

Der Zebrafärbling als Modell der Entwicklung und Regeneration

U. Strähle, S. Rastegar, C. Etard, S. Weg-Remers, F. Müller, ITG

Einleitung

Niemand hatte den durchschlagenden Erfolg des Zebrafärblings im Jahre 1981 vorhersehen können, als George Streisinger die Vorzüge dieses neuen Tiersystems, zum ersten Mal der Fachwelt vorstellte [1]. Der Genetiker Streisinger hatte sich bereits in den 70er Jahren auf die Suche nach einem Wirbeltier gemacht, das vergleichbare genetische Eigenschaften besitzt, wie seine bisherigen Studienobjekte, die Bakteriophagen (Viren, die Bakterien befallen). Das Ziel der Genetik ist es, vererbare molekulare Veränderungen, sogenannte Mutationen, in einzelnen Abschnitten der Erbinformation, den Genen einzuführen, um deren Effekte auf den Organismus zu studieren. Die Vision von George Streisinger war es ein Wirbeltier zu finden, mit dem man wie mit Bakteriophagen Genetik betreiben kann, um die Funktion von Genen zu entschlüsseln.

Der Zebrafärbling (Abb. 1A), der wissenschaftlich auch *Danio rerio* und im Englischen „zebrafish“ genannt wird, hatte viele Eigenschaften, die bei einem solchen Unterfangen von Vorteil sind. Die Fische sind im Erwachsenenalter zwischen 3 und 6 cm groß und können 4 bis 6 Jahre alt werden. Dieser tropische Süßwasserfisch, der im Ganges beheimatet ist, legt das ganze Jahr über Eier und ist ohne besonderen Aufwand in Aquarien zu halten. Seine Eier entwickeln sich innerhalb von wenigen Tagen zu freilebenden Larven und dies geschieht komplett außerhalb des Mutterleibes. Dazu kommt noch, dass die Embryonen und Larven optisch transparent sind (Abb. 1B),

so dass die Entwicklung unter dem Mikroskop bei hoher optischer Auflösung verfolgt werden kann.

Anfangs der neunziger Jahre war das Studium des Zebrafärblings noch immer ein eher belächeltes Projekt einiger weniger Arbeitsgruppen. Das System begann jedoch zunehmend Forscher anzuziehen. Ein weiterer Meilenstein im Erfolgskurs des Zebrafärblings

war die im Jahre 1996 publizierten Ergebnisse der Mutanten-Screens der Labore von Christiane Nüsslein-Volhard und Wolfgang Driever. Zusammen hatten diese beide Arbeitsgruppen über eintausend Gen-Mutationen isoliert [2, 3]. Damit war der Durchbruch geschafft und der Zebrafärbling ein anerkanntes Tiermodell geworden. Wurde der Zebrafärbling anfänglich im wesentlichen von Entwicklungs- und Neurobiologen gepriesen, hat man Zebrafärblinge in der Zwischenzeit als Tiermodelle für menschliche Erkrankungen [4, 5], in der Pharmakologie zum „drug-screening“ [6] und in der molekularen Toxikologie [7, 8] adoptiert.

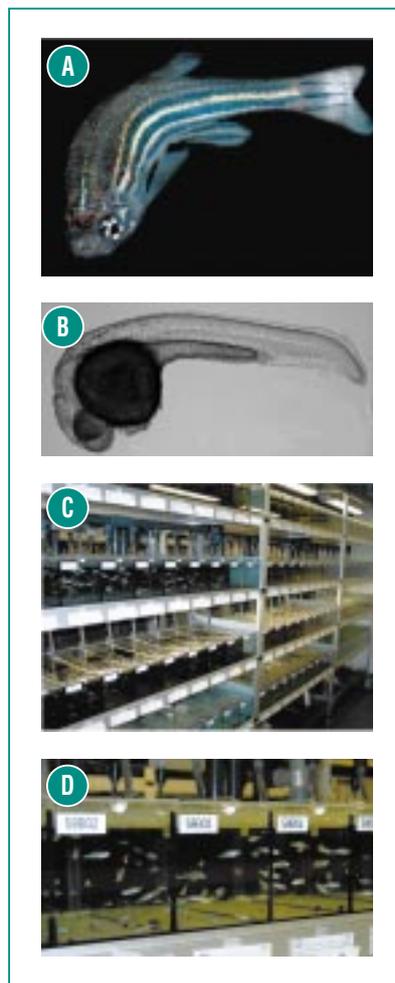


Abb. 1: A: Erwachsener Zebrafärbling. B: Embryo 30 Stunden nach der Befruchtung der Eizelle. C, D: Anlage am Forschungszentrum Karlsruhe zur Massenzucht von Zebrafärblingen.

Die Stärke der „Forward Genetics“ zur Entschlüsselung von molekularen Mechanismen

Das Ziel der Entwicklungsbiologie ist es, die molekularen Mechanismen der Zellkommunikation und der Zellinteraktion zu entschlüsseln, die dazu führen, dass sich komplexe und hochfunktionellen Strukturen wie zum Beispiel ein Fisch oder der Mensch entwickeln können. Dazu braucht man Tiermodellensysteme, da man nur an diesen experimentelle Eingriffe ausführen kann, die notwendig sind, um die zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen zu verstehen.

Ein Vorteil des Zebrafärblings liegt darin, dass man ihn für klassische genetische Experimente (forward genetics) einsetzen kann [2, 3]. In diesen Analysen werden hunderte tausende von Fischen systematisch nach Gendefekten durch-

sucht, die man vorher durch Behandlung mit mutagenen Agenzien im Erbmateriale (der Desoxyribonukleinsäure oder DNS) erzeugt hat. Diese experimentelle Technik ist besonders gut geeignet, um komplexe Prozesse und Strukturen zu untersuchen.

Wie funktioniert dieser Ansatz? Stellen Sie sich vor, Sie wollten z. B. die Funktion eines Mikrowellenherdes verstehen und Sie hätten mehrere hunderte Geräte zur Verfügung. Sie verändern diese Geräte dann, indem Sie jeweils einen Teil entfernen und testen, wie dadurch die Funktion des Gerätes beeinträchtigt wird. Auf diese Weise finden Sie z. B. die Teile, die für die Beleuchtung des Innenraumes verantwortlich sind (mehrere Kabel, Lampe, Fassung, Türschalter, etc). Somit haben Sie zwei Ziele erreicht: Sie haben zum einen Bauteile identifiziert und außerdem gezeigt, dass sie eine Funktion in der Beleuchtung haben. Um dieses Anschauungsbeispiel noch realistischer zu machen, müssten Sie sich vorstellen, dass die Bauteile sehr klein (im Nanometerbereich) sind und der Mikrowellenherd aus mehr als 20.000 Einzelkomponenten besteht. Sie können diese Einzelkomponenten auch nicht anfassen oder sehen, sondern müssen sie erst in großer Stückzahl reproduzieren, um dann mit Hilfe ausgefeilter molekularbiologischer Techniken die chemischen und physikalischen Eigenschaften der Bauteile zu untersuchen.

In den realen genetischen Screens im Zebrafisch gelang es die Funktion von tausenden von Genen bzw. Proteinen (Bauteile des Mikrowellenherdes) im

Zebrafisch zu identifizieren. Es wurden Gene gefunden, die für die Formgebung und Gewebeentwicklung im Embryo (Abb. 2) [2, 3, 9] oder für die Funktion des Nervensystems verantwortlich sind [2, 3, 10, 11]. Verlust des *cyclops* Gens zum Beispiel führt zur Ausbildung eines einzelnen zentralen Auges und Defekten in der Struktur des Gehirnes (Abb. 2A, B) Es ist aber auch klar geworden, dass die Funktion noch sehr vieler Gene unbekannt ist. Das Genom des Zebrafisch, das in der Zwischenzeit fast vollständig sequenziert wurde, umfasst ungefähr 25.000 Gene. Es liegt also noch ein weiter Weg vor uns, bevor wir die Funktion dieses Genoms umfassend verstehen können. Die Fischanlage des Forschungszentrums Karlsruhe soll dazu einen entscheidenden Beitrag liefern (Abb. 1C, D).

Zebrafische als Modelle menschlicher Erkrankungen

Viele Gene im Zebrafischgenom haben verwandte Gene im Menschen. Dadurch wird der Modellcharakter unserer Untersuchungserkenntnisse weiter unterstrichen. Diese Verwandtschaft begrenzt sich nicht nur auf die eigentliche Gen- und Proteinstruktur, sondern umfasst auch die regulatorischen Mechanismen, d. h. wie Gene gesteuert werden und wie Proteine miteinander interagieren. Viele regulatorische Gene, die Entwicklungsprozesse steuern, sind im Menschen als Krebsgene bekannt. Bestimmte Gendefekte rufen im Menschen und im Zebrafisch die gleichen Krankheitssymptome hervor, wie zum Beispiel die Mutation des Dystrophin-Gens, die im Menschen eine erb-

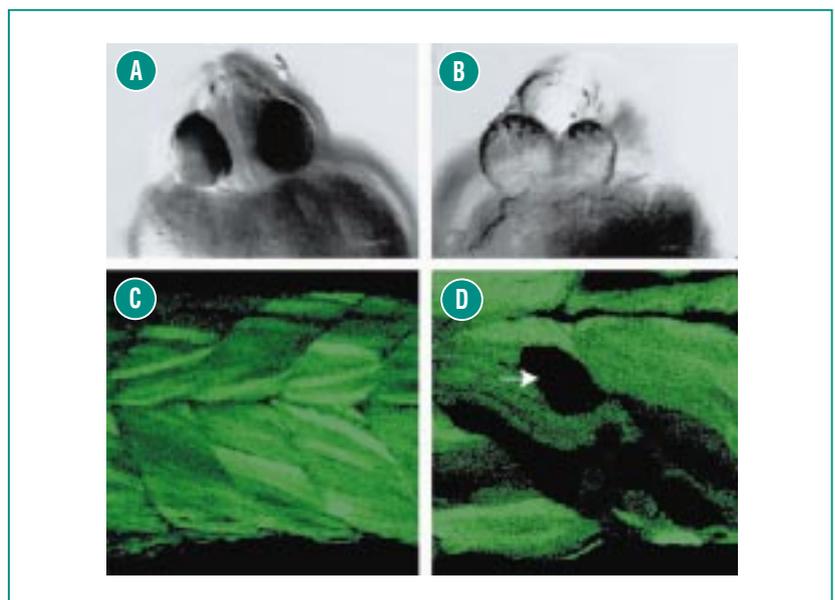


Abb. 2 : A, B: Wildtyp (A) bzw mutanter Embryo (B). Verlust des *cyclops* Gens führt zu einer Fusion der Augen (Cyclopie). C, D: Muskeln von einem Kontroll- (C) bzw „Knock-down“-Embryo (D), dem das Dystrophin-Protein fehlt. Die Muskelfibrillen (grün) lösen sich vom Bindegewebe, wodurch Löcher (Pfeil) im Muskelgewebe entstehen.

liche Muskelschwächeerkrankung verursacht [11, 12] (Abb. 2C,D). Man kann somit durch das Studium der Fisch-Mutanten etwas über menschliche Erkrankungen lernen und sogar die Fische benutzen, um nach neuen Medikamenten oder Therapien für den Menschen zu suchen.

Perspektive

Das Verständnis der molekularen Mechanismen der Krankheiten in Modellsystemen wie dem Zebrafisch ist Voraussetzung, um in Zukunft neue Therapien zu

entwickeln. Die gezielte Regeneration von menschlichen Geweben, die durch Verletzung oder Krankheit geschädigt wurden, ist ein nach dem heutigen Wissensstand noch visionäres Ziel. Um solche ehrgeizigen Projekte in die Realität umsetzen zu können, müssen wir noch viele Details der Entwicklung und der Erhaltung der normalen Körperfunktion verstehen lernen. Niedere Wirbeltiere wie der Zebrafisch haben eine weitaus höhere Regenerationsfähigkeit geschädigter Gewebe. So kann ein Fisch im Gegensatz zum Menschen Verletzungen am Herzen oh-

ne Vernarbung und damit verbundener Funktionsverluste reparieren [13]. Ein Schwerpunkt zukünftiger Forschung am Zebrafisch wird daher auch die Ergründung dieser Regenerationsfähigkeit sein, um zu lernen, wie man Gewebe im erwachsenen Organismus wiederherstellen kann.

Literatur

- [1] G. Streisinger, et al., *Production of clones of homozygous diploid zebra fish (Brachydanio rerio)*. *Nature*, 1981. 291(5813): p. 293-6.
- [2] W. Driever, et al., *A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish*. *Development*, 1996. 123: p. 37-46.
- [3] P. Haffter, et al., *The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, Danio rerio*. *Development*, 1996. 123: p. 1-36.
- [4] S. Berghmans, et al., *Making waves in cancer research: new models in the zebrafish*. *Biotechniques*, 2005. 39(2): p. 227-37.
- [5] E. Pradel, J.J. Ewbank, *Genetic models in pathogenesis*. *Annu Rev Genet*, 2004. 38: p. 347-63.
- [6] L.I. Zon, R.T. Peterson, *In vivo drug discovery in the zebrafish*. *Nat Rev Drug Discov*, 2005. 4(1): p. 35-44.
- [7] M. Behra, et al., *The use of zebrafish mutants to identify secondary target effects of acetylcholine esterase inhibitors*. *Toxicol Sci*, 2004. 77(2): p. 325-33.
- [8] A.J. Hill, et al., *Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity*. *Toxicol Sci*, 2005. 86(1): p. 6-19.
- [9] U. Strahle, et al., *one-eyed pinhead is required for development of the ventral midline of the zebrafish (Danio rerio) neural tube*. *Genes Funct*, 1997. 1(2): p. 131-48.
- [10] M. Behra, et al., *Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo*. *Nat Neurosci*, 2002. 5(2): p. 111-8.
- [11] C. Etard, et al., *Mutation in the delta-subunit of the nAChR suppresses the muscle defects caused by lack of Dystrophin*. *Dev Dyn*, 2005. 234(4): p. 1016-25.
- [12] D. Bassett, P.D. Currie, *Identification of a zebrafish model of muscular dystrophy*. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2004. 31(8): p. 537-40.
- [13] A. Raya, et al., *The zebrafish as a model of heart regeneration*. *Cloning Stem Cells*, 2004. 6(4): p. 345-51.