

Zeitschrift: Verhandlungen der Schweizerischen Naturforschenden Gesellschaft.
Wissenschaftlicher und administrativer Teil = Actes de la Société
Helvétique des Sciences Naturelles. Partie scientifique et administrative
= Atti della Società Elvetica di Scienze Naturali

Herausgeber: Schweizerische Naturforschende Gesellschaft

Band: 149 (1969)

Artikel: Regulationsphänomene bei der Differenzierung

Autor: Tiedemann, H.

DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-90682>

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: 25.04.2026

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

Regulationsphänomene bei der Differenzierung

H. TIEDEMANN

Institut für Physiologische Chemie, FU Berlin

Summary

The metabolism of different RNA Species in eggs and embryos and the control of differentiation at the transcriptional and translational level have been extensively investigated in several laboratories. Ribosomes and DNA like RNA which are synthesized in the oocyte are stored and used together with newly formed RNA in the early stages of embryogenesis. The synthesis of new ribosomes in amphibians is not directly correlated with differentiation.

The mesoderm-endoderm anlage in amphibian embryos is determined by the vegetalizing inducing factor, a protein of relatively low molecular weight. The action of the factor is counterbalanced by an inhibitor, which is an acidic protein.

The further differentiation of the mesoderm-endoderm anlage depends on mutual inductions between different parts of the anlage. The effectors involved in these interactions may likewise be proteins.

Experiments with actinomycin D (inhibitor of RNA synthesis) and with cycloheximid (inhibitor of protein synthesis) show that a tight correlation exists between the translational and transcriptional control of differentiation. A hypothetical model for the regulation of differentiation at the translational and transcriptional level is proposed.

Die Differenzierung eines befruchteten Eies zum erwachsenen Organismus ist unter kausalmorphologischen Gesichtspunkten schon sehr eingehend untersucht worden. Auf der molekularen Ebene sind unsere Kenntnisse über den Mechanismus der Differenzierung jedoch weniger vollständig. Die molekulare Biologie hat sich zunächst an Mikroorganismen orientiert. Die Grundmechanismen der Nukleinsäure- und Proteinbiosynthese sind bei Mikroorganismen und bei höheren Organismen zweifellos sehr ähnlich. Mit der Entwicklung höherer Organismen haben sich aber Kontrollmechanismen ausgebildet, die es bei Mikroorganismen nicht gibt.

Die Embryonalentwicklung geht von der Eizelle aus, in der bereits die gesamte Information für die Differenzierung zum erwachsenen Organismus niedergelegt ist. Diese Eizelle darf man sich aber nicht als eine von

einer Zellmembran umgebene Zytoplasmablase vorstellen, in der der Zellkern schwimmt. Vielmehr hat das Zytoplasma aller Eizellen eine Feinstruktur. Es lassen sich verschiedene Zytoplasmabereiche unterscheiden, die bei einigen Eitypen, z.B. den Eiern der Seescheiden, durch Einlagerung gefärbter Substanzen schon äusserlich unterschieden werden

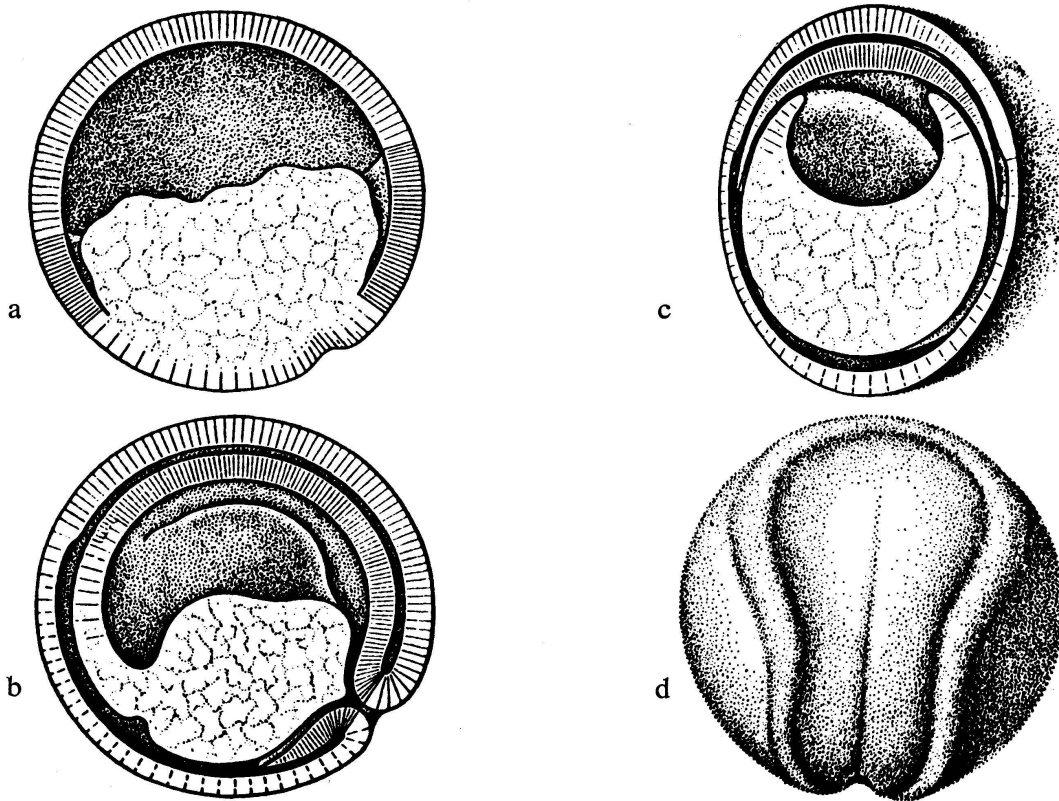


Abbildung 1

Schematische Darstellung der Gastrulation und Neurulation (nach V. HAMBURGER und B. MEYER aus SPEMANN, 1936)

- a) Längsschnitt durch eine frühe Gastrula
- b) Längsschnitt nach beendeter Gastrulation
- c) Querschnitt nach beendeter Gastrulation
- d) Ausbildung der Neuralplatte im dorsalen Ektoderm

können. Der Entwicklungsprozess beginnt mit der Furchung, die mit Kernteilungen einhergeht und zur Aufteilung verschiedener Zytoplasmabezirke auf bestimmte Furchungszellen führt.

Die Embryonalentwicklung ist bei Amphibien, Seeigeln sowie einigen Insektenarten sowohl morphologisch als auch biochemisch sehr eingehend untersucht worden, da diese Arten experimentell relativ leicht zu handhaben sind. Bei den *Amphibien*, die uns vor allem beschäftigen werden, bildet sich aus der gefurchten, etwa stecknadelkopfgrossen Eizelle die Blastula mit einem Hohlraum, dem Blastozöl. Bei der darauffolgenden Gastrulation (Abb. 1) bildet sich in der Nähe des vegetativen Pols im entodermalen Bereich ein Grübchen aus, der Urmund. Der gesamte Be-

reich, der später zu mesodermalen Organen wird, also zu Muskel, Chorda und Niere, wandert über die obere Urmundlippe in das Innere des Keimes ein. Ebenso wandert auch der entodermale Bereich ein, der später zum Verdauungstrakt wird. Das Ektoderm, also der Vorläufer von Haut und Nervensystem, breitet sich aus und umschliesst am Ende der Gastrulation den gesamten Keim. Nach Entfernung der Eihüllen kann man mit Hilfe einer von SPEMANN entwickelten Technik unter Verwendung von Glasnadeln bestimmte Keimbezirke entweder isolieren oder gegeneinander austauschen (H.SPEMANN, 1936). Durch Aufzucht isolierter Bezirke in Salzlösung – Nährstoffe zuzusetzen ist nicht notwendig, da die Keime sehr viel Dotter enthalten – kann man feststellen, ob die Entwicklungsrichtung dieser Keimbezirke bereits festgelegt oder determiniert ist. Die Determination ist also der erste Schritt zur Differenzierung. Das Ektoderm ist im Gegensatz zu allen anderen Keimteilen in der frühen Gastrula noch nicht determiniert. Isoliert aufgezogen, bildet es Stränge von kubischem Epithel (HOLTFRETER, 1938). Durch geeignete Induktionsfaktoren kann es experimentell zu Neuralgewebe, zu Muskel, Chorda oder zu Geweben des Darmtraktes (TAKATA und YAMADA, 1960) induziert werden. Wir werden uns mit diesem Vorgang später noch eingehender beschäftigen. In der Normalentwicklung induziert der eingewanderte Mesodermbereich im darüberliegenden dorsalen Ektoderm die Medullarplatte als Anlage des Nervensystems (MANGOLD, 1933). Man bezeichnet diesen Vorgang als Neuralinduktion.

Die Determination der Entoderm- und Mesodermanlage erfolgt durch den vegetalisierenden Faktor schon sehr früh in der Entwicklung, möglicherweise schon im Zusammenhang mit der Plasmaströmung nach der Befruchtung. Der Faktor (oder zwei chemisch eng verwandte Faktoren) ist wahrscheinlich schon im Zytoplasma der Oozyte prälokalisiert. Die mesodermalen Gewebe sind in der Morula bereits determiniert (HILDEGARD TIEDEMANN, 1967). An der weiteren Segregation der Anlage sind sekundäre Induktionsvorgänge beteiligt. So hängt die Differenzierung der verschiedenen Abschnitte des Darmtraktes von benachbarten mesodermalen Geweben ab (OKADA, 1954a und b; 1955a und b; 1960; TAKATA, 1960).

Die Differenzierung ist mit der Synthese gewebespezifischer Proteine gekoppelt. Die Determination etwa zu Muskel ist aber sicherlich nicht mit dem Beginn der Biosynthese von Aktomyosin, dem kontraktile Muskelprotein, identisch, sondern findet schon viel früher statt. Die sichtbare Differenzierung von Muskelfibrillen ist das Ende einer Kette von Differenzierungsschritten. Ähnliches gilt für die Differenzierung von Blutzellen und die Synthese von Hämoglobin, das erstmals im 7–8-Somitenstadium nachgewiesen werden kann (WILT, 1968).

Da die Proteinbiosynthese und die mit ihr eng verknüpfte Ribonukleinsäurebiosynthese bei unseren Betrachtungen eine grosse Rolle spielen, müssen wir ihren Mechanismus kurz betrachten. Die in der DNS niedergelegte genetische Information wird zunächst auf RNS übertragen. Diesen Schritt nennt man Transkription. Die Basensequenz der RNS wird

dann in die Aminosäuresequenz der Proteine übersetzt. Diesen Schritt nennt man Translation. Bei der Transkription wird an einem Strang der DNS-Doppelhelix im Zellkern Messenger-RNS (*m*-RNS) synthetisiert. Die *m*-RNS hat also eine zum genetisch aktiven DNS-Strang komplementäre Basenzusammensetzung. Nach dem Transport in das Zytoplasma lagern sich an die *m*-RNS Ribosomen an. Die Aminosäuren werden durch Aminosäure-spezifische Transfer-Ribonukleinsäuren an die Kodons der *m*-RNS angelagert und die Peptidbindungen geknüpft. Hierzu sind besondere Faktoren und Enzyme notwendig. Ribosomale RNS und Transfer-RNS werden ebenfalls durch DNS kodiert.

Die Kontrolle dieser Vorgänge kann sowohl bei der Transkription von DNS in RNS, bei der Translation der Basensequenzen der RNS in die Aminosäuresequenzen der Proteine oder bei der Übertragung der Information vom Zellkern in das Zytoplasma erfolgen.

Wir wollen uns zunächst mit dem Ribonukleinsäurestoffwechsel während Eireifung und Embryogenese beschäftigen. Eingehend wurde untersucht, ob RNS, die während der Oogenese synthetisiert wird, in der Oozyte gespeichert und später in der frühembryonalen Entwicklung verwendet wird. Die Hauptmenge der RNS, etwa 90%, ist Ribosomen-RNS. Sie ist analytisch am leichtesten zu erfassen. Der DNS-Abschnitt, an dem Ribosomen-RNS synthetisiert wird, ist vervielfacht. Beim Krallenfrosch *Xenopus laevis* ist das Gen etwa $450 \times$ repliziert. Man spricht auch nicht ganz korrekt von redundanten Genen. Während der Oogenese kommt es im frühen Lampenbürsten-Chromosomen-Stadium, das durch lampenbürstenartige Schleifenbildungen der Chromosomen gekennzeichnet ist, zu einer weiteren, etwa 1000fachen Replikation der ribosomalen DNS, die an zahlreiche kleine Nukleolen abgegeben wird, die zu dieser Zeit in der Oozyte gebildet werden. Somatische Zellen enthalten dagegen nur 2 Nukleolen. Die Nukleolen sind an einer massiven Synthese von Ribosomen beteiligt und stellen dann ihre Funktion ein (IZAWA et al, 1963; EDSTRÖM und GALL, 1963; WALLACE und BIRNSTIEL, 1966; BROWN und DAWID, 1968; BROWN und WEBER, 1968).

Die zahlreichen Nukleolen verschwinden mit der Auflösung des Oozytenkernes während der ersten Reifeteilung. Die beiden Nukleoli werden in den Zellkernen des Embryo erst wieder gebildet, wenn das Gastrulastadium erreicht ist. Zu diesem Zeitpunkt wird auch die Synthese von Ribosomen-RNS wieder aufgenommen (BROWN und LITTNA, 1964). Die Steuerung der *r*-RNS-Synthese ist ein klares Beispiel für das Abschalten und Wiedereinschalten von Genen im Verlauf der Entwicklung.

Von ELSDALE und FISCHBERG (1958) wurde eine *Xenopus*-Mutante entdeckt, die keine Nukleolen bildet. Dieser Mutante fehlen die Gene für die Bildung von 18- und 28-S-Ribosomen-RNS. Homozygote Embryonen dieser Mutante synthetisieren deshalb keine Ribosomen-RNS. Trotzdem entwickeln sich diese Mutanten mit den gespeicherten Ribosomen bis zum Schwanzknospenstadium. Die Differenzierung kann also bis zur Schwanzknospe, in der bereits alle Gewebe angelegt sind, ohne Neusynthese von Ribosomen-RNS ablaufen.

Eine Vervielfältigung anderer Gene, ausser den Genen für Ribosomen-RNS, im Verlauf der Differenzierung einzelner Gewebe ist bisher noch nicht gefunden worden*.

Die Synthese von Transfer-RNS beginnt am Ende des Blastulastadiums, also etwas früher als die Synthese der Ribosomen-RNS (BROWN und LITTNA, 1966a; GURDON und WOODLAND, 1969). Ähnlich verhält sich die Synthese von *r*-RNS und *t*-RNS in Seeigelembryonen.

In Mäuseembryonen, deren Eier offenbar keinen so grossen Vorrat an Ribosomen- und an Transfer-Ribonukleinsäure besitzen, beginnt die Neusynthese von Ribosomen-RNS und Transfer-RNS aber bereits wesentlich früher, nämlich im Vierzellenstadium (WOODLAND und GRAHAM, 1969).

Welche Proteine in einem bestimmten Entwicklungsstadium und in einem bestimmten Keimteil synthetisiert werden, hängt vor allem davon ab, welche Messenger-Ribonukleinsäuren zur Verfügung stehen und welche der verfügbaren Messenger-Ribonukleinsäuren aktiv an der Proteinbiosynthese teilnehmen. Man hat deshalb versucht festzustellen, wann in der Oogenese und der Embryogenese Messenger-Ribonukleinsäuren gebildet werden und wie die Zusammensetzung der Messenger-RNS sich ändert. Es ist schwierig, Messenger-RNS zu charakterisieren. Während die Basenzusammensetzung der *r*-RNS durch einen hohen Guanin-Zytosin-Gehalt ausgezeichnet ist, ähnelt die Basenzusammensetzung der Messenger-RNS mehr der DNS. *m*-RNS wird im allgemeinen schneller synthetisiert als *r*-RNS. Doch sind dies keine eindeutigen Kriterien. In den Zellkernen vieler Gewebe, auch in Zellkernen von Embryonen, wird ausserdem eine sehr hochmolekulare RNS synthetisiert, die in ihrer Basenzusammensetzung der DNS ähnelt. Sie wird sehr schnell umgesetzt. Ihre Halbwertszeit beträgt in manchen Geweben nur 30'. Sie wird nicht in das Zytoplasma transportiert (GEORGIEFF et al., 1963; SCHERRER et al., 1963; SCHERRER et al., 1966; PENMAN et al., 1968; SCHERRER und MARCAUD, 1968). Ihre Funktion ist noch unbekannt. *m*-RNS und die spezielle Kern-RNS können als Desoxyribonukleinsäure-ähnliche RNS, abgekürzt *d*-RNS, bezeichnet werden.

Zurzeit ist es noch nicht möglich, abgesehen von *m*-RNS für Hämoglobin, einzelne *m*-RNS-Spezies zu isolieren. Um festzustellen, wie die RNS-Population sich ändert, ist man deshalb auf andere Methoden angewiesen. Durch DNS-RNS-Hybridisierung (HALL und SPIEGELMAN, 1961; GILLESPIE und SPIEGELMAN, 1965) kann man untersuchen, ob zur DNS komplementäre Sequenzen in einer RNS-Präparation vorliegen. Doppelstrang-DNS wird durch Erhitzen und sehr schnelles Abkühlen in Einzelstränge zerlegt (Abb.2). Die Einzelstränge werden dann bei 66° mit RNS inkubiert. Wenn die RNS zur DNS komplementäre Sequenzen enthält, kommt es zur Bildung eines Doppelstranges von DNS und RNS. Um festzustellen, ob aus verschiedenen Organen oder Entwicklungs-

* Nach Versuchen von E. BELL (Nature 224, 326; 1969) kommen im Zytoplasma embryonaler Zellen DNS-haltige Partikeln vor. BELL nimmt an, dass diese Partikel durch selektive Vermehrung bestimmter Chromosomenabschnitte gebildet werden.

stadien isolierte Ribonukleinsäuren sich unterscheiden, misst man die Konkurrenz der Ribonukleinsäuren um die gleiche DNS. Dabei wird ein RNS-Präparat radioaktiv markiert. Das andere, nicht markierte RNS-Präparat wird dann in steigender Menge zum Inkubationsgemisch zuge-
 setzt. Wenn die inaktive RNS teilweise oder vollständig mit der mar-
 kierten RNS identisch ist, wird die markierte RNS aus dem Hybrid
 verdrängt. Dabei muss man berücksichtigen, dass Nukleinsäuren mit sehr
 ähnlicher Basensequenz nicht unterschieden werden (WALKER, 1969).

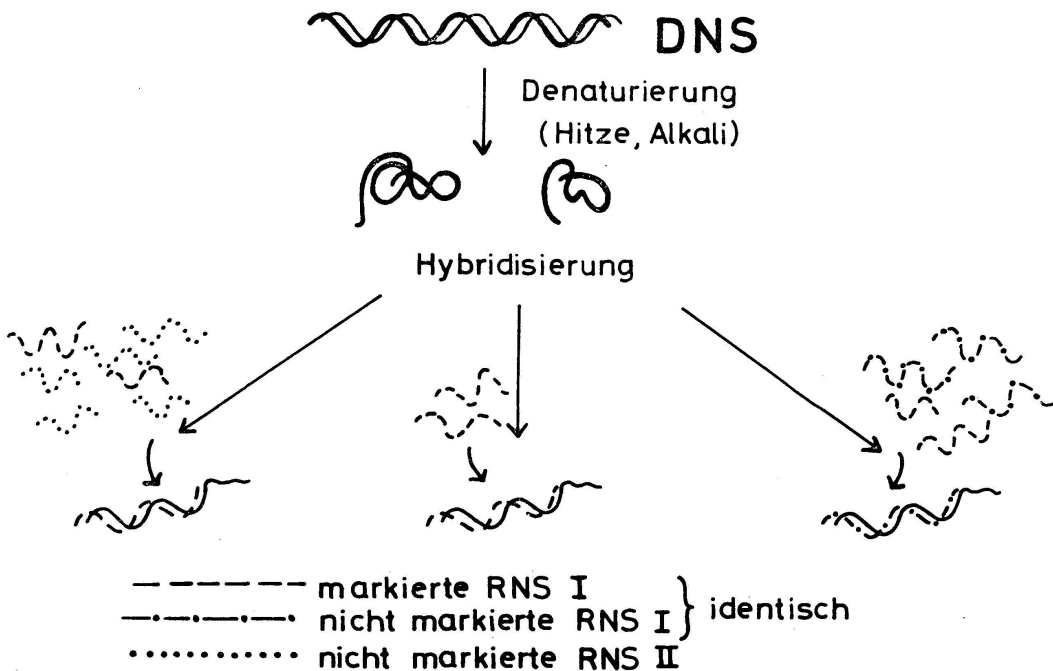


Abbildung 2

Schematische Darstellung der Hybridisierung von RNS mit DNS (s. Text)

Das Auftreten neuer (oder das Verschwinden bereits vorhandener) Ribonukleinsäurespezies bei einer Änderung von Genaktivitäten kann man mit der Hybridisierungsmethode nur unter Sättigungsbedingungen, also bei einem grossen Überschuss von RNS, erfassen. Um geringe qualitative Änderungen der Zusammensetzung eines Ribonukleinsäuregemisches nachzuweisen, ist es zweckmässig, die DNS zunächst durch Vorhybridisierung mit inaktiver RNS zu sättigen und in einer zweiten Hybridisierung das Hybrid mit radioaktiv markierter RNS zu inkubieren. Die markierte RNS hybridisiert (wenn kein Austausch stattfindet) nur, wenn sie RNS-Spezies enthält, die in der inaktiven RNS nicht enthalten sind.

Insbesondere Versuche von BRITTEN und KOHNE (1966, 1968) haben gezeigt, dass ein Teil der DNS sowohl mit sich selbst als auch mit RNS sehr schnell, ein anderer Anteil sehr viel (um Zehnerpotenzen) langsamer hybridisiert. BRITTEN nimmt an, dass der schnell hybridisierende Anteil aus Genen besteht, die im Genom in einer grossen Anzahl gleicher

oder ähnlicher Kopien vorliegen. Um bei Sättigungsversuchen auch den langsam hybridisierenden Teil der DNS sowie nur in wenigen Kopien vorliegende RNS-Arten zu erfassen, muss man mit einem grossen ($> 500\times$) RNS-Überschuss mehrere Tage hybridisieren. Die Mehrzahl der Untersuchungen ist nicht unter so rigorosen Bedingungen durchgeführt worden und erfasst nur den schnell hybridisierenden Anteil.

Markierungsversuche und Hybridisierungsversuche haben gezeigt, dass *d*-RNS während der Oogenese vor allem im Lampenbürstchenchromosomen-Stadium synthetisiert wird (~ 47 ng/Oozyte). Etwa 6% der schnell hybridisierenden Gene und mindestens 0,5% der langsam hybridisierenden Gene sind in der Oozyte an der RNS-Synthese beteiligt (DAVIDSON und HOUGH, 1969). Ein Anteil von 0,3% entspricht noch der stattlichen Anzahl von etwa 10000 Genen für Peptidketten mit je 146 Aminosäuren, entsprechend den β -Ketten des Hämoglobins. Die Oozyten-*d*-RNS dient zum Teil der Proteinsynthese während der Oogenese, zum Teil wird sie gespeichert und auf den Embryo übertragen (CRIPPA et al., 1967).

In Amphibien-Embryonen beginnt die Synthese von *d*-RNS während der Furchung (BROWN und LITTNA, 1966b), in Seeigelembryonen direkt nach der Befruchtung. Die Synthese von *d*-RNS pro Zelle, also pro RNS synthetisierendem Genom, steigt im Verlauf der Entwicklung zunächst an (NEYFAKH, 1969). Sowohl ein Teil der neusynthetisierten RNS als auch gespeicherte RNS erscheinen in Polyribosomen und nehmen an der Proteinsynthese teil (CRIPPA und GROSS, 1969; RINALDI und MONROY, 1969).

Wir haben die Synthese von *d*-RNS und *r*-RNS in Geweben untersucht, die sich in ihrem Differenzierungszustand stark unterscheiden. In gealtertem Ektoderm, das nur aus kubischem Epithel besteht, ist die Synthese von *d*-RNS geringer als in gleich alten Keimen des Neurulastadiums (TIEDEMANN et al., 1965). Die Synthese von *r*-RNS läuft im Ektoderm nur wenig langsamer ab als im Neurulastadium.

Mit Hilfe der Hybridisierungstechnik wurde gefunden, dass im Embryo die neusynthetisierte und die gespeicherte RNS zu einem Teil homologe Sequenzen enthalten (GLISIN et al., 1966; KAFIANI, 1969). Allerdings gehen die experimentellen Befunde in dieser Frage noch auseinander. DAVIDSON und MIRSKY nehmen an, dass in der Blastula ausschliesslich eine ganz spezielle, für die frühe Embryogenese spezifische RNS synthetisiert wird (DAVIDSON et al., 1968).

In der Gastrula ist nach Untersuchungen aus unserem Laboratorium (JANTZEN et al., 1969) bereits ein grosser Teil aller RNS-Spezies vorhanden, die im Schwanzknospenstadium gefunden werden. Die Gastrula enthält wahrscheinlich schon *m*-RNS für die Grundstrukturen der Zelle und die Grundfunktionen des Stoffwechsels sowie einen Teil der gewebe-spezifischen *m*-RNS – mit Ausnahme der *m*-RNS für Neuralgewebe, das in der Gastrula noch nicht induziert ist. Sehr grosse Unterschiede in der Zahl der aktiven Gene zwischen den beiden Stadien sind deshalb nicht zu erwarten.

Die in verschiedenen Organen des erwachsenen Organismus synthetisierte RNS ist ebenfalls mit Hilfe der Hybridisierungsmethode verglichen

worden. PAUL und GILMOUR (1968) haben Chromatin aus verschiedenen Organen isoliert und am Chromatin in vitro RNS synthetisiert. Diese RNS, die nur wenig Ribosomen-RNS enthält, zeigt auch im Sättigungsbereich deutliche organspezifische Unterschiede. PAUL und GILMOUR haben auch die Funktion von Histon und sauren Proteinen bei der RNS-Synthese untersucht. Während die Histone eine allgemeine Hemmung, aber keine spezifische Genregulation bewirken, kann den sauren Proteinen die Rolle spezieller Geneffektoren zukommen.

Die Translation von *m*-RNS ist besonders von MONROY und Mitarbeitern (MONROY, 1967) an Seeigelembryonen untersucht worden. Während bei Molchembryonen Befruchtung und Determinationsvorgänge nicht mit dramatischen Änderungen in der Gesamtsyntheserate der Proteine verbunden sind, steigt die Synthese der Proteine bei Seeigeln kurz nach der Befruchtung stark an. Versuche mit isolierten Ribosomen aus befruchteten und unbefruchteten Eiern haben gezeigt, dass die Ribosomen vor der Befruchtung weniger gut zur Translation befähigt sind. Auf einen strukturellen Unterschied deutet der Befund hin, dass Ribosomen aus befruchteten Eiern bei niedriger Mg^{++} -Konzentration leichter in Unter-einheiten dissoziieren. Bei der Synthese von Polyphenylalanin mit Polyuridylsäure, die sich aber anders als «natürliche» *m*-RNS verhält, unterscheiden sich Ribosomen aus befruchteten und unbefruchteten Eiern jedoch nicht. – Ausserdem werden wahrscheinlich in maskierter Form als Proteinkomplex vorliegende *m*-Ribonukleinsäuren nach der Befruchtung demaskiert, so dass sie sich nun an Ribosomen anlagern können (TYLER, 1967; STAVY und GROSS, 1967).

Alle diese Versuche zeigen, dass sich die Synthese von *m*-RNS und der Anteil der RNS, der aktiv an der Proteinsynthese teilhat, mit der Differenzierung ändern. Wie wird nun die differentielle RNS- und Proteinsynthese gesteuert? Es ist schon länger bekannt, dass spezielle Effektoren an der Kontrolle der Differenzierung beteiligt sind. Unter Effektoren verstehen wir Induktionsfaktoren und Inhibitoren, welche die Differenzierung in eine bestimmte Richtung lenken. In hochgereinigter Form konnte bisher nur der Faktor, welcher in Amphibien-Embryonen die Mesoderm-Entoderm-Anlage induziert, gewonnen werden. Wir nennen ihn vegetalisierenden Faktor*. Die Induktionsfaktoren werden am Gastrula-Ektoderm getestet (Abb. 3). Ektoderm aus der frühen Amphibiengastrula entwickelt sich nach Isolation und Aufzucht in Salzlösung zu Epithelsträngen. Es ist also noch nicht zu den Geweben, die normalerweise aus ihm entstehen, nämlich Nervengewebe und Epidermis, determiniert. Durch entsprechende Induktionsfaktoren kann es entweder zu Nervengewebe oder zu Geweben, die vom Mesoderm abstammen, wie Chorda, Muskel und Niere, und zu entodermalen Geweben des Darmtraktes induziert werden. Die Induktionsfaktoren können nach der Einsteckmethode (MANGOLD, 1924) auch an Ganzkeimen ausgetestet werden. Durch Füllen mit Alkohol

* Wurde bisher als «mesodermalisierender» Faktor bezeichnet. Ob es sich um einen oder zwei chemisch eng verwandte Faktoren handelt, ist noch nicht sicher.

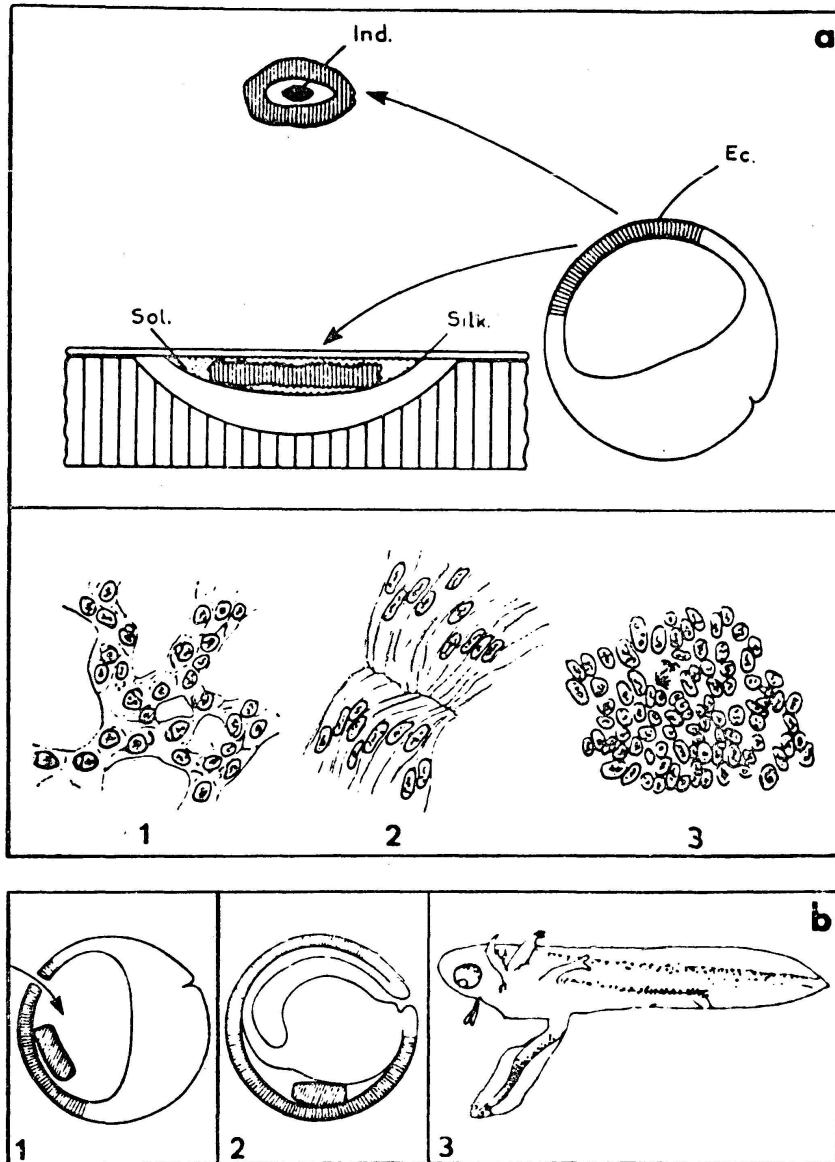


Abbildung 3

Testmethoden für Induktionsfaktoren

a) Der Induktor wird entweder in Plättchenform (Ind.) oder in gelöster Form (Sol.) an isoliertem Gastrulaektoderm getestet. Wenn Lösungen getestet werden, muss das Ektoderm mit Seide (Silk.) bedeckt werden, um ein Abkugeln zu verhindern. Das Resultat der Testversuche ist schematisch im unteren Teil von Abbildung 3 a dargestellt: 1 Stränge von kubischem Epithel entstehen, wenn keine Induktionsfaktoren zugefügt werden – 2 Differenzierung von Myoblasten durch vegetalisierenden Faktor – 3 Differenzierung von Neuralgewebe durch neuralisierenden Faktor

b) Induktionsfaktoren werden in Plättchenform an Ganzkeimen nach der Einsteckmethode getestet. 1 Der Induktor wird durch einen Schlitz in das Blastozöl einer jungen Gastrula gesteckt – 2 Am Ende der Gastrulation liegt der Induktor in Kontakt mit dem ventralen Ektoderm – 3 Im ventralen Ektoderm ist durch eine Rohfraktion, die vegetalisierenden und neuralisierenden Faktor enthält, ein überzähliger Schwanz induziert worden (aus TIEDEMANN, 1968)

und Trocknen an der Wasserstrahlpumpe werden die auszutestenden Fraktionen in Plättchenform gebracht und gleich grosse Teile dieser Plättchen werden dann in das Blastozöl einer frühen Amphibiengastrula eingesteckt. Durch die Gastrulationsbewegungen kommt das Implantat mit dem ventralen Ektoderm in Berührung, in dem es Induktionen hervorrufen kann. Die Induktionen sind komplexe morphologische Gebilde. Sie entstehen durch eine Vielzahl von Wechselwirkungen, die auf den ersten Determinationsschritt folgen. Entscheidend ist dabei, dass mit dem Test der erste geschwindigkeitsbegrenzende Schritt der Gewebedetermination gemessen wird. Eine typische Induktion ist in Abbildung 4 dargestellt.

Zur Extraktion und Anreicherung des vegetalisierenden Faktors sind wir von Hühnerembryonen, die diesen Faktor reichlich enthalten, ausgegangen (TIEDEMANN und TIEDEMANN, 1956a; TIEDEMANN, 1966; 1967). Nach zweimaliger Fällung mit Ammoniumsulfat wird der Extrakt dann mit dem gleichen Volumen Phenol auf 60° erwärmt. Nach dem Abkühlen und Zentrifugieren bilden sich 3 Schichten (Abb. 5). Die Proteine sind in der Phenolschicht angereichert. Der Induktionsfaktor kann aus dieser Schicht mit Alkohol gefällt werden, während aus der oberen Schicht isolierte Nukleinsäuren und Polysaccharide praktisch keine Induktionswirkung haben (KOCHER-BECKER und TIEDEMANN, 1968). Dieser Befund war überraschend. Wir hatten die Phenolmethode ursprünglich zur Isolierung von Ribonukleinsäure aus Embryonen ausgearbeitet (TIEDEMANN und TIEDEMANN, 1956b), da man zu jener Zeit noch vermutete, dass die

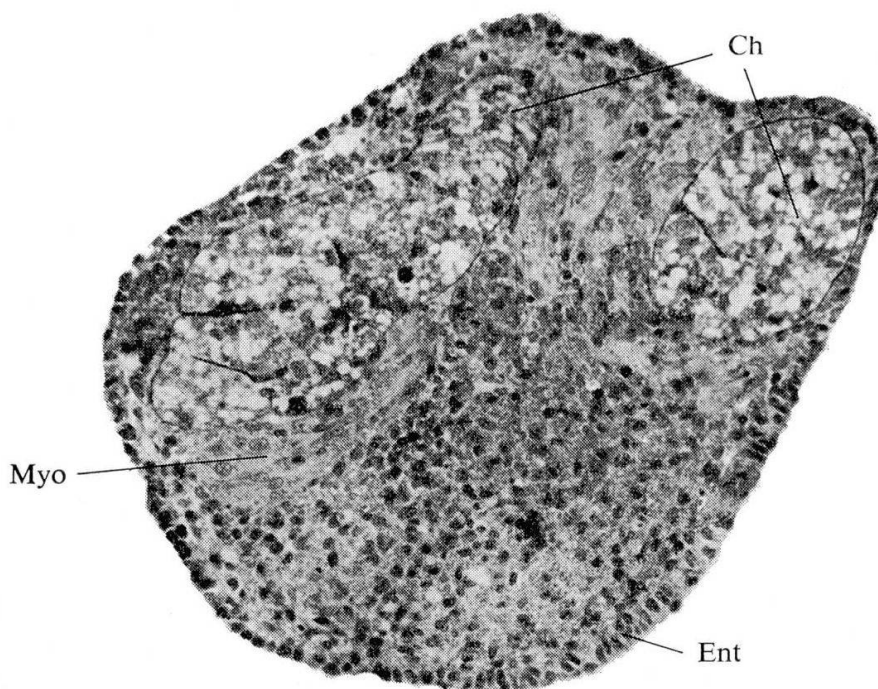


Abbildung 4

Durch vegetalisierenden Faktor in isoliertem Ektoderm induzierte Gewebe (Präparat Dr. GRUNZ). Ch = ind. Chorda; Myo = ind. Myoblasten; Ent = ind. Entoderm

Induktionsfaktoren Nucleinsäuren wären. Der mit Phenol extrahierte Faktor wird dann durch Chromatographie an Carboxymethylzellulose, einem Kationenaustauscher, in Gegenwart von 6 M Harnstoff weiter angereichert. Durch Elektrophorese mit Sephadex G 100 als Medium können weitere inaktive Begleitproteine abgetrennt werden. Diese Trennung beruht auf einer Kombination von elektrophoretischer Trennung und Gelfiltration. Zur weiteren Reinigung hat sich die Elektrofokussierung, bei der Proteinmoleküle nach ihrem isoelektrischen Punkt in einem pH-Gradienten getrennt werden, besonders bewährt. Die aktive Fraktion

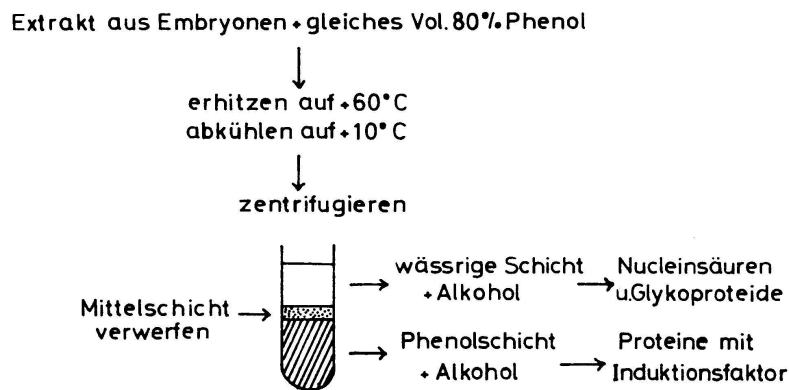


Abbildung 5

Abtrennung der Proteine von Nucleinsäuren und Polysacchariden durch Extraktion mit Phenol

enthält nur einen geringen Anteil des insgesamt auf die Säule gegebenen Proteins (Abb. 6). Durch eine zweite Fokussierung bei pH 7–9 kann der Faktor noch weiter angereichert werden (H. P. GEITHE und H. TIEDEMANN, 1969). Der Faktor ist in den Embryonen nur in sehr geringer Menge enthalten. Aus 1 kg Hühnerembryorümpfen erhält man weniger als 1 mg von der bisher reinsten Fraktion. Nach Mischen mit γ -Globulin, das keinerlei Induktionwirkung hat, im Verhältnis 1:5000–1:10000, ruft der Faktor im Einstecktest noch Induktionen hervor. Es handelt sich um ein Protein, das frei von Nucleinsäuren und Nucleotiden ist. Das Molekulargewicht liegt in der Größenordnung von 25000–30000 (TIEDEMANN et al., 1966), der isoelektrische Punkt bei pH 7,5–8,0 (in Gegenwart von 6 M Harnstoff). Durch Sulfhydrylreagenzien, wie Thioglykolsäure oder Mercaptoäthanol wird das Molekül inaktiviert, wahrscheinlich durch Spaltung von Disulfidbrücken (TIEDEMANN et al., 1969 b).

Von YAMADA (1961, 1962) wurde aus Meerschweinchenknochenmark eine Proteinfraction gewonnen, die mesodermale und entodermale Gewebe induziert. WANG et al. (1963) isolierten aus Leber nach dem Phenolverfahren eine Proteinfraction, die den vegetalisierenden Faktor enthält.

Die Extraktion und Anreicherung von Induktionsfaktoren aus Amphibienembryonen ist schwierig, weil diese Embryonen viel inaktives Dotter-

protein enthalten. Aus Amphibiengastrulen konnte FAULHABER in unserem Laboratorium den vegetalisierenden Faktor aber partiell anreichern. Es handelt sich ebenfalls um ein Protein. Das Molekulargewicht ist möglicherweise höher als beim vegetalisierenden Faktor aus Hühnerembryonen (FAULHABER et al., 1969a).

Ultrazentrifugierte Extrakte (0,1 M Natriumchlorid, 2 Std. $105000 \times g$) aus Hühnerembryonen oder Amphibienembryonen induzieren keine



Abbildung 6

Reinigung des vegetalisierenden Induktionsfaktors (2,5 mg) durch Elektrofokussierung (46 h). Der Ampholinepuffer enthielt 6 M Harnstoff. Volumen der Fraktionen: 2,6 ml

Rümpfe und Schwänze. Sie enthalten aber vegetalisierenden Faktor, der in den Extrakten gehemmt ist. Der Faktor kann durch Extraktion mit Phenol aktiviert werden. Bei der Phenolextraktion wird ein Inhibitor abgetrennt und in der wässrigen Phase angereichert. Aus der wässrigen Phase kann der Inhibitor mit 2 Vol. Alkohol gefällt werden. Der Inhibitor kann auch durch Elektrophorese vom Induktionsfaktor abgetrennt werden. Der Inhibitor wandert zur Anode (TIEDEMANN, 1968; BORN et al., 1969).

Kombiniert man die Proteinfraction, die den vegetalisierenden Induktionsfaktor enthält, in Gegenwart von 6 M Harnstoff mit dem Inhibitor, dialysiert zur Entfernung des Harnstoffs gegen Wasser und fällt mit Alkohol, so ist der Induktionsfaktor in dem Rekombinat wieder vollständig gehemmt (Abb. 7). Mit Hilfe dieses Testes war es möglich, den Inhibitor durch Ultrazentrifugieren und anschließende Chromatographie an Hydroxylapatit weiter anzureichern (Abb. 8). Der Inhibitor wird in

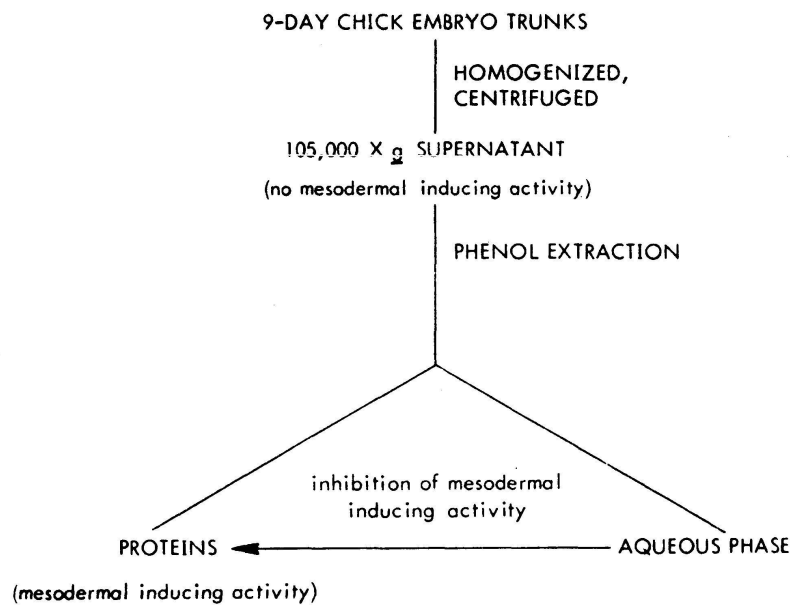


Abbildung 7
Hemmung des vegetalisierenden Faktors durch Rekombination der Proteinfraktion
(vegetalisierender Faktor) mit wässriger Phase (aus TIEDEMANN, 1968)

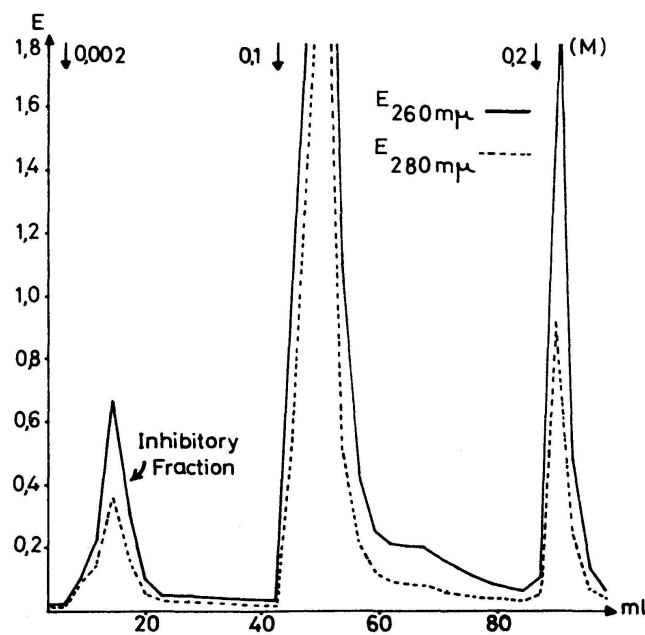


Abbildung 8
Anreicherung des in der wässrigen Phase enthaltenen Inhibitors durch Chromatographie an Hydroxylapatit (wässrige Phase aus 33 g Hühnerembryorümpfen wurde 45 min bei $150000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde an 3,1 ml Hydroxylapatit $[1 \times 4 \text{ cm}]$ chromatographiert. Die Pfeile geben den jeweils zur Elution verwendeten Phosphatpuffer pH 6,8 an)

$2 \cdot 10^{-3}$ M Phosphat an Hydroxylapatit nicht adsorbiert und erscheint mit der Glykoprotein-Fraktion. In dieser Fraktion enthaltene geringe Mengen Nukleinsäuren und Polynukleotide können nach Inkubation mit Pankreas-Ribonuklease durch Chromatographie an Sephadex G 50 in 6 M Harnstoff abgetrennt werden. Der Inhibitor wird durch Cetyltrimethylammoniumbromid gefällt. Er wird durch Trypsin partiell und durch Pronase, ein proteolytisches Enzym aus *Aspergillus oryzae*, vollständig inaktiviert, dagegen nicht durch Pankreas-Ribonuklease. Der Inhibitor ist ein saures Protein, möglicherweise ein Glykoprotein. Polyvinylsulfat, ein Polyanion, reaktiviert den Induktor-Inhibitor-Komplex schon in kleiner Dosis vollständig (TIEDEMANN et al., 1969 a).

Entsprechende Fraktionen aus Bakterien und Hefe, *r*-RNS und DNS aus höheren Organismen sowie Chondroitinsulfat, Hyaluronsäure und Heparin wirken im Rekombinationstest nicht hemmend (TIEDEMANN, 1968).

Der neuralisierende Induktionsfaktor, der die Neuralanlage induziert, konnte bisher nur partiell gereinigt werden. Er enthält noch Nukleinsäure, wird aber ebenso wie der vegetalisierende Faktor durch proteolytische Fermente inaktiviert, dagegen nicht durch Ribonuklease. Im Gastrulaektoderm ist der neurale Induktionsfaktor in inaktiver Form enthalten. Die chemische Natur des Inhibitors ist aber noch unbekannt.

Im Gegensatz zu Bakterien können bei höheren Organismen genetische Versuche nur in beschränktem Umfang zur Aufklärung des Mechanismus der Differenzierung herangezogen werden. Wir sind deshalb auf andere Befunde angewiesen und wollen drei Gruppen von Untersuchungen betrachten: 1. Die Verteilung der Induktionsfaktoren und Inhibitoren auf Zytoplasma und Zellkern. 2. Die zeitliche Begrenzung der Differenzierungsfähigkeit (Kompetenz) von Gastrulaektoderm und anderen embryonalen Geweben und ihre Abhängigkeit von der Proteinsynthese. 3. Den Einfluss von Inhibitoren der Ribonukleinsäure- und der Proteinsynthese auf den Induktionsvorgang.

Der vegetalisierende Faktor kommt in Hühnerembryonen und in Amphibienembryonen nur im Zytoplasma, dort vor allem in der sogenannten Mikrosomenfraktion vor; er ist nicht in den Zellkernen enthalten. Dagegen ist der neuralisierende Faktor sowohl im Zytoplasma als auch in Zellkernen vorhanden (TIEDEMANN et al., 1962; KAWAKAMI et al., 1961). Die Hauptmenge des Inhibitors für den vegetalisierenden Faktor finden wir im löslichen Zytoplasma, einen kleineren Teil in der zytoplasmatischen Membran- und Ribosomenfraktion. Die Zellkerne enthalten keinen Inhibitor. Allerdings kann man nicht ausschließen, dass er aus den Kernen beim Waschen herausgelöst werden könnte.

Die Reaktionsfähigkeit des Ektoderms, seine Kompetenz, ist zeitlich begrenzt. Am Ende der Gastrulation verliert das Ektoderm die Fähigkeit, auf Induktionsfaktoren zu reagieren. Selbst mit sehr hohen Induktordosen findet keine Induktion mehr statt. Das Ektoderm verliert aber nur dann seine Kompetenz, wenn die Proteinbiosynthese normal abläuft. Nach Hemmung der Proteinbiosynthese durch Actidion bleibt das Reak-

tionsvermögen bis zu 18 Stunden länger erhalten (GRUNZ, 1969). Es ist noch nicht auszuschliessen, dass der Verlust der Kompetenz darauf beruht, dass die Induktionsfaktoren in älteres Ektoderm nicht mehr eindringen können. Diese Annahme ist aber nicht sehr wahrscheinlich. Im präsumptiven Mesodermbereich wird die Fähigkeit zu neuraler Differenzierung noch früher eingeschränkt, wahrscheinlich schon bei der Determination der Mesodermanlage, obwohl der neurale Induktionsfaktor in aktiver Form im Mesodermbereich (Urdarmdach) vorhanden ist.

Mit der Determination ist immer eine Einschränkung der Reaktionsmöglichkeiten eines Gewebes verbunden. Die Differenzierung ist also meist irreversibel. Unter bestimmten Bedingungen (Serientransplantation im Abdomen adulter Fliegen) konnten Hadorn und Mitarbeiter (HADORN, 1965; GEHRING, 1968) das bereits festgelegte Organmuster von Imaginalscheiben von Insektenlarven aber gesetzmässig ändern. Der Vorgang wird als Transdetermination bezeichnet. Sicher sind von diesen Untersuchungen noch wichtige Beiträge zum Mechanismus der Determination zu erwarten.

Hängt die Einschränkung der Kompetenz bei Amphibienembryonen primär von irreversiblen oder schwer reversiblen Veränderungen im Zytoplasma oder im Zellkern ab? Zur Lösung dieser Frage ist von mehreren Arbeitsgruppen die Transplantation von Zellkernen herangezogen worden. Der Oozytenkern einer unbefruchteten Eizelle wird entweder durch UV-Licht inaktiviert oder abgesaugt (BRIGGS und KING, 1959; GURDON, 1964). In die Oozyte werden dann Zellkerne aus embryonalen Geweben transplantiert. Nach Transplantation von Kernen, die aus dem Neurulastadium entnommen wurden, entwickeln sich bis zu 40% der Embryonen normal. Nach Transplantation von Kernen aus dem Darmepithel der Schwanzknospe ist der Anteil an normalen Transplantatembryonen geringer (etwa 4%; GURDON, 1962). GURDON führt dies aber nicht auf Inaktivierung von Genen zurück, sondern auf die beschränkte Fähigkeit älterer Kerne, sich dem zytoplasmatisch festgelegten schnellen Mitoserhythmus der Furchungsstadien anzupassen. Dadurch kommt es zu einer irregulären Verteilung von Chromosomen. – Werden Kerne transplantiert, die bereits *r*-RNS und *t*-RNS synthetisieren, so wird die Synthese dieser Ribonukleinsäuren nach Transplantation in das Zytoplasma der Oozyte gestoppt und erst in der Gastrula, also zum normalen Zeitpunkt, wieder aufgenommen. Das Zytoplasma bestimmt also, wann diese RNS-Arten synthetisiert werden (GURDON und BROWN, 1965; GURDON und WOODLAND, 1968).

Wenn man sich der Meinung GURDONS anschliesst, dass die Gene nicht irreversibel inaktiviert werden, muss man folgern, dass im Zytoplasma mit Proteinsynthese verbundene Prozesse ablaufen, welche die Reaktionsfähigkeit des Gewebes irreversibel einschränken.

Weitere Einblicke in den Mechanismus der Determination und Differenzierung hinsichtlich des Zusammenspiels von Kern und Zytoplasma haben Versuche mit Hemmern der Protein- und der Ribonukleinsäuresynthese ermöglicht.

Actinomycin D (AcD) bildet mit Doppelstrang-DNS Komplexe und hemmt dadurch die Transkription der RNS. Wegen der Impermeabilität von Amphibieneiern für AcD ist es notwendig, AcD in die befruchteten Eier zu injizieren. Nach Injektion von 0,2 μg pro Ei wird die Entwicklung im Blastulastadium gestoppt (BRACHET et al., 1964), also im gleichen Stadium, in dem letale Hybride absterben, deren Zellkern und Eizytoplasma von verschiedenen Arten (BALTZER, 1940) stammen. Ausschalten des Kernes durch Röntgenbestrahlung führt ebenfalls zum Stillstand der Entwicklung im Blastulastadium (NEYFAKH, 1961). Seeigelebryonen erreichen, vom Beginn der Entwicklung an mit AcD behandelt, das Stadium der Mesenchymblastula (GIUDICE et al., 1968). Da die Permeabilität für AcD auch bei Seeigelebryonen während der Furchung begrenzt zu sein scheint (THALER et al., 1969), ist es noch nicht völlig sicher, ob die ersten Differenzierungsschritte bei Seeigelebryonen ausschliesslich mit gespeicherter RNS ohne Neusynthese von RNS ablaufen können.

Die Wirkung von AcD auf Induktionsvorgänge bei Amphibien ist in Helsinki und in unserem Laboratorium untersucht worden. Wir haben Mesoderm zusammen mit anhängendem Ektoderm aus der Gastrula explantiert und in der Gewebekultur mit AcD behandelt (TIEDEMANN et al., 1967). Das Mesoderm ist bereits determiniert und induziert im mitexplantierten Ektoderm in der unbehandelten Kontrolle Nervengewebe. Bei einer Konzentration von 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ AcD findet man im Gewebe noch zahlreiche Mitosen. Die Differenzierung von Nervengewebe ist bereits stark gehemmt, während Muskel und Chorda gut differenziert sind. Bei einer Konzentration von 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ AcD wird keinerlei Neuralgewebe mehr gebildet. In geringer Menge entstehen aber noch schlecht differenzierte Chorda (ohne Chordascheide) und Myoblasten. Die RNS-Synthese ist bei dieser Konzentration vollständig gehemmt. Die Versuche zeigen, dass im Gastrulastadium in der Mesodermanlage ein Teil der *m*-RNS für gewebespezifische Chorda- und Myoblastenproteine bereits vorhanden ist. BEETSCHEN und Mitarbeiter (DUPRAT et al., 1967) haben gezeigt, dass die Neuralanlage auch in der Neurula gegen AcD empfindlicher ist als die Anlage der Myomeren. – TOIVONEN, VAINIO und SAXÉN (1964) haben Gastrulaektoderm unmittelbar nach Induktion durch vegetalisierenden Faktor mit AcD behandelt. Sie fanden, dass AcD in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ die Differenzierung von Muskel und Chorda im Vergleich zu den nicht mit AcD behandelten Kontrollen vollständig hemmt. Differenzierungsvorgänge, welche im gerade induzierten mesodermalen Gewebe oder Nervengewebe anlaufen, erfordern also eine Neusynthese von RNS durch Transkription. In die gleiche Richtung weisen die oben erwähnten Hybridisierungsversuche. Allerdings kann noch nicht völlig ausgeschlossen werden, dass bei der Gewebedetermination kurzlebige *m*-RNS stabilisiert wird. Weiterhin ist ungeklärt, welche Bedeutung der zytoplasmatischen DNS, die bei Amphibien vorwiegend in der Hülle der Dotterplättchen lokalisiert ist (BRACHET und FICQ, 1965; WALLACE, 1963), bei der Differenzierung zukommt. AcD könnte auch für die Differenzierung wichtige zytoplasmatische Transkriptionvorgänge hemmen.

In weiteren Versuchen sind wir der Frage nachgegangen, welchen Einfluss eine Hemmung der Proteinsynthese während des Induktionsvorganges auf die Differenzierung hat. Gastrulaektoderm wurde mit Actidion, einem Hemmer der Proteinsynthese, und dann 4 Std. mit hochgereinigtem vegetalisierendem Faktor behandelt. Nach Entfernung des Induktors wurden die Explantate wieder in Actidion-freies Medium gebracht. Da die Hemmung der Proteinsynthese durch Actidion reversibel ist, könnten nun alle für die gewebespezifische Differenzierung notwendigen Proteine synthetisiert werden. Die Differenzierung ist aber partiell gehemmt. Wahrscheinlich werden während des Induktionsvorganges Proteine synthetisiert, bei denen es sich um weitere Regulatorproteine handeln könnte.

Diese Ergebnisse können wir nun zusammenfassen. Der vegetalisierende Faktor (oder zwei chemisch eng verwandte und deshalb noch nicht getrennte Faktoren) und der Inhibitor, ebenfalls ein Protein, kontrollieren die Determination der Mesoderm-Entoderm-Anlage. Darauf folgt eine wechselseitige Induktion der Gewebe, die sich vom Mesoderm und Entoderm ableiten (Chorda, Muskel, Niere, Darmtrakt). Durch den vegetalisierenden Faktor wird also eine Kette von Reaktionen ausgelöst, die wahrscheinlich mit der Synthese weiterer Regulatorproteine verknüpft sind.

Ob der Angriffspunkt der Effektoren primär im Zytoplasma oder im Zellkern liegt, ist noch nicht sicher. Jedenfalls besteht zwischen der Kontrolle der Translation im Zytoplasma und der Kontrolle der Transkription am Chromatin eine enge Wechselwirkung. Die Funktion der Effektorproteine könnte entweder in der Erkennung bestimmter *m*-Ribonukleinsäuren, der Initiation der Synthese bestimmter Peptidketten oder aber in einer Wechselwirkung mit Zellkern- (oder Zytoplasma-) DNS bestehen.

Zum Schluss möchte ich noch ein bekanntes Beispiel für eine direkte Kontrolle der Genaktivität, die Bildung sogenannter Puffs in den Speicheldrüsenchromosomen von Insektenlarven, erwähnen (BEERMANN und BAHR, 1954; PANITZ, 1964; BERENDES, 1968). Es zeigt zugleich, wie Hormone in die postembryonale Entwicklung eingreifen. An den Riesenchromosomen, die durch mehrtausendfache Längsteilung der Einzelchromatiden entstehen, sind Auftreibungen, in denen RNS synthetisiert wird, lichtmikroskopisch zu erkennen. Die Ausbildung bestimmter Puffs, wird durch das Verpuppungshormon Ecdyson kontrolliert (CLEVER, 1965; KARLSON und SEKERIS, 1967). Nach Untersuchungen von CLEVER wirken andere Faktoren, wahrscheinlich Proteine, in der Vorpuppe zum Ecdyson antagonistisch (CLEVER, 1966).

Hormone greifen in eine Vielzahl von Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen ein. Ich kann sie unmöglich alle aufzählen und möchte mich auf eine Frage beschränken, die mir im Zusammenhang mit der Kontrolle der Organdifferenzierung interessant erscheint. Ein und dasselbe Hormon kann je nach Entwicklungsstadium und untersuchtem Organ sehr verschiedene Wirkungen haben. Nur wenige Beispiele, bei

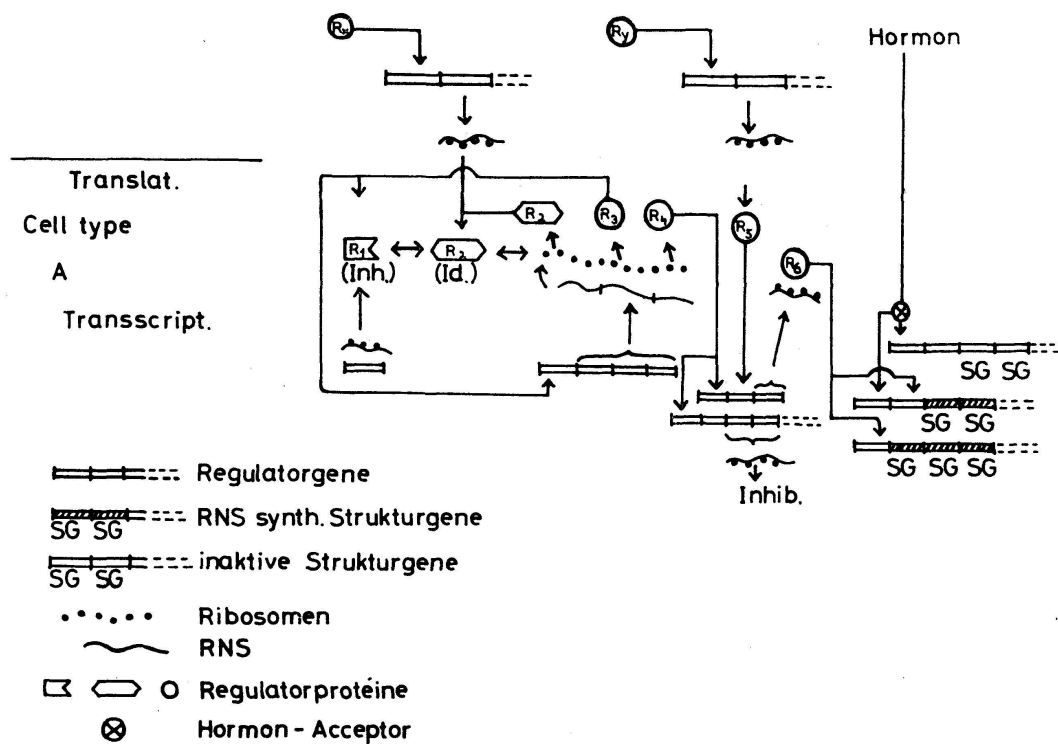


Abbildung 9

Hypothetisches Modell der Kontrolle von Transkription und Translation bei der Differenzierung

denen Hormone wahrscheinlich unter Zwischenschaltung eines Rezeptors die Aktivität von Genen modifizieren (KARLSON, 1963), seien genannt*.

Kortikosteroide induzieren in der Retina des Hühnerembryo eine vorzeitige Synthese von Glutaminsynthetase (MOSCONA, 1968), in der Rattenleber die Synthese von Tryptophanpyrrolase und Transaminasen. Thyroxin induziert bei der Metamorphose von Froschlarven in der Leber Enzyme des Harnstoffzyklus, im Schwanzmuskel Hydrolasen für die Schwanzresorption (WEBER, 1967; TATA, 1966).

Östrogene stimulieren das Wachstum des Uterus, im Ovar die Eireifung und in der Leber die Synthese des Dotterprotein Phosvitin (GRUBER, 1969). Die Wirkung eines Hormons auf ein bestimmtes Gewebe hängt offenbar davon ab, wie das Gewebe durch die vorausgegangenen Determinationsschritte programmiert wurde.

Im Gegensatz zu Bakterien, die sich wechselnden äusseren Bedingungen durch Enzyminduktion oder andere Mechanismen rasch und reversibel anpassen müssen, ist bei höheren Organismen die Konstanz des Milieus in allen Geweben sehr genau kontrolliert. Dadurch wird eine höhere Spezialisierung ermöglicht, die aber sehr komplexe Steuerungsmechanismen

* Hormone können auch an anderen Zellstrukturen (Zellmembranen) angreifen. Ein Teil der Hormonwirkungen kommt zudem durch Sekundäreffekte zustande und beruht u. a. auf einer Veränderung von Metabolitkonzentrationen.

voraussetzt. Es ist deshalb zu erwarten, dass ein relativ grosser Anteil des Genoms für Regulationsprozesse benötigt wird. Dies ist in einem hypothetischen Modell berücksichtigt, das Abbildung 9 zeigt. In diesem hypothetischen Modell gibt es zwei Gruppen von Regulatorgenen, Regulatorgene für die Codierung von Regulatorproteinen und Regulatorgene für die Erkennung von Regulatorproteinen. Die Strukturgene für Enzymproteine oder Strukturproteine sind mit mehreren Regulatorgenen der zweiten Gruppe gekoppelt. Das Modell ähnelt in dieser Hinsicht Modellen, welche kürzlich von GEORGIEV (1969) sowie von BRITTEN und DAVIDSON* (1969) auf Grund anderer Überlegungen aufgestellt wurden. Die Regulatorproteine können Aktivatoren oder Inhibitoren sein. Regulatorproteine, welche an der Programmierung eines Zelltyps beteiligt sind, können entweder aus benachbarten Zellen eines anderen Zelltyps stammen oder in der Zelle selbst synthetisiert werden. Ein Strukturgen wird nur transkribiert, wenn für alle vorgeschalteten Regulatorgene die entsprechenden Effektoren vorhanden sind. Ob das erste Regulatorprotein, der Induktionsfaktor *Id*, wie im Modell angenommen primär in die Translation eingreift, muss durch weitere Versuche geklärt werden. Das Modell gilt aber auch, wenn man den primären Angriffspunkt an das Genom verlegt.

Eine direkte genetische Evidenz für das Vorhandensein von Regulatorgenen fehlt bei höheren Organismen. Bei Insekten sind aber Mutationen bekannt, die in komplexe Determinationsprozesse eingreifen. So wurde von GEHRING (1966) eine Mutante entdeckt, bei der die Antenne und der anliegende Teil der Kopfkapsel in eine vollständige mittlere Extremität und den anliegenden Teil des ventralen Thorax transformiert ist. Wahrscheinlich ist ein einzelnes Gen mutiert.

Die in dieser Arbeit erwähnten eigenen Untersuchungen wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

* BRITTEN und DAVIDSON nehmen an, dass die Regulation am Genom durch RNS erfolgt. Sehr wahrscheinlich sind aber Proteine an der Kontrolle des Genoms beteiligt.

LITERATUR

- BALTZER, F.: Über erbliche letale Entwicklung und Austauschbarkeit artverschiedener Kerne bei Bastarden. *Naturwiss.* 28, 177-187, 196-206; 1940.
- BEERMANN, W., and BAHR, G.F.: The submicroscopic structure of the Balbiani ring. *Exptl.Cell Res.* 6, 195-201; 1954.
- BERENDES, H. D.: Controlled Induction of Gene Activity in Polytene Chromosomes, in: *Le Basi Molecolari del Differenziamento*. Accademia Nazionale Dei Lincei, Quaderno N. 104. 179-187, Roma 1968.
- BORN, J., TIEDEMANN, H., and TIEDEMANN, H.: Activation of a Morphogenetic Factor by Electrophoresis. *Febs Letters* 2, 251-254; 1969.
- BRACHET, J., DENIS, H., and DEVITRY, F.: The Effects of Actinomycin D and Puromycin on Morphogenesis in Amphibian Eggs and *Acetabularia mediterranea*. *Devel.Biol.* 9, 398-434; 1964.
- BRACHET, J., and FICQ, A.: Binding sites of ¹⁴C actinomycin in amphibian oocytes and an autoradiography technique for the detection of cytoplasmic DNA. *Exptl.CellRes.* 38, 153-159; 1965.
- BRIGGS, R., and KING, T.J.: *The cell*, I, 536-617 (hg. von J.BRACHET und A.E.MIRSKY) Academic Press, New York 1959.
- BRITTEN, R.J., and KOHNE, D.E., Carnegie Institution of Washington: Yearbook 65, 78; 1966.
- BRITTEN, R.J., and KOHNE, D.E.: Repeated Sequences in DNA. *Science* 101, 529; 1968.
- BRITTEN, R.J., and DAVIDSON, E.H.: Gene Regulation for Higher Cells: A Theory. *Science* 165, 349-357; 1969.
- BROWN, D.D., and LITTNA, E.: Variations in the synthesis of stable RNA's during oogenesis and development of *Xenopus laevis*. *J.Mol.Biol.* 8, 688-95; 1964.
- BROWN, D.D., and LITTNA, E.: Synthesis and accumulation of low molecular weight RNA during embryogenesis of *Xenopus laevis*. *J.Mol.Biol.* 20, 95-112; 1966 a.
- BROWN, D.D., and LITTNA, E.: Synthesis and accumulation of DNA-like RNA during embryogenesis of *Xenopus laevis*. *J.Mol.Biol.* 20, 81-94; 1966 b.
- BROWN, D.D., and WEBER, C.S.: Gene linkage by RNA-DNA hybridization. *J.Mol.-Biol.* 34, 618-697; 1968.
- BROWN, D.D., and DAWID, I.B.: Specific gene amplification on oocytes. *Science* 160, 272-280; 1968.
- CLEVER, U.: Puffing changes in incubated and in ecdysone treated *Chironomus tentans* salivary glands. *Chromosoma* 17, 309; 1965.
- CLEVER, U.: Induction and Repression of a Puff in *Chironomus tentans*. *Develop.Biol.* 14, 421-438; 1966.
- CRIPPA, M., DAVIDSON, E.H., and MIRSKY, A.E.: Persistence in early Amphibian embryos of information RNA's from the lampbrush chromosome stage of organogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 57, 885-891; 1967.
- CRIPPA, M., and GROSS, P.R.: Maternal and embryonic contributions to the functional messenger-RNA of early development. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 62, 120-127; 1969.
- DAVIDSON, E. H., CRIPPA, M., and MIRSKY, A. E.: Evidence for the appearance of novel gene products during amphibian blastulation. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 60, 152-159; 1968.
- DAVIDSON, E. H., and HOUGH, B. R.: High sequence diversity in the RNA synthesized at the lampbrush stage of oogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 63, 342-349; 1969.
- DUPRAT, A., BEETSCHEN, J., et ZALTA, J.: Action de faibles concentrations de puromycine sur la différenciation de divers types de cellules embryonnaires d'amphibiens urodèles cultivées in vitro. Action combinée de l'actinomycine D. *Compt.Rend.* 264, 2508-2511; 1967.

- EDSTRÖM, J. E., and GALL, J. G.: The base composition of ribonucleic acid in lampbrush chromosomes nucleoli nuclear sap and cytoplasm of *Triturus oocytes*. *J. Cell Biol.* 19, 279-284; 1963.
- ELSDALE, T. R., FISCHBERG, M., and SMITH, S.: A Mutation that reduces nucleolar number in *Xenopus laevis*. *Exptl. Cell Res.* 14, 642-643; 1958.
- FAULHABER, I., BORN, J., TIEDEMANN, H., and TIEDEMANN, H.: Antagonism between inducers and natural inhibitors in the Amphibian embryo. Federation of European Biochemical Societies, Abstracts of Communications Madrid No. 718, 1969.
- GEHRING, W.: Bildung eines vollständigen Mittelbeines mit Sternopleura in der Antennenregion bei der Mutante Nasobemia (NS) von *Drosophila melanogaster*. *Arch. J. Klaus-Stift. Vererb.-Forsch.* 41, 44-54; 1966.
- GEHRING, W.: The stability of the Determined State in Cultures of Imaginal Disks in *Drosophila*, in Results and Problems of Cell Differentiation, Vol. I (Ed.: H. URSPRUNG) 136-154, 1968.
- GEITHE, H. P., und TIEDEMANN, H.: Noch unveröffentlicht, 1969.
- GEORGIEV, G. P.: Some aspects of control of gene expression in animal cells. IX. Internat. Embryological Conference, Moskau 1969.
- GEORGIEV, G. P., SAMARINA, O. P., LERMAN, M. I., SMIRNOV, M. N., and SEVERTZOV, A. N.: Biosynthesis of messenger and ribosomal ribonucleic acids in the nucleochromosomal apparatus of animal cells. *Nature* 200, 1291-1294; 1963.
- GILLESPIE, D., and SPIEGELMAN, S.: A quantitative assay for DNA-RNA hybrids with DNA immobilized on a membrane. *J. Mol. Biol.* 12, 829-842; 1965.
- GIUDICE, G., MUTOLO, V., and DONATUTI, G.: Gene Expression in Sea Urchin Development. *Wilhelm Roux' Arch.* 161, 118-128; 1968.
- GLISIN, V. R., GLISIN, M. V., and DOTY, P.: The nature of messenger RNA in the early stages of sea urchin development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 56, 285; 1966.
- GRUBER, M.: Hormonal induction of the yolk protein phosvitin in rooster liver. IX. Internat. Embryological Conference, Moskau 1969.
- GRUNZ, H.: Noch unveröffentlicht, 1969.
- GURDON, J. B.: Adult Frogs Derived from the Nuclei of Single Somatic Cells. *Devel. Biol.* 4, 256-273; 1962.
- GURDON, J. B.: The transplantation of living cell nuclei. *Adv. Morphogenesis* 4, 1-43; 1964.
- GURDON, J. B., and BROWN, D. D.: Cytoplasmic regulation of RNA synthesis and nucleolus formation in developing embryos of *Xenopus laevis*. *J. Mol. Biol.* 12, 27-35; 1965.
- GURDON, J. B., and WOODLAND, H. R.: The Cytoplasmic Control of Nuclear Activity in Animal Development. *Biological Reviews* 43, 233-267; 1968.
- GURDON, J. B., and WOODLAND, H. R.: The influence of the cytoplasm on the nucleolus during cell differentiation with special reference to RNA synthesis during amphibian cleavage. *Proc. Roy. Soc. B* 173, 99-111; 1969.
- HADORN, E.: Problems of determination and transdetermination. *Brookhaven Symp. Biol.* 18, 148-161; 1965.
- HALL, B. D., and SPIEGELMAN, S.: Sequence complementarity of T2-DNA and T2-specific RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 47, 137-146; 1961.
- HOLTFRETER, J.: Differenzierungspotenzen isolierter Teile der Urodelengastrula. *Roux' Arch. Entw. Mech.* 138, 522-656; 1938.
- IZAWA, M., ALLFREY, V. G., and MIRSKY, A. E.: Composition of the Nucleus and Chromosomes in the Lampbrush Stage of the Newt Oocyte. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 50, 811; 1963.
- JANTZEN, H., GASC, J.-M., und TIEDEMANN, H.: Veröffentlichung in Vorbereitung. 1969.

- KAFIANI, K.: Hybridization of loach embryo RNA (Demonstr.) IX. Internat. Embryological Conference, Moskau 1969.
- KARLSON, P.: Perspectives Biol.Med. 6, 203; 1963.
- KARLSON, P., SEKERIS, C.E.: Ecdysone, an insect steroid hormone and its mode of action. Recent Prog. Hormone Res. 22, 473; 1967.
- KAWAKAMI, I., IYEIRI, S., and MATSUMOTO, A.: Embryonic inductions by microsomal fractions separated with sodium deoxycholate. Embryologia 6, 1; 1961.
- KOCHER-BECKER, U., und TIEDEMANN, H.: Untersuchungen zur Frage der Induktionsfähigkeit von Nukleinsäuren (Untersuchungen am Amphibienektoderm). Arch.Entwicklungsmech.Organ. 160, 375-400; 1968.
- MANGOLD, O.: Transplantationsversuche zur Frage der Spezifität und der Bildung der Keimblätter. Arch.Entwicklungsmech.Organ. 100, 198-301; 1924.
- MANGOLD, O.: Über die Induktionsfähigkeit der verschiedenen Bezirke der Neurula von Urodelen. Naturwiss. 21, 761-766; 1933.
- MONROY, A.: Molecular Analysis of the Activation of the Egg, in: Le Basi Molecolari del Differenziamento. Accademia Nazionale Dei Lincei, Quaderno N. 104, 151-154, Roma 1967.
- MOSCONA, A.A.: Induction of Retinal Glutamine Synthetase in the Embryo and in Culture, in: Le Basi Molecolari Del Differenziamento. Accademia Nazionale Dei Lincei, Quaderno N. 104, 237-256, Roma 1968.
- NEYFAKH, A.A.: Vergleichende strahlenbiologische Untersuchung der morphogenetischen Funktion der Kerne in der Entwicklung der Tiere. Naturwissenschaftl. Beiträge, Verlag Kultur und Fortschritt, Berlin 8, 828-845; 1961.
- NEYFAKH, A.A.: The synthesis of macromolecules in early development. IX. Internat. Embryological Conference, Moskau 1969.
- OKADA, T.S.: Experimental studies on the differentiation of the endodermal organs in Amphibia. I. Significance of the mesenchymatous tissue to the differentiation of the presumptive endoderm. Mem.Coll.Sci.Univ.Kyoto, Ser.B 21, 1-6; 1954 a.
- OKADA, T.S.: Experimental studies on the differentiation of the endodermal organs in Amphibia. II. Differentiating potencies of the presumptive endoderm in the presence of the mesodermal tissues. Mem.Coll.Sci.Univ.Kyoto, Ser.B 21, 7-14; 1954 b.
- OKADA, T.S.: Experimental studies on the differentiation of the endodermal organs in Amphibia. III. The relation between the differentiation of pharynx and head-mesenchyme. Mem.Coll.Sci.Univ.Kyoto, Ser.B 22, 17-22; 1955 a.
- OKADA, T.S.: Experimental studies on the differentiation of the endodermal organs in Amphibia. IV. The differentiation of the intestine from the fore-gut. Annot.zool. japon. 28, 210-214; 1955 b.
- OKADA, T.S.: Epithelio-mesenchymal relationship in the regional differentiation of the digestive tract in the amphibian embryo. Arch.Entwicklungsmech.Organ., 152, 1-21; 1960.
- PANITZ, R.: Hormonkontrollierte Genaktivitäten in den Riesenchromosomen von *Acriotopus lucidus*. Biol.Zbl. 83, 197-230; 1964.
- PAUL, J., and GILMOUR, R.S.: Organ-specific Restriction of Transcription in Mammalian Chromatin. J.Mol.Biol. 34, 305-316; 1968.
- PENMAN, S., VESCO, C., and PENMAN, A.: Localization and Kinetics of Formation of Nuclear Heterodisperse RNA, Cytoplasmic Heterodisperse RNA and Polyribosome-associated Messenger-RNA in Hela Cells. J.Mol.Biol. 34, 49; 1968.
- RINALDI, A. M., and MONROY, A.: Polyribosome Formation and RNA Synthesis in the Early Post-Fertilization Stages of the Sea Urchin Egg. Develop.Biol. 19, 73-86; 1969.
- SCHERRER, K., MARCAUD, L., ZAJDELA, F., LONDON, I., and GROS, F.: Patterns of RNA Metabolism in a differentiated Cell: A rapidly labeled, unstable 60 S RNA with messenger properties in duck erythroblasts. Proc.Natl.Acad.Sci. 56, 1571; 1966.

- SCHERRER, K., and MARCAUD, L.: Messenger RNA in Avian Erythroblasts at the Transcriptional and Translational Levels and the Problem of Regulation in Animal Cells. *J.Cell.Comp.Physiol.* 72, Suppl.1, 181-212; 1968.
- SPEMANN, H.: Experimentelle Beiträge zu einer Theorie der Entwicklung. Springer, Berlin 1936.
- STAVY, L., and GROSS, P.R.: The Protein-synthetic lesion in unfertilized eggs. *Proc. Natl.Acad.Sci.* 57, 735-742; 1967.
- TAKATA, C.: The differentiation in vitro of the isolated endoderm under the influence of the mesoderm in *Triturus pyrrhogaster*. *Embryologia* 5, 38-70; 1960.
- TAKATA, C., and YAMADA, T.: Endodermal tissues developed from the isolated newt ectoderm under the influence of guinea pig bone marrow. *Embryologia* 5, 8-20; 1960.
- TATA, J.R.: Hormones and the Synthesis and Utilization of Ribonucleic Acids. *Progress in Nucleic Acid Research* 5, 191-250; 1966.
- THALER, M.M., COX, M.C.L., and VILLEE, A.: Actinomycine D: Uptake by Sea Urchin Eggs and Embryos. *Science*, 164, 832-833; 1969.
- TIEDEMANN, H.: The molecular basis of differentiation in early development of amphibian embryos. In: *Current Topics in Developmental Biology*, Vol. 1, hg. von A. MONROY und A.A. MOSCONA. Academic Press, New York, 85-112; 1966.
- TIEDEMANN, H.: Inducers and Inhibitors of Embryonic Differentiation: Their Chemical Nature and Mechanism of Action. *Exp.Biol.Med.*, Vol.1, 8-21. Hg. von E. HAGEN, W. WECHSLER und P. ZILLIKEN. S. Karger, Basel/New York; 1967.
- TIEDEMANN, H.: Factors Determining Embryonic Differentiation. *J.Cell.Comp.Physiol.* 72, Suppl.1, 129-144; 1968.
- TIEDEMANN, HILDEGARD: Unveröffentlichte Versuche, 1967.
- TIEDEMANN, H., und TIEDEMANN, H.: Versuche zur chemischen Kennzeichnung von embryonalen Induktionsstoffen. *Z.Physiol.Chem.*, 306, 7-32; 1956 a.
- TIEDEMANN, H., und TIEDEMANN, H.: Isolierung von Ribonukleinsäure und Nucleotiden aus Embryonalextrakt und Leber und ihr Verhalten in Induktionsversuch. *Z.Physiol.Chem.* 306, 132-142; 1956 b.
- TIEDEMANN, H., KESSELRING, K., BECKER, U., und TIEDEMANN, H.: Über die Induktionsfähigkeit von Mikrosomen- und Zellkernfraktionen aus Embryonen und Leber von Hühnern. *Develop.Biol.* 4, 214-241; 1962.
- TIEDEMANN, H., BORN, J., und KOCHER-BECKER, U.: Synthese von Ribonukleinsäuren in Ganzkeimen und im isolierten Ektoderm von *Triturus alpestris*. *Z.Naturforschg.* 20b, 997-1004; 1965.
- TIEDEMANN, H., BORN, J., und TIEDEMANN, H.: Chemische Eigenschaften des mesodermalen Induktionsfaktors. Verhalten bei der Zonenzentrifugierung. *Z.Physiol.Chem.* 346, 7-16; 1966.
- TIEDEMANN, H., BORN, J., und TIEDEMANN, H.: Embryonale Induktion und Hemmung der Ribonukleinsäure-Synthese durch Actinomycin D. *Z. Naturforschg.* 22, 649-659; 1967.
- TIEDEMANN, H., TIEDEMANN, H., and BORN, J.: Polyvinylsulfate: Interaction with Complexes of Morphogenetic Factors and Their Natural Inhibitors. *Science* 164, 1175-1176; 1969 a.
- TIEDEMANN, H., BORN, J., und KOCHER-BECKER, U.: Wirkung von Sulfhydrylverbindungen auf embryonale Induktionsfaktoren. *Roux'Arch.Entwicklungsmech.Organ.* 163, 316-324; 1969 b.
- TOIVONEN, S., VAINIO, T. and SAXÉN, L.: The effect of actinomycin D on primary embryonic induction. *Rev.SuisseZool.* 71, 139-145; 1964.
- TYLER, A.: Masked Messenger-RNA and Cytoplasmic DNA in Relation to Protein Synthesis and Processes of Fertilization and Determination in Embryonic Development. *Dev.Biology* 1, 170-226; 1967.

- WALKER, P. M. B.: The Specificity of Molecular Hybridization in Relation to studies on Higher Organisms. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 9, 301-303; 1969.
- WALLACE, H., and BIRNSTIEL, M. L.: Ribosomal Cistrons and the Nucleolar Organizer. *Biochim.Biophys.Acta* 114, 296; 1966.
- WALLACE, R. A.: Studies on amphibian yolk III. A resolution of yolk platelet compounds. *Biochim.Biophys.Acta* 74, 495-504; 1963.
- WANG, Y., MO, H., and SHEN, J.: Studies of the mesoderm-inducing agent from mammalian liver. *Acta Biol.Exptl.Sinica* 8, 356-368; 1963.
- WEBER, R.: Biochemical and Cellular Aspects of Tissue Involution in Development. *Exp.Biol.Med.* Vol.1, 63-76, hg. von E.HAGEN, W.WECHSLER und P.ZILLIKEN. S.Karger, Basel/New York; 1967.
- WILT, F.H.: Regulation of the initiation of chick embryo hemoglobin synthesis. *J.Mol. Biol.* 12, 331; 1965.
- WOODLAND, H. R., and GRAHAM, C. F.: RNA synthesis during early development of the mouse. *Nature* 221, 327-332; 1969.
- YAMADA, T.: A chemical approach to the problem of the organizer. In: *Advances in Morphogenesis*, Vol.1. 1-53, hg. von M.ABERCROMBIE und JEAN BRACHET. Academic Press, New York/London; 1961.
- YAMADA, T.: The inductive phenomenon as a tool for understanding the basic mechanism of differentiation. *J.Cell.Comp.Physiol., Suppl.*1, 60, 49-64; 1962.