

Kleine Moleküle, große Pläne – können niedermolekulare Verbindungen die menschliche Regeneration steuern?

Claudia Gey und Athanassios Giannis*

Stichwörter:

Biologische Aktivität · Dedifferenzierung · Regenerationsprozesse · Reversin · Zellzyklus

Die Überlieferung des Aristoteles, wonach der Salamander unversehrt durch Feuer laufen kann und es dabei löscht,^[1] ist durch nichts zu belegen und sicherlich falsch. Wahr hingegen und seit 235 Jahren dokumentiert ist die Tatsache, dass dem Salamander nach Verlust seines Schwanzes ein neuer wächst. Mitte des 18. Jahrhunderts beschrieb der italienische Wissenschaftler Lazzaro Spallanzani diese bemerkenswerte Eigenschaft des ausgewachsenen Tieres, durch Verletzung verlorene Gliedmaßen, den Kiefer sowie den Schwanz zu regenerieren.^[2] Bis heute ist der Salamander das Paradebeispiel für Regenerationsfähigkeit bei Tieren.

Im Unterschied zu niederen Tieren sind Wirbeltiere nur eingeschränkt in der Lage, verletzte, abgestorbene oder verlorene Körperteile zu ersetzen, denn mit fortschreitender Gewebespezialisierung nimmt die Fähigkeit zur Regeneration ab. Es gibt nur wenige Beispiele für reparative Regeneration bei Säugern (Fingerspitze bei Kindern, Zuwachsen eines Lochs im Kaninchenohr).^[3]

Ein Sonderfall der menschlichen Regeneration ist die Leber: Entferntes Gewebe wird durch Vergrößerung der verbleibenden Strukturen (Hypertrophie), aber auch durch Zunahme der Zellzahl (Hyperplasie), ersetzt. Ob sich dabei ausdifferenzierte Hepatozyten

teilen oder ob der Zellzuwachs durch Proliferation von Stammzellen erfolgt, ist noch nicht geklärt.^[4] Das Ziel vieler Forschungsarbeiten ist deshalb, die zellbiochemischen Mechanismen der Regeneration zu verstehen und das Regenerationspotenzial von Säugern zu erhöhen.

Die außergewöhnliche Regenerationsfähigkeit der Schwanzlurche beruht auf dem Prozess der zellulären Dedifferenzierung. Bei dieser Form der Regeneration wird die fehlende Struktur vom Wundrand her aufgebaut (Epimorphose). Zellen aus unterschiedlichen Geweben bauen im Bereich der Verletzung ihre Spezialstrukturen ab und erhalten somit Eigenschaften von Vorläuferzellen. Die reembryonalisierten Zellen bilden das Blastem und beginnen zu proliferieren. Kontrolliert durch die Umgebung können die Zellen des Blastems erneut differenzieren und verschiedene Gewebe bilden: Schwanz, Gliedmaßen oder Kiefer.

Erste wissenschaftliche Belege für die Dedifferenzierung von Amphibienzellen wurden 1938 erhalten. Wenig später zeigten elektronenmikroskopische Aufnahmen, dass Muskelzellen von Molchen am Ort der Amputation ihre fibrilläre Struktur verloren und einkernige Zellen das Blastem bildeten. Gleichzeitig wurde in Experimenten mit ³H-markiertem Thymidin die DNA-Synthese nachgewiesen.^[5] Transplantationsexperimente mit Muskelzellen, die mit Rhodamin-Dextran-Konjugaten markiert waren, ermöglichten die Beobachtung des Prozesses im zeitlichen Verlauf. Mehrkernige Muskelzellen von Molchen wurden in vitro kultiviert und

durch Injektion mit dem Farbstoffkonjugat dauerhaft markiert. Gereinigte Zellen gleicher Größe wurden anschließend in regenerierende Molchgliedmaßen implantiert. Nach einer Woche konnten mit Rhodamin markierte, einkernige Zellen identifiziert werden. Die Anzahl einkerniger Zellen erhöhte sich im weiteren Verlauf.^[6]

Den Nachweis, dass endogene Muskelzellen dedifferenzieren können, erbrachten schließlich Echeverri et al. Sie injizierten dextrangekoppelte Fluoreszenzfarbstoffe in einzelne Muskelfasern durchsichtiger Axolotl (mexikanische Wassermolche) und führten anschließend Amputationen durch. Durch In-vivo-Markierung und mit Differential-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie (DIC-Imaging) konnte gezeigt werden, dass alle Kerne einer einzigen Muskelzelle als einkernige Zellen abschnürten und das Blastem bildeten.^[7] Über den molekularen Mechanismus des Dedifferenzierungsprozesses ist noch wenig bekannt. Der Verlust des Zellkontakts an der Verletzung ist notwendig, jedoch nicht ausreichend, um die Fragmentierung der Muskelzellen und den Wiedereintritt in den Zellzyklus auszulösen.

Zur Aufklärung der intrazellulären Signalwege wurden Muskelfasern verschiedener Mausstämmen in vitro mit einem die Proliferation auslösenden Serum stimuliert. Myozyten der Maus gelten als ausdifferenziert und nicht mehr teilungsfähig. Muskelzellkulturen aus Molchen treten dagegen nach Serumstimulation in die S-Phase ein. 1994 zeigten Schneider et al., dass Muskelfasern aus murinen Retinoblastom(Rb)-

*] Dipl.-Biochem. C. Gey, Prof. Dr. A. Giannis
Institut für Organische Chemie
Universität Leipzig
Johannisallee 29
04103 Leipzig (Deutschland)
Fax: (+49) 0341-973-6599
E-mail: giannis@chemie.uni-leipzig.de

Mangelmutanten nach Serumstimulation ebenfalls in die S-Phase übergangen.^[8] Dies deutete darauf hin, dass in Säugern der G1-S-Übergang durch das Rb-Protein blockiert wird. Unterstützt wurde die Vermutung durch den Nachweis von phosphoryliertem, inaktiviertem Rb-Protein in stimulierten Muskelfasern des Molches.^[9] In Wildtyp-Mauszellen blieb Rb auch nach Serumstimulation unphosphoryliert und somit aktiv. Muskelfasern der Maus, in denen die Expression von Cyclin D und CDK4 induziert wurde, konnten unter serumreichen Bedingungen den G1-S-Block überwinden.^[10] Der Kinase-Signalweg mit dem Rb-Protein als Target und Faktoren aus dem Serum scheinen demnach bei der Induktion der Dedifferenzierung eine wichtige Rolle zu spielen (Abbildung 1).

Die Arbeitsgruppen um Schultz und Ding testeten kürzlich eine Bibliothek von niedermolekularen Verbindungen aus der Klasse der 2,6-disubstituierten Purine auf die Induktion von Dedifferenzierung in somatischen Säugerzellen.

Vorläuferzellen muriner Muskelzellen (Myoblasten, C2C12-Zellen) wurden mit den Verbindungen inkubiert (Konzentration: 5 μM). Dann wurde untersucht, ob einzelne Derivate die Myoblasten dedifferenzieren und in multipotente Zellen umwandeln können. Nach Entfernung der Substanzen wurden die Zellen parallel zum einen mit einem Medium inkubiert, das die Bildung von Osteoblasten induziert, zum anderen mit einem Medium, das die Bildung von Adipozyten induziert. Osteoblasten wurden durch den Nachweis von alkalischer Phosphatase als Marker für Knochenzellen identifiziert, Adipozyten wurden durch Färbung mit Oil Red O nachgewiesen. Um auszuschließen, dass bei dem Test auch Verbindungen identifiziert werden, die die Transdifferenzierung von Myoblasten zu Osteoblasten induzieren, wurden die Zellen nach Einwirkung der Substanzen ohne Osteogenese-Medium kultiviert und dann auf das Vorhandensein von alkalischer Phosphatase getestet.

In einem zweiten Ansatz wurden die C2C12-Zellen auf weitere Differenzierungsfähigkeit überprüft, indem ein Adipogenese auslösendes Medium zugegeben wurde. Unter den 50000 getesteten niedermolekularen Verbindungen war 2-(4-Morpholinoanilino)-6-cyclohexylaminopurin (**1**, Reversin) am wirksamsten (Abbildung 1). Die Inkubation mit **1** und die anschließende Kultivierung in Osteoblasten induzierendem Medium führte zu einer siebenfach höheren Aktivität der alkalischen Phosphatase als im Kontrollansatz (Behandlung mit DMSO). Durch Inkubation mit **1** wurde die Bildung von Muskelzellen aus den Myoblasten verhindert. Gleichzeitig nahm die Anzahl einkerniger Zellen zu. Im zweiten Testansatz wiesen nach Zusatz von Adipogenese induzierendem Medium 40% der Zellen Eigenschaften von Fettzellen auf (Fetttröpfchen) und waren mit Oil Red O anfärbbar.

Unter Einwirkung von Reversin differenzierten murine Myoblasten nicht zu Muskelzellen, sondern entwickelten sich in entsprechenden Medien zu Osteoblasten oder Adipozyten. Kontrollansätze ohne Zusatz von Osteogenese- oder Adipogenese-induzierenden Medien führten nach Einwirkung von Reversin nicht zu differenzierten Zellen, sondern es wurden einkernige Zellen erhalten. Damit wurde eine transdifferenzierende Wirkung des Reversins ausgeschlossen. Reversin-behandelte Myoblasten erhielten multipotente Eigenschaften zurück und konnten unter entsprechenden Bedingungen wie mesenchymale Vorläuferzellen zu Knochen- und Fettzellen differenzieren. Mit **1** wurde die erste niedermolekulare Verbindung identifiziert, die als externes Signal eine Rückentwicklung von gewebespezifischen Säugerzellen zu multipotenten Vorläuferzellen induzieren kann.

Wenn es gelingt, mithilfe kleiner Moleküle den Dedifferenzierungsprozess gezielt herbeizuführen, können vielleicht auch höhere Lebewesen fehlende Strukturen durch epimorphische Regeneration ersetzen. Über medizinische Anwendungen solcher niedermolekularer Verbindungen darf spekuliert werden. Es ist zunächst wichtig, den Prozess der Dedifferenzierung auf molekularer Ebene zu verstehen. Dazu tragen Verbindungen wie Reversin bei.

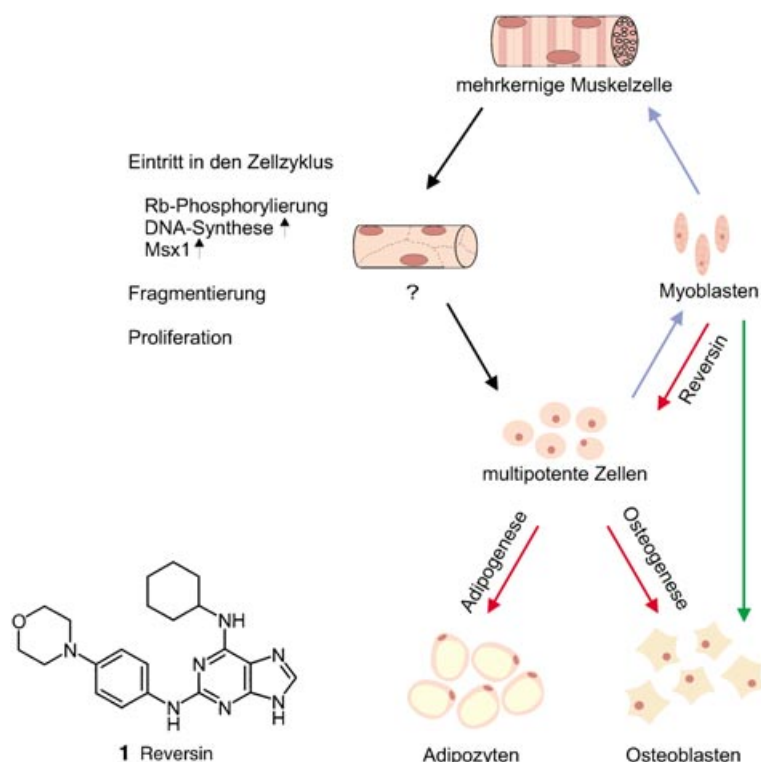


Abbildung 1. Dedifferenzierung von Muskelzellen und der Einfluss von Reversin (**1**). Schwarze Pfeile zeigen schematisch den Dedifferenzierungsprozess, blaue Pfeile symbolisieren die Ontogenese. Molekulare Vorgänge bei der Dedifferenzierung sind stichpunktartig ergänzt. Rote Pfeile geben das Experiment von Schultz und Ding et al. wieder, der grüne Pfeil kennzeichnet ein Beispiel für Transdifferenzierung. In Anlehnung an Lit. [11] und [15].

Durch Analyse von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen können Informationen über den biologischen Bindungspartner gewonnen werden, die z. B. für Affinitätsgegekoppelte Experimente nützlich sind. Ob Reversin die Aktivität eines Proteins (etwa einer Kinase) moduliert, das direkt oder indirekt das Rb-Protein phosphorylieren und damit die Blockade des Übergangs in die S-Phase aufheben kann, ist zurzeit noch unklar. Solche Kenntnisse würden allerdings nur einen Teilprozess der Dedifferenzierung erklären.

Schultz und Ding et al. haben für ihre Experimente Myoblasten verwendet. Diese einkernigen Zellen wurden während der Embryogenese determiniert, zu Muskelzellen zu differenzieren, weisen jedoch noch Eigenschaften von Vorläuferzellen auf. Es ist unwahrscheinlich, dass Reversin allein in völlig ausdifferenzierten Muskelzellen Dedifferenzierung auslösen kann. Nach wie vor ist nicht verstanden, welche Signale in den Muskelzellen der Amphibien den Übergang vom mehrkernigen Synzytium zur einkernigen Zelle steuern. Dieser Fragmentierungsprozess scheint unabhängig vom Eintritt in den Zellzyklus zu sein. Muskelzellen von Molchen, in denen der Übergang in die S-Phase durch Röntgenstrahlung oder Inhibition von CDK4 verhindert wurde, bildeten nach Transplantation in das Wundblasstern dennoch einkernige Zellen,^[12] die nicht durch Mitose entstanden sein können. Dedifferenzierung wird demnach durch zwei Teilprozesse induziert: Fragmentierung und Eintritt in den Zellzyklus mit anschließender Proliferation. Kinasen sind bei der Aktivierung der Zellteilung wesentliche Steuerelemente. Dort könnte Reversin eingreifen. Wodurch die Fragmentierung ausgelöst wird, ist noch unbekannt.

Viele Fragen zum Verständnis der Dedifferenzierung sind noch offen: Sind Fragmentierung und Zellteilung zwei unabhängige Prozesse, oder sind sie miteinander verknüpft? Welche Faktoren im Serum heben die Zellteilungsblockade auf? Welche Rolle spielen die *Msx*-Gene? Während der Embryogenese unterdrücken Mitglieder dieser Genfamilie Differenzierungsprozesse, um die Proliferation von Vorläuferzellen zu fördern. Muskelzellen von Mäusen,

in denen die Expression von *Msx1* induziert wurde, konnten ebenfalls zu multipotenten Zellen dedifferenzieren.^[13] Die bisherigen Ergebnisse zeigen die Komplexität des Prozesses auf.

Die Bedeutung der Dedifferenzierung für die Regeneration von Säugern lässt sich nur erahnen. Neueste Erkenntnisse im Bereich der Stammzellforschung deuten daraufhin, dass das menschliche Regenerationspotenzial bisher unterschätzt wurde. So konnten adulte Stammzellen in mindestens 20 Geweben, auch im Gehirn, nachgewiesen werden. Außerdem scheinen adulte Stammzellen nicht nur spezifisch für das jeweilige Gewebe zu sein, sondern sie können auch zu Zellen eines anderen Gewebetyps differenzieren (Plastizität). Die Mechanismen, die zur Plastizität der Stammzellen führen, sind noch nicht verstanden, der Dedifferenzierungsprozess kommt aber als eine wichtige Möglichkeit infrage.^[14] Eine niedermolekulare Substanz wie Reversin wird zwar alleine die Dedifferenzierung von Zellen nicht auslösen oder steuern können, aber sie ist ein nützliches Hilfsmittel zur Aufklärung der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen.

Glossar

Blastem	nicht differenziertes Bildungsgewebe
CDK4	Cyclin-abhängige Kinase 4; eine der Kinasen, die den Zellzyklus regulieren
Cyclin D	Protein, das die Aktivität der CDK4 steuert
Myoblasten	Vorläuferzellen von Muskelzellen der quergestreiften Muskulatur
reparative Regeneration	Ersatz von (durch Unfall oder Beschädigung) verlorenen Körperstrukturen
Retinoblastom	Krebserkrankung der sich entwickelnden Netzhaut. In entarteten Zellen fehlt das Rb-Protein, wodurch die Zellvermehrung nicht gehemmt wird. Der Verlust des Rb-Gens (Tumor-Suppressor-Gens) ist ein Merkmal vieler Krebserkrankungen

Rhodamin-Dextran Mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin konjugiertes Polymer, das als impermeabler Farbstoff für Zellen verwendet wird

Synzytium Produkt bei der Verschmelzung von Zellen, z. B. eine vielkernige Muskelzelle der Skelettmuskulatur

Transdifferenzierung „Umprogrammierung“ gewebespezifischer Stammzellen zu differenzierten Zellen anderer Gewebe

Online veröffentlicht am 8. Juli 2004

- [1] Aristoteles (384–322 v. Chr.), *Historia animalium* (Hrsg.: I. Bekker), 552b, 10–17: Η σαλαμάνδρα ποιεί φανερὸν: αὐτὴ γάρ, ὡς φασί, διὰ τοῦ πυρὸς βαδίζουσα κατασβέννυσσι το πῦρ. („Der Salamander tut das Offensichtliche: Wie bereits gesagt, während er durchs Feuer geht, löscht er es auch.“)
- [2] L. Spallanzani, *An Essay on Animal Reproductions* (übersetzt aus dem Italienischen von M. Maty), Becket & de Hondt, London, 1769.
- [3] D. Freudig in *Lexikon der Biologie* (Hrsg.: R. Sauermost), Spektrum, Heidelberg, 1999–2004, S. 462–463.
- [4] D. Palmes, H.-U. Spiegel, *Biomaterials* **2004**, 25, 1601–1611.
- [5] K. Echeverri, E. M. Tanaka, *Semin. Cell Dev. Biol.* **2002**, 13, 353–360.
- [6] D. C. Lo, F. Allen, J. P. Brookes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 7230–7234.
- [7] K. Echeverri, J. D. Clarke, E. Tanaka, *Dev. Biol.* **2001**, 236, 151–164.
- [8] J. W. Schneider, W. Gu, L. Zhu, V. Mahdavi, G. B. Nadal, *Science* **1994**, 264, 1467–1471.
- [9] E. M. Tanaka, A. A. F. Gann, P. B. Gattes, J. P. Brookes, *J. Cell Biol.* **1997**, 136, 155–165.
- [10] L. Latella, A. Sacco, D. Pajalunga, M. Tianinen, D. Macera, M. D'Angelo, A. Felici, A. Sacchi, M. Crescenzi, *Mol. Cell Biol.* **2001**, 21, 5631–5643.
- [11] S. Chen, Q. Zhang, X. Wu, P. G. Schultz, S. Ding, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 410–411.
- [12] C. P. Velloso, A. Kumar, E. M. Tanaka, J. P. Brookes, *Differentiation* **2000**, 66, 239–246.
- [13] S. J. Odelberg, A. Kollhoff, M. T. Keating, *Cell* **2000**, 103, 1099–1109.
- [14] A. J. Wagers, I. L. Weissman, *Cell* **2004**, 116, 639–648.
- [15] S. J. Odelberg, *Semin. Cell Dev. Biol.* **2002**, 13, 335–343.