

Michael Brand¹ und Jochen Wittbrodt²

¹Department für Neurobiologie, Universität Heidelberg, und Max-Planck-Institut für molekulare Zellbiologie und Genetik, Dresden

²Developmental Biology Programme, European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg

Zebrafisch und Medaka als Modellorganismen der Entwicklungsbiologie

Die Genomsequenzierungen erzeugen eine Fülle neuer Sequenzdaten aller in den Genomen der verschiedenen 'Modellorganismen' enthaltenen Gene. Wie aber kann die Funktion dieser Gene ermittelt werden, und wie kann die Information zwischen den Organismen verglichen werden, um Entwicklung und Evolution zu verstehen? In den genetisch gut zugänglichen Invertebraten-Modellorganismen mit ihren etwa 19.000 (*C. elegans*) beziehungsweise rund 12.000 Genen (*Drosophila*) ist das Verständnis von Entwicklungsprozessen bereits weit gediehen. Bei Vertebraten mit ihren ca. 70.000 bis 100.000 Genen ist dies aufgrund der größeren Komplexität der Entwicklungsprozesse und der größeren Zahl der Gene ungleich schwieriger – die Antworten sind jedoch für Grundlagenforschung und Medizin gleichermaßen von Bedeutung. Zwei Modellorganismen der Entwicklungsbiologie, Zebrafisch und Medaka, bieten die Möglichkeit zur integrierten molekularen, klassisch-genetischen und experimentellen Analyse und eignen sich daher hervorragend für eine detaillierte mechanistische und schließlich vergleichende Analyse des Vertebraten-Genoms. Als Beispiel diskutieren wir unsere Untersuchungen zur Entwicklung des Auges beziehungsweise der zentralnervösen Schaltstellen visueller Information im Vorder- und Mittelhirn.

► Zur Steuerung ihrer Entwicklung verwenden Invertebraten und Vertebraten häufig ähnliche genetische Schaltkreise. Nachdem über mehr als ein Jahrzehnt die Gemeinsamkeiten der genetischen Regulation der Entwicklung von Vertebraten und Invertebraten klarer hervortreten, stellt sich nun die Frage, wie denn eigentlich die Unterschiede entstehen. Fliegen oder Nematoden sehen nun einmal anders aus als Fische, Mäuse oder Menschen. Bei Vertebraten gibt es im Schnitt etwa vier Kopien von jedem *Drosophila*-Gen, oder, wie Denis Duboule einmal formuliert hat, „Vertebraten sind oktaploide *Drosophilae*“. Zudem unterscheiden sich die einzelnen Vertebraten leicht in der Zahl der Mitglieder der jeweiligen Genfamilien. Vermutlich sind solche Unterschiede in der Kopienzahl der Gene, aber auch in deren Regulation mitverantwortlich für die Entstehung von Unterschieden zwischen den einzelnen Vertebraten. Die Entstehung dieser Unterschiede zwischen den Species im molekularen Detail zu verstehen, ist eine zentrale Herausforderung an die molekulare Entwicklungsbiologie der nächsten Dekade.

Hier diskutieren wir, warum sich Zebrafische (*Danio rerio*) und Medaka (*Oryzias latipes*, Killifische) besonders für Studien der molekularen Funktion von Vertebraten-Genen eignen, insbesondere im Hinblick auf vergleichende Studien mit Maus oder Mensch. Angesichts der typischerweise in komplexen räumlichen und zeitlichen Mustern aktiven Gene erfordert eine genaue Funktionsanalyse aufwendige genetische und experimental-embryologische Techniken, um die Genfunktion im jeweiligen Gewebekontext zu verstehen. Wir argumentieren, daß in Fischen, neben der Möglich-

keit einer funktionellen Inaktivierung von Genen durch Mutation, die Möglichkeit zu einer experimentellen Manipulation, wie Transplantation, Injektion, aber auch der Herstellung von transgenen Tieren und Transposon-Insertionen – ähnlich wie bei *Drosophila* und *C. elegans* – von entscheidendem Vorteil bei der Analyse sind (siehe TOOLBOX 1: Methoden). Für vergleichende Studien sind Fische ebenfalls gut geeignet, weil sie als größte Gruppe der Vertebraten (> 28.000 Arten) eine Vielzahl von Adaptationen aufweisen. Wir schildern die Ergebnisse systematischer Mutagenese-Experimente, in denen Mutanten des Zebrafisches und von Medaka isoliert wurden, die eine wertvolle Ressource für die funktionelle Analyse eines Wirbeltiergenoms darstellen. Am Beispiel eigener Arbeiten illustrieren wir, wie die weitere Analyse der isolierten Mutanten Erkenntnisse über Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der genetischen Kontrolle der Entwicklung des Auges (Wittbrodt) sowie der zentralnervösen Schaltstellen visueller Information im Vorder- und Mittelhirn (Brand) liefert.

Fisch-Embryonen und 'Tools'

Zwei für experimentelle Analysen entscheidende Eigenschaften von Zebrafisch- und Medaka-Embryonen sind, daß sie sich extrakorporal entwickeln und transparent sind. Die Normalentwicklung dieser Embryonen ist daher sehr gut beschrieben. Die Eiablage erfolgt an den Lichtzyklus gekoppelt und die befruchteten Eier entwickeln sich dann synchron. Innerhalb kurzer Zeit (6 bis 10 h, Zebrafisch; 8–12 h, Medaka) entstehen in der Gastrulation (Abb. 1a) die endo-, meso- und ektodermalen Zelllagen des Embryos. Zwischen 10 und 24 Stunden wird der Embryo in Segmente unterteilt, und nach nur einem Tag der Entwicklung ist ein typischer Wirbeltier-Embryo erkennbar (Abb. 1c), mit ausgeprägtem Auge, Ohr und internen Gehirnstrukturen, die bereits funktionelle Schaltkreise enthalten. Einige Neuronen dieser Schaltkreise, beispielsweise die Retikulospi-nale Neurone des Hinterhirns oder Motoneurone des Neuralrohrs, sind aufgrund ihrer Position und der Form ihrer Fortsätze individuell identifizierbar ('identified neurons'), was ansonsten nur bei Invertebraten wie *Drosophila* und *Caenorhabditis elegans* möglich ist. Auch haben die Embryonen bereits ein Herz, das Blutzellen durch das Gefäßsystem pumpt. In den folgenden Tagen werden parallel zur weiteren Differenzierung des Nervensystems andere Organe wie der Niere, Leber und Darm ausdifferenziert. Durch extensive Wanderungen der Neuralleistenzellen werden etwa die Kiefer und das Pigmentmuster erzeugt. Nach fünf bis sechs Tagen schwimmen die

Toolbox 1: Methoden

Bei Zebrafisch und Medaka stehen zur Analyse der Embryonalentwicklung eine Reihe von spezifischen Methoden zur Verfügung:

Mutagenese und Screen (Standard F2 und Gynogenese)

Durch mutagene Agenzien (Ethylnitrosoharnstoff, Psoralen, Röntgen-Strahlung) werden Punktmutationen bzw. Chromosomenbrüche in das Genom eingeführt und deren Auswirkungen in der F3-Generation morphologisch und mit Hilfe von spezifischen Färbetechniken (siehe unten) analysiert.

RNA-„whole mount in-situ“-Hybridisierung, Antikörperfärbungen

Diese Färbungen zur Detektion spezifischer Transkripte oder Proteine können wegen der geringen Größe der Embryonen vollautomatisch und mit hohem Durchsatz durchgeführt werden.

Injektionsexperimente

- ▶ Erzeugung transgener Linien, z. B. mit GFP, Transposons
- ▶ Transiente Missexpressionsexperimente durch Injektion von DNA-Expressionskonstrukten bzw. durch mRNA-Injektion
- ▶ Funktionsblockierung durch Injektion doppelsträngiger RNA (RNAi)

Larven und können erste Nahrung aufnehmen. Die Geschlechtsreife wird nach zwei bis drei Monaten erreicht, und adulte Fische können zwei bis drei Jahre alt werden.

Genetische Analyse der Entwicklung

Eine der wichtigsten Eigenschaften von Zebrafisch und Medaka ist, daß in Mutagenese-Experimenten („screens“) systematisch Mutanten isoliert werden können, in denen die Normalentwicklung gestört ist. Zwei große Zebrafisch-Screens wurden in den vergangenen Jahren in den Labors von Prof. Dr. Christiane Nüsslein-Volhard in Tübingen und von Prof. Dr. W. Driever in Boston durchgeführt, in denen mehrere Tausend Mutanten isoliert wurden (siehe die „Zebrafisch-Ausgabe“ von Development, Vol. 123). Mutanten in mehr als 400 Genen wurden weiter untersucht, und betreffen eine Vielzahl embryonaler Prozesse (siehe Toolbox 3: „Genetik“) und stellen eine wertvolle Ressource dar. Weitere Mutagenese-Experimente laufen seither in Zebrafisch-Labors weltweit, in denen neue Mutanten isoliert werden. Mittlerweile stehen hochauflösende genetische Karten und andere Methoden der Genomanalyse zur Verfügung, über die Mutanten und die betroffenen Gene einander zugeordnet werden können, und ein Genomprojekt ist angelaufen (siehe Toolbox 2: Genomics). In

- ▶ Lineage-Studien durch Injektion oder „optical uncaging“

Transplantation und Mosaik-Analyse

Durch die Transparenz und leichte Zugänglichkeit des Embryos sind Transplantationen während aller Entwicklungsstadien relativ einfach durchführbar. Die Transplantation von Wildtypzellen in einen mutanten Empfänger bzw. umgekehrt erlaubt wichtige Rückschlüsse auf die Natur der Mutation und des von ihr betroffenen Entwicklungsprozesses.

Zeitrafferanalyse

spezifischer, embryonaler Entwicklungsschritte in wildtypischen und mutanten Embryonen, nach Transplantationen, etc.

Verhaltenstests

Einfache Verhaltensmuster und Reflexe werden genutzt, um gezielt „Verhaltensmutanten“ zu identifizieren (siehe oben).

Bedingt durch die gute Zugänglichkeit der frühen Embryonalentwicklung lassen sich die aus höheren Vertebraten bekannten neuroanatomischen und neurophysiologischen Methoden bereits während früher Embryonalstadien im Fisch anwenden.

Medaka betrifft eine Vielzahl der verfügbaren Mutanten aus historischen Gründen adult sichtbare Phänotypen, aber auch embryonal letale Mutanten sind beschrieben. Mutagenescreens sind durchgeführt worden, und eine Karte des Genoms steht zur Verfügung.

Im folgenden wollen wir anhand von Arbeiten aus unseren Arbeitsgruppen illustrieren, wie die experimentelle, molekulare und genetische Analyse der Fischentwicklung Aufschluß über die Entwicklung des Wirbeltier-Nervensystems gibt.

Das visuelle System

Das visuelle System der Wirbeltiere besteht zum einen aus dem Auge als rezeptivem Sinnesorgan, zum anderen aus spezialisierten Zentren des Gehirns, in denen die aufgefundenen Signale verarbeitet werden. Diese Funktion wird im Fisch vom optischen Tectum, einem Bereich des Mittelhirns wahrgenommen. Während der Embryonalentwicklung entstehen zunächst Augenbecher und Tectum unabhängig voneinander. Um eine präzise Projektion der in der Retina aufgefundenen Signale auf das optische Tectum zu gewährleisten, werden später in der Entwicklung die einzelnen Axone des optischen Nerven präzise in den entsprechenden Teil des optischen Tectums geleitet.

Entwicklung des Auges

Bereits während der Gastrulation entwickelt sich aus einer distinkten epithelialen Anlage am anterioren Ende der entstehenden Embryonalachse das Augenfeld. Es wird während der Gastrulation durch induktive Prozesse festgelegt und besteht sowohl aus neuroektodermalen Bereichen, die sich später zum eigentlichen Augenbecher entwickeln, als auch aus Abkömmlingen des Oberflächenektoderms, aus denen sich Linse und Cornea entwickeln (Abb. 2a). Das Augenfeld wird durch Signalmoleküle der *hedgehog*-Genfamilie gespalten, die aus dem anterioren axialen Mesoderm sezerniert werden. Hierdurch erhält das sich entwickelnde Auge seine proximo-distale Ausrichtung (Abb. 2b). Beide sich bildenden Augenvesikel differenzieren weiter und formen Augenbecher und Linse in einem Prozeß der wiederum durch induktive Interaktionen gesteuert wird (Abb. 2c). Die Induktion der Linse im Kopfektoderm erfolgt noch bevor die Augenvesikel als seitliche Ausstülpungen des Vorderhirns erkennbar sind. Durch ein planares „Signal“ aus der Region des Augenfeldes wird in der lateral flankierenden Region des Kopfektoderms die Bildung der Linse induziert.

Obwohl sich die Augen von Vertebraten und Fliegen in Bezug auf die Anatomie und die Funktion grundlegend unterscheiden, zeigen neueste Ergebnisse bei Vertebraten und *Drosophila* überraschende Parallelen auf molekularer Ebene. Das Mausgen *Pax6* und dessen Homologes in *Drosophila* kodieren für einen Transkriptionsfaktor, der eine Homöodomäne und eine Paired-Domäne enthält. Homologe von *Pax6* wurden in einer Vielzahl von Vertebraten und Invertebraten identifiziert, und wie in der Maus und in *Drosophila* sind sie dort im sich entwickelnden zentralen Nervensystem sowie in den Augenanlagen exprimiert.

Der Verlust der *Pax6*-Aktivität bei *Drosophila-eyelless* (*ey*)-Mutanten sowie bei Maus und Ratte (*Small eye*) führen zu einer Reduktion der Augengröße (heterozygote Embryonen) beziehungsweise zum Verlust der Augen (homozygot mutante Embryonen). Mutationen in dem *Pax6*-Homologen des Menschen sind die Ursache für die Erbkrankheit Aniridia, die eine Reduktion der Iris und Linsen-, Retina- und Sehnervdefekte zur Folge hat. Die ektopische Expression von *Pax6* während der Embryonalentwicklung von *Drosophila* hat die Ausbildung ektopischer Augen an den Stellen mit *Pax6*-Überexpression zur Folge. Die Beobachtung daß das PAX6-Protein in Fliegen und Vertebraten notwendig, in bestimmten *Drosophila*-Gewebe auch hinreichend für die Augenentwicklung ist, ist Grundlage für das Argument, daß *Pax6* ein „master control gene“

der Augenentwicklung darstellt. Somit stellt sich die Frage, ob weitere Gene in der von *Pax6* initiierten Kaskade evolutionär konserviert sind.

Tatsächlich konnten Homologe des *Drosophila*-Homöoboxgens *sine oculis*, das für die Entwicklung des gesamten visuellen Systems in *Drosophila* benötigt wird, in Vertebraten identifiziert und kloniert werden. Es wurde gezeigt, daß in Vertebraten das Gen *Six3* zu einer Gruppe evolutionär konservierter Gene gehört, die für die Etablierung eines Auges von Bedeutung sind.

Zum einen führt die ektopische Überexpression des *Six3*-Gens durch DNA-Injektion in Medaka-Embryonen zur Bildung ektopischer Linsen. Dabei ist nur die Ohrplakode kompetent, auf die von *Six3* initiierten Signale mit der Ausbildung einer ektopischen Linse in Abwesenheit eines Augenbeckers oder neuroretinaler Strukturen zu reagieren.

Die Expression von *Six3* in der Retina und der frühen Linsenplakode ließe sich mit einer Funktion sowohl in der Bildung der Linse als auch der Retina vereinbaren. Die Untersuchung einer möglichen Rolle von *Six3* bei der frühen Entwicklung der Vertebraten-Retina durch Injektion von mRNA führte zu retinaler Hyperplasie, einer drastischen Vergrößerung der Augenvesikel. Noch eindrücklicher führt die Überexpression von *Six3* unter Einbeziehung regulatorischer Interaktionen zwischen *Pax6* und *Six3* zur Ausbildung ektopischer Augenbecher im Mittelhirn (Abb. 1e,f). Wie im sich entwickelnden Auge sind auch hier *Pax6* und *Six3* in der Region exprimiert, die zunächst retinale Vorläuferstrukturen ausbildet. Die Korrelation von ektopischer *Pax6*-Expression und der Bildung ektopischer Retina legt nahe, daß die *Pax6*-Expression eine Voraussetzung für die Ausbildung einer ektopischen Retina darstellt. Die retinalen Vorläuferstrukturen haben das Potential, sich (zum Teil) in ektopische Augenbecher weiterzuentwickeln. Somit initiiert *Six3* den Prozeß der Retinabildung und sorgt durch Rückkopplung mit *Pax6* für die Festlegung retinaler Identität. Es ist aber allein nicht hinreichend für eine vollständige Implementierung späterer Schritte der retinalen Entwicklung. Diese Experimente zeigen, daß das Entwicklungsprogramm, das zur Ausbildung von Augen führt, die evolutionär konservierten Interaktionen von *Six3* und *Pax6*, die Homologen von *so* und *ey* beinhaltet. Während in höheren Vertebraten (Frosch, Hühnchen) offenbar ein ähnlicher Mechanismus zur Etablierung retinaler Identität verwendet wird, zeigt der Vergleich mit den Ergebnissen ähnlicher Experimente im Zebrafisch, daß dieser Mechanismus innerhalb der Fische ein „Thema mit Variationen“ darstellt. Dies wird schließlich dazu

beitragen, mit Hilfe weiterer vergleichender Untersuchungen das Grundprinzip der Retinaentwicklung „herauszudestillieren“.

Die Mehrzahl der bislang isolierten Fisch-Mutanten, welche die Augenentwicklung betreffen, interferieren mit späteren Schritten der retinalen Differenzierung. Es sind jedoch zwei Mutanten beschrieben, deren Phänotyp auf eine Rolle der betroffenen Gene in frühen Schritten der Augenentwicklung schließen läßt. In mutanten *masterblind*-Zebrafischembryonen tritt ein Verlust beziehungsweise eine Reduktion der Augen auf, und Teile des Vorderhirns sind transformiert. Möglicherweise sind die Veränderungen in der Vorderhirnanlage Ursache für die Reduktion oder Abwesenheit der Augen. Bei der Medaka-Mutante *eyes lack* (*el*) ist spezifisch die Augenentwicklung gestört. In homozygoten *el*-Embryonen bilden sich keine Augen aus, wobei die Morphologie des Gehirns nicht offensichtlich gestört ist. Es zeigt sich, daß die Ausbildung des Augen-

feldes sowie dessen Zerteilung und die damit einhergehende proximo-distale Musterbildung nicht betroffen sind, während die im Wildtyp damit einhergehende Morphogenese des Augenvesikels nicht stattfindet. Somit zeigt die *el*-Mutante, daß die Morphogenese des Auges (die nicht stattfindet) und die frühe Musterbildung innerhalb des Augenfeldes (die stattfindet) zwei distinkte Prozesse darstellen, die genetisch entkoppelt werden können.

Organisation der Mittelhirnentwicklung

Die Ganglionzellen in der Retina des Auges leiten über ihre Axone die visuelle Information zum optischen Tectum, einem dorsalen Bereich des Mittelhirns, der als primäres visuelles Zentrum in fast allen Vertebraten fungiert. Dabei werden benachbarte Retina-Ganglionzellen mit benachbarten Zellen des Tectums verschaltet und erzeugen so ein getreues Abbild der visuellen In-

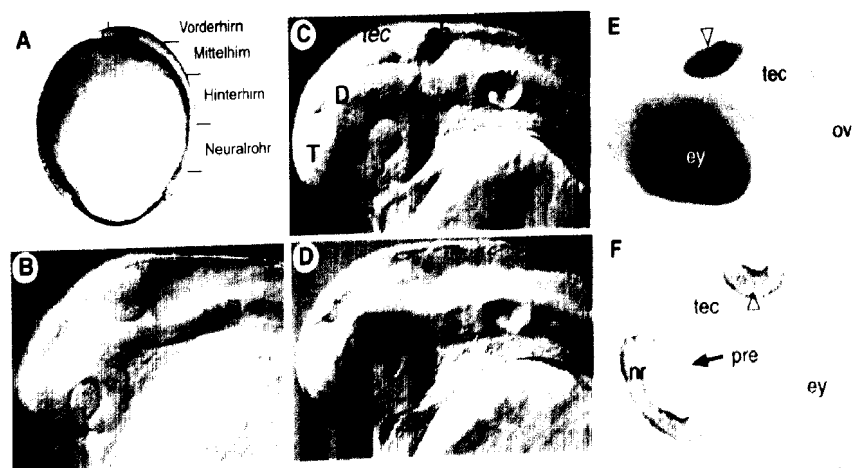


Abb 1: Analyse der Neuralentwicklung im Fischembryo. Fischembryonen (A-D, Zebrafisch, E, F Medaka, F, Querschnitt, sonst laterale Ansicht). A) Unterteilung des sich entwickelnden Gehirns im Neuralstadium (90% Epibolie). B, D) Mutanten (*ace*, *noi*) in denen die Mittel-Hinterhirngrenze betroffen ist, markiert mit einem * (vgl. mit Wildtyp in C). E, F) Ausbildung ektopischer Augenbecher (offene Pfeilspitze) im Mittelhirn als Folge der Überexpression von *Six3*. Querschnitt in F zeigt die beginnende Differenzierung in Pigmentepithel und neuroretinale Strukturen.

TOOLBOX 2: Genom-Forschung

Durch die Genomforschung stehen eine Vielzahl von Methoden, Reagenzien und identifizierten Genen für die molekulare Analyse zur Verfügung; einige Beispiele sind nachstehend aufgeführt. Die Analyse des Zebrafisch-Genoms ist bereits fortgeschritten, die des Medaka-Genoms ist initiiert.

► Genetische und molekulare Kartierungen

Diese sind wichtig für die Identifikation der Gene, die in bestimmten Mutanten betroffen sind. Es stehen hochauflösende genetische Karten zur Verfügung, auf der Mutanten, cDNAs, 'simple sequence repeats' etc. kartiert sind, sowie PAC-, YAC-, BAC-, cDNA- und genomische Genbibliotheken. Eine physikalische Karte ist in Arbeit.

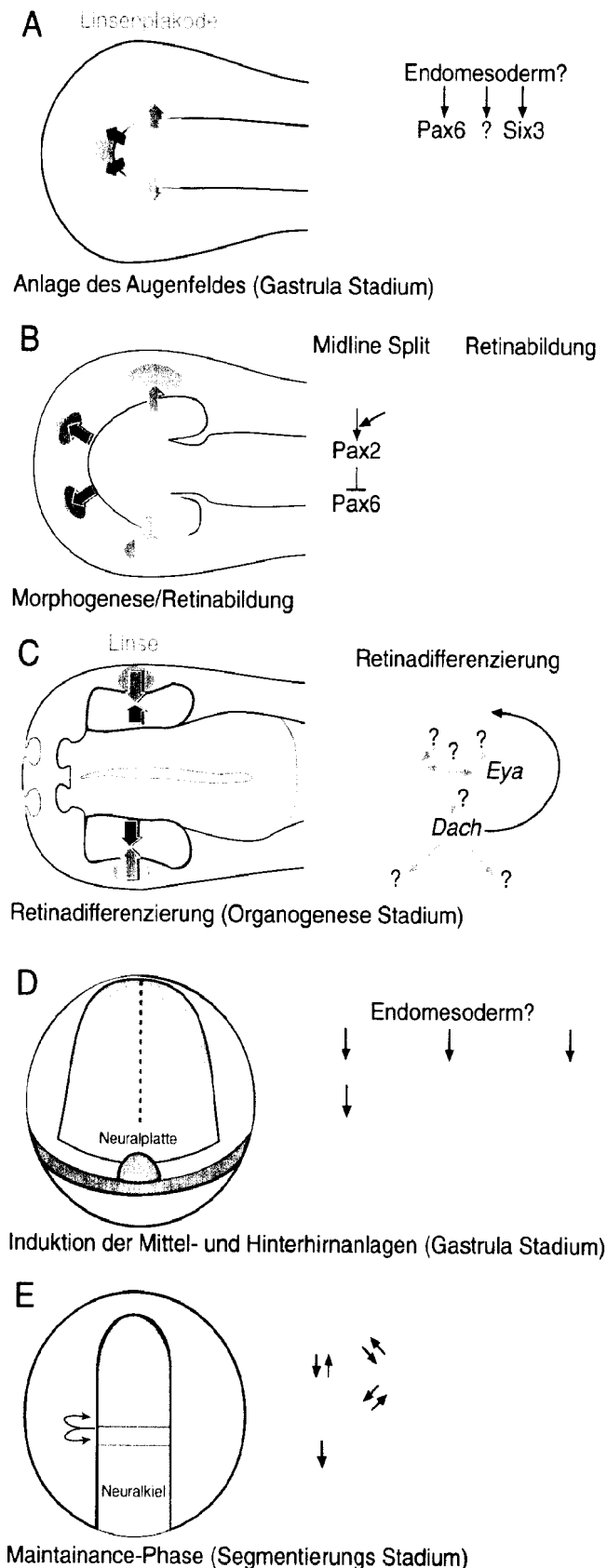
► EST-Projekt

Ungefähr 30.000 ESTs (expressed sequence tags) aus 'Oligo-fingerprinted'-Bibliotheken sind zur Zeit sequenziert und in „Genbank“ deponiert. Das erleichtert die Isolierung spezifischer Zebrafischgene.

►

Die Sequenzierung des Zebrafisch-Genoms ist in Vorbereitung; Größe: Zebrafisch ca. 1700 MB, Medaka ca. 750 MB, mit jeweils rund 70.000 bis 100.000 Genen (zum Vergleich: *Drosophila* ca. 12.000 Gene, *C. elegans*: ca. 97 MB, 19.000 Gene, Maus/Mensch: ca. 3000 MB, 140.000 Gene).

Aktuelle Informationen zu diesem und anderen Themen sind im Internet erhältlich unter Zebrafisch <http://www.zfish.uoregon.edu/>; Medaka <http://biol1.bio.nagoya-u.ac.jp/8000/>



formation im Gehirn (Retinotopie). Damit diese Verschaltung funktionieren kann, müssen die Zellen des Auges und des Tectums Informationen über ihre relative Position besitzen. Diese Positionsinformation wird bereits während der frühen Embryonalentwicklung festgelegt, und das Verständnis der zugrundeliegenden Prozesse ist von großer Bedeutung für die weitere Entwicklung und Funktion des Mittelhirns.

Zellmarkierungen zeigen, daß das Mittelhirn sich aus dem anterioren Teil der Neuralplatte entwickelt. Dieser Prozeß beginnt bereits während der Gastrulation, wenn die Zellen sich morpholo-

Abb. 2: Schematische Darstellung der frühen Augenentwicklung und der Musterbildung an der Mittel-Hinterhirngrenze. Näheres siehe Text

gisch noch nicht voneinander unterscheiden. Die Induktion des Mittelhirnschicksals erfolgt unter dem Einfluß noch unbekannter sekretierter Signalmoleküle; Mitglieder der *wnt*- und der *Fgf*-Familien von Signalmolekülen sowie Retinsäure werden als Kandidaten für die Signale diskutiert. Generell scheinen innerhalb der Neuralplatte beziehungsweise des Neuralrohrs die Musterbildungsprozesse, durch die die unterschiedlichen Zellschicksale hervorgebracht werden, entlang der dorsal-ventralen und anterior-posterioren Achse weitgehend unabhängig voneinander zu erfolgen. Dorsal-ventrale Musterbildung ist relativ gut verstanden: Hier spielen die Konzentration und gradierte Verteilung sekretierter Signalproteine eine wichtige Rolle, die über Aktivierung ihrer Signaltransduktionskaskaden spezifische Zelltypen definieren. Auf der dorsalen Seite gehören dazu die Mitglieder der BMP (bone morphogenetic protein)-Familie, während ventral die Mitglieder der Shh (sonic hedgehog)-Familie diese Funktion ausüben.

Dagegen ist die anterior-posteriore Musterbildung wesentlich weniger gut verstanden. Von großer Bedeutung sind spezielle „Organisator“-Zellpopulationen, die über die Ausschüttung sekretierter Signalproteine die Musterbildung in benachbarten Gehirnregionen entlang der anterior-posterioren Achse steuern. Der erste bekannte Organisator dieser Art befindet sich an der Grenze zwischen Mittel- und Hinterhirn (MHG, auch *isthmus rhombencephali*, Fig. 1c) und wird deshalb auch als MHG-Organisator oder Isthmus-Organisator bezeichnet. Er exprimiert etwa die *Fgf8*- und *Wnt-1*-Signalmoleküle. Elegante Transplantationsexperimente am Hühnerembryo zeigten, daß der Organisator in der Lage ist, Mittelhirn zu induzieren und zu polarisieren. Dabei ist die Expression von *Fgf8* von entscheidender Bedeutung. Die Prinzipien der Entwicklung und Funktion eines solchen Organisators in der Neuralplatte können am Beispiel des MHG-Organisators gut untersucht werden, weil er sehr früh entsteht und besonders gut experimentell zugänglich ist. Vermutlich gibt es aber mehrere solcher Organisatoren im sich entwickelnden Neuroepithel; beispielsweise wurde ein Organisator für das Vorderhirn kürzlich am Vorderrand der Zebrafisch Neuralplatte entdeckt, und auch hier gibt es Hinweise für eine Beteiligung von *Fgf8*.

Mutationen in mindestens drei Genen aus den Zebrafisch-Mutagenesen betreffen die anterior-posteriore Entwicklung des Mittelhirns und des MHG-Organisators bereits besonders früh und versprochen daher Aufschluß über die zugrundeliegenden genetischen Mechanismen der Organisator-Entstehung und -Aktivität zu geben. Homozygote Mutanten für das *no isthmus (noi)*-Gen haben kein Mittelhirn mehr, und es fehlen die Mittel-Hinterhirngrenze und das Cerebellum (Abb. 1d). *Acerebellar (ace)* Mutanten haben ein – allerdings verändertes – Tectum und Mittelhirn, aber die MHG und das Cerebellum fehlen ebenfalls (Abb. 1b). *spiel-ohne-grenzen (spg)*-Mutanten haben einen ähnlichen Phänotyp wie *ace*-Mutanten. Diese mutanten Phänotypen können direkt im Embryo beobachtet werden (Abb. 1) und wurden durch Analyse einer Vielzahl von Genexpressions- und neuroanatomischen Markern bestätigt. Genetische Kopplungstests und molekulare Analysen zeigten weiterhin, daß in *noi*-Mutanten der paired-Typ-Transkriptionsfaktor *pax2.1* mutiert ist und daß in *acerebellar*-Mutanten das sekretierte Signalmolekül *Fgf8* mutiert ist; das in *spg*-Mutanten betroffene Gen ist noch nicht identifiziert.

Beide Gene werden bereits früh im Gastrulationsstadium im sich entwickelnden Mittel-Hinterhirn-Primordium exprimiert. Die molekulare Analyse zeigt jedoch, daß sie nicht für dessen Induktion benötigt werden. Interessanterweise erfolgt die anfängliche Expression in zueinander benachbarten Domänen (Abb. 2d): *pax2.1*

ist dabei in der Mittelhirnanlage und *Fgf8* in der Hinterhirnanlage exprimiert, auf beiden Seiten des Embryos. Die Expressionsanalysen in der jeweils anderen Mutante, aber auch Überexpressionsexperimente zeigten zudem, daß *pax2.1* und *fgf8* unabhängig voneinander aktiviert werden. Demnach ist *Fgf8* für die Induktion des Mittelhirns entbehrlich; es wird aber in einer späteren Phase zur Polarisierung benötigt (s.u.). Ein drittes Gen, das für das Signalmolekül *wnt-1* aus der *wingless*-Familie kodiert, wird ebenfalls unabhängig aktiviert. Innerhalb seiner Domäne ist der *pax2.1*-Transkriptionsfaktor jedoch auch zu diesem Zeitpunkt bereits notwendig für die Aktivierung von *eng2* und *eng3* aus der *Engrailed*-Familie der Homöobox-Transkriptionsfaktoren. Das Mittelhirn und Hinterhirnprimordium sowie mehrere Signalwege darin scheinen also zunächst unabhängig voneinander bereits in der Gastrula aktiviert zu werden. Für die Aktivierung sind bisher unbekannte Signale aus dem Endomesoderm verantwortlich, die ihrerseits durch die endodermale Expression des *otx2*-Homöoboxproteins kontrolliert werden. An der Identifizierung dieser aktivierenden Signale wird zur Zeit intensiv gearbeitet.

Im Verlauf der weiteren Entwicklung wird das Mittelhirnprimordium polarisiert, zum Beispiel wird nun *Engrailed* in einem Gradienten exprimiert. Es treten Interaktionen zwischen den anfänglich unabhängigen Domänen auf – während der Segmentierungsphase werden die *pax2.1*- und *fgf8*-Gene in ihrer Aktivität vom jeweils anderen Gen abhängig und bilden eine Art Rückkopplungsschleife („Maintenance“-Phase, Abb. 2d, e). Die Analyse von Maus-Mutationen in den *En1*- und *wnt-1*-Genen sowie „Misexpression“-Experimente in Medaka und Zebrafisch lassen vermuten, daß diese Gene ebenfalls an der Rückkopplungsschleife beteiligt sind. Eine ähnliche Rückkopplungsschleife, jedoch ohne Beteiligung von *Fgf8*, ist auch bei der Segmentierung des *Drosophila*-Embryos aktiv, was wiederum auf die grundsätzliche Konservierung vieler regulatorischer Genkaskaden hindeutet. Der posteriore Teil der *pax2.1*-Expressionsdomäne exprimiert in diesem Stadium nun auch *fgf8*, etwa in der Region, in der der MHG-Organisator entsteht. Hier wird auch die Expression zweier weiterer Transkriptionsfaktoren der Pax-Genfamilie (und anderer Gene) angeschaltet, deren Expression in *noil/pax2.1*-Mutanten spezifisch ausfällt (Abb. 2e). Interessanterweise scheint letzteres in der Maus nicht der Fall zu sein: Hier sind Pax2 und Pax5 zunächst unabhängig voneinander aktiviert und redundant. Es ist im Moment nicht klar, was dieser Unterschied in der Regulation bedeutet, aber ein Zusammenhang mit einem Funktionswechsel

	Zebrafisch	Medaka
Generationszeit	8-12 Wochen	8-10 Wochen
Embryonalentwicklung	2 Tage	6 Tage
Eier/Weibchen/Woche	200-900, synchron	200-300 synchron
Chromosomensatz 1n	25	24
Genomgröße	ca. 1700 MB	ca. 750 MB
Mutanten	in ca. 500 Genen beschrieben	in ca. 100 Genen beschrieben
Haltung	platz- und kostengünstig	
Mutagenese	chemisch, durch Bestrahlung, Insertionen	

Toolbox 3: Genetik

Mutantenklassen nach betroffenen Geweben/Prozessen (Tübingen Zebrafisch-Screen): Epibolie, Frühe Zellteilungen, Zell-Vitalität, Körperachsen, Chorda, Somiten, Vorder-, Mittel-, Hinterhirn, Gehirnvtrikel, Neuralrohr, Neuronale Degeneration, Auge, Retinotektale Projektion, Innenohr, Bewegung u. Balance, Seitenlinienorgan, Kiefer, Kiemenbögen, Pigmentzellen, Herz Morphology und Physiologie, Muskeldifferenzierung, Kreislauf, Blut, Leber, Darm, Niere, Körperform, Flossen, Haut
Für detailliertere Beschreibungen des Phänotyps einzelner Mutanten(-gruppen) siehe die „Zebrafisch-Ausgabe“ von Development, Vol. 123, (1996), und <http://wwwweb.mpib-tuebingen.mpg.de/abt.3/>.

sel des dorsalen Mittelhirns bei Säugern ist denkbar.

Auch in späteren Phasen der Mittelhirnentwicklung scheint der MHG-Organisator eine wichtige Rolle zu spielen. In dieser späteren Phase müssen die Retina-Ganglienzellen (RGCs) des Auges mit ihren axonalen Wachstumskegeln die korrekte Position innerhalb des Tectum opticum finden, um die visuelle Welt korrekt auf das Tectum abzubilden. Zu den dafür notwendigen axonalen „guidance“-Molekülen gehören Oberflächenproteine der Ephrin-Klasse, die in Gradienten im Tectum verteilt sind und die ihrerseits durch die gradierte Verteilung des *Engrailed*-Transkriptionsfaktors kontrolliert werden. Der *Engrailed*-Gradient im Mittelhirn hängt seinerseits von Signalen aus dem MHG-Organisator ab. Eine Komponente des Signals ist dabei wiederum *Fgf8*, da in *acerebellar/Fgf8*-mutanten Embryonen die *Engrailed*- und Ephrin-Expression abwesend oder nicht polarisiert sowie die retinotopische Organisation der RGCs im Tectum stark gestört ist. Transplantationsexperimente, in denen Augen und Gehirne verschiedenen Genotyps kombiniert wurden, zeigen dabei, daß der mutante Genotyp des Gehirns für die gestörte Verschaltung der RGCs mit dem Tectum verantwortlich ist. Interessanterweise zeigen die gleichen Transplantationsexperimente, daß es eine zweite Funktion von *Fgf8* in der Stimulation repulsiver Eigenschaften der Isthmus-Region gibt, die als eine Art Barriere ein Überschießen der RGC-Axone über das Tectum hinaus verhindert. Ähnlich wie für die MHG lassen sich repulsive Eigenschaften auch für *fgf8*- und *pax2.1*-exprimierende Gliazellen im optischen Chiasma nachweisen, einem Bereich, den RGCs auf dem Weg von der Retina zum Tectum gerichtet durchwachsen müssen. Im optischen Chiasma agiert daher möglicherweise ein ähnliches genetisches Netzwerk, wie es sich im Detail an der Mittelhinterhirngrenze untersuchen läßt.

Viele Fragen bleiben offen. Welches sind die Signale, die die Entstehung des Augenfeldes beziehungsweise der Mittel-Hinterhirnregion kontrollieren? Welche Signale steuern die Differenzierung des Auges in seine Bereiche, wie Augenbecherstiel, Neuroretina und Pigmentepithel, und wie ist die Kontrolle der Morphogenese mit der Differenzierung des sich entwickelnden Auges gekoppelt? Wie entsteht der Organisator an der MHG, was macht seine Funktion aus, und wie kontrolliert er mechanistisch das Zellschicksal der benachbarten Zellen? In welchem Maße finden sich Funktionen und Signaltransduktionswege des MHG-Organisators auch im Augenfeld wieder? Wie wird die Morphogenese und Differenzierung der MHG-Region gesteuert? In *Amphioxus*, einem einfachen Chordaten, scheint ein MHG-Organisator noch nicht zu existieren, und er könnte daher eine Vertebraten-spezifische „Erfindung“ sein – wann tritt er erstmalig in der Evolution auf und wodurch? Wie verändert er seine Aktivität im Phylum der Vertebraten und mit welchen Konsequenzen für die Evolution und Funktion dieser Gehirnregion? Der MHG-Organisator repräsentiert ein neues Prinzip der Entstehung von Zellschicksalen im Nervensystem. Er ist wahrscheinlich kein Einzelfall – siehe Chiasma –, aber er ist vielleicht der früheste, und sicher einer der zugänglichsten Organisatoren seiner Art im Nervensystem.

Mit den genetischen, experimentellen und molekularen Methoden, die im Fisch zur Verfügung stehen, sollte es möglich sein, die frühe Entwicklung des Auges sowie des MHG-Organisators stellvertretend für andere in ihrer Funktion und Evolution zu verstehen. Neue Mutanten und Gene sowie zum Beispiel *in vivo*-Farbstoffe wie Green Fluorescent Protein (GFP), die unter der Kontrolle spezifischer Promotoren zur Herstellung transgener Fische verwendet wur-

den, sollten helfen, ein genaueres Verständnis der Mechanismen zu entwickeln, die dann auf ihre Abwandlungen in der Evolution hin untersucht werden können.



Michael Brand

studierte Biologie an den Universitäten Marburg und Köln sowie Biochemie und Molekularbiologie an der Harvard University, Cambridge, USA. Nach der Promotion am Institut für Entwicklungsbiologie der Universität Köln (1989) arbeitete er als Postdoctoral Fellow am Howard Hughes Medical Institut der University of California, San Francisco, und als Assistent am Tübinger Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie, wo er sich 1997 habilitierte. Seit 1995 ist er Gruppenleiter am Institut für Neurobiologie der Universität Heidelberg und am neugegründeten Max-Planck Institut für Molekulare Zellbiologie und Genetik, Dresden (z.Zt. mit Sitz in Heidelberg). Der Schwerpunkt seiner Arbeit liegt bei den molekulargenetischen Grundlagen der Entwicklung des Nervensystems bei Wirbeltieren, insbesondere beim Zebrafisch.



Jochen Wittbrodt

studierte Biologie und Chemie an der Ludwig-Maximilians-Universität München. Nach der Promotion am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried bei München (1990) arbeitete er als Postdoctoral Fellow am Biozentrum der Universität Basel, Schweiz. 1995 übernahm er eine Nachwuchsgruppe im SFB 271 am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie in Göttingen und habilitierte sich 1998 an der Technischen Universität Braunschweig. Seit 1999 ist er Gruppenleiter am European Molecular Biology Laboratory (EMBL) in Heidelberg und beschäftigt sich mit den molekularen und genetischen Grundlagen der frühen Entwicklung des Nervensystems, insbesondere des Auges.

Literatur

- Brand, M.** (1998). Genetic analysis of early development of a vertebrate nervous system in the zebrafish, *Danio rerio*. *Zoology* 101, 345-364.
- Duboule, D. and Wilkins, A. S.** (1998). The evolution of 'bricolage'. *Trends Genet* 14, 54-59.
- Grainger, R. M.** (1992). Embryonic lens induction: shedding light on vertebrate tissue determination. *Trends Genet.* 8, 349-355.
- Jean, D., Ewan, K. and Gruss, P.** (1998). Molecular Regulators Involved in Vertebrate Eye Development. *Mech. Dev.* 76, 3-18.
- Lumsden, A. and Krumlauf, R.** (1996). Patterning the vertebrate neuraxis. *Science* 274, 1109-1123.
- Puelles, L., Marin, F., Martínez-de-la-Torre, M. and Martínez, S.** (1996). The midbrain-hindbrain junction: a model system for brain regionalization through morphogenetic neuroepithelial interactions. In *Mammalian Development*, (ed. P.Lonai), pp. 173-197: Harwood.
- Postlethwait, J. H., Yan, Y. L., Gates, M. A., Horne, S., Amores, A., Brownlie, A., Donovan, A., Egan, E. S., Force, A., Gong, Z. et al.** (1998). Vertebrate genome evolution and the zebrafish gene map. *Nat. Genet.* 18, 345-349.
- Wada, H., Naruse, K., Shimada, A. and Shima, A.** (1995). Genetic linkage map of a fish, the Japanese medaka *Oryzias latipes*. *Molecular Marine Biology & Biotechnology* 4, 269-274.

Augenentwicklung

- Cheyette, B. N. R., Green, P. J., Martin, K., Garren, H., Hartenstein, V. and Zipursky, S. L.** (1994). The *Drosophila* sine oculis locus encodes a homeodomain-containing protein required for the development of the entire visual system. *Neuron* 12, 977-996.
- Halder, G., Callaerts, P. and Gehring, W. J.** (1995). Induction of ectopic eyes by targeted expression of the *eyeless* gene in *Drosophila*. *Science* 267, 1788-1792.
- Heisenberg, C. P., Brand, M., Jiang, Y. J., Warga, R. M., Beuchle, D., van Eeden, F. J., Furutani-Seiki, M., Granato, M., Haffter, P., Hammerschmidt, M. et al.** (1996). Genes involved in forebrain development in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* 123, 191-203.
- Henry, J. J. and Grainger, R. M.** (1990). Early tissue interactions leading to embryonic lens formation in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* 141, 149-163.
- Hill, R. E., Favor, J., Hogan, B. L. M., Ton, C. C. T., Saunders, G. F., Hanson, I. M., Prosser, J., Jordan, T., Hastie, N. D. and van Heyningen, V.** (1991). Mouse small eye results from mutations in a paired-like homeobox containing gene. *Nature* 354, 522-525.
- Loosli, F., Winkler, S. and Wittbrodt, J.** (1999). Six3 overexpression initiates the formation of ectopic retina. *Genes Dev.* 13, 649-654.
- Malicki, J., Neuhauss, S. C. F., Schier, A. F., Solnica-Krezel, L., Stemple, D. L., Stainier, D. Y. R., Abdelilah, S., Zwartkruis, F., Rangini, Z. and Driever, W.** (1996). Mutations Affecting Development of the Zebrafish Retina. *Development* 123, 263-273.
- Oliver, G., Loosli, F., Köster, R., Wittbrodt, J. and Gruss, P.** (1996). Ectopic lens induction in fish in response to the murine homeobox gene *Six3*. *Mech. Dev.* 60, 233-239.
- Oliver, G., Mailhos, A., Wehr, R., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. and Gruss, P.** (1995). *Six3*, a murine homologue of the *sine oculis* gene, demarcates the most anterior border of the developing neural plate and is expressed during eye development. *Development* 121, 4045-4055.
- Quiring, R., Walldorf, U., Kloter, U. and Gehring, W. J.** (1994). Homology of the *eyeless* gene of *Drosophila* to the small eye gene in mice and aniridia in humans. *Science* 265, 785-789.

MHG-Entwicklung

- Brand, M., Heisenberg, C.-P., Jiang, Y.-J., Beuchle, D., Lun, K., van Eeden, F. J. M., Furutani-Seiki, M., Granato, M., Haffter, P., Hammerschmidt, M. et al.** (1996). Mutations in zebrafish genes affecting the formation of the boundary between midbrain and hindbrain. *Development* 123, 179-190.
- Kozmik, Z., Holland, N. D., Kalousova, A., Paces, J., Schubert, M. and Holland, L. Z.** (1999). Characterization of an amphioxus paired box gene, *Amphipax2/5/8*: developmental expression patterns in optic support cells, nephridium, thyroid-like structures and pharyngeal gill slits, but not in the midbrain-hindbrain boundary region. *Development* 126, 1295-1304.
- Lun, K. and Brand, M.** (1998). A series of no isthmus (noi) alleles of the zebrafish *pax2.1* gene reveals multiple signaling events in development of the midbrain-hindbrain boundary. *Development* 125, 3049-3062.
- Pickar, A., Brennan, C., Reifers, F., Böhli, H., Holder, N. and Brand, M.** (1999). Requirement for zebrafish *acerebellar/FGF8* in midbrain polarization, mapping and confinement of the retinotectal projection. *Development* 126, 2967-2978.
- Reifers, F., Böhli, H., Walsh, E. C., Crossley, P. H., Stainier, D. Y. and Brand, M.** (1998). *Fgf8* is mutated in zebrafish *acerebellar* (*ace*) mutants and is required for maintenance of midbrain-hindbrain boundary development and somitogenesis. *Development* 125, 2381-2395.
- Ristoratore, F., Carl, M., Deschet, K. et al.** (1999). The midbrain-hindbrain boundary genetic cascade is activated ectopically in the diencephalon in response to the widespread expression of one of its components, the medaka gene *Ol-eng2*. *Development* 126, 3769-3779.
- Schwarz, M., Alvarez Bolado, G., Urbanek, P., Busslinger, M. and Gruss, P.** (1997). Conserved biological function between *Pax-2* and *Pax-5* in midbrain and cerebellum development: evidence from targeted mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 14518-14523.
- Shaman, A. C. and Brand, M.** (1998). Evolution and homology of the nervous system: cross-phylum rescues of *otd/Otx* genes. *Trends in Genetics* 14, 211-214.
- Urbanek, U., Fetka, L., Meisler, M. H. and Busslinger, M.** (1997). Cooperation of *Pax2* and *Pax5* in midbrain and cerebellum development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 5703-5703.
- Wurst, W., Auerbach, A. B. and Joyner, A. L.** (1994). Multiple developmental defects in *Engrailed-1* mutant mice: an early mid-hindbrain deletion and patterning defects in forelimbs and sternum. *Development* 120, 2065-2075.

Korrespondenzadressen

PD Dr. Michael Brand
Department für Neurobiologie
Universität Heidelberg, und
Max-Planck-Institut für Molekulare
Zellbiologie und Genetik (Dresden)
Im Neuenheimer Feld 364,
D-69120 Heidelberg, Germany
Tel.: 06221-548355
Fax: 06221-544496
eMail: brand@sun0.urz.uni-heidelberg.de
www: <http://www.nbio.uni-heidelberg.de/Brand.html>

PD Dr. Jochen Wittbrodt
Developmental Biology Programme
European Molecular Biology Laboratory
Meyerhofstrasse 1
P/O Box 10.2209
D-69012 Heidelberg
Tel.: 06221-38776
Fax: 06221-387166
eMail: Jochen.Wittbrodt@EMBL-Heidelberg.de
<http://www.embl-heidelberg.de/ExternalInfo/wittbrodt/OfficialGroupPage.html>