

Kapitel 1. Einführung

Im Oktober 1980 erschien in *Nature* ein Artikel über die Identifizierung essentieller Gene für die Embryonalentwicklung der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*. Diese waren durch systematische Mutagenesescrines charakterisiert worden (Nüsslein-Volhard und Wieschaus 1980). Das Prinzip dieses Experiments (Abb. 1) war so einfach wie genial. Nüsslein-Volhard und Wieschaus setzten eine männliche Fliege dem Mutagen ENU (Ethylnitrosoharnstoff) aus, verpaarten diese mit Weibchen und analysierten die Nachkommen von solch behandelten Fliegen auf phänotypische Veränderungen. Diese Mutanten mit offensichtlich abnormen Entwicklungen während der Embryonalperiode sollten dann im nächsten Schritt auf molekularer Ebene untersucht werden. Ziel war es, die zugrundeliegende Veränderung im Erbgut aufzudecken und in Bezug zur phänotypischen Veränderung zu setzen.

ENU bietet sich im Gegensatz zu anderen Mutagenen wie z.B. Röntgenstrahlung an, da es Punktmutationen verursacht (Mullins et al. 1993; Solnica-Krezel et al. 1994) und somit nicht zu großen Strangbrüchen führt, deren Induktion zu sicherlich größeren Deletionen mit entsprechend höherer Letalität, sowie damit verbunden geringerer Aussagekraft der Mutanten führen würde. Dieser Ansatz, klassische Genetik (Mutationsinduktion) mit Molekularbiologie (Nucleotidanalyse) zu verbinden, wurde 1995 mit dem Nobelpreis für Medizin und Physiologie ausgezeichnet.

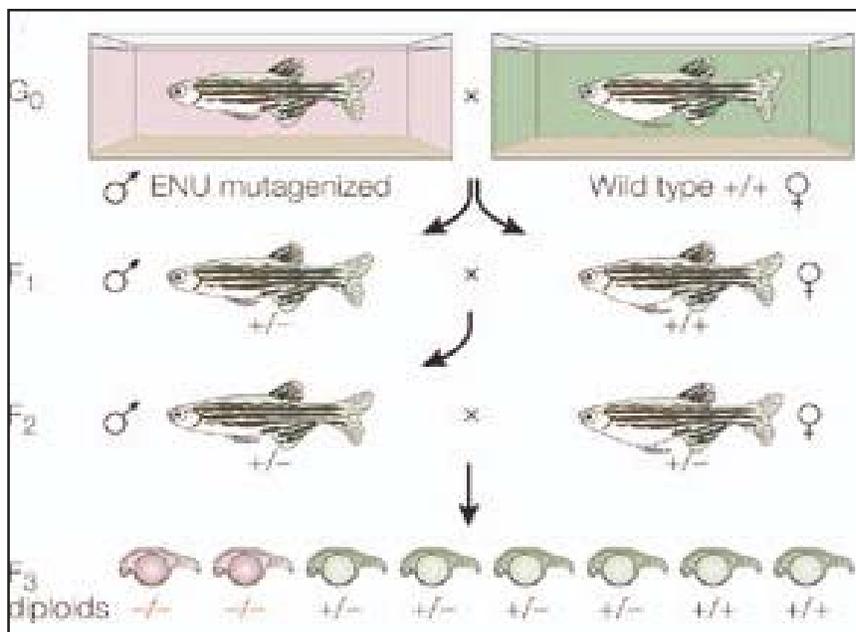


Abb.1 Prinzip des experimentellen Screens, um Zebrafischmutanten zu finden (Grafik aus Stainier et al.): Männchen werden ENU ausgesetzt und mit Wildtyp Weibchen gepaart, um eine heterozygote F₂ Generation zu erhalten. Diese F₂ Generation wird inter se gekreuzt, um rezessive Mutanten aufzuspüren (25 % in der F₃ Generation)

Einige Monate später wurde dieser experimentelle Ansatz von *Streisinger* aufgegriffen und im Zebrafisch (*Danio rerio*), einem ursprünglich aus Indien stammenden Süßwasserfisch aus der Gruppe der Knochenfische (Teleostei), eingeführt (Streisinger et al. 1981). Um die Ursachen zu verstehen, welche ausschlaggebend für die Einführung des Zebrafisches als neuem Modellorganismus waren, ist es notwendig, andere gängige Tiermodelle zu betrachten. Sie alle haben Stärken und Schwächen für bestimmte Fragestellungen in der Entwicklungsbiologie und Molekulargenetik.

1.1 Modellorganismen in der Entwicklungsbiologie

Das Grundproblem der etablierten Modellorganismen in der Entwicklungsbiologie wie der bereits erwähnten Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* oder dem Krallenfrosch *Xenopus laevis* ist die relativ große entwicklungsgeschichtliche Distanz zum Menschen (Ingham 1997). Die Maus oder Ratte als Vertreter der Säugetiere besitzen Nachteile wie, im Vergleich zu Insekten und Amphibien, niedrigere Anzahl von Nachkommen und ungleich längere Generationszeit. Zudem entwickeln sich ihre Nachkommen innerhalb des Mutterleibs. Manipulationen am Embryo *ex utero* sind jedoch technisch aufwendiger, von Problemen bei der Reimplantation ganz zu schweigen. Allerdings ist der Mausorganismus dem menschlichen am ähnlichsten, so dass an ihm erzielte Forschungsergebnisse oft die beste Aussage über die Verhältnisse im Menschen liefern.

Größter Vorteil der Maus ist die Möglichkeit, knock-outs zu generieren, d.h. Gene im Organismus künstlich auszuschalten. Voraussetzung dafür ist, dass das zu untersuchende Gen bereits bekannt ist. Leider ist dieses Verfahren in der Maus aufgrund der oben geschilderten Nachteile für die Analyse einer hohen Genanzahl praktisch nicht bezahlbar und technisch schwierig durchzuführen. Trotzdem gibt es Versuche in diese Richtung, deren Ergebnisse aber phänotypisch aufgrund von Redundanz oft schwieriger zu interpretieren sind. Ein Mutagenesecscreen wäre somit aufgrund des Fehlens der notwendigen Saturation kaum zu bewerkstelligen (Neidhardt et al. 2000).

1.2 Zebrafisch als Modellorganismus

Die Nachteile der genannten Modellorganismen zu kompensieren und deren Vorteile möglichst zu konservieren, führte zum Vorschlag, den Zebrafisch zu etablieren. Er verbindet die Vorteile der Invertebraten einer kurzen Generationszeit, einer hohen Anzahl von Nachkommen und technisch leicht zugänglicher Embryonen, die sich außerhalb des Mutterleibes entwickeln (Metscher et al. 1999). Darüber hinaus ist er unkompliziert zu halten und hat als Vertebrat alle Organsysteme, die auch im Menschen vorkommen (Auge, Hirn, Herz, Drüsen, u.s.w.). Die Embryonen sind unter einem Lichtmikroskop sichtbar und in ihrer Entwicklung aufgrund eines transparenten Chorions und transparenter Zellen beobachtbar.

Im Zebrafisch sind Methoden anwendbar, die eine Synthese darstellen aus Embryologie und Molekulargenetik. Techniken zur Modifikation auf molekularer Ebene sind z.B. die in der Maus beschriebenen knock-outs, im Zebrafisch *morpholinos* genannt, die seit kurzem verfügbar sind und Überexpression bestimmter Gene mittels Injektionstechniken. Dagegen stellen z.B. Zellimplantationsexperimente Methoden der Embryologie dar.

Saturierte Mutageneseccreens sind eine Grundlage für weiterführende Forschung bzgl. molekularer Ursachen der phänotypischen Veränderung. Eine Darstellung dieser Screens, sowie die weiterführende molekulare Charakterisierung der gefundenen Mutanten ist in der Extraausgabe des Journals *Development* publiziert (*Development* 1996).

Für 2004 ist der Abschluß der vollständigen Sequenzierung des Zebrafischgenoms geplant (Pressemitteilung des *Sanger Centre* in *Science* 2000 December 1; 290).

1.3 Entwicklung des Zebrafischembryos

Zebrafisch Oocyten entwickeln sich innerhalb von 24 Stunden zu einem Embryo, welcher bereits alle Organanlagen des späteren adulten Fisches besitzt. Die Schnelligkeit dieser Vorgänge ist einer der Hauptgründe für die Etablierung des Zebrafisches als Modellorganismus. Aus Abbildung 2 ist ersichtlich, dass die Beobachtung der Entwicklung der Embryonen aufgrund der Transparenz des Chorions unter Zuhilfenahme eines Lichtmikroskops ohne Probleme möglich ist.

Die Ausrichtung der Embryonen in ventral-dorsaler, sowie anteriorer-posteriorer Richtung ist zum ersten Mal nach ca. 6 Stunden im sogenannten *shield* Stadium möglich. Diese Bezeichnung leitet sich von einer Stelle des Keimrings (engl. *germ-ring*) her, an welcher sich eine Akkumulation von Zellen ausbildet, dem sogenannten *shield*, Äquivalent des Spemann-Organisator im Zebrafisch. Dort wird sich in der weiteren Entwicklung die dorsale Seite des Embryos befinden. Das Blastoderm bedeckt zu diesem Zeitpunkt in etwa die Hälfte des kugelförmigen Embryos, gut sichtbar in der Ansicht auf den Animalpol. Das Blastoderm ist in zwei unterschiedliche Zell-Lagen differenzierbar, dem äusseren Epi- und inneren Hypoblast.

Nach 10 Stunden, dem sogenannten *bud*-Stadium, bedeckt das Blastoderm bereits fast vollständig den Dotter. Das caudale Ende des Embryos besitzt eine Verdickung (engl. *bud*). Anterior des Rumpfes (engl. *tailbud*) befindet sich die verdickte Neuralplatte, deren posteriorer Teil sich zum Rückenmark und den Spinalnerven entwickeln wird.

Die ersten 8 Somiten des Embryos sind nach ca. 18 Stunden entwickelt, zur gleichen Zeit ist das Vorläuferorgan der Augen sowie posterior davon das Mittelhirn sichtbar. Die Entwicklung des Rumpfes ist nach 18 Stunden durch Zusammenziehung des Dottersacks gekennzeichnet, welche den Embryo zu einem relativen Längenwachstum in Bezug zur Dicke veranlasst. Die Augenlinse sowie das Gehörvorläuferorgan ist sichtbar und die Dottersackverlängerung klar vom Dottersack abgegrenzt. Das Gehirn ist bereits in seine einzelnen Komponenten (Pros-, Di-, Telencephalon) strukturiert.

Nach 24 Stunden schließlich ähnelt der Zebrafischembryo dem menschlichen Embryo in einem vergleichbaren Entwicklungsstadium nach 40-45 Tagen. Die Organanlagen sind vollständig ausdifferenziert, der Embryo außerhalb seines Chorions lebensfähig. Kleinhirn, Epiphyse sowie Hypothalamus im Diencephalon sind unterscheidbar. Das Riechorgan anterior-dorsal des Vorderhirns (Abb. 2 E) sowie Otolithen im Gleichgewichtsorgan sind erkennbar. Der letzte Somit ist ausgebildet. Blutbildung, Herz-Kreislauf, Leber und Niere beginnen zu arbeiten. Das schlagende Herz und der pulsatile Blutstrom im Gefäßsystem sind sichtbar.

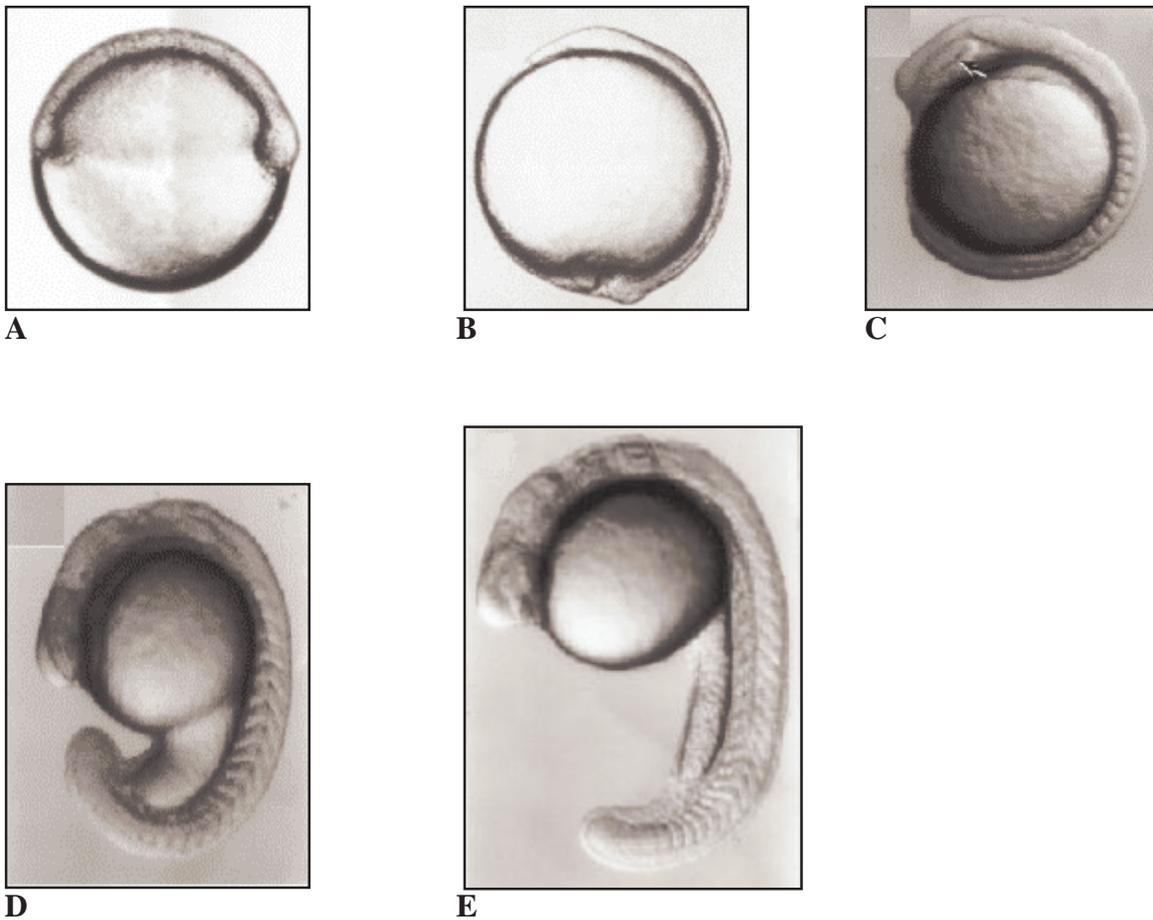


Abb.2 Entwicklung des Zebrafischembryos (Grafiken aus Westerfield):

A Embryo im shield Stadium (6 hpf, 50% epiboly);

B im *bud*-Stadium (10 hpf.), ist die Namensgebung durch die Verdickung (=bud) der Zellschicht bedingt;

C Embryonen nach 14 hpf. mit 8 vollentwickelten Somiten (engl. *eight somites stage*);

D Embryo nach 18 hpf. mit bereits gestrecktem Rumpf, klar abgrenzbarem Dottersack und Dottersackextension;

E Embryo nach 24 hpf. mit strukturiertem Gehirn und vollentwickelter Organanlage wie im späteren adulten Fisch

1.4 Genetisch bedingte Krankheiten im Menschen und ihr entsprechender Zebrafischmutant

1.4.1 Blut / Haematopoiese

Zum Verständnis der Blutentwicklung ist es notwendig, sehr frühe Entwicklungsschritte der Oocyte und der Gastrulation zu beleuchten. Die Differenzierung verschiedener Gewebe in verschiedene Regionen des sich entwickelnden Embryos lässt Rückschlüsse darauf zu, wie Blut-Vorläuferzellen gebildet werden und auf welcher Ebene der Ausdifferenzierung eventuelle Mutationen krankheitsauslösend wirken.

Gesichert ist, dass sich ein ventrales und ein dorsales Mesoderm bilden, die Vorläufergewebe von z.B. Blut / Mesenchym (ventrales Mesoderm) sowie Somiten / Chorda dorsalis (dorsales Mesoderm) darstellen.

Das Mesoderm selbst bildet sich an einer bestimmten Stelle der Blastula, der so genannten Marginalzone. Die molekularen Hintergründe dieser Induktion bleiben unklar, obwohl man annimmt, dass Moleküle der *nodal*-Familie dafür verantwortlich sind.

Diese These wird durch die Charakterisierung der *one eye pinhead* Mutante geklärt werden können, deren Mesodermentwicklung gestört ist (Schier und Talbot 2001).

Der *BMP* (*bone morphogenetic protein*) *pathway* erfüllt wichtige Regulationsvorgänge im ventralen Mesoderm, Ursprungsort des Blutorgans. Überexpression von *BMP* induziert das Wachstum, eine Verminderung verursacht einen Verlust des ventralen Mesoderms sowie von ihm abhängiger Strukturen (z.B. Blut).

Dies ist der Fall in der Mutante *swirl*, dessen *BMP2b* Gen mutiert ist und demzufolge Blut, wie auch die Pronephronen (Vorläufer der Niere), die ebenfalls von Mesoderm abstammen, nicht angelegt werden. Die Mutante zeigt folglich ein Überwiegen der dorsalen/dorsolateralen Strukturen.

Eine *BMP7* Mutation induziert im Zebrafisch den gleichen Phänotyp wie die *swirl* Mutante. *Smad5* (*mothers against decapentaplegic homolog 5*) ist ein die *BMP*-Expression aufrechterhaltendes Gen, welches in der Mutante *somitabun* mutiert ist und welche ebenfalls, bei dann abnehmendem *BMP*-Expressionsgrad, einen dorsalisierten Phänotyp aufweist.

Das Gegenteil, nämlich ein ventralisierter Phänotyp unter Proliferationsinhibition des dorsalen Mesoderm ist z.B. für eine Überexpression des Gens *noggin* beschrieben. Injektion

von *chordin* oder einem Antagonisten des *BMP4* Rezeptors bewirkt einen dorsalisierten Phänotyp, welcher durch den *chordin* Antagonisten *tolloid* inhibierbar ist.

Die entsprechende Zebrafisch Mutante für *chordin* wird *chordino* genannt. Es zeigt sich deutlich, dass unterschiedliche Mutationen auf molekularer Ebene phänotypisch gleich erscheinen können, aber zum Verständnis der verschiedenenartigen molekularen Ursachen entscheidend beitragen können. Frühe Entwicklungsschritte aufzuklären ist für die Erforschung der weiteren Ausdifferenzierung in verschiedene Organsysteme essentiell.

Da das Mesoderm auch für andere Organe wie das Herz Ausgangsgewebe ist (siehe 1.4.2), verwundert es nicht, dass Mutationen existieren, welche verschiedene Organsysteme betreffen (Pleiotropie). Dies ist für viele menschliche Erbkrankheiten bekannt. Sichtbarer Beweis ist die Einteilung in Syndrome als gemeinsames Auftreten verschiedener Symptome in bestimmter Konstellation.

Ein Beispiel im Zebrafisch ist die Mutante *cloche* mit Defekten im Blutsystem als auch in der Herzentwicklung. *cloche* (fr. Glocke) besitzt eine gestörte Differenzierung des Herzendothels, in dessen Folge das Herz dilatiert, die Form einer Glocke annimmt sowie funktionell (Kontraktion) gestört ist. Dieser Phänotyp lässt die Vermutung zu, dass die im Menschen bekannten Herzmyopathien auf ähnliche Ursachen zurückzuführen sind. Der Zebrafisch vermag trotz des fehlenden Kreislaufsystems noch nach mehr als 22 Stunden seinen Sauerstoffbedarf ausreichend durch Diffusion sicherzustellen, eine Stärke dieses Modells, welches die Erforschung dieser Mutation erst möglich macht, da andere Modellorganismen unter solchen Bedingungen schwerlich überleben.

Daraus lässt sich ableiten, dass Mutationen, welche ausschließlich das Blutsystem betreffen, folglich in Regulationsmechanismen eingreifen, welche sich erst nach der gemeinsamen Entwicklungsstrecke unterschiedlicher Organe zu Beginn der Embryonalentwicklung auswirken.

Drei weitere Beispiele für Zebrafisch Mutanten des Blutsystems sind *frascati*, *sauternes* und *yquem*.

Die Mutante *frascati* ist durch einen Untergang von Erythrocyten nach 2-5 Tagen geprägt, die annehmen lassen, dass die Mutation relativ spät in der Entwicklung auftretende Differenzierungsmechanismen stört.

Für die Mutante *sauternes* ist der Defekt bekannt. Ein für die Erythrocytendifferenzierung notwendiges Enzym, die δ -Aminolaevulinatsynthetase (ALAS 2) ist gestört. Ein

Pathomechanismus, der im Menschen auch nach langandauernder Bleiexposition beobachtet wird. Das angeborene Krankheitsbild wird als sideroblastische Anämie bezeichnet. Interessanterweise ähneln sich Blutausrichthe des Zebrafischmutanten und betroffener menschlicher Patienten.

Die *sauternes* Mutante ist das erste Tiermodell für sideroblastische Anämie. Ebenfalls einen Enzymdefekt in der Haematopoiese weist die Mutante *yquem* auf. Dort ist die Uroporphyrinogendecarboxylase (UROD) gestört, Auslöser für eine Form der Porphyrie im Menschen. Das Blutbild ist hier durch Erythrocyten geprägt, die unter UV-Licht fluoreszieren, deren Lebensdauer herabgesetzt ist und die somit zu Anämien führt. Das Krankheitsbild wird ferner durch multiple Hautdefekte und Empfindlichkeit gegenüber Licht geprägt, welche die betroffenen Patienten dazu verurteilt, Licht zu meiden. Porphyrin wird aufgrund des Enzymdefekts vermehrt in den Zähnen abgelagert, welche eine braunrote Farbe annehmen. Historisch mögen betroffene Personen von ihrem Aussehen der Ausgangspunkt für Vampirgeschichten gewesen sein (rote Zähne, Nachtaktivitäten, blasses Kolorit durch Anämie).

Die Mutante *zinfadel* scheint ein Modell für Thalassämie zu sein, einen vererbbaeren Defekt in der Hämoglobinproduktion mit hypochromem Blutbild und folgender Anämie, die besonders häufig rund um das Mittelmeer (gr. *thalassa* Meer) auftritt (Orkin 1995).

1.4.2 Herz

Die Herzentwicklung nimmt Ausgang von dem anterior-lateralen Teil des Mesoderms, so dass auch hier in der frühen Entwicklung der bereits zitierte *BMP-pathway* von Bedeutung ist. Ein sehr früher Schritt wird offensichtlich durch die Expression von *tinman* eingeleitet, dessen Mutation die Weiterentwicklung des rudimentär angelegten Gefäßes inhibiert, aus dem sich das Herz entwickelt (Chen et al. 1996). Auch *tinman* wird vom *BMP* reguliert (hier *BMP2* und *4*), ebenso wie von der Expression seiner Rezeptoren *thickvein* und *smad4*. Herzfehler sind eine der häufigsten angeborenen Krankheiten.

Interessant ist auch, dass Gene aus der *GATA*-Familie (Transkriptionsfaktoren), wie *pannier* und *tinman* in der Lage sind, bei ektopischer Expression in anderen Zellen rhythmogen zu

wirken und dort gewissermaßen Eigenschaften der Cardiomyocyten nachzuahmen. Bei gleichzeitiger Expression scheinen sie sich gegenseitig zu verstärken.

Ein Hinweis auf stark differenzierte Regulationsmechanismen sind auch allein fünf bekannte *tinman* abhängige Transkriptionsfaktoren (*nkx*), von denen jeder nur während bestimmter Entwicklungsvorgänge wirkt (z.B. *nkx2.5* nur in späten Entwicklungsstadien).

Die Zebrafischmutante *acerebellar*, welche ein defektes *fgf8* (engl. *fibroblast growth factor*) Gen besitzt (Reifers et al. 1998), reguliert die *nkx2.5* und *GATA4* Expression herunter.

Bei Untersuchungen am Huhn ist gezeigt worden, dass durch Expression von *BMP2* und *fgf8* im nicht cardiogenen Teil des Mesoderms cardiogenes Gewebe induziert werden kann. Da *fgf8* Induktion in *acerebellar* die Expression von *nkx2.5* und *GATA4* wiederherzustellen vermag, kann es als Schaltstelle (*upstream*) für diese Moleküle betrachtet werden.

Das Herz ist eines der wenigen Organe, welches nicht paarig angelegt wird. Dies läßt auf grundlegend andere Regulationsmechanismen schließen als bei symmetrischer Anlage. Nach der Gastrulation ballen sich Herzvorläuferzellen zusammen, bevor eine primitive Röhre angelegt wird. Dieser Prozeß scheint relativ empfindlich zu sein, da viele Mutanten bekannt sind, die eine sogenannte "cardia bifida" ausbilden. Hierbei wird die Fusion der zwei Regionen, welche Herzvorläuferzellen enthalten, verhindert und es bilden sich zwei, wenngleich primitive, Herzen. Die Mutante *faust* mit einem mutierten *GATA5* (Reiter et al 1999) und *casanova*, dessen Gendefekt erst vor kurzem kloniert wurde und sich als bisher unbekannter Subtyp eines Transkriptionsfaktors aus der *sox*-Familie herausgestellt hat (Kikuchi et al. 2001, Dickmeis et al. 2001), sind zwei Beispiele.

Ein anderes Gen, welches eine wichtige Rolle für die Entwicklung des Herzventrikels zu spielen scheint ist *dHAND*. In der Maus bewirkt ein knock-out einen aplastischen rechten Ventrikel, während die entsprechende Zebrafischmutante *hands off* einen Defekt in der Myocarddifferenzierung aufweist sowie die angesprochene "cardia bifida" (Yelon et al. 2000).

1.4.3 Niere

Die Niere ist ein hochdifferenziertes Organ, welches aus zwölf verschiedenartigen Zelltypen besteht. Sie geht aus dem Teil des Mesoderms hervor, welcher unterhalb der anterioren Somiten und dorsal der Vorläuferzellen des Herzens gelegen ist. Diese Position lässt vermuten, dass Herz und Niere gemeinsame Vorläufer besitzen. Auch für das Blutsystem scheint das zuzutreffen, da ein normalerweise spezifisches „Blutgen“ (Markergen) *GATA2* ebenfalls in Pronephrosvorläuferzellen exprimiert ist.

Der *BMP*-Pathway spielt auch bei der Nierenentwicklung eine Rolle. Es scheint, dass *BMP* das Gen *pax2.1* beeinflusst (Drummond et al. 1998), welches in frühen Vorläuferzellen des Pronephroganges als auch im entstehenden Tubulussystem exprimiert wird. Die Zebrafischmutante für *pax2.1* ist unter dem Namen *no isthmus* beschrieben. Ihre Podozyten scheinen sich, unter persistierender *vegf*-Expression (engl. *vascular endothelial growth factor*), im Gegensatz zum Pronephrogang normal zu entwickeln (Majumdar et al. 2000).

Ungeklärt ist die Rolle von Signalen der Chorda dorsalis, welche die Differenzierung und die Lage der Niere betreffen. Der Pronephrogang in der Mutante *floating head* besitzt eine auffallend lateralisierte Position, während seine Differenzierung unbeeinträchtigt scheint. Da aufgrund der Position der dorsale Anteil der Aorta nicht gebildet wird, behelfen sich die Nierenpodocyten damit, aus Endothelzellen Glomeruli zu bilden. Dies zeigt auf, dass Zellen Mechanismen besitzen, benachbartes Gewebe zur Organentwicklung heranzuziehen.

Ähnliche Vorgänge dürften sich in Tumorgewebe abspielen, welches sich gewissermaßen eine eigene Blutzufuhr schafft. Für die Therapie kann das Verständnis solcher Vorgänge entscheidende Impulse geben.

Im Gegensatz dazu besitzt die bereits angeführte Mutante *cloche* (siehe 1.4.2) in der Niere kein Endothel. In der Maus ist eine Mutation bekannt, welche Ähnlichkeiten zu *cloche* aufweist. Im Gegensatz zu *cloche* ist dort die Mutation bekannt und geklont. Es handelt sich um *vegf*, ein essentielles Gen der Endothel-Differenzierung. Die Mausmutante stirbt jedoch bereits *in utero*, während der Zebrafisch *cloche* in gewissem Umfang lebensfähig und somit weiterer Forschung zugänglich ist.

Interessanterweise ist *scl* (engl. *stem-cell leukemia hematopoietic transcription factor*), ein essentielles Gen für die Haematopoiese, in der Lage, bei Überexpression auf Kosten der

Somiten- und Nierenentwicklung Blut zu bilden. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Entwicklung dieser beiden Organsysteme korreliert ist.

Drei andere Mutationen, die ausschließlich die Niere oder das Äquivalent im Zebrafisch, den Pronephrosengang, betreffen, sind für die Mutanten *double bubble*, *fleer* und *dizzy* beschrieben. Sie scheinen alle die basolaterale Na^+/K^+ -ATPase im Tubulussystem zu beeinflussen (Drummond et al. 1996). Da vererbare Nierenerkrankungen eine hohe Inzidenz aufweisen (vor allem polycystische Nierenerkrankungen), ist die Aufdeckung der Pathomechanismen von hohem Interesse. Im Zebrafisch sind allein fünfzehn Mutanten mit polycystischen Nieren beschrieben mit den pathophysiologischen Folgen der Niereninsuffizienz (z.B. Ödemen) wie im Menschen. Schon die hohe Anzahl der Mutanten und der Zelltypen lässt darauf schließen, es mit komplexen Regulationsmechnismen zu tun zu haben.

Einen Ansatz zum Verständnis des Einflusses von Kreislaufhochdruck auf diese Erkrankung mag die Mutante *silent heart* bieten, die einen niedrigen Blutdruck durch Diffusion von Sauerstoff zeitweise kompensieren kann.

Das mutierte Gen *PKD1* (engl. *polycystic kidney disease*) ist im Zusammenhang sowohl mit ATPase Defekten als auch Nierenzysten beschrieben (Torra et al. 1997).

1.4.4 Zentrales Nervensystem

Als *Streisinger* den Zebrafisch als neues Modell vorschlug, hoffte er, dadurch vor allem neue Erkenntnisse in der Neuro- und Verhaltensbiologie zu erzielen. Obwohl dem Fisch ein differenzierter Cortex fehlt und die Analyse seines Verhaltens nicht einfach erscheint, war er auch hier in der Lage, seine Stärken zu zeigen. Die gefundenen Mutanten zeigen weitreichende Änderungen in ihren cerebralen Strukturen (Pros-, Di-, Telencephalon) ebenso wie Defekte auf Synapsenebene mit ausbleibender Verbindung von einzelnen Neuronen. Dies ist sowohl für das ZNS gezeigt worden, z.B. mit ausbleibender Entwicklung des Nervus opticus, als auch im PNS.

Neuralgewebe stammt vom dorsalen Ectoderm ab und kann, wie bereits bei anderen Organen beschrieben, durch Beeinflussung des *BMP-pathway* modifiziert werden. So besitzen die Mutanten *swirl*, *snailhouse* und *somitabun* ein proliferiertes Neuralgewebe, dem eine *BMP*-Mutation zugrundeliegt. Das Gegenteil wäre für *chordino* anzunehmen, dessen *BMP*

blockierendes Protein *chordin* (siehe auch 1.4.1) mutiert ist. Allerdings scheint *BMP* noch durch andere Moleküle geblockt zu werden, da sich die Entwicklung des Neuroectoderm fortsetzt, wozu die Herabregulation von *BMP* notwendige Voraussetzung ist. Eine Erklärung mag sein, dass früher agierende Moleküle als *BMP*, und hier vor allem Wnt / β - Catenin, durch Interaktionen mit anderen Molekülen *BMP* herabregulieren und damit die Neuralentwicklung induzieren können. Diese Annahmen beruhen auf den Verhältnissen im Zebrafisch, da ein experimenteller knock-out in der Maus letal wirkt und somit nicht in der Lage ist, neue Erkenntnisse zu erbringen.

Das früh entstehende Neuralgewebe hat den histologischen Charakter des späteren Vorderhirns und wird dann weiter differenziert durch Moleküle wie *wnt*, *fgf* und Retinsäure. Dorsal gelegenes Ectoderm ist Ausgangsgewebe für Neuralleiste und Zelllinien des dorsalen Neuralrohres (bei gleichzeitiger *BMP*-Blockierung), während die Bildung der ventralen Anteile von der Expression des Gens *shh* (Sonic Hedgehog) abhängt.

Auch die Mutante *mercedes/ogon* (Hammerschmidt et al.1996) besitzt sowohl ein reduziertes dorsales Mesoderm als auch eine reduzierte Neuralplatte. Ihr Phänotyp ähnelt der Mutante *chordino*. Die molekulare Identität ihres Defekts bleibt jedoch nach wie vor unklar.

Die Mutanten *cyclops*, *squint* und *one eyed pinhead* (Schier und Talbot 2001) entwickeln normales Neuralgewebe, obwohl ihnen spezifische, vom Spemann Organisator sekretierte Moleküle zu fehlen scheinen (Moleküle der sogenannten *nodal*-Familie), welche für die Differenzierung der Neuralstrukturen als wichtig angesehen werden. Auch die chirurgische Ablation des *shield* (und damit des Spemann Organisator) vermag die normale Ausbildung des Neuralgewebes nicht zu beeinträchtigen. Die Ursachen dafür sind unklar.

1.5 Physiologische Methoden im Zebrafisch

Auch in der klassischen physiologischen Forschung hat sich der Zebrafisch als Konkurrent der Maus etabliert (Vogel 2000). Dies ist z.B. der Fall für die Erforschung der Fettsucht, obwohl der ca. 4 cm grosse Fisch dies schwerlich vermuten lässt. Zwei Mutanten *jumbo* und *fressack* ähneln einem Mausmodell, welchem das Protein *Leptin* fehlt. Diesem scheint für Gewichtsregulation und Sättigungsgefühl eine entscheidende Rolle zuzukommen. Solche Mäuse hören nicht auf zu fressen ebenso wie ihre Zebrafischäquivalente. Der Zebrafisch

bietet darüber hinaus die Möglichkeit, die aufgenommene Nahrung unter einem Mikroskop auf ihrem Weg durch den Intestinaltrakt zu verfolgen. So ist es möglich, Defekte von Enzymen, welche Nahrungsbestandteile aufspalten, durch deren radioaktive und leuchtende Markierung aufzuspüren. Somit kann ein möglicher genetischer Defekt in seinen physiologischen Auswirkungen erkannt werden.

Die Mutante *chihuahua* gilt als Modell für *Osteogenesis imperfecta*. Obwohl der Zebrafisch keine Knochen im herkömmlichen Sinne besitzt, zeigt auch er die pathologischen Folgen dieser Krankheit, eine erhöhte Fragilität seines Skeletts. Dies ist durch Röntgenaufnahmen des Fisches nachweisbar. Als Modell mag er dazu beitragen, die genetischen Hintergründe dieser für betroffene Menschen nach ca. 20-25 Jahren tödlich endenden Erkrankung zu verstehen.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, aus einer Zebrafisch cDNA Bibliothek des RZPD diejenigen Klone (EST) herauszusuchen, welche in ihrer Sequenz eine hohe Homologie zu Genen besitzen, die im Menschen in Krankheiten impliziert sind (Untergruppe der GeneCards Datenbank; bioinformatics.weizmann.ac.il/cards). Für diese Klone sollte mit Hilfe von RNA-RNA Hybridisierung ein Screening auf ihr Expressionsverhalten in 6 Entwicklungsstadien des Zebrafischembryos durchgeführt werden. Interessante organspezifische Expressionsmuster lassen somit erste Rückschlüsse zu auf räumliche und zeitliche Expression des entsprechenden Gens und bilden Grundlage für eine weiterführende funktionelle Analyse.