

Dissertation
der Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität
München



Transgene Zebrafischmodelle zur Charakterisierung der
Rolle der Astrozyten in der Entwicklung des
Nervensystems und in der Leukodystrophie *Alexander*
disease (AXD)

vorgelegt von

Katharina Stahl

27. Mai 2010

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 2006 bis Dezember 2009 am Deutschen Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen (DZNE) am Adolf Butenandt Institut der Ludwig-Maximilians Universität München unter der Betreuung von Dr. Christian Brösamle durchgeführt.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation eigenständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe. Ich habe weder anderweitig versucht, eine Dissertation einzureichen oder eine Doktorprüfung durchzuführen, noch habe ich diese Dissertation oder Teile davon einer anderen Prüfungskommission vorgelegt.

München, den 27.05.2010

Katharina Stahl

Promotionsgesuch eingereicht am	27.Mai 2010
Datum der mündlichen Prüfung	07.Oktober 2010
1. Gutachter:	Prof. Dr. George Boyan
2. Gutachter:	PD Dr. Mario Wullimann

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.2 Zelltypen des Nervensystems	8
1.2.1 Die Neurone	10
1.2.2 Gliazellen	11
1.2.2.1 Mikroglia	11
1.2.2.2 Makroglia	12
1.2.2.2.1 Oligodendrozyten und Schwann´sche Zellen	12
1.2.2.2.2 Astrozyten	13
1.3 Das Astrozytenprotein GFAP und sein Aufbau	14
1.3.1 Aufbau des Intermediärfilaments	14
1.3.2 <i>Alexander disease</i> (AXD) und krankheits-assoziierte Mutationen im <i>gfap</i> -Gen	16
1.3.3 GFAP im Zebrafisch	20
1.3.4 Der Zebrafisch <i>gfap</i> -Promotor	21
1.4 Experimentelle Ansätze zur Untersuchung der Astrozyten	22
1.4.1 Ablation von Astrozyten	22
1.4.2 Transgene Expression von GFAP	24
1.5 Zebrafisch als Modellorganismus	25
1.5.1 Vorteile des Zebrafischs als Modellorganismus	25
1.5.2 Das Nervensystem des Zebrafischs	26
2. Zielsetzung der Arbeit	27
3. Material und Methoden	28
3.1 Material	28
3.1.1 Zebrafischlinien	28
3.1.2 Vektoren und Plasmide	28
3.1.3 Bakterienstämme	29
3.1.4 Zelllinien	29
3.1.5 Enzyme und Chemikalien	29
3.1.6 Puffer und Lösungen	31
3.1.7 Medien	33
3.1.8 Oligonukleotide	34
3.1.9 Antikörper	35
3.1.10 Kits	37
3.1.11 Verbrauchsmittel und Geräte	37
3.2 Methoden	40

Inhaltsverzeichnis

3.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	40
3.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	40
3.2.1.2 Schneiden von DNA mittels Restriktionsendonukleasen.....	40
3.2.1.3 Dephosphorylierung	41
3.2.1.4 Ligation von DNA-Fragmenten	41
3.2.1.5 Herstellung transformations-kompetenter DH5 α Zellen	41
3.2.1.6 Transformation in kompetente Zellen	42
3.2.1.7 Herstellen von Glycerinkulturen.....	42
3.2.1.8 Präparation von Plasmid-DNA.....	42
3.2.1.9 Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel	42
3.2.1.10 Isolation von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel	43
3.2.1.11 Sequenzierung von DNA	43
3.2.1.12 Gateway® Klonierung.....	43
3.2.2 Fischarbeit.....	43
3.2.2.1 Aufzucht und Haltung der Zebrafische (Danio rerio)	43
3.2.2.2 Herstellen von Injektionsplatten und -nadeln.....	44
3.2.2.3 Injektion von DNA zur Herstellung transgener Zebrafischlinien	44
3.2.2.4 Genotypisierung durch Fin Clips	45
3.2.2.5 Präparation von Gehirn und Rückenmark aus adulten Fischen	45
3.2.3 Immunhistochemische Methoden	46
3.2.3.1 „Whole-mount“ Immunhistochemie.....	46
3.2.3.2 Einbetten von Zebrafischlarven/ -gewebe für Gefrierschnitte.....	47
3.2.3.3 Immunhistochemische Analyse von Gefrierschnitten.....	47
3.2.4 Zellkultur.....	47
3.2.4.1 Kultivierung von HEK 293T Zellen.....	47
3.2.4.2 Beschichtung von Deckgläschen mit Poly-L-Lysin (PLL)	48
3.2.4.3 Transiente Transfektion von DNA in HEK 293T Zellen	48
3.2.5 Biochemische Methoden.....	48
3.2.5.1 Lyse von kultivierten, transfizierten Zellen.....	48
3.2.5.2 Lyse von Fischlarven.....	49
3.2.5.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	49
3.2.5.4 Western Blot	50
3.2.5.5 „Strippen“ von Western Blot Membranen	51
4. Ergebnisse	52
4.1 Ablation von Astrozyten	52
4.1.1 Konstrukte zur Etablierung der induzierbaren Fischlinien.....	52

Inhaltsverzeichnis

4.1.1.1 Das hitze-induzierbare Cre-Rekombinase Konstrukt	52
4.1.1.2 Cre-Rekombinase-induzierbares Diphtherietoxin A Konstrukt	53
4.1.1.3 Zweifach transgene Fischlinien	54
4.1.2 Die hitze-induzierbare Cre-Rekombinase	56
4.1.2.1 Herstellung der hitze-induzierbaren Fischlinie.....	56
4.1.2.2 Funktioneller Test der Cre-Rekombinase Aktivität nach Hitzeinduktion	58
4.1.3 Cre-Rekombinase-induzierbares Diphtherietoxin A (DTA)	60
4.1.4 Ablation von Astrozyten in doppeltransgenen Fischen	61
4.1.4.1 Vererbung der einzelnen Konstrukte in doppeltransgenen Embryonen	62
4.1.4.2 Nachweis der erfolgreichen Rekombination	64
4.1.4.3 Deformationen nach Ablation der Astrozyten	67
4.1.4.4 Immunhistochemische Analyse der deformierten Embryonen	69
4.1.4.5 Analyse der Embryonen mittels Acridin Orange als Zelltodmarker	70
4.1.4.6 Variabilität der Effizienz der Astrozyten-Ablation.....	73
4.2 GFAP-Aggregation als zellulärer Stressfaktor in einem Zebrafischmodell für <i>Alexander disease</i> (AXD).....	74
4.2.1 Konstrukte zur Herstellung der transgenen Zebrafischlinien	74
4.2.1.1 Das „Driver“-Konstrukt.....	75
4.2.1.2 Die gfap “Responder“-Konstrukte	76
4.2.1.2.1 UAS-GFP gfapR251H.....	76
4.2.1.2.2 UAS-GFPgfap wt	77
4.2.1.2.3 DsRed-UAS-gfapR251H	77
4.2.2 Test der <i>Responder</i> -Konstrukte in Zellkultur.....	79
4.2.3 Lebendbeobachtung der transgenen Zebrafischlarven.....	80
4.2.4 Dynamik der Aggregate in der lebenden Larve.....	84
4.2.4.1 Entstehung der GFAP-Aggregate.....	84
4.2.4.2 Abbaumechanismen der Aggregate	86
4.2.5 Immunhistochemische Untersuchungen der transgenen Zebrafischlinien.....	87
4.2.5.1 Immunhistochemische Untersuchung an der ganzen Larve	88
4.2.5.1.1 „ <i>Whole-mount</i> “ Färbungen gegen GFAP	88
4.2.5.1.2 „ <i>Whole-mount</i> “ Färbung gegen HuC.....	89
4.2.5.2 Färbungen auf Gefrierschnitten	90
4.2.5.2.1 Färbung gegen GFAP	91
4.2.5.2.2 Färbung gegen HuC	94
4.2.6 Biochemische Untersuchung der Aggregate.....	96
4.2.7 Elektronenmikroskopische Untersuchung der Aggregate	99

Inhaltsverzeichnis

4.2.7.1 Analyse der Semidünnschnitte	99
4.2.7.2 Elektronenmikroskopische Analyse der Ultradünnschnitte.....	102
5. Diskussion	105
5.1 Die Astrozyten und ihre Rolle im Nervensystem	106
5.2 Der Zebrafisch <i>gfap</i> Promotor	107
5.3 Die hitze-induzierte genetische Ablation von Astrozyten.....	108
5.3.1 Einfach-transgene Zebrafischlinien.....	108
5.3.2 Doppel-transgene Embryonen	110
5.4 Transgene Expression krankheits-assoziiertes Mutationen im zf GFAP.....	111
5.5 Untersuchung der Astrozyten am Modellorganismus Zebrafisch	114
5.6 Ausblick	115
6. Zusammenfassung.....	117
7. Summary	119
8. Literatur	120
9. Anhang	124
9.1 Abkürzungsverzeichnis.....	124
9.2 Abbildungsverzeichnis	126
9.3 Tabellenverzeichnis	127
Lebenslauf	128
Danksagung.....	130

1. Einleitung

1.1 Das Nervensystem

Das Nervensystem (lat.: Systema nervosum) bezeichnet die Gesamtheit aller Nerven- und Gliazellen eines Organismus. Es sichert die Funktion der überlebenswichtigen Organe. Außerdem ist es verantwortlich für die Wahrnehmung der Umwelt und koordiniert Reaktionen auf Veränderungen im Umfeld (Kandel, 2000). Bei niederen Metazoen ist das Nervensystem einfach organisiert. Es gibt Neurone, die Nervennetze ausbilden und einfache Prozesse steuern können (Wehner, 1995). In der evolutionären Weiterentwicklung findet man bereits bei bilateralsymmetrischen Plathelminthen Anhäufungen von Nervenzellkörpern in so genannten Ganglien, die als Gehirn der jeweiligen Organismen interpretiert werden können. Die Nervenstränge erstrecken sich dann von den Ganglien aus entlang des gesamten Körpers des Lebewesens und koordinieren dessen Bewegungen (Wehner, 1995). Bei den Cephalopoden, den Arthropoden und den Vertebraten als höchste Vertreter der Metazoen ist das Nervensystem komplexer aufgebaut und unterteilt in das zentrale Nervensystem (ZNS) und das periphere Nervensystem (PNS). Das ZNS besteht bei Vertebraten aus dem Gehirn und dem Rückenmark und ist mit seinen afferenten Fasern (aus der Peripherie zum Gehirn / Rückenmark) hauptsächlich zuständig für die Ausführung schneller Bewegungen (Reflexe) sowie für die Verarbeitung der Reize, die das Lebewesen aus seiner Umwelt aufnimmt. Weiterhin unterliegt die motorische Koordination der Kontrolle des ZNS. Zudem werden alle Abläufe, die die lebenswichtigen Funktionen koordinieren, wie zum Beispiel die Atmung oder auch die Verdauung und der Hormonhaushalt, vom ZNS gesteuert. Als PNS bezeichnet man die Fasern, die das Rückenmark verlassen und die Zielorgane innervieren. Diese so genannten efferenten Fasern sind verantwortlich für die Ausführung willentlich durchgeführter Bewegungen und erstrecken sich oft über lange Distanzen. Weiterhin gehören Fasern, die von der Peripherie über die Dorsalwurzelganglien (DRG = dorsal root ganglia) in das ZNS projizieren, zum PNS. Diese so genannten Afferenzen (z.B. Ia- oder IIa-Afferenzen) leiten zum Beispiel Signale von den Muskelspindeln über die DRGs in das ZNS. Das perfekte Zusammenspiel aller Zelltypen im Nervensystem sichert eine exakte Übertragung der Reize und damit die Funktion des Nervensystems. Ist eine Komponente von Geburt an fehlerhaft, kann es zu (Entwicklungs-) Defekten wie beispielsweise *Alexander*

disease (AXD) kommen. Bei dieser Erkrankung liegt eine Mutation im Gen eines Zytoskelettproteins der Astrozyten (*gfap* = glial fibrillary acidic protein) vor (siehe 1.3.2). Nach Verletzungen (z.B. Schlaganfall, Unfall mit Schädigung am Nervensystem) oder vererbten Veränderungen in Proteinen des Nervensystems können ebenfalls Erkrankungen auftreten, die auf ein verändertes Zusammenspiel der Zelltypen zurückzuführen sind.

1.2 Zelltypen des Nervensystems

Im Nervensystem gibt es verschiedene Zelltypen, denen unterschiedliche Aufgaben zuteilwerden. Im Nervensystem des Menschen findet man etwa 10^{11} Neurone und deutlich mehr Gliazellen (Kandel, 2000). Diese Zellen kommunizieren und interagieren auf unterschiedliche Weisen miteinander, um die Funktion des Nervensystems zu garantieren (Abbildung 1).

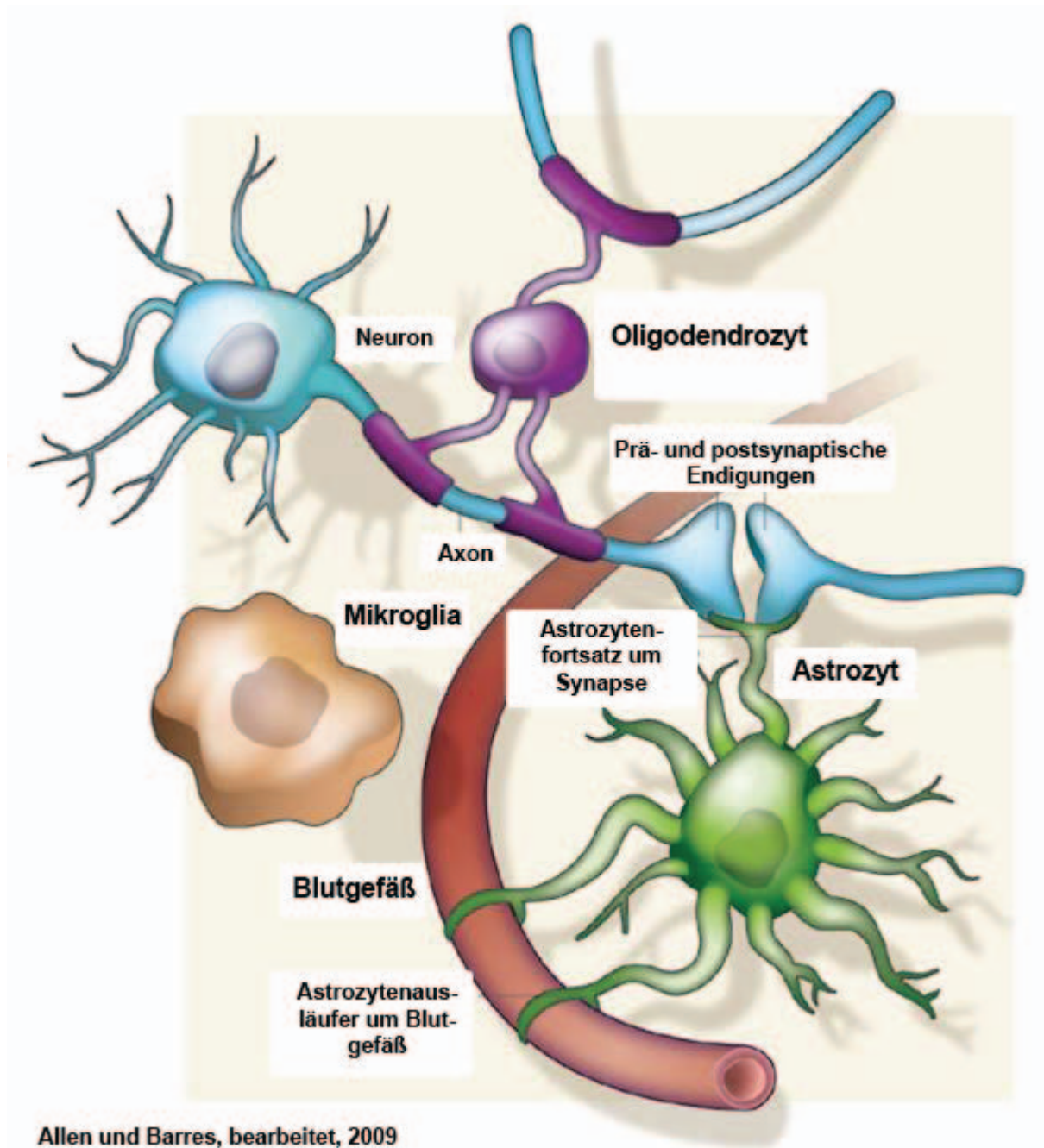


Abbildung 1: Zellen des zentralen Nervensystems

Im Nervensystem von Vertebraten findet man die Neurone als Signalüberträger. Gliazellen übernehmen unterschiedliche Aufgaben: Mikrogliazellen stellen die immunkompetenten Zellen des Nervensystems dar, Oligodendrozyten sind für die Bildung der Myelinschicht im ZNS verantwortlich. Im PNS wird diese Aufgabe von Schwann'schen Zellen übernommen. Die Astrozyten haben eine Vielzahl an Aufgaben. Sie sind beteiligt an der Bildung der Blut-Hirn-Schranke sowie an der Versorgung der Neurone mit Nährstoffen. Während der Entwicklung stellen sie Leitstrukturen dar, an denen Neurone zu ihren Zielen hin wandern.
Abbildung aus (Allen and Barres, 2009), bearbeitet.

1.2.1 Die Neurone

Die Neurone sind die eigentlichen Signalüberträger des Nervensystems. Ein Neuron besteht aus einem Zellkörper, einem Axon, das den Zellkörper am so genannten Axonhügel verlässt, sowie Dendriten, über die Kontakte zu weiteren Neuronen bestehen. Man klassifiziert die Neurone nach der Anzahl ihrer Fortsätze, die sich direkt vom Zellkörper erstrecken. So findet man unipolare Neurone, zum Beispiel dorsale Wurzelganglien (DRG), die nur einen Fortsatz haben. Bipolare Neurone besitzen je ein Axon und einen Dendriten mit direktem Kontakt zum Zellkörper. Bei multipolaren Neuronen findet man ein Axon sowie viele direkt vom Zellkörper abzweigende Dendriten (Kandel, 2000). Bei den Neuronen unterscheidet man weiterhin je nach ihrer Funktion zwischen sensorischen und motorischen Neuronen. Die sensorischen Neurone werden auch als Afferenzen bezeichnet, die die Reize aus der Umwelt von der Peripherie in zentrale Regionen des Nervensystems weiterleiten. Die Motoneurone, die man auch Efferenzen nennt, verlassen das Rückenmark an unterschiedlichen Stellen, entsprechend der Lage ihrer Effektoren, z.B. Muskeln oder Drüsen. Motoneurone, die die Armmuskulatur innervieren, verlassen das Rückenmark zum Beispiel in eher rostralen Regionen. Efferenzen, die für die Signalübertragung in die Beine verantwortlich sind, treten dagegen eher in distalen Regionen aus dem Rückenmark. Die Signalübertragung im Nervensystem erfolgt über die Depolarisation der Nervenzellmembran. Eine Depolarisation wird durch Ionenflüsse über die Membran und die damit einhergehende Ladungsverschiebung verursacht. Die initiale Depolarisation erfolgt dabei über Neurotransmitter. Die Depolarisation kann sich dann durch Depolarisation der benachbarten Membranen von Zelle zu Zelle auch über längere Distanzen ausbreiten. In höheren Vertebraten sind die Nervenfasern von einer isolierenden Myelinschicht umgeben. Diese Schicht ist an den so genannten Ranvier'schen Schnürringen in regelmäßigen Abständen unterbrochen und nur dort kann eine Depolarisation der axonalen Membran stattfinden. Diese so genannte saltatorische Reizleitung sichert die Depolarisation und damit auch die Kommunikation über längere Strecken. Dadurch wird sowohl eine schnelle Verständigung als auch eine schnelle Reaktion auf Umweltreize gewährleistet, wodurch wiederum das Überleben des Organismus, zum Beispiel bei Fluchtreaktionen, gesichert wird.

1.2.2 Gliazellen

Obwohl die Neurone die Überträger der Reize im Nervensystem sind, findet man etwa zehn- bis fünfzigmal mehr Gliazellen als Neurone (Kandel, 2000). Lange Zeit betrachtete man Gliazellen vor allem als das Bindegewebe des Nervensystems mit schützender und unterstützender Funktion. So sind Gliazellen sowohl am strukturellen Aufbau während der Entwicklung als Leitstrukturen für auswachsende Neurone beteiligt und dienen auch als Isolation der Neurone (Kandel, 2000). Der Name der Gliazellen wurde von ihrem Entdecker Rudolf Virchow Mitte des 19. Jahrhunderts aufgrund der damals angenommenen Funktionen als Bindegewebe in Anlehnung an das griechische Wort für Leim (*glia*) geprägt. Mittlerweile weiß man jedoch, dass Gliazellen nicht ausschließlich unterstützende Aufgaben haben. Vor allem Astrozyten (siehe 1.2.2.2) rückten in den letzten 20 Jahren mehr und mehr in den Vordergrund der Forschung (Rossi and Volterra, 2009). So weiß man heute, dass diese Zellen mit anderen Zelltypen, v.a. Neuronen, kommunizieren und so zur Plastizität der neuronalen Schaltkreise beitragen (Rossi and Volterra, 2009). Man unterteilt die Gliazellen in „Mikroglia“ und „Makroglia“.

1.2.2.1 Mikroglia

Als Mikroglia bezeichnet man immunkompetente Gliazellen, die im Gehirn - ähnlich wie Makrophagen in der allgemeinen Immunantwort - für die Immunreaktion verantwortlich sind (Kandel, 2000). Diese Zellen sind nicht nur funktionell den Makrophagen sehr ähnlich, sondern gehen auch entwicklungsbiologisch auf den gleichen Ursprung zurück. Mikrogliazellen haben also im Nervensystem eine besondere Stellung, da sie sich nicht, wie alle anderen Zellen des Nervensystems, aus dem Ektoderm, sondern aus dem Mesoderm entwickeln (Kandel, 2000). Mikroglia liegen im Nervensystem meist in nicht aktiviertem Zustand vor und weisen eine verästelte Struktur auf (Kreutzberg, 1996). Verletzungen oder Erkrankungen des Nervensystems, wie z.B. Alzheimer, Parkinson, Prion-Erkrankungen und andere Infektionen, führen zur Aktivierung der Mikroglia (Brown, 2009). Neben morphologischen Veränderungen führt die Aktivierung auch zur Sekretion verschiedener Faktoren, die sowohl pro-inflammatorisch und zytotoxisch (zum Beispiel Superoxid, Stickstoffmonoxid (NO) oder Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α)) wie aber auch trophisch und anti-inflammatorisch (zum Beispiel Tenascin R) sein

können (Brown, 2009). Die Rolle der Mikroglia kann im Gehirn also sehr unterschiedlich sein.

1.2.2.2 Makroglia

Als Makroglia bezeichnet man die Gliazellen ektodermalen Ursprungs. Man unterscheidet dabei drei Gruppen, die im Nervensystem von Vertebraten vorkommen: die myelin-bildenden Oligodendrozyten und Schwann'schen Zellen (SZ) sowie nicht-myelinisierende Astrozyten.

1.2.2.2.1 Oligodendrozyten und Schwann'sche Zellen

Sowohl im ZNS wie auch im PNS von Vertebraten sind viele Nervenfasern von einer isolierenden Schicht, der Myelinschicht, umgeben. Diese Isolierung ermöglicht eine hohe Nervenleitgeschwindigkeit über längere Strecken. Die Bildung dieser isolierenden Myelinschicht wird im ZNS von den Oligodendrozyten, im PNS von den Schwann'schen Zellen übernommen. Diese Gliazellen hüllen dabei die Ausstülpungen ihrer Plasmamembranen in konzentrischen Schichten um die Axone. Ein einziger Oligodendrozyt kann mit seinen Fortsätzen bis zu 15 Internodien unterschiedlicher Neurone umwickeln und isolieren (Kandel, 2000). Bei der Myelinisierung im PNS kann eine Schwann'sche Zelle mit ihren Fortsätzen jedoch nur ein einziges Internodium eines Neurons myelinisieren (Abbildung 2A). Die Myelinschicht wird zunächst sehr locker um die Neurone angelegt. Anschließend wird sie durch Einlagerungen verschiedener Proteine stabiler und kompakter. Die Proteinzusammensetzung des peripheren und zentralen Myelins ist im Wesentlichen gleich, einige Proteinkomponenten unterscheiden sich jedoch. So findet man das periphere Myelinprotein 22 (PMP22) sowie das Myelinprotein 0 (P0) in Säugern ausschließlich im PNS. Das Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) ist nur im ZNS lokalisiert, wohingegen die Proteine Connexin 32 (Cx32), myelin-assoziiertes Glykoprotein (MAG), basisches Myelinprotein (MBP) sowie Proteolipidprotein (PLP) bzw. dessen Splicevariante DM20 sowohl im PNS wie auch im ZNS vorhanden sind (Abbildung 2B). Bei Untersuchungen des Myelins von Fischen (Forelle und Zebrafisch) hat man in der Proteinverteilung jedoch eine abweichende Besonderheit festgestellt: in diesen Spezies fand man P0 im Zebrafisch beziehungsweise die homologe Variante IP1 in der Forelle sowohl im PNS wie auch im ZNS (Brösamle and Halpern, 2002; Stratmann and Jeserich, 1995).

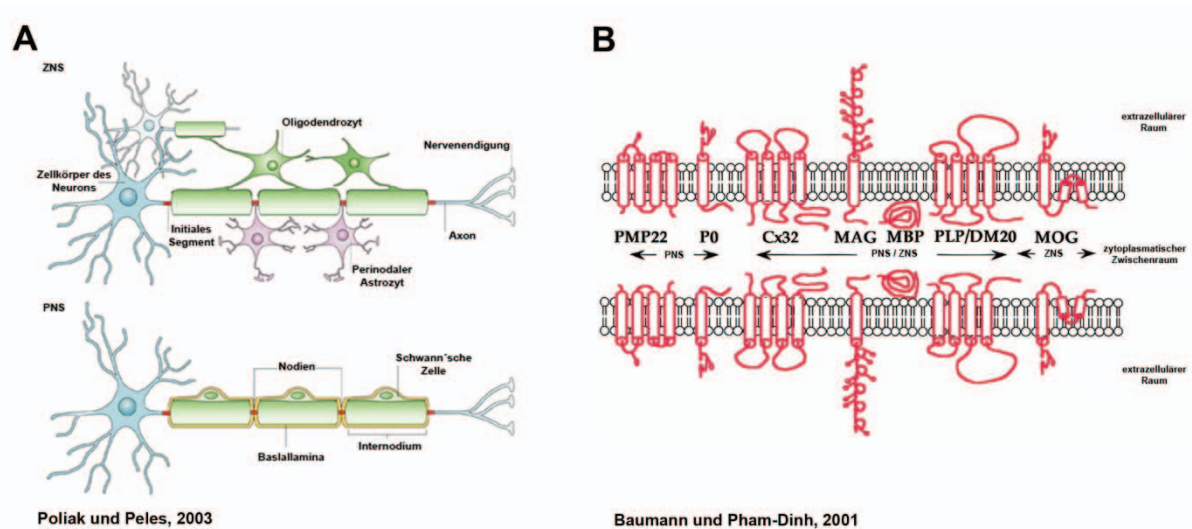


Abbildung 2: Myelinisierung im ZNS und PNS sowie assoziierte Proteine

A: Die Myelinisierung wird im PNS und im ZNS von unterschiedlichen Zellen durchgeführt. Im ZNS kann ein Oligodendrozyt mit den Ausstülpungen seiner Plasmamembran bis zu 15 Internodien verschiedener Neurone myelinisieren. Im PNS sind Schwann'sche Zellen für die Bildung der Myelinschicht verantwortlich. Diese Zellen können nur ein Internodium eines einzigen Neurons isolieren.

Abbildung aus (Poliak and Peles, 2003).

B: Einlagerungen von verschiedenen Proteinen in die Myelinmembranen verleihen der Isolationsschicht zusätzliche Stabilität und machen sie kompakter. Die Proteinzusammensetzung im ZNS und PNS ist im Wesentlichen gleich, einige Proteine sind jedoch nur im PNS bzw. ZNS vorhanden.

Abbildung aus (Baumann and Pham-Dinh, 2001).

1.2.2.2 Astrozyten

Astrozyten galten im Nervensystem lange Zeit nur als Bindegewebszellen mit überwiegend unterstützender und schützender Funktion. So dienen die Fortsätze der Astrozyten in der frühen neuronalen Entwicklung als Leitstrukturen für noch nicht differenzierte Neurone, die durch Migration entlang der Astrozytenfortsätze zu ihrem Ziel gelangen (Blackburn et al., 2009). Sie sichern durch Interaktionen mit den Blutkapillaren zum einen die Energieversorgung der Neurone, zum anderen sind sie durch diese Interaktionen zusammen mit weiteren Zelltypen, u.a. weiteren Mikrogliazellen, an der Bildung der für den Organismus lebenswichtigen Blut-Hirn-Schranke beteiligt (Blackburn et al., 2009). Diese Barriere ist nur für bestimmte Moleküle permeabel und verhindert so das Eindringen von schädlichen Substanzen in Bereiche des ZNS und somit dessen Schädigung (Prat et al., 2001). Außerdem sind Astrozyten zuständig für die Homöostase im Ionenhaushalt, v.a. der Natrium- (Na^+), Kalium- (K^+) und Wasserstoffionen (H^+), die auch bei der Erregung einer Nervenzelle eine wichtige Rolle spielen. Obwohl die Signalübertragung den

Neuronen obliegt, spielen Astrozyten bei der Bildung von Synapsen eine wichtige Rolle. Sie umgeben dabei die post- und präsynaptische Zelle und dienen als dynamische Regulatoren der Neurotransmission (Perea and Araque, 2005). Diese so genannte „*tripartite synapse*“, die aus der prä- und postsynaptischen Zelle sowie einem Astrozyten besteht, hat die Astrozyten in den letzten Jahren unter anderem wieder mehr in den Vordergrund der Forschung gerückt. So vermutet man mittlerweile auch, dass es nicht nur Interaktionen und Kommunikation zwischen Astrozyten und Neuronen gibt, sondern auch zwischen den einzelnen Gliazelltypen, wie z.B. Astrozyten und Oligodendrozyten (Carmen et al., 2007). Weiterhin weiß man, dass Astrozyten selbst Rezeptoren für Neurotransmitter besitzen und so genannte Gliotransmitter freisetzen können. Durch diese glia-neuronale Kommunikation tragen Astrozyten zur Modulation der synaptischen Aktivität bei (Rossi and Volterra, 2009). Dies ermöglicht neue Ansatzpunkte, um Astrozyten und ihre oft unterschätzte Rolle näher zu beleuchten.

1.3 Das Astrozytenprotein GFAP und sein Aufbau

Hauptbestandteil des Zytoskeletts der Astrozyten ist das saure gliale fibrilläre Astrozytenprotein (GFAP), ein Intermediärfilament der Gruppe III (Fuchs and Weber, 1994). Dieses Intermediärfilament erstreckt sich bis in die Fortsätze der Astrozyten und verleiht ihnen ihre Stabilität und Beweglichkeit.

1.3.1 Aufbau des Intermediärfilaments

Das humane *gfap*-Gen ist auf Chromosom 17q21 lokalisiert (Bongcam-Rudloff et al., 1991) und erstreckt sich insgesamt über 10 Kilobasen (kb) (Isaacs et al., 1998), die mRNA beträgt 3 kb (Eng et al., 2000). Das Gen ist in neun Exons und entsprechende Introns unterteilt (Rodriguez et al., 2001). Ein Teil des ersten Exons kodiert im Protein für den Aminoterminus (N-Terminus). Der Rest des ersten Exons sowie die Exons zwei bis sechs kodieren für die Mitteldomäne des Proteins (Rodriguez et al., 2001), die zwischen den einzelnen Spezies sehr konserviert ist (Balcarek and Cowan, 1985; Cohen and Schwartz, 1993; Condorelli et al., 1999; Reeves et al., 1989). Die Exons sieben bis neun kodieren für den Carboxyterminus (C-Terminus) (Rodriguez et al., 2001), der ebenfalls eine hohe Konservierung zwischen den einzelnen Spezies aufweist (Balcarek and Cowan, 1985; Cohen and Schwartz, 1993; Condorelli et al., 1999; Reeves et al., 1989) (Abbildung 3A). Das GFAP-Protein

Einleitung

besteht aus 432 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 55 Kilodalton (kDa) (Bongcam-Rudloff et al., 1991; Reeves et al., 1989). Es besitzt wie alle Intermediärfilamente eine α -helikale, stabförmige Mitteldomäne, die von einer Kopf- und einer Schwanzdomäne flankiert wird (Bongcam-Rudloff et al., 1991). Die stabförmige Mitteldomäne wird in vier Segmente unterteilt (1A, 1B, 2A, 2B), die dann durch Linker miteinander verbunden sind (L1, L12, L2) (Parry and Steinert, 1999). Die GFAP-Monomere mit ihrer α -helikalen Sekundärstruktur lagern sich in paralleler Organisation zu doppelt-verwundenen (coiled-coil) Homodimeren zusammen. Zwei GFAP-Homodimere bilden dann durch eine anti-parallele Verbindung ein versetztes Tetramer. Diese Tetramere lagern sich schließlich zu so genannten 10nm-Fibrillen zusammen, die den Intermediärfilamenten ihre Stabilität verleihen (Abbildung 3B, 1-5) (Alberts, 2002). Neben GFAP- α , der hauptsächlich auftretenden Isoform, gibt es bei Nagern weitere Isoformen. GFAP- β ist 169 Aminosäuren kürzer als GFAP- α und ist in Schwann'schen Zellen des PNS lokalisiert (Feinstein et al., 1992; Galea et al., 1995). Die Expression von GFAP- γ beschränkt sich auf Regionen außerhalb des Gehirns. Bei dieser Isoform wird Exon 1 nicht transkribiert, dafür enthält sie jedoch die letzten 126 Aminosäuren des ersten Introns (Zelenika et al., 1995). Die GFAP- δ Isoform enthält alle neun Exons und zusätzlich 1255 Aminosäuren des Introns sieben, die das Leseraster jedoch nicht verschieben (Condorelli et al., 1999). Diese Isoform enthält im Vergleich zur GFAP- α Isoform einen veränderten C-Terminus, über den Interaktionen zu anderen Proteinen erfolgen können (Condorelli et al., 1999). Bei der GFAP- ϵ Isoform wird ein Teil des Introns sieben des *gfap*-Gens als Exon verwendet (Nielsen et al., 2002). Diese Isoform wird im Gehirn exprimiert, jedoch in deutlich geringerem Maße als GFAP- α (Nielsen et al., 2002).

Einleitung

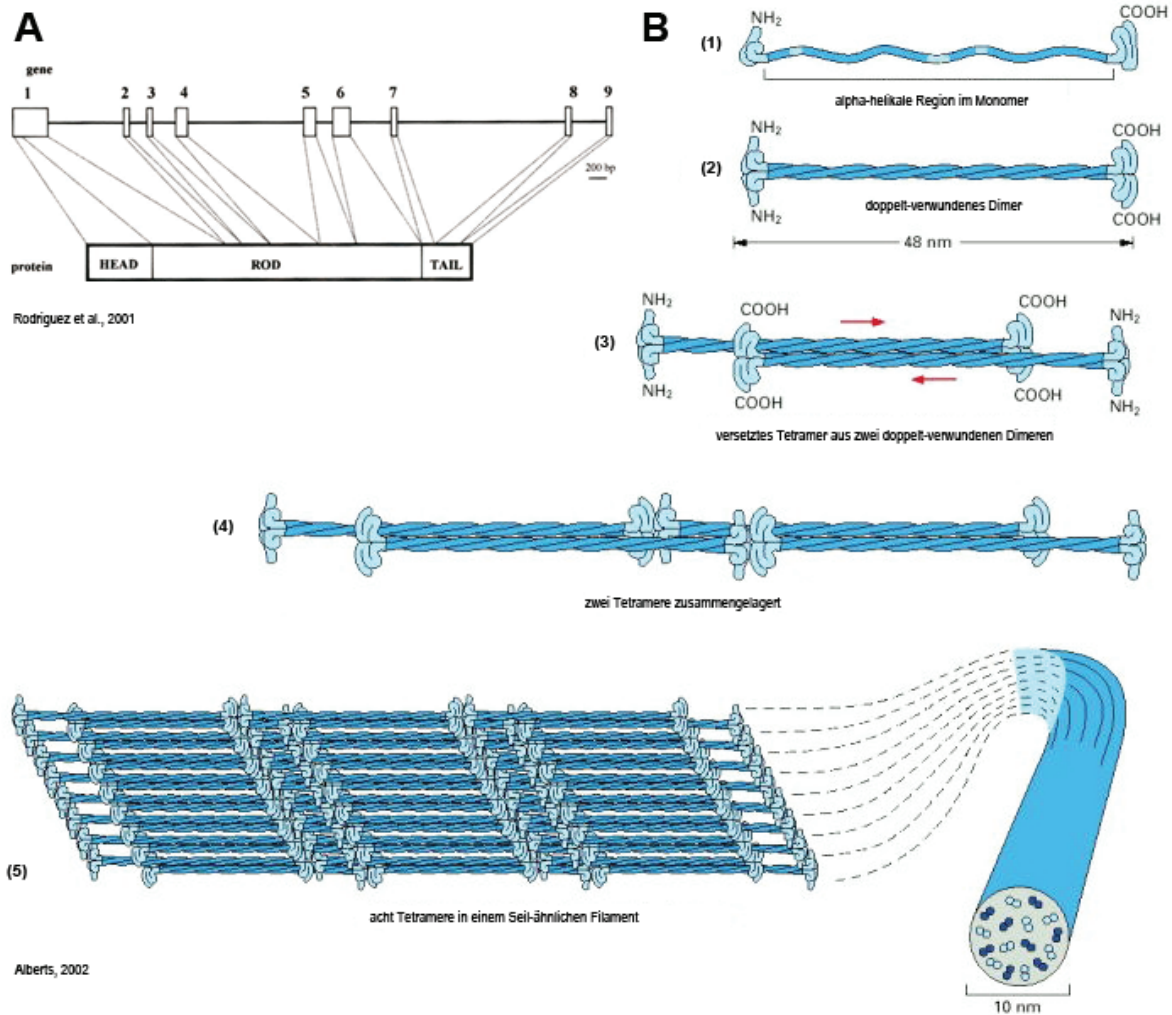


Abbildung 3: Vom *gfap*-Gen zum GFAP-Protein

A: Das humane *gfap*-Gen ist in neun Exons und acht Introns organisiert. Die Exons kodieren im Protein für eine Kopfdomäne (head), eine stabförmige Mitteldomäne (rod) sowie eine Schwanzdomäne (tail). Die stabförmige Mitteldomäne wird in vier Segmente (1A, 1B, 2A, 2B) unterteilt, die über die Linker L1, L12 und L2 miteinander verbunden sind (hier nicht gezeigt).

Abbildung aus (Rodriguez et al., 2001).

B: Die α -helikalen GFAP-Monomere (1) lagern sich zu doppelt-verwundenen Dimeren zusammen (2), die sich dann wiederum zu versetzten Tetrameren zusammenfinden (3). Die Tetramere assoziieren sich schrittweise (4), bis schließlich das sehr stabile, seil-ähnliche 10nm-Filament entstanden ist (5).

Abbildung aus (Alberts, 2002).

1.3.2 Alexander disease (AXD) und krankheits-assoziierte Mutationen im *gfap*-Gen

Als *Alexander disease* (AXD) (OMIM #203450) bezeichnet man eine Erkrankung, die erstmals 1949 von W.S. Alexander beschrieben wurde (Alexander, 1949). Bei dieser Erkrankung des ZNS handelt es sich um eine Leukodystrophie (Wohlwill et al., 1959). Als Leukodystrophien werden im Allgemeinen Erkrankungen des Nervensystems bezeichnet, bei denen das Myelin der Patienten beeinträchtigt ist. Dabei kann das Myelin nicht vollständig ausgebildet sein oder im Verlauf der Erkrankung abgebaut werden. Die Patienten leiden deshalb meist unter Einschränkungen der motorischen Fähigkeiten sowie unter neurologischen Defekten. AXD kann in drei verschiedenen

Varianten vorliegen: der infantilen, der juvenilen und der adulten Form. Die infantile Form ist die am häufigsten vorkommende Variante. Die Patienten erkranken meist innerhalb der ersten beiden Lebensjahre und sind sowohl in ihrer körperlichen wie auch in der mentalen Entwicklung stark retardiert (Li et al., 2002). Außerdem leiden sie an Megalenzephalie und Krampfanfällen (Li et al., 2002). Häufig treten dann auch Lähmungen in allen Gliedmaßen auf. Die Patienten müssen meist über Sonden ernährt werden und werden selten älter als zehn Jahre (Li et al., 2002). Bei Patienten mit juveniler AXD treten die Symptome meist im Alter zwischen vier und zehn bis zwölf Jahren auf (Johnson, 2002; Li et al., 2002). Die Krankheit verläuft bei diesen Patienten langsamer als bei Patienten mit infantiler AXD. Die Patienten leiden meist an Sprech-, Ess- und Schluckbeschwerden. Im Verlauf der Krankheit treten häufig auch Bewegungseinschränkungen durch Beeinträchtigungen der Beine sowie des Gleichgewichtssinnes auf. Patienten mit juveniler AXD können mit der Erkrankung teilweise jedoch sehr lange leben (Johnson, 2002). Bei Patienten, die an der adulten Form von AXD leiden, treten die Symptome sehr spät auf, meist im Alter ab 20 bis zu 70 Jahren. Die Krankheit äußert sich dann durch langsam fortschreitende Fehlfunktionen des Gehirns, wie beispielsweise Tremor oder Schluckbeschwerden, und andere unterschiedliche neurologische Anzeichen für eine Erkrankung (Quinlan et al., 2007; Sawaisi, 2009). In einigen Fällen können die Patienten jedoch auch asymptomatisch sein (Shiihara et al., 2004). Bei infantiler AXD sind die Patienten überwiegend männlich mit einem Verhältnis von etwa 2,5:1 zu weiblichen Patienten. Bei juveniler und adulter AXD ist eine solche Geschlechterverteilung jedoch nicht mehr zu beobachten (Reichard et al., 1996).

Als molekulare Ursache für AXD sind mittlerweile spontane heterozygote *de novo*-Punktmutationen im Gen für *gfap* bekannt (Brenner et al., 2001). Für einige wenige AXD Patienten wurden auch einige vererbte Mutationen detektiert (Li et al., 2005), bei denen die Eltern oder Geschwister jedoch asymptomatisch waren. Aus verschiedenen Patientenstudien mit unterschiedlichen Untersuchungsmethoden ist bekannt, dass sich die weiße Substanz, also die Myelinschicht, im ZNS der Patienten stark zurückbildet und somit zu einer Verlangsamung der Nervenleitgeschwindigkeit führt (Abbildung 4A, B). Weiterhin weiß man, dass mutiertes GFAP keine Homodimere und folglich auch keine 10nm-Fibrillen mehr ausbilden kann. GFAP dient dann nicht mehr der Zellstabilität (Hsiao et al., 2005), sondern aggregiert in so genannten Rosenthalfasern (Abbildung 4C). Diese elektronendichten Aggregate

können sowohl licht- wie auch elektronenmikroskopisch detektiert werden (Herndon et al., 1970). Hauptbestandteil in diesen Aggregaten ist mutiertes GFAP, daneben findet man Ubiquitin (Iwaki et al., 1993), α -Cristallin und das Hitzeschockprotein 27 (hsp27) als Chaperon (Der Perng et al., 2006).

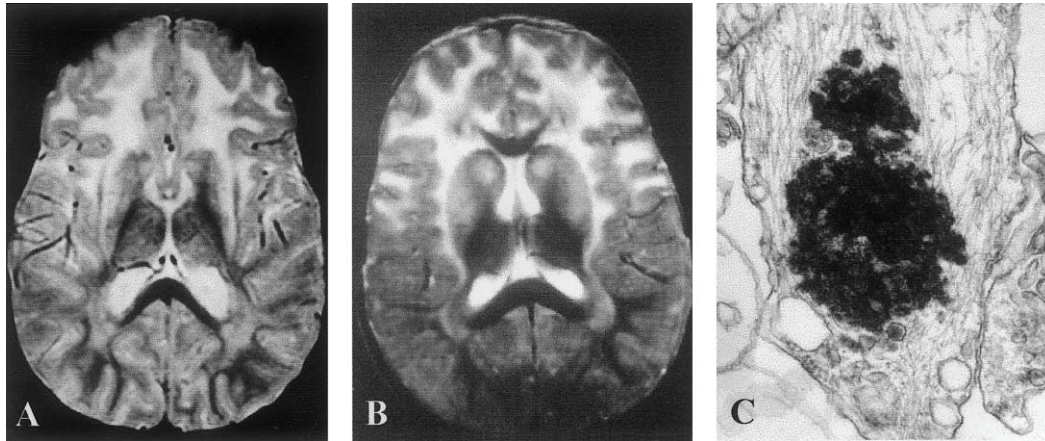


Abbildung 4: MRI und EM von AXD Patienten

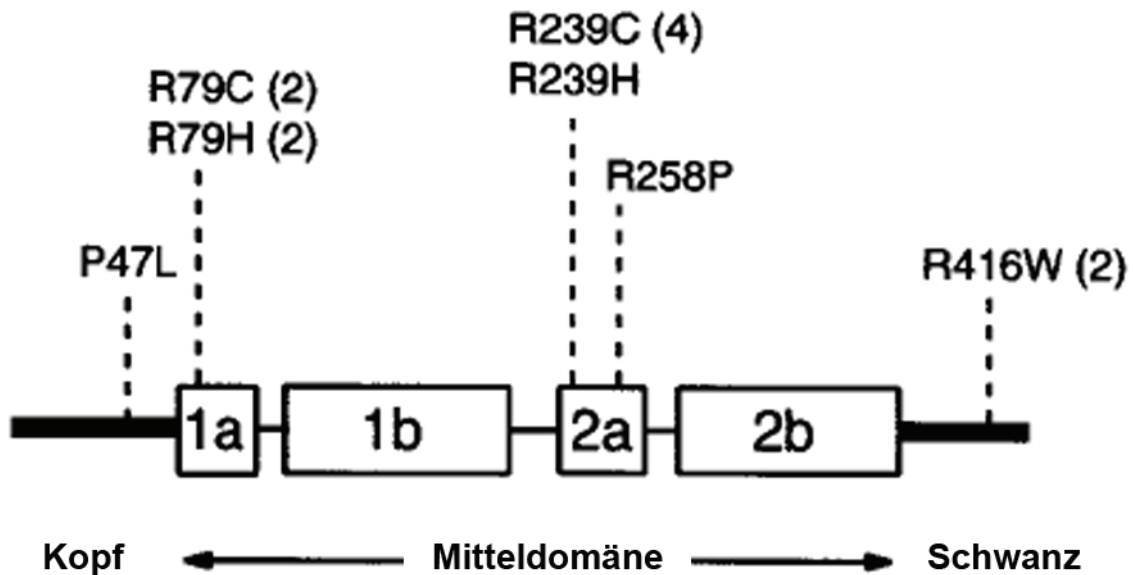
A, B: T2-gewichtete MRI-Aufnahmen eines klassischen AXD Patienten (A) mit einer Arginin zu Cystein Mutation an Position 88 (R88C) sowie eines Patienten mit einer milden Form von AXD (B), der Träger einer Arginin zu Histidin Mutation an Position 79 (R79H) ist.

C: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Präparaten eines AXD Patienten. Die elektronendichten Rosenthalfasern im unregelmäßigen GFAP Netzwerk sind deutlich erkennbar. Vergrößerung: 28500X. Abbildung aus (Rodriguez et al., 2001).

In einigen Patientenstudien wurde das Gen für *gfap* hinsichtlich Mutationen untersucht (Brenner et al., 2001; Li et al., 2002; Rodriguez et al., 2001). Dabei konnten vor allem Mutationen, die in der stabförmigen Mitteldomäne des GFAP-Proteins lokalisiert waren, mit AXD assoziiert werden. Mutationen in dieser Region des Proteins führen mit großer Wahrscheinlichkeit zu einem veränderten Verhalten von GFAP, da diese Domäne für Interaktionen mit anderen GFAP-Monomeren verantwortlich ist. Mutationen können zu Destabilisierungen der α -Helix führen, was wiederum die Bindung zu Interaktionspartnern schwächt oder unmöglich macht. Die meisten der identifizierten Mutationen führen zu infantiler AXD (Li et al., 2002), jedoch wurden auch bei Patienten mit juveniler und adulter AXD Mutationen im *gfap*-Gen detektiert (Li et al., 2002). Die häufigsten Mutationen waren Arginin zu Histidin oder Cystein-Mutationen an Position 79 im humanen GFAP-Protein (R79H, R79C), Arginin zu Histidin oder Cystein-Mutationen an Position 239 (R239H, R239C), sowie Arginin zu Prolin-Mutationen an Position 258 (R258P). Eine weitere, häufig auftretende Mutation ist eine Arginin zu Tryptophan-Mutation an Position 416

Einleitung

(R416W), die in der Schwanzdomäne des Proteins lokalisiert ist (Brenner et al., 2001; Li et al., 2002; Rodriguez et al., 2001) (Abbildung 5). Die mutierten Arginin-Reste wurden hierbei durch ein CGC-Triplet kodiert (Nielsen and Jorgensen, 2003). Neben diesen am häufigsten auftretenden Mutationen wurden weitere detektiert, die jedoch jeweils in nur einer Familie vorkamen. Eine Mutation, die in der Kopfdomäne des Proteins lokalisiert ist, ist von besonderer Bedeutung: eine Prolin zu Lysin-Mutation an Position 47 (P47L). Diese Mutation tritt in Patienten nie alleine, sondern immer in Kombination mit einer weiteren pathogenen Mutation auf. Kontrollpersonen, die nur Träger der P47L Mutation waren, zeigten aber keine AXD-Symptome, d.h. P47L alleine scheint keine pathogene Mutation zu sein. Die Patienten mit einer pathogenen Mutation und P47L zeigten dagegen mildere Symptome im Vergleich zu anderen Patienten mit identischen pathogenen Mutationen (R239C, R416W), aber ohne P47L. Es wird daher diskutiert, ob die P47L-Mutation den durch die weiteren Mutationen verursachten Phänotyp mildern kann (Li et al., 2002). Weiterhin liegt P47L in einer Region des *gfap*-Gens (gezeigt für Maus), die *in vitro* an der Polymerbildung beteiligt ist. Mutationen in dieser Region könnten so die Aggregation von GFAP verhindern oder zumindest erschweren (Li et al., 2002). Vergleiche der AXD-assoziierten Mutationen im humanen *gfap* mit den entsprechenden Regionen im Zebrafisch *gfap*-Gen zeigten, dass die Mutationen mit hoher Wahrscheinlichkeit Aminosäurereste beeinträchtigen, die stark konserviert sind (Nielsen and Jorgensen, 2003).



Brenner et al., 2001

Abbildung 5: AXD-assoziierte Mutationen in GFAP-Protein

Die häufigsten Mutationen in GFAP, die mit AXD assoziiert sind, sind in der Mitteldomäne lokalisiert, die mit ihrer α -helikalen Sekundärstruktur für die Interaktionen der Monomere verantwortlich ist. Eine weitere, häufig auftretende Mutation ist in der Schwanzdomäne lokalisiert. Die P47L-Mutation in der Kopfdomäne hat eine besondere Rolle, da sie immer in Kombination mit einer weiteren, pathogenen Mutation auftritt und somit möglicherweise den dadurch verursachten Phänotyp abschwächen kann. Abbildung aus (Brenner et al., 2001).

1.3.3 GFAP im Zebrafisch

Wie bereits erwähnt, sind das *gfap*-Gen und das GFAP-Protein in vielen Spezies vorhanden und auch konserviert (Balcarek and Cowan, 1985; Cohen and Schwartz, 1993; Condorelli et al., 1999; Reeves et al., 1989). Untersuchungen des Zebrafisch *gfap*-Gens zeigten, dass die Organisation des Gens identisch zu der von Säugern ist, also neun Exons sowie acht Introns aufweist (Nielsen and Jorgensen, 2003). Ein Teil von Exon eins kodiert für die Kopfdomäne. Der Rest des ersten Exons sowie die Exons zwei bis sechs kodieren für die Mitteldomäne. Die Exons sieben bis neun kodieren für die Schwanzdomäne (Abbildung 6A). Die Länge der Introns ist jedoch deutlich verschieden im humanen und Zebrafisch Gen für *gfap* (Nielsen and Jorgensen, 2003) (Abbildung 6). Das in (Nielsen et al., 2002) beschriebene alternativ gespligte Exon 7, das dann als GFAP- ϵ Isoform transkribiert und translatiert wird, konnte im Zebrafisch bisher nicht detektiert werden (Nielsen and Jorgensen, 2003). Das Zebrafisch GFAP-Protein besteht aus 444 Aminosäuren und ist damit um zwölf Aminosäuren länger als das humane GFAP-Protein (Nielsen and Jorgensen, 2003). Ein Abgleich der Aminosäuresequenzen von humanem *gfap* mit Zebrafisch *gfap* zeigte eine Gleichheit von 67% (Nielsen and Jorgensen, 2003) (Abbildung 6B). Das

Einleitung

Protein hat ein Molekulargewicht von 50 kDa und zeigt eine identische Organisation wie das humane GFAP-Protein: eine Kopfdomäne, eine Mitteldomäne, die in vier Segmente unterteilt ist, sowie eine Schwanzdomäne. Außerdem weist das Protein typische Merkmale eines Intermediärfilaments auf. So lagern sich die GFAP-Monomere im Zebrafisch zu Dimeren zusammen und die Filamente bilden dann das Zytoskelett der Astrozyten (Nielsen and Jorgensen, 2003).

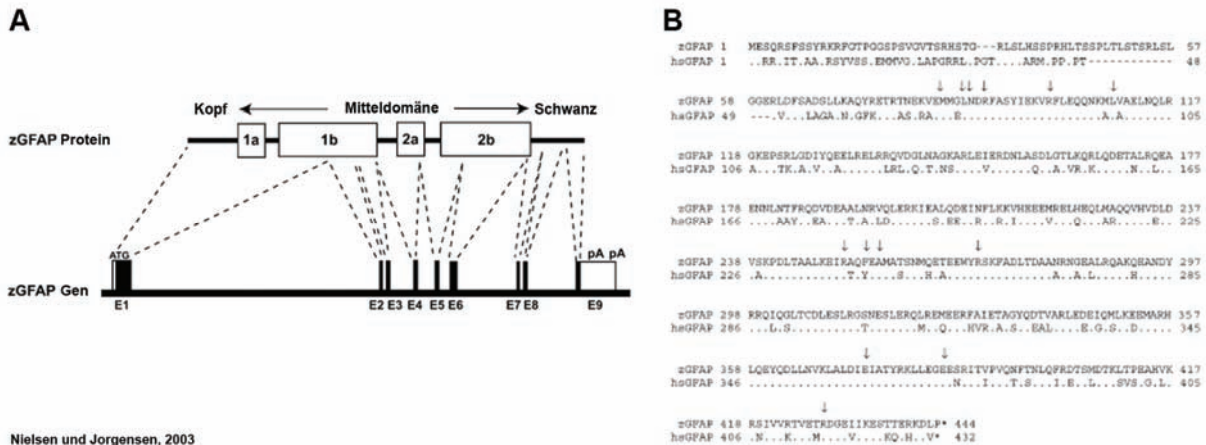


Abbildung 6: Zebrafisch *gfap* und dessen Konservierung

A: Die Organisation des Zebrafisch *gfap*-Gens ist identisch mit der des humanen *gfap*: es enthält neun Exons sowie acht Introns. Das Protein besteht aus einer Kopf-, einer Mittel- und einer Schwanzdomäne. Die Mitteldomäne ist auch in vier Segmente unterteilt, die durch Linkerregionen miteinander verbunden sind.

B: Der Abgleich der humanen Aminosäuresequenz mit der Zebrafisch Aminosäuresequenz für *gfap* zeigt eine hohe Konservierung. Identische Aminosäuren sind durch Punkte dargestellt (.), Lücken durch Gedankenstriche (-). Die unterschiedlichen Aminosäuren sind im Einbuchstabencode angezeigt. Die Pfeile zeigen mit der Erkrankung *Alexander disease* (AXD) assoziierte Mutationen.

Abbildungen aus (Nielsen and Jorgensen, 2003).

1.3.4 Der Zebrafisch *gfap*-Promotor

Die regulatorischen Elemente des Zebrafisch *gfap* sind in einem 7.4 kb großen Stück lokalisiert. Dazu zählen etwa 3 kb, die der *gfap*-Transkriptionsstartstelle vorgelagert sind, sowie die ersten 16 bp des ersten Exons des *gfap*-Gens und etwa 4.3 kb des ersten Introns (Bernardos and Raymond, 2006). Der Zebrafisch *gfap*-Promotor ist ab etwa 15 Stunden nach der Fertilisation (15 hpf) deutlich aktiv (Marcus and Easter, 1995). Die Intensität steigert sich im Verlauf der frühen Entwicklung und bleibt dann bis in das Erwachsenenalter konstant (Bernardos and Raymond, 2006). Der Promotor beschränkt die Expression auf Gliazellen im ZNS sowie einige Zellen außerhalb des ZNS (Bernardos and Raymond, 2006). Die GFAP-exprimierenden Zellen im ZNS sind sowohl die Zellkörper wie auch die Fortsätze der Müller-Glia in

der neuralen Retina und die den Zentralkanal des Rückenmarks flankierenden Zellen (Bernardos and Raymond, 2006). Im PNS ist GFAP-Expression vor allem in der Linse des Auges, in noch nicht ausgereiften Schwann'schen Zellen und in enterischen Gliazellen vorhanden (Bernardos and Raymond, 2006).

1.4 Experimentelle Ansätze zur Untersuchung der Astrozyten

Die Rolle der Astrozyten im Nervensystem ist weitaus umfangreicher als bisher bekannt. Dass diese Zellen nicht ausschließlich als Binde- und Stützgewebe gelten, ist mittlerweile gezeigt. Welche weiteren Rollen ihnen zukommen und in welchem Maße sie Einfluss auf die Myelinisierung in einem intakten Nervensystem und im Krankheitskontext nehmen, soll in der vorliegenden Arbeit mit unterschiedlichen Methoden erforscht werden. Dazu werden die Zellen auf unterschiedliche Weise Stressbedingungen ausgesetzt und anschließend untersucht.

1.4.1 Ablation von Astrozyten

Zur Untersuchung der Rolle von Astrozyten in einem intakten Nervensystem sollen diese Zellen während der Entwicklung zu definierten Zeitpunkten ausgeschaltet werden. Dies kann durch die Expression eines Toxins in Astrozyten erreicht werden. Das Diphtherietoxin ist für Ablationsexperimente bereits etabliert (Breitman et al., 1987; Palmiter et al., 1987). Dieses Toxin, das ursprünglich aus dem *Corynebacterium diphtheriae* stammt, besteht aus zwei Untereinheiten, der Diphtherietoxin A- und B-Untereinheit (DTA und DTB). Das DTB-Fragment vermittelt die Bindung an die Zielzelle, kann selbst aber nicht als Toxin wirken (Herschman et al., 1982). Das DTA-Fragment dagegen ist die toxische Untereinheit, wenn auch die Aktivität durch die Bindung an DTB über eine Disulfidbrücke verstärkt wird (Herschman et al., 1982). In einer Zelle inhibiert DTA die Proteinbiosynthese und induziert so das Absterben der Zielzelle (Herschman et al., 1982). Für die hier beschriebenen Experimente wurde nur die toxisch wirkende DTA-Untereinheit ohne DTB verwendet. So wird sichergestellt, dass DTA nach dem Zelltod nicht in weitere Zellen gelangen und diese ungewollt schädigen kann. Permanente Expression von DTA in den Zellen würde jedoch die Entwicklung dieser Zellen von Beginn an unterdrücken. Ein induzierbares System ermöglicht die Expression ab einem bestimmten, selbst gewählten Zeitpunkt. Für die Induktion wird in diesem Ansatz eine Kombination zweier induzierbarer Systeme verwendet: zum einen das Cre/loxP-

System, zum anderen die Induktion der Expression durch Anwendung von Hitze. Die Cre-Rekombinase ist ein Enzym, das ursprünglich aus dem Bakteriophagen P1 stammt und heute in vielen Bereichen der Molekularbiologie Anwendung findet (Ghosh and Van Duyne, 2002). Dieses Enzym erkennt bestimmte, kurze DNA-Sequenzen („loxP Stellen“), bindet an sie und entfernt dann die dazwischen liegenden Sequenzen durch sequenzspezifische Rekombination (Abremski and Hoess, 1984). Die Expression der Cre-Rekombinase kann über die Anwendung von Hitze induziert werden. Dabei werden ubiquitär so genannte Hitzeschockelemente (HSE) durch Anwendung von Hitze aktiviert, die wiederum durch bidirektionale Minimalpromotoren die Expression eines grün fluoreszierenden Reporters (green fluorescent protein, GFP) sowie der Cre-Rekombinase auslösen (Bajoghli et al., 2004). Die loxP-Stellen flankieren in den hier beschriebenen Experimenten eine translationale Stopsequenz, die die Translation der folgenden mRNA in funktionelles Protein blockiert. Wird diese Stopsequenz durch die Cre-Rekombinase entfernt, erfolgt die Expression der nachgelagerten Sequenzen, die in diesem Experiment für das DTA kodieren (siehe 4.1). Die Expression des loxP-Konstrukts wird durch die Verwendung des *gfap*-Promotors auf Astrozyten beschränkt (Bernardos and Raymond, 2006) und garantiert so die zellspezifische Expression von DTA. Somit erfolgt durch Anwendung von Hitze zunächst die ubiquitäre Expression der Cre-Rekombinase, die dann wiederum die Expression des DTA in Astrozyten induzieren kann. Durch die gezielte Kombination dieser induzierbaren Systeme können so bestimmte Zellen zu definierten Zeitpunkten in der Entwicklung ausgeschaltet werden. Alle Konstrukte, die zur Herstellung transgener Fischlinien verwendet wurden, wurden mit Erkennungsstellen für die Tol2 Transposase (Tol2 Stellen) flankiert. Dieses Enzym, das ursprünglich aus Medaka (*Oryzias latipes*) isoliert wurde, katalysiert die effiziente Integration der zwischen zwei benachbarten Tol2-Stellen liegenden Sequenzen in das Genom des Empfängerorganismus (Kawakami, 2005). Die Injektion der Konstrukte in Zebrafischeier erfolgte zusammen mit Tol2-Transposase-mRNA, die dann in den Eiern in funktionelles Tol2-Transposase Protein translatiert wird, die Tol2-Stellen erkennt und die Integration der dazwischen liegenden Sequenzen in das Zebrafischgenom katalysiert (siehe 1.5.1). Durch die Anwendung dieses Transposonverfahrens kann die Effizienz der Transgenintegration erheblich gesteigert werden (Kawakami, 2005).

1.4.2 Transgene Expression von GFAP

Eine mit Mutationen in Astrozytenproteinen assoziierte Erkrankung im ZNS ist *Alexander disease* (AXD) (siehe 1.3.2). Zur Erforschung von AXD existieren bereits Zellkultur- und Mausmodelle, in denen mutiertes GFAP transgen exprimiert wird (Der Perng et al., 2006; Hagemann et al., 2009; Hagemann et al., 2006; Hsiao et al., 2005; Tanaka et al., 2007; Tang et al., 2006; Yoshida et al., 2009). Durch diese Modelle, wie auch durch die Analyse von AXD-Patientenmaterial, wurden die bisherigen Kenntnisse über die Erkrankung erlangt. Über Mechanismen der Entstehung und des Abbaus von Aggregaten aus mutiertem GFAP, so genannten Rosenthalfasern, ist bisher jedoch sehr wenig bekannt. Um nun die Rolle der Astrozyten im Allgemeinen sowie unter AXD-Bedingungen detaillierter zu untersuchen, wurde in Zebrafischlarven die kodierende Sequenz des Zebrafisch *gfap* in Astrozyten transgen exprimiert. Dazu wurden Konstrukte verwendet, die für ein Fusionsprotein aus dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) und GFAP in der Wildtypvariante sowie mit einer AXD-assoziierten Mutation kodieren. Außerdem wurde ein Konstrukt verwendet, das für das nicht fusionierte, jedoch mutierte GFAP kodiert. Durch die Expression der Fusionsproteine können Aggregations- und Abbaumechanismen ohne Fixierung am lebenden Organismus verfolgt werden. Zur Generierung der transgenen Fischlinien wurde das aus der *Drosophila*- und Hefegenetik bekannte Gal4/UAS-System verwendet. Hierbei wird zunächst der Transkriptionsfaktor Gal4 unter einem bestimmten Promotor aktiviert, welcher dann an die so genannte *upstream activating sequence* (UAS) bindet und somit die Expression der nachgelagerten Sequenzen induziert (Brand and Perrimon, 1993). Diese Technik bewirkt durch die Bindung von Gal4 an UAS eine stark erhöhte Expression des Transgens. Dieses System ist jedoch nur funktional, wenn sowohl eine Gal4- wie auch eine UAS-Sequenz in einer Zelle vorliegen. Die Gal4-Sequenz ist im so genannten *Driver*-Konstrukt enthalten. Dieses Konstrukt wird unter dem *gfap*-Promotor, der die Expression in Astrozyten garantiert, exprimiert. Die UAS-Sequenz ist auf dem *Responder*-Konstrukt enthalten. Dieser folgen in den unterschiedlichen *Responder*-Konstrukten die Fusionsproteine mit und ohne Mutation sowie die Sequenz des nicht fusionierten *gfap* mit Mutation (siehe 4.2). Wie aus der Literatur bekannt ist, stellt bereits die transgene Expression von GFAP ohne Mutation in Astrozytenzellkulturen ausreichend Stressbedingungen her, die in gewissem Maße zur Aggregation von GFAP führen können (Tang et al., 2006).

Durch die transgene Expression von GFAP mit Mutation in Zellkultursystemen wird die Aggregation jedoch deutlich verstärkt (Tang et al., 2006). Diese Erkenntnisse müssen für die Interpretation der hier erhaltenen Ergebnisse bedacht werden.

1.5 Zebrafisch als Modellorganismus

Der Zebrafisch (*Danio rerio*) gehört zur Klasse der Knochenfische und kann bis zu fünf Zentimeter groß werden. Ursprünglich stammt der Zebrabärbling, wie der Zebrafisch auch genannt wird, aus Indien und Pakistan, wo er in langsam fließenden (Zuflüsse des Ganges) oder stehenden (Reisfelder) Gewässern vorkommt. In den letzten Jahren hat sich der Zebrafisch als Modellorganismus zunächst in der Entwicklungsbiologie, später auch in der Molekularbiologie etabliert.

1.5.1 Vorteile des Zebrafischs als Modellorganismus

Durch die recht einfache, platzsparende und kostengünstige Haltung vieler Fische ist es möglich, entsprechend viele Nachkommen zu erzeugen. So kann ein Elternpaar etwa 200-300 befruchtete Eier pro Woche legen. Die extramaternale Entwicklung der Zebrafischeier sowie deren Transparenz eignen den Zebrafisch besonders gut vor allem für die Erforschung von Entwicklungsvorgängen und Lebendbeobachtungen der Larven. Außerdem können Transplantationsexperimente und Mutagenesescrines recht einfach und effizient in den Larven durchgeführt werden. Die Generierung transgener Fischlinien ist deutlich einfacher als bei anderen Modellorganismen. So werden beim Zebrafisch extrakorporal befruchtete Eier mit der Fremd-DNA injiziert. Diese DNA-Fragmente integrieren dann in das Genom und können bei Integration in die Keimbahn an die nächste Generation weitervererbt werden. Die Effizienz der Integration kann durch die Anwendung einer Transposasetechnik gesteigert werden. Dazu wird ein Enzym benötigt, das spezifische DNA-Abschnitte erkennt und dann den Transfer der zwischen diesen Stücken liegenden Sequenz in das Genom katalysiert. In der vorliegenden Arbeit wurde als Enzym die Tol2-Transposase verwendet, die ursprünglich aus dem Medakafisch stammt und in Zebrafischen natürlicherweise nicht vorkommt. Dieses Enzym erkennt spezifisch die Tol2-Stellen, die die Fremd-DNA flankieren. Die DNA-Konstrukte werden zusammen mit Tol2-Transposase mRNA in befruchtete Zebrafischeier im Einzellstadium injiziert. Die Tol2-Transposase mRNA wird dann im Ei in aktives Transposase Protein translatiert und katalysiert so die Integration der

DNA-Fragmente in das Zebrafischgenom. Die Effizienz kann mit Hilfe dieser Technik auf bis zu 50% an transgenen Nachkommen gesteigert werden (Kawakami, 2005). Die Transposasetechnik wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich mit dem aus der Drosophila- und Hefegenetik bekannten Gal4/UAS-System kombiniert (Brand and Perrimon, 1993; Ptashne, 1988), wodurch die Expressionseffizienz der transgenen Proteine zusätzlich gesteigert werden konnte.

1.5.2 Das Nervensystem des Zebrafischs

Obwohl ein Zebrafisch dem Menschen rein optisch überhaupt nicht gleicht, gibt es in der Entwicklung und Morphologie der einzelnen Organe deutliche Ähnlichkeiten. Das Nervensystem ist dem des Menschen sehr ähnlich bezüglich der Organisation wie auch der vorkommenden Zelltypen. Außerdem ist das Nervensystem der Zebrafische bereits nach 24 Stunden sehr weit entwickelt. Schon nach wenigen Tagen können von den Fischen komplexe Vorgänge wie Schwimmen, Nahrungsaufnahme und Fluchtverhalten koordiniert werden. In den Larven findet man bereits sehr früh ein ausgeprägtes Gehirn, das in Vorder-, Mittel- und Nachhirn unterteilt ist und verzweigte neuronale Netzwerke enthält. Die Myelinisierung wird auch im Zebrafisch von den unterschiedlichen Gliazelltypen (Oligodendrozyten im ZNS, SZ im PNS) durchgeführt (Brösamle and Halpern, 2002; Park et al., 2002; Tomizawa et al., 2000a). Außerdem findet man radiale Gliazellen vor allem im Auge (Tomizawa et al., 2000b) und sternförmige Astrozyten vor allem im Rückenmark der Zebrafische (Kawai et al., 2001). An das Nachhirn schließt sich das Rückenmark an, das sich entlang des gesamten Körpers der Larve erstreckt. Im Rückenmark findet man den Zentralkanal, um welchen die Zellkörper der Astrozyten angelagert sind und ihre Fortsätze in die Peripherie des Rückenmarks erstrecken. Während sich die Zelltypen in Zebrafisch und Mensch sehr ähneln, unterscheidet sich die Verteilung der Myelinproteine in diesen Spezies. So findet man P0 in Vertebraten ausschließlich im PNS (Lemke and Axel, 1985), beim Zebrafisch und anderen Fischarten, wie beispielsweise der Forelle, wurden P0 bzw. dessen Orthologe jedoch nur im ZNS detektiert (Brösamle and Halpern, 2002; Stratmann and Jeserich, 1995). Mit diesen Eigenschaften eignet sich der Zebrafisch hervorragend zur Erforschung des Nervensystems sowie dessen Erkrankungen.

2. Zielsetzung der Arbeit

Das Nervensystem der Wirbeltiere ist ein sehr komplexes und lebenswichtiges Organ, das aus vielen unterschiedlichen Zelltypen besteht. Die korrekte Kommunikation aller Zelltypen, z.B. Neuronen, Oligodendrozyten, Schwann'schen Zellen und Astrozyten, sichert die Funktionalität des Nervensystems. Astrozyten galten lange Zeit lediglich als Zellen mit schützender und unterstützender Funktion. Mittlerweile weiß man jedoch, dass Astrozyten durch Kommunikation sowohl mit Neuronen wie auch mit anderen Gliazellen (z.B. Oligodendrozyten) (Carmen et al., 2007) u.a. den Myelinstatus im Nervensystem beeinflussen können und in der Lage sind, die synaptische Aktivität zu modulieren (Rossi and Volterra, 2009). In der vorliegenden Arbeit sollten Methoden entwickelt werden, mit denen die Kommunikation der Astrozyten mit anderen Zelltypen des Nervensystems untersucht werden können. So sollten verschiedene induzierbare Systeme generiert und kombiniert angewendet werden, um die Expression eines Toxins (A-Untereinheit des Diphtherietoxins) in Astrozyten während der Entwicklung der Zebrafischlarven steuern zu können. Anschließend sollten die Auswirkungen der transgenen Expression der Toxine bzw. der induzierten Ablation der Astrozyten auf den Myelinstatus der Larven mittels immunhistochemischen und biochemischen Methoden untersucht werden. In einem zweiten experimentellen Ansatz sollten Fusionsproteine aus einem Gliazellprotein (GFAP) mit und ohne Mutation und einem fluoreszenten Marker (GFP) transgen exprimiert und damit die humane Leukodystrophie *Alexander disease* (AXD) im Zebrafisch modelliert werden. Mit Hilfe von *in vivo*-Experimenten und Lebendbeobachtungen sollten anschließend Migrations- und Interaktionsprozesse der Gliazellproteine untersucht sowie Aggregations- und Abbaumechanismen der transgenen Proteine in den Astrozyten des Nervensystems erforscht werden. Dadurch soll die Rolle der Astrozyten detaillierter erforscht und im gesunden Nervensystem wie auch unter Krankheitsbedingungen untersucht werden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zebrafischlinien

Zur Herstellung transgener Fischlinien wurden AB Wildtypembryonen verwendet. Zur Auskreuzung der transgenen Zebrafische wurden *Tübingen long fin-* (TLF) beziehungsweise *albino*-Mutanten verwendet.

3.1.2 Vektoren und Plasmide

Vektor	Herkunft
GFAP-like (fc66a07EST)	Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung (RZPD), Berlin
gfap-promotor (pEGFP1-gfap regulatory elements)	P. Raymond, University of Michigan, Ann Arbor
pBS-gdf7-IRES-lox-neo-lox-DTA	T. Jessell, Columbia University, New York
pBS-RfA	A. Roure, Université de la Méditerranée, Marseille
pCR 2.1 TOPO	Invitrogen, Karlsruhe
pCR8/TOPO/GW	Invitrogen, Karlsruhe
pCSII-mnCre	R. Köster, Helmholtzzentrum München
pCS-CMV – lox eGFP lox – DsRed	L. Bailly-Cuif, Helmholtzzentrum München
peGFP C1	Clontech, Heidelberg
pSGH2	T. Czerny, Veterinärmed. Universität, Wien
pT2dCMVGal4VP16	D. Paquet, LMU München
pT2dDsRed-pA-DsRed.T4-E1b-UAS-E1b-GW-R1-R2pA	D. Paquet, LMU München

Material und Methoden

pT2dDsRed-UAS-Tau	D. Paquet, LMU München
pT2dHuCGal4VP16	D. Paquet, LMU München

Tabelle 1: Vektoren und Plasmide

3.1.3 Bakterienstämme

DH5α kompetente E.coli Zellen	Invitrogen, Karlsruhe
One Shot TOP10 E.coli Zellen	Invitrogen, Karlsruhe
One Shot ccdB Survival	
T1 Phage-Resistant Zellen	Invitrogen, Karlsruhe

3.1.4 Zelllinien

HEK 293T Zellen	humane embryonale Nierenzelllinie
-----------------	-----------------------------------

3.1.5 Enzyme und Chemikalien

Alle Restriktionsendonukleasen sowie Enzyme wurden, falls nicht anders angegeben, von Fermentas, St. Leon-Rot bezogen. Die nicht extra aufgeführten Laborchemikalien wurden bei den Firmen Merck (Darmstadt), Invitrogen (Karlsruhe), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (Taufkirchen) bezogen.

GoTaq Polymerase	Promega, Mannheim
Lipofectamin 2000	Invitrogen, Karlsruhe
MfeI	New England BioLabs, Schwalbach
MluNI	Roche Diagnostics, Mannheim
PacI	New England BioLabs, Schwalbach
PEG 4000	Fermentas, St.-Leon-Rot
ProteinaseK	Roche Diagnostics, Mannheim
Pwo	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
StuI	New England BioLabs, Schwalbach

Material und Methoden

2,5% Glutaraldehyd/Cacodylatpuffer	Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA
Acridin Orange	Sigma, Taufkirchen
Acrylamid/Bisacrylamid (37, 5:1) 40%	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma, Taufkirchen
Chloramphenicol	Sigma, Taufkirchen
Chloroquine	Sigma, Taufkirchen
DNA-Leiter (low/middle/high range)	Fermentas, St. Leon-Rot
ECL Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare, München
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
Fetales Kälberserum (FCS, steril)	Invitrogen, Karlsruhe
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
MG132	Calbiochem, Merck Gruppe, Darmstadt
Milchpulver frema Reform	Granivita, Heimertingen
NuSieve GTG low melting Agarose	Cambrex BioSciences, Rockland, ME, USA
PBS (steril)	Gibco, BRL Life Technologies, Karlsruhe
Penicillin	Invitrogen, Karlsruhe
Poly-L-Lysin	Sigma, Taufkirchen
Rapamycin	LC Laboratories, Woburn, MA, USA
Spectinomycin	Fluka, Sigma, Taufkirchen
Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe

Material und Methoden

Trypsin	Boehringer, Mannheim
Trypsin (Zellkultur)	Gibco, BRL Life Technologies, Karlsruhe
Ultra Pure™ Agarose	Invitrogen, Karlsruhe

3.1.6 Puffer und Lösungen

6x SDS-Ladepuffer	0,35M Tris-HCl (pH 6,8) 10,28% (w/v) SDS 36% (v/v) Glyzerin 0,6M DTT 0,012% Bromphenolblau
Tris-Glycine-Laufpuffer (10X)	29 g Tris 144 g Glycine ad 1 l H ₂ O 1% SDS mit H ₂ O auf 1X verdünnen
Lysepuffer	2mM Tris 2mM EDTA 2mM PMSF pH 7 KCl zugeben (0,5M oder 1M)
PBS (10X)	80 g NaCl 14,2 g Na ₂ HPO ₄ ⁻ *2H ₂ O 2 g KCl 2 g KH ₂ PO ₄

Material und Methoden

	ad 1 l H ₂ O, pH 6,8
	mit H ₂ O auf 1X verdünnen
PBST	1X PBS
	0,1 % Tween20
Stripping Puffer	7,57 g Tris
	200 ml 10% SDS
	ad 1 l H ₂ O, pH 6,7
TB	10mM HEPES
	15mM CaCl ₂ *2H ₂ O
	250mM KCl, pH 6,7, mit KOH einstellen
	55mM MnCl ₂ *2H ₂ O
	steril filtrieren
TBE (10X)	540 g Tris
	275 g Borsäure
	200 ml 0,5M EDTA
	ad 1 l H ₂ O
	mit H ₂ O auf 1X verdünnen
TBS (10X)	60,57 g Tris
	73,05 g NaCl
	ad 1 l H ₂ O, pH 7,6
	mit H ₂ O auf 1X verdünnen
TBST	1X TBS

Material und Methoden

	0,1% Tween20
TE	10mM Tris (pH 8) 1mM EDTA
Transferpuffer (10X)	30,3 g Tris 144 g Glycine ad 1 l H ₂ O, pH 8,3 mit H ₂ O und 20% MetOH (100%) auf 1X verdünnen

3.1.7 Medien

Dulbecco´s Eagle

modified Medium (DMEM) Invitrogen, Karlsruhe

E3-Medium (60X Stocklösung) 172 g NaCl
7,6 g KCl
29 g CaCl₂ *2 H₂O
49 g MgSO₄ *7 H₂O
mit dH₂O auf 1x verdünnen
Methylenblau zugeben

LB-Medium 10 g Trypton
5 g Hefeextrakt
5 g NaCl
ad 1 l H₂O, autoklavieren, pH 7,5

Optimem Invitrogen, Karlsruhe

SOB-Medium 20 g Trypton

Material und Methoden

5 g Hefeextrakt

0,5 g NaCl

10 mM MgCl₂

10 mM MgSO₄

2,5 mM KCl

ad 1 l H₂O, autoklavieren, pH 6,8

SOC-Medium

SOB-Medium

20mM Glucose (nach Autoklavieren)

3.1.8 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide (Primer) für PCR wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific, Ulm synthetisiert und sind in folgender Tabelle in 5'-3'-Richtung angegeben.

Name	Sequenz (5' → 3')
Beta-Actin-F	TGTTTTCCCCTCCATTGTTGG
Beta-Actin-R	TTCTCCTTGATGTCACGGAC
Cre for	GCATTTCTGGGGATTGCTTA
Cre rev	CCCGGCAAACAGGTAGTTA
DTA-F	TCGTACCACGGGACTAAACC
DTA-F1 (lox-F)	GCCAGAGGCCACTTGTGTAG
DTA-F2 (IRES lox for)	GATAGTTGTGGAAAGAGTC
DTA-R	CTTAACGCTTTCGCCTGTTC
DTA-R1 (DTA-lox rev)	AGAGCGGGTTTTTCATTATC
GFAP-F/ ClaI	CCATCGATGGATGGAGTCCCAGCGTTCCTTCTCA
GFAP-F/ ClaI_mod	CCATCGATATGGAGTCCCAGCGTTCCTTCTCA
GFAP-F mut	GAAGGAGATCCATGCTCAGTTTG

Material und Methoden

GFAP-R mut	TCAAACCTGAGCATGGATCTCCT
GFAP-R/ NheI	CTAGCTAGCTAGTTATGGCAGATCCTTCCTCTCC
GFP-F/ ClaI_neu	CCATCGATTGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG
GFP-R/ ClaI	CCATCGATGGTTGTACAGCTCGTCCATGC

Tabelle 2: Oligonukleotide

3.1.9 Antikörper

Die Primärantikörper wurden sowohl für immunhistochemische Untersuchungen (IHC) wie auch zur Analyse im Western Blot (WB) verwendet. Die Verdünnung für IHC erfolgte in 1% BSA in PBST, für WB in 3% Milch in TBST. Die Primärantikörper wurden vom Hersteller charakterisiert und auf ihre Spezifität getestet.

Antikörper gegen	Antigen	Spezies	Verdünnung	Firma
Azetyliertes Tubulin	Azetyliertes Tubulin des Seeigels	Maus	1:40000 (WB)	Sigma, Taufkirchen
DsRed (monoklonal)	Rot fluoreszierendes Protein der Scheibenanemone (DsRed)	Maus	1:500 (IHC)	Clontech, Heidelberg
DsRed (polyklonal)	DsRed-Express	Kaninchen	1:500 (IHC)	Clontech, Heidelberg
gfap	GFAP aus dem Rückenmark der Kuh	Kaninchen	1:1000 (IHC)	DAKO Deutschland, Hamburg
HuC	Synthetisches HuC Peptid humanen Ursprungs	Maus	1:1000 (IHC)	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
zrf-1	Zebrafisch GFAP	Maus	1:500 (IHC),	Zebrafish International

Material und Methoden

			1:2000 (WB)	Resource Center (ZIRC), University of Oregon, Eugene, OR, USA
--	--	--	-------------	--

Tabelle 3: Primärantikörper

Die Verdünnung der Sekundärantikörper für immunhistochemische Untersuchungen erfolgte in 1% BSA in PBST, für WB in TBST. Die Sekundärantikörper wurden vom Hersteller charakterisiert und auf ihre Spezifität getestet.

Antikörper	Antigen	Fluoreszenz	Verdünnung	Firma
Alexa Fluor 488 goat-anti-mouse	IgG schwere Kette und leichte Ketten von allen Ig-Klassen aus Maus	grün	1:500 (IHC)	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa Fluor 488 goat-anti-rabbit	IgG schwere Kette und leichte Ketten von allen Ig-Klassen aus Kaninchen	grün	1:500 (IHC)	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa Fluor 555 goat-anti-mouse	IgG schwere Kette und leichte Ketten von allen Ig-Klassen aus Maus	rot	1:500 (IHC)	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa Fluor 555 goat-anti-rabbit	IgG schwere Kette und leichte Ketten von allen Ig-Klassen aus	rot	1:500 (IHC)	Invitrogen, Karlsruhe

Material und Methoden

	Kaninchen			
Sheep-anti-mouse HRP	IgG aus Maus und Ratte	---	1:5000 (WB)	Amersham Biosciences, Freiburg

Tabelle 4: Sekundärantikörper

3.1.10 Kits

HiSpeed Midi Kit 25	Qiagen, Hilden
NucleoSpin Extract	Machery-Nagel, Düren
NucleoSpin Extract II	Machery-Nagel, Düren
TOPO®	Invitrogen, Karlsruhe
TOPO® Gateway	Invitrogen, Karlsruhe
mMessage Machine	Ambion, Austin, TX, USA
GeneClean USA	MP Biomedicals, LLC, Solon, OH, USA

3.1.11 Verbrauchsmittel und Geräte

Einbettformen	PolySciences, Eppelheim
Einbettmedium TissueTek	Sakura Finetek Europe, Zoeterwoude, Niederlande
Glaskapillaren 1B120F-4	World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA
Glaspipette	NeoLab, Heidelberg
Kanülen (0,60x30mm BL/LB)	Braun, Melsungen
Objektträger SuperFrost	Menzel, Braunschweig
LiquidBlocker	Daido Sangyo Co., Ltd., Tokyo, Japan
PCR-Platten	Thermo Fisher Scientific, Ulm

Material und Methoden

Präpariernadeln	VWR International GmbH, Darmstadt
Präparierpinzetten, Dumont	NeoLab, Heidelberg
PVDF-Membran	Millipore, Billerica, MA, USA
Reaktionsgefäße (50; 15; 2; 1,5; 0,5ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Röntgenfilme Super RX	Fujifilm Deutschland, Düsseldorf
Spitzen für Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzen (1ml ohne Nadel)	Terumo Europe, Leuven, Belgien
Whatman Blottingpapier	Schleicher & Schuell, Dassel
Zellkulturflaschen 25cm ²	nunc, Langenselbold
Zellschaber	Corning Inc., Corning, NY, USA
Analysewaage BP 3100 S	Sartorius, Göttingen
Entwickler	CAWO Photochemisches Werk GmbH, Schrobenhausen
Elektrophoresekammer für DNA	Peqlab, Erlangen
Elektrophoresekammer Mini-PROTEAN 3	BioRad, München
Expositionskassette	Kisker Biotech, Steinfurt
Feinwaage BP 221 S	Sartorius, Göttingen
Injektionsapparatur	Eppendorf, Hamburg
Inkubator (28,5°C)	Binder, Tuttlingen
Inkubator HeraCell (37°C, 5% CO ₂)	Heraeus, Hanau
Kamera Axiocam HRC	Zeiss, Jena
Kühlzentrifuge multifuge 30 S-R	Heraeus, Hanau
Kryostat Microm HM 560	Thermo Fisher Scientific, Ulm

Material und Methoden

Lichtquelle KL 1500 LCD	Zeiss, Jena
Magnetrührer RH Basic	IKA, Staufen
Mikroskope	
Axioplan imaging	Zeiss, Jena
Fluoreszenzbinokular MZ 16 FA	Leica, Bensheim
Konfokales Mikroskop LSM 519 META	Zeiss, Jena
Stereomikroskop Stemi 2000-C	Zeiss, Jena
Nanophotometer	Implen, München
DMZ-Universal Puller für Glaskapillaren	Zeitz Instruments, München
Neubauer-Zählkammer	Merck eurolab, Ismaning
pH-Meter	WTW, Weilheim
Pipetten (10µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipetten (20, 200, 1000µl)	Gilson, Middletown, WI, USA
Pipettierhilfe Accu-Jet	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler	BioRad, München
Thermoschüttler	Eppendorf, Hamburg
Tischschüttler Heidolph Duomax 1030	Hilab, Düsseldorf
Tischzentrifuge 3415D	Eppendorf, Hamburg
Transferkammer Mini-Trans Blot	BioRad, München
Schüttelinkubator Certomat BS1	Braun, Melsungen
Spannungsquellen	
Consort EV243/ EV231	Sigma, Taufkirchen
PowerPac 300	BioRad, München

UV-Lichtquelle zur Dokumentation von

Agarosegelen Vortex Genie2 Scientific Industries, Bohemia, NY, USA

Wasseraufbereitungsanlage Millipore, Billerica, MA, USA

Wasserbad GFL, Bergwedel

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (**polymerase chain reaction**) wurden bestimmte DNA-Bereiche vervielfältigt. Diese Methode wurde verwendet, um DNA-Fragmente für eine Ligation (Standard-PCR) zu erhalten oder um Genotypisierungen von Fischlarven und adulten Fischen (Genotypisierungs-PCR) durchzuführen. Für eine Standard-PCR wurden 100-500 ng Template-DNA, je 0,5µM des 5'- und 3'-Primers, 1mM dNTP-Mix (enthält je 10mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 5x GoTaq-Puffer (verdünnt auf 1x) und 0,1µl GoTaq-Polymerase benötigt. Das Gesamtvolumen für eine Standard-PCR betrug 20µl, die Differenz wurde mit dH₂O aufgefüllt. Für eine Kolonie-PCR zur Analyse von Bakterienkolonien wurde die entsprechende Kolonie in LB-Medium resuspendiert und dann 5-10µl der Suspension als Template in einem Gesamtvolumen von 50µl eingesetzt. Genotypisierungs-PCRs wurden in einem Gesamtvolumen von 20µl durchgeführt. Als Template wurden 5-10µl Lysat mit genomischer DNA eingesetzt.

3.2.1.2 Schneiden von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Plasmid-DNA (0,5-1µg) oder PCR-Produkte (5-10µg) wurden zur Analyse 1-2 h in einem Mix aus Restriktionsenzym (10U), passendem Puffer (1x) und dH₂O in einem Gesamtvolumen von 20µl bei entsprechender Temperatur im Wasserbad inkubiert. Für eine Klonierung verwendete DNA wurde über Nacht bei entsprechender Temperatur im Wasserbad inkubiert. Die geschnittenen DNA-Fragmente wurden dann mit Hilfe eines Agarosegels (siehe 3.2.1.9) aufgetrennt und daraus isoliert (siehe 3.2.1.10).

3.2.1.3 Dephosphorylierung

Die 5'-Phosphatgruppen der linearisierten Vektor-DNA wurden mittels alkalischer Phosphatase aus dem Kälberdarm (**c**alf **i**ntestine **a**lkaline **p**hosphatase (CIAP)) entfernt, um Re-Ligationen des Vektors ohne Insertions-DNA zu verhindern. Zur Dephosphorylierung wurden 10-40µl des linearisierten Vektors in 1x CIAP Reaktionspuffer, 1U CIAP sowie nukleasefreiem dH₂O in einem Endvolumen von 50µl für 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Danach wurde die Aktivität des Enzyms durch Erhitzen auf 85°C für 15 Minuten gestoppt.

3.2.1.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation eines verdauten DNA-Fragments in den mit den entsprechenden Enzymen linearisierten, dephosphorylierten Vektor erfolgte mittels des Enzyms T4-DNA Ligase. Für eine Ligation mit überhängenden Enden wurden 100-200 ng Vektor-DNA und 300-600 ng Insertions-DNA (Verhältnis Vektor:Insert 1:3) in einem Gesamtvolumen von 20µl in 1x T4-Ligationspuffer, T4-Ligase (1-2U) und dH₂O über Nacht bei 18°C inkubiert. Bei einer Ligation mit stumpfen Enden wurden Vektor und DNA-Insert im Verhältnis 1:1 eingesetzt. Außerdem wurde zusätzlich 50% PEG 4000 zur Reaktion zugegeben sowie die Menge an T4-Ligase entsprechend den Angaben des Herstellers auf 5U erhöht.

3.2.1.5 Herstellung transformations-kompetenter DH5α Zellen

Zur Herstellung transformations-kompetenter Zellen wurden zunächst Zellen des *Escherichia coli* (*E.coli*) Stammes DH5α auf einer Agarplatte ohne Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 100ml SOB-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und erneut über Nacht bei 37°C, schüttelnd bei 300rpm inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Lösung zu einem Gesamtvolumen von 250ml mit einer Optischen Dichte (OD) von 0,1 aufgefüllt. Diese Suspension wurde erneut für 20 bis 24 Stunden bei 18°C und 250rpm inkubiert. Sobald die Zellen eine OD von 0,6 bis 0,8 erreicht hatten, wurde die Lösung auf 50ml-Reaktionsgefäße verteilt und für zehn Minuten auf Eis inkubiert. Die folgenden Arbeitsschritte wurden alle bei 4°C durchgeführt. Es folgte eine Zentrifugation von 20 Minuten bei 3500rpm, 4°C. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet wurde dann in 16ml TB-Puffer (vorgekühlt) pro Reaktionsgefäß resuspendiert und für zehn Minuten auf Eis inkubiert. Nach wiederholtem Zentrifugieren (20 Minuten, 3500rpm,

4°C) wurde wiederum der Überstand verworfen, das Pellet nun in 4ml vorgekühltem TB-Puffer resuspendiert und 7% DMSO zugegeben. Nach zehnmütiger Inkubation auf Eis wurden 200µl-Aliquots hergestellt, die dann in flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend bei -80°C gelagert wurden.

3.2.1.6 Transformation in kompetente Zellen

Plasmide oder Ligationsprodukte wurden zur Vervielfältigung in kompetente Zellen transformiert. Hierzu wurden 1µl Plasmid-DNA oder 10µl des Ligationsansatzes zu 100µl kompetenten Zellen gegeben. Nach 15minütiger Inkubation auf Eis wurde ein Hitzeschock von 45-60 Sekunden bei 42°C im Wasserbad durchgeführt. Zu den kompetenten Zellen wurde anschließend 400µl SOC-Medium zugegeben. Die Suspension wurde dann eine Stunde bei 37°C, 200rpm inkubiert. Im Anschluss wurde die Lösung in zwei verschiedenen Konzentrationen auf vorgewärmte Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika über Nacht bei 37°C inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden entweder in einer Kolonie-PCR (siehe 3.2.1.1) analysiert oder zum Animpfen von Mini- oder Midi-Kulturen (siehe 3.2.1.8) verwendet.

3.2.1.7 Herstellen von Glycerinkulturen

Zur Konservierung der klonierten Plasmide wurde die transformierte Zellsuspension mit Glycerin (steril) im Verhältnis 4:1 gemischt. Die Lösung wurde dann in mit Trockeneis vorgekühltem EtOH (100%) eingefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.1.8 Präparation von Plasmid-DNA

3ml (Mini-Präp) bzw. 200ml (Midi-Präp) LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika wurden mit Bakterien-Einzelkolonien der LB-Platten (siehe 3.2.1.6) angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200rpm inkubiert. Anschließend wurde die DNA mittels NucleoSpin ExtractII bzw. HiSpeed Midi Kit 25 nach Angaben der Hersteller präpariert.

3.2.1.9 Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel

Um DNA-Fragmente nach einem Restriktionsverdau oder nach einer PCR entsprechend ihrer Größe aufzutrennen, sichtbar zu machen und aufzureinigen, wurden sie mit 6x Ladepuffer versetzt und auf ein 0,8%iges Agarosegel in TBE-Puffer mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,2 µg/ml) aufgetragen. Die Trennung

erfolgte aufgrund der unterschiedlichen Laufgeschwindigkeiten der Fragmente im elektrischen Feld. Als Größenstandard dienten DNA-Leitern mit verschiedenen Markerbanden (low, middle und high range). Die Elektrophorese wurde bei 120V in TBE-Puffer in einer Gelelektrophoresekammer durchgeführt.

3.2.1.10 Isolation von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel

In einem Agarosegel aufgetrennte DNA-Fragmente wurden mittels eines Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein 1,5ml-Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Mit Hilfe des NucleoSpinExtract Kits wurden die DNA-Fragmente dann nach Angaben des Herstellers aus der Agarose isoliert und für die Ligation (siehe 3.2.1.4) verwendet.

3.2.1.11 Sequenzierung von DNA

DNA-Konstrukte wurden von der Firma GATC Biotech AG in Konstanz durchgeführt. Die Analyse der Sequenzen erfolgte über Vector NTI Advance 10 (Invitrogen) sowie über das online verfügbare Programm „BLAST“ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>.

3.2.1.12 Gateway® Klonierung

Das von der Firma Invitrogen entwickelte sehr effiziente Gateway Klonierungssystem ist ein System zum Austausch von DNA-Sequenzen ohne herkömmlichen Restriktionsverdau und anschließende Ligation. Der Austausch der Sequenzen erfolgt hierbei nur über Rekombination. Bei dieser Methode kann ein im *Entry*-Vektor befindliches Gen, das von *att-L* Stellen flankiert ist, in einen *Destination*-Vektor transferiert werden, der *att-R* Stellen enthält. Die Rekombination wird bei dieser Methode vermittelt durch Zugabe des Enzyms LR-Clonase. Der entstehende Vektor, der das Gen flankiert von *att-B* Stellen enthält, wird nun *Expression*-Vektor genannt. Die Selektion der einzelnen Vektoren erfolgt aufgrund unterschiedlicher Selektionsmarker. Die Durchführung der Reaktion erfolgte nach Angaben des Herstellers.

3.2.2 Fischerarbeit

3.2.2.1 Aufzucht und Haltung der Zebrafische (Danio rerio)

Die Zebrafische wurden in der instituts-eigenen Fischanlage nach Standardmethoden gehalten und gezüchtet (Mullins et al., 1994; Westerfield, 1994).

Zusammensetzen von einem Männchen und einem Weibchen über Nacht in einer Ansetzbox resultierte in Zebrafischembryonen. Die Embryonen wurden für maximal sechs Tage in Embryonalmedium (E3) bei 28,5°C gehalten.

3.2.2.2 Herstellen von Injektionsplatten und -nadeln

10cm Petrischalen wurden etwa zur Hälfte mit 1,5%iger Agarose in E3-Medium gefüllt. In die flüssige Agarose wurde ohne Luftblasen zu erzeugen eine Form eingelegt. Nach Polymerisieren der Agarose (etwa 30 bis 60 Minuten) wurde die Form vorsichtig entfernt. Die entstandenen Rinnen wurden zum Fixieren der Embryonen während des Injektionsvorganges verwendet.

Injektionsnadeln wurden aus Glaskanülen am DMZ-Universal Puller ausgezogen und vor Füllen mit der Injektionslösung mit einer Pinzette aufgebrochen.

3.2.2.3 Injektion von DNA zur Herstellung transgener Zebrafischlinien

Transgene Zebrafischlinien wurden durch Mikroinjektion von entsprechender DNA zusammen mit Transposase mRNA in die erste Zelle von befruchteten Zebrafischeiern generiert. Hierzu wurden am Vorabend adulte Zebrafischpaare in Ansetzboxen mit einem Boxteller zusammengesetzt. Am nächsten Tag konnten etwa 15 Minuten nach Ziehen des Boxtellers die ersten Zebrafischeier entnommen werden. Die so erhaltenen Eier wurden in Injektionsplatten überführt, ausgerichtet und dann mit der entsprechenden DNA-Lösung mit 200hPa Injektionsdruck (p_i) injiziert. Die Injektionsdauer betrug 0,1 bis 0,2 Sekunden (t_i), der Kapillareffekt, also das Zurückziehen der Flüssigkeit in die Injektionsnadel, wurde durch den Kapillardruck (p_c) von 0hPa verhindert. Anschließend wurden die injizierten Embryonen in frische Petrischalen mit E3 Medium überführt und über Nacht bei 28,5°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden nicht befruchtete und deformierte Embryonen aussortiert, die intakten Embryonen wurden auf erfolgreiche Insertion der injizierten DNA sortiert (entweder über Fluoreszenz oder über eine Genotypisierungs-PCR). Nach der Identifizierung wurden die überlebenden Embryonen in E3 Medium ohne Methylenblau überführt, an das System der Fischanlage angeschlossen und aufgezogen.

3.2.2.4 Genotypisierung durch Fin Clips

Zur Genotypisierung von adulten Zebrafischen wurde ein Teil der Schwanzflosse mit einem sterilen Skalpell entfernt, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 100% MetOH überschichtet. Das Präparat wurde entweder bei -20°C gelagert oder direkt weiter verwendet. Hierzu wurde das MetOH soweit möglich abgezogen, anschließend wurden die Reaktionsgefäße bei Raumtemperatur mit geöffnetem Deckel inkubiert bis die gesamte Flüssigkeit vollständig verdampft war. Nach Zugabe von 25µl TE-Puffer/ Proteinase K (17mg/ml) pro Reaktionsgefäß wurden die Proben für mehrere Stunden bei 55°C inkubiert bis die Flossen komplett lysiert waren. Im Anschluss wurden zu jeder Probe 50µl TE-Puffer zugegeben und durch Inkubation der Reaktionsgefäße für fünf Minuten bei 95°C wurde die Proteinase K inaktiviert. Fünf Mikroliter der Suspension wurden als Matrize für die Genotypisierungs-PCR (siehe 3.2.1.1) verwendet.

3.2.2.5 Präparation von Gehirn und Rückenmark aus adulten Fischen

Zur Präparation von Gehirn und Rückenmark wurden adulte Fische in Eiswasser getötet und anschließend auf einer Sektionsplatte fixiert. Mit Pinzetten wurden zunächst die Schuppen und die Haut beseitigt. Zur Präparation des Gehirns wurden die Schädelknochen aufgebrochen und entfernt. Im Anschluss wurden das Fettgewebe und die das Rückenmark umgebenden Wirbelknochen so weit sezirt, bis das Rückenmark frei lag. Gewebe zur Analyse im Western Blot wurde sofort entnommen, umgehend in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -20°C gelagert. Zur immunhistochemischen Analyse wurden zunächst frei präpariertes Gehirn und Rückenmark im gesamten Organismus in 4% Paraformaldehyd über Nacht bei 4°C fixiert. Anschließend wurde das Gewebe mit Hilfe von Präparationspinzetten und –scheren aus dem Organismus sezirt. Material für die Analyse im Elektronenmikroskop wurde ebenfalls zunächst im gesamten Organismus in 2,5% Glutaraldehyd in Cacodylatpuffer fixiert und anschließend mit Hilfe von Präparationspinzetten und –scheren entnommen.

3.2.2.6 Hitzeanwendung zur Induktion des Transgens

Die Expression der ablations-assoziierten Transgene wurde durch Anwendung von Hitze induziert. Die Gelege aus den Verkreuzungen der beiden transgenen Linien wurden an Tag eins halbiert. Eine Hälfte wurde als Kontrolle bei Raumtemperatur

inkubiert, die zweite Hälfte wurde dem Hitzeschock ausgesetzt. Dazu wurden die Embryonen in Petrischalen (ø 60mm) mit frischem E3-Medium überführt. Diese Petrischalen mit den Embryonen wurden anschließend in ein Wasserbad mit einer Temperatur von 37°C gestellt und dort für eine bis anderthalb Stunden inkubiert. Im Anschluss wurden die Embryonen wieder in Petrischalen (ø 94mm) mit frischem E3 Medium überführt und bis zur weiteren Untersuchung zusammen mit den nicht hitze-behandelten Kontrollen auf Raumtemperatur inkubiert.

3.2.3 Immunhistochemische Methoden

3.2.3.1 „Whole-mount“ Immunhistochemie

Für die immunhistochemische Analyse von ganzen Zebrafischlarven wurden die Larven über Nacht in 4% PFA bei 4°C fixiert. Anschließend wurde die Fixationslösung abgezogen, die Larven wurden mit 100% MetOH überschichtet und bei -20°C gelagert. Nach jeweils je fünfminütiger Rehydratation in einer absteigenden MetOH-Reihe (75%, 50%, 25% je in PBST) und anschließender Inkubation in PBST (dreimal je fünf Minuten) wurden die Larven für 30 Minuten bei 37°C in 0,1% Trypsin in 1mM EDTA in PBS inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in PBST erfolgte eine Behandlung mit 0,5% Hyaluronidase in PBST bei 37°C für 30 Minuten (zwei Tage alte Larven) bzw. 45 Minuten (drei bis sechs Tage alte Larven). Anschließend wurden die Larven erneut in PBST gewaschen. Danach wurden unspezifische Bindungsstellen mit 5% BSA in PBST geblockt (ein bis zwei Stunden, RT). Die Inkubation in der Primärantikörperlösung erfolgte über Nacht bei 4°C. Die Verdünnungen der Primärantikörper in 1% BSA in PBST können Tabelle 3 (siehe 3.1.9) entnommen werden. Am folgenden Tag wurden die Larven viermal für je 15 Minuten in PBST gewaschen, anschließend erfolgte die Inkubation in Sekundärantikörperlösung über Nacht bei 4°C oder für zwei Stunden bei RT im Dunkeln. Die Verdünnungen für die Sekundärantikörper in 1% BSA in PBST sind in Tabelle 4 (siehe 3.1.9) aufgeführt. Nach mehreren Waschschritten in PBST erfolgte die Analyse der gefärbten Larven im Fluoreszenzmikroskop. Bei Färbungen mit dem neuronalen Marker HuC wurde der Trypsin-/Hyaluronidaseverdau durch eine zwanzigminütige Inkubation in Proteinase K (30µg/ml in dH₂O) ersetzt.

3.2.3.2 Einbetten von Zebrafischlarven/ -gewebe für Gefrierschnitte

Zebrafischlarven bzw. -gewebe wurden in 4% PFA über Nacht bei 4°C fixiert und anschließend über Nacht bei 4°C in 30%iger Sukroselösung inkubiert. Die Proben wurden dann in Einbettformen mit Einbettmedium überführt, mit Präpariernadeln ausgerichtet und dann auf Trockeneis eingefroren. Anschließend wurden die Probenblöcke bei -20°C gelagert oder direkt am Kryostaten 10µm dünne Schnitte angefertigt, auf SuperFrost Objektträger aufgenommen und bei -20°C gelagert oder direkt bearbeitet.

3.2.3.3 Immunhistochemische Analyse von Gefrierschnitten

Zu analysierende Gefrierschnitte wurden auf RT aufgetaut und kurz getrocknet. Die Schnitte wurden dann mit einem fetthaltigen Stift umrandet und anschließend zweimal für je 20 Minuten in PBST gewaschen. Dann wurden die Präparate für ein bis zwei Stunden in 5% BSA in PBST inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungsstellen abzusättigen. Die Inkubation in Primärantikörperlösung erfolgte über Nacht bei 4°C. Die Verdünnung der Primärantikörper in 1% BSA in PBST kann Tabelle 3 (siehe 3.1.9) entnommen werden. Am folgenden Tag wurden die Schnitte dreimal je 30 Minuten in PBST gewaschen und anschließend für zwei bis drei Stunden in Sekundärantikörperlösung inkubiert. Die Verdünnung der Sekundärantikörper in 1% BSA in PBST ist in Tabelle 4 (siehe 3.1.9) aufgeführt. Nach dreimaligem Waschen in PBST (jeweils 30 Minuten) wurden die Präparate mit einigen Tropfen Mowiol beschichtet und anschließend mit Deckgläschen abgedeckt und im Dunkeln bis zur Analyse am Fluoreszenzmikroskop gelagert.

3.2.4 Zellkultur

3.2.4.1 Kultivierung von HEK 293T Zellen

HEK 293T Zellen wurden in Zellkulturflaschen (25cm²) in 5ml Dulbecco's Eagle modified medium (DMEM)/ 10% fetales Kälberserum (FCS)/ Penicillin/ Streptomycin (Pen/Strep) bei 5% CO₂ und 37°C kultiviert. Sobald die Zellen konfluent waren, wurden sie mit 1xPBS (steril) gewaschen und anschließend mit 0,5ml Trypsin von der Flasche gelöst. Im Anschluss wurde die Zellsuspension entsprechend ihrer Dichte in neue Zellkulturflaschen überführt und mit frischem Medium inkubiert.

3.2.4.2 Beschichtung von Deckgläschen mit Poly-L-Lysin (PLL)

Zur besseren Anhaftung der Zellen an Deckgläschen, die zur Immunfärbung verwendet wurden, wurden die Deckgläschen vor der Kultivierung der Zellen mit Poly-L-Lysin beschichtet. Hierzu wurden die Deckgläschen in 80% EtOH getaucht und abgeflammt. Anschließend wurden die Deckgläschen für 30 Minuten in PLL (10mg/ml in 1xPBS, steril) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in 1x PBS (steril) und Trocknen der Deckgläschen wurden sie einzeln in Kulturschalen gelegt und die Zellsuspension zugegeben. Nach erfolgreichem Anwachsen der Zellen auf den Deckgläschen wurden sie zur Transfektion und anschließend für Immunfärbungen verwendet.

3.2.4.3 Transiente Transfektion von DNA in HEK 293T Zellen

Die Zellen wurden vor der Transfektion in entsprechende Zellkulturgefäße ausgesät und bis zu einer Konfluenz von etwa 80% kultiviert. Für Transfektionen in 3,5cm-Platten wurden 1-2µg DNA mit Hilfe von Lipofectamin 2000 (Invitrogen) entsprechend den Angaben des Herstellers transfiziert. Nach sechs bis acht Stunden wurde das Transfektionsmedium durch Vollmedium ersetzt. Die Zellen wurden 24 bis 48 Stunden nach Transfektion für Immunfärbungen verwendet bzw. geerntet und die Proteinlevels im Western Blot analysiert.

3.2.5 Biochemische Methoden

3.2.5.1 Lyse von kultivierten, transfizierten Zellen

Die Lyse von Zellkulturproben erfolgte auf Eis. Kultivierte und transfizierte HEK 293T Zellen wurden mit 1xPBS (steril) gewaschen und anschließend in 1xPBS mit Hilfe eines Zellschabers von den Kulturgefäßen abgelöst. Die Zellsuspension wurde dann in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und auf Eis inkubiert. Nach einem kurzen Zentrifugationsschritt (30 Sekunden, 4°C) wurde das Pellet erneut mit 1xPBS gewaschen. Nach wiederholtem Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet entweder sofort in Lysepuffer resuspendiert und weiter analysiert oder bei -20°C gelagert. Nach Resuspension des Pellets in 500µl des entsprechenden Lysepuffers erfolgte eine 15minütige Zentrifugation bei 13000xg, 4°C. Der resultierende Überstand wurde mit 75µl des 6x SDS Laufpuffers versetzt, das Pellet in etwa 500µl des 6xSDS-Laufpuffers resuspendiert. Anschließend wurden die

Proben für fünf Minuten bei 95°C, 500rpm gekocht. Nach kurzem Zentrifugieren erfolgte die Analyse in der SDS-PAGE (siehe 3.2.5.3).

3.2.5.2 Lyse von Fischlarven

Die Lyse von Fischlarven bzw. Fischgewebe erfolgte auf Eis. Die Larven oder Gewebe wie Hirn und Rückenmark wurden entweder umgehend in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -20°C gelagert oder sofort mit Lysepuffer versetzt und weiter verwendet. Das Material wurde in etwa 500µl des entsprechenden Lysepuffers mit Hilfe von Kanülen und Spritzen durch wiederholtes auf- und abziehen homogenisiert. Das Homogenat wurde dann für fünf Minuten bei 6000xg, 4°C zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in 6x SDS Laufpuffer resuspendiert. Ein Teil des resultierenden Überstands wurde ebenfalls mit 6x SDS Laufpuffer versetzt, der weitere Teil wurde erneut für 30 Minuten bei 13000xg, 4°C zentrifugiert. Das zweite Pellet wurde ebenfalls in 6x SDS Laufpuffer resuspendiert, zum zweiten Überstand wurde 6x SDS Laufpuffer zugegeben. Die Proben wurden dann für fünf Minuten bei 95°C, 500rpm gekocht. Nach kurzem Zentrifugieren erfolgte die Analyse in der SDS-PAGE (siehe 3.2.5.3).

3.2.5.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine aus Zell- bzw. Fischlysaten wurden in einer SDS-PAGE aufgrund ihrer molekularen Größe analysiert. Die Gele verfügten hierbei über einen Trenngelbereich von etwa 7cm Länge und über ein Sammelgel von ca. 1 cm Gesamtlänge. Die Glasplatten (Stärke 1,5cm) für die Gele wurden vor Verwendung mit 80% EtOH von Rückständen befreit. Das Trenngel wurde anschließend bis etwa 2cm unterhalb des oberen Randes zwischen die Platten gefüllt und danach mit Isopropanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation des Acrylamids (etwa 20 Minuten) wurde überschüssiges Isopropanol abgegossen und kleinere Rückstände mit einem saugfähigen Tuch entfernt. Anschließend wurde das Sammelgel eingefüllt und ein Kamm für 12 bzw. 15 Taschen eingesteckt. Nach erfolgreicher Polymerisation des Sammelgels mit den Probenaschen wurde das Gel in die Elektrophoresekammer gestellt, die dann mit Laufpuffer gefüllt wurde. Nach Entfernen des Kammes, wurden die Taschen gründlich mit einer Glaspipette mit Laufpuffer gespült, um Rückstände zu entfernen. Die vorbereiteten Proben (siehe 3.2.5.1, 3.2.5.2) wurden anschließend in die Taschen gefüllt. Im Sammelgelbereich erfolgte die Elektrophorese mit 80V

Material und Methoden

(etwa 30 Minuten), im darauffolgenden Trenngelbereich mit 120V (etwa 60 bis 90 Minuten).

Die Zusammensetzungen von Trenn- und Sammelgel sind in Tabelle 5 angegeben.

	Trenngel 10% (für 2 Gele)	Sammelgel 4% (für 2 Gele)
<i>H₂O (ml)</i>	9,8	3,2
<i>0,5M Tris/ pH 6,8/ 0,4% SDS (ml)</i>	/	1,25
<i>1,5M Tris/ pH 8,8/ 0,4% SDS (ml)</i>	5	/
<i>40% Acrylamid/ Bisacrylamid (ml)</i>	5	0,5
<i>10% APS (μl)</i>	200	50
<i>TEMED (μl)</i>	20	5

Tabelle 5: Trenn- und Sammelgelzusammensetzung

3.2.5.4 Western Blot

Nachdem die Proteine erfolgreich in einer SDS-PAGE aufgetrennt worden waren, wurden sie zur weiteren Analyse auf eine PVDF-Membran übertragen. Diese wurde vor Verwendung durch 15sekündiges Inkubieren in 100% MetOH aktiviert, anschließend zweimal in dH₂O gewaschen und dann in vorgekühltem Transferpuffer äquilibriert. Ebenfalls vor dem Transfer in kaltem Transferpuffer äquilibriert wurden zwei Schwämme, vier Blottingpapiere und das Gel.

Folgender Aufbau wurde im Transfersystem eingehalten (Kathode → Anode):

- Schwamm
- 2X Whatman Blottingpapier
- Gel
- PVDF-Membran
- 2x Whatman Blottingpapier
- Schwamm

Das so entstandene „Sandwich“ wurde zusammen mit einem Eispack in die Blottingkammer gegeben, die dann wiederum mit Transferpuffer gefüllt wurde. Der Transfer wurde bei konstanten 400mA eine Stunde lang durchgeführt. Nach erfolgreichem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran wurden unspezifische Bindungsstellen für den Antikörper durch eine einstündige Inkubation in 3% Milchlösung in 1XTBST bei Raumtemperatur abgesättigt. Anschließend wurde der Primärantikörper in einer 1%igen Milchlösung in 1XTBST zugegeben und über Nacht bei 4°C schüttelnd inkubiert. Die Verdünnung der verwendeten Primärantikörper ist Tabelle 3 (siehe 3.1.9) zu entnehmen. Am folgenden Tag wurde die Membran viermal je 15 Minuten in 1xTBST gewaschen und anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur schüttelnd mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Die Verdünnung der verwendeten Sekundärantikörper ist in Tabelle 4 (siehe 3.1.9) aufgelistet. Nach erneutem viermaligem Waschen folgte die Detektion der Antikörperkomplexe über die enhanced chemoluminescence (ECL)-Technik.

3.2.5.5 „Strippen“ von Western Blot Membranen

Um eine PVDF-Membran mehrfach mit verschiedenen Antikörpern zu untersuchen, wurde der erste Antikörper nach erfolgreicher Detektion durch das sogenannte „Strippen“ der Membran wieder entfernt. Dazu wurde die Membran zunächst dreimal für je 15 Minuten in TBST gewaschen. Anschließend wurde die Membran für zwei Stunden in Stripping Puffer im Wasserbad bei 55°C unter konstantem Schütteln inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen in TBST und Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen mit 3%iger Milchlösung wurde die Membran erneut zur Analyse mit einem Antikörper (siehe 3.2.5.4) verwendet.

4. Ergebnisse

4.1 Ablation von Astrozyten

Der Zebrafisch (*Danio rerio*) vereinigt als Modellorganismus in der Biologie viele Vorteile in sich. So entwickeln sich die Larven beispielsweise außerhalb des mütterlichen Körpers. Außerdem sind die Larven transparent, wodurch Entwicklungsprozesse am Mikroskop verfolgt werden können. Die Entwicklung des Nervensystems ist bereits nach etwa vier Tagen sehr weit fortgeschritten und zudem der von Säugetieren sehr ähnlich. Dies ermöglicht die Untersuchung von unterschiedlichen Prozessen, wie beispielsweise Zellwanderungen sowie Interaktionen unterschiedlicher Zelltypen, in diesen Larven. In der vorliegenden Arbeit war der Fokus auf die Erforschung der Astrozyten sowie deren Interaktionen mit Neuronen und anderen Gliazellen gerichtet. Diesen Zellen wurde auf unterschiedliche Weise Stress zugefügt und anschließend die Auswirkungen auf das gesamte Nervensystem untersucht. Als Stressbedingungen wurden zum einen die konditionelle Ablation von Astrozyten wie auch die transgene Expression von krankheits-assoziierten Formen von GFAP in Astrozyten (siehe 4.2) verwendet.

4.1.1 Konstrukte zur Etablierung der induzierbaren Fischlinien

Um Astrozyten in spezifischen Stadien der Entwicklung des Organismus ausschalten und die Auswirkungen auf das Nervensystem des Lebewesens untersuchen zu können, wurde ein induzierbares System verwendet. Dabei handelt es sich um eine Kombination aus einer hitze-induzierbaren Methode und dem Cre/loxP System. Dazu wurden mit Hilfe der im Folgenden erläuterten Konstrukte stabil transgene Zebrafischlinien generiert, die für die Versuche verwendet wurden. Eine Kombination der beiden Systeme erlaubt die Induktion der Genexpression in spezifischen Geweben.

4.1.1.1 Das hitze-induzierbare Cre-Rekombinase Konstrukt

Die hitze-induzierbare Komponente besteht aus einem bidirektionalen Konstrukt, das acht repetitive, hitze-induzierbare Hitzeschockpromotorelemente (HSE) enthält, die beidseitig von Minimalpromotoren flankiert sind. Der erste Minimalpromotor treibt das grün fluoreszierende Protein (GFP) als fluoreszierenden Reporter an, der die Identifizierung der transgenen Larven mittels eines Fluoreszenzbinokulars ermöglicht. GFP dient dadurch als Reporter für die erfolgreiche Hitzeinduktion des

Konstrukts. Auf den zweiten Minimalpromotor folgt eine „multiple cloning site“ mit Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen, über die bestimmte Sequenzen inseriert werden können (Bajoghli et al., 2004). Für die hier verwendete Strategie wurde die für die Cre-Rekombinase kodierende Sequenz aus einem Ursprungsvektor (pCSII-mnCre) über EcoRI/XhoI-Schnittstellen eingefügt. Nach erfolgreicher Insertion der Cre-Rekombinase wurde die gesamte hitze-induzierbare Kassetten über I-Sce-I-Schnittstellen aus dem Vektorrückgrat entfernt, die entstandenen überhängenden Enden mit Hilfe des Klenow-Enzyms aufgefüllt und anschließend in den pminiTol2-Vektor integriert, der zuvor über eine EcoRV-Schnittstelle linearisiert und dann dephosphoryliert worden war. In diesem neuen Rückgrat ist die hitze-induzierbare Kassetten von Tol2 Stellen flankiert, die zusammen mit dem Enzym Tol2-Transposase eine effiziente Integration der zwischen den Tol2-Stellen liegenden Sequenzen in das Genom des Empfängerorganismus katalysieren (Kawakami, 2005) (Abbildung 7A).

4.1.1.2 Cre-Rekombinase-induzierbares Diphtherietoxin A Konstrukt

Das Konstrukt, das die Zielsequenzen für die Cre-Rekombinase, also die loxP-Stellen, enthält, ist im pminiTol2-Rückgrat kloniert. Hierfür wurde der Vektor zunächst über eine MluNI-Schnittstelle linearisiert. Der *gfap*-Promotor, der die Expression spezifisch auf Astrozyten beschränkt (Bernardos and Raymond, 2006), wurde über Sall/XhoI-Schnittstellen aus seinem Ursprungsvektor isoliert und die entstandenen überhängenden Enden mittels Klenow-Enzym aufgefüllt. Anschließend wurde der Promotor in den linearisierten pminiTol2-Vektor kloniert. In diesen neuen Vektor wurde über EcoRV-Schnittstellen eine so genannte Gateway Kassetten mit *attR*-Rekombinationsstellen (Invitrogen, Karlsruhe) aus dem Donorvektor pBS-RfA inseriert. Den neu entstandenen Vektor bezeichnet man als *Destination*-Vektor, da er eine Sequenz aufnehmen kann, die zwischen *attL*-Stellen in einem zweiten Vektor liegt. Diese *attL*-Stellen sind zu den *attR*-Stellen kompatibel, die Übertragung der dazwischen liegenden Sequenzen erfolgt über Rekombination. Die Gateway-Technologie ist ein von Invitrogen® entwickeltes Verfahren, das innerhalb kürzester Zeit sehr effiziente Klonierungen ermöglicht. Über diese Methode wurde eine Kassetten mit Erkennungsstellen für die Cre-Rekombinase („loxP-Stellen“) in den *Destination*-Vektor rekombiniert. Diese Sequenz startet mit einer „*internal ribosomal entry site*“ (IRES). Anschließend enthält sie die loxP-Stellen, die eine Stopsequenz flankieren (man spricht dann von einer „geflochten“ Stopsequenz). An diesen

geflochten Abschnitt schließt sich die Sequenz für die A-Untereinheit des Diphtherietoxins (DTA) an. Diese gesamte Kasette wurde über PacI-Schnittstellen aus ihrem Ursprungsvektor herausgelöst und anschließend mit dem Enzym EcoRI nachverdaut. Über diese Schnittstellen wurde die Kasette dann in den pCR8GW-Vektor kloniert, der die zu den vorher beschriebenen *attR*-Rekombinationsstellen kompatiblen *attL*-Stellen enthält. Diesen Vektor nennt man *Entry*-Vektor, da er die Sequenz zwischen den *attR*-Stellen in den *Destination*-Vektor übertragen kann. Eine Rekombination der beiden Gateway-Konstrukte führte schließlich zum Endprodukt, dem so genannten *Expression*-Vektor, der den *gfap*-Promotor gefolgt von einer IRES und einer geflochten Stopsequenz sowie anschließend die Sequenz für DTA enthält (Abbildung 7B). Das Diphtherietoxin A ist in diesem Konstrukt nicht aktiv, solange die Stopsequenz vorhanden ist. Erst nach Entfernen der geflochten Stopsequenz durch die Cre-Rekombinase wird das DTA aktiviert und exprimiert.

4.1.1.3 Zweifach transgene Fischlinien

Die beiden beschriebenen Konstrukte wurden verwendet, um stabil transgene Fischlinien zu etablieren. In den anschließenden Ablationsexperimenten wurden stabil transgene Nachkommen beider beschriebener Fischlinien miteinander verkreuzt. In diesen Embryonen wurde dann durch Hitze die ubiquitäre Expression der Cre-Rekombinase induziert. Die zellspezifische Induktion des DTA erfolgte über das zweite Transgen und dessen astrozyten-spezifischen *gfap*-Promotor. Da dieses Konstrukt ausschließlich in Astrozyten vorhanden war, wurde auch nur in diesem Zelltyp DTA aktiviert. Die Expression von DTA in Astrozyten blockiert in diesen Zellen die Proteinbiosynthese und führt so schließlich zum Absterben der Zellen (Abbildung 7C).

Ergebnisse

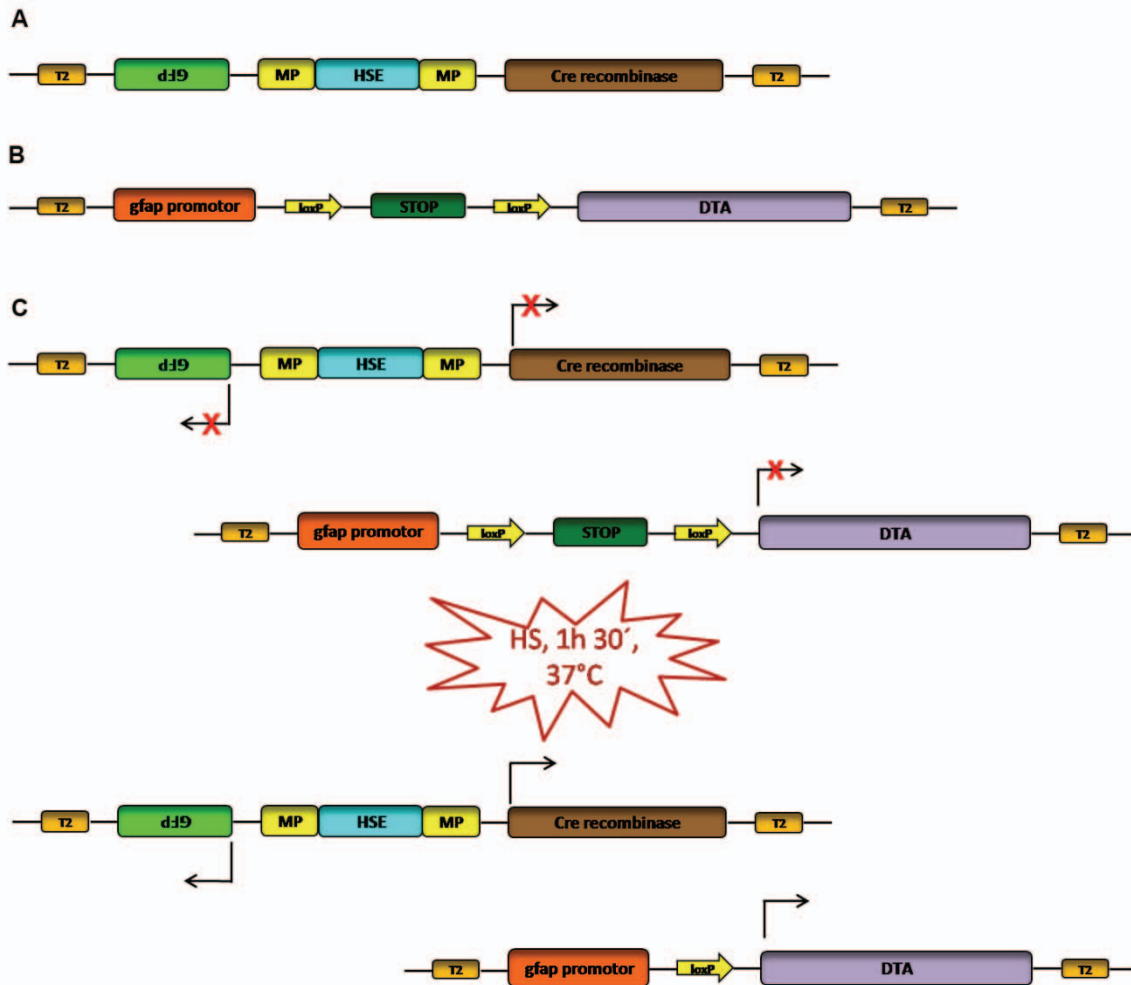


Abbildung 7: Konstrukte zur Herstellung der transgenen Fischlinien und methodisches Schema der Hitzeinduktion

Für die Etablierung der transgenen Fischlinien wurden zwei unterschiedliche Konstrukte verwendet.

A: Das Konstrukt für die Hitzeinduktion ist im pminiTol2-Rückgrat kloniert. Das bidirektionale Konstrukt enthält auf beiden Seiten der so genannten „heat shock elements“ (HSE) Minimalpromotoren (MP), die jeweils die Expression von GFP als fluoreszierenden Reporter und die Expression der inserierten Cre-Rekombinase antreiben.

B: Das Cre-Rekombinase-induzierbare Konstrukt ist im pminiTol2-Rückgrat kloniert. Dieses Konstrukt enthält den astrozyten-spezifischen *gfap*-Promotor, gefolgt von einer IRES (nicht angezeigt) sowie einer geflochtenen Stopsequenz, die wiederum von der Sequenz für DTA gefolgt wird.

C: Nach Verkreuzung der beiden transgenen Fischlinien entstehen Embryonen, die beide Transgene enthalten können. Die doppeltransgenen Embryonen wurden dann an Tag eins (1 day post fertilization, dpf) einem Hitzeschock (eine bis anderthalb Stunden bei 37°C im Wasserbad) ausgesetzt. Dies führte zur Aktivierung der Hitzeschockelemente und dadurch zur Expression von GFP und der Cre-Rekombinase. Die ubiquitär exprimierte Cre-Rekombinase erkennt spezifisch in Astrozyten die loxP-Stellen und bindet an diese. Dadurch wird das Entfernen der geflochtenen Stopsequenz katalysiert und somit die DTA-Expression aktiviert. Das Toxin blockiert in den Zellen die Proteinsynthese und führt so zum Absterben der Zelle.

T2: Erkennungsstellen für Tol2-Transposase, GFP: grün fluoreszierendes Protein, MP: Minimalpromotor, HSE: Hitzeschockpromotorelemente, DTA: Diphtherietoxin Untereinheit A

4.1.2 Die hitze-induzierbare Cre-Rekombinase

4.1.2.1 Herstellung der hitze-induzierbaren Fischlinie

Zur Etablierung stabil transgener hitze-induzierbarer Fischlinien wurde das DNA-Konstrukt (siehe 4.1.1.1) zusammen mit Tol2-Transposase-mRNA in Zebrafischembryonen im Einzellstadium injiziert. Die Tol2-Transposase-mRNA wird von der Zelle in Tol2-Transposase Protein translatiert, welches spezifisch die das Konstrukt flankierenden Tol2-Stellen erkennt und die effiziente Insertion der dazwischen liegenden Sequenzen in das Zebrafischgenom katalysiert. Durch die Anwendung der Transposasetechnik wird die Effizienz der Integration des Transgens in das Zebrafischgenom gesteigert und so die Anzahl an transgenen Nachkommen erhöht. Die injizierten Larven wurden dann zwei bis drei Tage nach Injektion Hitze ausgesetzt. Alle Embryonen, die nun in der Untersuchung am Fluoreszenzbinokular grüne Fluoreszenz zeigten, wurden bis zur Geschlechtsreife aufgezogen (F0-Generation). Diese Fische haben das Transgen nur zum Teil stabil in die Keimbahn integriert. Man spricht dann von „mosaik-transgenen“ Fischen. Nach Auskreuzen der geschlechtsreifen, injizierten F0-Fische mit Wildtypfischen kann man stabil transgene Nachkommen (F1-Generation), die das Transgen in allen Zellen besitzen und an ihre Nachkommen weitergeben, selektieren. Diese Fische wurden für die weiteren Ablationsexperimente verwendet.

Die Induktion des Konstrukts wurde überprüft, indem die Gelege stabil transgener Fische für eine bis anderthalb Stunden Hitze (37°C im Wasserbad) ausgesetzt und ein bis zwei Tage nach Hitzebehandlung am Fluoreszenzbinokular untersucht wurden. In den Gelegen wurden etwa 50% transgene Embryonen mit deutlich grüner Fluoreszenz detektiert (Abbildung 8A). Diese Zahl lässt darauf schließen, dass das Transgen in der Parentalgeneration einmal stabil in das Genom integriert wurde und an die folgenden Generationen weitervererbt wird. Die Fluoreszenzintensität variierte zwischen Nachkommen einzelner injizierter Fische, abhängig vom Ort der Integration der Fremd-DNA in das Genom. So wurden stark transgene Linien identifiziert, bei denen grüne Fluoreszenz überwiegend in Muskelzellen und in der Linse im Auge detektiert wurde (Abbildung 8B). In schwächeren Linien wurde grüne Fluoreszenz vornehmlich in Bereichen des zentralen Nervensystems gefunden, zum Beispiel im Hirn und Teilen des Rückenmarks sowie in den Radialgliazellen und Neuronen des Auges (Abbildung 8C). Sowohl stark transgene wie auch schwach transgene Linien

Ergebnisse

wurden aufgezogen, die Versuche wurden jedoch überwiegend mit Fischen der stark transgenen Linie durchgeführt.

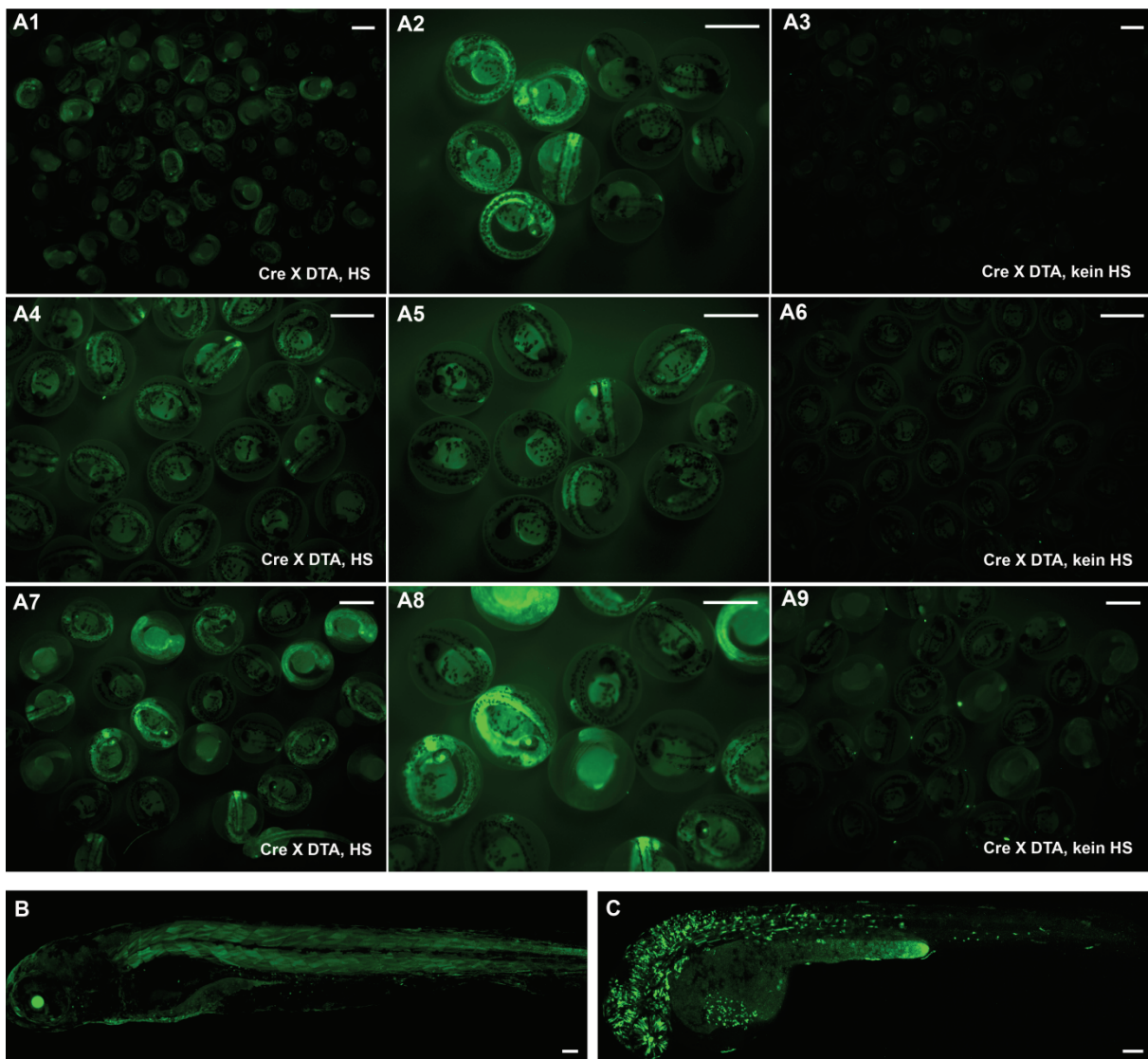


Abbildung 8: Hitzeinduktion von GFP in transgenen Embryonen

Die Induktion des Transgens wurde in Embryonen an 1 dpf durch Anwendung von Hitze (eine bis anderthalb Stunden, 37°C im Wasserbad) und anschließende Untersuchung der Gelege am Fluoreszenzbinokular kontrolliert.

A: Die Fluoreszenzintensität variierte stark zwischen den einzelnen transgenen Linien. Diese Abbildung zeigt drei unterschiedliche Gelege, die dem Hitzeschock ausgesetzt waren sowie die entsprechenden, nicht hitze-behandelten Kontrollen. In den hitze-behandelten Gelegen (1, 4, 7) war deutliche grüne Fluoreszenz in etwa 50% der Embryonen des Geleges zu erkennen, die Bilder 2, 5 und 8 zeigen eine Vergrößerung der hitze-behandelten Embryonen. In den nicht-behandelten Kontrollen (3, 6, 9) war kaum grüne Fluoreszenz in den Larven zu erkennen. Maßstab: 1mm.

B: In manchen transgenen Linien konnten GFP-positive Zellen überwiegend im Muskelgewebe der Fische und in der Linse im Auge detektiert werden. Maßstab: 100µm.

C: In anderen transgenen Linien waren deutlich weniger Zellen GFP positiv. Diese Zellen waren überwiegend im Gehirn und teilweise im Rückenmark sowie in den Radialgliazellen des Auges lokalisiert. Maßstab: 100µm.

4.1.2.2 Funktioneller Test der Cre-Rekombinase Aktivität nach Hitzeinduktion

Durch die grüne Fluoreszenz in den Larven kann zwar die Anwesenheit des Konstrukts wie auch die Induktion der Expression nach Hitzeeinwirkung nachgewiesen werden, nicht jedoch die Aktivität der Cre-Rekombinase. Um diese zu testen, wurde in transgene Embryonen das CMV-lox eGFP lox-DsRed-Testplasmid injiziert. Dieses Konstrukt enthält einen *cmv*-Promotor, gefolgt von einer geflochtenen GFP-Sequenz, die wiederum von einer DsRed-Sequenz gefolgt wird. In Abwesenheit der Cre-Rekombinase ist die DsRed-Sequenz inaktiv und das Konstrukt exprimiert nur GFP. Durch das Entfernen der GFP-Sequenz durch die Cre-Rekombinase wird die DsRed-Sequenz aktiviert und das Konstrukt exprimiert DsRed. Die GFP-Sequenz wird allerdings nur herausgeschnitten, wenn die Cre-Rekombinase anwesend und auch aktiv ist. Nach Injektion des Testplasmids in Cre-Rekombinase transgene Nachkommen sowie Hitzeschock und damit einhergehender Aktivierung der Cre-Rekombinase waren Embryonen mit grün, rot und rot-grün fluoreszierenden Zellen vorhanden (Abbildung 9). Die grüne Fluoreszenz resultierte aus der Induktion des GFP des Hitzeschockplasmids sowie aus (noch) nicht erfolgter, durch Cre-Rekombinase katalysierter Rekombination des Testplasmids. Die rote Fluoreszenz resultierte aus der DsRed-Expression nach erfolgreicher Rekombination und bereits erfolgtem Abbau der GFP-Fluoreszenz des hitze-induzierbaren Plasmids. Als in der Abbildung gelb erscheinende Fluoreszenz kann die Anwesenheit beider Fluorochrome, also GFP des hitze-induzierbaren Konstrukts sowie DsRed des Testplasmids, in einer Zelle interpretiert werden. Diese Ergebnisse lassen auf eine erfolgreiche Hitzeinduktion funktioneller Cre-Rekombinase schließen.

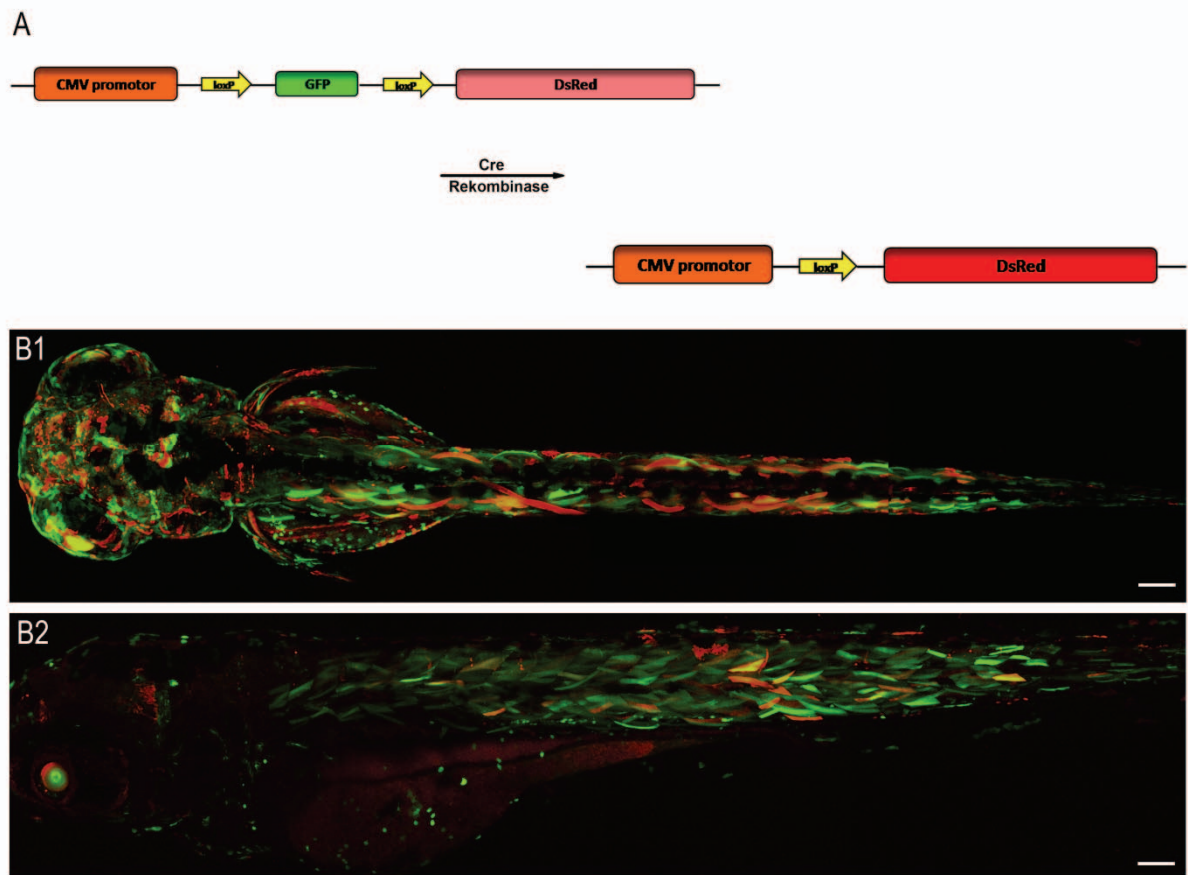


Abbildung 9: Funktioneller Test der Cre-Rekombinase

Die Funktionalität der Cre-Rekombinase wurde durch Mikroinjektion eines Testplasmids in Cre-Rekombinase transgene Larven verifiziert.

A: Die Expression des Testplasmids erfolgte unter einem *cmv*-Promotor, der ubiquitäre Expression vermittelt. Im Konstrukt folgte dann zunächst eine geflochte GFP-Sequenz, auf die dann eine DsRed-Sequenz folgte. Bei nicht vorhandener oder inaktiver Cre-Rekombinase kann grüne Fluoreszenz detektiert werden. Wird durch die Aktivierung der Cre-Rekombinase die geflochte GFP-Sequenz entfernt, wird die DsRed-Sequenz aktiviert und rote Fluoreszenz detektiert.

B: Die Injektion des Testplasmids in transgene Embryonen und anschließende Hitzeinduktion der Cre-Rekombinase resultierte in deutlich fluoreszenten Embryonen. Es wurde grüne Fluoreszenz detektiert, die zum einen durch die Hitzeinduktion des GFP-Reporters verursacht wird. Zum anderen war die grüne Fluoreszenz auch auf das Testplasmid und (noch) nicht erfolgte Rekombination zurückzuführen. Es erscheinen nicht alle Zellen des Embryos grün, da das Testplasmid nach Injektion ein mosaikales Expressionsmuster aufweist und die transgene Hitzeschock-GFP-Sequenz noch nicht in allen Zellen aktiviert ist. Die beobachtete rote Fluoreszenz resultierte aus erfolgreicher Rekombination des Testplasmids und bereits abgebautem GFP aus dem Hitzeschockplasmid, wohingegen bei roter und grüner Fluoreszenz beide Fluorochrome noch gleichzeitig in einer Zelle vorhanden waren. Diese Zellen erscheinen in der Abbildung gelb. Die Abbildung zeigt einen injizierten, transgenen Embryo sowohl in dorsaler Sicht (B1) als auch eine Seitenansicht des Embryos (B2). Maßstab: 100µm.

4.1.3 Cre-Rekombinase-induzierbares Diphtherietoxin A (DTA)

Eine weitere transgene Fischlinie wurde durch Mikroinjektion des DTA-Plasmids (siehe 4.1.1.2) zusammen mit Transposase-mRNA in Wildtyp-Larven generiert. Da dieses Konstrukt keinen Fluoreszenzreporter enthält, erfolgte die Selektion der transgenen Nachkommen über PCR mittels spezifischer Primer, die im Integrationskonstrukt liegen und so zum Nachweis der Integration verwendet werden können (Abbildung 10A). Zur Identifikation transgener Fische wurde die genomische DNA aus abgeschnittenen Schwanzflossenteilen der adulten Fische der F₀-Generation isoliert und anschließend in einer PCR die entsprechenden Sequenzen amplifiziert. Ein Ergebnis einer solchen Genotypisierung ist in Abbildung 10B in Form eines Agarosegels dargestellt. Die aus den DTA-Primern resultierende Bande war bei 400 bp zu erwarten, als Kontrolle wurde eine PCR mit Aktin-Primern durchgeführt. Die Bande für diese PCR lag bei 1270 bp. Bei dieser Kontrolle wurde die Anwesenheit des *aktin*-Gens und somit die Anwesenheit von genomischer DNA in der Probe nachgewiesen. In dem hier gezeigten Beispiel wurden 34 Proben genotypisiert, davon wurden 11 als eindeutig DTA-positiv identifiziert, die übrigen zeigten eine schwache oder keine Bande für das DTA-Plasmid, obwohl eine deutliche Bande für Aktin, also auch Template-DNA, vorhanden war. Bei schwachen Banden für DTA wurde eine zweite PCR zur Verifizierung der Ergebnisse durchgeführt. Die Negativkontrolle, deren PCR-Ansatz keine DNA enthielt, zeigte weder ein Signal in der Größe der DTA- noch der Aktin-Bande. Als Positivkontrolle wurde DNA eines bereits als positiv identifizierten transgenen Fisches verwendet. Diese Probe resultierte in Banden der entsprechenden Größe für beide Reaktionen. Die Nachkommen (F₁-Generation) identifizierter, transgener Elternfische wurden dann für die folgenden Ablationsexperimente verwendet. Die Integration des DTA-Plasmids in das Genom der Zebrafische zeigte keine negativen Auswirkungen auf das Überleben oder die Reproduktion der transgenen Fische.

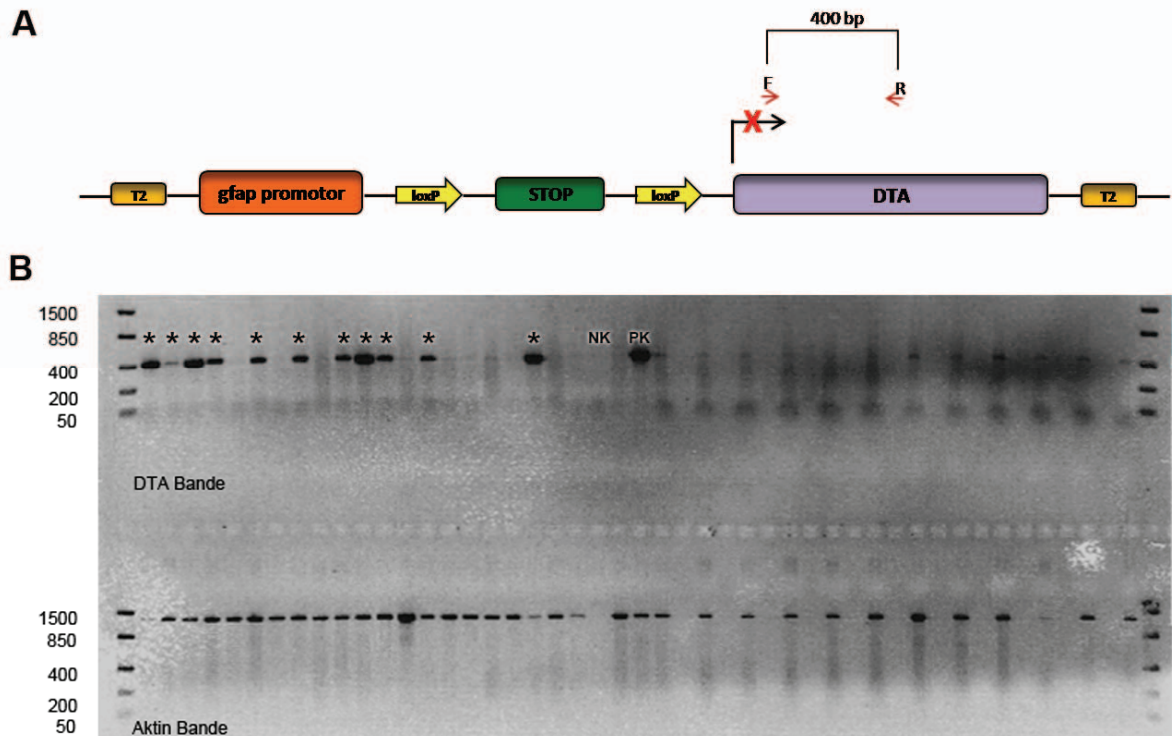


Abbildung 10: Genotypisierung der DTA-transgenen Fische (F0-Generations)

Da das Cre-Rekombinase-induzierbare Plasmid keinen Fluoreszenzreporter enthält, erfolgte die Genotypisierung der Fische mittels PCR.

A: Zur Genotypisierung der transgenen Fische wurden Primer verwendet, die in der DTA-Sequenz binden. Diese Primer resultieren in einer 400 bp großen Bande und geben Auskunft über die Anwesenheit des Konstrukts, nicht aber über die Induktion der DTA-Sequenz.

B: Repräsentativ ist hier die Genotypisierung von 34 Fischen gezeigt. Es wurde eine PCR für DTA sowie auch für Aktin als Kontrolle durchgeführt. Die getesteten Fische wiesen im Agarosegel alle eine Bande für Aktin bei einer Größe von 1270 bp auf, d.h. in allen Proben war Template-DNA vorhanden. Die Negativkontrolle (keine Template-DNA, NK) zeigte weder eine Bande für Aktin noch für DTA, wohingegen die Positivkontrolle (DNA eines bereits positiv identifizierten Fisches, PK) eine deutliche Bande sowohl für DTA als auch Aktin aufwies. 11 der 34 getesteten Fische wurden als eindeutig DTA-positiv (*) identifiziert.

4.1.4 Ablation von Astrozyten in doppeltransgenen Fischen

In den Ablationsexperimenten wurden adulte transgene Fische beider beschriebener Linien (siehe 4.1.2, 4.1.3) miteinander verkreuzt. Die daraus resultierenden Embryonen trugen potentiell beide Transgene. Die Wahrscheinlichkeit für die Übertragung eines Transgens bei nur einer Insertion in das elterliche Genom beträgt rein rechnerisch 50%. Da beide Elternteile je ein Transgen tragen, besteht für die Nachkommen damit bei jeweils nur einer Insertion des Transgens eine Wahrscheinlichkeit von 25%, beide Transgene, die für eine erfolgreiche Ablation benötigt werden, gemeinsam zu erhalten. 25% der Nachkommen tragen keines der beiden Transgene, jeweils 25% der Nachkommen tragen nur eines der beiden Transgene. Man muss demnach bei den Verkreuzungsexperimenten von potentiell

doppeltransgenen Nachkommen ausgehen. Die aus den Verkreuzungen der beiden Fischlinien resultierenden Gelege wurden an 2 dpf geteilt. Eine Hälfte wurde einem Hitzeschock unterzogen (Abbildung 7C), die zweite Hälfte diente als Kontrolle und wurde bei Raumtemperatur inkubiert. Etwa 24 Stunden nach Hitzeschock war grüne Fluoreszenz detektierbar und die Larven konnten weiter beobachtet und untersucht werden. Wie bereits in vorangegangenen Versuchen gezeigt wurde, wird durch Anwendung von Hitze sowohl GFP als auch die Cre-Rekombinase ubiquitär induziert. Diese bindet in Astrozyten an die entsprechenden Erkennungsstellen und katalysiert die Rekombination und damit das Entfernen der Stopsequenz. Dadurch wird die A-Untereinheit des Diphtherietoxins spezifisch in Astrozyten exprimiert. Durch die Präsenz des Toxins wird die Proteinsynthese in der entsprechenden Zelle blockiert (Herschman et al., 1982). Da in diesen Zellen keine neuen Proteine synthetisiert werden, führt die DTA-Expression letztlich zum Absterben dieser Zelle.

4.1.4.1 Vererbung der einzelnen Konstrukte in doppeltransgenen Embryonen

Bei einer einzigen Integration jeder Fremd-DNA in das Genom resultierte die Verkreuzung der beiden oben beschriebenen Fischlinien sowohl in doppeltransgenen Nachkommen (25%), wie auch in Nachkommen, die nur je ein Transgen trugen (50%) und in solchen, die keines (25%) erhalten hatten (Abbildung 11A). Bei mehrfachen Integrationen der Fremd-DNA können sich diese Zahlenverhältnisse allerdings verschieben und die Genetik wird deutlich komplexer als hier dargestellt. Um die Anwesenheit der unterschiedlichen Konstrukte zu überprüfen, wurde zunächst ein Hitzeschock mit den potentiell doppeltransgenen Embryonen durchgeführt und die hitzeschock-transgenen Nachkommen über Fluoreszenzuntersuchungen identifiziert. Dabei wurden 41% GFP-positive Larven detektiert. Von den Kontrollembryonen, die keinen Hitzeschock erfahren hatten, waren alle untersuchten Embryonen GFP-negativ (Abbildung 11B). Die im Vergleich zu vorherigen Versuchen niedrigere Zahl an GFP-positiven Embryonen ist auf Unterschiede zwischen Individuen der einzelnen transgenen Fischlinien oder eine etwas ineffizientere Hitzeinduktion durch Schwankungen der Temperatur oder der Hitzeschockdauer zurückzuführen. Da zwischen den einzelnen Elterntieren eine gewisse Varianz in der GFP-Intensität liegt, kann auch dies als Grund für die geringere GFP-Fluoreszenz angenommen werden. Weiterhin spielt eine Rolle, dass es sich bei den Fischen um Lebewesen handelt, die aufgrund äußerer Umstände

Ergebnisse

unterschiedlich reagieren können. Im Anschluss an die Analyse der GFP-Fluoreszenz wurden alle Embryonen lysiert und die genomische DNA als Template für eine DTA-PCR verwendet, um das Cre-Rekombinase-induzierbare Konstrukt nachzuweisen. Sowohl bei den hitze-behandelten als auch bei den Kontrollembryonen zeigte sich eine Verteilung von etwa 2/3 DTA-positiven zu 1/3 DTA-negativen Embryonen (Abbildung 11C). Da mehr als 50% an einfach-transgenen Nachkommen detektiert wurden, wurde die Fremd-DNA mehr als einmal an unterschiedlichen Loci in das Genom integriert.

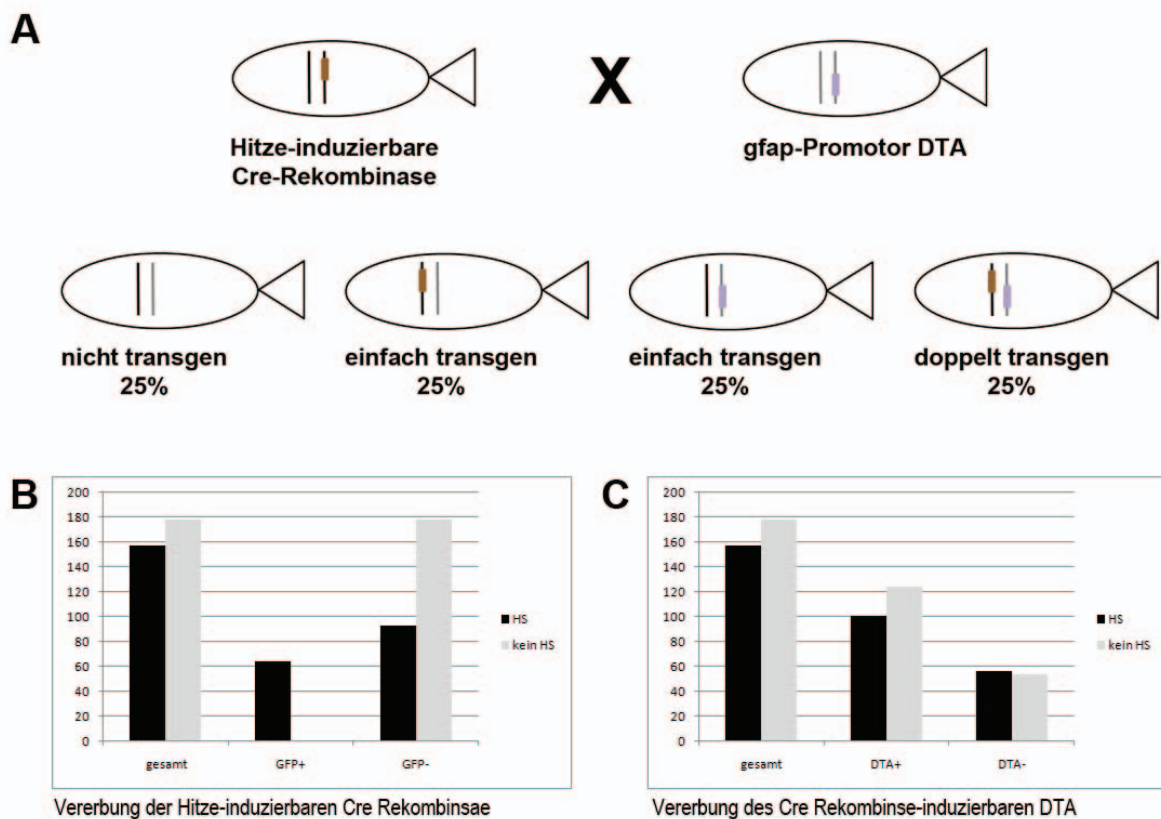


Abbildung 11: Kreuzungsschema und statistische Auswertung der Vererbung der einzelnen Konstrukte

A: Falls jedes Transgen nur einmal in das Genom des Elternfisches integriert wurde, gibt es rein rechnerisch eine Wahrscheinlichkeit von 25% an doppeltransgenen Nachkommen, die sowohl die Cre-Rekombinase wie auch die Sequenz für DTA enthalten. Die Wahrscheinlichkeit, dass nur jeweils ein Transgen an die Nachkommen vererbt wird, liegt bei jeweils 25%, also insgesamt 50%. Die restlichen 25% der Nachkommen erhalten keines der beiden Transgene. Enthält ein Elternteil mehr als eine Integration, stellt sich die Genetik komplexer dar.

braun: Cre-Rekombinase-Transgen, lila: DTA-Transgen

B: Die Analyse der hitze-behandelten Embryonen am Fluoreszenzmikroskop ergab eine Verteilung von 41% GFP-positiven zu 59% GFP-negativen Larven. Bei den nicht hitze-behandelten Larven konnte am Fluoreszenzmikroskop keine grüne Fluoreszenz detektiert werden.

C: Die Vererbung des Cre-Rekombinase-induzierbaren Konstrukts wurde mittels PCR untersucht. Sowohl in der hitze-behandelten wie auch in der Kontrollgruppe wurde das DTA-Konstrukt in etwa 2/3 der Embryonen nachgewiesen, in etwa 1/3 der Embryonen konnte kein DTA-Konstrukt detektiert werden.

4.1.4.2 Nachweis der erfolgreichen Rekombination

Die Anwesenheit des hitze-induzierbaren Plasmids kann einfach durch visuelle Untersuchung am Fluoreszenzbinokular durchgeführt werden. Die Anwesenheit des Cre-Rekombinase-induzierbaren Plasmids muss jedoch über PCR gezeigt werden, ebenso wie die erfolgreiche Rekombination. So wurden alle aus den Verkreuzungsexperimenten resultierenden Embryonen lysiert und mittels PCR auf erfolgreiche Rekombination untersucht. Hierzu wurde eine Multiplex-PCR-Strategie mit zwei unterschiedlichen *forward* Primern (F1 und F2) angewendet (Abbildung 12A). Der erste *forward* Primer (F1) liegt innerhalb der geflochtenen Stopsequenz. Ein PCR-Produkt aus F1 und dem verwendeten *reverse* Primer (R1) zeigte die Präsenz des DTA-Plasmids ohne Rekombination an und resultierte in einer Bande von 380 bp. Nach erfolgreicher Rekombination wurde mit der Stopsequenz auch die Bindungsstelle für F1 entfernt. Durch den zweiten *forward* Primer (F2) und den *reverse* Primer entstand ein PCR-Produkt mit einer Größe von 530 bp, das die erfolgreiche Rekombination anzeigt. Zur Analyse der lysierten Larven wurde die Multiplex-PCR durchgeführt, d.h. es wurden alle drei Primer gleichzeitig in einer Reaktion eingesetzt. Bei Larven, die eine Bande für erfolgreiche Rekombination aufweisen (F2 x R1), kann durchaus auch eine zweite Bande detektiert werden. Dies ist möglich, da in den Larven das Transgen vorhanden ist, aber nicht in allen Zellen Rekombination stattfinden muss, also auch ein PCR-Produkt aus F1 und R1 entstehen kann. Bei der Analyse der Ergebnisse wurden vier unterschiedliche Situationen detektiert: Hitzeschock-Embryonen, die Banden mit beiden Größen aufwiesen und daher durch Rekombination aktiviertes DTA exprimieren. Außerdem wurden Hitzeschock-Embryonen, die nur die Bande von 380 bp aufwiesen, detektiert. In diesen Embryonen war nur die DTA-Sequenz vorhanden, es fand allerdings keine Rekombination statt. Bei den nicht hitze-behandelten Kontrollembryonen wurden ebenfalls Embryonen sowohl mit zwei Banden (Rekombination) als auch Embryonen mit nur einer Bande bei 380 bp (keine Rekombination) detektiert. Die vier unterschiedlichen Situationen lassen sich durch die unterschiedlich großen PCR-Produkte in einem Agarosegel deutlich unterscheiden (Abbildung 12B). Die Ergebnisse der PCR-Analyse erlauben allerdings keine quantitativen Aussagen über die Rekombinationseffektivität. Die Anwesenheit der beiden Banden in den nicht hitze-behandelten Embryonen lässt auf einen gewissen Undichte-Grad des Systems schließen. Das bedeutet, die Induktion der Hitzeschockpromotorelemente kann zu

Ergebnisse

einem gewissen Grad auch spontan bei Temperaturen unter 37°C erfolgen und benötigt dann keine Hitzeaktivierung. Damit wird auch die Cre-Rekombinase ohne Hitzeanwendung ubiquitär exprimiert. Die in den nicht hitze-behandelten Embryonen aktivierte Cre-Rekombinase reicht jedoch nicht aus, um genügend DTA zur Zellschädigung zu aktivieren.

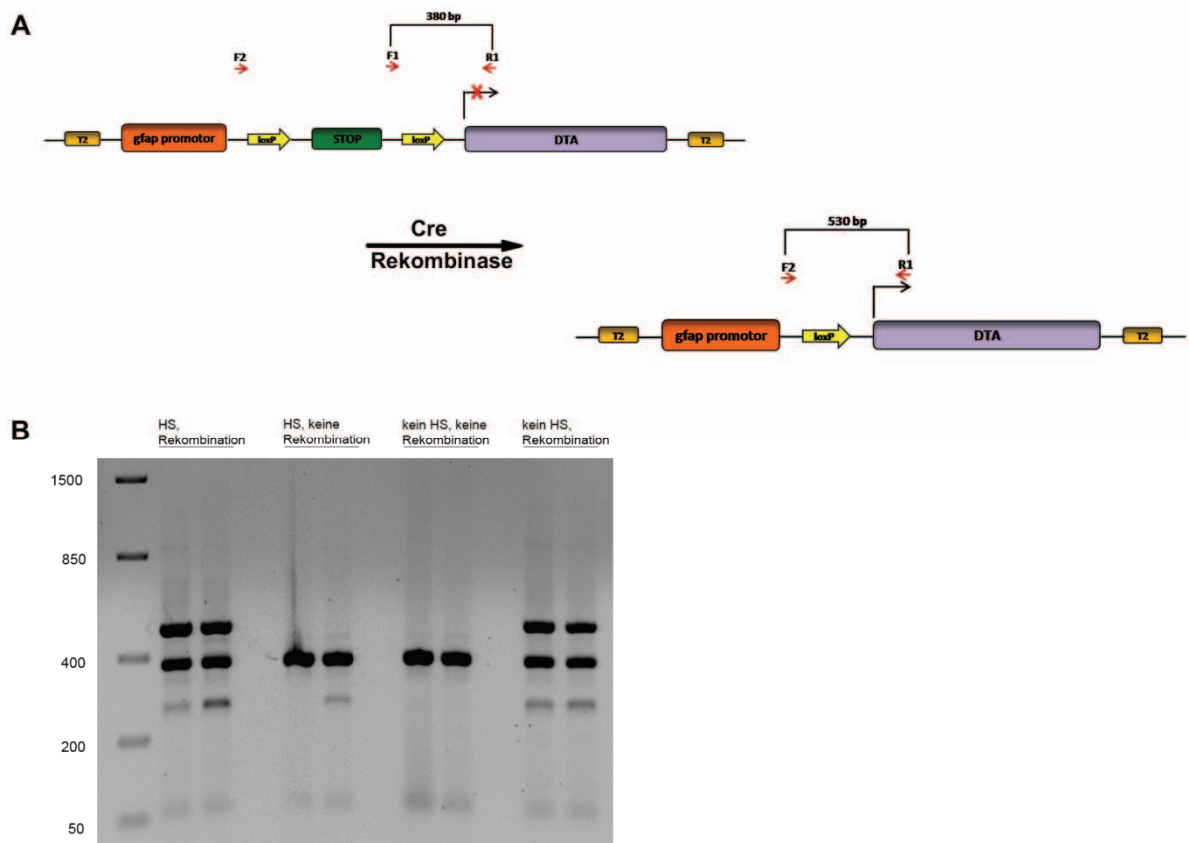


Abbildung 12: Nachweis der Rekombination mittels einer Multiplex-PCR-Strategie

Die erfolgreiche Rekombination des Cre-Rekombinase-induzierbaren Konstrukts wurde mittel PCR überprüft.

A: Eine PCR mit einem *forward* Primer (F1) innerhalb der geflochtenen Stopsequenz und einem *reverse* Primer (R1) im *DTA* resultiert in einer Bande mit einer Größe von 380 bp. Nach erfolgreicher Rekombination wird die Bindungsstelle für F1 entfernt und ein zweiter *forward* Primer (F2) vor der geflochtenen Stopsequenz kann binden. Die aus F2 x R1 resultierende Bande hat dann eine Größe von 530 bp. Die Amplifikation von F2 x R1 in nicht rekombinierter DNA wurde durch eine kurze Elongationszeit vermieden.

B: Nach der PCR wurden vier unterschiedliche Situationen detektiert: nach Hitzeschock und erfolgreicher Rekombination waren eine Bande bei 380 bp und eine weitere bei 530 bp sichtbar, nach Hitzeschock ohne Rekombination wurde nur die Bande bei 380 bp, die nur die Anwesenheit der *DTA*-Sequenz anzeigt, detektiert. Für die Kontrollembryonen wurden auch beide Situationen, also erfolgreiche Rekombination (380 bp und 530 bp) und keine Rekombination (380 bp) detektiert. In Embryonen mit erfolgreicher Rekombination waren beide Banden detektierbar, da die *DTA*-Sequenz nicht in allen Zellen aktiviert sein muss, d.h. in einem Embryo in beiden Zuständen vorliegen kann.

Die fluoreszenzmikroskopische Analyse von insgesamt 157 hitze-behandelten Embryonen ergab 64 GFP-positive sowie 93 GFP-negative Embryonen. Der anschließende Nachweis für das *DTA*-Transgen erfolgte über PCR. Aus allen GFP-

Ergebnisse

positiven Embryonen zeigten 22 keine Bande für DTA, alle übrigen 42 Embryonen zeigten zwei Banden und damit die Anwesenheit des Transgens sowie erfolgreiche Rekombination (Abbildung 13A). Aus 93 GFP-negativen Embryonen waren 34 auch negativ für DTA, 54 zeigten nur eine Bande, d.h. die DTA-Sequenz war vorhanden, aber nicht aktiviert. Fünf der hitze-behandelten, GFP-negativen und damit auch Cre-Rekombinase-negativen Embryonen zeigten in der PCR-Analyse zwei Banden (Abbildung 13B). Diese Embryonen müssen allerdings als falsch-positive Proben interpretiert werden, da keine Rekombination stattfinden kann, wenn keine Cre-Rekombinase anwesend ist. Von den nicht hitze-behandelten Kontrollen (176) zeigten 54 Embryonen keine Bande für DTA. Die übrigen 124 Embryonen zeigten zu jeweils gleichen Teilen (je 62) Rekombination (zwei Banden) bzw. keine Rekombination (eine Bande bei 380 bp) (Abbildung 13C, D). Die Undichte des Systems wurde anschließend in einer weiteren PCR untersucht. Hierzu wurde die genomische DNA von allen nicht hitze-behandelten Larven getestet. Diese Larven konnten nicht fluoreszenzmikroskopisch auf die Anwesenheit des Cre-Rekombinase Transgens untersucht werden, da keine Hitzeinduktion stattgefunden hatte. In der PCR wurde unterschieden zwischen den Larven, die erfolgreiche Rekombination gezeigt hatten, und denen, die keine Rekombination aufweisen konnten. In der Reaktion wurden Primer eingesetzt, die in der Sequenz für die Cre-Rekombinase lokalisiert sind (Cre for, Cre rev) und in einer 240 bp großen Bande resultieren. Aus 62 nicht hitze-behandelten Larven, die in der zuvor gezeigten DTA-PCR erfolgreiche Rekombination aufweisen konnten, enthielten 60 auch das Transgen für die Cre-Rekombinase (Abbildung 13E). Die beiden Proben, in denen die Cre-Rekombinase nicht nachgewiesen werden konnte, müssen kritisch betrachtet werden. Ist keine Cre-Rekombinase in einer Larve vorhanden, sollte auch keine Rekombination stattfinden. Eine mögliche Erklärung für diese „falsch-negativen“ Proben ist, dass die als Template verwendete genomische DNA nicht erfolgreich oder in zu geringen Mengen in die Reaktion gegeben wurde. Die nicht hitze-behandelten Larven, die das DTA-Transgen enthielten, aber keine Rekombination zeigten, wurden ebenfalls getestet. Hierbei zeigten allerdings nur zehn der insgesamt 62 Larven eine Bande für die Cre-Rekombinase. Die übrigen 52 Proben waren negativ für das Transgen (Abbildung 13F). Diese Fakten zeigen erneut, dass das System undicht ist. Bei erfolgreicher Rekombination wurde in 97% der Fälle Cre-Rekombinase nachgewiesen. In den Larven, die keine Rekombination zeigten, war dagegen nur in

Ergebnisse

16% der Fälle Cre-Rekombinase anwesend. Das bedeutet, dass fast immer, wenn Cre-Rekombinase vorhanden ist, auch spontane, nicht induzierte Rekombination stattfinden kann. Dies ist für die Interpretation der folgenden Ergebnisse zu berücksichtigen.

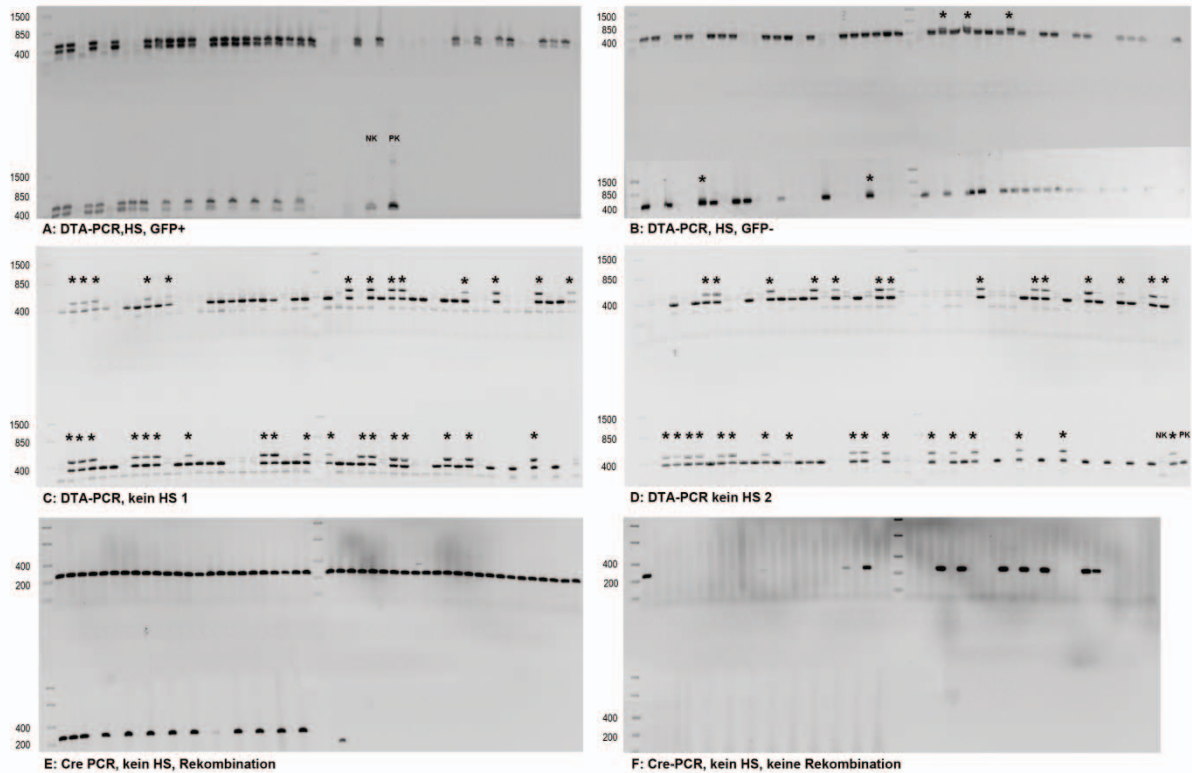


Abbildung 13: PCR-Analyse der hitze-behandelten und Kontrolllarven

Die einzelnen Embryonen wurden nach einem Hitzeschock mittels PCR analysiert, um die beiden Transgene nachzuweisen.

A: Der Nachweis des DTA-Transgens in den einzelnen hitze-behandelten Embryonen, die GFP-positiv waren, resultierte bei allen Proben in zwei Banden, d.h. in allen Larven war das Transgen vorhanden und zeigte Rekombination. NK: Negativkontrolle, keine Template, PK: Positivkontrolle für die Anwesenheit des Transgens, Template: DTA-Plasmid-DNA

B: Der DTA-Nachweis in den hitze-behandelten, GFP-negativen Larven zeigte bei fünf Proben zwei Banden, d.h. Rekombination (*). Diese Proben müssen als falsch-positiv interpretiert werden. Alle übrigen Proben zeigte nur eine (54) bzw. keine (34) Bande für DTA.

C/D: Die Analyse der nicht hitze-behandelten Kontrollen zeigte in der PCR für das DTA-Transgen 52 negative und 124 DTA-positive Proben. Die Hälfte der DTA-positiven Larven zeigte erfolgreiche Rekombination (*), die zweite Hälfte enthielt nur das nicht rekombinierte Transgen.

E: Die weitere Analyse der nicht hitze-behandelten Larven mit Rekombination in Form einer PCR für Cre-Rekombinase wies in 60 der 62 getesteten Larven Cre-Rekombinase nach. In den beiden negativen Proben wurde zu wenig oder keine Template-DNA eingesetzt.

F: Bei der Analyse der nicht hitze-behandelten Larven, die keine Rekombination zeigten, enthielten nur zehn aus 62 getesteten Larven die Cre-Rekombinase.

4.1.4.3 Deformationen nach Ablation der Astrozyten

Zur Ablation der Astrozyten wurde das Gelege aus der Verkreuzung der beiden transgenen Linien 2 dpf zur Hälfte dem Hitzeschock ausgesetzt, die zweite Hälfte wurde als Kontrolle bei Raumtemperatur aufbewahrt. Anschließend wurden die

Ergebnisse

Embryonen nicht bei der für sie optimalen Temperatur von 28°C inkubiert, sondern bei Raumtemperatur. Dies wurde durchgeführt, um eine mögliche Induktion der Cre-Rekombinase bei dieser Temperatur zu verhindern und so die Undichte des Systems zu reduzieren. Ein bis zwei Tage nach Hitzeschock konnte dann grüne Fluoreszenz wahrgenommen werden. Vier bis fünf Tage nach Hitzeschock, nachdem die Embryonen aus dem Chorion geschlüpft waren, traten die ersten Unterschiede zwischen Hitzeschock-Embryonen und Kontrollen auf. Bei etwa der Hälfte der hitze-behandelten Embryonen wurde ein Phänotyp mit gekrümmter Körperachse detektiert (Abbildung 14A). Es handelte sich hierbei um sehr heterogene Deformationen, von nur leichten Verkrümmungen der Körperachse (Abbildung 14B) bis hin zu so genannten „curly tail up“ (Abbildung 14C) oder „curly tail down“ (Abbildung 14D) Phänotypen. Die beiden letzteren wiesen deutliche Deformationen der Körperachse nach oben bzw. nach unten auf. Die Bewegungsfähigkeit war bei Larven mit leichteren Deformationen massiv eingeschränkt, bei Larven mit stärkeren Veränderungen der Körperachse kaum vorhanden. Die zweite Hälfte der hitze-behandelten und eindeutig GFP-positiven Embryonen zeigte keinerlei phänotypische Veränderungen. Die nicht hitze-behandelten Kontrollen zeigten im Vergleich zu den hitze-behandelten Embryonen deutlich schwächere bis keine GFP-Signale. Auch die phänotypische Untersuchung zeigte keinerlei Deformationen der Körperachse (Abbildung 14).



Abbildung 14: Phänotypische Untersuchung der hitze-behandelten und Kontrollembryonen

Die phänotypische Untersuchung der hitze-behandelten und der Kontrollembryonen zeigte für etwa die Hälfte der hitze-behandelten Embryonen eine deutliche Krümmung der Körperachse. Die zweite Hälfte der hitze-behandelten Embryonen sowie auch die Kontrollembryonen wiesen keinerlei phänotypische Veränderungen auf (A). Die beobachteten Deformationen waren sehr heterogen. So wurden leichte Verkrümmungen (B) sowie der so genannte „curly tail up“ Phänotyp mit einer Krümmung der Körperachse nach oben (C) und auch der so genannte „curly tail down“ Phänotyp mit einer Krümmung der Körperachse nach unten (D) detektiert. Maßstab: 1mm.

4.1.4.4 Immunhistochemische Analyse der deformierten Embryonen

Zur genaueren Untersuchung der deformierten Embryonen wurden immunhistochemische Färbungen mit dem anti-zrf-1 Antikörper durchgeführt. Das Epitop dieses Antikörpers ist das gliale, fibrilläre, saure Astrozytenprotein (GFAP). Fünf Tage nach dem Hitzeschock wurden hitze-behandelte Larven, die grüne Fluoreszenz exprimierten und damit auch die Cre-Rekombinase enthielten, in PFA fixiert. Dabei wurde zwischen deformierten und nicht deformierten Larven unterschieden. Weiterhin wurden hitze-behandelte Larven, die GFP-negativ waren sowie nicht hitze-behandelte Kontrolllarven fixiert. Die anschließende Färbung und deren Analyse zeigten eine deutlich erkennbare GFAP-Färbung in allen untersuchten Situationen. In allen Larven war das GFAP-Netzwerk intakt und zeigte keine sichtbaren Unterschiede zwischen hitze-behandelten und Kontrolllarven. In den hitze-behandelten, GFP-positiven, deformierten Larven wurde besonders die Region um die Verkrümmung der Körperachse untersucht, aber auch hier schien das

Ergebnisse

endogene GFAP-Netzwerk nicht beeinträchtigt zu sein (Abbildung 15). Die Penetration des Antikörpers ist trotz Permeabilisation des Gewebes ziemlich unregelmäßig. Dies ist auf das Alter der Larven (sechs Tage bei Raumtemperatur, d.h. ca. fünf Tage alt) zurückzuführen.

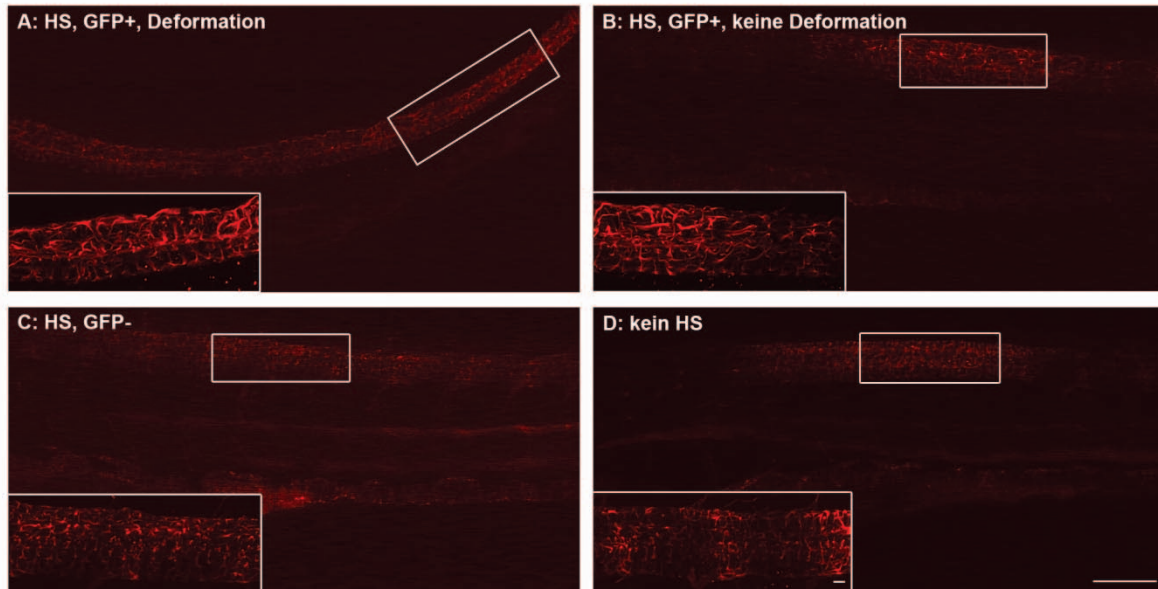


Abbildung 15: Immunhistochemische Untersuchung der deformierten Larven

Die immunhistochemische Analyse der deformierten Larven wurde fünf Tage nach Hitzeschock mit dem anti-zrf-1 Antikörper (rot) durchgeführt. Maßstab: D: 100µm, Vergrößerung: 10µm.

A: In hitze-behandelten, deformierten Larven war das GFAP-Netzwerk deutlich erkennbar und auch intakt. Auch in der Region um die deutlich sichtbare Deformation der Körperachse schienen die GFAP-positiven Zellen keine Veränderungen aufzuweisen.

B: In hitze-behandelten, GFP-positiven, jedoch nicht deformierten Larven war das GFAP-Netzwerk ebenfalls intakt, jedoch schwächer detektierbar.

C: Auch in hitze-behandelten Larven, die vor der immunhistochemischen Analyse keine grüne Fluoreszenz zeigten, war das Netzwerk aus endogenem GFAP detektierbar und wies keine sichtbaren Veränderungen auf.

D: Die nicht hitze-behandelten Kontrollen wiesen ebenfalls ein intaktes GFAP-Netzwerk auf, außerdem waren keine Unterschiede zu den hitze-behandelten Larven erkennbar.

4.1.4.5 Analyse der Embryonen mittels Acridin Orange als Zelltodmarker

Nachdem bei der immunhistochemischen Analyse keine, bei der phänotypischen Untersuchung der Embryonen jedoch deutliche Unterschiede zwischen hitze-behandelten und Kontrollembryonen aufgetreten waren, wurde der apoptotische Zelltod in den Larven detaillierter untersucht. Dazu wurden die Embryonen mit Acridin Orange, einem Marker für Apoptose (Furutani-Seiki et al., 2004), analysiert. Hierbei handelt es sich um einen Farbstoff, der nach Bindung an DNA fluoresziert. Acridin Orange kann die Kernmembran in intakten Zellen nicht passieren, d.h. nur in Zellen, die diese Barriere auflösen, ist die Interaktion mit der DNA möglich. Dieser

Ergebnisse

Farbstoff ist damit ein Nachweis für apoptotisch sterbende oder tote Zellen. Ein Vorteil von Acridin Orange ist, dass die Substanz direkt in das Embryonalmedium gegeben und von den Larven über die Kiemen aufgenommen werden kann. So sind einzelne apoptotisch absterbende Zellen oder Zellverbände im gesamten lebenden Organismus erkennbar. Die Untersuchung von deformierten Embryonen mittels Acridin Orange fünf Tage nach Hitzebehandlung resultierte in einer deutlich erhöhten Anzahl an absterbenden Zellen in den deformierten Larven (Abbildung 16A). In hitze-behandelten Larven, die eine Deformation der Körperachse aufwiesen, war im Bereich des Rückenmarks eine drastisch erhöhte Anzahl Acridin Orange-positiver Zellen erkennbar. Die hitze-behandelten aber nicht deformierten Larven hingegen zeigten nur den in der Entwicklung der Larven normalen Level an Zelltod, in keinen Bereichen der Larve aber eine vermehrte Anzahl an Acridin Orange-positiven Zellen. Eine Wiederholung der Versuche mit Hitzeschock ausgesetzten, allerdings nicht deformierten Larven zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach dem Hitzeschock resultierte in einem moderaten Level an absterbenden Zellen. An Tag zwei nach Hitzebehandlung waren sowohl für die transgenen Larven wie auch die Wildtypkontrollen mit und ohne Hitzebehandlung kaum absterbende Zellen erkennbar (Abbildung 16B). An Tag fünf nach Hitzebehandlung nahm die Anzahl der Acridin Orange-positiven Zellen in allen Larven leicht zu, signifikante Unterschiede zwischen doppeltransgenen und Wildtypembryonen mit und ohne Hitzebehandlung waren aber auch hier nicht erkennbar (Abbildung 16C). Ebenso war die Anzahl Acridin Orange-positiver Zellen deutlich geringer als in den Versuchen mit deformierten Larven (Abbildung 16A).

Ergebnisse

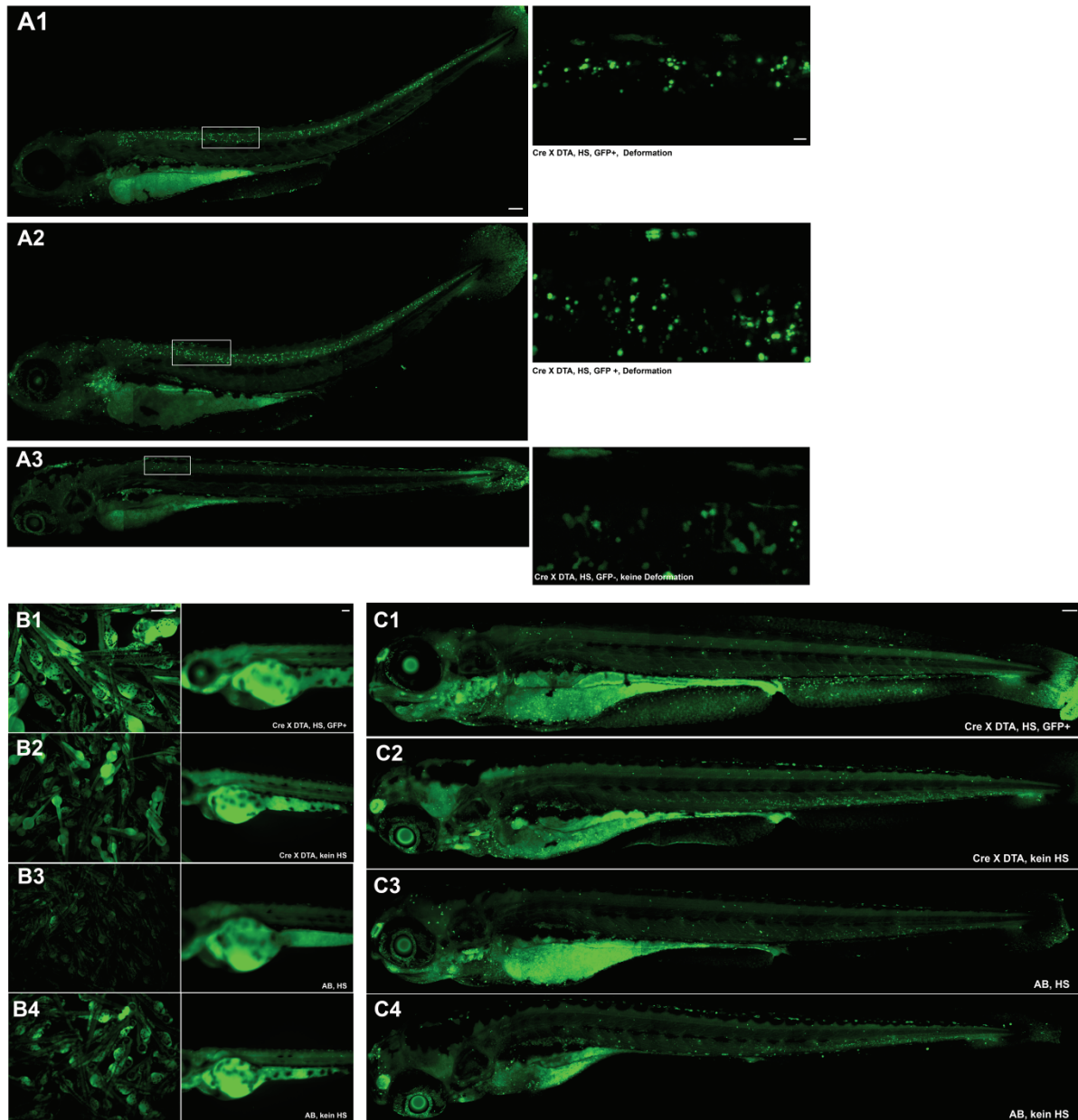


Abbildung 16: Acridin Orange-Färbung als Marker für Zelltod

Die zellulären Veränderungen der hitze-behandelten Embryonen wurden mittels Acridin Orange untersucht.

A: In deformierten Larven (A1, A2) wurde im Vergleich zu nicht deformierten Larven (A3) eine deutlich erhöhte Anzahl Acridin Orange-positiver Zellen im Bereich des Rückenmarks detektiert.

Maßstab: 100µm, Vergrößerung: 10µm.

B: In hitze-behandelten transgenen (B1) und Wildtyp-Larven (B3) sowie in den nicht hitze-behandelten Kontrollen (B2, B4) konnte an Tag zwei nach Hitzeschock kein erhöhter Level an Acridin Orange-positiven Zellen detektiert werden.

Maßstab: Übersicht: 1mm, Einzellarve: 100µm.

C: An Tag fünf nach Hitzeschock war die Anzahl der Acridin Orange-positiven Zellen insgesamt in allen Situationen leicht erhöht, signifikante Unterschiede zwischen transgenen (C1, C2) und Wildtyp-Larven (C3, C4) mit und ohne Hitzebehandlung waren aber nicht erkennbar.

Maßstab: 100µm.

4.1.4.6 Variabilität der Effizienz der Astrozyten-Ablation

Wie in den bisher durchgeführten Versuchen gezeigt wurde, variiert die Effizienz der Ablation von Astrozyten in den einzelnen Experimenten deutlich. So konnten beispielsweise in einigen Versuchen sehr stark deformierte Larven detektiert werden (Abbildung 14). In anderen Ansätzen dagegen waren weder Deformationen noch Acridin Orange-positive Zellen als Vorläufer der Deformation erkennbar (Abbildung 16). Die Anwesenheit beider Transgene wurde jedoch in allen Fällen entweder über Fluoreszenzuntersuchungen oder PCR in den Larven nachgewiesen. Diese Schwankungen sind möglicherweise auf multiple Insertionen der DNA in das Genom zurückzuführen. Mehrere Insertionen können dann zu einem erhöhten Level an Cre-Rekombinase führen, was wiederum zu einer vermehrten Aktivierung des DTA führt. Dadurch wird in den entsprechenden Zellen eher oder in höherem Maße die Proteinsynthese gehemmt und es kommt schneller zum Zelltod. In Larven, die weniger Insertionen besitzen, bleibt der Cre-Rekombinase Level niedriger, es wird weniger DTA aktiviert, dadurch kommt es weniger schnell oder in weniger Zellen zum Zelltod und seltener zur Deformation. Ein weiterer Grund für die Variabilität der Ablation kann die Insertion der DNA an unterschiedlichen Loci im Genom sein. Findet die Insertion an einem Locus statt, der zu einem bestimmten Zeitpunkt oder aufgrund besonderer Umweltfaktoren stillgelegt und damit transkriptionell inaktiv wird, kann auch die inserierte DNA nicht mehr transkribiert und translatiert werden. Folglich kommt es nicht mehr zur Expression der Fremd-DNA und die gesamte Ablationsmaschinerie arbeitet nicht mehr. Dabei ist es ausreichend, wenn ein Konstrukt transkriptionell inaktiv wird, denn für eine erfolgreiche Ablation ist die Aktivität beider Konstrukte in der gleichen Zelle Voraussetzung.

4.2 GFAP-Aggregation als zellulärer Stressfaktor in einem Zebrafischmodell für *Alexander disease* (AXD)

Neben der Ablation bestimmter Zellen in der Entwicklung (siehe 4.1) ist die Überexpression von ausgewählten Proteinen in bestimmten Zellen ein weiterer Stressfaktor, durch den die Rolle der jeweiligen Zellen detaillierter beleuchtet werden kann. Der Zebrafisch mit seinen transparenten Larven und einem bereits früh in der Embryonalentwicklung ausgebildeten Nervensystem sowie den Homologien zu Säugetieren liefert zur Erforschung der Astrozyten im ZNS einen idealen Modellorganismus. Nachdem Astrozyten lange Zeit „nur“ als Stütz- und Versorgerzellen im Nervensystem galten, wurde ihr Beitrag u.a. zur Bildung von Synapsen („tripartite synapse“, siehe 1.2.2.3) in den letzten Jahren verstärkt erforscht. Um die Funktion der Astrozyten im ZNS genauer zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit in diesen Zellen das Zytoskelettprotein gliales fibrilläres saures Astrozytenprotein (GFAP) in Wildtypform und mit einer Mutation überexprimiert. Diese Mutation ist neben weiteren Mutationen genetisch assoziiert mit einer Leukodystrophie: *Alexander disease* (AXD), eine Erkrankung des ZNS, die in drei verschiedenen Varianten, der infantilen, der juvenilen und der adulten Form vorliegen kann (Alexander, 1949; Johnson, 2002; Li et al., 2002; Quinlan et al., 2007; Sawaisi, 2009). Aus verschiedenen Patientenstudien ist bekannt, dass sich die weiße Substanz, also auch die Myelinschicht, im ZNS der Patienten stark zurückbildet und somit zu einer Verlangsamung der Nervenleitgeschwindigkeit führt. Es ist bekannt, dass mutiertes GFAP zusammen mit Ubiquitin, α -Cristallin und Hitzeschockprotein 27 (hsp27) in so genannten Rosenthalfasern aggregiert (Der Perng et al., 2006; Iwaki et al., 1993). Um die Rolle der Aggregation von GFAP für die Physiologie und Entwicklung der Astrozyten zu untersuchen, wurde GFAP mit und ohne Mutation sowie als Fusionsprotein mit einem Fluorochrom in Astrozyten überexprimiert.

4.2.1 Konstrukte zur Herstellung der transgenen Zebrafischlinien

Zur Etablierung der transgenen Fischlinien wurde das aus der Hefe- und Drosophilagenetik bekannte Gal4/UAS-System verwendet. Hierbei werden zur Erzeugung einer transgenen Fischlinie zwei Konstrukte benötigt: ein *Driver*-Konstrukt, das das Gal4-Protein unter einem zellspezifischen Promotor exprimiert. Das aktivierte Gal4-Protein erkennt dann auf dem zweiten Konstrukt, dem

Responder-Konstrukt, die UAS-Promotorsequenz und aktiviert als Transkriptionsfaktor die Transkription der darauf folgenden cDNAs durch Bindung an die UAS-Sequenz (Brand and Perrimon, 1993). Voraussetzung für die Expression der transgenen Proteine ist die Anwesenheit beider Konstrukte in einer Zelle. Durch die Anwendung dieses Systems wird die Intensität der Transgenexpression deutlich gesteigert.

4.2.1.1 Das „Driver“-Konstrukt

Das *Driver*-Konstrukt wurde im pminiTol2-Rückgrat kloniert. Dieser Vektor enthält Tol2-Stellen, Erkennungsstellen für das Enzym Tol2-Transposase. Durch diese Stellen wird eine effizientere Integration der zwischen zwei Tol2-Stellen liegenden Sequenzen in das Genom des Empfängerorganismus katalysiert. Zwischen den beiden Erkennungsstellen für die Tol2-Transposase liegt im pminiTol2-Vektor eine „multiple cloning site“, über deren MluNI-Schnittstelle der Vektor linearisiert und anschließend über das Enzym CIAP dephosphoryliert wurde. Die Sequenz für das Gal4VP16 (im Folgenden nur als Gal4 bezeichnet) wurde aus dem pT2dHuCGal4VP16-Vektor über ClaI/XbaI-Schnittstellen isoliert und die überhängenden Enden anschließend über die Klenow-Enzymreaktion aufgefüllt. In einer Ligationsreaktion wurden die beiden Fragmente miteinander verbunden. Der entstandene pminiTol2-Gal4-Vektor wurde dann erneut am 5'-Ende des Gal4 über das Enzym MfeI linearisiert, die überhängenden Enden mit Klenow-Enzym aufgefüllt und anschließend mit CIAP dephosphoryliert. Der *gfap*-Promotor (Bernardos and Raymond, 2006) wurde aus seinem Vektor über Sall/XhoI-Schnittstellen isoliert und die überhängenden Enden mit Klenow-Enzym aufgefüllt. Darauf folgend wurden die beiden Fragmente zu dem im Folgenden *Driver*-Konstrukt genannten pminiTol2-gfapprom-Gal4-Vektor ligiert. Der *gfap*-Promotor aktiviert die Genexpression spezifisch in Astrozyten, v.a. im Rückenmark der Zebrafischlarven sowie im Stammhirn, den Radialgliazellen des Auges und in nicht myelinisierenden Schwann'schen Zellen (Bernardos and Raymond, 2006). Das *Driver*-Konstrukt wurde zur Etablierung aller Fischlinien in Kombination mit unterschiedlichen *Responder*-Konstrukten verwendet, die nachfolgend beschrieben werden.

4.2.1.2 Die *gfap* "Responder"-Konstrukte

Die unterschiedlichen *Responder*-Konstrukte sind alle im pminiTol2-Vektor kloniert. Sie enthalten eine UAS-Sequenz als Bindungsstelle für das Gal4, durch dessen Bindung dann entweder ein oder zwei E1b-Minimalpromotoren aktiviert werden. Enthält das Konstrukt einen E1b-Minimalpromotor, spricht man von einem unidirektionalen Konstrukt (Abbildung 17A, B). Ist die UAS-Sequenz auf beiden Seiten von je einem E1b-Minimalpromotor flankiert (Abbildung 17C), spricht man von einem bidirektionalen Konstrukt, da in Gegenwart von Gal4 durch beide Minimalpromotoren cDNA-Sequenzen aktiviert werden können.

4.2.1.2.1 UAS-GFP *gfap*R251H

Das erste *Responder*-Konstrukt exprimiert ein N-terminales Fusionsprotein aus dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) und dem glialen fibrillären sauren Astrozytenprotein (GFAP). In der Sequenz dieses Proteins ist an Position 251 eine Arginin zu Histidin Mutation (R251H) enthalten. Die Mutation wurde über PCR mit den folgenden Primern in der Zebrafischsequenz induziert: *gfap*-F mut und *gfap*-R mut. Über eine weitere PCR mit den *gfap*-F/Clal und *gfap*-R/NheI Primern, die eine Clal- bzw. NheI-Schnittstelle enthalten, wurde die gesamte kodierende cDNA mit enthaltener Mutation amplifiziert. Anschließend wurde das PCR-Produkt mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut. Mit den gleichen Enzymen wurde aus dem pT2dDsRed-UAS-Tau-Vektor die Tau-Sequenz entfernt und die Sequenz für *gfap*R251H inseriert. Im Folgenden wurde die Sequenz für GFP mittels GFP-F/Clal_{neu} und GFP-R/Clal Primern aus dem pEGFP-C1 Vektor amplifiziert und dann über die Clal-Schnittstellen im gleichen Leseraster an das 5'-Ende der kodierenden *gfap*R251H-Sequenz kloniert. Die Kasette aus UAS, gefolgt von einem E1b-Minimalpromotor, die zusammen die Expression der cDNA antreiben, sowie der cDNA des Fusionsproteins, wurde dann über StuI- und NheI-Schnittstelle aus dem Vektor isoliert und in den mit EcoRV linearisierten und dephosphorylierten pminiTol2-Vektor umklont. Das von Tol2-Stellen flankierte Konstrukt wurde zusammen mit dem *Driver*-Konstrukt und Tol2-Transposase-mRNA zur Etablierung der UAS-GFP*gfap*R251H transgenen Zebrafischlinien verwendet (Abbildung 17A). Die Mutation an Position 251 (R251H) im Protein für zf GFAP entspricht Position 239 (R239H) im humanen GFAP. Mutationen an dieser Stelle liegen einer sehr schweren

Pathologie bei Patienten mit AXD und einhergehender massiver Aggregation des GFAP zugrunde.

4.2.1.2.2 UAS-GFPgfp wt

Ein weiteres *Responder*-Konstrukt enthält ebenfalls die cDNA für ein N-terminales Fusionsprotein aus GFP und zf GFAP, aber ohne Mutation. Die *gfp* cDNA wurde hierfür in einer PCR über die *gfp*-F/Clal und *gfp*-R/Nhel Primer amplifiziert. Im Anschluss wurde das PCR-Produkt mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut. Über Clal- und Nhel-Schnittstellen wurde in dem pT2dDsRed-UAS-Tau-Vektor die Tau-Sequenz durch die *gfp*-Sequenz ersetzt. Die GFP-Sequenz wurde über PCR mit GFP-F/Clal_{neu} und GFP-R/Clal aus dem pEGFP-C1 Vektor amplifiziert, mit dem Clal-Restriktionsenzym verdaut und anschließend im gleichen Leseraster mit dem 5'-Ende der *gfp*-Sequenz fusioniert. Die zwischen Stul- und Nhel-Schnittstellen liegende Sequenz aus UAS, dem E1b-Minimalpromotor, der die Expression der cDNA antreibt, und dem GFPgfp wt Fusionsprotein wurde anschließend in den über EcoRV linearisierten und dephosphorylierten pminiTol2-Vektor umklont. Dieses Konstrukt wurde zusammen mit dem *Driver*-Konstrukt und Tol2-Transposase-mRNA zur Etablierung der UAS-GFPgfp wt transgenen Zebrafischlinien verwendet (Abbildung 17B). Das Fusionsprotein enthält keine Mutation, es dient als Überexpressionskontrolle.

4.2.1.2.3 DsRed-UAS-gfpR251H

Als *Responder*-Konstrukt ohne Fusionsprotein wurde ein bidirektionales Konstrukt kloniert. Dazu wurde über eine PCR mit den *gfp*-F/Clal-mod und *gfp*-R/Nhel Primern die cDNA für *gfpR251H* amplifiziert. Als Template diente das pT2dDsRed-UAS-gfp R251H₁ Konstrukt. Dieses Konstrukt wies eine Verschiebung des Leserasters auf, deshalb wurde ein modifizierter *forward* Primer zur Amplifizierung und anschließenden Umklonierung verwendet. Aus dem PCR-Produkt und dem pCR8GW-Vektor (Invitrogen®) wurde ein *Entry*-Vektor kloniert. Eine LR-Rekombination aus diesem *Entry*-Vektor und dem bereits klonierten *Destination*-Vektor pT2dDsRed-pA-DsRed.T4-E1b-UAS-E1b-GW-R1-R2pA resultierte in dem Zielvektor pT2dDsRed-UAS-gfpR251H, der zusammen mit dem *Driver*-Konstrukt und Tol2-Transposase-mRNA zur Etablierung der DsRed-UAS-gfpR251H transgenen Zebrafischlinien verwendet wurde. Das *Responder*-Konstrukt enthielt die

Ergebnisse

UAS-Sequenz flankiert in beiden Richtungen von je einem E1b-Minimalpromotor, der zum einem die DsRed-Sequenz sowie zum anderen die cDNA für *gfap* mit der Arginin zu Histidin Mutation an Position 251 (*gfap* R251H) enthält (Abbildung 17C). Das DsRed dient dabei als Fluoreszenzreporter zur einfachen Identifizierung der transgenen Nachkommen.

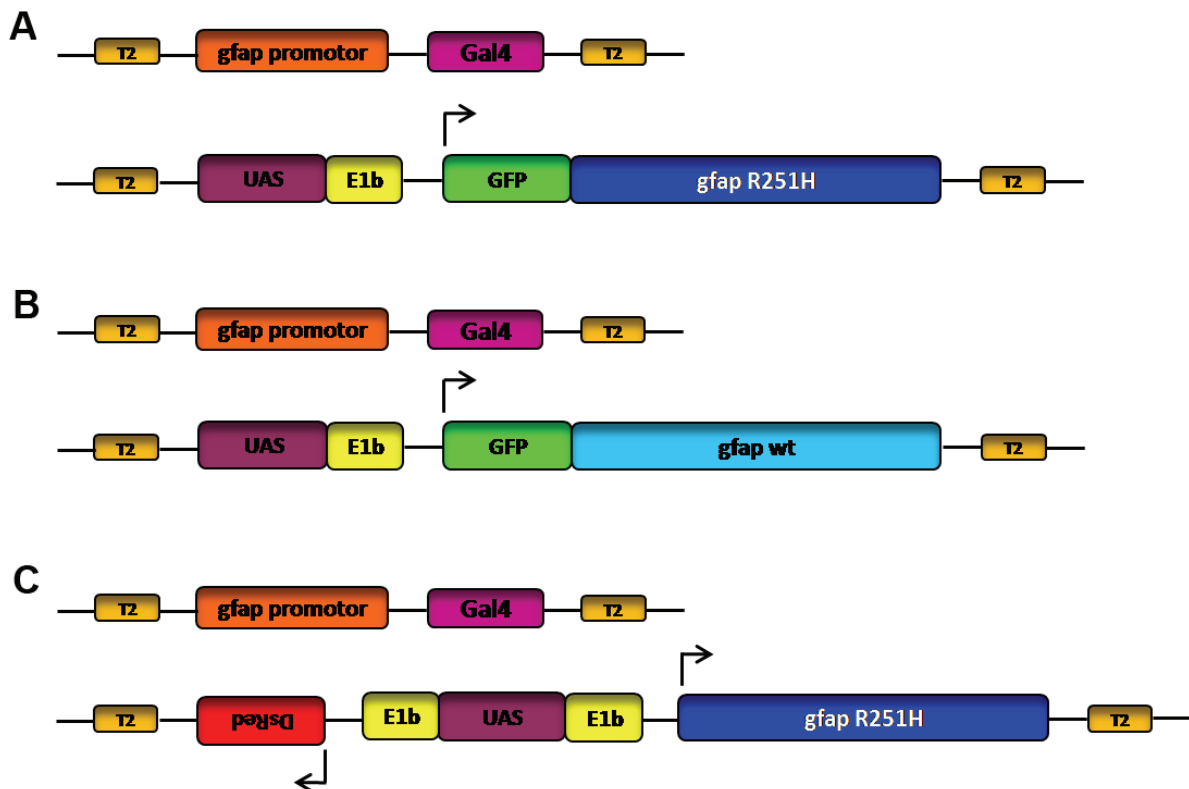


Abbildung 17: Konstrukte zur Herstellung von Zebrafischlinien mit transgener GFAP-Expression

Zur Etablierung der transgen GFAP-exprimierenden Zebrafischlinien wurden jeweils zwei Konstrukte für eine Fischlinie benötigt.

A: Die gewebespezifische Expression von GFAP wurde durch den *gfap*-Promotor erreicht. Dieser liegt auf dem *Driver*-Konstrukt und treibt die Expression des Gal4-Proteins an. Flankiert wird dieses Konstrukt von Tol2-Stellen. Das *Responder*-Konstrukt enthält ebenfalls Tol2-Stellen. Dazwischen liegt die UAS-Sequenz, die von einem E1b-Minimalpromotor gefolgt wird. Dieser treibt die Expression eines Fusionsproteins aus GFP und GFAP an. Die *gfap*-Sequenz kodiert für eine Arginin (R) zu Histidin (H)-Mutation an Position 251 (R251H).

B: Das *Driver*-Konstrukt ist von Tol2-Stellen flankiert und enthält den *gfap*-Promotor, der das Gal4-Protein aktiviert. Das *Responder*-Konstrukt enthält die UAS-Sequenz gefolgt von einem E1b-Minimalpromotor. Auf diese Sequenz folgt eine cDNA kodierend für GFP sowie *gfap* in der Wildtypvariante. Auch dieses Konstrukt ist zwischen Tol2-Stellen lokalisiert.

C: Zur gewebespezifischen Expression von GFAP wurde das *gfap*-Promotor *Driver*-Konstrukt verwendet, das anschließend an den Promotor die Gal4-cDNA enthält und von Tol2-Stellen gesäumt wird. Das *Responder*-Konstrukt enthält die UAS-Sequenz, die bidirektional von E1b-Minimalpromotoren gesäumt wird. Einer der Promotoren induziert die Expression von DsRed als Fluoreszenzreporter, der zweite die Expression der *gfap*-cDNA mit der Arginin (R) zu Histidin(H)-Mutation an Position 251 (R251H) des translatierten Proteins.

4.2.2 Test der *Responder*-Konstrukte in Zellkultur

Um die Funktionalität der *Responder*-Konstrukte zu testen, wurden sie zunächst in HEK 293T Zellen transfiziert. Als *Driver*-Konstrukt diente die Gal4-Sequenz unter der Kontrolle eines *cmv*-Promotors (pT2dCMVGal4VP16), da der *gfap*-Promotor in HEK 293T Zellen nicht aktiv ist. Die Zellen wurden mit den jeweiligen Konstruktkombinationen transfiziert und auf Deckgläschen kultiviert. Alle drei Konstrukte zeigten in den transfizierten Zellen Fluoreszenz. Sowohl das Fusionsprotein mit Mutation als auch das Fusionsprotein ohne Mutation zeigten GFP-positive Aggregate in den Zellen (Abbildung 18A, B). Aggregatbildung nach der Transfektion des UAS-GFP *gfap* wt Fusionsproteins war in diesem Maße zu erwarten, da alleine die Überexpression zu geringer Aggregation führen kann (Tang et al., 2006). In den Zellen, die mit dem DsRed-Konstrukt transfiziert wurden, konnte rote Fluoreszenz mit zytosolischer Lokalisation festgestellt werden (Abbildung 18C). Die erfolgreich transfizierten Zellen wurden nach zweitägiger Wachstumsperiode fixiert, immunhistochemisch gegen GFAP gefärbt und am konfokalen Mikroskop analysiert. Die mit den Fusionskonstrukten transfizierten Zellen zeigten ausschließlich Kolo-kalisation der GFP-positiven Aggregate (grün) mit den immunhistochemisch angefärbten GFAP-positiven Signalen (rot). Dies war zu erwarten, da die transfizierten Konstrukte für Fusionsproteine codieren und HEK 293T Zellen kein endogenes GFAP exprimieren (Abbildung 18A, B). Die Färbung der mit dem nicht-fusionierten DsRed-Konstrukt transfizierten Zellen zeigte im DsRed-positiven Zytosol der Zellen deutlich grüne Aggregate (Abbildung 18C). Da die HEK 293T Zellen kein endogenes GFAP exprimieren, sind die Aggregate auf transfiziertes GFAP mit der R251H-Mutation zurückzuführen.

Ergebnisse

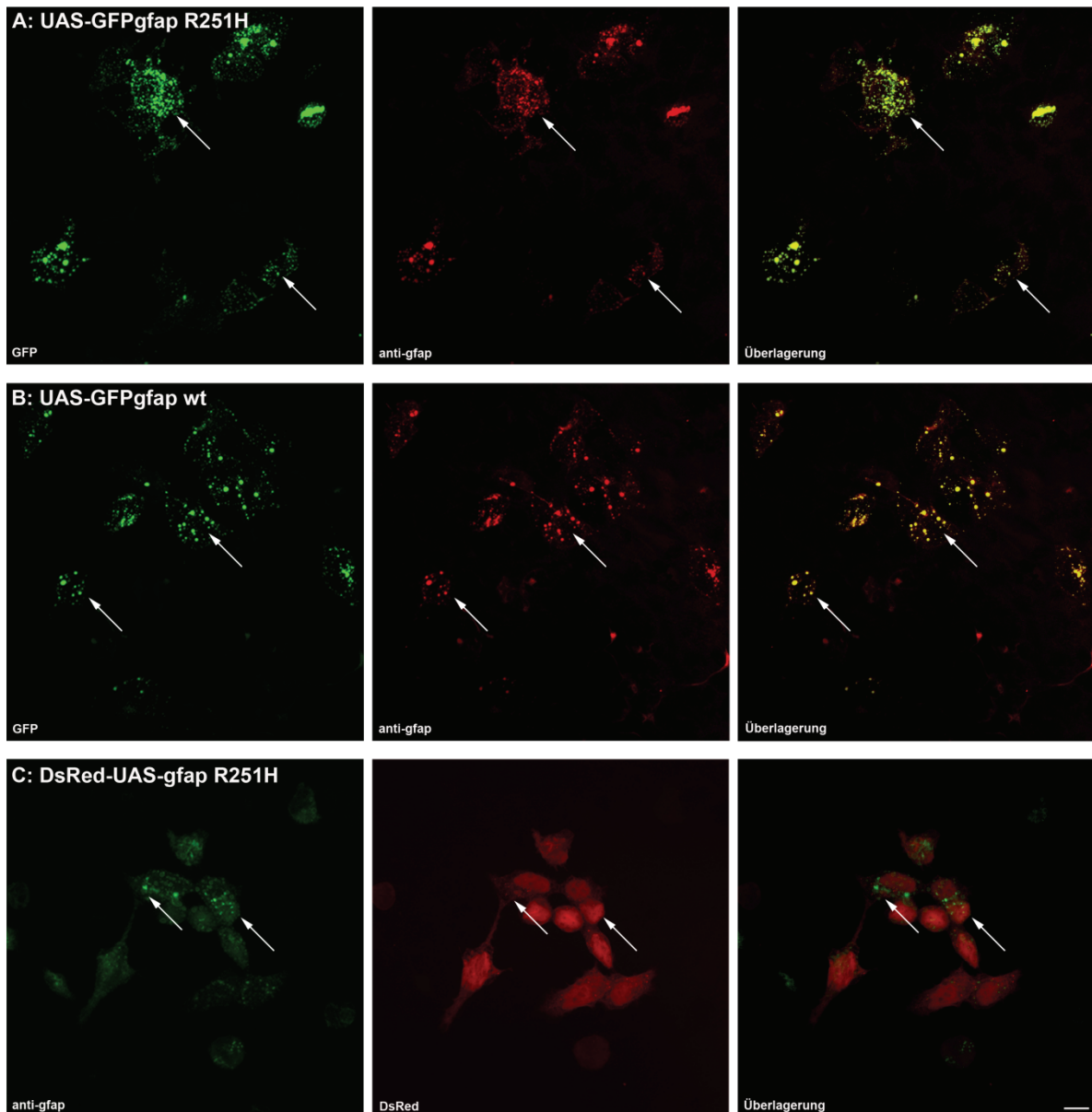


Abbildung 18: Test der *Responder*-Konstrukte in Zellkultur

Die Funktionalität der *Responder*-Konstrukte wurde zunächst durch Transfektion zusammen mit einem *cmv*-Promotor-Gal4 *Driver*-Konstrukt in HEK 293T Zellen getestet. Maßstab: 10µm

A: Die Transfektion mit dem Konstrukt für das GFPgfap R251H-Fusionsprotein zeigte deutliche GFP-positive Aggregate. Die gleichen Aggregate wurden in einer GFAP-Immunfärbung (rot) detektiert.

B: Die Transfektion mit dem Konstrukt für das GFPgfap wt-Fusionsprotein resultierte ebenfalls in deutlich GFP-positiven Aggregaten. Auch mit der immunhistochemischen Färbung gegen GFAP wurden die gleichen Aggregate detektiert (rot).

C: Die Transfektion mit dem DsRed-UAS-gfap R251H Konstrukt resultierte in deutlich DsRed-positivem Zytosol der Zellen. Mit einer Färbung gegen GFAP konnten Aggregate sichtbar gemacht werden, die im Zytosol lokalisiert, aber DsRed-negativ waren.

4.2.3 Lebendbeobachtung der transgenen Zebrafischlarven

Zur Etablierung der transgenen Zebrafischlinien wurden ein *Driver*- und ein *Responder*-Konstrukt zusammen mit Tol2-Transposase-mRNA in

Ergebnisse

Zebrafischembryonen im Einzellstadium injiziert. Die Tol2-Transposase-mRNA diente zur effizienteren Integration der Fremd-DNA in das Zebrafischgenom. Bei Injektion von zwei Konstrukten des Gal4/UAS-Systems ist eine effiziente Integration besonders wichtig, da nur Fische, die beide Konstrukte in das Genom integriert haben, das Transgen exprimieren können. Nach erfolgreicher Injektion der Larven wurden diese am zweiten Tag (2 days post fertilization, dpf) am Fluoreszenzbinokular untersucht. GFP- und DsRed-positive Embryonen wurden aufgezogen (F0-Generation) und deren stabil transgene Nachkommen (F1-Generation) für die folgenden Experimente verwendet.

Wie bereits erwähnt, ist ein großer Vorteil des Zebrafischs als Modellorganismus die Transparenz der Larven. So können Entwicklungsprozesse wie auch die Expression von fluoreszenz-gekoppelten Proteinen leicht am (Fluoreszenz-) Binokular verfolgt werden. Übersichtsaufnahmen der GFAP transgenen Larven zeigten die Expression der transgenen Proteine im Bereich des Stammhirns und des Rückenmarks. Deutliche GFP-Expression in Form von GFP-positiven Aggregaten war für das GFP_{gfap} R251H-Transgen bereits 1 dpf zu erkennen (Abbildung 19A), das GFP_{gfap} wt-Transgen wurde auch ab 1 dpf, aber in deutlich weniger Zellen und damit deutlich schwächer exprimiert (Abbildung 19B). Intensive rote Fluoreszenz war in den DsRed transgenen Fischen in Zellkörpern auch im Bereich des Nachhirns sowie des Rückenmarks detektierbar (Abbildung 19C). Diese Fluoreszenz war 1 dpf noch nicht, aber 2 dpf deutlich erkennbar. Da für die Etablierung aller transgener Fischlinien der gleiche *gfap*-Promotor verwendet wurde, der ab etwa 15 Stunden (hours post fertilization, hpf) mit steigender Intensität aktiv ist (Bernardos and Raymond, 2006; Marcus and Easter, 1995), ist die verzögerte DsRed-Expression auf eine längere Maturationszeit des DsRed-Fluorochroms im Vergleich zu GFP zurückzuführen. In den nicht transgenen Geschwisterfischen war keine Fluoreszenz detektierbar. Lebendaufnahmen von vier Tage alten, narkotisierten Zebrafischlarven am konfokalen Mikroskop zeigten deutlich, dass die Expression des GFP_{gfap} R251H-Transgens ausschließlich zu Aggregaten aus dem Fusionsprotein führte. Es lagen keine filamentöse Vernetzungen vor (Abbildung 19D). In GFP_{gfap} wt transgenen Larven hingegen war auch in höherer Vergrößerung ein deutlich niedrigeres Expressionslevel des transgenen Proteins zu erkennen. Aggregate, die durch die transgene Expression verursacht wurden, waren in diesen Larven eindeutig detektierbar. Allerdings traten neben Aggregaten auch deutlich erkennbare

Ergebnisse

filamentöse Strukturen und Vernetzungen des transgenen Proteins auf (Abbildung 19E). Die Unterschiede im Verhalten des UAS-GFP_{gfap} R251H-Transgens im Vergleich zum UAS-GFP_{gfap} wt-Transgen erlauben den Schluss, dass die Mutation einen wesentlichen Beitrag zur Aggregation von GFAP leistet. Mutiertes GFAP hat im Gegensatz zu nicht mutiertem GFAP eine erhöhte Tendenz zur Aggregation als zur Ausbildung filamentöser Strukturen. Die Aggregation des Wildtypkonstrukts ist in gewissem Maße sicherlich auf die Überexpression zurückzuführen (Tang et al., 2006). Die Expression des DsRed-UAS-*gfap* R251H-Transgens führte zur zytosolischen Expression des DsRed-Fluorochroms (Abbildung 19F). Aussagen über den Aggregationsgrad des GFAP können an diesem Punkt noch nicht getroffen werden, da es sich bei diesem Konstrukt ausschließlich um eine Expressionskontrolle, nicht aber um ein Fusionsprotein handelt. Eine geringe Anzahl an DsRed-positiven Aggregaten, die jedoch deutlich kleiner waren als die GFP-positiven Aggregate der anderen transgenen Linien, war dennoch in den transgenen Larven detektierbar (Abbildung 19F). Diese wurden allerdings als DsRed-Aggregate interpretiert, da dieses Fluorochrom eine natürliche Neigung zur Bildung von Aggregaten aufweist, die in manchen Fällen auch toxisch wirken können (Tao et al., 2007).

Ergebnisse

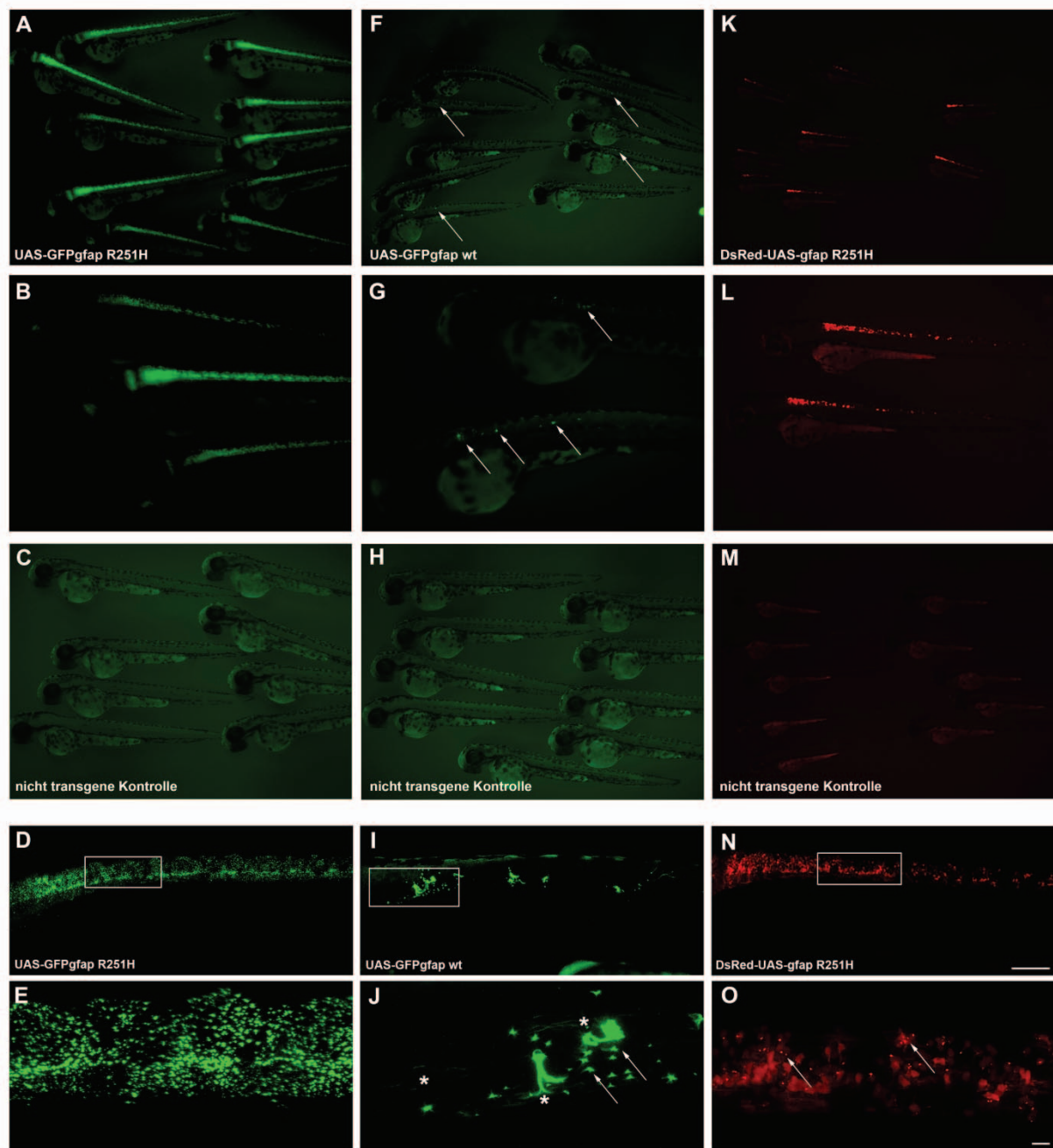


Abbildung 19: Lebendaufnahmen der unterschiedlichen transgenen Zebrafischlinien

Die transgenen Zebrafischlinien können mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops analysiert werden. Maßstab (N): 100µm, (O): 10µm.

Die Expression des GFPgfap R251H-Transgens war ab 1 dpf detektierbar. Die Expression erfolgte im Stammhirn sowie dem Rückenmark der Larven (A, B). Die nicht transgenen Geschwisterkontrollen (C) wiesen keine Fluoreszenz auf. Untersuchungen von vier Tage alten Larven am konfokalen Mikroskop zeigten, dass das Fusionsprotein ausschließlich in aggregiertem Zustand vorlag, nicht jedoch in filamentösen Vernetzungen (D, E).

Die Expression des GFPgfap wt-Transgens war ebenfalls ab 1 dpf detektierbar, allerdings mit stark reduzierter Intensität im Vergleich zur mutierten Variante des Fusionsproteins (F, G, GFP-positive Signale sind mit Pfeilen markiert). Im Gegensatz zum Transgen mit Mutation waren bei der Analyse von Larven 4 dpf am konfokalen Mikroskop in der Wildtypvariante neben Aggregaten (Pfeile) auch deutlich filamentöse Strukturen (Stern) erkennbar (I, J).

Die Expression des DsRed-UAS-gfap R251H-Transgens war erst ab 2 dpf deutlich detektierbar (K, L). Konfokale Aufnahmen von Larven 4 dpf zeigten, dass die Expression des Fluorochroms im Zytosol

der Zellen erfolgte (N). Eine geringe Anzahl an Aggregaten, die jedoch deutlich kleiner waren als die GFP-positiven Aggregate, war auch hier detektierbar (O, Pfeile).

4.2.4 Dynamik der Aggregate in der lebenden Larve

Die Transparenz der Zebrafischlarven erlaubt neben der Detektion der fluoreszenzgekoppelten Proteine auch Experimente zu deren Bewegungen und Interaktionen. Um die Bildung der Aggregate und potentielle Abbaumechanismen zu verfolgen, wurden *live imaging* Experimente über längere Zeiträume angefertigt. Diese Experimente wurden ausschließlich an GFPgfp R251H transgenen Larven durchgeführt, da die Aggregate in diesen Larven durch die GFP-Fusion deutlich detektierbar sind.

4.2.4.1 Entstehung der GFAP-Aggregate

Bereits 1 dpf konnten in GFPgfp R251H transgenen Larven GFP-positive Aggregate detektiert werden. Um den Prozess der Aggregatbildung näher zu untersuchen, wurden Larven an Tag eins dechorioniert und anästhesiert. Anschließend wurden über einen Zeitraum von zwölf Stunden in fünf- bis zehnminütigen Abständen konfokale Bilder der gleichen Region im Embryo aufgenommen. Diese Einzelaufnahmen wurden dann als Film zusammengesetzt und analysiert. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Bildung der Aggregate ein dynamischer Prozess und die entstehenden Aggregate selbst - im Gegensatz zu vielen anderen bekannten Aggregaten - keinesfalls statische Gebilde sind. Die Aggregate wanderten entlang der Astrozytenausläufer und fusionierten dann mit anderen Aggregaten zu größeren Komplexen, die wiederum ihre Wanderung fortsetzten. Diese Prozesse sind in einem „time lapse“ Video über zwölf Stunden mit konfokalen Aufnahmen im Abstand von fünf Minuten dieser Dissertation als CD beigelegt. In diesem Video liegt die Larve mit ihrer anterioren Seite nach rechts, posterior ist links. Die dorsale Seite zeigt nach oben, die ventrale nach unten. Es werden die Wanderungs- und Fusionsprozesse der Fusionsproteine (hier in weis dargestellt) verdeutlicht. In der linken Bildhälfte sind außerdem sehr schön mehrere Zellteilungen an verschiedenen Stellen mit auflösenden und sich anschließend wieder bildenden Aggregaten zu sehen (siehe auch Abbildung 20 C). In der Bildmitte bleicht die Fluoreszenzintensität aufgrund der Laserbelastung über den gesamten Zeitraum geringfügig aus. Zur Verdeutlichung der Ergebnisse wurden von zwei unterschiedlichen transgenen Embryonen je drei Aufnahmen im Abstand von jeweils 24 Stunden (1, 2, 3 dpf) sowie eine letzte

Ergebnisse

Aufnahme im Abstand von 76 Stunden (6 dpf) angefertigt, die die Entstehung der Aggregate zeigen. Zwischen den einzelnen Zeitpunkten war für beide Embryonen (Abbildung 20A, B) eine deutliche Steigerung der GFP-Intensität und damit auch Aggregatakkumulation erkennbar. Abbildung 20A zeigt einen schwächer transgenen Embryo, wohingegen in Abbildung 20B ein Embryo mit stärkerer GFP-Expression zu sehen ist. An 6 dpf nahm die Intensität in beiden Embryonen leicht ab, was mit dem Abbau der Aggregate oder einer Stagnation der Proteinbildung trotz Wachstum der Larve erklärt werden kann.

In „time lapse“ Videos konnte mehrfach beobachtet werden, dass sich die Aggregate während einer Zellteilung auflösten und anschließend wieder bildeten. Der Ablauf einer solchen Zellteilung mit auflösenden Aggregaten ist sowohl im beiliegenden Video (linke Bildhälfte, s.o.) als auch in Abbildung 20C dargestellt. Der Prozess erstreckt sich über etwa 25 Minuten. Die Zelle enthielt zu Beginn deutlich erkennbare GFP-positive Aggregate (0), die in der Vorbereitung auf die bevorstehende Teilung immer diffuser wurden (5') und sich dann komplett auflösten (10'). Allmählich ordneten sich die Bestandteile entlang der Teilungsebene an (15') und die Zelle teilte sich (20'). In den entstandenen Tochterzellen waren die GFP-positiven Aggregate wieder deutlich erkennbar (25').

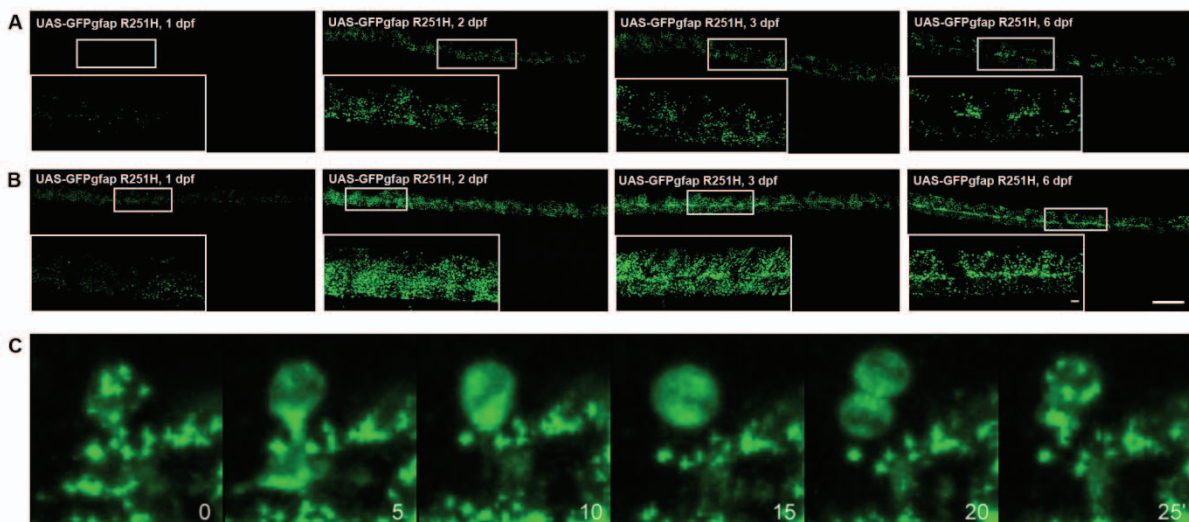


Abbildung 20: Dynamik der Aggregate

Die Bildung der Aggregate konnte in „time lapse“ Videos als ein dynamischer Prozess beobachtet werden. Die Aggregatformation über einen Zeitraum von sechs Tagen sowie Ausschnitte aus einem „time lapse“ Video sind hier dargestellt. Maßstab (B): 100µm, Vergrößerung: 10µm.

A, B: *Live imaging* Experimente zweier unterschiedlicher GFPgfp R251H transgener Embryonen (A, B) zeigten Variationen zwischen den einzelnen transgenen Linien bezüglich der GFP-Intensität. Eine Zunahme der GFP-positiven Aggregate im Zeitverlauf war allerdings in beiden Embryonen sehr

deutlich zu erkennen. Eine Stagnation bzw. ein leichter Rückgang der Intensität war zwischen Tag drei und sechs zu beobachten.

C: In „time lapse“ Videos wurden mehrfach sich teilende Zellen detektiert, deren Aggregate sich während der Zellteilung auflösten und anschließend in den Tochterzellen wieder erschienen. Die Beobachtung einer Zellteilung über etwa 25 Minuten zeigte, dass sich die Aggregate deutlich sichtbar in der Zelle befanden, dann langsam auflösten und sich der GFP-positive Inhalt der Zelle entlang der Teilungsebene anordnete. Nach erfolgter Zellteilung war das transgene Protein in den entstandenen Tochterzellen wieder re-aggregiert.

4.2.4.2 Abbaumechanismen der Aggregate

Um potentielle Abbaumechanismen der Aggregate zu erforschen, wurden GFPgfp R251H transgene Larven verschiedenen Pharmaka mit unterschiedlicher Wirkung auf die einzelnen Proteinabbaumechanismen ausgesetzt. Die Behandlung wurde durch Zugabe der jeweiligen Substanz in bereits für den Fisch beschriebenen Konzentrationen in das Embryonalmedium durchgeführt (Bretaud et al., 2007; Goldsmith et al., 2006). Als Kontrolle dienten transgene, nicht behandelte Larven. Zur Inhibition des proteasomalen Abbauweges wurde MG 132 in einer Konzentration von 50µM verwendet. Diese Substanz blockiert den Abbau über das Proteasom, wodurch es zu einer Akkumulation der GFP-positiven Aggregate kommen kann, falls diese über das Proteasom abgebaut werden. Im Vergleich zu den nicht behandelten Kontrollen (Abbildung 21A) wurde jedoch in den MG 132-behandelten Larven (Abbildung 21B) im Verlauf des Experiments kein signifikanter Unterschied in der Zunahme der GFP-positiven Aggregate festgestellt. Autophagie wurde in der Literatur als möglicher Abbauweg für GFAP-Aggregate diskutiert (Tang et al., 2008). Die Modifikation dieses Degradationsweges wurde durch die Substanzen Chloroquine in einer Konzentration von 50µM (Abbildung 21C) sowie Rapamycin in einer Konzentration von 1µM (Abbildung 21D) durchgeführt. Chloroquine inhibiert dabei den autophagischen Abbau und sollte deshalb zu einer Akkumulation der Aggregate führen. Rapamycin dagegen stimuliert Autophagie. Die Aggregate sollten daher deutlich weniger detektierbar sein, falls sie über Autophagie degradiert werden. Die Behandlung wurde an 1 dpf (Start) begonnen und dann fünf Tage lang fortgeführt. Aufnahmen wurden an 2, 3 und 6 dpf gemacht. Allerdings konnten weder unter autophagie-inhibierenden noch unter autophagie-stimulierenden Konditionen signifikante Unterschiede in der GFP-Intensität der Larven im Vergleich zu nicht behandelten Larven detektiert werden. Da diese Experimente dreimal durchgeführt wurden und immer ähnliche Ergebnisse lieferten, kann deshalb über einen Degradationsmechanismus der Aggregate an dieser Stelle keine Aussage getroffen, sondern allenfalls spekuliert werden. Als mögliches Problem bei diesen

Ergebnisse

Experimenten muss berücksichtigt werden, dass nicht eindeutig bekannt ist, ob die jeweilige Substanz durch die verwendete *low melting* Agarose zum Fixieren der Larven in diese gelangen kann. Die negativen Effekte sind also möglicherweise auf keine oder zu geringe Konzentrationen der jeweiligen Substanz im Embryo zurückzuführen.

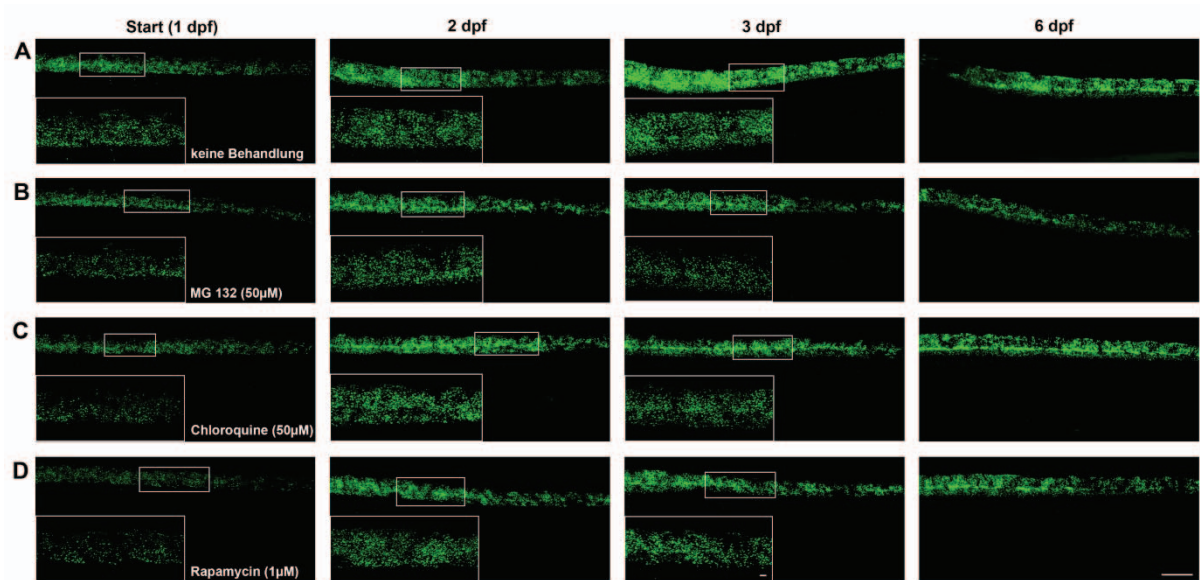


Abbildung 21: Einfluss verschiedener Pharmaka auf die Degradation der GFAP-Aggregate

Verschiedene Substanzen mit unterschiedlicher Wirkung auf bekannte Degradationsmechanismen wurden getestet, um den Abbau der GFAP-Aggregate zu erforschen. Der Beginn der Behandlung mit der jeweiligen Substanz erfolgte 1 dpf (Start, 1 dpf). Die Aufnahmen erfolgten dann im Abstand von einem (2dpf), zwei (3 dpf) und fünf (6 dpf) Tagen nach Behandlungsbeginn. Maßstab (D): 100µm, Vergrößerung: 10µm.

A: Als Kontrolle dienten GFP_{gfap} R251H transgene Larven, die keiner Behandlung ausgesetzt waren. Hier war eine deutliche Zunahme der GFP-positiven Aggregate im Zeitverlauf, wie auch in den Vorversuchen bereits gezeigt wurde, zu erkennen. Zwischen 3 dpf und 6 dpf kam es zur Stagnation bzw. zu leichtem Rückgang der GFP-Intensität.

B: Die Behandlung der Larven mit MG 132 (50µM) zeigte im Verlauf der Zeit einen Anstieg der GFP-Intensität, vergleichbar mit den nicht behandelten Kontrollen. Signifikante Unterschiede zu den Kontrollen waren nicht erkennbar. Die erwartete vermehrte Akkumulation der Aggregate durch Inhibierung des proteasomalen Abbaus konnte nicht gezeigt werden.

C: Nach Chloroquine-Behandlung (50µM) zeigten die Larven auch hier eine Zunahme der GFP-Intensität vergleichbar zu den nicht behandelten Kontrollen. Die erwartete gesteigerte Zunahme der GFP-Akkumulation aufgrund der Inhibierung des autophagischen Abbaus konnte nicht gezeigt werden.

D: Ein vermehrter Abbau der Aggregate bzw. ein Rückgang der GFP-Intensität nach Rapamycin-Behandlung (1µM) konnte nicht gezeigt werden. Die Behandlung mit dem Stimulator für Autophagie zeigte in diesen Versuchen einen Zuwachs der GFP-Intensität vergleichbar zu den nicht behandelten Kontrollen.

4.2.5 Immunhistochemische Untersuchungen der transgenen Zebrafischlinien

Nachdem die Aggregatdynamik in *live imaging* Experimenten dargestellt worden war, wurden weitere zelluläre Veränderungen durch immunhistochemische Färbungen untersucht. Diese Experimente wurden sowohl an ganzen Larven, also „*whole-*

mount“, wie auch auf Gefrierschnitten durchgeführt. Die Präparate wurden mit Antikörpern angefärbt und anschließend ausgewertet.

4.2.5.1 Immunhistochemische Untersuchung an der ganzen Larve

Immunhistochemische Antikörperfärbungen der Larve ermöglichen Untersuchungen des Gewebes und erlauben, aufgrund der Gegenfärbung mit unterschiedlichen zellulären Markern, Aussagen über die Lokalisation der sichtbar gemachten Komponenten. Mit Hilfe einer Antikörperfärbung können Proteinkolokalisationen wie auch Veränderungen bestimmter Zellen und deren Anzahl nachgewiesen werden. Für so genannte „*whole-mount*“ Färbungen, also Färbungen des gesamten Organismus, wird die ganze Larve zu bestimmten Zeitpunkten in der Entwicklung fixiert und anschließend immunhistochemisch gefärbt. Mit dieser Methode können zelluläre Veränderungen in ihrer natürlichen Umgebung ohne Präparation des Gewebes detektiert werden. In Zebrafischlarven ist dies in der frühen Entwicklung sehr gut möglich, da die Larven zu diesem Zeitpunkt noch sehr transparent sind.

4.2.5.1.1 „*Whole-mount*“ Färbungen gegen GFAP

GFP_{gfap} R251H transgene Larven sowie nicht transgene Wildtyp-Larven im Alter von zwei, vier und sechs Tagen wurden fixiert. Anschließend wurden in diesen Larven immunhistochemische Färbungen mit einem anti-GFAP Antikörper durchgeführt. GFAP ist ein Zytoskelettprotein, das in Astrozyten vorkommt. Der Antikörper erkennt sowohl das endogene GFAP wie auch das transgen exprimierte, mit einer Mutation versehene GFAP. Dadurch können sowohl Astrozyten sichtbar gemacht, wie auch Aussagen über die Lokalisation der transgenen Proteine getroffen werden. In Experimenten mit GFP_{gfap} R251H transgenen Larven konnten in allen untersuchten Altersstufen deutliche Kolokalisationen des Fusionsproteins (GFP-positive Aggregate) mit GFAP (rot angefärbt) im endogenen GFAP-Netzwerk (ebenfalls rot angefärbt) detektiert werden (Abbildung 22A). Das endogene GFAP-Netzwerk schien durch die Aggregation des transgen exprimierten Fusionsproteins im Vergleich zu nicht transgenen Wildtyp-Larven (Abbildung 22B) deutlich in der Struktur und Organisation gestört zu werden.

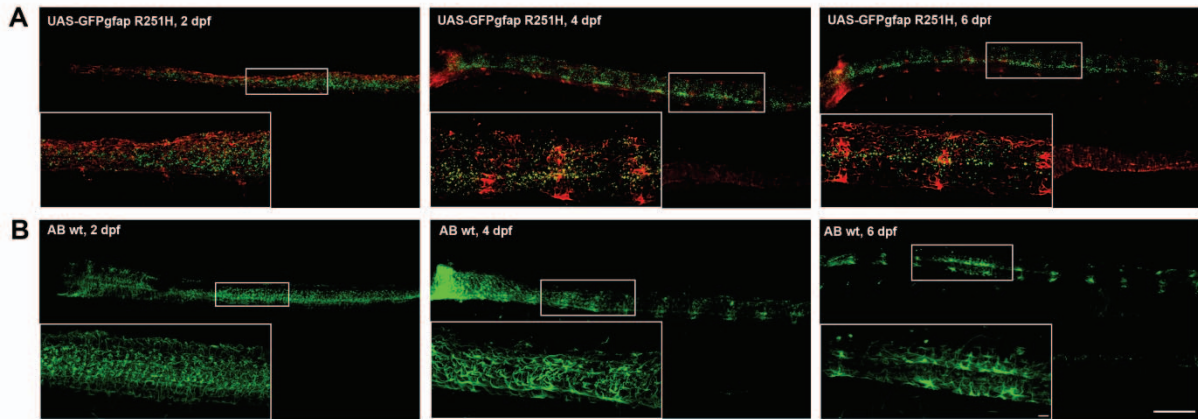


Abbildung 22: „Whole-mount“ Färbungen mit einem anti-GFAP Antikörper

Mit Hilfe von Färbungen ganzer Zebrafischlarven mit einem anti-GFAP Antikörper konnten Unterschiede zwischen GFPgfap R251H transgenen und Wildtyp-Larven gezeigt werden. Maßstab (B): 100µm, Vergrößerung: 10µm.

A: In GFPgfap R251H transgenen Larven im Alter von zwei, vier und sechs Tagen konnten deutliche GFP-positive Aggregate detektiert werden. Diese Aggregate kolokalisierten mit dem endogenen GFAP-Netzwerk der Astrozyten, das rot angefärbt war. Die Ordnung des Netzwerks war deutlich gestört im Vergleich zu nicht transgenen Wildtyp-Larven.

B: Die Färbung von GFAP in Wildtyp-Larven zeigte ein sehr dichtes und gleichmäßiges Netzwerk aus Astrozyten (grün), das im gesamten Bereich des Rückenmarks detektierbar und sehr gleichmäßig war.

4.2.5.1.2 „Whole-mount“ Färbung gegen HuC

Veränderungen an Neuronen wurden mit Hilfe des pan-neuronalen Markers HuC, der ausdifferenzierte Neurone erkennt, an ganzen Larven untersucht. Die Versuche wurden mit GFPgfap R251H und DsRed-UAS-gfap R251H transgenen Fischen sowie Wildtypfischen im Alter von zwei und vier Tagen durchgeführt. In GFPgfap R251H transgenen Larven waren die GFP-positiven Aggregate deutlich erkennbar. Außerdem zeigte die Antikörperfärbung eindeutige rote Neurone. Im Alter von zwei und vier Tagen kam es zu keinerlei Kolokalisation der beiden Strukturen (Abbildung 23A). Am Tag sechs schienen sowohl das Fusionsprotein wie auch das HuC-Antigen im gleichen Zelltyp vorzuliegen (Daten hier nicht gezeigt). Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist ein Durchscheitern eines der beiden Fluorochrome in den jeweils anderen Kanal, also ein Artefakt und keine echte Kolokalisation. Die Färbung von HuC in DsRed-UAS-gfap R251H transgenen Larven zeigte HuC-positive Zellen (grün) in den untersuchten Altersstufen deutlich getrennt von DsRed-positiven Zellen (Abbildung 23B). Im Vergleich zu Wildtyp-Larven (Abbildung 23C) konnten in den transgenen Larven keine signifikanten Unterschiede in Anzahl oder Aussehen der Neurone festgestellt werden.

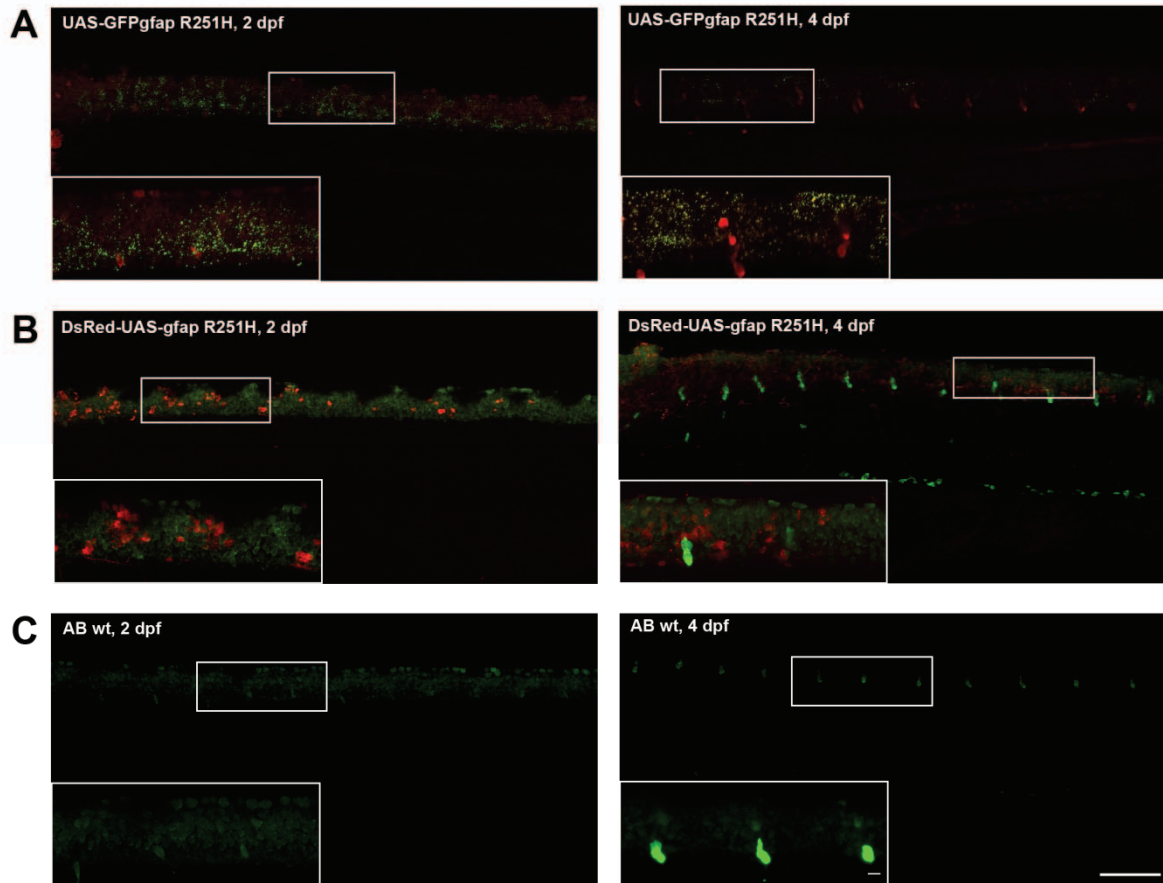


Abbildung 23: „Whole-mount“ Färbungen mit einem anti-HuC Antikörper

Mit Hilfe von Färbungen ganzer Zebrafischlarven mit einem anti-HuC Antikörper konnten in transgenen Larven und Wildtyp-Larven Neurone angefärbt werden. Maßstab (C): 100µm, Vergrößerung: 10µm.

A: Bereits im Alter von zwei und vier Tagen waren in GFPgfap R251H transgenen Embryonen deutlich Neurone (rot) und GFP-positive Aggregate detektierbar. Die beiden Strukturen zeigten keine Kolo-kalisation.

B: In DsRed-UAS-gfap R251H transgenen Embryonen waren in beiden Altersstufen eindeutige neuronale Färbungen (grün) sowie DsRed-positive Zellen detektierbar. Eine Kolo-kalisation der beiden Zelltypen war in keiner der untersuchten Situationen erkennbar.

C: Eine HuC-Färbung in nicht transgenen Kontrollen resultierte in allen untersuchten Situationen in einer deutlich neuronalen Färbung (grün), signifikante Unterschiede zu transgenen Larven waren nicht erkennbar.

4.2.5.2 Färbungen auf Gefrierschnitten

Immunhistochemische Färbungen an ganzen Larven erlauben zwar eine Aussage über mögliche Kolo-kalisationen oder zelluläre Veränderungen, eine detailliertere Untersuchung des Gewebes wird aber durch Gefrierschnitte des Rückenmarks von transgenen Larven und Wildtyp-Larven und anschließende immunhistochemische Färbung erreicht. Dafür wurden Larven im Alter von zwei, vier und sechs Tagen fixiert, eingebettet und anschließend am Kryostat 10µm dünne Schnitte angefertigt. Diese Gefrierschnitte wurden anschließend mit unterschiedlichen Antikörpern angefärbt, um mögliche zelluläre Veränderungen genauer zu erforschen.

4.2.5.2.1 Färbung gegen GFAP

Durch eine Färbung mit einem anti-GFAP Antikörper wurde sowohl endogenes wie auch transgen exprimiertes GFAP in Querschnitten von Zebrafischlarven detektiert. In GFP_{gfap} R251H transgenen Larven waren sehr deutlich GFP-positive Aggregate erkennbar, die eindeutig positiv für GFAP (rot bzw. rot-grün) und im endogenen Astrozyten-Netzwerk lokalisiert waren. Im Alter von sechs Tagen war die Anzahl der GFP-positiven Aggregate reduziert und es waren einige GFP-positive Filamente sichtbar (Abbildung 24A). Die Reduktion der GFP-positiven Aggregate 6 dpf stimmt mit den Beobachtungen aus *live imaging* Experimenten überein, in denen eine Stagnation bzw. ein leichter Rückgang der GFP-Intensität im Alter von sechs Tagen beobachtet wurde (siehe Abbildung 20A, B). Die Färbung auf Gefrierschnitten von DsRed-UAS-*gfap* R251H transgenen Larven zeigte in allen Altersstufen eine deutliche GFAP-Färbung (grün) sowie im Bereich des Zentralkanals DsRed-positive Zellkörper mit Ausläufern in die Peripherie des Rückenmarks. Diese Ausläufer kolokalisierten mit den antikörper-gefärbten Astrozyten. Im Alter von zwei Tagen waren einige Aggregate erkennbar, die sowohl grüne wie auch rote Fluoreszenz aufwiesen (Abbildung 24B). Im Vergleich zu nicht transgenen Wildtyp-Larven (Abbildung 24C) war das Astrozyten-Netzwerk in den transgenen Larven deutlich weniger strukturiert und organisiert und auch weniger dicht.

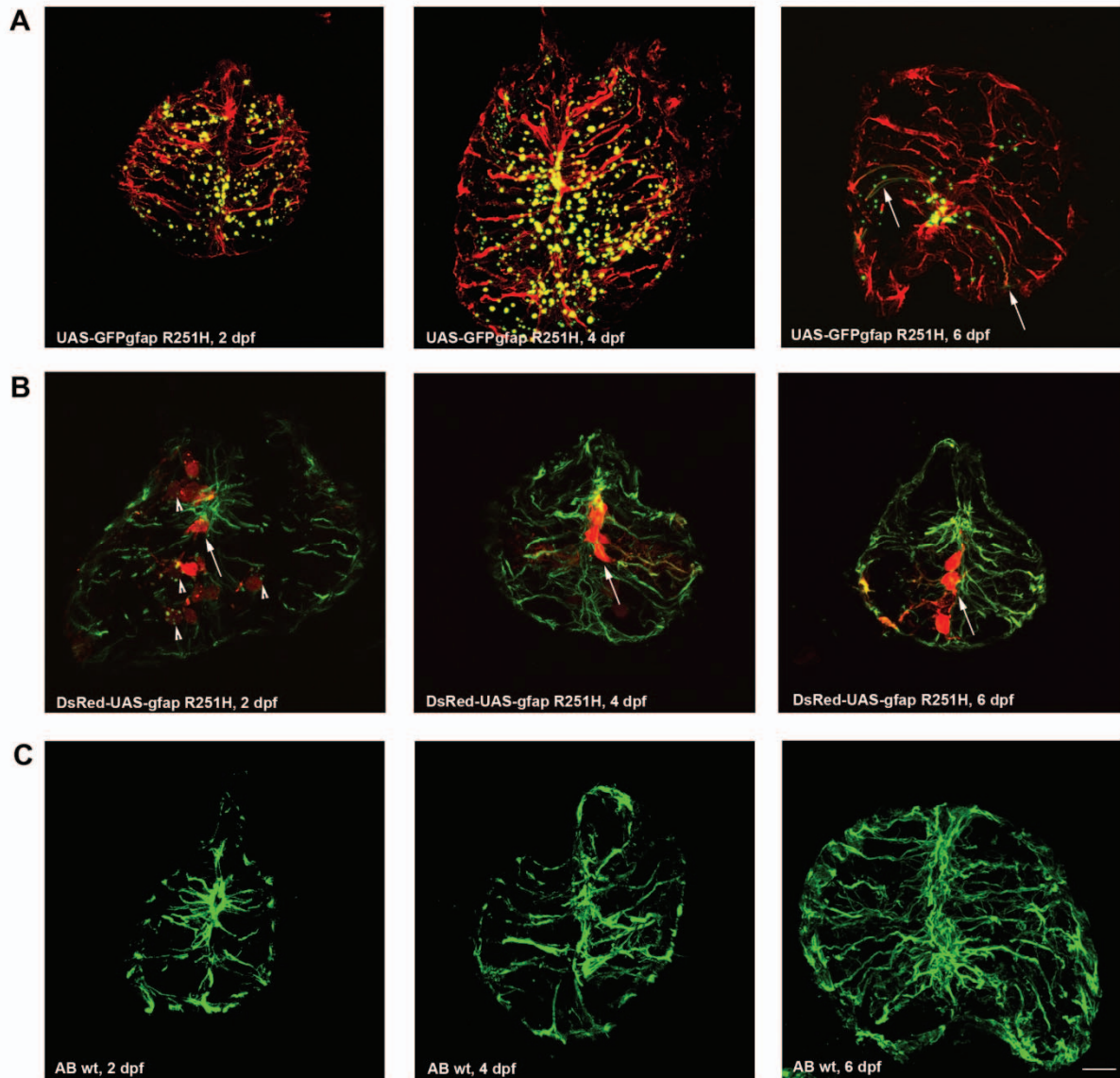


Abbildung 24: Anti-GFAP-Färbung auf Querschnitten des Rückenmarks von Larven

Durch Färbungen auf Gefrierschnitten von Larven wurde die zelluläre Organisation des Rückenmarks detaillierter untersucht. Mit Hilfe des anti-GFAP Antikörpers wurden Astrozyten sichtbar gemacht. Maßstab (C): 10µm.

A: Auf Gefrierschnitten des Rückenmarks von GFPgfap R251H transgenen Larven waren deutlich GFP-positive Aggregate erkennbar. 6 dpf war die Anzahl der Aggregate reduziert, allerdings waren einige GFP-positive Ausläufer (Pfeile) sichtbar. Die Aggregate wie auch die Ausläufer zeigten deutliche Kolo-kalisation mit dem rot angefärbten GFAP-Netzwerk der Astrozyten.

B: Gefrierschnitte des Rückenmarks von DsRed-UAS-gfap R251H transgenen Larven zeigten im Bereich des Zentralkanals eindeutig DsRed-positive Zellkörper (rot, Pfeile), die ihre Ausläufer bis in die Peripherie des Rückenmarks aussendeten. Diese Ausläufer waren sowohl DsRed-positiv wie auch positiv für grün angefärbtes GFAP. 2 dpf war eine geringe Anzahl an doppel-positiven Aggregaten (Pfeilspitzen) erkennbar, zu späteren Zeitpunkten jedoch nicht mehr.

C: Das grün angefärbte GFAP-Netzwerk war in Wildtyp-larven deutlich strukturierter und dichter als in den transgenen Larven.

Die an Tag sechs in GFPgfap R251H beobachtete Tendenz des Rückgangs der Aggregate hin zu filamentösen Strukturen wurde in adulten transgenen Fischen untersucht. Dazu wurde das Rückenmark von adulten, GFPgfap R251H transgenen

Ergebnisse

Zebrafischen sowie Wildtypkontrollen im Alter von vier und zehn Monaten präpariert, fixiert und eingebettet. Im Anschluss wurden Gefrierschnitte angefertigt und immunhistochemische Färbungen mit einem anti-GFAP Antikörper durchgeführt. Im Vergleich zu den Larven waren in Adulten deutlich weniger GFP-Signale detektierbar. GFP-positive Aggregate waren meist im Bereich des Zentralkanals lokalisiert. Von dort erstreckten sich GFP-positive filamentöse Strukturen in die Peripherie des Rückenmarks, die deutlich mit dem endogenen GFAP-Netzwerk kolokalisierten. Die GFP-positiven Aggregate schienen in den adulten Fischen kleiner zu sein als in Larven. Diese Effekte waren im Alter von zehn Monaten prominenter erkennbar als im Alter von vier Monaten (Abbildung 25A, B). Die Organisation und Struktur des Astrozyten-Netzwerks erschien in den transgenen Zebrafischen nur leicht beeinträchtigt im Vergleich zu den Wildtypfischen.

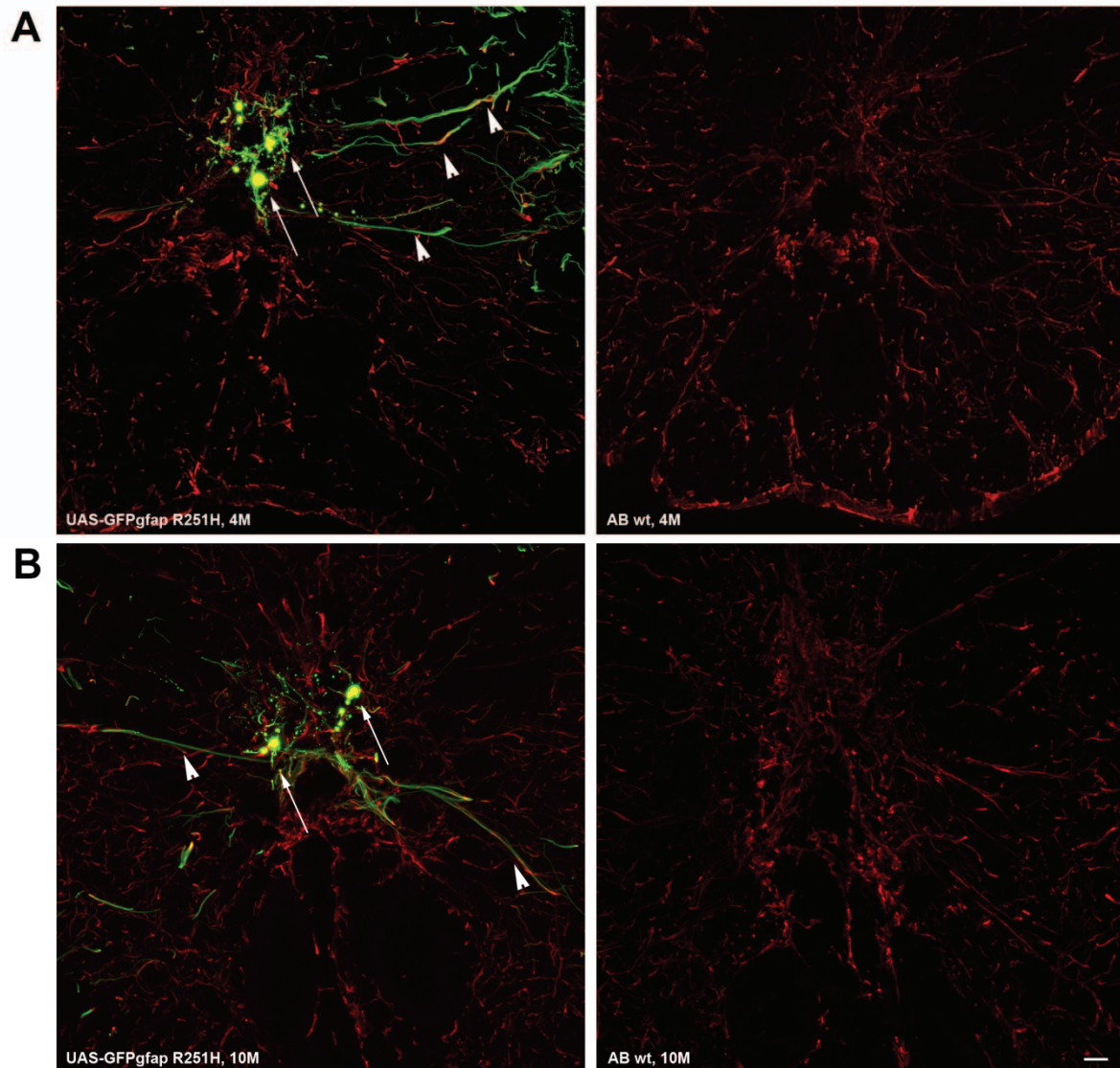


Abbildung 25: Anti-GFAP-Färbung auf Querschnitten des Rückenmarks von Adulten

Färbungen von Rückenmarksquerschnitten adulter transgener Fische wurden durchgeführt, um die Veränderungen auf zellulärer und struktureller Ebene in diesen Altersstufen zu untersuchen. Maßstab: 10µm.

A: In vier Monate alten transgenen Zebrafischen waren deutliche GFP-positive Aggregate im Bereich des Zentralkanals (Pfeile) wie auch filamentöse Ausläufer (Pfeilspitzen) zu erkennen. Diese Strukturen kolokalisierten mit endogenem GFAP (rot). Im Vergleich zu den Wildtypfischen war das Astrozyten-Netzwerk nur leicht beeinträchtigt.

B: In zehn Monate alten transgenen Zebrafischen waren neben GFP-positiven Aggregaten (Pfeile) im Bereich des Zentralkanals ebenfalls GFP-positive Ausläufer (Pfeilspitzen) detektierbar, die mit dem endogenen GFAP-Netzwerk (rot) kolokalisierten. Die Aggregate erschienen kleiner als in den Larven, das Astrozyten-Netzwerk war auch hier im Vergleich zu nicht transgenen Fischen nur leicht beeinträchtigt.

4.2.5.2.2 Färbung gegen HuC

Zur Untersuchung der neuronalen Strukturen in transgenen Larven und Wildtypplarven wurden Gefrierschnitte von diesen Larven im Alter von zwei, vier und sechs Tagen

Ergebnisse

angefertigt sowie anschließend Färbungen mit dem pan-neuronalen Marker HuC durchgeführt.

Die Färbung von GFP_{gfap} R251H transgenen Larven zeigte in allen Altersstufen deutlich sichtbare GFP-positive Aggregate. Diese Aggregate schienen mit der Färbung gegen HuC (rot), also mit Neuronen, zu kolokalisieren (Abbildung 26A). Da jedoch das GFP_{gfap} R251H Transgen unter einem Astrozyten-Promotor exprimiert wurde, der sehr spezifisch ist, konnten diese vermeintlich doppel-transgenen Aggregate als Mikroskopieartefakte interpretiert werden. In Färbungen von Schnitten DsRed-UAS-_{gfap} R251H transgener Larven konnte in keiner Altersstufe eine Kolokalisation der DsRed-positiven Astrozyten mit den grün angefärbten Neuronen detektiert werden. Die Zellkörper der DsRed-positiven Zellen waren auch hier im Bereich des Zentralkanals lokalisiert und Ausläufer erstreckten sich zwischen den grün angefärbten Neuronen in die peripheren Regionen des Rückenmarks (Abbildung 26B). Im Vergleich zur neuronalen Färbung in nicht transgenen Wildtyp-Larven (Abbildung 26C) waren in den transgenen Larven keine sichtbaren Veränderungen der Neurone erkennbar. Eine Aussage über deutlichen Zelltod der Neurone in transgenen Larven, wie ursprünglich vermutet, kann nicht getroffen werden.

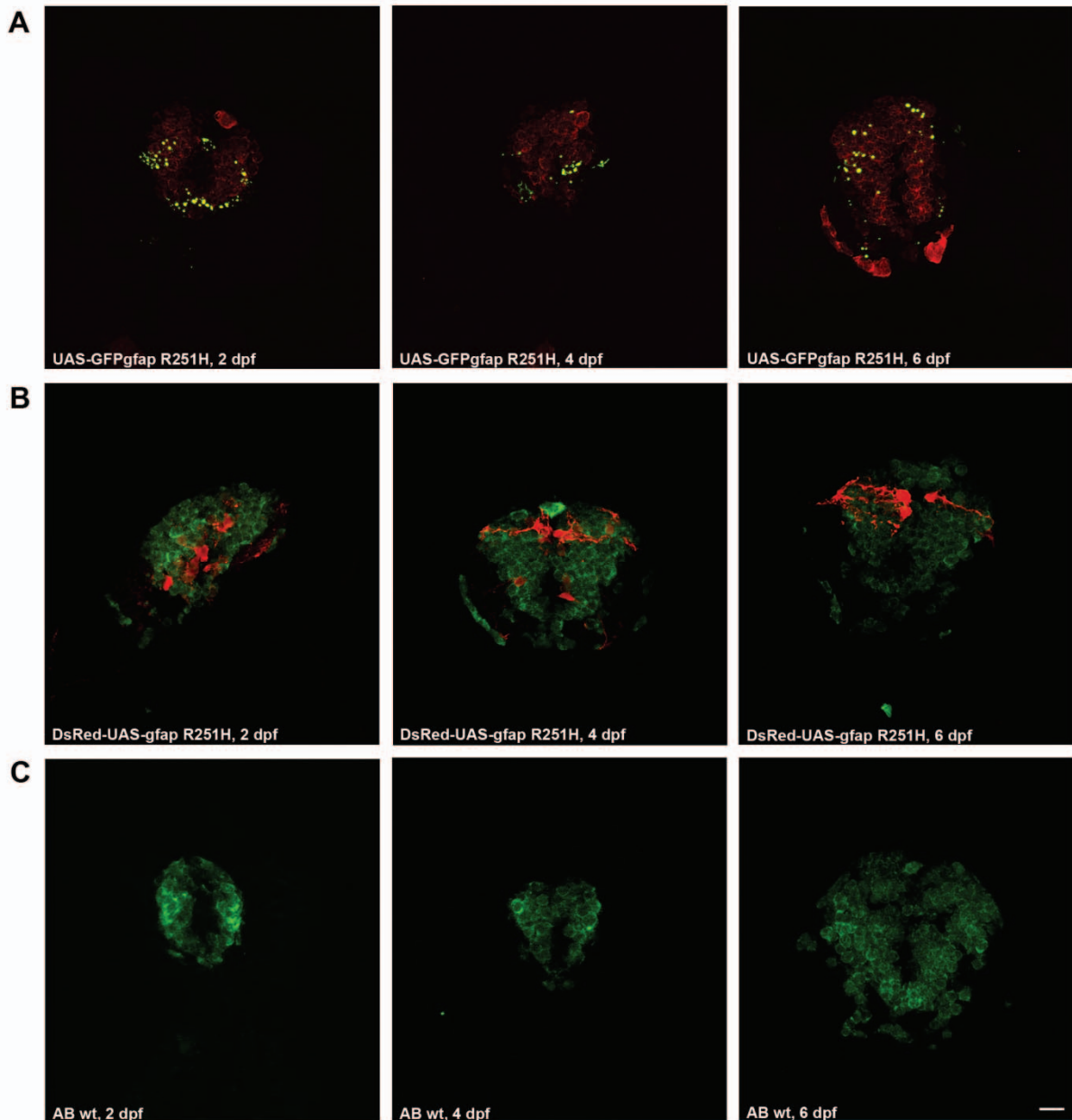


Abbildung 26: Anti-HuC-Färbung auf Querschnitten des Rückenmarks von Larven

Eine Färbung gegen das HuC-Antigen wurde durchgeführt, um Veränderungen in der neuronalen Organisation transgener und Wildtyp-Larven zu untersuchen. Maßstab: 10 µm.

A: In GFPgfap R251H transgenen Larven schienen die GFP-positiven Aggregate in allen Altersstufen mit den angefärbten Neuronen (rot) zu kolokolalisieren. Die Neurone selbst waren gleichmäßig und dicht präsent.

B: In DsRed-UAS-gfap R251H transgenen Larven waren die Zellkörper der DsRed-positiven Zellen um den Zentralkanal lokalisiert. Kolokolisationen der Zellkörper oder ihrer Ausläufer mit grün angefärbten Neuronen waren nicht detektierbar.

C: In Wildtyp-Larven waren gleichmäßig und dicht präsente Neurone detektierbar, Unterschiede zu transgenen Larven waren in diesem Experiment nicht detektierbar.

4.2.6 Biochemische Untersuchung der Aggregate

Zur biochemischen Analyse der Aggregate wurden zunächst transfizierte Zellen und im Anschluss dann die transgenen Fischlinien verwendet. Die mit den beschriebenen „Responder“-Konstrukten und einem „Driver“-Konstrukt aus dem *cmv*-Promotor

Ergebnisse

sowie Gal4 (pT2dCMVGal4VP16) transfizierten Zellen (siehe 4.2.2) wurden 48 Stunden nach erfolgreicher Transfektion geerntet. Anschließend wurden die Zellen in Lysepuffer mit unterschiedlichen Kaliumchlorid(KCl)-Konzentrationen lysiert. Dabei entstand eine lösliche (Überstand) wie auch eine unlösliche (Pellet) Fraktion der Zelllysate, die beide im Western Blot analysiert wurden. Der verwendete anti-zrf1 Antikörper erkennt als Epitop GFAP. Dieses hat ein Molekulargewicht von etwa 50 kDa, das Fusionsprotein aus GFP und GFAP liegt bei etwa 80 kDa. Mit Hilfe des anti-zrf1 Antikörpers konnten die Fusionsproteine (UAS-GFPgfap wt sowie UAS-GFPgfap R251H) sowie nicht fusioniertes GFAP aus dem DsRed-UAS-gfap R251H Konstrukt nachgewiesen werden. Zusätzlich erkennt der Antikörper weitere Banden, die entweder prozessierte Fusionsproteine oder unspezifische Banden darstellen (Abbildung 27A). Trotz starker Schwankungen in der Beladung (Abbildung 27B) war die Proteinexpression in allen transfizierten Zellen relativ gleichmäßig hoch. Steigende KCl-Konzentrationen im Lysepuffer erhöhen laut Literatur die Löslichkeit von GFAP und bewirken damit eine Verschiebung von GFAP aus dem Pellet in den Überstand (Hsiao et al., 2005). Die Untersuchung der Zelllysate im Western Blot zeigte allerdings kein verändertes Löslichkeitsverhalten von GFAP. Weiterhin konnten unter allen verwendeten Bedingungen keinerlei höher-molekulare Komplexe detektiert werden, die auf Aggregate schließen ließen (Daten nicht gezeigt). Gezeigt ist lediglich, dass der Antikörper (anti-zrf1) das Antigen erkennt und im Western Blot ein Signal ergibt.

Ergebnisse

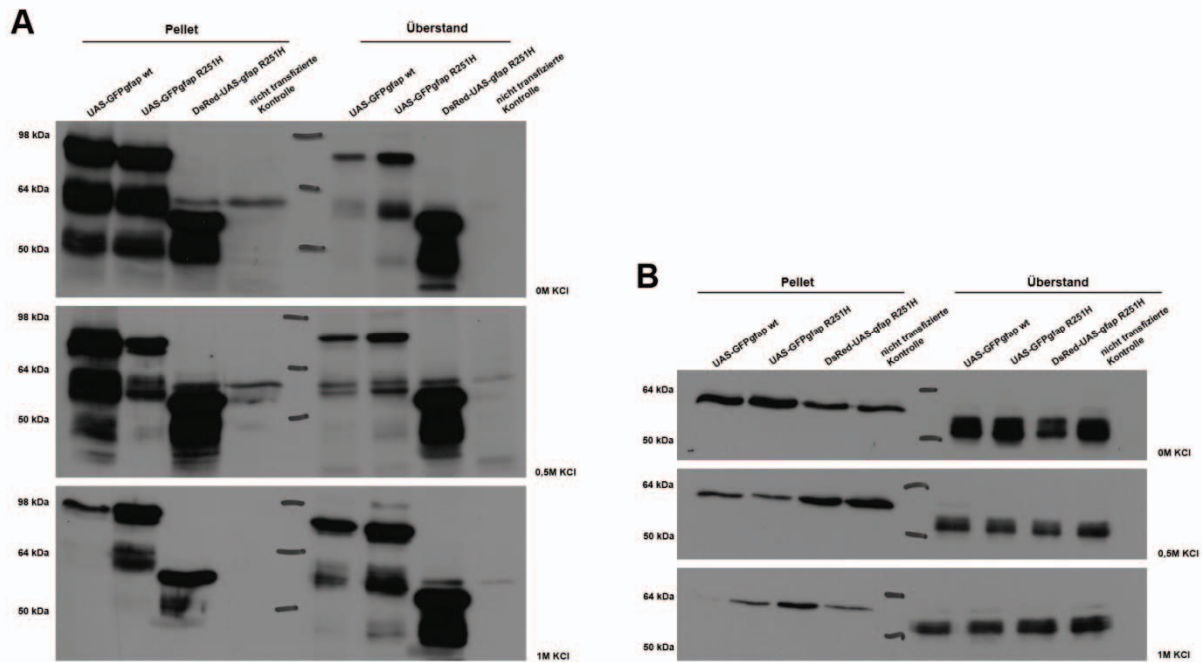


Abbildung 27: Biochemische Analyse der transfizierten Zelllysate

A: Die Analyse der Zelllysate mit dem anti-zrf1 Antikörper gegen das GFAP-Epitop zeigte, dass in allen transfizierten Zellen ein ähnlicher Level an Proteinexpression vorliegt. Ein unterschiedliches Löslichkeitsverhalten von GFAP in steigenden KCl-Konzentrationen war nicht detektierbar.

B: Die Beladungskontrolle wurde mit einem Antikörper gegen azetyliertes Tubulin durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass die Beladung der einzelnen Spuren stark schwankte.

Die biochemische Analyse der Aggregate in transgenen Fischen wurde ausschließlich mit stabil transgenen UAS-GFPgfp R251H Fischen und nicht transgenen Wildtypfischen durchgeführt. Larven im Alter von zwei, vier und sechs Tagen wurden dazu in Lysepuffer mit unterschiedlichen KCl-Konzentrationen lysiert und im Western Blot analysiert. Über den anti-zrf1 Antikörper wurden sowohl endogenes GFAP wie auch das transgen exprimierte GFPgfp R251H Fusionsprotein detektiert. Das endogene GFAP wurde bereits an Tag zwei deutlich exprimiert, was die Ergebnisse aus den Färbungen bestätigt. Das transgene Protein wurde in den Versuchen ohne KCl weder im Pellet noch im Überstand erkannt. Bei Lyse in Lysepuffer ohne KCl war kein endogenes GFAP im Überstand detektierbar, sondern ausschließlich im Pellet. Bei Lyse der Larven in Lysepuffer mit 1M KCl war in den transgenen Larven eine dünne Bande bei etwa 80 kDa erkennbar. Dieses schwache Signal für das Fusionsprotein steht allerdings in deutlichem Widerspruch sowohl zu der starken GFP-Expression, die in *live imaging* Experimenten und immunhistochemischen Färbungen beobachtet wurde, wie auch zu der sehr starken Expression von endogenem GFAP. Weiterhin war in den Proben mit 1M KCl eine leichte Verschiebung des Löslichkeitsverhaltens von GFAP aus dem Pellet in den

Ergebnisse

Überstand zu erkennen, allerdings auch hier nur für das endogene, nicht aber das transgen exprimierte GFAP (Abbildung 28A). Wie exakt diese Ergebnisse und die beobachteten Trends sind, bleibt in Frage gestellt, da die Beladung der einzelnen Spuren stark schwankte (Abbildung 28B).

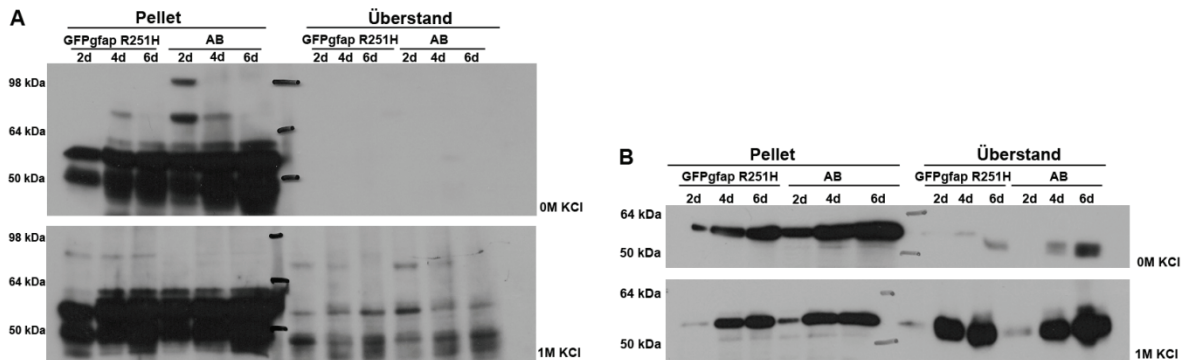


Abbildung 28: Biochemische Analyse der Aggregate in transgenen Fischen

A: Die Lyse der transgenen GFPgfap R251H Larven und Wildtyp-Larven im Alter von zwei, vier und sechs Tagen sowie die anschließende Analyse mit dem anti-zrf1 Antikörper zeigte eine deutliche Expression von endogenem GFAP in der unlöslichen Fraktion (50 kDa). Nach der Lyse in Puffer mit 1M KCl war auch das GFPgfap R251H Transgen detektierbar (80 kDa). Eine Veränderung des Löslichkeitsverhaltens war nur nach Lyse in Puffer mit 1M KCl schwach erkennbar.

B: Die Analyse der lysierten Larven mit einem Antikörper gegen azetyliertes Tubulin als Beladungskontrolle zeigte, dass die Beladung der einzelnen Spuren stark schwankte und daher eine exakte Interpretation der Ergebnisse nicht zulässt.

4.2.7 Elektronenmikroskopische Untersuchung der Aggregate

In der Literatur werden Rosenthalfasern als elektronendichte Aggregate beschrieben, die im Elektronenmikroskop deutlich erkennbar sind (Herndon et al., 1970). Diese Aggregate enthalten mutiertes GFAP als Hauptbestandteil. Außerdem wurden Ubiquitin, α -Cristallin und hsp27 in den Aggregaten detektiert. Zur Analyse der transgenen GFPgfap R251H Fischlinien wurde das Rückenmark sowohl von Larven im Alter von vier Tagen wie auch von adulten Fischen im Alter von sieben Monaten und von entsprechenden nicht transgenen Wildtypkontrollen präpariert. Zunächst wurden Semidünnschnitte hergestellt, um die passende Region im Gewebe zu finden. Diese Schnitte wurden mit Toluidinblau angefärbt und analysiert. Anschließend wurden von den entsprechenden Regionen Ultradünnschnitte angefertigt und am Elektronenmikroskop (EM) untersucht.

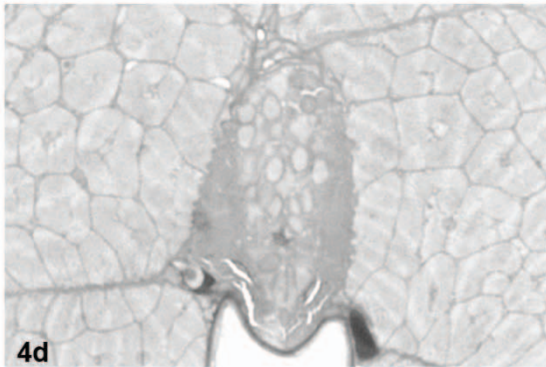
4.2.7.1 Analyse der Semidünnschnitte

Die Semidünnschnitte der transgenen Larven wie auch der Wildtypkontrollen zeigten bereits im Alter von vier Tagen myelinisierte Axone im Bereich des Rückenmarks.

Ergebnisse

Diese meist eher großen Axone waren im Zentrum des Rückenmarks lokalisiert. Deutliche Unterschiede zwischen transgenen Larven und Wildtyparven waren allerdings in diesem Alter nicht erkennbar. Im Alter von sieben Monaten war die Myelinisierung deutlich fortgeschritten. Die Mauthner Axone (Sterne) sowie weitere efferente Fasern im ventralen Bereich des Rückenmarks (Pfeilspitzen) und auch afferente Fasern im dorsalen Bereich des Rückenmarks (Pfeile) zeigten eine dicke und regelmäßige Myelinschicht. Auch die übrigen Axone waren deutlich erkennbar von Myelin umgeben. Die Struktur und Organisation des Rückenmarks schien in den transgenen Fischen (Abbildung 29A) im Vergleich zu den Wildtypkontrollen (Abbildung 29B) zu beiden untersuchten Zeitpunkten nicht verändert zu sein.

A: GFPgfap R251H



B: AB

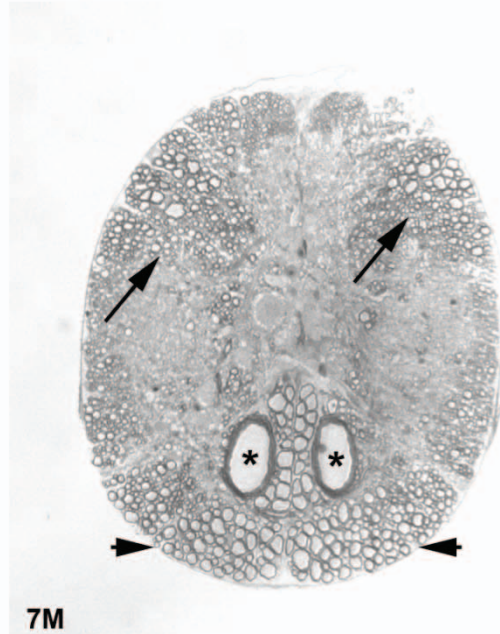
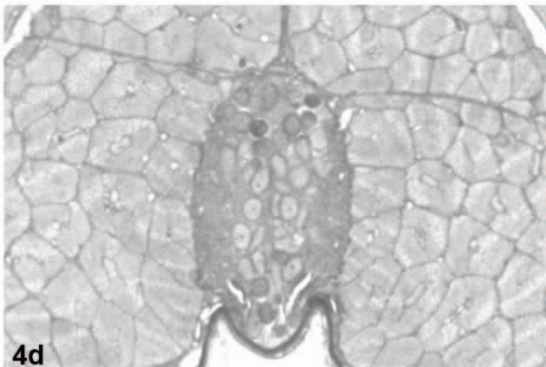


Abbildung 29: Semidünnschnitte der transgenen und Wildtypfische

Zunächst wurden die Semidünnschnitte der Proben untersucht, um Unterschiede zwischen transgenen Proben und Wildtypproben zu detektieren. Vergrößerung: 4d: 63x (Wasser), 7M: 20x

A: Die transgenen Larven im Alter von vier Tagen zeigen bereits deutlich myelinisierte Axone. Diese liegen im zentralen Bereich des Rückenmarks. Im Alter von sieben Monaten waren deutlich mehr Axone vorhanden, die alle eine regelmäßige Myelinschicht enthielten. Eindeutig zu erkennen waren die beiden großen und stark myelinisierten Mauthner Axone (Sterne) im ventralen Bereich des Rückenmarks sowie myelinisierte efferente (Pfeilspitzen) und afferente (Pfeile) Fasern.

B: Auch die Wildtyparven im Alter von vier Tagen zeigten eine Myelinschicht um die Axone im zentralen Bereich des Rückenmarks. Im Alter von sieben Monaten waren auch hier die Mauthner Axone (Sterne) mit ihrer dicken Myelinschicht sowie weitere myelinisierte efferente (Pfeilspitzen) und afferente (Pfeile) Fasern zu erkennen. Unterschiede zu den transgenen Proben konnten nicht festgestellt werden.

4.2.7.2 Elektronenmikroskopische Analyse der Ultradünnschnitte

Die anschließend angefertigten Ultradünnschnitte von vier Tage und sieben Monaten alten GFPgfp R251H transgenen Fischen und Wildtypfischen wurden im Elektronenmikroskop analysiert. In vier Tage alten transgenen Larven (Abbildung 30A) konnten im Elektronenmikroskop elektronendichte Profile detektiert werden (Pfeile). Diese Strukturen wiesen eine identische Verteilung sowie eine vergleichbare Größe wie die im Fluoreszenzmikroskop in den lebenden Larven detektierten GFPgfp R251H-Aggregate (siehe Abbildung 19D, E) auf. Daraus lässt sich schließen, dass es sich bei diesen Strukturen um GFAP-Aggregate handelt. In den Wildtypkontrollen (Abbildung 30B) waren solche elektronendichten Profile nicht vorhanden. Bezüglich der Myelinisierung unterschieden sich die transgenen Larven und Wildtyp-Larven in diesem Alter nicht. In beiden Situationen war eine dünne Myelinschicht um die Nervenbündel zu erkennen, die jedoch noch nicht vollständig entwickelt ist. Die Präparate wiesen auch hinsichtlich der zellulären Organisation keine Unterschiede auf. Echte Astrozytenausläufer konnten jedoch in beiden Situationen in diesem Alter noch nicht detektiert werden. In den sieben Monate alten Proben war in den transgenen Präparaten eine deutliche, kompakte Myelinschicht um die Axone zu erkennen (Abbildung 30C, D), die ähnlich dick zu sein schien wie in den nicht transgenen Wildtypkontrollen (Abbildung 30E). Die Organisation der Myelinschicht war in den transgenen Präparaten deutlich gestört, was allerdings als ein Präparationsartefakt interpretiert werden kann. In den Astrozytenfortsätzen transgener Fische (Abbildung 30C, D, mit Pfeilspitzen markiert) war im Vergleich zu den Wildtypkontrollen (Abbildung 30E) ein stark beeinträchtigtes GFAP-Filamentnetzwerk zu erkennen. Die einzelnen Fasern waren deutlich unregelmäßiger angeordnet und in sehr reduzierter Anzahl vorhanden, nur vereinzelt waren faserartige Strukturen detektierbar. Außerdem war die Anzahl der Vakuolen (Stern) in den transgenen Fischpräparaten deutlich erhöht. Um die Membranen der Vakuolen sowie an der Membran des Astrozytenfortsatzes (Pfeile in den vergrößerten Ausschnitten) sammelten sich elektronendichte Aggregate, die als Rosenthalfasern interpretiert werden können. In den nicht transgenen Präparaten waren weder elektronendichte Aggregate noch eine erhöhte Anzahl an Vakuolen detektierbar.

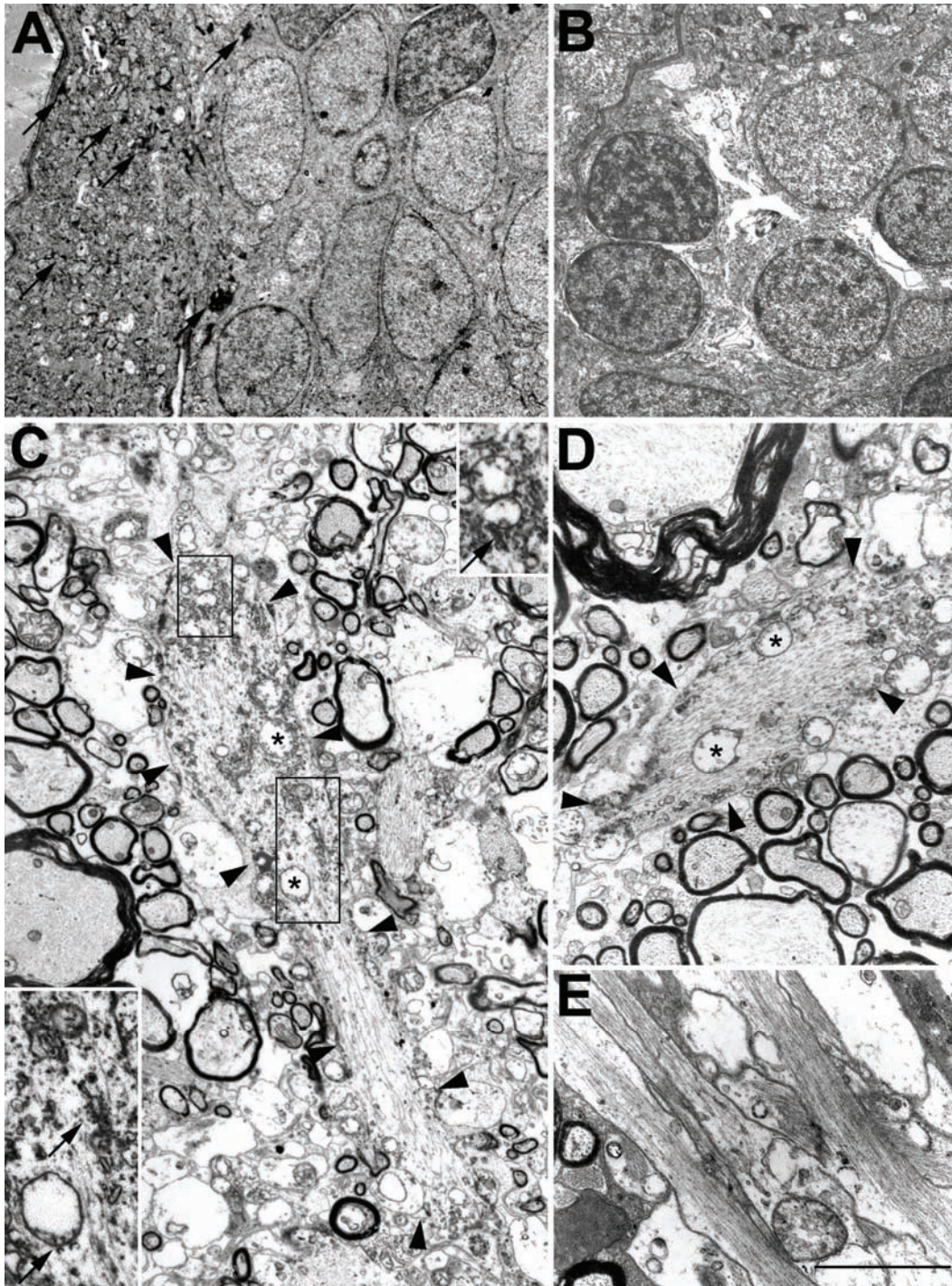


Abbildung 30: Elektronenmikroskopische Analyse der transgenen Präparate und Wildtypkontrollen

Die transgenen Proben und Wildtypproben unterschiedlicher Altersstufen wurden im EM untersucht. Maßstab (E): 4µm.

A: In den vier Tage alten GFPgfp R251H transgenen Larven waren im EM deutlich elektronendichte Profile erkennbar (Pfeile), die aufgrund ihrer Größe und der Verteilung als GFAP-Aggregate interpretiert werden können. Die Myelinisierung ist bereits erkennbar, diese befindet sich jedoch noch in der Entwicklung.

B: In vier Tage alten Wildtyplarven waren im EM keine elektronendichten Strukturen erkennbar. Die Myelinisierung ist, wie bei den transgenen Larven, bereits in Ansätzen erkennbar, jedoch noch nicht vollständig entwickelt.

C, D: In sieben Monate alten Präparaten von GFPgfp R251H transgenen Fischen konnte eine deutliche Myelinisierung detektiert werden, die teilweise eine gestörte Struktur zeigte. In

Ergebnisse

Astrozytenausläufern (durch Pfeilspitzen markiert) fand man ein deutlich gestörtes GFAP-Netzwerk. Die Anzahl an Vakuolen war in den Ausläufern der Astrozyten erhöht (Stern). Außerdem fanden sich um diese Vakuolen sowie an den Rändern der Zellausläufer deutliche, elektronendichte Strukturen (Pfeile in den vergrößerten Ausschnitten), die als Rosenthalfasern interpretiert werden können.

E: In sieben Monate alten Wildtypfischen war die Myelinisierung deutlich, sehr regelmäßig und kompakt erkennbar. Das GFAP-Netzwerk in den Astrozytenausläufern war deutlich regelmäßiger als in den transgenen Fischen. Elektronendichte Ablagerungen waren nicht erkennbar.

5. Diskussion

Im Fokus dieser Dissertation lag die Charakterisierung von Astrozyten, definiert als GFAP exprimierende Zellen, und anderen Zelltypen im Nervensystem. Dazu wurden zwei unterschiedliche Strategien angewandt: die hitze-induzierte genetische Ablation von Astrozyten sowie die transgene Expression von fluoreszenz-gekoppeltem GFAP mit und ohne AXD-assoziiertes Mutation. Über die hitze-induzierte, genetische Ablation der Astrozyten konnte gezeigt werden, dass sowohl induzierbare (Hitzeschockpromotor) wie auch genetische (Cre/loxP Rekombination) Systeme im Zebrafisch funktionieren. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Integration eines induzierbaren DTA Transgens in das Genom des Fisches ohne Induktion keine Auswirkungen auf die Entwicklung und das Überleben der Larven hat. Nach erfolgreicher Induktion des DTA Transgens waren aber teilweise deutliche morphologische Veränderungen zu erkennen. Die Varianz der Veränderungen ist sehr wahrscheinlich auf eine variable Expression des DTA zurückzuführen. Nach Induktion des DTA Transgens konnte in den deformierten Larven eine deutlich erhöhte Anzahl an Acridin Orange-positiven Zellen nachgewiesen werden. Diese Zellen deuten auf vermehrten Zelltod in den Larven nach DTA-Expression hin.

Die transgene Expression von GFAP mit und ohne AXD-assoziiertes Mutation im Zellkultursystem und in den Fischen zeigte, dass bereits das Wildtyp-GFAP in beiden Systemen nach Überexpression eine hohe Tendenz zur Aggregation zeigt. Die Aggregate waren jedoch nach transgener Expression von GFAP mit Mutation in beiden Systemen deutlich stärker als nach Expression von GFAP ohne Mutation. Die Aggregate konnten ausschließlich in GFAP-exprimierenden Zellen und nicht in Neuronen nachgewiesen werden. Auch konnte gezeigt werden, dass die Aggregate die Ordnung und Organisation des endogenen GFAP-Netzwerks erheblich störten. Die Untersuchung von älteren Larven und adulten Fischen zeigte, dass die Größe und Anzahl der Aggregate mit zunehmendem Alter abnimmt. Die Löslichkeit der GFAP-Aggregate unterscheidet sich deutlich von der Löslichkeit von Aggregaten anderer Proteinaggregationserkrankungen. Während beispielsweise die für die Alzheimer-Erkrankung typischen Amyloid- und tau-Aggregate schwer löslich sind, konnte mit Hilfe von Lebendbeobachtungen am konfokalen Mikroskop gezeigt werden, dass sich die GFAP-Aggregate während der Zellteilung auflösen und nach erfolgter Teilung sofort wieder bilden. In biochemischen Untersuchungen konnten

ebenfalls nur die Monomere der (Fusions-) Proteine nachgewiesen werden und keine höher-molekularen Aggregate.

Aufgrund der Transparenz der Zebrafischlarven ermöglichen beide in dieser Arbeit angewandte Techniken aus unterschiedlichen Blickwinkeln detaillierte Einblicke in die Biologie von Astrozyten und erlauben so eine intensive Charakterisierung dieser Zellen. Dennoch bringen beide Methoden auch Probleme mit sich, die im Folgenden diskutiert werden sollen.

5.1 Die Astrozyten und ihre Rolle im Nervensystem

Neben ihren bisherigen Funktionen, die überwiegend unterstützenden und schützenden Charakter hatten, scheinen Astrozyten weitere wichtige Funktionen zu übernehmen, die zu einem intakten Nervensystem beitragen. Astrozyten sind offensichtlich in der Lage, eine große Anzahl an Aggregaten zu tolerieren, ohne dass ihre eigentlichen Funktionen und damit das Nervensystem des Organismus eingeschränkt werden. Obwohl die Organisation des GFAP-Netzwerks in einigen Situationen durch die Anwesenheit der Aggregate erheblich gestört ist (siehe 4.2.5), scheinen die Larven dadurch nicht eingeschränkt zu sein. Sie entwickeln sich ähnlich im Vergleich zu nicht transgenen Wildtyp-Larven. Sie beginnen in ähnlichen Entwicklungsstadien zu schwimmen, Nahrung aufzunehmen und schließlich sind sie in der Lage, sich erfolgreich fortzupflanzen. Während Aggregate in den Astrozyten in recht großer Anzahl toleriert werden können, scheint ein gänzlich Fehlen der Astrozyten schwerwiegendere Auswirkungen auf die Zebrafischlarven zu haben. Nach der Ablation der Astrozyten in der frühen Entwicklung kommt es zu massiven Deformationen der Larven (siehe 4.1.4.3). Die Auswirkungen dieser Deformationen sind so stark, dass die Larven nicht mehr in der Lage sind, sich zu bewegen und Nahrung aufzunehmen, was letztlich zum Tod der Larven führt. Ob nun diese Toleranz der Aggregate und die Intoleranz des kompletten Fehlens der Astrozyten auf glia-neuronale Kommunikationsprozesse, auf die Kompensation der Aufgaben der durch die Aggregate eingeschränkten Astrozyten durch andere Zellen oder andere, interne Toleranzgrenzen bisher unbekannter Art zurückzuführen sind, bleibt zu untersuchen. Inwieweit sich die Aggregate auf molekularer Ebene auf die Larven auswirken, d.h. ob und inwieweit beispielsweise die Signalübertragung bei der Reizleitung eingeschränkt ist, muss noch vollständig analysiert werden.

Während die bisher etablierten Mausmodelle für AXD (Hagemann et al., 2006; Hsiao et al., 2005; Tanaka et al., 2007) sowie das hier beschriebene Fischmodell außer den GFAP-Aggregaten keine Symptome für AXD aufweisen, kommt es bei Menschen mit den beschriebenen Mutationen im Gen für *gfap* zu weiteren schweren Symptomen wie beispielsweise Megalenzephalie, körperlicher und geistiger Entwicklungsverzögerung, motorischen Einschränkungen etc. (siehe 1.3.2). Selbst in GFAP transgenen Fischen mit einem Alter bis zu zwei Jahren konnten keine dieser weiteren Symptome nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Es bleibt daher die Frage, ob die bisher bekannten Mutationen im *gfap*-Gen (Brenner et al., 2001; Li et al., 2002; Rodriguez et al., 2001) alleine als Auslöser für AXD ausreichen oder ob es sich hierbei nur um einen von vielen Faktoren handelt, die alle zusammen in ihrer Summe letztlich zu diesem Krankheitsbild führen.

5.2 Der Zebrafisch *gfap* Promotor

Als regulatorische Elemente für *gfap* im Zebrafisch, die hier als *gfap*-Promotor bezeichnet werden, wurden Abschnitte in der genomischen DNA identifiziert, die insgesamt eine Größe von 7,4 kb aufweisen (Bernardos and Raymond, 2006). Diese Regionen umfassen etwa 3 kb, die der translationalen Startstelle vorgelagert sind, sowie 16 Basenpaare von Exon 1 der *gfap*-Sequenz und zusätzlich etwa 4,3 kb von Intron 1 des *gfap*-Gens. Diese Sequenzen wurden für die Etablierung der regulatorischen Elemente aus technischen Gründen in umgekehrter Reihenfolge (Intron1, 5'/Exon1) verwendet (Bernardos and Raymond, 2006). Während der frühen Embryonalentwicklung wurde die Spezifität des *gfap*-Promotors mittels der Expression von GFP unter der Kontrolle des Promotors untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass der Promotor sowohl in Zellen des ZNS wie jedoch auch in einigen Zellen außerhalb des ZNS aktiv ist. Die Zellen im ZNS zeigten in Gegenfärbungen mit einem Antikörper gegen GFAP positive Signale sowohl für GFP wie auch für die Antikörperfärbung. Bei den GFP-positiven Zellen im PNS handelt es sich um Zellen des Linsenepithels im Auge und einigen Zellen nahe dem Verdauungstrakt. Außerdem konnten GFP-positive nicht-myelinisierende Schwann'sche Zellen detektiert werden, die entlang von peripheren Nerven lokalisiert waren (Bernardos and Raymond, 2006). Alle diese Zellen wurden bereits früher in Zebrafischen oder Mäusen als GFAP-exprimierende Zellen beschrieben (Eng et al., 2000; Marcus and Easter, 1995). Da jedoch die überwiegende Anzahl an GFP-exprimierenden Zellen

im ZNS lokalisiert ist und auch deutlich mit einer anti-GFAP Antikörperfärbung kolokalisiert, kann der *gfap*-Promotor durchaus als spezifisch für Astrozyten im ZNS angesehen und für Experimente zur Charakterisierung dieser Zellen verwendet werden. In den hier durchgeführten Experimenten konnten die GFP-exprimierenden Zellen überwiegend im ZNS detektiert werden. In einigen Fällen waren jedoch auch Zellen im PNS zu finden, die als die bereits früher beschriebenen GFAP-positiven Zellen identifiziert werden konnten.

5.3 Die hitze-induzierte genetische Ablation von Astrozyten

Die hitze-induzierte genetische Ablation der Astrozyten erfolgte in dieser Arbeit in doppel-transgenen Nachkommen, die durch die Verkreuzung von zwei verschiedenen einfach transgenen Elterntieren erhalten wurden. Durch diese Methode kann zwar zunächst die Expression der Transgene in den jeweiligen einfach-transgenen Fischlinien sicher gestellt werden, die Genetik der doppel-transgenen Nachkommen stellt sich jedoch komplexer dar.

5.3.1 Einfach-transgene Zebrafischlinien

Die Anwendung der Tol2-Transposasetechnik für die Etablierung der transgenen Fischlinien resultierte in einer sehr effizienten Integrationsrate der Transgene in das Zebrafischgenom, so dass mehrere unterschiedliche Linien für jedes Transgen etabliert werden konnten. Die Expression des jeweiligen Transgens zeigte sich in den einzelnen Fischlinien jedoch sehr variabel. Diese Unterschiede zwischen den einzelnen transgenen Linien sind in der Regel abhängig vom genomischen Ort der Integration sowie der Anzahl der Kopien des Transgens im Zebrafischgenom. Eine einzige Integration in die Keimbahn resultiert nach klassischen Erbgewetzen in durchschnittlich 50% an transgenen Nachkommen. Bei mehreren Integrationen erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, transgene Nachkommen zu erhalten, entsprechend. Ob nun das integrierte Transgen auch exprimiert wird, hängt jedoch stark vom Ort der Integration in das Genom ab. Ist das Transgen an einem Lokus integriert, der transkriptionell inaktiv ist, so findet trotz möglicherweise erfolgreicher Induktion durch Rekombination keine Expression des Transgens statt. Der Ort der Integration ist jedoch mit der hier verwendeten Technik nicht zu kontrollieren. Die Cre-Rekombinase transgenen Fischlinien wurden aufgrund der im gleichen Transgen enthaltenen grünen Fluoreszenz auf erfolgreiche Induktion geprüft. Dabei zeigte sich

eine Rate von etwa 50% an transgenen Nachkommen (siehe 4.1.2.1). Über die Anzahl der Integrationen in das Genom kann aber keine Aussage getroffen werden, da möglicherweise auch „stille“ Integrationen vorliegen. Die Funktionalität der transgen exprimierten Cre-Rekombinase wurde durch die Injektion eines Reporterplasmids getestet. Dabei wurde das Plasmid in die befruchtete Eizelle von Nachkommen Cre-Rekombinase transgener Elternfische injiziert, in welchen es sich in einem Mosaikmuster auf die Zellen verteilt. Nach Hitzebehandlung zeigte die anschließende Untersuchung, dass in der Mehrzahl der Zellen nur grüne Fluoreszenz detektierbar war. Dies lässt darauf schließen, dass zum einen das Reporterplasmid vorhanden ist, zum anderen, dass erfolgreiche Hitzeinduktion stattgefunden hat. Einige Zellen enthielten rekombiniertes und nicht-rekombiniertes Reporterplasmid (rote und grüne Fluoreszenz), wiederum einige Zellen zeigten nur rote Fluoreszenz. Diese Zellen lassen auf eine funktionelle Cre-Rekombinase schließen. In Zellen mit beiden Fluorochromen waren beide Plasmide gleichzeitig vorhanden, in Zellen mit ausschließlich roter Fluoreszenz war die aus dem Cre-Rekombinase Plasmid stammende GFP-Fluoreszenz (grün) bereits abgebaut. Die Anzahl der Zellen, die das Reporterplasmid enthalten, ist gering im Vergleich zum Cre-Rekombinase Transgen, welches als Keimbahn-Transgen in allen Zellen vorhanden sein sollte. Dies lässt sich damit erklären, dass für die Injektion des Reporterplasmids keine Transposase verwendet wurde und es nicht zur Integration in das Genom kommt. Die Untersuchung zur Funktionalität der Cre-Rekombinase gibt jedoch auch keine Auskunft über die Anzahl der Integrationen in das Genom, sondern nur über die Funktionalität des Enzyms. Die hitze-induzierbare Cre-Rekombinase muss bezüglich der „leakiness“ des Systems diskutiert werden. Von induzierbaren Systemen im Allgemeinen ist bekannt, dass sie oftmals bereits ohne ihren eigentlichen Stimulus in geringem Maße aktiv sind. Dadurch kommt es in einigen Fällen zu spontaner, ungewollter Expression des Transgens und somit zu Schwierigkeiten bei der Konsistenz der Ergebnisse und deren Interpretation. Ein gewisser Level an Hintergrundexpression ist für die verwendeten, artifiziellen Hitzeschockelemente (HSE) bekannt, jedoch deutlich reduziert im Vergleich zu den natürlich vorkommenden Hitzeschockpromotoren (hsp) (Bajoghli et al., 2004). Die in einigen Fällen beobachtete minimale Undichte des Systems konnte durch die Inkubation der Larven bei Raumtemperatur anstelle der optimalen Temperatur von 28,5°C größtenteils weiter reduziert werden. Leichte GFP-Expression war dennoch in

einigen Fällen detektierbar. Diese leichte Undichte ist jedoch so gering, dass die Menge an DTA - das in gleichem Maße exprimiert wird - nicht ausreicht, um die Zellen nachhaltig zu schädigen.

Bei den DTA-transgenen Fischlinien treten zusätzliche Probleme auf, die bei der Auswertung der Ergebnisse beachtet werden müssen. So ist dieses Transgen nicht an die Expression eines Fluorochroms gekoppelt. Dadurch muss die erfolgreiche Integration in das Genom mittels PCR überprüft werden. Auch hier kann durch die Analyse nur eine Aussage über eine erfolgreiche Integration, nicht aber über den Ort und die Anzahl der Integrationen gemacht werden. Weiterhin gibt es weder eine Induktions- noch eine echte Expressionskontrolle für das DTA-Transgen. Eine durchgeführte *in situ*-Hybridisierung mit einer Sonde zur Evaluation vorhandener mRNA zeigte keine eindeutigen Ergebnisse. Dieses negative Ergebnis könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Expression des DTA-Proteins sehr schnell letal ist und somit weder mRNA noch Protein nachgewiesen werden können, da in der jeweiligen Zelle die Proteinbiosynthese - und damit Transkription und Translation - blockiert werden. Die erfolgreiche Rekombination des DTA-Transgens konnte durch eine Multiplex-PCR deutlich nachgewiesen werden (siehe 4.1.4.2). Die Expression des DTA war jedoch erst auf Proteinlevel im Western Blot oder über immunhistochemische Färbungen nachweisbar, da es sich bei der vorgeschalteten Stopsequenz um eine translationale Stopsequenz handelt. Das bedeutet, dass selbst der Nachweis der mRNA (z.B. über eine *in situ*-Hybridisierung) keine Auskunft über aktives DTA-Protein geben könnte. Der immunhistochemische Nachweis mit einem anti-DTA Antikörper zeigte keine Signale (Daten in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt). Ein möglicher Grund für dieses negative Ergebnis ist, dass die Expression des DTA-Transgens schnell letal sein kann, da die Proteinbiosynthese der Zelle durch das DTA-Protein gehemmt wird. Ein Western Blot zur Untersuchung des DTA-Proteinlevels wurde in der vorliegenden Arbeit mangels im Western Blot funktionierender Antikörper für DTA nicht durchgeführt.

5.3.2 Doppel-transgene Embryonen

Die Genetik in den doppel-transgenen Larven stellt sich weitaus komplexer dar. Rein hypothetisch besteht für alle Nachkommen bei nur einer Kopie des jeweiligen Transgens in der elterlichen Keimbahn eine Wahrscheinlichkeit von 25%, beide Transgene zu erhalten (siehe 4.1.4.1). Die übrigen 75% tragen dann entweder je ein

Transgen (je 25%) oder sind nicht transgen (25%). Da jedoch die Tol2-Transposasetechnik angewendet wurde, steigt die Wahrscheinlichkeit, dass mehrere Integrationen stattgefunden haben. Die Genetik weicht somit vom einfachen Mendel'schen Vererbungsschema ab. Da mit unterschiedlichen Parentallinien gearbeitet werden musste, in denen die Integration bereits sehr variabel ist, lassen sich auch die teilweise sehr unterschiedlichen Ergebnisse und Statistiken der Experimente der doppel-transgenen Larven erklären.

Die für die doppel-transgenen Larven nach Hitzebehandlung beobachteten Deformationen, die nicht in allen Experimenten reproduziert werden konnten, sind ebenfalls auf die Variabilität zwischen den einzelnen transgenen Parentallinien zurückzuführen. In den deformierten Larven waren möglicherweise mehr Kopien vorhanden als in nicht oder schwächer deformierten Larven. Auch die unterschiedliche Anzahl an Acridin Orange-positiven, also absterbenden Zellen, ist auf die Variabilität zwischen den einzelnen Parentallinien zurückzuführen. So reicht die Induktion in Linien, die mehrere Kopien enthalten, möglicherweise schon aus, um Zelltod auszulösen, wohingegen in Linien mit weniger Kopien noch keine Effekte erkennbar sind. Auch die Dauer und die Temperatur der Hitzeanwendung kann sich auf das Induktionsniveau auswirken. Die Induktion erfolgte in der vorliegenden Arbeit immer bei 37°C. Die Länge wurde in einigen Versuchen jedoch zwischen einer und anderthalb Stunden variiert, um Unterschiede festzustellen. Es zeigten sich aber in späteren Experimenten auch nach längerem Hitzeschock (anderthalb Stunden) keine Deformationen oder Acridin Orange-positive Zellen.

5.4 Transgene Expression krankheits-assoziiierter Mutationen im zf GFAP

Die transgene Expression von Wildtyp-GFAP im Zellkultursystem kann bereits zu Aggregatbildung führen (Tang et al., 2006). Diese Effekte wurden auch in der vorliegenden Arbeit in Zellkultur beobachtet (Abbildung 18). Das Expressionsniveau der GFP-gekoppelten Wildtypvariante sowie der Variante ohne Fluorochromfusion jedoch mit Mutation schien bei der optischen Untersuchung der Zellen wie auch der Larven geringer zu sein als die Expression des GFP-Fusionsproteins mit Mutation. In allen drei Situationen konnte jedoch deutlich Aggregation nachgewiesen werden. Durch die Anwesenheit von transgenem und endogenem Protein ist der GFAP-Level insgesamt erhöht, wodurch das Protein zur Aggregation neigt. Die krankheits-assoziierte Mutation im *gfap*-Gen (R251H) zeigte jedoch eine deutlich erhöhte Anzahl

an Aggregaten. Diese Beobachtungen aus der Zellkultur zeigten sich so auch im Zebrafisch, wobei hier die Unterschiede zwischen Wildtypfusionsprotein und mutiertem Fusionsprotein noch gravierender waren als im Zellkultursystem. Diese Unterschiede sind möglicherweise durch die unterschiedlichen Promotoren zu erklären. Im Zellkultursystem wurde der *cmv*-Promotor im *Driver*-Konstrukt verwendet, da der *gfap*-Promotor in den verwendeten HEK-Zellen nicht aktiv ist. Im Fisch hingegen wurde der *gfap*-Promotor verwendet, da die Expression nur in Astrozyten erfolgen sollte.

Die in Experimenten an lebenden Larven beobachtete Dynamik und Verteilung der Aggregate stimmte nicht immer mit den Ergebnissen aus den immunhistochemischen Färbungen von Gefrierschnitten und des gesamten Organismus überein. In Lebendbeobachtungen und auch in Färbungen der gesamten fixierten Larve konnten die Aggregate über das gesamte Rückenmark verteilt, sowohl entlang der anterior-posterioren wie auch entlang der dorso-ventralen Achse beobachtet werden. In Gewebequerschnitten der fixierten Larven konnten die Aggregate jedoch überwiegend im Bereich des Zentralkanals des Rückenmarks detektiert werden. Auch schien die Aggregatdichte entlang der anterior-posterioren Achse abzunehmen. Dies kann auf eine zu geringe Auflösung des verwendeten Mikroskops für Lebendbeobachtungen zurückzuführen sein. In Lebendbeobachtungen sind zwar optische Schnitte durch den Organismus möglich, aber feinere Details sind erst im Gewebeschnitt gut auflösbar. Bei der Etablierung des *gfap*-Promotors konnte auch eine deutliche Aktivität des Promotors im Gehirn der Larven nachgewiesen werden (Bernardos and Raymond, 2006). Diese Expression war jedoch weder in Lebendbeobachtungen noch in Färbungen auf ganzen Larven oder Gewebeschnitten detektierbar. Bei *in situ*-Hybridisierungen auf Larven des gleichen Alters mit einer Sonde gegen *gfap* wurden Ergebnisse erhalten, welche unsere Ergebnisse stützen (Brösamle, persönliche Kommunikation, unveröffentlicht).

Die GFAP-Aggregate wiesen, im Gegensatz zu Proteinaggregaten vieler anderer neurodegenerativer Erkrankungen wie beispielsweise Alzheimer, Parkinson oder Prionerkrankungen, eine deutliche Dynamik auf. Sind bei diesen Erkrankungen die Aggregate stabil, statisch und sehr schwer löslich, so zeigen die GFAP-Aggregate deutliche Bewegungen. Sie sind in der Lage, sich während der Zellteilung aufzulösen und danach erneut zu aggregieren. Aufgrund dieser Eigenschaften unterscheidet

sich AXD deutlich von anderen, bereits bekannten Proteinaggregationskrankheiten. Die unterschiedlichen, in der Literatur vorgeschlagenen Abbaumechanismen der GFAP-Aggregate (Tang et al., 2008), sowie andere Abbauwege in Zellen wurden in dieser Arbeit pharmakologisch untersucht, um Degradationsmechanismen der Aggregate zu analysieren. Weder das Proteasom noch Autophagie scheinen jedoch einen Einfluss auf den Abbau der Aggregate zu haben. Dies ist möglicherweise auf eine unvollständige Penetration der jeweiligen Substanz in die Larve zurückzuführen. Die getesteten Pharmaka wurden dem Embryomedium sowie der Agarose, in welcher die Larven fixiert worden waren, zugegeben. Eine Diffusion durch die Agarose war möglicherweise in nicht ausreichender Konzentration vorhanden, sodass die Ergebnisse (siehe 4.2.4.2) unter Umständen durch zu niedrige Konzentrationen beeinträchtigt waren und deshalb eher vorsichtig zu interpretieren sind.

In den immunhistochemischen Färbungen wurde die Lokalisation der fluoreszenzmarkierten Aggregate in ganzen, fixierten Larven sowie in Schnitten überprüft. Die Penetration der Antikörper in den intakten Larven wurde vor allem in höheren Altersstufen durch den experimentellen Verdau der umgebenden Strukturen verbessert. Dennoch konnten in den älteren Larven durch teilweise sehr schlechte Penetration nur sehr schwache Signale detektiert werden. In den jüngeren Larven dagegen waren deutliche Signale detektierbar, die eine Kolo-kalisation der Aggregate mit dem endogenen GFAP-Netzwerk zeigten. Für die Färbungen mit dem neuronalen Marker HuC konnte dagegen keine Kolo-kalisation festgestellt werden. Diese Ergebnisse bestätigen erneut die Spezifität des *gfap*-Promotors. Weiterhin wurden Färbungen mit Antikörpern für weitere beschriebene Bestandteile von Rosenthalfasern wie z.B. Ubiquitin durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Diese Färbungen zeigten jedoch keine Signale. Dies ist möglicherweise auf die verwendeten Antikörper zurückzuführen, für die bisher keine Kreuzreaktivität im Zebrafisch demonstriert worden ist. Es kann daher also keine Aussage über die weitere Zusammensetzung der GFAP-positiven Aggregate im Zebrafisch getroffen werden.

Die Analyse der Aggregate mittels Western Blot stellte sich schwierig dar. Unter allen getesteten Bedingungen konnten ausschließlich GFAP-Monomere gezeigt werden. Da jedoch auch in der Literatur kaum Angaben zu höher-molekularen GFAP-

Komplexen zu finden sind, ist davon auszugehen, dass diese Aggregate schwierig mittels Western Blot darzustellen sind. Dies unterstützt wiederum die Hypothese, dass es sich bei GFAP-Aggregaten um deutlich instabilere und leicht löslichere Aggregate handelt als bei anderen Erkrankungen mit Proteinaggregaten. Die Fusionsproteine konnten im Western Blot eindeutig detektiert werden, d.h. die Methode selbst wie auch die verwendeten Chemikalien funktionierten zufriedenstellend.

Die Analyse der transgenen Fische und der entsprechenden Wildtyp-Kontrollen am Elektronenmikroskop zeigte Strukturen, die als Rosenthalfasern interpretiert werden können. Allerdings ist auch hier zu erwähnen, dass die Verhältnisse der elektronendichten Aggregate zu den in Lebendbeobachtungen detektierten Aggregaten nicht übereinstimmen. In elektronenmikroskopischen Untersuchungen adulter Fische wurden deutlich weniger Aggregate detektiert als in Lebendbeobachtungen von Larven. Ob dies ein Präparations- oder Fixationsartefakt ist oder ob mit zunehmendem Alter der Fische die Dichte der Aggregate tatsächlich abnimmt, bleibt zu verifizieren.

5.5 Untersuchung der Astrozyten am Modellorganismus Zebrafisch

Das Nervensystem des Zebrafischs ähnelt dem von Säugern in Bezug auf die vorhandenen Zelltypen und die Organisation sehr. Da es sich bei den Larven des Zebrafischs um transparente Larven handelt, die sich außerhalb des mütterlichen Körpers entwickeln, eignen sich diese Larven hervorragend für Lebendbeobachtungen. Solche Experimente lassen sich jedoch häufig auch mit weniger Aufwand in Zellkultursystemen durchführen. Bei Zellkulturexperimenten im Allgemeinen muss jedoch bedacht werden, dass es sich zwar um lebende Systeme handelt, die aber vom Organismus isoliert sind. So können beispielsweise Zell-Zellinteraktionen nicht im Zellkultursystem analysiert werden. Auch können in Zellkulturexperimente andere Proteinexpressionslevel verändert sein im Vergleich zum lebenden Organismus. Ein Transfer der Ergebnisse aus Zellkulturversuchen auf einen Organismus ist daher immer begrenzt. In Zellkultursystemen für AXD konnte die Aggregatbildung in verschiedenen Zelllinien (Tang et al., 2006) wie auch Autophagie als Abbaumechanismus für die Aggregate (Tang et al., 2008) gezeigt werden. Bisher konnten jedoch weder im Fisch noch in Mäusen solche Abbaumechanismen vor GFAP-Aggregate nachgewiesen werden. Der Vorteil eines

Mausmodells ist die Möglichkeit der Untersuchung in einem intakten Organismus, der dem Menschen sehr ähnlich ist. Lebendbeobachtungen lassen sich jedoch in Mäusen oder Ratten nur sehr aufwändig nach operativem Eingriff in den Organismus und nach dem Einsetzen eines transparenten Fensters durchführen. Die Ergebnisse aus solchen Experimenten müssen allerdings vorsichtig interpretiert werden, da oft durch den Eingriff Entzündungen oder anderweitige Reaktionen des Organismus stattfinden können, die die Ergebnisse verfälschen könnten. In den Mausmodellen für AXD konnten Rosenthalfasern sowohl licht- wie auch elektronenmikroskopisch dargestellt werden. Alle weiteren Merkmale, wie z.B. Megalenzephalie oder der Verlust der weissen Substanz, konnten bisher jedoch in keinem Modellsystem gezeigt werden. Der Zebrafisch bietet als Modellorganismus im Allgemeinen sowie zur Untersuchung der Astrozyten deutliche Vorteile gegenüber Mäusen: die Fische sind in ihrer Haltung kostengünstig und platzsparend. Außerdem sind sie in der Lage, in kurzer Zeit viele Nachkommen hervorzubringen. Der jedoch größte Vorteil gegenüber Mäusen ist die Möglichkeit, aufgrund der transparenten Larven Lebendbeobachtungen auf zellulärer Ebene durchzuführen. Diese Experimente ermöglichen die Illustration von Proteininteraktionen im gesamten, lebenden Organismus. So konnte für AXD die Bildung der GFAP-Aggregate im lebenden Organismus gezeigt und beobachtet werden. Außerdem konnte hier die Mobilität der Fusionsproteine und damit der GFAP-Proteine in den Larven erstmals dargestellt werden. Erstmals beschrieben wurden auch das Verhalten und die Dynamik der Aggregate während der Zellteilung. Doch auch im Zebrafisch konnten für AXD bisher nur die GFAP-Aggregate und nicht – wie erhofft – die übrigen Merkmale von AXD gezeigt werden. Eine kombinierte Interpretation der Ergebnisse aller Modellorganismen und Zellkultursysteme zusammen kann neue Erkenntnisse über die Rolle der Astrozyten sowohl bei dieser Erkrankung wie auch im Allgemeinen bringen. Außerdem können durch die unterschiedlichen Ansatzpunkte auch neue Erkenntnisse über die schwerwiegende Erkrankung AXD gewonnen werden, die möglicherweise zur Entwicklung therapeutischer Strategien für Patienten genutzt werden können.

5.6 Ausblick

Um die Rolle der Astrozyten für ein intaktes Nervensystem mit Hilfe der Ablation der Astrozyten weiter zu untersuchen, muss zunächst die vorhandene Varianz reduziert

werden. In den erfolgreich ablatierten Larven sollten dann Färbungen durchgeführt werden, um die Anzahl und Struktur der Astrozyten mit nicht ablatierten Kontrolllarven zu vergleichen. Diese Experimente können u.a. zeigen, wie viele Astrozyten für ein intaktes Nervensystem benötigt werden. Auch können die Ablationsexperimente zu späteren Zeitpunkten und mit variablen Temperaturen oder Zeitspannen durchgeführt werden. So kann untersucht werden, wie viele Astrozyten benötigt werden bzw. bis zu welchem Grad sie zerstört sein dürfen, damit das Nervensystem noch intakt und die Fische in ihren Lebensfunktionen nicht eingeschränkt sind. Außerdem kann so untersucht werden, an welchem Zeitpunkt in der Entwicklung die Ablation die massivsten Auswirkungen auf das Nervensystem des Organismus hat.

Die Untersuchung der GFAP-Aggregate kann mittels immunhistochemischen Färbungen an den gesamten Larven wie auch an Schnitten der Larven weiter die Organisation des GFAP-Netzwerks in verschiedenen Altersstufen beleuchten. Zudem kann die Zusammensetzung der Aggregate im Zebrafisch durch den immunhistochemischen Nachweis bereits beschriebener Komponenten, wie z.B. Ubiquitin und Hitzeschockproteinen, bestätigt werden. Außerdem können die Abbaumechanismen der GFAP-Aggregate weiter untersucht werden, indem die Larven nicht in Agarose eingebettet werden und somit sichergestellt wird, dass die zu untersuchenden Pharmaka in ausreichender Konzentration in die Larven gelangen. Die biochemische Analyse der Aggregate stellt sich nach wie vor als schwierig dar, da die Aggregate nicht besonders stabil sind. Die Untersuchung der Aggregate auf elektronenmikroskopischer Ebene kann die Organisation des GFAP-Netzwerks sowie die Anwesenheit und Verteilung der GFAP-Aggregate innerhalb des Netzwerks beleuchten.

Die Ergebnisse all dieser bereits durchgeführten sowie der noch möglichen Untersuchungen können die Funktion der Astrozyten sowie die Rolle, die diese Zellen für ein intaktes Nervensystem spielen, weiter aufklären.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Kommunikationsprozesse im Nervensystem, insbesondere der Astrozyten näher untersucht. Weiterhin wurde der Einfluss der Astrozyten auf den Myelinstatus im Nervensystem anhand von Erkrankungen, deren Ursache in den Astrozyten zu suchen ist, erforscht. Die Arbeit wurde anhand des Modellorganismus Zebrafisch durchgeführt. Dieser eignet sich aufgrund seiner transparenten und extramaternally entwickelnden Larven besonders für *in vivo* Experimente und Lebenduntersuchungen. Weiterhin findet man beim Zebrafisch einen dem menschlichen Nervensystem sehr ähnlichen Aufbau sowie eine ähnliche Organisation des Nervensystems. Die Rolle der Astrozyten im Nervensystem wurde durch die Anwendung verschiedener zellulärer Stressbedingungen untersucht. Zum einen wurde in Astrozyten die Expression der A-Untereinheit des Diphtherietoxins (DTA) induziert, die dann zum Absterben der Astrozyten führte. Hierzu wurden zunächst zwei stabil transgene Fischlinien etabliert, die dann miteinander verkreuzt wurden. In den daraus resultierenden doppel-transgenen Nachkommen wurde in Astrozyten mittels eines hitze-induzierbaren Systems in Kombination mit dem Cre/loxP-System zu einem selbst gewählten Zeitpunkt die Expression des DTA induziert. Die Expression von DTA bewirkt den Niedergang der jeweiligen Astrozyten. Mit Hilfe dieser Technik konnte ein neues Verfahren zur zeit- und gewebespezifischen Ablation bestimmter Zelltypen für den Zebrafisch etabliert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von DTA ohne Induktion keine negativen Auswirkungen auf das Überleben und die Entwicklung der jeweiligen Zellen hat.

Als weiterer Stressfaktor für Zellen gilt die transgene Expression von (Fusions-) Proteinen. In der vorliegenden Arbeit wurden Fusionsproteine aus GFP und Zebrafisch GFAP in der Wildtypvariante sowie mit einer krankheits-assoziierten Mutation (R251H) in Astrozyten transgen exprimiert. Weiterhin wurde eine nicht fusionierte Variante des mutierten GFAP zusammen mit einem DsRed-Fluorochrom transgen exprimiert, um die Zellen, die das Transgen enthalten, sichtbar zu machen. Dadurch können *in vivo* Experimente an den Larven ermöglicht werden. Untersuchungen am Fluoreszenz- sowie am Elektronenmikroskop und Analysen des transgenen Gewebes mittels immunhistochemischer Färbungen haben gezeigt, dass allein die transgene Expression des Wildtyp-GFAP die Bildung von Aggregaten mit

Zusammenfassung

GFAP als Hauptbestandteil induziert. Diese Effekte wurden jedoch durch die transgene Expression der mutierten Variante verstärkt. Der Abbau der entstandenen Aggregate sollte nun durch die Manipulation verschiedener bekannter Abbauwege analysiert werden. Allerdings konnten hier keine Ergebnisse erzielt werden. Mit Hilfe der hier beschriebenen und etablierten transgenen Fischlinien kann nun jedoch die Rolle der Astrozyten in der Entwicklung des gesunden Nervensystems sowie unter Krankheitsbedingungen erforscht werden.

7. Summary

This thesis focused on the cellular interactions in the nervous system, and in particular on the interactions of astrocytes and other cell types of the nervous system. A further aim was to examine the influence of astrocytes on the processes leading to myelination in the nervous system.

The study was undertaken in the zebrafish which is particularly suitable for *in vivo* live imaging experiments due to its transparent and externally developing larva. The nervous system of the zebrafish also offers the advantage of being cellularly organized in similar manner to that of mammals and comprises essentially the same cell types.

Astrocyte function was investigated using two molecular approaches. First, astrocytes were ablated by induced expression of the A-subunit of diphtheria toxin (DTA). For this technique, two stable transgenic fish lines were generated and then cross-bred. In double transgenic animals, DTA expression was induced specifically in astrocytes at defined time points by combining a heat-inducible system with the Cre/loxP system of site-specific recombination. Expression of DTA induces astrocyte death but has no deleterious effects on the development and survival when not induced. These systems in combination provide a new technique for time- and tissue-specific ablation of defined cell types in zebrafish.

Second, fusion proteins were expressed transgenically in astrocytes. GFP was fused with zebrafish GFAP in the wildtype and with an *Alexander disease* (AXD) associated mutation (GFAP R251H). A non-fused, but disease associated version of GFAP was expressed together with the DsRed-fluorochrome to visualize the cells expressing the transgene. The expression of the transgenic proteins together with the fluorochromes allows *in vivo* live imaging experiments to be undertaken. Analyses via fluorescence and electron microscopy, as well as immunohistochemical staining, showed that overexpression of wildtype GFAP alone is sufficient to cause aggregation. The expression of GFAP containing the disease associated mutation enhanced this effect. The degradation of the aggregates was examined via manipulation of various degradation pathways, but these experiments were not conclusive. The fish lines established can now be used to examine the role of astrocytes in a healthy nervous system as well as under disease conditions.

8. Literatur

- Abremski, K., and Hoess, R. (1984). Bacteriophage P1 site-specific recombination. Purification and properties of the Cre recombinase protein. *J Biol Chem* *259*, 1509-1514.
- Alberts, B. (2002). *Molecular biology of the cell*, 4th edn (New York, Garland Science).
- Alexander, W.S. (1949). Progressive fibrinoid degeneration of fibrillary astrocytes associated with mental retardation in a hydrocephalic infant. *Brain* *72*, 373-381, 373 pl.
- Allen, N.J., and Barres, B.A. (2009). Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature* *457*, 675-677.
- Bajoghli, B., Aghaallaei, N., Heimbucher, T., and Czerny, T. (2004). An artificial promoter construct for heat-inducible misexpression during fish embryogenesis. *Dev Biol* *271*, 416-430.
- Balcarek, J.M., and Cowan, N.J. (1985). Structure of the mouse glial fibrillary acidic protein gene: implications for the evolution of the intermediate filament multigene family. *Nucleic Acids Res* *13*, 5527-5543.
- Baumann, N., and Pham-Dinh, D. (2001). Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* *81*, 871-927.
- Bernardos, R.L., and Raymond, P.A. (2006). GFAP transgenic zebrafish. *Gene Expr Patterns* *6*, 1007-1013.
- Blackburn, D., Sargsyan, S., Monk, P.N., and Shaw, P.J. (2009). Astrocyte function and role in motor neuron disease: a future therapeutic target? *Glia* *57*, 1251-1264.
- Bongcam-Rudloff, E., Nister, M., Betsholtz, C., Wang, J.L., Stenman, G., Huebner, K., Croce, C.M., and Westermarck, B. (1991). Human glial fibrillary acidic protein: complementary DNA cloning, chromosome localization, and messenger RNA expression in human glioma cell lines of various phenotypes. *Cancer Res* *51*, 1553-1560.
- Brand, A.H., and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* *118*, 401-415.
- Breitman, M.L., Clapoff, S., Rossant, J., Tsui, L.C., Glode, L.M., Maxwell, I.H., and Bernstein, A. (1987). Genetic ablation: targeted expression of a toxin gene causes microphthalmia in transgenic mice. *Science* *238*, 1563-1565.
- Brenner, M., Johnson, A.B., Boespflug-Tanguy, O., Rodriguez, D., Goldman, J.E., and Messing, A. (2001). Mutations in GFAP, encoding glial fibrillary acidic protein, are associated with Alexander disease. *Nat Genet* *27*, 117-120.
- Bretaud, S., Allen, C., Ingham, P.W., and Bandmann, O. (2007). p53-dependent neuronal cell death in a DJ-1-deficient zebrafish model of Parkinson's disease. *J Neurochem* *100*, 1626-1635.
- Brösamle, C., and Halpern, M.E. (2002). Characterization of myelination in the developing zebrafish. *Glia* *39*, 47-57.
- Brown, D.R. (2009). Role of microglia in age-related changes to the nervous system. *ScientificWorldJournal* *9*, 1061-1071.
- Carmen, J., Magnus, T., Cassiani-Ingoni, R., Sherman, L., Rao, M.S., and Mattson, M.P. (2007). Revisiting the astrocyte-oligodendrocyte relationship in the adult CNS. *Prog Neurobiol* *82*, 151-162.
- Cohen, I., and Schwartz, M. (1993). cDNA clones from fish optic nerve. *Comp Biochem Physiol B* *104*, 439-447.
- Condorelli, D.F., Nicoletti, V.G., Barresi, V., Conticello, S.G., Caruso, A., Tendi, E.A., and Giuffrida Stella, A.M. (1999). Structural features of the rat GFAP gene and identification of a novel alternative transcript. *J Neurosci Res* *56*, 219-228.
- Der Perng, M., Su, M., Wen, S.F., Li, R., Gibbon, T., Prescott, A.R., Brenner, M., and Quinlan, R.A. (2006). The Alexander disease-causing glial fibrillary acidic protein mutant, R416W, accumulates into Rosenthal fibers by a pathway that involves filament aggregation and the association of alpha B-crystallin and HSP27. *Am J Hum Genet* *79*, 197-213.
- Eng, L.F., Ghirnikar, R.S., and Lee, Y.L. (2000). Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res* *25*, 1439-1451.

- Feinstein, D.L., Weinmaster, G.A., and Milner, R.J. (1992). Isolation of cDNA clones encoding rat glial fibrillary acidic protein: expression in astrocytes and in Schwann cells. *J Neurosci Res* *32*, 1-14.
- Fuchs, E., and Weber, K. (1994). Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem* *63*, 345-382.
- Furutani-Seiki, M., Sasado, T., Morinaga, C., Suwa, H., Niwa, K., Yoda, H., Deguchi, T., Hirose, Y., Yasuoka, A., Henrich, T., *et al.* (2004). A systematic genome-wide screen for mutations affecting organogenesis in Medaka, *Oryzias latipes*. *Mech Dev* *121*, 647-658.
- Galea, E., Dupouey, P., and Feinstein, D.L. (1995). Glial fibrillary acidic protein mRNA isoforms: expression in vitro and in vivo. *J Neurosci Res* *41*, 452-461.
- Ghosh, K., and Van Duyne, G.D. (2002). Cre-loxP biochemistry. *Methods* *28*, 374-383.
- Goldsmith, M.I., Iovine, M.K., O'Reilly-Pol, T., and Johnson, S.L. (2006). A developmental transition in growth control during zebrafish caudal fin development. *Dev Biol* *296*, 450-457.
- Hagemann, T.L., Boelens, W.C., Wawrousek, E.F., and Messing, A. (2009). Suppression of GFAP toxicity by alphaB-crystallin in mouse models of Alexander disease. *Hum Mol Genet* *18*, 1190-1199.
- Hagemann, T.L., Connor, J.X., and Messing, A. (2006). Alexander disease-associated glial fibrillary acidic protein mutations in mice induce Rosenthal fiber formation and a white matter stress response. *J Neurosci* *26*, 11162-11173.
- Herndon, R.M., Rubinstein, L.J., Freeman, J.M., and Mathieson, G. (1970). Light and electron microscopic observations on Rosenthal fibers in Alexander's disease and in multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* *29*, 524-551.
- Herschman, H.R., Simpson, D.L., and Cawley, D.B. (1982). Toxic ligand conjugates as tools in the study of receptor-ligand interactions. *J Cell Biochem* *20*, 163-176.
- Hsiao, V.C., Tian, R., Long, H., Der Perng, M., Brenner, M., Quinlan, R.A., and Goldman, J.E. (2005). Alexander-disease mutation of GFAP causes filament disorganization and decreased solubility of GFAP. *J Cell Sci* *118*, 2057-2065.
- Isaacs, A., Baker, M., Wavrant-De Vrieze, F., and Hutton, M. (1998). Determination of the gene structure of human GFAP and absence of coding region mutations associated with frontotemporal dementia with parkinsonism linked to chromosome 17. *Genomics* *51*, 152-154.
- Iwaki, T., Iwaki, A., Tateishi, J., Sakaki, Y., and Goldman, J.E. (1993). Alpha B-crystallin and 27-kd heat shock protein are regulated by stress conditions in the central nervous system and accumulate in Rosenthal fibers. *Am J Pathol* *143*, 487-495.
- Johnson, A.B. (2002). Alexander disease: a review and the gene. *Int J Dev Neurosci* *20*, 391-394.
- Kandel, E.R.S., James H.; Jessell, Thomas M. (2000). *Principles of Neural Science*, 4th edn (New York, McGraw-Hill).
- Kawai, H., Arata, N., and Nakayasu, H. (2001). Three-dimensional distribution of astrocytes in zebrafish spinal cord. *Glia* *36*, 406-413.
- Kawakami, K. (2005). Transposon tools and methods in zebrafish. *Dev Dyn* *234*, 244-254.
- Kreutzberg, G.W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* *19*, 312-318.
- Lemke, G., and Axel, R. (1985). Isolation and sequence of a cDNA encoding the major structural protein of peripheral myelin. *Cell* *40*, 501-508.
- Li, R., Johnson, A.B., Salomons, G., Goldman, J.E., Naidu, S., Quinlan, R., Cree, B., Ruyle, S.Z., Banwell, B., D'Hooghe, M., *et al.* (2005). Glial fibrillary acidic protein mutations in infantile, juvenile, and adult forms of Alexander disease. *Ann Neurol* *57*, 310-326.
- Li, R., Messing, A., Goldman, J.E., and Brenner, M. (2002). GFAP mutations in Alexander disease. *Int J Dev Neurosci* *20*, 259-268.
- Marcus, R.C., and Easter, S.S., Jr. (1995). Expression of glial fibrillary acidic protein and its relation to tract formation in embryonic zebrafish (*Danio rerio*). *J Comp Neurol* *359*, 365-381.
- Mullins, M.C., Hammerschmidt, M., Haffter, P., and Nusslein-Volhard, C. (1994). Large-scale mutagenesis in the zebrafish: in search of genes controlling development in a vertebrate. *Curr Biol* *4*, 189-202.

- Nielsen, A.L., Holm, I.E., Johansen, M., Bonven, B., Jorgensen, P., and Jorgensen, A.L. (2002). A new splice variant of glial fibrillary acidic protein, GFAP epsilon, interacts with the presenilin proteins. *J Biol Chem* *277*, 29983-29991.
- Nielsen, A.L., and Jorgensen, A.L. (2003). Structural and functional characterization of the zebrafish gene for glial fibrillary acidic protein, GFAP. *Gene* *310*, 123-132.
- Palmiter, R.D., Behringer, R.R., Quaife, C.J., Maxwell, F., Maxwell, I.H., and Brinster, R.L. (1987). Cell lineage ablation in transgenic mice by cell-specific expression of a toxin gene. *Cell* *50*, 435-443.
- Park, H.C., Mehta, A., Richardson, J.S., and Appel, B. (2002). *olig2* is required for zebrafish primary motor neuron and oligodendrocyte development. *Dev Biol* *248*, 356-368.
- Parry, D.A., and Steinert, P.M. (1999). Intermediate filaments: molecular architecture, assembly, dynamics and polymorphism. *Q Rev Biophys* *32*, 99-187.
- Perea, G., and Araque, A. (2005). Glial calcium signaling and neuron-glia communication. *Cell Calcium* *38*, 375-382.
- Poliak, S., and Peles, E. (2003). The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier. *Nat Rev Neurosci* *4*, 968-980.
- Prat, A., Biernacki, K., Wosik, K., and Antel, J.P. (2001). Glial cell influence on the human blood-brain barrier. *Glia* *36*, 145-155.
- Ptashne, M. (1988). How eukaryotic transcriptional activators work. *Nature* *335*, 683-689.
- Quinlan, R.A., Brenner, M., Goldman, J.E., and Messing, A. (2007). GFAP and its role in Alexander disease. *Exp Cell Res* *313*, 2077-2087.
- Reeves, S.A., Helman, L.J., Allison, A., and Israel, M.A. (1989). Molecular cloning and primary structure of human glial fibrillary acidic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* *86*, 5178-5182.
- Reichard, E.A., Ball, W.S., Jr., and Bove, K.E. (1996). Alexander disease: a case report and review of the literature. *Pediatr Pathol Lab Med* *16*, 327-343.
- Rodriguez, D., Gauthier, F., Bertini, E., Bugiani, M., Brenner, M., N'Guyen, S., Goizet, C., Gelot, A., Surtees, R., Pedespan, J.M., *et al.* (2001). Infantile Alexander disease: spectrum of GFAP mutations and genotype-phenotype correlation. *Am J Hum Genet* *69*, 1134-1140.
- Rossi, D., and Volterra, A. (2009). Astrocytic dysfunction: insights on the role in neurodegeneration. *Brain Res Bull* *80*, 224-232.
- Sawaishi, Y. (2009). Review of Alexander disease: beyond the classical concept of leukodystrophy. *Brain Dev* *31*, 493-498.
- Shiuhara, T., Sawaishi, Y., Adachi, M., Kato, M., and Hayasaka, K. (2004). Asymptomatic hereditary Alexander's disease caused by a novel mutation in GFAP. *J Neurol Sci* *225*, 125-127.
- Stratmann, A., and Jeserich, G. (1995). Molecular cloning and tissue expression of a cDNA encoding IP1--a PO-like glycoprotein of trout CNS myelin. *J Neurochem* *64*, 2427-2436.
- Tanaka, K.F., Takebayashi, H., Yamazaki, Y., Ono, K., Naruse, M., Iwasato, T., Itohara, S., Kato, H., and Ikenaka, K. (2007). Murine model of Alexander disease: analysis of GFAP aggregate formation and its pathological significance. *Glia* *55*, 617-631.
- Tang, G., Xu, Z., and Goldman, J.E. (2006). Synergistic effects of the SAPK/JNK and the proteasome pathway on glial fibrillary acidic protein (GFAP) accumulation in Alexander disease. *J Biol Chem* *281*, 38634-38643.
- Tang, G., Yue, Z., Talloczy, Z., Hagemann, T., Cho, W., Messing, A., Sulzer, D.L., and Goldman, J.E. (2008). Autophagy induced by Alexander disease-mutant GFAP accumulation is regulated by p38/MAPK and mTOR signaling pathways. *Hum Mol Genet* *17*, 1540-1555.
- Tao, W., Evans, B.G., Yao, J., Cooper, S., Cornetta, K., Ballas, C.B., Hangoc, G., and Broxmeyer, H.E. (2007). Enhanced green fluorescent protein is a nearly ideal long-term expression tracer for hematopoietic stem cells, whereas DsRed-express fluorescent protein is not. *Stem Cells* *25*, 670-678.
- Tomizawa, K., Inoue, Y., Doi, S., and Nakayasu, H. (2000a). Monoclonal antibody stains oligodendrocytes and Schwann cells in zebrafish (*Danio rerio*). *Anat Embryol (Berl)* *201*, 399-406.
- Tomizawa, K., Inoue, Y., and Nakayasu, H. (2000b). A monoclonal antibody stains radial glia in the adult zebrafish (*Danio rerio*) CNS. *J Neurocytol* *29*, 119-128.
- Wehner, R.G., W. (1995). *Zoologie*, 23rd edn (Stuttgart, Georg Thieme).

Literatur

- Westerfield, M. (1994). The zebrafish book. (Eugene OR, University of Oregon Press).
- Wohlwill, F.J., Bernstein, J., and Yakovlev, P.I. (1959). Dysmyelinogenic leukodystrophy; report of a case of a new, presumably familial type of leukodystrophy with megalobarencephaly. *J Neuropathol Exp Neurol* *18*, 359-383.
- Yoshida, T., Sasayama, H., and Nakagawa, M. (2009). The process of inducing GFAP aggregates in astrocytoma-derived cells is different between R239C and R416W mutant GFAP. A time-lapse recording study. *Neurosci Lett* *458*, 11-14.
- Zelenika, D., Grima, B., Brenner, M., and Pessac, B. (1995). A novel glial fibrillary acidic protein mRNA lacking exon 1. *Brain Res Mol Brain Res* *30*, 251-258.

9. Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	dpf	Tage nach Befruchtung
µl	Mikroliter	DRG	dorsale Wurzelganglien
µM	Mikromolar	DTA	A-Untereinheit des Diphtherietoxins
A	Adenin	DTB	B-Untereinheit des Diphtherietoxins
APS	Ammoniumperoxodisulfat	DTT	Dithiothreitol
bp	Basenpaare	E.coli	Escherichia coli
BSA	Rinderserumalbumin	ECL	Elektrochemilumineszenz
C	Cystein	EDTA	Ethylendiamintetra-essigsäure
C	Cytosin	eGFP	verstärktes GFP
cDNA	komplementäre DNA	EM	Elektronenmikroskop
CIAP	Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm	EtOH	Ethanol
CMV	Cytomegalovirus	F0	Parentalgeneration
C-Terminus	Carboxyterminus	F1	erste Filialgeneration
Cx32	Connexin 32	FCS	fetales Kälberserum
dATP	Desoxyadenosin-triphosphat	g	Erdbeschleunigung
dCTP	Desoxycytidintriphosphat	G	Guanin
dGTP	Desoxyguanosin-triphosphat	GFAP	gliales saures fibrilläres Astrozytenprotein
dH ₂ O	destilliertes Wasser	GFP	grün fluoreszierendes Protein
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium	h	Stunde
DMSO	Dimethylsulfoxid	H	Histidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure	H ⁺	Wasserstoff
dNTP	Desoxynukleosid-triphosphat	H ₂ O	Wasser

Anhang

HCl	Salzsäure	ng	Nanogramm
hpf	Stunden nach Fertilisation	NK	Negativkontrolle
hPa	Hektopascal	nm	Nanometer
HRP	Meerrettichperoxidase	N-Terminus	Aminoterminus
HSE	Hitzeschockelemente	OD	optische Dichte
hsp27	Hitzeschockprotein 27	P	Prolin
IHC	Immunhistochemie	P0	Myelinprotein 0
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle	PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
K ⁺	Kalium	PBST	Phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween
Kb	Kilobasenpaare	PCR	Polymeraseketten- reaktion
kDa	Kilodalton	PEG	Polyethylenglykol
L	Lysin	PFA	Paraformaldehyd
LB	Luria Bertani Medium	PK	Positivkontrolle
mA	Milliampère	PLL	Poly-L-Lysin
MAG	Myelin assoziiertes Glykoprotein	PLP	Proteolipidprotein
MBP	basisches Myelinprotein	PMP22	peripheres Myelinprotein 22
MetOH	Methanol	PMSF	Phenylmethylsulfonyl- fluorid
ml	Milliliter	PNS	peripheres Nervensystem
mM	Millimolar	PVDF	Polyvinylidenfluorid
MOG	Myelin Oligodendrozytenprotein	R	Arginin
MP	Minimalpromotor	rpm	Umdrehungen pro Minute
MRI	Magnetresonanz- bildgebung	RT	Raumtemperatur
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure	SDS	Natriumdodecylsulfat
Na ⁺	Natrium	SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese

Anhang

SOB	Super Optimal Broth	TLF	Tübingen long fin
SZ	Schwann´sche Zellen	U	Einheit
T	Thymin	UAS	upstream activating sequence
TB	Tris-Borat	V	Volt
TBE	Tris Borat-EDTA	W	Tryptophan
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween	WB	Western Blot
TE	Tris-EDTA	ZNS	Zentrales Nervensystem
TEMED	Tetramethylethylendiamin		

9.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zellen des zentralen Nervensystems.....	9
Abbildung 2: Myelinisierung im ZNS und PNS sowie assoziierte Proteine	13
Abbildung 3: Vom <i>gfap</i> -Gen zum GFAP-Protein	16
Abbildung 4: MRI und EM von AXD Patienten.....	18
Abbildung 5: AXD-assoziierte Mutationen in GFAP-Protein	20
Abbildung 6: Zebrafisch <i>gfap</i> und dessen Konservierung	21
Abbildung 7: Konstrukte zur Herstellung der transgenen Fischlinien und methodisches Schema der Hitzeinduktion.....	55
Abbildung 8: Hitzeinduktion von GFP in transgenen Embryonen	57
Abbildung 9: Funktioneller Test der Cre-Rekombinase	59
Abbildung 10: Genotypisierung der DTA-transgenen Fische (F0-Generatation)	61
Abbildung 11: Kreuzungsschema und statistische Auswertung der Vererbung der einzelnen Konstrukte	63
Abbildung 12: Nachweis der Rekombination mittels einer Multiplex-PCR-Strategie.	65
Abbildung 13: PCR-Analyse der hitze-behandelten und Kontrolllarven.....	67
Abbildung 14: Phänotypische Untersuchung der hitze-behandelten und Kontrollembryonen	69
Abbildung 15: Immunhistochemische Untersuchung der deformierten Larven.....	70
Abbildung 16: Acridin Orange-Färbung als Marker für Zelltod.....	72
Abbildung 17: Konstrukte zur Herstellung von Zebrafischlinien mit transgener GFAP-Expression.....	78

Anhang

Abbildung 18: Test der <i>Responder</i> -Konstrukte in Zellkultur	80
Abbildung 19: Lebendaufnahmen der unterschiedlichen transgenen Zebrafischlinien	83
Abbildung 20: Dynamik der Aggregate	85
Abbildung 21: Einfluss verschiedener Pharmaka auf die Degradation der GFAP- Aggregate	87
Abbildung 22: „ <i>Whole-mount</i> “ Färbungen mit einem anti-GFAP Antikörper	89
Abbildung 23: „ <i>Whole-mount</i> “ Färbungen mit einem anti-HuC Antikörper.....	90
Abbildung 24: Anti-GFAP-Färbung auf Querschnitten des Rückenmarks von Larven	92
Abbildung 25: Anti-GFAP-Färbung auf Querschnitten des Rückenmarks von Adulten	94
Abbildung 26: Anti-HuC-Färbung auf Querschnitten des Rückenmarks von Larven	96
Abbildung 27: Biochemische Analyse der transfizierten Zelllysate	98
Abbildung 28: Biochemische Analyse der Aggregate in transgenen Fischen.....	99
Abbildung 29: Semidünnschnitte der transgenen und Wildtypfische	101
Abbildung 30: Elektronenmikroskopische Analyse der transgenen Präparate und Wildtypkontrollen	103

9.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vektoren und Plasmide.....	29
Tabelle 2: Oligonukleotide.....	35
Tabelle 3: Primärantikörper.....	36
Tabelle 4: Sekundärantikörper.....	37
Tabelle 5: Trenn- und Sammelgelzusammensetzung.....	50

Lebenslauf

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Katharina Irmtraud Stahl
Adresse: Esswurmstr. 23
81371 München
Geburtsdatum: 23.08.1980
Geburtsort: Erlenbach/Main
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung

11/2006-12/2009 Promotion am Deutschen Zentrum für Neurogenerative Erkrankungen (DZNE), Adolf Butenandt Institut, Ludwig-Maximilians Universität München, Arbeitsgruppe Dr. Christian Brösamle

09/2006 Abschluss des Studiums
Abschluss: Diplom, Note: sehr gut

10/2005 -09/2006 Diplomarbeit an der neurologischen Klinik der Julius-Maximilians Universität Würzburg, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Rudolf Martini, Note: sehr gut
Thema: Characterization of endoneurial fibroblasts

09/2005 Diplomprüfungen
Neurobiologie (Hauptfach), Note: sehr gut
Biochemie (Nebenfach), Note: sehr gut
Zell- & Entwicklungsbiologie (Nebenfach), Note: sehr gut

01/2004-06/2004 Auslandssemester an der Umeå Universitet, Umeå, Schweden

10/2000-09/2006 Studium der Biologie an der bayerischen Julius-Maximilians Universität Würzburg

Lebenslauf

06/2000 Maria-Ward-Gymnasium Aschaffenburg
Abitur, Note: 2,8

Berufliche Tätigkeit

Seit 01/2010 Wissenschaftlicher Außendienst

Zentrum für Humangenetik und Laboratoriumsmedizin
Dr. Klein und Dr. Rost, Martinsried

Posterpräsentationen

09/2009 “9th European Meeting on Glial Cells in Health and
Disease”, Paris, Frankreich

Postertitel: Investigation of Glia-Neuronal Interactions and
Myelination in zebrafish (*Danio rerio*)

04/2009 “Interact PhD Symposium 2009”, München

Postertitel: Zebrafish as model organism for Alexander
disease

07/2008 “Glia in Health and Disease”, Cold Spring Harbor, New
York, USA

Postertitel: Investigation of glia-neuronal interactions in
zebrafish

12/2007 “Interact PhD Symposium 2007”, München

Postertitel: Cellular interactions of myelinating glia with
other cells in development, the adult and disease

Danksagung

Mein besonderer Dank geht an Dr. Christian Brösamle für die Überlassung des spannenden Themas. Er hatte immer ein offenes Ohr für Fragen und Probleme im und um das Labor sowie nützliche Tipps und Tricks für seine Doktoranden. Weiterhin ermöglichte er mir die Teilnahme an internationalen Kongressen, die mich in meiner fachlichen wie auch persönlichen Entwicklung positiv geprägt haben.

Ein weiterer Dank geht an Prof. Dr. George Boyan, der sich bereit erklärt hat, diese Arbeit vor der Fakultät für Biologie zu vertreten. Außerdem hat er diese Arbeit durch zahlreiche Diskussionen entscheidend bereichert.

Ich danke PD Dr. Mario Wullimann für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit.

Ebenso danke ich Dr. Anja Capell und Dr. Stefan Lichtenthaler, die als Mitglieder meines PhD Komitees dieses Projekt mit einem anderen Blick und entsprechenden Denkanstößen vorangebracht haben und immer ein offenes Ohr für mich hatten. Weiterhin geht ein Dank an Prof. Dr. Christian Haass, an dessen Lehrstuhl diese Arbeit durchgeführt wurde.

Ich danke allen Wissenschaftlern, die uns Konstrukte überlassen haben: Laure Bailly-Cuif, Thomas Czerny, Dominik Paquet und Pamela Raymonds.

Ein weiterer Dank geht an Karin Schaefer und Severin Filser für die gute und oft auch motivierende und sehr konstruktive Zusammenarbeit. Außerdem danke ich unseren ehemaligen Kolleginnen Daniele Franc und Barbara Obirei für eine sehr angenehme und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.

Ein außerordentlicher Dank gilt allen Doktoranden-Kolleginnen und -Kollegen des Lehrstuhls für Stoffwechselbiochemie, die durch ihren Einsatz und ihr Handeln echte zwischenmenschliche Größe und soziale Kompetenz gezeigt haben.

Besonders möchte ich hier die Mädels der AG Tatzelt/Winklhofer erwähnen, die mich in schweren Zeiten immer wieder zum Durchhalten motiviert haben: Anita Schlierf, Margit Miesbauer, Mareike Fett, Natalie Pfeiffer, Ulrike Resenberger und Viktoria Ruf.

Mein besonderer Dank geht an meine Familie, meine Eltern, meine Schwester und Oma, die mir meine Ausbildung ermöglicht haben und während meines Studiums und der Doktorarbeit immer für mich da waren und mir - trotz oft schwierigen Umständen - immer wieder eine Anlaufstelle zum „Auftanken“ waren.

Mein größter Dank gilt jedoch Lasse, der meine Launen und „Tiefs“ mit unglaublicher Geduld und Gelassenheit ertragen und mich trotz ausweglos erscheinender Lage immer wieder zum Lachen gebracht und motiviert hat – DANKE! Ich liebe Dich!

Zum Schluss danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), die mir eine Promotion innerhalb von nur drei Jahren ermöglicht hat!