

Teratogene und metamorphosehemmende Wirkung von Retinsäure in *Ciona intestinalis*

Teratogenic and Metamorphosis-Inhibiting Activity of Retinoic Acid in *Ciona intestinalis*

J. Manuel Denucé

Zoologisch Laboratorium I, Katholieke Universiteit, Toernooiveld,
6525 ED Nijmegen, Nederland

Z. Naturforsch. **46c**, 1094–1100 (1991); eingegangen am 11. März/22. Juli 1991

Ciona intestinalis, Retinoic Acid, Malformations, Metamorphosis

Exposure of embryos of the sea squirt, *Ciona intestinalis*, to all-*trans*-retinoic acid (between 10^{-5} and 10^{-7} M) causes specific malformations of the larvae and suppression of settlement and metamorphosis. Whether the vitamin A derivative was administered at the 2-cell stage, or at the early gastrula stage did not affect the nature or the extent of the ensuing anomalies. Malformations include a dorsal bulge of the body, an irregular disposition of ocellar pigment, and a twisted tail. Treated larvae have no statocyst pigment. There is also a reduction in size of the body, compared to control larvae. Retinoic acid retarded hatching, or even blocked it (at 10^{-5} M). Obviously retinoic acid interferes with the induction of metamorphosis, possibly through neutralizing one or more factors responsible for settlement and metamorphosis. The possible role of thyroxin in these processes is being critically evaluated.

Einleitung

Seit langem ist bekannt, daß Vitamin A (Retinol) bei Wirbeltieren das Wachstum fördert und Xerophthalmie (partielle Verhornung der Cornea) und Nachtblindheit verhindert. In der Endokrinologie konnten mit der Zufuhr von Vitamin A gewisse Besserungen bei Hyperthyreosen erzielt werden. Vitamin A wird im Organismus aus dem Provitamin Carotin erzeugt. Das Oxydationsprodukt des Vitamin-A-Aldehyds ist die Vitamin-A-Säure, auch Retinsäure genannt. Diese kann die Sehfunktion nicht im Stand erhalten, ermöglicht jedoch das Wachstum.

Auch ist bekannt, daß Mangel an Vitamin A zu Augenmißbildungen führt [1]. Aber nicht nur Vitamin-A-Defizienz, auch ein Überangebot von Vitamin A kann bei Säugetieren in der Frühgravidität zu Mißbildungen führen (für Literaturangaben siehe [2]).

Andererseits sprechen neue Befunde dafür, daß die all-*trans*-Retinsäure bei Wirbeltieren die Wirkung eines Morphogens ausübt. Behandlung der Flügelknospe des Hühnerembryos mit all-*trans*-Retinsäure induziert eine spiegelbildliche Duplikation von Fingerelementen [3]. Das Vitamin-A-De-

rivat imitiert also genau die Duplikation, die entsteht, wenn Mesenchymgewebe aus der hinteren Seite der Gliedmaßenknospe (die sog. Zone polarisierender Aktivität oder ZPA) auf die vordere Seite der Knospe verpflanzt wird. An dieser Stelle entsteht dann eine zusätzliche, spiegelbildliche Gliedmaße [4]. Die Befunde verstärken den Verdacht, daß die Retinsäure das natürlich auftretende Morphogen ist.

Aus der bis jetzt vorliegenden Literatur über die teratogene und Morphogenwirkung von Vitamin A und Retinsäure geht hervor, daß fast alle Versuche an Wirbeltierembryonen durchgeführt wurden. Eine Ausnahme bildet eine Arbeit über den Einfluß von Retinoiden (Retinol, Retinal und Retinsäure) auf die Metamorphose des marinen Hydroids *Hydractinia echinata* [5].

Die oben erwähnten Ergebnisse mit Wirbeltierkeimen, die durchaus schwierig experimentell zu behandeln sind, waren eine Anregung, um die Wirkung von Retinsäure auf Eier von Invertebraten, insbesondere von den zu den Urochordaten (Tunicaten) gehörenden Ascidien, zu studieren. Diese marinen Chordaten, die sozusagen ein Bindeglied zwischen Wirbellosen und Wirbeltieren bilden, leben als Adultform festsitzend, während die Larven freischwimmend sind. Die Typenverwandtschaft zu den übrigen Chordaten, einschließlich der Vertebraten, zeigt sich vor allem im Schwanz der Larven, der von Neuralrohr und Chorda durchzogen

Sonderdruckanforderungen an Prof. J. M. Denucé.

Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, D-7400 Tübingen
0939–5075/91/1100–1094 \$ 01.30/0



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

ist. Bei der Metamorphose der kaulquappenähnlichen Ascidienlarve wird der Schwanz mitsamt dorsalem Nervensystem und Chorda abgebaut.

Als Untersuchungsobjekt wurde die Seescheide *Ciona intestinalis* gewählt. Diese Art schien besonders gute Aussicht zu bieten, teratogene Prozesse aufzuklären, da sich Eier und Larven in großer Anzahl in gleichen Entwicklungsstadien lebend untersuchen lassen.

Ziel dieser Arbeit war es, die morphologischen Veränderungen während der Embryonal- und Larvalentwicklung von *Ciona intestinalis* unter dem Einfluß unterschiedlicher Retinsäure-Konzentrationen zu studieren. Außerdem sollte geklärt werden, wie weit die Larven bei den verschiedenen eingesetzten Retinsäure-Konzentrationen noch in der Lage sind, zu metamorphosieren.

Material und Methoden

Embryonen und Larven

Die Experimente wurden durchgeführt an der Stazione Zoologica in Neapel (Italien).

Exemplare von der Seescheide, *Ciona intestinalis*, einem Zwitter mit getrennten Gonaden, wurden im Golf von Neapel gefangen. Die Experimente fanden in den Monaten Mai und Juni statt, weil in dieser Periode die beste Aussicht auf Eimaterial besteht. Die Kreuzbefruchtung gelang im allgemeinen sehr gut. Für alle Experimente wurde weit von der Küste geholt und nachher filtriertes Seewasser benutzt. Zur Gewinnung der Gameten wurde ein Schnitt durch die Geschlechtsdrüsen gemacht, wonach die Geschlechtszellen herausfließen. Die Spermien wurden in Seewasser suspendiert und mittels einer Pipette zu dem die Eier enthaltenden Seewasser gesetzt. Eine gleichmäßige Suspension der Spermien wurde erreicht durch wiederholtes Hin- und Hergießen des Seewassers zwischen zwei Gefäßen. Um Verunreinigung vorzubeugen, wurde nach Absetzen der Eier am Boden des Gefäßes dekantiert. Derselbe Vorgang wurde dreimal wiederholt. Unter dem Binokular wurde kontrolliert ob alle Eier befruchtet waren. Zeichen einer gelungenen Befruchtung ist die corticale Kontraktion, die dem Ei das Aussehen einer Birne verleiht. Die sich entwickelnden Embryonen

und Larven wurden ohne Zusatz von Antibiotika bei 16 °C und bei 23 °C gehalten. Züchtung bis über die Metamorphose gelang ohne Schwierigkeiten. Zur Identifizierung der Entwicklungsstadien eigneten sich die Normentafel von Whittaker [6] sowie einige Angaben von Berrill [7] über den Entwicklungsablauf.

Lebendbeobachtungen wurden an einem Zeiss-Axiophot-Mikroskop vorgenommen. Für die Mikrophotographie wurden AgfaPan 400 sowie die Farbfilme Kodak EPT 5037 und Kodak ET 160-5077 benutzt. Farbaufnahmen von geschlüpften Larven wurden in einem Leitz-Lesegerät projiziert (Objektiv Leitz Elmar 1:2,8/55 mm). Von den Vorderkörpern der Larven wurden die Konturen zuerst aufgezeichnet und anschließend mit einem MOP-Gerät der Fa. Kontron ausgewertet. Zusätzlich wurden Videoaufnahmen gemacht (Philips Newicon Video 400 camera system, in Kombination mit einem JVC-Stereo-Videorecorder HR-D 755 E). Diese Technik erwies sich als besonders erfolgreich beim Vergleichen der Beweglichkeit geschlüpfter Larven.

Der Nachweis von proteolytischen Enzymen im Schlüpfmedium wurde nach Denucé und Formisano [8] mit Hide Powder Azure (Calbiochem) als Substrat vorgenommen. Die Spaltung des chromogenen Substrats bei pH 8,0, unter Freisetzung einer blauen Farbe, wurde unter dem Mikroskop verfolgt.

Behandlung der Embryonen mit Retinsäure

All-trans-Retinsäure (Janssen Chimica, Beerse, Belgien) wurde zuerst in einer winzigen Menge absoluten Alkohols gelöst und diese Stammlösung anschließend bis zur gewünschten Konzentration (10^{-7} , 10^{-6} und 10^{-5} M) mit Seewasser verdünnt. Die Lösungen wurden unmittelbar vor dem Gebrauch bereitet. Die Embryonen wurden während 20–30 min der Wirkung der gelösten Substanz ausgesetzt, entweder bei 16 °C oder bei 23 °C. Die weitere Entwicklung erfolgte in normalem Seewasser. Die Retinsäure-Behandlung wurde in zwei verschiedenen Entwicklungsstadien vorgenommen, nämlich im Zweizellen-Stadium und im frühen Gastrula-Stadium. Das Resultat der Behandlung wurde unter dem Mikroskop kontrolliert und mikrophotographiert.

Ergebnisse

Folgen der Behandlung für die Gestaltbildung von Larven

Retinsäure erwies sich als besonders wirksam beim Verursachen von Mißbildungen bei *Ciona intestinalis*. Störungen der Formbildung waren besonders ausgesprochen in den Larven. Im Gegensatz dazu zeigten die Entwicklungsstadien bis zur Larve (Furchung, Keimblätterbildung, Neurulation) keinerlei mikroskopisch sichtbaren Abweichungen von der Normogenese.

Werden Keime unmittelbar nach der ersten Teilung in eine 10^{-7} -M-Retinsäure-Lösung gebracht und darin 20 min gelassen, so entstehen beim Schlüpfen Larven mit abnorm gestalteten Ruderschwanz und Vorderkörper (Abb. 1 B). Während bei normalen Larven der Schwanz in Ruhestellung in der Längsachse des Körpers eingestellt ist, kennzeichnet der Schwanz von behandelten Larven sich durch eine oder mehrere scharfe Biegungen, wobei die Krümmung stets ventrad ist. Bei höheren Konzentrationen der Versuchssubstanz

war der Schwanz oft kürzer und breiter als normal (Abb. 1 C, D). Ganz ausgesprochen sind die Abweichungen im Bereich des Vorderkörpers (Kopfrumpf). Im Vergleich zu den Kontroll-Larven erscheint der Vorderkörper von Versuchslarven viel plumper (Abb. 2). Aus einer morphometrischen Bestimmung vom Umfang des Vorderkörpers ergeben sich Werte, die um 30% niedriger liegen als bei den Kontroll-Larven (Abb. 3). Es werden keine Haftpapillen gebildet. Als weitere Folge der Behandlung tritt eine dorsale Ausbuchtung der Wand des Vorderkörpers auf. Der Hohlraum dieser Blase ist ein ebenfalls ausgestülpter Teil des Hohlraumes des Gehirns. Die Anhäufung schwarzen Pigmentes an der Basis dieser Erweiterung deutet auf den Ocellus, eines der drei bisher beschriebenen sensorischen Organe der Ascidienlarven (Abb. 2). Normalerweise entsteht der Ocellus aus einer Verdickung der Hirnbläschenwand, dorsal und rechts von der Sagittalebene. Der Pigmentbecher besteht aus einer U- oder V-förmigen Zelle [9]. Die Pigmentmasse behält mehr oder weniger diese Konkavität bei den behandelten Larven,

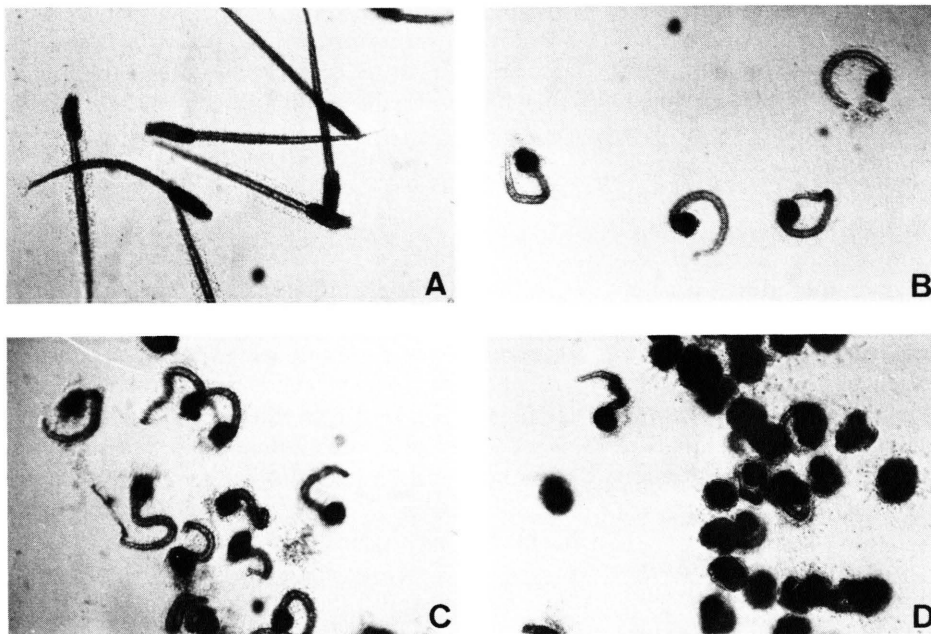


Abb. 1. Wirkung verschiedener Konzentrationen von Retinsäure auf die Entwicklung von *Ciona intestinalis*. Die Keime wurden im 2-Zellen-Stadium während 20 min dem Vitamin-A-Derivat ausgesetzt. (A) Normale Larven aus der gleichen Aufzucht wie die Versuchsindividuen. (B), (C) und (D) Larven nach Behandlung mit 10^{-7} M, 10^{-6} M und 10^{-5} M Retinsäure. Die Zellen, die Vorderkörper und Schwanz wie eine kontinuierliche Schicht umhüllen, sind Testazellen. In (D) sind die meisten Keime nicht geschlüpft. Vergrößerung ca. $53\times$.

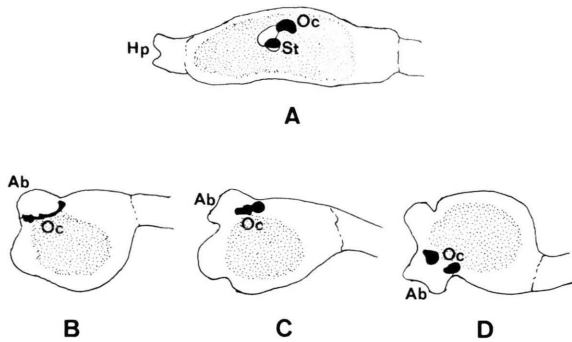


Abb. 2. Strichzeichnungen von Vorderkörpern von *Ciona-intestinalis*-Larven. Vorn ist in allen Zeichnungen links, hinten (Anschluß zum Schwanz) liegt rechts. (A) Vorderkörper einer Kontroll-Larve; (B), (C) und (D) Vorderkörper von Larven die im Frühgastrula-Stadium einer 10^{-6} -M-Retinsäurelösung ausgesetzt waren. Nur die Kontroll-Larve ist im Besitz von Haftpapillen (Hp) und von Ocellus (Oc) und Statocyste (St). In den behandelten Larven (B, C und D) liegt das abnorm strukturierte Pigment des Ocellus (Oc) an der Basis der dorsalen Ausbuchtung (Ab). Die Larve in (D) liegt um 180° um ihre Körperachse gedreht. Vergrößerung ca. 400 \times .

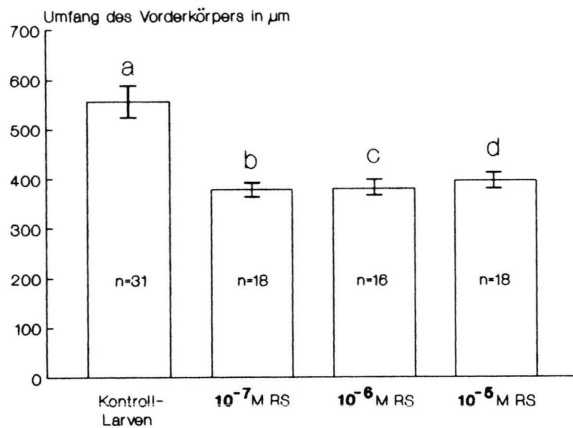


Abb. 3. Einfluß von verschiedenen Retinsäure(RS)-Konzentrationen auf die Größe des Vorderkörpers. Für die Meßwerte einer Gruppe wurden jeweils das arithmetische Mittel und die Standardabweichung berechnet. Die Signifikanz der Differenz zweier Mittelwerte wurde mit dem *t*-Test bestimmt. Bei allen Versuchsgruppen war im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen der mittlere Umfang des Vorderkörpers signifikant herabgesetzt ($P < 0,01$); (b) ist nicht verschieden von (c) ($P > 0,5$), aber die Differenz zwischen (b) und (d) ist signifikant ($P < 0,01$). Das gleiche gilt für (c) und (d) ($P < 0,02$).

trotz der Verlagerung an der Basis der Ausstülpung. Aber es treten auch einzelne Melaninklumpchen auf. Die Statocyste fehlt bei diesen Larven. Die Häufigkeit der blasenförmigen Erweiterung des Hirnbläschens vermindert sich mit zunehmender Retinsäurekonzentration: bei 10^{-7} M ist sie 94%, bei 10^{-6} M 50% und bei 10^{-5} M nur noch 11%. Andererseits ist der Grad der Retinsäurewirkung unabhängig von dem Zeitpunkt des Einsetzens der Behandlung (2-Zellen-Stadium oder Frühgastrula), von ihrer Dauer und von unterschiedlichen Zuchttemperaturen (16°C oder 23°C). Erwartungsgemäß verläuft die Entwicklung von Furchung bis zum Schlüpfen viel schneller bei 23°C als bei 16°C , aber dies gilt sowohl für Kontrollen als auch für behandelte Keime.

Schlüpftermin

Embryonen, die mit 10^{-7} M Retinsäure behandelt wurden, schlüpfen ungefähr um die gleiche Zeit wie die Kontrollen. Eine halbe bis eine Stunde später schlüpfen die Embryonen des 10^{-6} -M-Versuchsansatzes. Die 10^{-5} -M-Gruppe schließlich schlüpfte 1–2 Stunden verspätet. Im letzteren Fall waren die Larven oft nicht imstande, sich ganz von dem Chorion zu befreien (partiell Schlüpfen) (Abb. 1 D).

Metamorphose

In der Regel fängt bei Kontroll-Larven die Metamorphose schon ca. 18 h nach dem Schlüpfen an. Dagegen wurde bei den behandelten Larven nie eine Metamorphose beobachtet. Dennoch gab es unter diesen Larven solche mit glasheller Schwanzspitze, unter normalen Umständen ein Zeichen für eine bevorstehende Metamorphose. Die Beweglichkeit von behandelten Larven ist auf unregelmäßige zuckende Bewegungen reduziert, die aber nicht zu wirklichen Lageveränderungen führen. Auch fehlen die Rotationsbewegungen rund um die Körperachse, die bei normalen Larven der Metamorphose vorangehen. Die Lebensfähigkeit von behandelten Larven ist übrigens beschränkt: Die meisten Larven sterben schon am Ende des Schlüpftages, am zweiten Tage sind alle tot. Larven aus einer Zucht, die 10^{-5} M Retinsäure ausgesetzt waren, gehen zuerst ein.

Proteasen im Zuchtmedium

Nach dem Schlüpfen konnte in der Kulturflüssigkeit (Seewasser) sowohl von Kontroll-Larven als auch von behandelten Larven proteolytische Aktivität nachgewiesen werden. Aller Wahrscheinlichkeit nach geht es hier um eine Schlüpfprotease [10, 11] und nicht um eine an der Metamorphose beteiligten Protease, weil zur Zeit der Probenahme von Metamorphose noch keine Spur zu erkennen war und außerdem die behandelten Larven nie metamorphosierten.

Diskussion

Die Larve von *Ciona intestinalis* ist eine typische rekapitulative Spätlarve (Sekundärlarve), die eine regressive Metamorphose vollzieht [12]. Ähnlich wie bei Kaulquappen wird der Schwanz resorbiert, es überlebt nur der Vorderkörper. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß Retinsäure schon bei 10^{-7} M teratogene Wirkung hat. Diese manifestiert sich ganz deutlich gegen Ende der embryonalen Entwicklung. Eine bestimmte sensible Phase läßt sich nicht nachweisen, da Schädigungen sowohl nach Behandlung mit der Versuchssubstanz nach der ersten Furchung als auch im Gastrulastadium auftraten. Die Hauptmißbildungsarten, die mit Hilfe von Retinsäurezusätzen zum Seewasser ausgelöst wurden, sind Schwanzdeformationen und Vorderkörpermißbildungen. Bei 10^{-7} M war die Häufigkeit der Mißbildungen nahezu 100%. Die Larven waren nicht in der Lage, die scharfe Krümmung des Schwanzes nach bestimmter Zeit auszugleichen. Ein Fall abnormer Biegung des Schwanzes der Kaulquappenlarve von *Ascidella aspersa* wurde von Berrill [13] auf ungleiches Wachstum des Schwanzektoderms zurückgeführt. Obwohl dieser Mechanismus bei *Ciona intestinalis* nicht auszuschließen ist, ist jedoch sicher, daß im abnormen Schwanz die Muskelzellen, die Chorda dorsalis sowie das Neuralrohr genauso vorhanden sind wie im Schwanz der Kontroll-Larven. In einigen Fällen wurde das Schwanzende vollkommen durchsichtig. Außer der umhüllenden Tunica verfallen die inneren Gewebe der Histolyse, einem Vorgang, der mit dem Abbau von Larvalorganen der Kontroll-Larven vergleichbar ist. Dennoch trat bei den behandelten Larven nie eine Metamorphose auf. Es ist durchaus möglich, daß das Fehlen von Haftpapillen an der Vorderseite von be-

handelten Larven die Ursache für das Ausbleiben der Metamorphose ist. Bekanntlich sezernieren diese Papillen Adhäsionsstoffe, welche die Fixierung der Larven an einem festen Substrat ermöglichen. Es soll aber darauf hingewiesen werden, daß Metamorphose auch ohne vorangehende Fixierung möglich ist [14, 15]. Wie auf Videoaufnahmen ersichtlich war, konnten nach einigen Stunden die scharfen Biegungen des Schwanzes mehr oder weniger rückgängig gemacht werden, aber der Schwanz blieb immerhin gebogen. Schwanzdeformationen treten auch auf, wenn *Ciona*-Eier eine Stunde lang mit 10^{-4} M 5-Azacytidin, einem kräftigen Hemmstoff der DNS-Methylierung, behandelt werden [16]. Die Biegungen sind jedoch weniger scharf als bei mit Retinsäure behandelten Larven. Außerdem verursachte das Cytidinanalog einige Ausfallserscheinungen (Fehlen von pigmentierten Sinnesorganen und von Haftpapillen), welche in den Retinsäure-Experimenten auch beobachtet wurden.

Während Kontroll-Larven nach dem Schlüpfen einen schlanken Vorderkörper aufweisen, war dieser Körperteil bei behandelten Larven ausgesprochen plump. Bemerkenswert ist, daß auch bei Kontroll-Larven kurz nach dem Ausschlüpfen der Vorderkörper mehr oder weniger eiförmig ist. Eine Streckung findet erst nach etwa fünf Minuten statt. Bei behandelten Larven bleibt jedoch der plumpe Aspekt des Vorderkörpers behalten, und dieser Körperteil erreicht nur etwa 70% des Umfanges eines Kontrollvorderkörpers. Eine dorsale blasenförmige Erweiterung des Vorderkörpers trat fast hundertprozentig nach Behandlung mit 10^{-7} M Retinsäure auf. Die Frequenz der Ausbuchtungen nimmt mit steigender Dosis des Vitamin-A-Derivats ab. Schwarze Pigmentanhäufungen an der Basis dieser Bläschen deuten auf die Anwesenheit des Ocellus, ein für die Ascidienlarven charakteristisches Sinnesorgan. Da dieses Organ aus der Wand des Gehirnbläschens entsteht [17, 18], darf geschlossen werden, daß Nervengewebe an der blasenförmigen Erweiterung des Vorderkörpers beteiligt ist. Eine ähnliche Situation, ebenfalls mit Ektopie der pigmentierten Sinnesorgane, wurde bei *Ascidella aspersa* beschrieben [13]. In diesem Fall wurde jedoch die Metamorphose nicht beeinträchtigt. Reverberi und Ortolani [19] erwähnen den Verlust von einem der beiden schwarzen Pigmentkörperchen nach äquatorialer Sektion des

Eies von *Ascidia malaca*. In der vorliegenden Arbeit nahm die Pigmentmasse in dem abnormen Vorderkörper von *Ciona* verschiedene Formen an. Oft erschien das Pigment als eine halbkreisförmige Linie mit Anschwellungen an beiden Enden (Abb. 2B) oder als grobe, voneinander getrennte Körner (Abb. 2D). Daß es sich um Melanin der Pigmentkuppe des Ocellus handelt, läßt sich aus der dorsalen Lage der Melaningebilde sowie aus der stark an der U-Form der Normallarven erinnernden Einbuchtung schließen. In keinem einzigen Fall wurde in behandelten Larven eine Statocyste beobachtet. Die sich im Hirnvesikel befindlichen Sinnesorgane werden also in verschiedenem Maße durch exogene Retinsäure beeinflusst. Es sieht ganz danach aus, daß die Melanophoren der Statocyste nicht imstande sind das schwarze Pigment zu bilden, während die Pigmentkuppe des Ocellus einige Stunden später ganz entschieden Melanin produziert. Andererseits ist nicht auszuschließen, daß Retinsäure die Entstehung von Statocysten unterbindet.

Im Schlüpfmedium von Kontrollen und behandelten Larven konnte proteolytische Aktivität nachgewiesen werden. Es ist naheliegend, daraus auf das Vorkommen eines Schlüpfenzyms zu schließen. Die Annahme, daß es sich um bei der Histolyse beteiligte Proteasen handelt, scheint angesichts der fehlenden Metamorphose der behandelten Larven unbegründet.

Die vorliegenden Untersuchungen haben gezeigt, daß von exogener Retinsäure eine Hemmwirkung auf die Metamorphose ausgeht. Schon sehr lange hat man nach den die Metamorphose induzierenden Faktor gesucht. Verschiedene Substanzen, z. B. Schwermetalle, Farbstoffe, Ca^{2+} , Na^+ , I^- , Strychnin sowie Umwelteinflüsse (z. B. Hell-dunkel-Wechsel), und „crowding“ wirken bei einigen Ascidien-Arten metamorphosestimulierend (für eine Übersicht siehe [20]). Auch Extrakte von Larven und Adulten beschleunigen die Metamorphose von einigen Arten [21–23]. Nach den Erkenntnissen über den Einfluß des Schilddrüsenhormons Thyroxin auf die Metamorphose bei Amphibien hat man sich auch bei den Ascidien die Frage gestellt, ob vielleicht bei dieser Tiergruppe ebenfalls Thyroxin die Metamorphose bestimmt. Experimente an *Ascidia malaca* scheinen zugunsten einer Rolle von Thyroxin bei der Metamorphose zu

sprechen [24]. Verabreichung von L-Thyroxin beschleunigt den Anfang der Metamorphose bei dieser Art. Es wird die eventuelle Rolle von sog. „button cells“, die im ventralen Hämocoel vorkommen, bei der Produktion eines thyroxinartigen Moleküls beschrieben. Bekanntlich sind die Ascidien befähigt, das Jod des Seewassers anzureichern und in Thyroxinmoleküle einzubauen. Die selektive Bindung von Jod findet im sog. Endostyl (Hypobranchialrinne) statt, wie von Thorpe und Thorndyke [25] in Adulten von *Ciona intestinalis* nachgewiesen werden konnte. Der Endostyl wurde deshalb mit der Schilddrüse der Wirbeltiere homologisiert. Während also ein Einfluß von Schilddrüsenhormon auf die Metamorphose der Ascidien-Larven nicht zu leugnen ist, spricht gegen die Annahme einer natürlichen Rolle von Thyroxin in diesem Prozeß, daß der Endostyl seine Differenzierung erst kurz vor der Metamorphose vollzogen hat. Bisher liefern die Beschreibungen der larvalen Organe nicht den Beweis, daß der Endostyl irgendwelche regulierende Funktion bei der Metamorphose erfüllt [26]. Auch die Neuraldrüse, die oft mit der Hypophyse der Wirbeltiere verglichen wird, tritt erst während oder nach der Metamorphose auf [27]. Aber auch wenn man irgendwelche hypophysenartige Aktivität ablehnt, ist nicht auszuschließen, daß das Hirnbläschen der Larve eine Vermittlungsrolle zwischen der Umwelt und den Metamorphoseprozessen spielt [26].

Von Retinsäure ist der nukleare Rezeptor bekannt. Erstaunlicherweise gehört dieser Rezeptor zur Superfamilie von Hormon-Rezeptoren, die sich an DNS binden [28, 29]. Obwohl Vitamin A nicht in einer endokrinen Drüse produziert wird, ist dieser Wirkstoff einem Hormon ähnlich [30]. Durch seine funktionell aktive Form, die Retinsäure, ist es imstande, die Transkription eigener Gene sowie fremder Gene, z. B. des Wachstums- und des Schilddrüsenhormons, entweder zu aktivieren oder zu bremsen. Eine Bremsung des bislang unbekannten Ascidien-Metamorphosehormons würde die Hemmung der Kaulquappen-Metamorphose herbeiführen. Da nukleare Rezeptoren für Retinsäure noch nicht bei Ascidien-embryonen nachgewiesen wurden, bleibt der oben geschilderte Wirkungsmechanismus der Retinsäure bei der Metamorphose noch sehr spekulativ.

Dank

Meinen neapolitanischen Kollegen Dr. A. D'Aniello, Dr. A. de Santis sowie Frl. L. Padula möchte ich für ihre Gastfreundschaft und Unterstützung ganz besonders danken. Frl. W. Paulij danke ich für die Vorbereitung der Graphik und

Frau E. A. J. Derksen für die Ausführung des Manuskriptes. Der Königliche Akademie der Wissenschaften zu Brüssel, Belgien, sei für die Genehmigung zur Benutzung des belgischen Arbeitstisches an der Zoologischen Station (Neapel) gedankt.

- [1] F. Hale, Am. J. Ophth. **18**, 1087 (1935).
- [2] K. A. Rosenbauer, Entwicklung, Wachstum, Mißbildungen und Altern bei Mensch und Tier, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 1969.
- [3] C. Thaller und G. Eichele, Nature **327**, 625 (1987).
- [4] J. W. Saunders und M. T. Gasseling, in: Epithelial-Mesenchymal Interactions (R. Fleischmajer und R. E. Billingham, Hrsg.), p. 78, Williams and Wilkins, Baltimore 1968.
- [5] W. A. Müller, J. Embryol. Exp. Morphol. **81**, 253 (1984).
- [6] J. R. Whittaker, J. Exp. Zool. **202**, 139 (1977).
- [7] N. J. Berrill, Phil. Trans. Roy. Soc. London, Ser. **B225**, 255 (1935).
- [8] J. M. Denucé und A. Formisano, Arch. Int. Physiol. Biochim. **90**, 185 (1982).
- [9] R. M. Eakin und A. Kuda, Z. Zellforsch. **112**, 287 (1971).
- [10] S. Caggegi, A. Flugy, E. Puccia und G. Reverberi, Atti Accad. Naz. Lincei Rend. Cl. Sci. Fis. Mat. Nat. **56**, 803 (1974).
- [11] J. M. Denucé, Arch. Int. Physiol. Biochim. **83**, 958 (1975).
- [12] P. Fioroni, Allgemeine und Vergleichende Embryologie der Tiere, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1987.
- [13] N. J. Berrill, Phil. Trans. Roy. Soc. London, Ser. **B219**, 281 (1931).
- [14] R. A. Cloney, in: Settlement and Metamorphosis of Marine Invertebrate Larvae (F. S. Chia und M. E. Rice, Hrsg.), p. 255, Elsevier, New York 1978.
- [15] R. A. Cloney, Amer. Zool. **22**, 817 (1982).
- [16] E. Puccia und A. Maiorca, Acta Embryol. Morphol. Exper. n. s. **8**, 307 (1987).
- [17] P. P. Grassé, Traité de Zoologie, XI (Echinodermes – Stomocordés – Procordés), Masson et Cie., Paris 1948.
- [18] H. Ohtsuka, Zool. Sci. **7**, 739 (1990).
- [19] G. Reverberi und G. Ortolani, Devel. Biol. **5**, 84 (1962).
- [20] W. F. Lynch, Amer. Zool. **1**, 59 (1961).
- [21] C. Grave, Carnegie Inst. Washington Publ. **452**, 209 (1935).
- [22] C. Grave und P. A. Nicoll, Carnegie Inst. Washington Publ. **517**, 1 (1939).
- [23] I. Svane, J. N. Havenhand und A. J. Jörgensen, J. Exp. Mar. Biol. Ecol. **110**, 171 (1987).
- [24] E. Patricolo, G. Ortolani und A. Cascio, Cell Tissue Res. **214**, 289 (1981).
- [25] A. Thorpe und M. C. Thorndyke, Symp. zool. soc. Lond. **36**, 159 (1975).
- [26] E. Barrington, in: Metamorphosis (W. Etkin und L. I. Gilbert, Hrsg.), Appleton-Century-Crofts, New York 1968.
- [27] D. Georges, La Cellule **74**, 161 (1987).
- [28] V. Giguère, E. S. Ong, P. Segui und R. M. Evans, Nature **330**, 624 (1987).
- [29] M. Petkovich, N. J. Brand, A. Krust und P. Chambon, Nature **330**, 444 (1987).
- [30] G. Wolf, J. Nutr. Biochem. **1**, 284 (1990).