezielle RNA wird für den Aufbau von Ribosomen benötigt. Das als *Genamplifikation* bezeichnete Phänomen führt somit zu einem *quantitativ* unterschiedlichen Gengehalt zwischen Oocyten und somatischen Zellen. Dabei ist das Ausmaß der Genamplifikation sehr beträchtlich: Während der Oogenese entstehen zusätzlich 1000-4000 Kopien von rRNA-codierenden Genen. Für somatische Zellen ist eine ähnliche

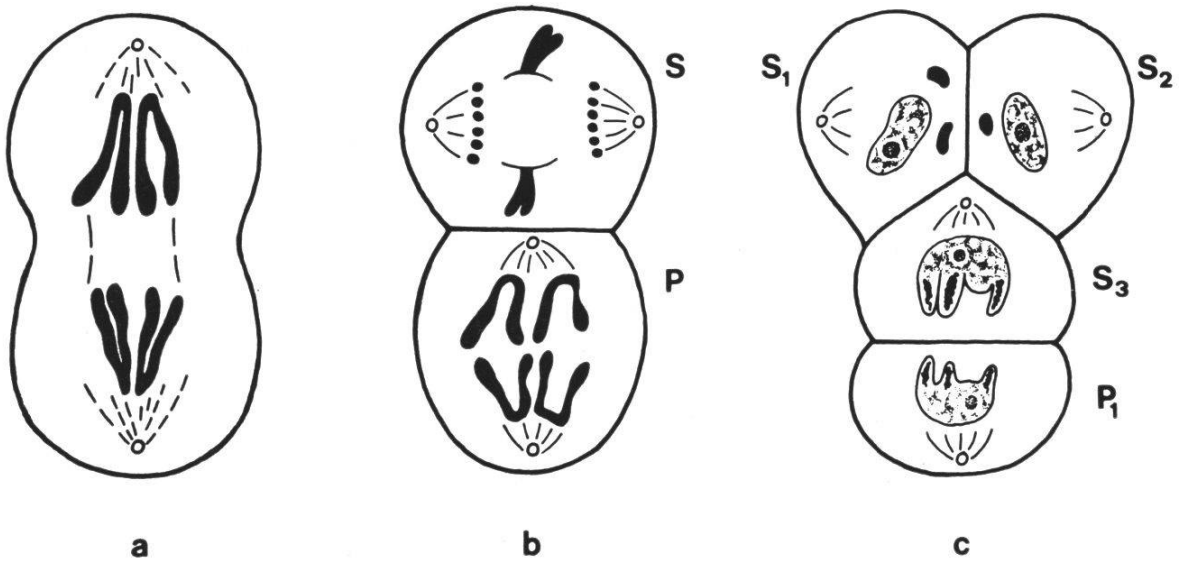

Abb. 14: Chromatindiminution bei *Ascaris*. a) Teilung der befruchteten Eizelle zum 2-Zeller. b) Teilung zum 4-Zeller. Die Chromatindiminution erfolgt in der Zelle S, sie unterbleibt in der Zelle P. c) 4-Zeller nach Abschluß der Zellteilung. Aus den Zellen S_1, S_2 und S_3 entsteht das Soma, aus der Zelle P_1 die Keimbahn.

Amplifikation von ribosomaler DNA nie mit Sicherheit nachgewiesen worden. Einzig Speicheldrüsenchromosomen der Mückenlarve *Rhynchosciara* zeigen eine lokale DNA-Synthese in speziellen DNA-Puffs (Pavan, 1965). Im Gegensatz zur Genamplifikation in den Oocyten ist jedoch über die Funktion dieser zusätzlichen DNA nichts bekannt.

8. Chromatindiminution

Im Jahre 1887 entdeckte Theodor Boveri beim Spulwurm *Ascaris* die *Chromatindiminution*. Bei der Teilung des sich entwickelnden Keimes vom Zwei- zum Vierzeller (Abb. 14b) tritt ein unerwartetes Ereignis ein: Während in der einen Zelle (P) die Verteilung der Chromosomen auf die beiden Tochterkerne normal erfolgt, zerfallen in der anderen Zelle (S) die Chromosomen in viele kleine Einzelchromosomen. Nur diese werden anschließend den beiden Tochterkernen zugeteilt, die distalen Chromosomenschenkel bleiben im Cytoplasma liegen (Abb. 14c) und werden später resorbiert. Nach Abschluß der Zellteilung enthalten deshalb die Kerne der beiden Zellen S_1 und S_2 weniger DNA als diejenigen der Zellen P_1 und S_3. In der nächsten Teilung vom Vier- zum Achtzeller findet die Chromatindiminution auch in der S_3-Zelle statt. Boveri verfolgte nun das Schicksal der einzelnen Zellen und stellte fest, daß die Zellen mit der reduzierten Menge DNA den adulten Körper aufbauen, während aus den Zellen mit dem vollen DNA-Gehalt alle Keimzellen des Spulwurms hervorgehen. Somit läßt sich bei *Ascaris* eine Differenzierung in Soma und Keimbahn nachweisen; dabei enthalten die Keimbahnzellen offensichtlich mehr DNA als die Somazellen.

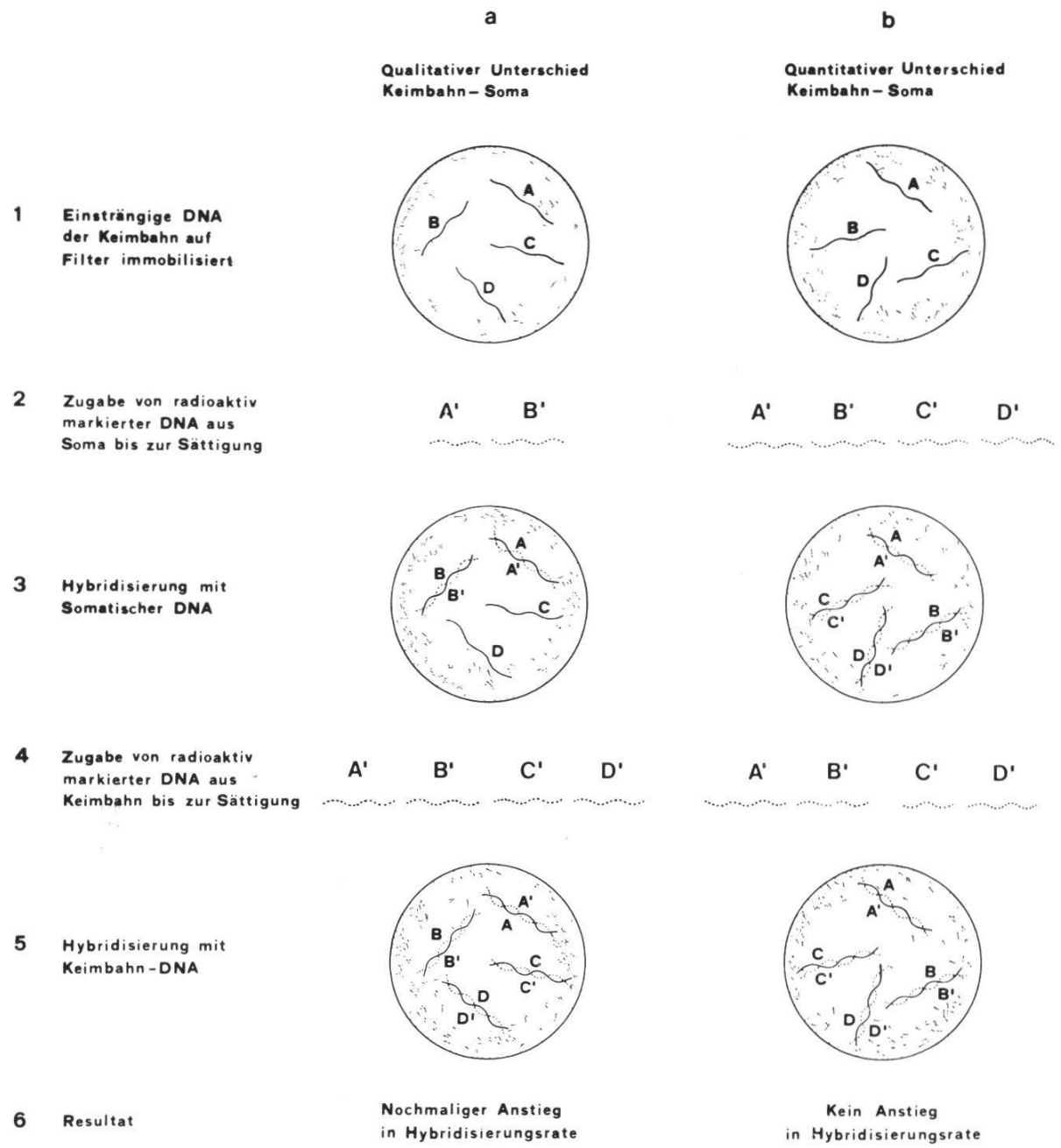

Abb. 15: Sequentielle Hybridisierung. Erklärung im Text.

Hier stellt sich nun die wichtige Frage nach dem genetischen Informationsgehalt der keimbahnbegrenzten DNA. Sind in ihr Gene enthalten, die nur den Keimbahn- aber nicht den Somazellen zugeteilt worden sind, d.h. besteht zwischen den DNA-Sequenzen der Keimbahn und des Somas ein qualitativer oder lediglich ein quantitativer Unterschied?

Mit Hilfe der Technik der *sequentiellen Hybridisierung* versuchten wir (Tobler et al., 1972), dieses Problem zu lösen. Die Idee des Experimentes ist in Abb.15 skizziert. Im Fall a) wird angenommen, daß zwischen Keimbahn und Soma ein qualitativer Unterschied besteht (die DNA-Sequenzen C' und D' kommen nur

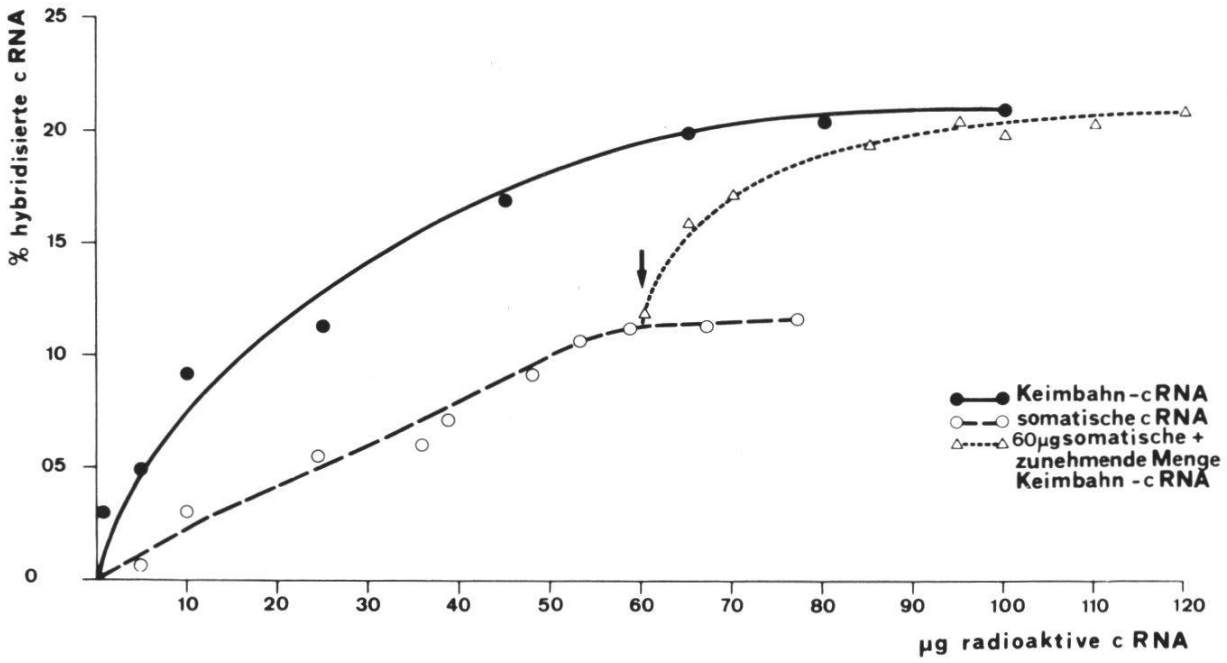

Abb. 16: Sättigungshybridisierung der Keimbahn-DNA von *Ascaris lumbricoides* mit cRNA [1] von Keimbahn-DNA (●—●) und cRNA von somatischer DNA (○—○). Nach Bestimmung des Sättigungswertes für somatische cRNA wurde zusätzlich Keimbahn-cRNA zugegeben (Pfeil). Der erneute Anstieg in der Radioaktivität (△—△) weist auf einen qualitativen Unterschied in den analysierten DNA-Sequenzen zwischen Keimbahn und Soma hin (aus Tobler et al, 1972).

in der Keimbahn vor), während sich im Fall b) die DNA-Sequenzen quantitativ unterscheiden. Zunächst wird einsträngige DNA aus Zellen der Keimbahn auf einem Filter immobilisiert. Anschließend wird radioaktiv markierte einsträngige DNA aus somatischen Zellen bis zur Sättigung zugegeben. Im Fall a) hybridisieren nur die DNA-Stränge A' und B' mit ihren komplementären Partnern, im Fall b) zusätzlich auch die Sequenzen C' und D'. Wird nun in einem zweiten Schritt einsträngige, radioaktiv markierte DNA aus Zellen der Keimbahn zugegeben, so ist im Fall a) ein weiterer Anstieg in der Hybridisierungsrate zu erwarten, da nun die keimbahnspezifischen Sequenzen C' und D' mit ihren noch freien, komplementären Partnern zu hybridisieren vermögen. Unterscheiden sich jedoch Keimbahn- und Soma-DNA nur quantitativ voneinander (Fall b), so ist kein zweiter Anstieg in der Hybridisierungsrate zu erwarten, da ja alle Sequenzen bereits nach Zugabe der somatischen DNA abgesättigt worden sind.

[1] Da die radioaktive Markierung von Keimbahn-DNA bei lebenden Ascaris nicht gelang, wurde im vorliegenden Sättigungshybridisierungsversuch eine zu DNA komplementäre RNA (cRNA) verwendet, die in vitro enzymatisch an Keimbahn- und Soma-DNA synthetisiert worden war. Es darf jedoch angenommen werden, dass diese cRNA eine getreue Kopie der DNA-Sequenzen darstellt.

Die experimentellen Resultate sind in der Abb. 16 dargestellt. Daraus wird klar ersichtlich, daß die Hybridisierung der Keimbahn-DNA mit somatischen DNA-Sequenzen einen geringeren Sättigungsgrad erreicht als mit DNA-Sequenzen aus der Keimbahn. Wird jedoch nach Erreichen der Sättigung mit somatischer DNA zusätzlich Keimbahn-DNA zugegeben, so steigt die Hybridisierungsrate auf das Niveau der Keimbahn-DNA an. Offensichtlich enthält die Keimbahn spezifische DNA-Sequenzen, die in den somatischen Zellen nicht vorkommen. Dabei wurden allerdings aus experimentellen Gründen ausschließlich repetitive DNA-Sequenzen erfaßt. Ein *qualitativer* Unterchied zwischen Keimbahn- und Soma-DNA ist deshalb nur für diese DNA-Sequenzen nachgewiesen. Theoretisch bleibt die Möglichkeit bestehen, daß auch Somazellen eine Kopie der eliminierten, repetitiven DNA-Sequenzen in ihrem Genom zurückbehalten haben.

Leider ist über die *Funktion* der keimbahnspezifischen DNA bei *Ascaris* nichts bekannt. Hingegen lassen Experimente bei zwei Gallmückenarten darauf schließen, daß diese DNA für die Keimzellreifung unentbehrlich ist. Embryonen von *Wachtliella* (Geyer-Duszynska, 1966) und *Mayetiola* (Bantock, 1970) enthalten in ihren Keimbahnzellen den vollen Chromosomengehalt von ca. 40 Chromosomen, in den somatischen Zellen jedoch lediglich 8 Chromosomen. Wird die Chromosomenelimination experimentell auch in der Keimbahn ausgelöst, so wird den zukünftigen Keimzellen ebenfalls die reduzierte Anzahl von 8 Chromosomen zugeteilt. Solche Embryonen entwickeln sich zu sterilen, sonst jedoch normalen adulten Mücken. Aus diesem Resultat muß geschlossen werden, daß die eliminierten Chromosomen genetische Information enthalten, die für die normale Keimzellbildung unentbehrlich ist.

9. Vollständiger DNA-Verlust in einigen spezialisierten Zellen

Ausnahmen von der Regel der DNA-Konstanz differenzierter Zellen stellen alle jene Fälle dar, wo Zellen ihren Kern, und somit den Hauptanteil des genetischen Materials einer Zelle, endgültig verloren haben. Dies trifft zu für Erythrocyten der Säuger, Linsenfaserzellen von Wirbeltieren und Siebzellen von Pflanzen. Bei all diesen Beispielen handelt es sich um irreversible Differenzierungen, wobei solche Zellen weder zu Zellteilungen noch zu weiteren Differenzierungsleistungen fähig sind.

10. Zusammenfassung

Viele Evidenzen sprechen für eine genetische Identität differenzierter Zellen eines Organismus. Andererseits sind einige wichtige Ausnahmen zu dieser Regel bekannt geworden. So führt die Genamplifikation zu *quantitativ* verschiedenem Gengehalt zwischen Oocyten und somatischen Zellen. Die Chromatindiminution bei *Ascaris* hat einen *qualitativen* Unterschied im Anteil an repetitiven DNA-Sequenzen zwischen Zellen der Keimbahn und des Somas zur Folge. Die Frage,

ob quantitative oder qualitative Unterschiede im Gengehalt für die Zelldifferenzierung von Bedeutung sind, kann heute noch nicht endgültig beantwortet werden.

Meinen Mitarbeitern O. Kuhn, C. Singeisen, H. Walt und E. Zulauf danke ich sehr herzlich für die kritische Durchsicht des Manuskriptes. Herrn P. Geinoz bin ich für die sorgfältige Ausführung der Zeichnungen zu aufrichtigem Dank verpflichtet.

Literaturverzeichnis

BANTOCK, C. R.: Experiments on chromosome elimination in the gall midge, *Mayetiola destructor*. J. Embryol. exp. Morph. *24*, 257–286 (1970).

BEERMANN, W.: Chromosomenkonstanz und spezifische Modifikationen der Chromosomenstruktur in der Entwicklung und Organdifferenzierung von *Chironomus tentans*. Chromosoma *5*, 139–198 (1952).

BOVERI, Th.: Über Differenzierung der Zellkerne während der Furchung des Eies von *Ascaris megalocephala*. Anat. Anz. *2* (1887).

BRIGGS, R. and KING, T. J.: Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frog eggs. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) *38*, 455–463 (1952).

BRITTEN, R. J. and KOHNE, D. E.: Repeated sequences in DNA. Science *161*, 529–540 (1968).

BROWN, D. D. and DAWID, I. B.: Specific gene amplification in oocytes. Science *160*, 272–280 (1968).

DRIESCH, H.: Entwicklungsmechanische Studien. Z. wiss. Zool. *53*, 160–182 (1891).

FISCHBERG, M. and BLACKLER, A. W.: How cells specialize. Scientific American *205*, (9), 124–140 (1961).

GALL, J. G.: The genes for ribosomal RNA during oögenesis. Genetics *61*, 121–132 (1969).

GEYER-DUSZYŃSKA, I.: Genetic factors in oögenesis and spermatogenesis in *Cecidomyidae*. In: Darlington, C. D., Lewis, K. R. (Eds): Chromosomes Today *1*, 174–178. Edinburgh: Oliver and Boyd 1966.

GURDON, J. B.: Transplanted nuclei and cell differentiation. Scientific American *219*, (6), 24–35 (1968).

HADORN, E.: Problems of determination and transdetermination. In: Genetic control of differentiation. Brookhaven Symp. Biol. *18*, 148–161 (1965).

– und WEHNER, R.: Allgemeine Zoologie, begründet von Alfred Kühn. Stuttgart: Georg Thieme Verlag 1972.

HOYER, B. H., BOLTON, E. T., MCCARTHY, B. J. and ROBERTS, R. B.: The evolution of polynucleotides. In: BRYSON, V., VOGEL, H. J. (Eds.): Evolving genes and proteins. 581–590. New York: Academic Press 1965.

MCCARTHY, B. and HOYER, B. H.: Identity of DNA and diversity of messenger RNA molecules in normal mouse tissues. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) *52*, 915–922 (1964).

PAVAN, C.: Nucleic acid metabolism in polytene chromosomes and the problem of differentiation. Brookhaven Symp. Biol. *18*, 222–241 (1965).

ROUX, W.: Beiträge zur Entwicklungsmechanik des Embryos. 5. Über die künstliche Hervorbringung halber Embryonen durch Zerstörung einer der beiden Furchungskugeln, sowie über die Nachentwicklung (Postgeneration) der fehlenden Körperhälfte. Virchow's Arch. *64*, 113–154, 246–291 (1888).

SPEMANN, H.: Über verzögerte Kernversorgung von Keimteilen. Verh. Deutsch. Zool. Ges. Freiburg, 216–221 (1914).

TOBLER, H., SMITH, K. D. and URSPRUNG, H.: Molecular aspects of chromatin elimination in *Ascaris lumbricoides*. Develop. Biol. *27*, 190–203 (1972).

VASIL, V. and HILDEBRANDT, A. C.: Further studies on the growth and differentiation of single, isolated cells of tobacco *in vitro*. Planta *75*, 139–151 (1967).

VENDRELY, R.: The deoxyribonucleic acid content of the nucleus. In: CHARAGAFF, E., DAVIDSON, J. N. (Eds.): The nucleic acids *2*, 155–180. New York: Academic Press Inc. 1955.

WEISMANN, A.: Die Kontinuität des Keimplasmas. Jena: Fischer 1885.

YAMADA, T.: Cellular and subcellular events in Wolffian lens regeneration. In: MONROY, A., MOSCONA, A. A. (Eds.): Current topics in developmental biology *2*, 247–283. New York-London: Academic Press 1967.