



■ GERRIT BEGEMANN

Fisch und Mensch

EIN KLEINES MOLEKÜL STEUERT DIE ENTWICKLUNG VON EXTREMITÄTEN

■ Ausgewählte Zellen des Embryos leuchten unter dem Fluoreszenzmikroskop und ermöglichen so die Identifizierung bestimmter Gewebe (Foto: Peter Kolb).

Angeborene Fehlbildungen der Gliedmaßen treten bei 0,1 bis 0,2 Prozent aller Geburten auf. Häufig betroffen sind Finger oder Zehen, in seltenen Fällen kommt es zu schweren Defekten bei Armen und Beinen. Auch in der Evolution spielt der Verlust von Gliedmaßen eine wesentliche Rolle. Bei Wirbeltieren hat die Evolutionsgeschichte dazu geführt, dass die Beine bei Schlangen und Blindschleichen verschwunden sind. Wale und Delfine verloren ihre funktionslosen Hinterextremitäten, und bei vielen der flugunfähigen Vögel sind die Flügel, wie bei den Kiwis, zu unscheinbaren Stummeln verkümmert. Tatsächlich stammt auch der Mensch, wie alle Säugetiere, letzten Endes von den Fischen ab. Deshalb verwundert es nicht, dass unsere Arme und Beine aus den Brust- und Bauchflossen jener Fische entstanden sind, die erstmals das Wasser verließen und fortan amphibisch oder ganz an Land lebten. Fische haben während der Evolution so häufig die hinteren Extremitäten verloren, dass Carl von Linné die Klassifizierung der Fische 1894 nach den Bauchflossen vornahm. Er würdigte das Phänomen mit einer eigenen Ordnung innerhalb der Fische, den ‚fußlosen‘ Fischen (*Pisces Apodes*).

Scheinbar sind die Bauchflossen entbehrlich und die Brustflossen nicht – aber warum ist das so? Das Skelett der vorderen Extremitäten unterstützt bei Fischen die Kiemenatmung und das Verschlucken von Beute. Dadurch könnten schon kleine evolutive Veränderungen der Brustflossen zu schweren Beeinträchtigungen bei der Atmung und Nahrungsaufnahme führen. Das Skelett der hinteren Extremitäten dagegen dient ausschließlich der Verankerung der Bauchflossen. Dass deren Verlust hinnehmbar ist, zeigen etliche Familien von Fischen, unter ihnen die Aale. Sie kommen gänzlich ohne Bauchflossen, nie aber ohne Brustflossen aus.

FISCHE ALS MODELLORGANISMEN

Um auf den Ebenen von Zellen und Genen zu verstehen, wie die Gliedmaßen von Wirbeltieren gebildet werden, untersucht man diese komplexen Prozesse an Modellorganismen. Der Zebraquariabärling ist ein kleiner tropischer Fisch, der in der biomedizinischen Forschung hohe Wellen schlägt. Er eignet sich hervorragend, um Embryonen beim Wachsen zuzuschauen, denn die Fischeier sind zahlreich, entwickeln sich außerhalb der Mutter und sind komplett durchsichtig. Infolge ihrer

Transparenz kann man ohne Eingriffe von außen beobachten, wie Vorgänge bei der Entstehung eines Organs, des Blutgefäß- oder Skelettsystems ablaufen. Noch wichtiger ist, dass es eine große Anzahl unterschiedlicher Zuchtformen von Zebraquariabärlingen mit genetischen Defekten der Gliedmaßenentwicklung gibt (Abb. 1).

„WILL MAN FEHLENTWICKLUNGEN VON MENSCHLICHEN GLIEDMASSEN VERSTEHEN, KANN MAN DIE ZU GRUNDE LIEGENDE GENETIK AN FISCHFLOSSEN ERFORSCHEN.“

Ausschlaggebend für die Forschung mit Zebraquariabärlingen ist die Erkenntnis, dass sich sehr viele Erkrankungen des Menschen im Fisch simulieren lassen. Denn die meisten der beteiligten Mechanismen sind so tiefgreifend in der Evolution verankert, dass sie in Fischen und im Menschen annähernd gleich ablaufen. Will man Fehleentwicklungen von menschlichen Gliedmaßen verstehen, kann man die zu Grunde liegende Genetik an Fischflossen erforschen.

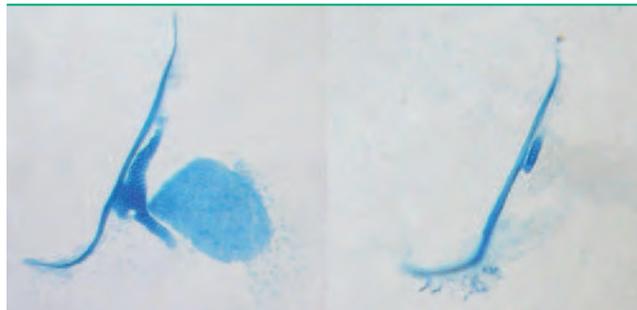


Abb. 1: An Schulterblatt und Schlüsselbein einer Zebraquariabärlarve (in der Form eines Bumerangs) hängt eine flache Knorpelscheibe, aus der sich die Knochen der Brustflosse entwickeln. Rechts: Bei einer mutanten Linie ohne Retinsäure entwickeln sich die Brustflossen nicht (Mikroskopische Aufnahme: Gerrit Begemann).

RETINSÄURE: UNENTBEHRLICH FÜR DEN KONTROLLIERTEN ABLAUF DER EMBRYONALENTWICKLUNG

Es gibt eine große Anzahl von Genen, die bei der Entwicklung der Gliedmaßen eine Rolle spielen. Einige von ihnen sind nur in den Hinterextremitäten aktiv, wie beispielsweise das *Tbx4*-Gen in den Bauchflossen (Abb. 2). Die meisten Gene werden aber in beiden Gliedmaßen benötigt und sind auch an weiteren Prozessen der Embryonalentwicklung beteiligt. Ein Beispiel hierfür spielt in der Arbeitsgruppe von Professor Gerrit Begemann eine zentrale Rolle: Retinsäure ist ein kleines Molekül, das in der Entwicklung aller Wirbeltiere wie ein Ein/Aus-Schalter für bestimmte Gene funktioniert.¹

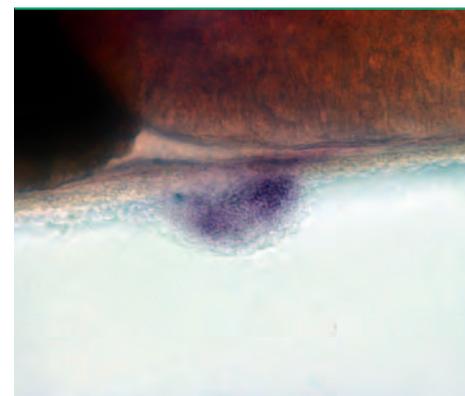


Abb. 2: Farblicher Nachweis für die Aktivität des *Tbx4*-Gens in einer sich entwickelnden Bauchflosse (Mikroskopische Aufnahme: Gerrit Begemann).



Abb. 3: Vor der Untersuchung von Embryonen werden unbefruchtete Eier der Zebraäbblinge unter dem Mikroskop aussortiert, am Mikroskop: Doktorandin Heidrun Draut M.Sc. (Foto: Peter Kolb).

Abb. 4 (rechts): Ein Zebraäbblingsweibchen kann bis zu 100 Eier legen. Eizellen und Embryonen sind transparent und somit gut zu beobachten (Foto: Peter Kolb).

Abb. 5: Die Larve eines Zebraäbblings, 6 Wochen alt und 1 cm lang (Mikroskopische Aufnahme: Gerrit Begemann).



pe herausfinden, dass Retinsäure von der Rumpfmuskulatur produziert wird und von dort auf die Vorläuferzellen der Brustflossen wirkt.² Retinsäure blockiert hier die Wirkung eines anderen Signalmoleküls, das die Entwicklung der benachbarten Herzvorläuferzellen unterstützt. Die Wechselwirkung der konkurrierenden Signale teilt den gemeinsamen Zellpool so auf, dass Herz- und Brustflossenentwicklung gemeinsam aus ihm gespeist werden.

Der Körper kann Retinsäure nicht selber herstellen, sondern gewinnt sie über die Nahrung aus dem Vitamin A oder als Embryo aus dem Vitaminvorrat des Dotters. Im Embryo stellen spezialisierte Zellen in sich entwickelnden Organen ein Enzym her, das aus Vitamin A Retinsäure gewinnt. Von dort aus kann Retinsäure wie ein Funksignal auf umliegende Zellen abgestrahlt werden, in deren Zellkerne eindringen und dort gezielt eine Reihe von Genen aktivieren. Diese kontrollieren zum Beispiel in den Gliedmaßen, aber auch im Herz und Zentralen Nervensystem, wichtige Entwicklungsschritte.

Die Arbeitsgruppe Entwicklungsbiologie hat entdeckt, dass eine Mutation im Enzym, das Retinsäure zur Verfügung stellt, zu schweren Entwicklungsdefekten dieser Organe führt. Ohne Retinsäure bildet sich kein Skelett in der Schulterregion, und die Vorderextremitäten fehlen. Durch eine zeitlich genau abgestimmte Blockade der Retinsäureproduktion in gesunden Embryonen konnte die Arbeitsgrup-

pe herausfinden, dass Retinsäure von der Rumpfmuskulatur produziert wird und von dort auf die Vorläuferzellen der Brustflossen wirkt.² Retinsäure blockiert hier die Wirkung eines anderen Signalmoleküls, das die Entwicklung der benachbarten Herzvorläuferzellen unterstützt. Die Wechselwirkung der konkurrierenden Signale teilt den gemeinsamen Zellpool so auf, dass Herz- und Brustflossenentwicklung gemeinsam aus ihm gespeist werden.

Neuere von der DFG-geförderte Studien haben außerdem gezeigt, dass Retinsäure für die Regeneration ausgewachsener Flossen mitverantwortlich ist. Verletzt sich ein Zebraäbbling an der Flosse, so wächst das amputierte Gewebe innerhalb von zwei Wochen komplett nach. Dabei kontrolliert Retinsäure die Zellteilung im nachwachsenden Gewebe und sorgt überdies dafür, dass sich Knochenzellen vermehren und wieder so verteilen, dass die Gesamtstruktur des Flossenskeletts wieder hergestellt wird.³

ENTWICKLUNGSPROZESSE SICHTBAR MACHEN

Wie unterscheidet sich die Entwicklung von Vorder- und Hinterextremitäten? Hier liegt der aktuelle Schwerpunkt der entwicklungsbiologischen Forschung in Bayreuth. Jetzt, da bekannt ist, wie Retinsäure die vorderen Gliedmaßen kontrolliert, stellt sich die Frage, ob das in den Bauchflossen des Zebraäbblings genauso funktioniert. Die Frage ist weder trivial, noch ist sie im Hinblick auf den derzeitigen Stand der Forschung einfach zu beantworten. Denn einerseits haben Untersuchungen an Mäusen ergeben, dass sich die Hinterbeine anscheinend auch ohne Retinsäure bilden; andererseits widerspricht dieser Befund dem gegenwärtigen Modell, wie sich Extremitäten bei Wirbeltieren grundsätzlich entwickeln: nämlich entlang einer räumlichen Achse, die auf der Rumpfseite von Retinsäure kontrolliert und an der Spitze der

auswachsenden Extremität von einem anderen Wachstumsfaktor gesteuert wird. Wenn dies zutrifft, würde Retinsäure auch die Entwicklung der Hinterextremitäten beeinflussen. Die geplanten Untersuchungen an Fischen als Modellsystem können also dazu beitragen, diesen grundlegenden Entwicklungsprozess bei Wirbeltieren aufzuklären.

Die Bauchflossen bei Zebraabrlingen entstehen erst nach 3 bis 4 Wochen in jungen Larven von 1 cm Länge (Abb. 5). Die Beobachtung der Bauchflossenentwicklung gelingt am lebenden Tier durch Zuchtlinien, bei denen bestimmte Zelltypen durch farbige Proteine sichtbar gemacht werden. Diese Moleküle leuchten unter schwachem UV-Licht rot oder grün (Abb. 6), ohne die Fischlarve zu beeinträchtigen. Auf diese Weise ist es möglich, einzelne Zellen unter dem Mikroskop zu identifizieren und sie über einen Zeitraum zu beobachten, während sie sich zu Knorpelzellen entwickeln und schließlich das Skelett der Bauchflossen anlegen. Um die Funktionen von Retinsäure zu untersuchen, lässt sich die Flossenentwicklung an den leuchtenden Zellen verfolgen, während man ihnen entweder zu viel oder

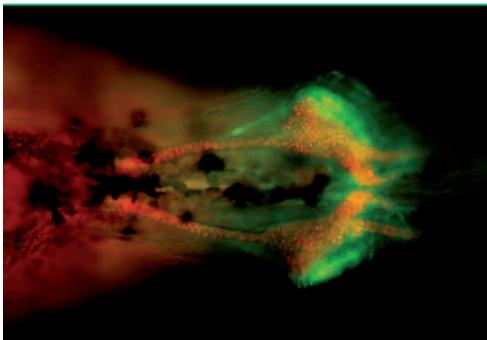


Abb. 6: Das Skelett der Bauchflossen einer Zebraabrlingslarve. Ausgewachsene Knorpelzellen sind rot markiert, Bindegewebszellen mit Knorpelvorläufern leuchten grün (Mikroskopische Aufnahme: Gerrit Begemann).

zu wenig Retinsäure anbietet. Letzteres ist möglich, indem man das Enzym Cyp26a1, das Retinsäure abbaut, gezielt in den Zellen der Bauchflossen aktiviert. Hierfür werden genetisch gezielt veränderte Linien von Zebraabrlingen benötigt, bei denen Cyp26a1 ausschließlich in den Bauchflossen aktiviert werden kann. Gleichzeitig gibt es genetische Tricks, mit denen sich auch die zeitliche Komponente der Aktivierung kontrollieren lässt. Sobald ein solches System eingerichtet und erfolgreich getestet worden ist, können präzise Veränderungen am Retinsäurevorrat vorgenommen werden, ohne dass andere Organe davon betroffen sind.



Abb. 7: Masterstudentin Marlene Schmidt B.Sc. untersucht DNA-Sequenzen, die für die Regulation der Flossenentwicklung notwendig sind (Foto: Peter Kolb).

WAS FISCH UND MENSCHEN VERBINDET

Trotz der Komplexität und relativen Häufigkeit erblicher Defekte bei der Entwicklung von Gliedmaßen sind die zu Grunde liegenden zellulären Vorgänge noch immer nicht ausreichend verstanden. Untersuchungen an geeigneten Tiermodellen bieten die Chance, ganz gezielt einzelne Faktoren in der Entwicklung an- oder auszuschalten. Fische und Menschen stammen von gemeinsamen Vorfahren ab, die – auch wenn es schon sehr lange her ist – bereits paarweise angeordnete Gliedmaßen zur Fortbewegung besaßen. Gesteuert wurde die Entwicklung dieser Gliedmaßen von Genen, die auch heute noch in Fisch und Mensch die Baupläne für Arme, Beine und die dazu homologen Flossen umsetzen.

Zebraabrlinge gewähren der Forschung präzise Einblicke in die hochkomplexe Entwicklung des Embryos zum erwachsenen Tier. Sie bieten die Möglichkeit, die an dieser Entwicklung beteiligten Wechselwirkungen zwischen Zellen, Geweben und Organen sowie deren genetische Steuerung gezielt zu untersuchen. Dadurch können wir auch etwas über den Menschen lernen, bei dem uns solche direkten Einblicke verwehrt bleiben.

AUTOR



Prof. Dr. Gerrit Begemann ist Professor für Entwicklungsbiologie an der Universität Bayreuth.

- 1 Vgl. dazu N. Blum, G. Begemann: 2013. The roles of endogenous retinoid signaling in organ and appendage regeneration. *Cellular and Molecular Life Sciences*. doi:10.1007/s00018-013-1303-7.
- 2 Y. Gibert et al.: 2006. Induction and prepatterning of the zebrafish pectoral fin bud requires axial retinoic acid signaling. *Development* 133: 2649-2659.
- 3 N. Blum, G. Begemann: 2015. Retinoic acid signaling spatially restricts osteoblasts and controls ray-interray organization during zebrafish fin regeneration. *Development* 142:2888-2893, doi: 10.1242/dev.120212, N. Blum, G. Begemann: 2015. Osteoblast de- and redifferentiation are controlled by a dynamic response to retinoic acid during zebrafish fin regeneration. *Development* 142:2894-903, doi: 10.1242/dev.120204.