

Sex, Plants and Rock'n Roll

Prof. Dr. Ueli Grossniklaus *)



___Faszination Entwicklungsbiologie

Über die letzten Jahrzehnte hat sich die Entwicklungsbiologie in eines der interessantesten und dynamischsten Gebiete der modernen Biologie entwickelt. Viele Erbfaktoren, die ursprünglich isoliert wurden, weil sie für die Entwicklung der Fruchtfliege *Drosophila* eine wichtige Rolle spielen, hat man später auch beim Menschen gefunden. Dort spielen sie eine ähnliche Rolle und können, falls nicht mehr funktionsfähig, zu Erbkrankheiten führen. Die Errungenschaften der modernen Entwicklungsbiologie und ihre Bedeutung auch für medizinische Aspekte wurde vor fünf Jahren mit dem Nobelpreis für Physiologie und Medizin an E. Lewis, C. Nüsslein-Vollhard und E. Wieschaus, welche die Steuerung der Embryonalentwicklung bei *Drosophila* studierten, ausgezeichnet [1,2].

Die Entwicklungsbiologie hat aber eine sehr lange Geschichte und ist wohl der älteste Zweig der Biologie, geht sie doch auf den Griechischen Philosophen Aristoteles zurück. Aristoteles öffnete jeden Tag ein Ei aus dem Gelege eines Huhnes und konnte so die Bildung des Embryos und seiner Organe verfolgen. Laut Aristoteles steht am Anfang der Wissenschaft

die Neugier, und in der Tat fasziniert uns heute die Entstehung eines Embryos aus einer einzigen befruchteten Zelle noch genau so, wie das für Aristoteles in 4. Jahrhundert vor Christus der Fall war. Für mich ist die Entwicklung eines Organismus eine sich nicht erschöpfende Quelle der Neugier. Ich hatte das Privileg, schon während meiner Dissertation bei Walter Gehring die Entwicklungsvorgänge zu studieren, die zur Bildung der Eizelle in *Drosophila* führen [3]. Ich untersuchte auch, welchen Einfluss die Erbfaktoren der Mutter auf die Entwicklung des entstehenden Embryos ausüben [4]. Beide Fragen faszinieren mich noch heute, allerdings befasst sich meine wissenschaftliche Arbeit nicht mehr mit Fruchtfliegen, sondern mit Pflanzen [www.unizh.ch/botinst]. Dies hat einerseits den Grund, dass wir sehr wenig über die genetischen Grundlagen der Pflanzenentwicklung wissen und so bei Pflanzen grundlegend neue Lösungen für entwicklungsbiologische Probleme zu erwarten sind. Andererseits sind Pflanzen von so grosser sozio-ökonomischer Wichtigkeit (Nahrungsversorgung der wachsenden Erdbevölkerung), dass unbedingt mehr Grundlagen für zukünftige Anwendungen erarbeitet werden müssen.

___Generationenwechsel

Die Erbsubstanz höherer Organismen ist in einzelne Chromosomen aufgeteilt. Sich sexuell fortpflanzende Organismen haben einen doppelten Chromosomensatz, wobei eine Kopie vom Vater und die zweite von der Mutter stammt. Damit die Chromosomenzahl über Generationen hinweg erhalten bleibt, werden die Chromosomen in einer Reifeteilung (Meiose) auf die Hälfte reduziert. Die Keimzellen (Eizellen und Spermien) haben also nur die Hälfte der Chromosomen einer normalen Körperzelle. Bei der Verschmelzung der Keimzellen während der

*) Prof. Dr. Ueli Grossniklaus
Institut für Pflanzenbiologie
der Universität Zürich
Zollikerstrasse 107
CH-8008 Zürich

Tel. 01 634 82 11
Fax 01 000 00 00
e-mail grossnik@botinst.unizh.ch

Nachdruck mit Quellenangabe gestattet.

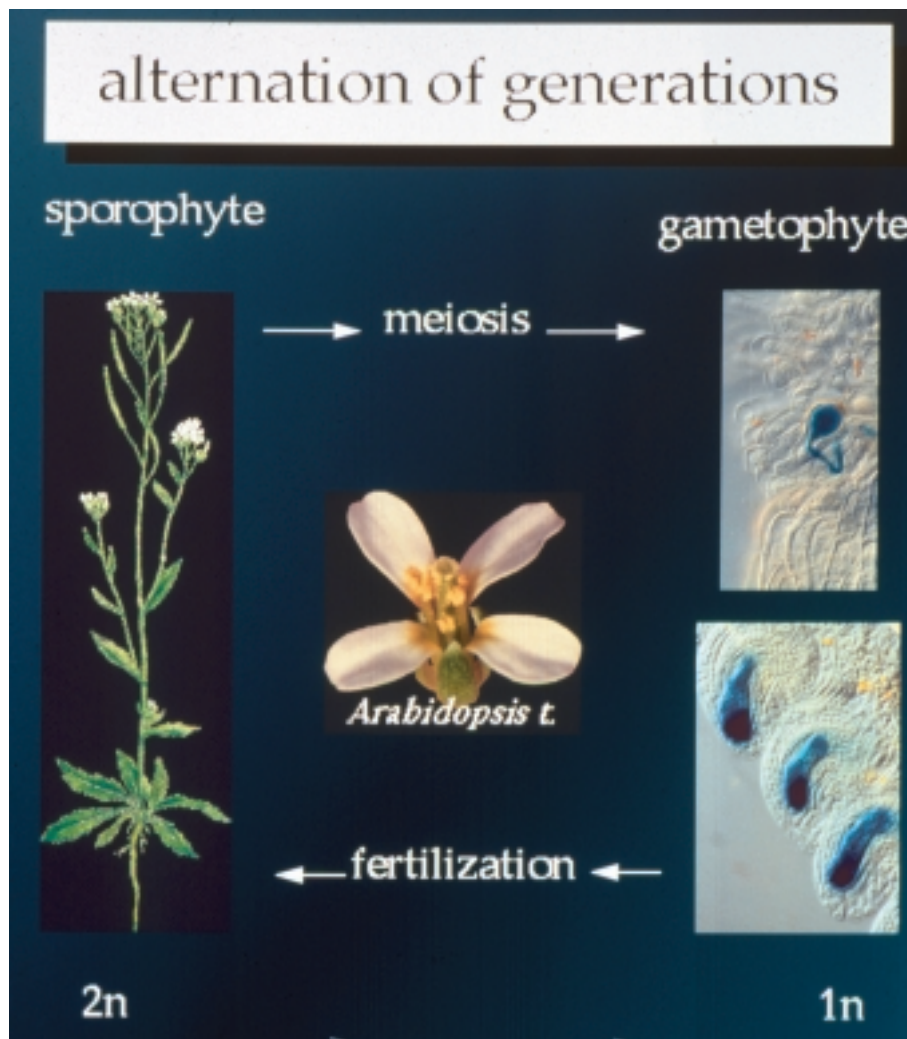


Abbildung 1 Wechsel der Generationen. Der Lebenszyklus der Pflanzen hat zwei ausgeprägte Generationen. Die Gametophyten (Pollen und Embryosack) sind blau gefärbt.

Befruchtung wird die ursprüngliche Chromosomenzahl wieder hergestellt. Dieser Wechsel zwischen normaler (diploider $2n$) und halbiertes (haploider $1n$) Chromosomenzahl ist bei Pflanzen viel ausgeprägter als bei Tieren. Während sich bei Tieren die Zellen, die aus einer Reifeteilung hervorgehen, direkt zu Eizellen und Spermien entwickeln, bilden die Zellen mit reduzierter Chromosomenzahl bei Pflanzen (sogenannte Sporen) eine unabhängige zweite Generation des Lebenszyklus [5]. Die Sporen untergehen Zellteilungen und bilden einen Organismus, der vollständig aus Zellen mit halbiertes Chromosomenzahl besteht und später die Keimzellen (oder Gameten) bildet. Da dieser Organismus die Gameten produziert, wird er als Gametophyt bezeichnet, während die sporenbildende Generation des pflanzlichen Lebenszyklus Sporophyt genannt wird (Abbildung 1). Bei niederen Pflanzen, z. B. Moosen, besteht der Gametophyt aus Tausen-

den von Zellen und bildet die dominante Generation des Lebenszyklus (Abbildung 2a). In der Evolution der höheren Pflanzen wurde der Gametophyt immer mehr reduziert. Während er bei Farnen noch immer freilebend, aber doch viel kleiner als der Sporophyt ist (Abbildung 2b), bestehen die Gametophyten der Blütenpflanzen aus einer sehr kleinen Anzahl von Zellen und entwickeln sich innerhalb der Geschlechtsorgane der Blüte. Unser Interesse gilt dem weiblichen Gametophyten oder Embryosack (Abbildung 2c), der die weiblichen Gameten bildet und sich innerhalb der Samenanlagen des Fruchtknotens entwickelt.

Modellsystem Arabidopsis

Für unsere Studien benutzen wir die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand). *Arabidopsis* birgt viele Vorteile für den Genetiker, der Entwicklungsvorgänge studieren will. Die Pflanze ist klein, hat eine kurze Generationszeit von 6 bis 8 Wochen, ist selbstbefruchtend und produziert eine grosse Anzahl von Nachkommen [6]. Eine Keimzelle von *Arabidopsis* hat nur 5 Chromosomen und das kleinste bekannte Genom (Gesamtheit aller Erbinformation) aller Pflanzen, das bis Ende 2000 ganz entschlüsselt sein wird. (www.arabidopsis.org/agi.html) Der Embryosack von *Arabidopsis* (Abbildung 2c) ist typisch für 70% der Blütenpflanzen und besteht aus nur sieben Zellen. Obschon diese Zellen alle aus einer einzelnen Spore hervorgegangen sind, haben sie sich sehr unterschiedlich entwickelt und vollführen spezifische Funktionen. Im Embryosack gibt es vier Zelltypen, zwei davon werden von je einem Spermium befruchtet (Doppelbefruchtung) und entwickeln sich zum Samen [7]. Die befruchtete

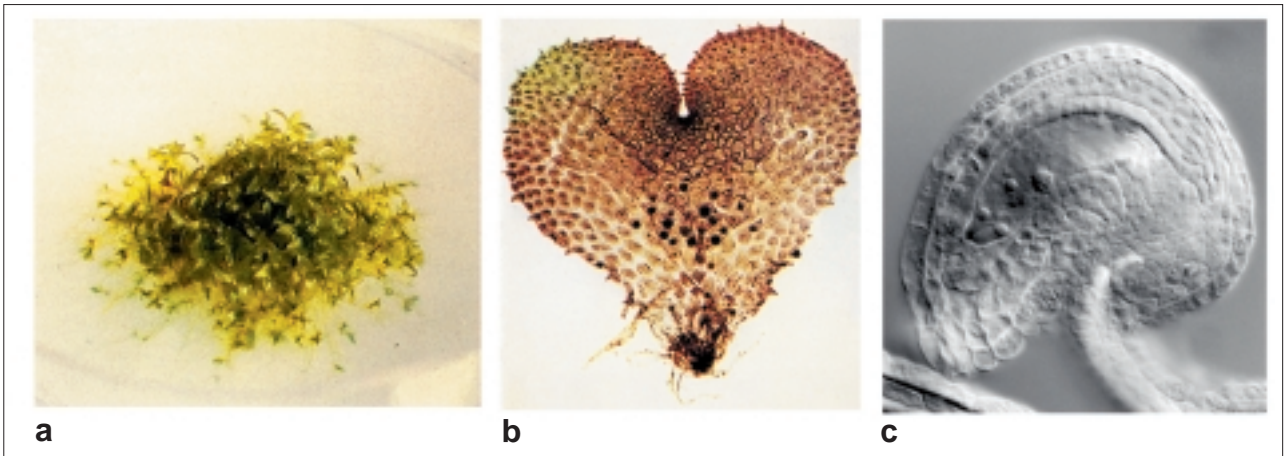


Abbildung 2 Evolution der Gametophyten. Die Gametophyten von Moos (a) und Farn (b) sind noch freilebend und bestehen aus einer grossen Anzahl von Zellen. Der weibliche Gametophyt der Blütenpflanzen entwickelt sich innerhalb der Samenanlage und besteht aus nur sieben Zellen (c).

Eizelle bildet den Embryo und schliesslich den Sämling, während die befruchtete Zentralzelle ein Nährgewebe, den Endosperm, bildet. Dieser ist ökonomisch von enormer Bedeutung macht er doch circa 80% eines Weizen-, Reis- oder Maiskorns aus. Was steuert diese so unterschiedliche Entwicklung von Embryo und Endosperm, welcher seine Existenz zu Gunsten des Embryos aufgibt? Welche Erbfaktoren führen dazu, dass die Ei- und Zentralzelle, die nur durch eine einzige Zellteilung voneinander getrennt sind, so unterschiedliche Produkte bilden? Wie wird die Arbeitsteilung (Zellspezialisierung) zwischen den Zellen des Embryosacks geregelt? Warum verschmelzen die Spermien, die durch den Pollenschlauch zum Embryosack transportiert werden, nur mit der Ei- und Zentralzelle und nicht mit ihren Schwesterzellen?

Trotz der grossen Wichtigkeit der Keimzellenbildung, Befruchtung und Samenentwicklung für die Pflanzenzucht und Samenproduktion (Saatgut, Nahrungs- und Futtermittel) liegen die genetischen Grundlagen dieser Entwicklungsprozesse noch weitgehend im Dunkeln. Nur wenige Erbfaktoren (Gene), welche diese Prozesse steuern wurden bisher identifiziert und noch weniger auf molekularer Ebene erforscht [5]. Unser Ziel ist es, in den nächsten Jahren die genetische Steuerung dieser wichtigen Prozesse besser zu verstehen und unsere Erkenntnisse auszunützen, um die Möglichkeiten der Pflanzenzucht zu verbessern. Insbesondere möchte wir einen Beitrag leisten zur Aufklärung der molekularen Mechanismen, welche

- 1) zur Bildung der Sporen führen
- 2) die Spezialisierung der Zellen im Embryosack steuern
- 3) die Doppelbefruchtung kontrollieren
- 4) an der mütterlichen Kontrolle der Samenbildung beteiligt sind

___Potentielle Anwendungen: Apomixis

Erkenntnisse auf diesen Gebieten sind nicht nur aus der Sicht des Entwicklungsbiologen hochinteressant, sondern bergen auch ein grosses Potential für agronomische Anwendungen. Im Zentrum unserer Forschung stehen daher Entwicklungsschritte, welche langfristig eine Veränderung der Fortpflanzungsprozesse mittels Gentechnologie ermöglichen. Wir sind speziell an Apomixis interessiert [8], ein Prozess, der die exakte Vervielfältigung von Pflanzen erlaubt und bei circa 700 Pflanzen natürlich vorkommt. Apomixis wurde in Zürich seit Beginn dieses Jahrhunderts durch die Dres. A. Ernst, A. Rütishauser und G. Nagler studiert. Die Einführung von Apomixis in Kulturpflanzen verspricht soziale und ökonomische Vorteile, welche die der Grünen Revolution, die Millionen von Menschen das Leben gerettet hat, bei weitem übersteigen [9]. In apomiktischen Pflanzen sind ganz bestimmte Entwicklungsschritte während der Fortpflanzung verändert. Ein besseres Verständnis der genetischen und molekularen Grundlagen dieser Prozesse ist deshalb der erste Schritt auf dem Weg zur Entwicklung von Apomixis in Kulturpflanzen [10]. Diese

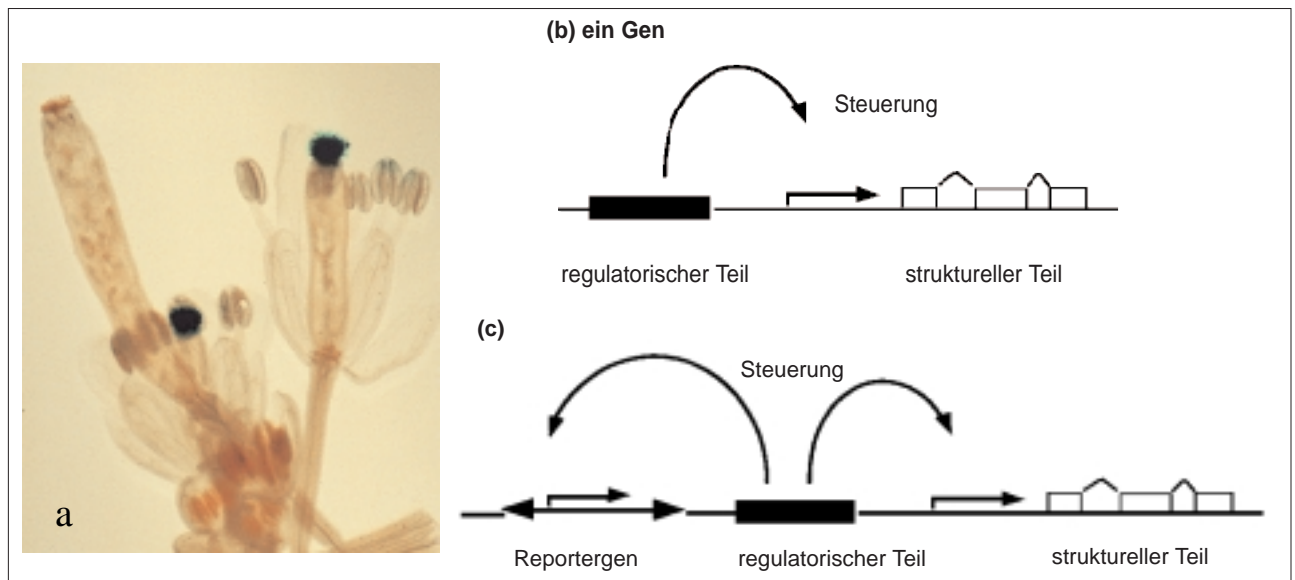


Abbildung 3 Enhancer Detektion. Ein Gen besteht im allgemeinen aus einem strukturellen Teil, der die Information für eine bestimmte Eiweisskette enthält, und einem regulatorischen Teil, der die Aktivität des Gens kontrolliert (a). Diese Kontrollsequenzen können auch auf andere Gene, zum Beispiel ein Reporter-gen, wirken (b), so dass das Reporter-gen in der gleichen Weise reguliert wird und zum Beispiel nur in den Zellen der Narbe (blaue Färbung) aktiv ist (c).

Technologie wird vor allem auch den Ländern des Südens, die heute kaum von Züchtungsprogrammen profitieren und daher jedes Jahr einen Großteil der Ernte verlieren, grosse Vorteile bringen. Daher ist es wichtig, dass die Grundlagen allgemein zugänglich sind und in der Öffentlichkeit bleiben (<http://billie.harvard.edu/apomixis>).

Die Suche nach den Erbfaktoren: Gene bekennen Farbe

Wie können wir nun aber die Erbfaktoren identifizieren, die für die Entwicklungsprozesse während der Fortpflanzung eine wichtige Rolle spielen? Alle Zellen eines Organismus enthalten die exakt gleiche Erbsubstanz. Daher ist es wichtig welche dieser Gene in einer bestimmten Zelle oder während eines Prozesses ausgeprägt werden. Mit anderen Worten sind während eines Entwicklungsprozesses nur bestimmte Gene aktiv und die Zusammensetzung der Gruppe von aktiven Genen ändert sich mit dem Fortschreiten des Prozesses [11]. Die Suche nach Erbfaktoren, die während eines bestimmten Prozesses aktiv sind, gleicht der Suche nach der Nadel im Heuhaufen und wird umso schwieriger, je weniger Zellen an diesem Prozess beteiligt sind. Wie können wir einen Erbfaktor finden, der zum Beispiel nur in

der Eizelle aktiv ist? Wir benutzen dazu eine Methode (Enhancer Detektion), die zuerst für *Drosophila* entwickelt wurde und die Sichtbarmachung von aktiven Erbfaktoren ermöglicht [11,12].

Um diese Methode zu erklären, muss ich zuerst noch zwei Punkte erläutern. Erbfaktoren bestehen im allgemeinen aus zwei Komponenten. Zum einen aus DNS Sequenzen, welche die Information für ein bestimmtes Eiweiss enthalten, zum anderen aus Sequenzen, welche die Information enthalten, wo und wann dieses Gen aktiv sein soll (Figur 3b). Diese Kontrollsequenzen werden auch Enhancer genannt und können nicht nur auf das dazugehörige Gen wirken, sondern auch auf andere Gene, die sich in ihrer Nachbarschaft befinden. Diese Eigenschaft kann man nutzen, indem Gene, deren Aktivität man einfach nachweisen kann (z. B. durch eine Färbereaktion), die aber keine eigenen Kontrollsequenzen tragen, in die Erbsubstanz integriert werden (Abbildung 3c). Diese Reporter-gene können dann sozusagen die Kontrollsequenzen und die dazugehörigen Gene in der Erbsubstanz aufspüren. Mit Enhancer Detektion können also in bestimmten Zellen aktive Gene durch eine Färbereaktion identifiziert werden. So ist zum Beispiel das in Abbildung 3a gezeigte Gen nur in den Zellen der Narbe der Arabidopsis Blüten aktiv (blaue Färbung).



Abbildung 4 Maiskolben mit sichtbarer Aktivität von hüpfenden Genen. Ein hüpfendes Gen hat einen Erbfaktor zerstört, der für die Bildung des dunklen Pigmentes wichtig ist (gelbe Körner). Überall, wo das hüpfende Gen wieder herauspringt, entsteht ein dunkler Fleck.

___ Hüpfende Gene zeigen den Weg

Um diese Reportergene an möglichst verschiedene Stellen in der Erbsubstanz zu bringen, werden «hüpfende Gene» benutzt, die sich innerhalb der DNS bewegen können. Wir benutzen das sogenannte *Dissociator (Ds)* Element, das von Barbara McClintock, einer weiteren Nobelpreisträgerin, in den 40er Jahren in Mais entdeckt wurde [13]. Barbara McClintock hat auch aufgeklärt, dass ein zweites Gen, das *Activator (Ac)* Element, benötigt wird, damit das *Ds* Element herumhüpfen kann. Die Aktivität dieser Elemente ist in *Abbildung 4* illustriert. Ein *Ds* Element hat ein Gen zerstört, das für die dunkle Pigmentierung der Maiskörner verantwortlich ist und daher sind diese Körner gelb. Da auch das *Ac* Element vorhanden ist, kann das *Ds* Element heraushüpfen und das Pigmentgen wird wieder funktionsfähig. In Zellen, in denen das *Ds* Element herausgehüpft ist, wird ein wieder Pigment gemacht, was zu einem dunklen Fleck führt. Dieses System funktioniert auch in *Arabidopsis*. Das *Ds* Element wurde mit einem Reportergen ergänzt, das nun je nachdem ob *Ac* vorhanden ist oder nicht, hüpfen oder stabilisiert werden kann [14].

Wir haben dieses auf dem *Ds* Element basierende Enhancer Detektions System in *Arabidopsis* be-

nutzt, um circa 4000 Pflanzenlinien zu erzeugen, die alle ein solches Element an einer anderen Zelle in ihrer Erbsubstanz tragen. Wir haben dann die Fruchtknoten herausgeziert und sie für Reportergenaktivität gefärbt. Wir konnten so die allerersten Erbfaktoren identifizieren, die im Embryosack aktiv sind (*Abbildung 5*). Die Strukturen sind so klein, dass die Färbungen nur unter dem Mikroskop angeschaut

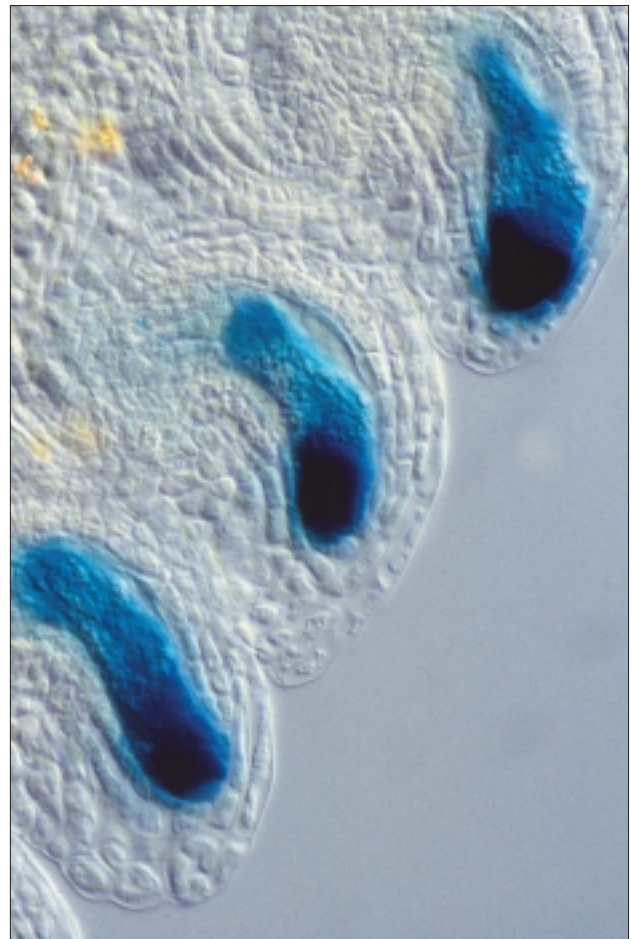


Abbildung 5 Enhancer Detektion hat ein Gen, das in den Zellen des Embryosackes aktiv ist, identifiziert. Das hier durch Färbung (blaue Färbung) sichtbar gemachte Gen ist nur in Zellen des Embryosackes, nicht jedoch in sporophytischen Zellen der Samenanlage aktiv.

werden können. Wir konnten auch Gene identifizieren, die nur in sogenannten Eiapparat aktiv sind (*Abbildung 6*) und sogar solche die nur in einer einzigen Zelle ausgeprägt werden. Gene mit so hochspezifischer Aktivität könnten auf keine andere Weise gefunden werden. Da das *Ds* Element wie eine rote Flagge die Stelle in der DNS angibt, wo sich das gesuchte Gen befindet, ist es auch ein leichtes, diese molekular zu isolieren. Wir sind dabei mehrere Gene, die nur in ganz spezifischen Zellen (z.B. der Eizelle) des Embryosackes aktiv sind, auf der molekularen Ebene zu charakterisieren. Diese Arbeiten

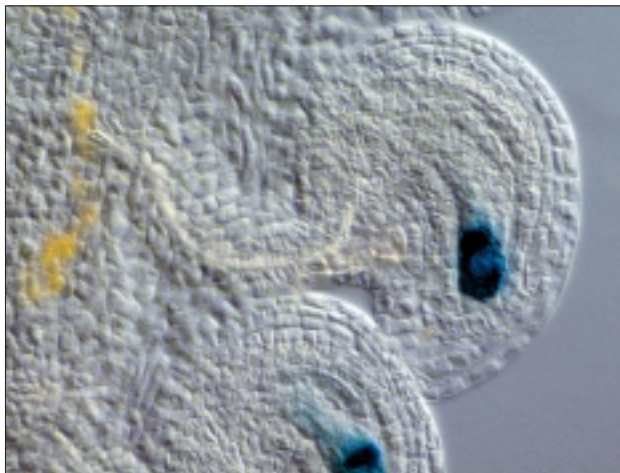


Abbildung 6 Das hier durch Färbung (blaue Färbung) sichtbar gemachte Gen ist nur in der Eizelle und zwei Helferzellen (Eiapparat) aktiv.

geben uns zum ersten Mal einen Einblick in die molekularen Grundlagen der Entwicklung dieses für die Fortpflanzung und Samenbildung zentralen Organismus.

___Dank

Ich danke James Moore für *Abbildung 1* und den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe für ihre wertvolle Mitarbeit und ihren Enthusiasmus. Arbeiten in meinem Labor werden unterstützt durch die Europäische Molekularbiologie Organisation, die Novartis Forschungsförderung, den «Searle Family Trust», den Kanton Zürich und das Bundesamt für Bildung und Wissenschaft.

Literatur

- 1) Lewis, E.B. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* **276**: 565-70.
- 2) Nüsslein-Volhard, C. and Wieschaus, E. Nüsslein-Volhard C, (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* **287**: 795-801.
- 3) Grossniklaus, U., Bellen, H.J., Wilson, C. and Gehring, W.J. (1989). P-element mediated enhancer detection applied to the study of oogenesis in *Drosophila*. *Development* **107**: 189-200.
- 4) Grossniklaus, U., Cadigan, K.M. and Gehring, W.J. (1994). Three maternal coordinate systems cooperate in the patterning of the *Drosophila* head. *Development* **120**: 3155-3171.
- 5) Grossniklaus, U. and Schneitz, K. (1998). Genetic and molecular control of ovule development and megagametogenesis. *Seminars in Cell & Devl. Biol.*, 9: 227-238.
- 6) Meyerowitz, E.M. (1989). *Arabidopsis*, a useful weed. *Cell* **56**: 263-269.
- 7) Russell, S.D. (1992). Double fertilization. In *Sexual reproduction in flowering plants*. (Russell, S.D. and Dumas, C. eds.) *International Review of Cytology* 140. Academic Press, New York, USA, pp. 357-388.
- 8) Nogler, G.A. (1984). Gametophytic apomixis. In *Embryology of Angiosperms* (Johri, B.M. ed.) Springer Verlag, Berlin, Germany, pp. 475-518.
- 9) Grossniklaus, U., Koltunow, A. and van Lookeren Campagne, M. (1998). A bright future for apomixis. *Trends in Plant Sciences*, 3: 415-416.
- 10) Grossniklaus, U., Moore, J.M. and Gagliano, W.B. (1998). Molecular and genetic approaches to understanding and engineering apomixis: *Arabidopsis* as a powerful tool. In *Advances in Hybrid Rice Technology*. Proceedings of the 3rd International Symposium on Hybrid Rice 1996 (Virmani, S.S., Siddiq, E.A., Muralidharan, K., eds.) International Rice Research Institute, Manila, Philippines, pp. 187-211.
- 11) O'Kane, C. and Gehring, W.J. (1987). Detection in situ of genomic regulatory elements in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 9123-9127.
- 12) Bellen, H.J., O'Kane, C.J., Wilson, C., Grossniklaus, U., Pearson, R.K. and Gehring, W.J. (1989). P-element-mediated enhancer detection: a versatile method to study development in *Drosophila*. *Genes & Dev.* **3**: 1288-300.
- 13) McClintock, B. (1950). The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **36**: 344-349.
- 14) Sundaresan, V., Springer, P.S., Volpe, T., Haward, S., Jones, J.D.G., Dean, C., Ma, H. and Martienssen, R.A. (1995). Patterns of gene action in plant development revealed by enhancer trap and gene trap transposable elements. *Genes & Dev.* **9**: 1797-1810.