

**Charakterisierung von *gpr17* und dessen
Einfluss auf die Myelinisierung im
Zebrafisch (*Danio rerio*)**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Henning Kleinert

aus

Frankfurt am Main

Bonn 2017

Die vorliegende Arbeit wurde mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn angefertigt.

1. Gutachter: Jun.-Prof. Dr. Benjamin Odermatt

2. Gutachterin: Prof. Dr. Evi Kostenis

Tag der Promotion: 02.05.2018

Erscheinungsjahr: 2018

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie der Medizinischen Fakultät der Rheinischen
Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Geschäftsführender Direktor des Instituts: Prof. Dr. Karl Schilling

Zusammenfassung

Der Zebrafisch (*Danio rerio*) ist ein karpfenartiger Süßwasserfisch, der sich aufgrund seiner schnell voranschreitenden Embryogenese und der Transparenz der Embryonen bis zum 5. Tag nach der Befruchtung der Eizelle (5 dpf) als Modellorganismus in der Grundlagenforschung etabliert hat. Diese Eigenschaften ermöglichen beispielsweise auf visueller Ebene sowohl *in vivo* als auch *in vitro* die Verfolgung physiologischer Prozesse sowie die Untersuchung der Einflüsse gentechnischer Manipulationen oder pharmakologischer Agenzien. In der aktuellen medizinischen Forschung spielt die Aufklärung der komplexen Mechanismen der Myelinisierung, Remyelinisierung und Demyelinisierung von Nervenzellen eine wichtige Rolle, um neue Therapieansätze für bisher nicht heilbare demyelinisierende Erkrankungen, wie die Multiple Sklerose, entwickeln zu können. Die Myelinisierung von Axonen im zentralen Nervensystem wird sowohl bei Säugetieren als auch bei Fischen von myelinisierenden Oligodendrozyten übernommen. Der humane G-Protein-gekoppelte Rezeptor GPR17 wurde in der Membran von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen detektiert und spielt nachweislich eine wichtige Rolle bei der Differenzierung dieser Zellen zu myelinisierenden Oligodendrozyten in Säugetieren. Die detaillierten intrazellulären Signalwege von GPR17 sowie die Charakterisierung der Liganden sind jedoch noch nicht vollständig geklärt und werden kontrovers diskutiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals die beiden paralogenen Gene *gpr17a* und *gpr17b* im Zebrafisch identifiziert. Die vorhergesagten Proteinstrukturen von Gpr17a und Gpr17b weisen die für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren charakteristischen sieben Transmembrandomänen sowie das konservierte H-X-X-R-Motiv in Transmembrandomäne 6 auf, welches beim humanen GPR17 für die Ligandenbindung verantwortlich ist. Mittels 5' RACE-PCR konnten zunächst die Exon-Intron Strukturen der genomischen Region von *gpr17a* und *gpr17b* aufgeklärt werden. Die Expressionsanalyse in den ersten 10 Tagen (dpf) zeigte für *gpr17a* einen drastischen Expressionsanstieg an Tag 3,5 (dpf) um das 11-fache, während das Expressionslevel anschließend tendenziell wieder abfiel. Das Expressionslevel von *gpr17b* war hingegen deutlich geringer, stieg bis zu Tag 6 (dpf) kontinuierlich an und fiel anschließend wieder leicht ab. Weitere Untersuchungen zeigten, dass *gpr17a* und *gpr17b* im adulten Fisch ausschließlich im ZNS (Gehirn, Rückenmark und Auge) exprimiert werden. Mittels *in situ* Hybridisierung wurden für *gpr17a* neben der Expression im Kopfbereich drei weitere Expressionsbereiche detektiert: Ein Bereich oberhalb des Notochords in der Region der Bodenplatte, ein weiterer Bereich im Rückenmark dorsal der Bodenplatte sowie punktuell

verteilte *gpr17a*-Signale auf der Ebene des Notochords. Bei der transienten Expression eines Plasmids, welches EGFP unter der Kontrolle des potentiellen *gpr17a*-Promotors exprimiert, wurden mittels 2-Photonenmikroskopie multipolare *gpr17a*-exprimierende Zellen im Bereich der Bodenplatte sowie dorsal des pMNs detektiert. Des Weiteren wurde im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss von Gpr17a auf die Oligodendrogenese des Zebrafisches untersucht. In der transgenen Zebrafischlinie *Tg(olig2:EGFP)* führte der Knockdown von Gpr17a - verursacht durch einen *gpr17a*-Morpholino - zu einer signifikanten Reduktion dorsal migrierender *olig2*⁺-Oligodendrozyten-Vorläuferzellen verbunden mit einer signifikanten Reduktion der Expression der Myelin-assoziierten Gene *mbpa* und *plp1b*. In der transgenen Zebrafischlinie *Tg(cldnk:GAL4,UAS:EGFP)* bewirkte der Knockdown mittels *gpr17a*-Morpholino eine signifikante Reduktion der bipolaren *cldnk*⁺-Oligodendrozyten dorsal des pMNs. Diese Ergebnisse zeigen im Umkehrschluss, dass Gpr17a im Zebrafisch einen positiven Einfluss auf die Initiation der Differenzierung und Migration von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen hat und schließlich für die Bildung von bipolaren *cldnk*⁺-Oligodendrozyten benötigt wird. Mittels FACS-Analyse kombiniert mit RT-qPCR wurde schließlich die Expression von *gpr17a* in EGFP-exprimierenden *olig2*⁺-Oligodendrozyten-Vorläuferzellen in drei Tage alten Zebrafischembryonen nachgewiesen. Co-Lokalisationsstudien zeigten, dass die multipolaren *gpr17a*-exprimierenden Zellen sowohl im Bereich der Bodenplatte als auch dorsal des pMNs gleichzeitig *olig2* exprimieren (frühe Oligodendrozyten-Vorläuferzellen), während die Expression von *gpr17a* in *cldnk*-exprimierenden Zellen (späte Oligodendrozyten Vorläuferzellen) nahezu ausgeschlossen wurde. Die Behandlung der Zebrafische mit Trichostatin A, einem Inhibitor der Oligodendrozyten-Entwicklung, führte zu einer signifikanten Reduktion der *gpr17a*-exprimierenden Zellen im Rückenmark verbunden mit einer nahezu vollständigen Abwesenheit der *mbpa*-Expression. Diese Ergebnisse deuten sehr stark auf die Expression von Gpr17a in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen des Zebrafisches hin. Weitere Untersuchungen dieser Arbeit gaben erste Hinweise darauf, dass Gpr17a im Zebrafisch - ähnlich wie bei Säugetieren - auch in Neuronen und Olig2-exprimierenden Radialglia exprimiert wird und dass der GPR17-Agonist MDL29,951 auch im Zebrafisch den Gpr17a-Rezeptor beeinflusst. Die Charakterisierung von Gpr17a im Zebrafisch eröffnet neue Möglichkeiten den Einfluss von Gpr17a auf die Myelinisierung weiter untersuchen und verstehen zu können und diese im Hinblick auf die Entwicklung neuer Therapieansätze für demyelinisierende Erkrankungen auf den Mensch übertragen zu können.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Myelinisierung von Nervenzellen	1
1.1.1 Myelinisierende Gliazellen.....	2
1.2 Demyelinisierende Erkrankungen	5
1.2.1 Multiple Sklerose	6
1.2.2 Therapie der Multiplen Sklerose	9
1.3 Zebraärbling (<i>Danio rerio</i>).....	11
1.3.1 Zebrafischgenom	14
1.3.2 Myelinisierung im Zebrafisch	15
1.3.3 Demyelinisierung und Remyelinisierung im Zebrafisch.....	18
1.4 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	19
1.4.1 GPR17	19
1.4.2 Signalwege von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren	21
1.5 Ziel der Arbeit	23
2 Materialien	25
2.1 Chemikalien.....	25
2.2 Reinstwasser	28
2.3 Enzyme	28
2.4 Oligonukleotide	29
2.5 Antikörper	31
2.6 Fischzellen, Transgene Zebrafischlinien, Wildtyp-Zebrafischlinien	32
2.7 Plasmide	32
2.8 Bakterienstämme	33
2.9 Fertigkits.....	33
2.10 Fischanlage	34
2.11 Geräte	35
2.12 Verbrauchsmaterialien.....	37
2.13 Software.....	39

3 Methoden	40
3.1 Zebrafischspezifische Methoden	40
3.1.1 Fischhaltung und Aufzucht	40
3.1.2 Herstellung von Injektionsnadeln und –platten zur Mikroinjektion	41
3.1.3 Mikroinjektion von Plasmiden zur Herstellung transienter transgener Fische	42
3.1.4 Mikroinjektion von Morpholinos	44
3.1.5 Applikation von Substanzen in das Fischwasser.....	44
3.1.6 Whole-mount <i>in situ</i> Hybridisierung.....	45
3.1.7 Fixierung von Zebrafisch-Embryonen für <i>in vivo</i> Aufnahmen.....	48
3.1.8 DiAsp-Färbung.....	48
3.1.9 Inhibition der Histon-Deacetylase (kurz HDAC).....	49
3.2 Molekulargenetische Methoden	49
3.2.1 Isolation von genomischer DNA aus dem Zebrafisch.....	49
3.2.2 Isolation von Gesamt-RNA aus dem Zebrafisch.....	50
3.2.3 DNaseI-Verdau der Gesamt-RNA.....	50
3.2.4 Quantifizierung von DNA und RNA.....	50
3.2.5 Isolation von Plasmid-DNA	51
3.2.6 Agarose-Gelelektrophorese	51
3.2.7 Aufreinigung von DNA-Fragmenten	52
3.2.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	52
3.2.9 Restriktionsverdau von DNA	52
3.2.10 Dephosphorylierung	52
3.2.11 Ligation von DNA.....	53
3.2.12 Klonierung multipler DNA-Fragmente	53
3.2.13 Transformation von chemokompetenten <i>E. coli</i> -Zellen.....	53
3.2.14 Herstellung von Glycerinkulturen	54
3.2.15 „Site-directed“ Mutagenese.....	54
3.2.16 Reverse Transkriptase (RT) - PCR.....	54
3.2.17 Quantitative Real-Time PCR (RT-qPCR).....	55
3.2.18 5' RACE PCR.....	59
3.2.19 DNA-Sequenzierung	61
3.2.20 <i>In vitro</i> Transkription	61
3.2.21 FACS-Analyse.....	62

3.3	Weitere Methoden	63
3.3.1	Proteingewinnung aus Zebrafischen	63
3.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	64
3.3.3	Westernblot	64
3.3.4	Immunfluoreszenz	65
3.3.5	Dynamische Massenumverteilung	66
3.3.6	Statistik	67
3.4	Zellkultur	68
3.4.1	PAC2-Zebrafisch-Fibroblasten	68
3.4.2	Humane embryonale Nierenepithelzellen (HEK 293-Zellen)	69
4	Ergebnisse	70
4.1	Charakterisierung von Gpr17 im Zebrafisch	70
4.1.1	Datenbankrecherche zu Gpr17	70
4.1.2	Nachweis und Charakterisierung des 5' Endes von <i>gpr17a</i>	73
4.1.3	Nachweis und Charakterisierung des 5' Endes von <i>gpr17b</i>	77
4.2	Expression von Gpr17 im Zebrafisch	82
4.2.1	Qualitativer Nachweis von <i>gpr17a</i> und <i>gpr17b</i>	82
4.2.2	Quantitativer Nachweis von <i>gpr17</i> und weiteren Myelin-assoziierten Genen	84
4.2.3	Quantitativer Nachweis nach Morpholino-Injektion	87
4.2.4	Testung des Gpr17a-Antikörpers	89
4.2.5	Auswirkung der Morpholino-Injektion auf Proteinebene	92
4.2.6	Einfluss des <i>gpr17a</i> -Knockdowns in der Fischlinie <i>Tg(olig2:EGFP)</i>	93
4.2.7	Einfluss des <i>gpr17a</i> -Knockdowns in der Fischlinie <i>Tg(cldnk:GAL4,UAS:EGFP)</i>	95
4.3	Lokalisation von Gpr17a im Zebrafisch	101
4.3.1	<i>In situ</i> Hybridisierung	101
4.3.2	Einfluss von Trichostatin A auf die <i>gpr17a</i> -Expression	107
4.3.3	Promotoranalyse von <i>gpr17a</i>	110
4.3.4	Co-Lokalisationsstudien zur Expression von <i>gpr17a</i>	115
4.3.5	Expression von <i>gpr17a</i> in Olig2-exprimierenden Zellen (FACS-Analyse)	122
4.4	Untersuchungen des Gpr17a-Rezeptors in HEK 293-Zellen	124
4.4.1	Dynamische Massenumverteilung nach Applikation von MDL29,951	124
4.4.2	Quantitativer Nachweis nach Inkubation in MDL29,951	128

5 Diskussion.....	130
5.1 Der genomische Aufbau von <i>gpr17</i> im Zebrafisch	130
5.2 Die Expression von <i>gpr17a</i> und <i>gpr17b</i> im Zebrafisch	132
5.3 Einfluss von Gpr17a auf die Oligodendrogenese	135
5.3.1 Beeinflussung der Oligodendrogenese mittels <i>gpr17a</i> -Morpholino	135
5.3.2 Einfluss von MDL29,951 auf den Gpr17a-Rezeptor im Zebrafisch	141
5.4 Gpr17a in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen im Zebrafisch	146
5.4.1 <i>gpr17a</i> -exprimierende Zelltypen im ZNS des Zebrafisches	146
5.4.2 Lokalisierung von <i>gpr17a</i> in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen.....	150
5.5 Ausblick.....	155
6 Literaturverzeichnis	158
7 Anhang.....	174
8 Publikationen	178

Abkürzungsverzeichnis

AG	Arbeitsgruppe
aGPCR	Adhesion G protein-coupled receptor
AUC	Area under the curve
bHLH	basic helix-loop-helix
Bp	Base pairs
BSA	Bovine serum albumin
cAMP	30,50-cyclic monophosphate
CNS	Central nervous system
DEPC	diethyl dicarbonate
DGN	Deutschen Gesellschaft für Neurologie
DMR	Dynamic mass redistribution
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline,
dpf	days post fertilization
eef1a111	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
ERBB	receptor tyrosine kinase
GPCR	G protein-coupled receptor
GRP17	G protein-coupled receptor 17
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HEK293	Human embryonic kidney cells 293
hpf	hours post fertilization
KIS	Klinisch isoliertes Syndrom (KIS)
MBP	Myelin basic protein
MDL 29,951	2-carboxy-4,6-dichloro-1H-indole-3-propionic acid
mRNA	Messenger RNA
MS	Multiple Sklerose
MS222	Tricaine methanesulfonate
Nkx2.2	NK2 Homeobox 2
OLIG	Oligodendrocyte transcription factor
OPC	Oligodendrocyte precursor cells
ORF	open reading frame
P0	Protein Zero

Abkürzungsverzeichnis

PBS	Phosphate-Buffered Saline
PBST	Phosphate-Buffered Saline Tween
PFA	Paraformaldehyd
PLP	Proteolipid protein
pMN	Primary motoneuron domain (primäre neurale Progenitorzellen)
PNS	Peripheres Nervensystem
PPMS	Primary Progressive MS
PTU	phenylthiourea
RACE-PCR	rapid amplification of cDNA-ends with polymerase chain reaction
rpm	Umdrehungen pro Minute
RRMS	Relapsing-remitting MS
RT-qPCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SOX10	SRY-box 10
SPMS	Secondary progressive MS
TSA	Trichostatin A
TSP	Transkriptionsstartpunkt
UTR	untranslated region
ZNS	Zentrales Nervensystem

Physikalische Größen und Einheiten wurden nach dem SI-System abgekürzt. Nukleotide wurden gemäß der IUPAC-Regeln benannt. Die Benennung von humanen Genen und Proteinen erfolgte gemäß der „Guideline for Human Gene Nomenclature“ des HUGO Gene Nomenclature Committee (Wain et al., 2002). Die Benennung von Genen und Proteinen des Zebrafisches erfolgte gemäß der „ZFIN Zebrafish Nomenclature Guidelines“ (www.zfin.org).

1 Einleitung

1.1 Myelinisierung von Nervenzellen

Die Myelinisierung beschreibt die Umkleidung der Axone von Nervenzellen (Neurone) mit Membranen von Gliazellen, die schließlich die sogenannte Myelinscheide bilden. Sowohl die Axone des zentralen Nervensystem (ZNS), als auch die Axone des peripheren Nervensystems (PNS) sind von Myelin umwickelt (Abbildung 1.1), um die Axone zu schützen und eine hohe Geschwindigkeit bei der Erregungsweiterleitung zu ermöglichen (Poliak and Peles, 2003; Rowitch and Kriegstein, 2010). Im menschlichen Gehirn gehören ca. 50% der gesamten Zellen zu den Gliazellen (Rowitch and Kriegstein, 2010). Die Gesamtheit aller myelinisierten Axone bildet im ZNS die weiße Substanz.

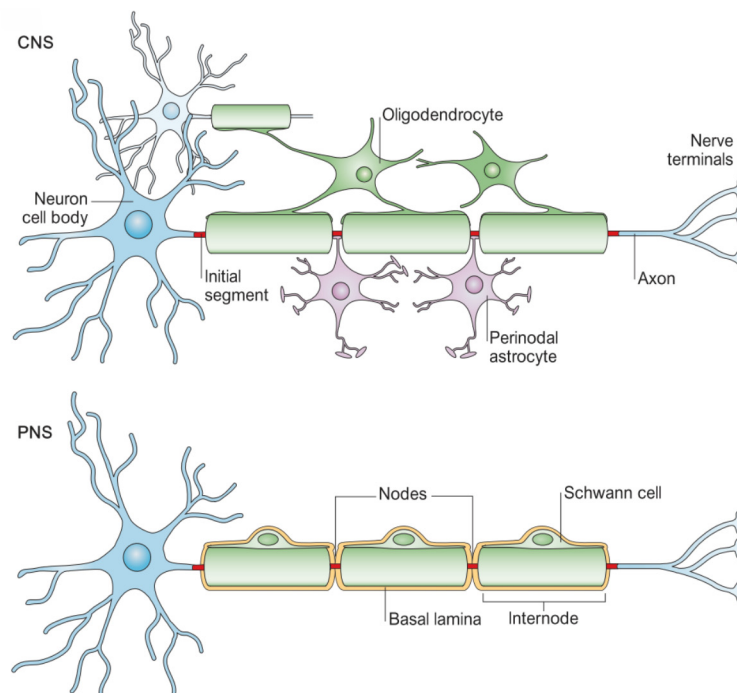


Abbildung 1.1: Myelinisierende Gliazellen der Neurone im ZNS (CNS, oben) und im PNS (unten). Oben: Im ZNS sind Oligodendrozyten für die Myelinisierung der Axone verantwortlich. Astrozyten versorgen die Axone mit Nährstoffen und stellen eine Art Leitstruktur dar, an der sich Axone zu ihrem Ziel bewegen. Unten: Im PNS bilden die Schwann-Zellen mit ihren Zellausläufern durch das mehrmalige Umwickeln der Axone die Myelinschicht. Bild modifiziert nach Poliak et al. (2003).

Die Trockenmasse des Myelins (griech.: *myelos* – Mark) besteht zu ca. 80% aus Lipiden (Cholesterin, Phospholipide, Glycolipide) und zu ca. 20% aus Proteinen (MBP – Basische

Myelinproteine (Anteil ca. 30-40%), PLP – Proteolipid-Protein (Anteil ca. 50%), MOG – Myelin/Oligodendrozyten Glykoprotein (Anteil kleiner 1%), MAG – Myelin-assoziiertes Glykoprotein (Anteil 1%) (Lees und Brostoff, 1984). Die lipidreiche Myelinscheide hat mit 40% einen sehr geringen Wassergehalt und isoliert die Nervenzelle, sodass sich die elektrische Kapazität der Nervenzellmembran verringert und sich der elektrische Widerstand erhöht, was die Weiterleitung der elektrischen Erregung aus dem Axon in die Umgebung verhindert. Durch das Vorhandensein der isolierenden Myelinscheide ist eine kontinuierliche Erregungsleitung über diese Axone ausgeschlossen. Wie Abbildung 1.1 zeigt, befinden sich zwischen den myelinisierten Abschnitten der Axone jedoch freiliegende nicht myelinisierte Axonabschnitte, die als Ranvier-Schnürringe (engl.: Nodes of Ranvier) bezeichnet werden (Poliak and Peles, 2003). Das Aktionspotential kann nur an den nicht myelinisierten Ranvier-Schnürringen durch eine Depolarisierung der Membran gebildet werden und springt somit innerhalb des Axons von Ranvier-Schnürring zu Ranvier-Schnürring. Man spricht hier von der saltatorischen Erregungsleitung, die um ein Vielfaches schneller ist als die kontinuierliche Erregungsweiterleitung an nicht myelinisierten Axonen (Morell und Quarles, 1999).

1.1.1 Myelinisierende Gliazellen

Das Gehirn besteht aus zwei Haupttypen von Zellen, den Nervenzellen und den Gliazellen (kurz als Glia bezeichnet). Zu den Gliazellen des ZNS gehören die Makroglia (Astrozyten und Oligodendrozyten) sowie die Mikroglia. Die Schwann-Zellen sind hingegen die Gliazellen des PNS (Kettenmann und Verkhratsky, 2011).

Die sehr heterogenen Astrozyten nehmen im Gehirn einen Anteil von ca. 80% aller Gliazellen ein. Astrozyten kontrollieren die extrazelluläre Kalium-Homöostase sowie den lokalen Blutfluss, entfernen überschüssiges Glutamat (Glutamat-Glutamin-Zyklus), versorgen Neurone mit Metaboliten, kontrollieren die Synaptogenese sowie die Stabilität von Synapsen und haben somit einen stark modulierenden Einfluss auf die neuronalen Netzwerke (Kettenmann und Verkhratsky, 2011). Mikroglia besitzen im Gehirn eine ähnliche Aufgabe wie Makrophagen in der allgemeinen Immunantwort (Hughes, 2012). Während im ZNS die Ausläufer von reifen Oligodendrozyten die Isolation der Axone der Neurone mit einer Myelinschicht übernehmen, sind im PNS die Ausläufer der Schwann-Zellen (SZ) für die Myelinisierung der Axone verantwortlich (Sherman und Brophy, 2005; Kettenmann und Verkhratsky, 2011). Ein einziger Oligodendrozyt ist in der Lage mit seinen Ausläufern bis zu 40 Myelinsegmente (Internodien) auf unterschiedlichen Axonen im ZNS zu bilden (Miron et

al., 2011). Reife- und unreife Oligodendrozyten entstehen aus den sogenannten Oligodendrozyten-Vorläuferzellen, die im Englischen als „Oligodendrocyte progenitor cells“ (OPCs) bezeichnet werden. Wie Abbildung 1.2 zeigt, werden Oligodendrozyten-Vorläuferzellen zum Großteil aus multipotenten neuralen Stammzellen (durch Spezifizierung) in der subventrikulären Zone des lateralen Ventrikels des Gehirns gebildet und migrieren schließlich in die Zielregionen, um sich beispielsweise in myelinisierende Oligodendrozyten auszdifferenzieren (Nait-Oumesmar et al., 2008; Bradl und Lassmann, 2010).

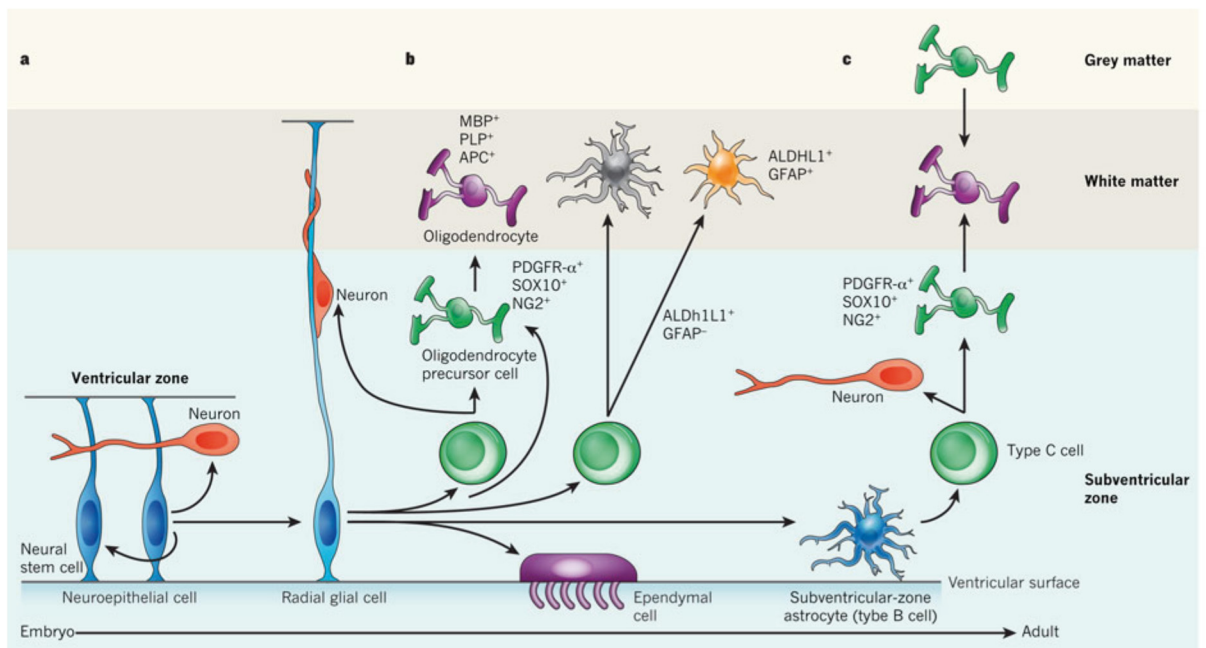


Abbildung 1.2: Humane Gliogenese während der Entwicklung vom Embryo zum Erwachsenen. **a**, Aus den Neuroepithelzellen bilden sich zum einen Neurone und Radialglia. **b**, Aus den Radialglia entwickeln sich intermediäre Vorläuferzellen und OPCs, die sich in Neurone und Oligodendrozyten ausdifferenzieren können. Radialglia können außerdem verschiedene Arten von Astrozyten sowie Ependymzellen bilden. **c**, Beim Erwachsenen können Oligodendrozyten über zwei unabhängige Signalwege entstehen. Astrozyten (Typ B-Zelle) bilden intermediäre Vorläuferzellen (Typ C-Zelle), die sich zu Neuronen und OPCs entwickeln können. Diese OPCs sowie die OPCs der grauen Substanz bilden schließlich die Oligodendrozyten der weißen Substanz. Bildquelle und Bildbeschriftung modifiziert nach Rowitch and Kriegstein (2010).

Die gesamte Zellentwicklung zu Oligodendrozyten-Vorläuferzellen und myelinisierenden Oligodendrozyten ist abhängig von einem komplexen Zusammenspiel intrinsischer und extrinsischer sowie epigenetischer Faktoren (Rowitch and Kriegstein, 2010). Zu den wichtigsten intrinsischen Faktoren gehören u.a. die basischen Helix-Schleifen-Helix (bHLH) Transkriptionsfaktoren OLIG1, OLIG2 und OLIG3 (Oligodendrocyte transcription factor)

(Rowitch, 2004; Meijer et al., 2012). Tabelle 1.1 zeigt eine Übersicht der Expressionslevel der *Olig*-Gene in unterschiedlichen ZNS-Regionen bzw. Zelltypen von Nagetier und Mensch.

Tabelle 1.1: Expression der Gene *Olig1*, *Olig2* und *Olig3*.

ZNS-Region oder Zelltyp	<i>Olig1</i>	<i>Olig2</i>	<i>Olig3</i>
<u>Während der Entwicklung</u>			
Ventraler Bereich des Rückenmarkes (pMN-Bereich)	++	+++	-
Dorsaler Bereich des Rückenmarkes	-	-	+++
Frühe Oligodendrozyten-Vorläuferzellen	+++	+++	-
<u>Postnatal</u>			
Subventrikulären Zone (transit-amplifying cells)	+++	+++	NT
Oligodendrozyten-Vorläuferzellen	+++	+++	NT
Myelinisierende Oligodendrozyten	+++	+++	NT
Außerhalb des ZNSs	-	-	++

Expressionslevel variieren von „keine Expression“ (-) bis hin zu „starke Expression“ (+++). NT= Nicht getestet. Tabelle modifiziert nach Meijer et al. (2012). Funktionen der OLIG- Proteine.

Wie Tabelle 1.1 zeigt, wird *Olig1* und *Olig2* ausschließlich im ZNS exprimiert. Neben der Expression in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen und Oligodendrozyten wurde *Olig2* auch in den Radialglia des Neuralrohrs detektiert (Meijer et al., 2012). *Olig1* und insbesondere *Olig2* spielen somit eine Schlüsselrolle bei der Spezifizierung multipotenter neuraler Stammzellen in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen und der anschließenden Differenzierung der Oligodendrozyten-Vorläuferzellen in myelinisierende Oligodendrozyten (Wegener et al., 2015). Wegener et al. (2015) konnten in ihren Untersuchungen *in vivo* und *in vitro* zeigen, dass allein die spezifische Überexpression von *Olig2* in Sox10⁺-Oligodendrozyten im Mausmodell für die Migration und Differenzierung von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen in myelinisierende Oligodendrozyten ausreichend war und die Überexpression von *Olig2* unter demyelinisierenden Bedingungen die Rate der Remyelinisierung erhöhte. Außerdem wurde eine Hochregulation von OLIG2 in reifen RTN4-A/NOGO-A⁺-Oligodendrozyten in aktiven und chronisch aktiven Läsionen festgestellt, was darauf hinweist, dass die Hochregulation von OLIG2 in reifen Oligodendrozyten-Vorläuferzellen für die Differenzierung und Remyelinisierung bei der Multiplen Sklerose notwendig ist (Wegener et al., 2015). Untersuchungen von MS-Läsionen zeigten, dass Oligodendrozyten-Vorläuferzellen in diesen Läsionen vorhanden waren (Chang et al., 2002), diese jedoch, aufgrund unterschiedlicher

inhibitorischer Einflüsse, nicht zu remyelinisierenden Oligodendrozyten ausdifferenzieren (Chang et al., 2002; Franklin und Ffrench-Constant, 2008; Chang et al., 2012). Zu den bekannten Transkriptionseinhibitoren der Zelldifferenzierung von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen zu myelinisierenden Oligodendrozyten gehören *Id2* und *Id4* (Inhibitor of DNA binding 2 and 4) sowie die basischen Helix-Schleifen-Helix Transkriptionsfaktoren *Hes1* und *Hes5* (Hes Family BHLH Transcription Factor 1 und 5) (Shen et al., 2008). Ein weiterer Regulator, der mit der Beeinflussung der Myelinisierung in Verbindung gebracht wird, ist der G-Protein-gekoppelte Rezeptor 17 (GPCR 17, kurz GPR17) (Hennen et al., 2013; Mitew et al., 2013; Fumagalli et al., 2015; Simon et al., 2016), dessen Einfluss in dieser Arbeit weiter untersucht wurde.

Es besteht weiterhin ein großes wissenschaftliches Interesse daran, die Einflussfaktoren auf die Proliferation zu myelinisierenden Oligodendrozyten besser kennenzulernen, um die Mechanismen der Myelinisierung (Aufbau der Myelinschicht), Demyelinisierung (Abbau der Myelinschicht) und Remyelinisierung (Aufbau der Myelinschicht nach einem Abbau) besser zu verstehen und letztendlich neue Therapieansätze bei demyelinisierenden Erkrankungen entwickeln zu können.

1.2 Demyelinisierende Erkrankungen

Demyelinisierende Erkrankungen sind Erkrankungen des Nervensystems, bei denen es zu einer Schädigung oder einem Abbau der Myelinschicht der Axone der Neurone kommt. Die Demyelinisierung hat eine fehlende Isolierung der Axone zur Folge, die schließlich die Erregungsweiterleitung einschränkt oder vollständig inhibiert. In diesem Fall kann es zu neurologischen Schädigungen in definierten Regionen des ZNS und PNS sowie zur Ausprägung verschiedener Krankheitsbilder kommen, die als demyelinisierende Erkrankungen zusammengefasst werden. Die demyelinisierenden Erkrankungen sind grundsätzlich von Erkrankungen abzugrenzen, die, aufgrund einer genetisch bedingten Myelinisierungsstörung (Dysmyelinisierung), die Bildung einer von vornherein abnormalen Myelinschicht verursachen (Love, 2006). Hierzu gehört beispielsweise die orthochromatische Leukodystrophie (Pelizäus-Merzbacher-Krankheit). Da die Myelinschicht des ZNS durch Oligodendrozyten und die Myelinschicht der PNS durch Schwann-Zellen gebildet wird (Abbildung 1.1), unterscheidet man zwischen den demyelinisierenden Erkrankungen des ZNS und des PNS. Zu den demyelinisierenden Erkrankungen des PNS gehören beispielsweise die

hereditäre motorisch-sensible Neuropathie (Charcot-Marie-Tooth Syndrom) und das Guillain-Barré-Syndrom. Das Guillain-Barré-Syndrom ist eine der häufigsten und schwersten akuten paralytischen Neuropathien, die höchstwahrscheinlich durch eine gegen die Myelinschicht der peripheren Nerven gerichtete Autoimmunantwort ausgelöst wird (Willison et al., 2016). Als Ursachen dieser Autoimmunreaktion wurden bisher zahlreiche vorausgehende bakterielle oder virale Infektionen, wie Infektionen mit *Campylobacter jejuni* oder dem Epstein-Barr-Virus, beschrieben (Kuwabara und Yuki, 2013; Hashemian et al., 2015). Der klinische Verlauf der Erkrankung ist charakterisiert durch akute oder chronische inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathien, die unter anderem zu Lähmungen der Muskulatur des Beckens, des Rumpfes sowie der Atemwege führen können. Die folgende Tabelle zeigt einige demyelinisierenden Erkrankungen des ZNS, die gemäß ihrer Pathogenese in verschiedene Kategorien eingegliedert werden können (Love, 2006).

Tabelle 1.2: Demyelinisierende Erkrankungen des ZNS.

Ursache der Demyelinisierung	Demyelinisierende Erkrankung
inflammatorische Prozesse	Multiple Sklerose Akute disseminierte Enzephalomyelitis (ADEM) Akute hämorrhagische Leukoenzephalitis (AHL)
virale Infektionen (beispielsweise mit dem JC-Virus (Humanes Polyomavirus 2))	Progressive multifokale Enzephalopathie (PML)
erlangte metabolische Störungen (beispielsweise Hyponatriämie)	Zentrale pontine Myelinolyse (ZPM) Extrapontine Myelinolyse (EPM)
hypoxisch-ischämische Prozesse	-
fokale Kompressionen	-

1.2.1 Multiple Sklerose

Bei der Multiplen Sklerose (MS) handelt es sich um eine im ZNS (Gehirn und Rückenmark) verstreut auftretende chronisch-entzündliche, demyelinisierende Erkrankung, die auch als *Enzephalomyelitis disseminata* bezeichnet wird (Sherman und Brophy, 2005; Trapp und Nave, 2008; Miller et al., 2015). Histopathologisch ist die MS durch multifokale demyelinisierte Läsionen charakterisiert. Zum heutigen Zeitpunkt gilt diese Erkrankung als nicht heilbar und ist gemäß dem Infektionsschutzgesetz nicht meldepflichtig, weshalb die

genaue Anzahl der erkrankten Personen in Deutschland nicht genau erfasst werden kann. Neuste und erstmals erhobene MS-Prävalenzdaten zeigen, dass in Deutschland im Jahr 2010 fast 200.000 Versicherte in der gesetzlichen Krankenversicherung mit MS diagnostiziert worden sind (Petersen et al., 2014). Interessanterweise zeigt die Prävalenz der Multiplen Sklerose deutliche geographische Unterschiede. Während in äquatornahen Gegenden (Japan, China, Zentralafrika, Südamerika) eine niedrige Prävalenz (< 5 Fälle/100.000 Personen) vorliegt, steigt die Prävalenz polwärts auf beiden Seiten des Äquators. Die höchsten Prävalenzen (30 Fälle/100.000 Personen) findet man in Europa, Australien und Nordamerika (Kurtzke, 1991; Noseworthy et al., 2000). Das Prädilektionsalter für die Erkrankung an MS liegt zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr (Hoffmann et al., 2009) und Frauen sind doppelt so häufig betroffen wie Männer (Hoffmann et al., 2009). Aufgrund der sehr unterschiedlich verlaufenden Erkrankungsformen, wird die MS umgangssprachlich auch als „Krankheit der 1000 Gesichter“ bezeichnet. Der individuelle Verlauf der Multiplen Sklerose variiert von Patient zu Patient sehr stark und ist nur sehr schlecht vorherzusagen. Grundsätzlich wird die Erkrankung von der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN) in vier unterschiedliche Stadien und Verlaufsformen eingeteilt (Hans-Christoph Diener, 2014):

- Klinisch isoliertes Syndrom (KIS)
- Schubförmige Verlaufsform der MS (Relapsing-remitting MS (RRMS))
- Sekundär progrediente Verlaufsform der MS (SPMS)
- Primär progrediente Verlaufsform der MS (PPMS)

Das erstmalige Auftreten neurologischer Symptome, die im Zusammenhang mit der MS stehen können, wird als Klinisch isoliertes Syndrom (KIS) bezeichnet. Dabei handelt es sich noch nicht um die eigentliche Diagnose MS, sondern um erste Hinweise auf die Erkrankung. Zu diesen neurologischen Symptomen gehören beispielsweise Sensibilisierungsstörungen, Müdigkeit, Sehstörungen, Schwindel oder Koordinationsstörungen. Die durch den Patienten geschilderten Symptome sind bei der ärztlichen Anamnese, insbesondere zur Abgrenzung von anderen neuronalen Erkrankungen, von großer Bedeutung. Die klassische Diagnose MS basiert auf dem ausführlichen Anamnesebericht des Arztes in Verbindung mit weiteren klinischen und präklinischen Nachweisen sowie einer Objektivierung der klinisch neurologischen Ausfälle. Das zeitlich begrenzte Auftreten neurologisch auffälliger Ereignisse wird als Schub bezeichnet. Die Leitlinie zur Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose der DGN definiert den Schub wie folgt:

„Neue oder eine Reaktivierung bereits zuvor aufgetretener klinischer Ausfälle und Symptome, die subjektiv berichtet oder durch die Untersuchung objektiviert werden können und

- a. mindestens 24 Stunden anhalten,
- b. mit einem Zeitintervall von 30 Tagen zum Beginn vorausgegangener Schübe auftreten und
- c. nicht durch Änderungen der Körpertemperatur (Abgrenzung vom Uhthoff-Phänomen) oder im Rahmen von Infektionen erklärbar sind.“

Ein Schub der RRMS ist also dadurch gekennzeichnet, dass in zeitlichen Abständen akute Funktionsstörungen auftreten, die sich in der Regel innerhalb weniger Wochen wieder zurückbilden ohne eine körperliche Behinderungszunahme festzustellen. Die Sekundär progrediente (Synonym: voranschreitende) Verlaufsform der MS (SPMS) zeichnet sich dadurch aus, dass die Rückbildung der Symptome nach einem Schub immer unvollständiger verläuft und mit zunehmenden körperlichen Beeinträchtigungen einhergeht. Bei der Primär progredienten MS (PPMS) haben die Patienten im Verlauf der Erkrankung keine Schübe, sondern es ist von Anfang mit einer schleichenden Zunahme neurologischer Symptome und körperlicher Beeinträchtigungen zu rechnen. Die primären Ursachen für die Demyelinisierung der Axone des ZNS bei MS-Patienten sind bisher noch unbekannt und man geht weiterhin von einer multifaktoriellen Genese der MS aus. Das Risiko an MS zu erkranken, hängt höchstwahrscheinlich mit genetischen Faktoren und bestimmten Umwelteinflüssen zusammen (Milo und Kahana, 2010). Weiterhin wurden in zahlreichen Studien Risikofaktoren, wie virale- oder bakterielle Infektionen, Vitamin D-Mangel oder UV-Strahlung in Betracht gezogen (Milo und Kahana, 2010). Dass genetische Faktoren eine Rolle bei der Erkrankung an MS spielen können, zeigt die familiäre Häufung dieser Erkrankung. Es konnte gezeigt werden, dass bei Verwandten ersten Grades das Risiko an MS zu erkranken im Vergleich zur Normalbevölkerung um 4% erhöht war (Kahana, 2000) und dass die Konkordanzrate bei monozygoten Zwillingen bei 26% und bei dizygoten Zwillingen und Geschwistern bei 3,5% lag (Hansen et al., 2005). Derzeit geht man von einer polygenetischen Vererbung der MS aus, die verschiedene Risikogene in unterschiedlichen Populationen in Betracht zieht (Dyment et al., 2004; D'Netto et al., 2009). Die relative geringe Konkordanzrate bei monozygoten Zwillingen sowie zahlreiche Prävalenz- und Migrationsstudien zeigen, dass zusätzliche Umwelteinflüsse einen Einfluss auf die Erkrankung an MS haben. Hinsichtlich

immunologischer Ursachen konnte bisher kein spezifischer Autoantikörper als Ursache für die Erkrankung identifiziert werden, der auf eine Autoimmunerkrankung hinweisen würde. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass es sich bei der Erkrankung um eine durch Lymphozyten (T- und B-Lymphozyten) vermittelte Autoimmunerkrankung handelt (Sherman und Brophy, 2005; Trapp und Nave, 2008; Sawcer et al., 2011; Miller et al., 2015), bei der autoreaktive T-Lymphozyten die Blut-Hirn-Schranke überwinden und im ZNS nach einer erneuten T-Zellaktivierung und T-Zellproliferation eine Entzündungskaskade auslösen (Miller et al., 2015). Durch die Freisetzung zahlreicher proinflammatorischer Zytokine (IL-1, TNF- α oder IFN- γ) kommt es zur Zerstörung der Myelinschicht und der Myelin-bildenden Oligodendrozyten (Hoffmann et al., 2009). Der Auslöser dieser beschriebenen T-Zell-vermittelten Immunreaktion ist bisher jedoch nicht bekannt.

1.2.2 Therapie der Multiplen Sklerose

Aktuelle immunmodulatorische bzw. immunsuppressive Arzneimitteltherapien haben eine Verhinderung bzw. Milderung der Neuroinflammation als Ziel (Hartung und Aktas, 2011). Abbildung 1.3 zeigt eine Übersicht über den gesamten aktuellen Stand in der Therapie der Multiplen Sklerose. Änderungen der Therapien und Dosisanpassungen sind jeweils abhängig vom sich laufend verändernden Krankheitsstadium der an Multiple Sklerose erkrankten Patienten. Grundsätzlich basiert die Therapie auf drei Therapieformen:

- Die Therapie des akuten Schubs
- Die langfristige verlaufsmodifizierende Therapie
- Die Therapie der Symptome

Wie Abbildung 1.3 zeigt, basiert die akute Schubtherapie auf der Behandlung mit Glukokortikosteroiden wie Methylprednisolon als Therapie der ersten Wahl (Kortison-Stoß-Therapie). Das verabreichte Glukokortikoid hat die Funktion überschießende Immunreaktionen und Entzündungsvorgänge einzudämmen. Ziel dieser Therapie ist es aggressive Immunzellen im ZNS zu stoppen und somit eine weitere Zerstörung der Myelinschicht der Nervenzellen zu stoppen. Als zweite Wahl gilt die Plasmaseparation im Falle einer fortdauernden Symptompersistenz nach der Behandlung mit ultrahochdosierten Glukokortikosteroiden. Durch die Plasmapherese wird Blutplasma (nicht-zellulärer Anteil des Blutes) vom zellulären Anteil des Blutes getrennt. Durch die Entfernung des Blutplasmas und

den Ersatz durch ein Plasmaersatzmittel werden die autoimmunen Antikörper entfernt, die Auslöser für den akuten Schub sind.

Indikation	CIS ¹	RRMS ¹			SPMS ¹	
Verlaufsmodifizierende Therapie	(Hoch-) aktive Verlaufsform		1. Wahl - Alemtuzumab - Fingolimod - Natalizumab	2. Wahl - Mitoxantron (- Cyclophosphamid) ⁴	3. Wahl - Experimentelle Verfahren	mit aufgesetzten Schüben ohne aufgesetzte Schübe
	Milde/moderate Verlaufsform ²	- Glatirameracetat - Interferon-β 1a im - Interferon-β 1a sc - Interferon-β 1b sc	- Dimethylfumarat - Glatirameracetat - Interferon-β 1a im - Interferon-β 1a sc - Interferon-β 1b sc - Teriflunomid (- Azathioprin) ³ (- IVIg) ⁴			- Interferon-β 1a sc - Interferon-β 1b sc - Mitoxantron (- Cyclophosphamid) ³
Schubtherapie	2. Wahl - Plasmaseparation					
	1. Wahl - Methylprednisolonpuls					

Bei Versagen einer verlaufsmodifizierenden Therapie bei milder/moderater Verlaufsform einer MS werden diese Patienten wie eine aktive MS behandelt.
 1 Substanzen in alphabetischer Reihenfolge, die hier gewählte Darstellung impliziert KEINE Überlegenheit einer Substanz gegenüber einer anderen innerhalb einer Indikationsgruppe (dargestellt innerhalb eines Kastens)
 2 Bei Versagen einer verlaufsmodifizierenden Therapie bei milder/moderater Verlaufsform einer MS werden diese Patienten wie eine aktive MS behandelt.
 3 zugelassen wenn Interferon-β nicht möglich oder unter Azathioprin-Therapie stabiler Verlauf erreicht
 4 Einsatz nur postpartal im Einzelfall gerechtfertigt, insbesondere vor dem Hintergrund fehlender Behandlungsalternativen
 5 zugelassen für bedrohlich verlaufende Autoimmunerkrankungen, somit lediglich nur für fulminante Fälle als Ausweichtherapie vorzusehen, idealerweise nur an ausgewiesenen MS-Zentren

Abbildung 1.3: Stufentherapieschema der Multiplen Sklerose (Hans-Christoph Diener, 2014).

Im Vergleich zur akuten Schubtherapie konzentriert sich die verlaufsmodifizierende Immuntherapie auf eine langfristige und vorbeugende Behandlung mit dem Ziel, die Schwere und Häufigkeit von Schüben zu reduzieren. Zur verlaufsmodifizierenden Therapie der MS werden unterschiedliche Immunmodulatoren sowie Immunsuppressiva eingesetzt. Wie Abbildung 1.3 zeigt, ist der Immunmodulator mit dem Wirkstoff Glatirameracetat (Copaxone®) für die Behandlung von MS-Patienten mit einem klinischen isolierten Syndrom (CIS) und für MS-Patienten mit einer milden/moderaten schubförmigen MS (RRMS) zugelassen. Bei dem Wirkstoff Glatirameracetat handelt es sich um ein synthetisches Eiweißmolekül, welches modulierend ins Immunsystem von MS-Patienten eingreift, T-Lymphozyten blockiert und somit das Myelin schützt. Der genaue Wirkmechanismus ist bisher aber noch nicht vollständig geklärt. Weitere immunmodulatorische Wirkstoffe zur Therapie des klinisch isolierten Syndroms und für Patienten mit einer milden/moderaten schubförmigen MS (RRMS) sind die Beta-Interferon 1a (Avonex®) und Interferon 1b (Betaferon®). Neben den Beta-Interferonen wird bei der milden/moderaten schubförmigen MS (RRMS) die immunmodulierende Substanz Dimethylfumarat (Tecfidera®) und die immunsuppressive Substanz Teriflunomid (Aubagio®) angewendet. Auch wenn der Wirkmechanismus für Teriflunomid noch nicht vollständig verstanden ist, soll Teriflunomid

die Aktivierung und Zellteilung von T- und B-Zellen unterdrücken und somit die Entzündungsreaktionen reduzieren. Zur Therapie der (Hoch-) aktiven Verlaufsform der schubförmigen MS (RRMS) werden die Wirkstoffe Alemtuzumab (Lemtrada[®]), Fingolimod (Gilenya[®]) sowie Natalizumab (Tysabri[®]) als Wirkstoffe der ersten Wahl angewendet. Bei den Wirkstoffen Alemtuzumab und Natalizumab handelt es sich um humanisierte gentechnologisch hergestellte monoklonale Antikörper. Der Antikörper Natalizumab verhindert das T-Lymphozyten die Blut-Hirn-Schranke überwinden, wohingegen der Antikörper Alemtuzumab eine zytotoxische Funktion besitzt. Alemtuzumab bindet an das CD52-Glykoprotein an der Zelloberfläche der B- und T- Zellen und führt somit zu einer Auflösung der Zellen. Fingolimod bindet an den S1P-Rezeptor (Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor) der Lymphozyten und verhindert somit, dass diese die Lymphknoten verlassen und ins ZNS wandern können, wo sie die Myelinscheide zerstören würden. Die dritte Therapieform in der Behandlung der Multiplen Sklerose ist die Therapie der Symptome. Die umgangssprachliche Bezeichnung der Multiplen Sklerose als „Krankheit der 1000 Gesichter“ begründet sich in der Vielzahl der Begleitbeschwerden. Zu erwähnen sind in diesem Zusammenhang u.a. Schmerzen, Darmstörungen, Blasenstörungen, Fatigue, Depressionen, Ataxie, Tremor, Sehstörungen, Sprechstörungen, Schluckstörungen sowie Epileptische Anfälle. Die Therapie erfolgt je nach Symptom zielgerichtet mit unterschiedlichen Arzneimitteln und alternativen Therapien wie Entspannungsverfahren oder Rehabilitationsverfahren.

Aufgrund der Tatsache, dass eine Erkrankung an Multipler Sklerose weiterhin nicht heilbar ist und alle Therapiestandards und alternativen Therapieversuche nur ein Fortschreiten der Erkrankung verlangsamen, ist eine intensive Grundlagenforschung auf diesem Gebiet unerlässlich. Als relativ neues Forschungsmodell hat sich der Zebrabärbling auf dem Gebiet der Grundlagenforschung etabliert, um die komplexen Mechanismen der Myelinisierung, Remyelinisierung und Demyelinisierung zu verstehen.

1.3 Zebrabärbling (*Danio rerio*)

Der Zebrabärbling (*Danio rerio*), auch als Zebrafisch bezeichnet, ist ein kleiner karpfenartiger Süßwasserfisch (Cyprinidae), der in Deutschland insbesondere durch die private Aquarienhaltung in Warmwasserbecken (22-28°C) populär geworden ist. Zebrafische gehören zur Teilklasse der Echten Knochenfische (Teleostei), einer Unterklasse der Strahlenflosser

(Actinopterygii), und somit zur Reihe der Knochenfische (Osteichthyes). Zebrafische sind Schwarmfische und erreichen ihre Geschlechtsreife nach drei bis vier Monaten. Die Körperlängen der adulten Zebrafische betragen 2 bis 4 cm. Die Haut der Fische hat ein charakteristisches blau-weißes Streifenmuster und die wichtigsten Unterscheidungsmerkmale zwischen den Geschlechtern sind die unterschiedlichen Formen sowie der dunklere bzw. goldenere Glanz der Schuppen bei den männlichen Tieren (Abbildung 1.4).

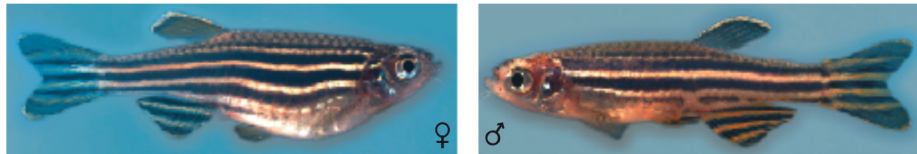


Abbildung 1.4: Weiblicher (links) und männlicher Zebrafisch (rechts). Bilder modifiziert nach Go Fish! (2009).

Das Ursprungsgebiet seiner Verbreitung liegt insbesondere in Indien, wo der Zebrafisch langsam fließende Flüsse, wie den Ganges, und auch Seen besiedelt. Der Zebrafisch ist ein Allesfresser. Im Gegensatz zu vielen anderen sich *ex utero* entwickelnden Modellorganismen in der Forschung, lässt sich die Entwicklung des Zebrafisches in den ersten Stunden und Tagen nach der Befruchtung der Eizelle besonders gut beobachten (Abbildung 1.5). Der Grund dafür ist die nahezu vollständige Transparenz des Fisches bis ca. 6 Tage nach der Befruchtung der Eizelle die natürliche Pigmentierung der Haut beginnt, sowie die sehr schnell voranschreitende Embryogenese des Fisches (Abbildung 1.5). Bereits 24 h nach der Befruchtung der Eizelle sind nahezu alle Organe vollständig ausgebildet. Der Zebrafisch ist somit ein geeignetes Tiermodell, um gentechnische Manipulationen im lebenden Tier in einer sehr frühen Entwicklungsphase nach der Befruchtung der Eizelle visuell zu beobachten. Unter optimalen Haltungsbedingungen sind weibliche Zebrafische (Rogner) in der Lage bis zu 300 Eier/pro Woche zu entwickeln, die außerhalb der Weibchen von den männlichen Zebrafischen (Milchner) besamt werden. Die Möglichkeiten das Genom des Zebrafisches zu modifizieren sind im Vergleich zur Manipulation des Genoms der Maus einfacher und weniger kostenintensiv. Auch die Herstellung transgener Zebrafische, die Fluoreszenzproteine exprimieren, macht den Zebrafisch zu einem beliebten Forschungsmodell für *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen (Bowman und Zon, 2010; Meijer und Spink, 2011). Des Weiteren bietet der Zebrafisch die Möglichkeit spezifische RNAs zur Überexpression bestimmter Gene bzw. Morpholinos zur Herunterregulierung bestimmter Gene in Fischeier zu injizieren und

deren Einflüsse anschließend beispielsweise auf molekularer oder visueller (makroskopisch oder mikroskopisch) Ebene zu untersuchen (Schulte-Merker und Stainier, 2014).

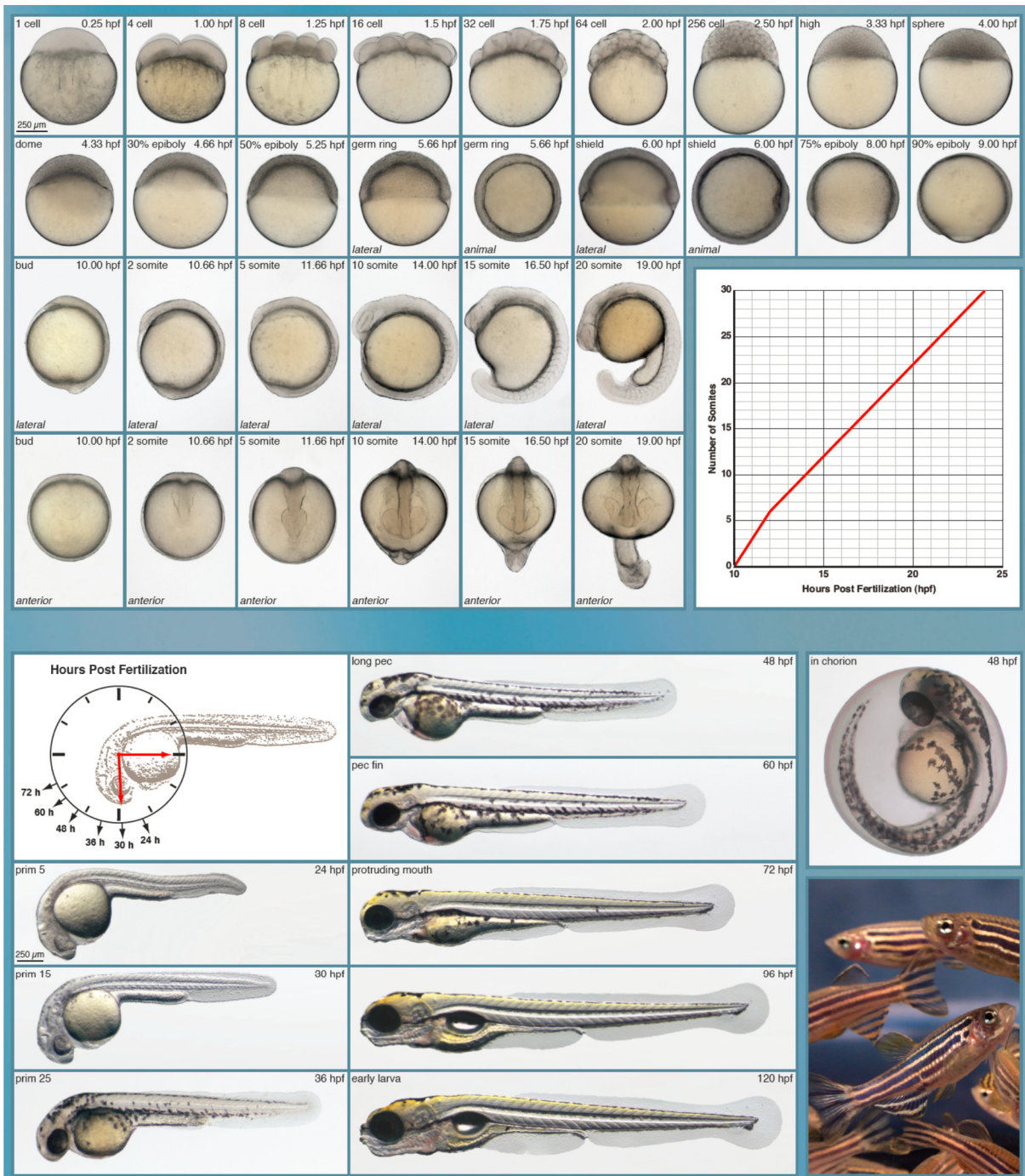


Abbildung 1.5: Entwicklungsstufen im Zebrafisch. In der oberen Hälfte der Abbildung ist von links nach rechts und von oben nach unten die Zellteilung zu beobachten beginnend mit dem 1-Zellstadium (1 cell) 15 min (0.25 hpf) nach der Befruchtung der Eizelle. Die untere Hälfte der Abbildung zeigt die Entwicklung des Zebrafisches von 24 bis 120 Stunden nach der Befruchtung der Eizelle. Bildquelle modifiziert nach Go Fish! (2009).

Neuere molekularbiologische Methoden wie die TALEN-Technik (transcription activator-like effector nuclease) und das CRISPR/Cas-System bieten im Zebrafisch weitere Möglichkeiten im Bereich der reversen Genetik (Gaj et al., 2013). Beide genannten Methoden ermöglichen punktuelle Veränderungen der DNA (Genome Editing). Auch die Applikation von Substanzen über das Fischwasser ist eine geeignete und etablierte Methode, um pharmakologische Einflüsse im Zebrafisch zu analysieren (Rennekamp und Peterson, 2015).

1.3.1 Zebrafischgenom

Im Jahr 2001 startete das gemeinnützige Institut „Wellcome Trust Sanger Institute“ ein internationales Projekt zur Sequenzierung des Zebrafischgenoms und veröffentlichte im Juli 2010 die neunte Version des Zebrafischgenoms „Zv9“ (GenBank assembly accession: GCA_000002035.2). Das Forschungskonsortium „Genome Reference Consortium, GRC“ veröffentlichte im September 2014 das Nachfolge-Zebrafischgenom „GRCz10“ (GenBank assembly accession: GCA_000002035.3). Das Forschungskonsortium „GRC“ ist ein internationaler Zusammenschluss mehrerer Forschungseinrichtungen. Das gesamte Zebrafischgenom ist sequenziert und es wird das Vorhandensein von mindestens 26.000 proteinkodierenden Genen ausgegangen (Collins et al., 2012). Vergleiche zum humanen Referenzgenom haben gezeigt, dass ungefähr 70% der menschlichen Gene mindestens ein offensichtliches Zebrafisch-Ortholog aufweisen (Howe et al., 2013). Evolutionsbedingt hat im Zebrafisch in einigen Fällen eine Genomduplizierung stattgefunden (Abbildung 1.6). Aus diesem Grund sind teilweise zwei Orthologe vorzufinden, die sich aber in ihrer Homologie unterscheiden können (Meyer und Schartl, 1999; Postlethwait et al., 1999).

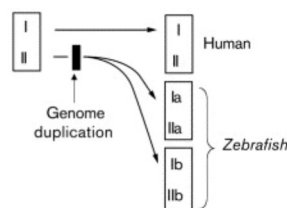


Abbildung 1.6: Genomduplizierung im Zebrafisch. Die linke Box zeigt die Genreihenfolge von zwei Genen (I und II) auf einem Chromosom. Der schwarze Kasten stellt die Duplizierung des gesamten Genoms dar, die zu einer initialen Verdoppelung der Anzahl von Chromosomen nach der Duplizierung des gesamten Genoms führt. Abbildung und Bildtext modifiziert nach Meyer und Schartl (1999).

1.3.2 Myelinisierung im Zebrafisch

Der Zebrafisch weist - wie viele andere Spezies - im Vergleich zum Menschen zahlreiche Homologien bei Genen auf, die mit der Myelinisierung assoziiert werden. Dass die grundlegende Struktur des Myelins des Zebrafisches der Myelinstruktur von Säugetieren sehr ähnlich ist, zeigten Avila et al. (2007). Das ist nicht verwunderlich, da bis auf die kieferlosen Fische alle Vertebraten Myelin bildende Oligodendrozyten besitzen (Kettenmann und Verkhratsky, 2011). Auch im Zebrafisch sind die Gliazellen für die Myelinisierung der Axone verantwortlich (Brösamle und Halpern, 2002). Brösamle und Halpern (2002) konnten drei Zebrafisch-cDNAs charakterisieren, dessen Sequenzen eine hohe Ähnlichkeit zu den Myelin-spezifischen Genen MBP, P0 und PLP anderer Vertebraten aufwiesen. Weitere Untersuchungen zur Myelinisierung im Zebrafisch zeigten, dass auch die Transkriptionsfaktoren *Olig1*, *Olig2*, *Sox10* sowie *Nkx2.2* im Zebrafisch auf eine ähnliche Weise wie beim Menschen die Oligodendrogenese beeinflussen (Monk & Talbot, 2009). Abbildung 1.7 zeigt zur Übersicht die Expression einiger wichtiger Gene im Verlauf der Entwicklung von Oligodendrozyten und Schwann-Zellen im Zebrafisch. Abbildung 1.7A skizziert den Verlauf der Oligodendrozyten-Entwicklung im zentralen Nervensystem beginnend mit der Entstehung von neuralen Progenitorzellen (neural precursors) im ventralen Bereich des Neuralrohrs bis hin zum reifen myelinisierenden Oligodendrozyten (myelinating OLs). Während der Transkriptionsfaktor *olig2* dauerhaft exprimiert wird, wird der Transkriptionsfaktor *sox10* erst ab der Entwicklungsstufe der Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (OL precursor cells, OPC) und der Transkriptionsfaktor *nkx2.2* erst in Pre-myelinisierenden Oligodendrozyten (premyelinating oligodendrocytes) exprimiert. Im peripheren Nervensystem beginnt die Entwicklung von Schwann-Zellen mit der Bildung von Zellen der Neuralleiste (neural crest cells) aus der Dachplatte (roof plate) des Neuralrohrs (neural tube). Anschließend migrieren diese Zellen in die Peripherie entlang wachsender Axone und entwickeln sich zu Vorläuferzellen der Schwann-Zellen (SC precursors). Wie Abbildung 1.7B zeigt, wird der Transkriptionsfaktor *sox10* während der gesamten Entwicklung der Schwann-Zellen exprimiert. Die Wachstumsfaktoren *erbb2* und *erbb3b* werden hingegen in Vorläuferzellen der Schwann-Zellen (SC precursors, SCPs) exprimiert. Im ZNS sowie im PNS von Zebrafischen wird das Myelinprotein Mbp ausschließlich von reifen myelinisierenden Oligodendrozyten und myelinisierenden Schwann-Zellen gebildet (Abbildung 1.7A und B).

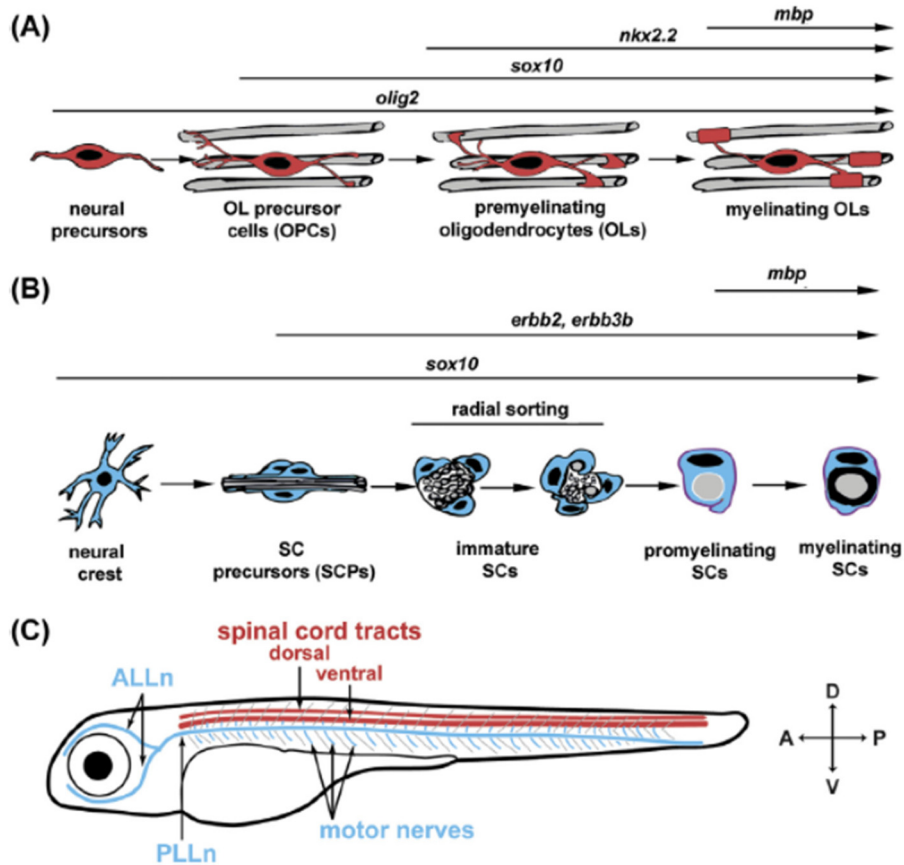


Abbildung 1.7: Myelinisierende Gliazellen im Zebrafisch. (A) Entwicklung der Oligodendrozyten (B) Entwicklung der Schwann-Zellen (C) Übersichtsbild eines 3-5 Tage alten Zebrafischembryos. Das zentrale Nervensystem ist in Rot markiert und das periphere Nervensystem ist Blau dargestellt. (Bildquelle: D'Rozario (2017))

Weitere Untersuchungen zur molekularen Evolution des basischen Myelinproteins (Myelin Basic Protein, MBP) im Zebrafisch bestätigten das Vorhandensein von zwei paralogenen *mbp*-Genen im Zebrafisch, dem *mbpa*-Gen und dem *mbpb*-Gen (Nawaz et al., 2013). Nawaz et al. (2013) detektierten in reifen Oligodendrozyten des ZNS und in Schwann-Zellen des PNS sowohl die Expression der *mbpa*- und *mbpb*-mRNA als auch die Expression der Proteine Mbp_a und Mbp_b, die über das Phospholipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) mit der Plasmamembran verknüpft sind. Das Gen *mpz* kodiert im Zebrafisch für das Myelinprotein 0 (P0, Englisch: Myelin Protein zero, MPZ) und wird im Zebrafisch sowohl im ZNS als auch im PNS exprimiert, wohingegen das im Säugetier vorkommende homologe Protein P0 ausschließlich im PNS exprimiert wird (Bai et al., 2011). Weitere Myelinproteine bzw. Myelin-assoziierte Proteine im Zebrafisch sind Claudin k (Münzel et al., 2012), Zwilling A und Zwilling B (Schaefer und Brösamle, 2009) sowie 36K/FLJ13639 (Morris et al., 2004).

Bei Claudin k handelt es sich um ein Fisch-spezifisches Protein, welches ausschließlich in myelinisierenden Schwann-Zellen und myelinisierenden Oligodendrozyten exprimiert wird. Claudine wie Claudin k sind ein wesentlicher Bestandteil von Schlussleisten (Tight junctions). Das Protein Claudin k und die Proteine Zwilling A und Zwilling B konnten als Bestandteil des Myelins bisher ausschließlich im Evolutionszweig der Echten Knochenfische nachgewiesen werden (Schaefer und Brösamle, 2009; Münzel et al., 2012). Gleiches gilt für das Protein 36K. Im Evolutionszweig der Echten Knochenfische ist das Protein 36K am häufigsten vorkommende Myelinprotein (Oppermann et al., 2003). Trotz der Tatsache, dass die mRNA des humanen homologen Gens von 36K (FLJ13639) im menschlichen Gehirn nachgewiesen werden konnte, fehlt 36K (FLJ13639) als Proteinbestandteil des Myelins in Säugetieren (Morris et al., 2004). Ein weiterer wichtiger Regulator der Entwicklung von Schwann-Zellen im Zebrafisch ist *gpr126/adgrg6*, ein G-Protein-gekoppelte Rezeptor der Adhäsions-Klasse (aGPCR) (Monk et al., 2009; Glenn und Talbot, 2013). Forschungsarbeiten von Petersen et al. (2015) zeigen, dass Gpr126 für die Myelinisierung von Schwann-Zellen benötigt wird. Die Mehrheit der aGPCRs wird auto-proteolytisch innerhalb der GPCR Proteolysestelle (GAIN-Domäne) gespalten, die auf der Extrazellulärseite der Membran jedes aGPCR lokalisiert ist (Liebscher et al., 2014; Petersen et al., 2015). Die Spaltung führt zu einem N-terminalen Fragment (NTF) und einem C-terminalen Fragment (CTF) (Liebscher et al., 2014). Für Gpr126 konnte festgestellt werden, dass der dominante N-Terminus (NTF, N-terminal fragment) von Gpr126 (Gpr126-NTF) unabhängig vom C-terminalen Ende (CTF, C-terminal fragment) von Gpr126 (Gpr126-CTF) den Prozess des „Radial Sortings“ fördert (Petersen et al., 2015). Gpr126-CTF fördert hingegen die Myelinisierung durch eine cAMP-Erhöhung bzw. terminale Differenzierung (Petersen et al., 2015). Ein weiterer G-Protein-gekoppelte Rezeptor der Adhäsions-Klasse (aGPCR), der mit der Myelinisierung im Zebrafisch in Verbindung gebracht wird, ist Gpr56 (Ackerman et al., 2015; Giera et al., 2015). Ackerman et al. (2015) zeigten, dass Gpr56 zu einem sehr frühen Stadium der Oligodendrozytenentwicklung exprimiert wird und die Anzahl reifer myelinisierender Oligodendrozyten in Gpr56-Zebrafischmutanten (Knockout) signifikant reduziert war. Zusammenfassend haben beide G-Protein-gekoppelte Rezeptoren einen kritischen Einfluss auf die Myelinisierung im Zebrafisch. Tabelle 1.3 zeigt eine aktuelle Übersicht transgener Zebrafischlinien die das Myelin betreffen.

Tabelle 1.3: Übersicht transgener Zebrafischlinien nach D'Rozario et al., 2017.

Gen	Transgener Zelltyp	Transgene Zelllinie	Referenz
<i>cldnk</i>	Myelinisierende Oligodendrozyten und Schwann Zellen	<i>Tg(cldnk:Gal4)^{ue101Tg}</i>	(Münzel et al., 2012)
<i>foxd3</i>	Unreife Schwann Zellen bis myelinisierende Schwann Zellen	<i>Tg(zFoxd3GFP)</i>	(Gilmour et al., 2002)
<i>nkx2.2a</i>	Ein Teil von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen und früh myelinisierenden Oligodendrozyten	<i>Tg(nkx2.2a:mEGFP)^{vu16Tg}</i>	(Kirby et al., 2006)
<i>mbp</i>	Myelinisierende Oligodendrozyten und myelinisierende Schwann Zellen	<i>Tg(mbp:EGFP)^{ck1Tg}</i> <i>Tg(mbp:EGFP)^{ue1Tg}</i> <i>Tg(mbp:EGFP-CAAX)^{ue2Tg}</i> <i>Tg(mbp:GAL4-VP16)^{co20Tg}</i>	(Jung et al., 2010) (Almeida et al., 2011) (Almeida et al., 2011) (Hines et al., 2015)
<i>mpz/p0</i>	Myelinisierende Oligodendrozyten	<i>Tg(mpz[10kb]:EGFP)^{pt408Tg}</i>	(Bai et al., 2014)
<i>olig1</i>	Gesamte Oligodendrozyten-Entwicklung	<i>Tg(olig1:mEGFP)^{nv150Tg}</i>	(Schebesta und Serluca, 2009)
<i>olig2</i>	Neurale Progenitorzellen, gesamte Oligodendrozyten-Entwicklung, Motoneurone	<i>Tg(olig2:EGFP)^{vu12Tg}</i> <i>Tg(olig2:dsRed)^{vu19Tg}</i> <i>Tg(olig2:Kaeda)^{vu85Tg}</i>	(Shin et al., 2003) (Kucenas et al., 2008b) (Zannino und Appel, 2009)
<i>plp</i>	Gesamte Oligodendrozyten-Entwicklung	<i>Tg(Mmu.Plp1:EGFP)^{cc1Tg}</i>	(Yoshida und Macklin, 2005)
<i>sox10</i>	Gesamte Oligodendrozyten-Entwicklung, Neuralleiste, Interneurone, Schwann Zellen	<i>Tg(sox10:mRFP)^{vu234Tg}</i> <i>Tg(sox10:EGFP)^{ba4Tg}</i> <i>Tg(sox10:nls-Eos)^{w18Tg}</i> <i>Tg(sox10:Gal4-VP16)^{co19Tg}</i> <i>Tg(sox10:KaTA4GI)</i>	(Kirby et al., 2006) (Dutton et al., 2001) (Prendergast et al., 2012) (Das und Crump, 2012) (Almeida und Lyons, 2015)

1.3.3 Demyelinisierung und Remyelinisierung im Zebrafisch

Eine Eigenschaft, die den Zebrafisch als Forschungsmodell sehr interessant macht, ist seine Fähigkeit zur vollständigen Regeneration nach Verletzungen des zentralen Nervensystems oder einzelner Gewebe wie z.B. dem Herz oder Teilen der Schwimmblossen (Goldshmit et al., 2012; Shi et al., 2015). Der Zebrafisch verfügt über die Fähigkeit im Larvenstadium und auch

im Erwachsenenalter Schäden im ZNS und PNS nahezu vollständig zu regenerieren (Vajn et al., 2013). In Säugetieren, wie beispielsweise den Menschen, ist die Regeneration von geschädigten oder durchtrennten Leitungsbahnen im ZNS und PNS nur eingeschränkt bis gar nicht möglich. Die damit verbundenen Funktionsverluste bleiben beim Menschen in der Regel irreversibel. Die Ursachen dafür sind weitestgehend unklar. Vergleichende Untersuchungen in geschädigten Bereichen des ZNS von Menschen und Zebrafischen haben gezeigt, dass hier ähnliche Ansammlungen von Gliazellen, insbesondere von Astrozyten, vorzufinden sind (Goldshmit et al., 2012). Goldshmit et al. (2012) konnten jedoch zeigen, dass die Gliazellen des Zebrafisches – im Vergleich zu den Gliazellen des Menschen - in der Lage waren, verschiedene Morphologien von sternförmig bis bipolar einzunehmen, um somit eine Regeneration durchtrennter Axone zu initiieren. Diese Funktion war im menschlichen Gewebe von MS-Patienten hingegen nicht zu beobachten (Franklin und French-Constant, 2008). Im Gegensatz zu einigen etablierten MS-Mausmodellen (z.B. EAE-Modell, experimental autoimmune encephalomyelitis model) ist die Anzahl an MS-Zebrafischmodellen, die eine MS-Erkrankung nachahmen, sehr gering. Im Zebrafisch hat sich gezeigt, dass sich für eine initiierte Demyelinisierung die Substanzen Metronidazol oder Lysophosphatidylcholin (LPC) bewährt haben (Chung et al., 2013; Münzel et al., 2014). Letztendlich sollten zukünftig weitere Zebrafischmodelle zur Demyelinisierung und Remyelinisierung entwickelt werden, um weitere Rückschlüsse auf die Erkrankung im Menschen ziehen zu können und folglich neue Therapieansätze zur Heilung zahlreicher neurodegenerativer Erkrankungen entwickeln zu können.

1.4 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

1.4.1 GPR17

GPR17 ist nach der humanen Gennomenklatur „HUGO Gene Nomenclature Committee“ (HGNC) die offizielle Abkürzung für „G protein-coupled receptor 17“. Das Gen hat die Gen-Identifizierungsnummer (Gen ID, NCBI) 2840. Weitere in der Literatur vorkommende Bezeichnungen lauten „R12“, „P2Y-like receptor“, „UDP/CysLT receptor“ und „uracil nucleotide/cysteinyl leukotriene receptor“. Die Bezeichnung „R12“ stammt dabei aus den ersten Untersuchungen von Raport et al. (1996). Im Genombrowser „Ensembl“ (<http://www.ensembl.org>) trägt das Gen GPR17 die Gennummer „ENSG00000144230“ und weist insgesamt 6 Transkripte auf. Die Transkripte GPR17-201, GPR17-001 sowie

GPR17-003 werden zu dem gleichen Protein translatiert und sind daher im Rahmen des gemeinsamen Konsensusprojektes (CCDS Database) unter der CCDS-Identifizierungsnummer 2148.1 charakterisiert. Bläsius et al. (1998) identifizierten in ihren Forschungsarbeiten ein Transkript mit zwei Startkodons, die mit einem gemeinsamen Stoppkodon endeten. Die längere Proteinform wurde als „fb1“ (Protein mit 367 Aminosäuren) und die kürzere Proteinform als „hip4“ (Protein mit 339 Aminosäuren) bezeichnet (Bläsius et al., 1998). Ciana et al. (2006) zeigten, dass die kurze Form von GPR17 durch endogen vorhandene Nukleotide und Cysteinyl-Leukotriene aktiviert wird. Verschiedene Arbeitsgruppen lokalisierten in den darauffolgenden Jahren die Expression von GPR17 in Neuronen und Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (Lecca et al., 2008; Chen et al., 2009; Fumagalli et al., 2011; Mitew et al., 2013; Ren et al., 2015). Um den Einfluss von GPR17 in der Oligodendrozyten-Differenzierung besser zu verstehen, zeigten Lecca et al. (2008), dass *in vitro* Pre-Oligodendrozyten die GPR17 exprimierten, nach der Exposition von Nukleotiden und Cysteinyl-Leukotriene mehr Mbp (Myelin-Basische Protein) bildeten. Daraus schlussfolgerte die Arbeitsgruppe, dass GPR17 die Differenzierung von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen zu myelinisierenden Oligodendrozyten aktivieren musste. Im Gegensatz dazu konnten andere Studien zeigen, dass GPR17 einen negativ regulierenden Einfluss auf die Myelinisierung haben soll (Chen et al., 2009; Hennen et al., 2013; Simon et al., 2016). So verhinderte die Überexpression von GPR17 in Mäusen *in vivo* und *in vitro* die Differenzierung und Reifung von Oligodendrozyten wohingegen der Knockout von *Gpr17* im Mäusen einen frühzeitigen Beginn der Myelinisierung zeigte (Chen et al., 2009). Verknüpft mit der Überexpression von GPR17 und der damit verbundenen Blockade der Differenzierung war eine Hochregulation und nukleäre Translokation von Differenzierungsinhibitoren wie ID2/ID4 (DNA-binding protein inhibitor ID-2/ID4), die einen negativ regulierenden Einfluss auf die Funktion von *Olig1* hatten (Chen et al., 2009). Der basische Helix-Schleifen-Helix (bHLH) Transkriptionsfaktor *Olig1* ist für die Reifung von Oligodendrozyten von wichtiger Bedeutung (Chen et al., 2009). Einen negativ regulierenden Einfluss von GPR17 auf die Myelinisierung konnten auch Hennen et al. (2013) nachweisen, die den Agonisten MDL29,951 (2-carboxy-4,6-dichloro-1H-indole-3-propionic acid) identifizierten, der *in vitro* spezifisch GPR17 aktivierte. In primären Oligodendrozyten aus Ratten konnten Sie in der Zellkultur nachweisen, dass die Aktivierung von GPR17 durch den Agonisten die Reifung von Oligodendrozyten verminderte (Hennen et al., 2013). Ergänzend zu den Ergebnissen von Chen et al. (2009) konnten Hennen et al. (2013) auch auf pharmakologischer Ebene einen

negativ regulierenden Einfluss von GPR17 auf die Reifung und Myelinisierung von Oligodendrozyten nachweisen.

1.4.2 Signalwege von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

Rezeptoren sind Makromoleküle, die membranständig oder intrazellulär lokalisiert sind und durch eine spezifische Bindung von beispielsweise Hormonen oder Pharmaka eine spezifische Wirkung ausüben. Man unterscheidet grundsätzlich zwischen ionotropen Rezeptoren und metabotropen Rezeptoren. Ionotrope Rezeptoren sind ligandengesteuerte Ionenkanäle, bei denen die Signaltransduktion nach der Bindung eines Liganden an der extrazellulären Domäne über den Einstrom von Ionen erfolgt. Der Acetylcholin-Rezeptor ist ein Beispiel für einen solchen ionotropen Rezeptor. Metabotrope Rezeptoren sind hingegen Rezeptoren, bei denen die Signaltransduktion über einen sogenannte „Second Messenger“ erfolgt. Bei einem „Second Messenger“ handelt es sich um ein Molekül, das nach der Bindung eines Liganden an einen membranständigen oder intrazellulären Rezeptor gebildet wird und durch die Aktivierung einer intrazellulären Signalkaskade extrazelluläre Signale weiterleitet oder verstärkt. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (englisch: G protein-coupled receptor, *GPCRs*) gehören zu den metabotropen Rezeptoren und sind membranständig (Schrage et al., 2015). *GPCRs* werden auch als 7-Transmembranrezeptoren (*7-TMR*) bezeichnet, da ihre Polypeptidkette 7 Mal die Membran durchzieht. 7-Transmembranrezeptoren besitzen einen extrazellulären N-Terminus, einen intrazellulären C-Terminus sowie drei extrazelluläre- (*ECL1-ECL3*) und drei intrazelluläre-Loops (*ICL1-ICL3*) (Venkatakrisnan et al., 2013). Rezeptoren aus der Familie der *GPCRs* regulieren zahlreiche Signalwege in Zellen und sind aus pharmakologischer Sicht von großer Bedeutung. Hormone und Neurotransmitter, wie z.B. Adrenalin, Dopamin und Serotonin, sowie die Pharmaka aus der Gruppe der Betablocker und Antihistaminika agieren als Liganden (Agonisten, Antagonisten oder inverser Antagonisten) von *GPCRs*. Fredriksson et. al (2003) identifizierten über 800 verschiedene Gensequenzen im humanen Genom, die für unterschiedliche *GPCRs* kodieren. Agonisten vermitteln über die Bindung an den Rezeptor eine stabilisierende Konformation, die im Zellinneren das G-Protein aktiviert. Partielle Agonisten binden an den Rezeptor, vermitteln jedoch nicht die maximale Rezeptorantwort wie reine Agonisten. Antagonisten blockieren die Bindungsstelle auf dem Rezeptor, sodass Agonisten nicht mehr binden können. Im Vergleich dazu binden inverse Agonisten an den Rezeptor und stabilisieren seine inaktive Form. Der an den Rezeptor bindende Ligand passiert als solches nicht die Membran. Die Signalweiterleitung im

aktivierten Zustand des GPCRs erfolgt im inneren der Zelle über an den Rezeptor gekoppelte stimulierende oder inhibitorische heterotrimere Guaninnukleotid-bindende Proteine (GTP-bindende Proteine, G-Proteine), die diesen Rezeptoren ihren Namen verliehen. Nach der Aktivierung des G-Proteins kann dieses in unterschiedliche Untereinheiten dissoziieren ($G\alpha$, $G\beta$, $G\gamma$). Die $G\alpha$ -Untereinheiten moduliert eine Reihe von „Second messenger“, wie z.B. Adenosin-3-5-monophosphat (cAMP) oder Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP3) und besteht wiederum aus verschiedenen Untereinheiten ($G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q/11$, $G\alpha_{12/13}$).

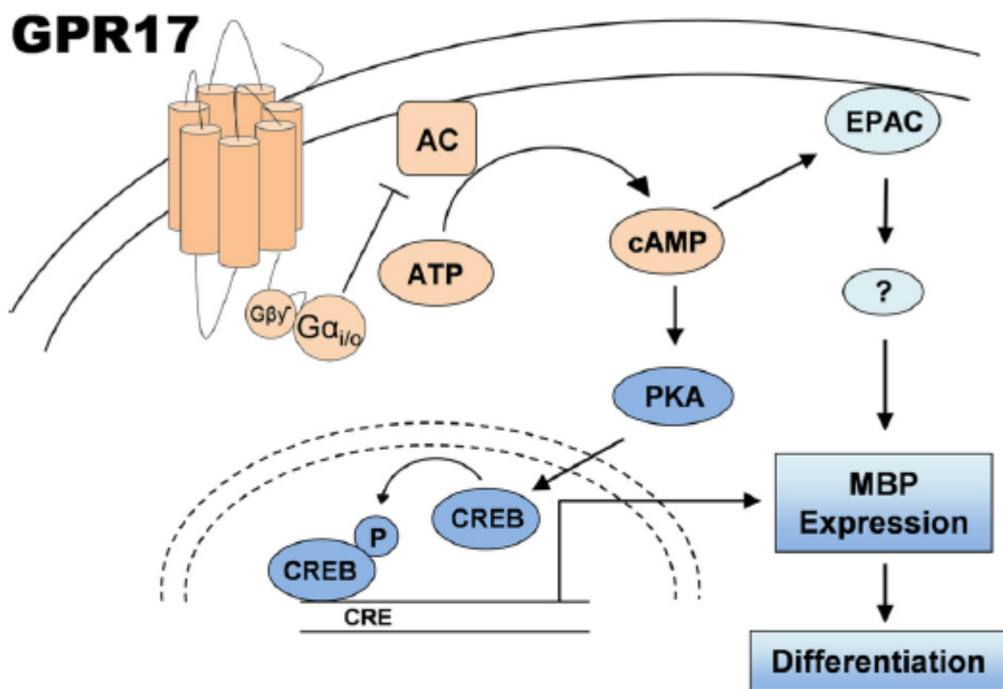


Abbildung 1.8: Schema zur möglichen Funktionsweise von GPR17. Die Stimulation von GPR17 führt zur Aktivierung der $G\alpha_i/o$ -Signalkaskade und vermindert die intrazelluläre cAMP-Konzentration durch Hemmung der Adenylatzyklase (AC). Verminderte Konzentrationen des Second messengers cAMP führen im Oligodendrozyten zu einer geringeren Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) und damit verbunden zu einer verminderten Phosphorylierung von CREB (CREB-Bindeprotein), einem Co-Aktivator der Transkription. Dies führt wiederum zu einer negativen Beeinflussung der Transkription von Genen, die in die Myelinisierung bzw. in die Reifung von Oligodendrozyten involviert sind (z.B. MBP). Gleichwohl führen verminderte cAMP-Konzentrationen zu einer verringerten Aktivierung von EPAC (Exchange Protein Directly Activated by cAMP), wodurch es ebenfalls zu einer Hemmung der Differenzierung von Oligodendrozyten kommen kann. Abbildung und Beschriftung modifiziert nach Simon et al. (2016)

Der Zusatz „s“ bei der $G\alpha$ -Untereinheit bezieht sich auf einen stimulierenden Effekt der Adenylatzyklase und damit auf eine Zunahme der intrazellulären cAMP-Konzentration. Der Zusatz „i“ deutet hingegen auf einen inhibitorischen Effekt auf die Adenylatzyklase und eine Abnahme der intrazellulären cAMP-Konzentration hin. Die Untereinheit $G\alpha_q$ ist dadurch charakterisiert, dass sie die Phospholipase C aktiviert. Dieses Enzym katalysiert die hydrolytische Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphaten (PIP₂) in Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃). Beide Spaltungsprodukte agieren als „Second messenger“. IP₃ führt zur Aktivierung von Rezeptoren des endoplasmatischen Retikulums und somit zu einer intrazellulären Erhöhung der Calcium-Konzentration. Diacylglycerol ist ein Aktivator der Calcium-abhängigen Proteinkinase C (PKC). $G\alpha_{12/13}$ aktiviert kleine GTPasen wie RhoA. Abbildung 1.8 zeigt die angenommene Funktionsweise nach der Aktivierung von GPR17 (Simon et al., 2016).

1.5 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die bisherigen Erkenntnisse über den GPR17-Rezeptor im Säugetier auf den Zebrafisch zu übertragen und somit weitere detaillierte Rückschlüsse auf die Abfolge und Funktion der Myelinisierung, Demyelinisierung und Remyelinisierung ziehen zu können, die noch offene Fragen zur Rolle dieses Rezeptors bei der Myelinisierung im Maus-, Ratten-Menschmodell beantworten können.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollten zunächst die 5' Enden der paralogen Zebrafischgene *gpr17a* und *gpr17b* mittels 5' RACE-PCR charakterisiert werden, um nähere Informationen zu den Transkripten inklusive der untranslatierten Regionen am 5' Ende zu erhalten.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte die Expression von *Gpr17a* und *Gpr17b* im Zebrafisch auf genomischer Ebene sowie auf Proteinebene untersucht werden. Der Expressionsverlauf von *gpr17a* und seinem paralogem Gen *gpr17b* sollte mittels qualitativer und quantitativer PCR an 1 bis 10 Tage alten Zebrafisch-Embryonen analysiert werden und im Zusammenhang mit der Expression verschiedener Myelin-assoziiierter Proteine betrachtet werden. Des Weiteren sollte der Einfluss eines *gpr17a*-Knockdowns - mithilfe eines Morpholinos – auf die Expression weiterer Myelin-assoziiierter Proteine in Wildtyp-Fischen sowie in den transgenen Fischlinien untersucht werden.

Im dritten Teil dieser Arbeit sollte die Expression von *Gpr17a* im ZNS des Zebrafisches mithilfe optischer Verfahren, wie z.B. der 2-Photonenmikroskopie, genauer lokalisiert

werden. Diese Untersuchungen sollten einerseits mittels *in situ* Hybridisierung und andererseits mithilfe verschiedener fluoreszierender Proteine unter der Kontrolle des *gpr17a*-Promotors in Wildtyp-Zebrafischen durchgeführt werden. Für die anschließenden Co-Lokalisations-Studien wurden die transgenen Zebrafischlinien *Tg(olig2:EGFP)* und *Tg(cldnk:GAL4,UAS:EGFP)* in die Untersuchungen mit einbezogen, die unter der Kontrolle des *olig2*- bzw. des *cldnk*-Promotors stabil EGFP exprimierten (Shin et al., 2003; Münzel et al., 2012).

In einem kleineren Teilprojekt sollte die Wirkung der Substanz MDL29,951, die als Agonist des humanen GPR17 beschrieben wurde (Hennen et al., 2013), auf die Expression von Gpr17a und weiterer Myelin-assoziiierter Proteine im Zebrafisch untersucht werden. Außerdem sollte mithilfe eines zellbasierten Assays (Dynamische Massenumverteilung) getestet werden, ob MDL29,951 auch im Zebrafisch eine Aktivierung von Gpr17a verursacht.

2 Materialien

2.1 Chemikalien

Tabelle 2.1: In dieser Arbeit verwendete Chemikalien.

Bezeichnung	Best.-Nr.	Hersteller/Vertrieb
0,5 % Trypsin-EDTA (10x), no Phenol Red	15400-054	Life Technologies GmbH
10xTris/Glycine/SDS-Buffer	161-0772	Bio-Rad Laboratories GmbH
2-Mercaptoethanol	M3148	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
4 - Di - 2 - ASP [4 - (4 - (Diethylamino)styryl) - N - methylpyridinium iodide]	AS-88052	AnaSpec
4x Laemmli Sample Buffer	161-0747	Bio-Rad Laboratories GmbH
6X DNA Loading Dye	R0611	Fisher Scientific Germany GmbH
AccuGel 29:1 (40%) Acrylamide	EC-852	National Diagnostics
Agarose (Type IX-A, Ultra-low Gelling Temperature)	A2576	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Agarose LE	840004	Biozym Scientific GmbH
Agarose Phor	850180	Biozym Scientific GmbH
Albumin Fraktion V (pH 7,0) für Western blotting BC	A6588	PanReac AppliChem
Amoniumsulfat	161-0700	Bio-Rad Laboratories GmbH
Ampicillin-Natrium	10835242001	Roche Diagnostics Deutschland GmbH
Ampuwa, Wasser für Injektionszwecke	Zul.-Nr. 40676.00.00	Fresenius Kabi Deutschland GmbH
Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments	11093274910	Roche Diagnostics Deutschland GmbH
BCIP/NBT Farbentwicklungs-Substrat	S3771	Promega GmbH
bisBenzimide H 33342 trihydrochloride	B2261	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Borsäure	A3581	PanReac AppliChem
Calcium Phosphate Transfection Kit	K2780-01	Fisher Scientific Germany GmbH
Calciumchlorid Dihydrat	C8106	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Complete Protease Inhibitor	04 693 116 001	Roche Diagnostics Deutschland GmbH
CutSmart Buffer	B7204S	New England Biolabs GmbH

Materialien

Bezeichnung	Best.-Nr.	Hersteller/Vertrieb
DEPC-Wasser	95284	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Dimethylsulfoxid, DMSO	D2650	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
di-Natriumhydrogenphosphat (Wasserfrei)	A2943	PanReac AppliChem
DMEM (1X) Dulbecco's Modified Eagle Medium	41965-062	Life Technologies GmbH
DMEM, High Glucose, GlutaMAX,	31966-021	Life Technologies GmbH
DMSO (Zellkultur)	A1584	PanReac AppliChem
dNTP Set, 100 mM Solutions	R0182	Fisher Scientific Germany GmbH
Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS)	14190-169	Life Technologies GmbH
Ethidiumbromid 1%	46067	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate salt (MS222, Tricaine)	A-5040	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ethylendiamiintetraessigsäure (EDTA)	39760.01	Serva Electrophoresis GmbH
Formamid	24311.291	VWR
GeneRuler 1 kb DNA Ladder 250 to 10,000 bp	SM0311	Fisher Scientific Germany GmbH
GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder	SM0321	Fisher Scientific Germany GmbH
GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder	SM1211	Fisher Scientific Germany GmbH
Gentamycin 10 mg/ml	157100-49	Life Technologies GmbH
Glycerin 99%	A3092	PanReac AppliChem
HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)	14025-050	Fisher Scientific Germany GmbH
Heparin-Natriumsalz	H3393	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
InstantOcean Meersalz	-	Instant Ocean United Pet Group
Iso-Propanol	6752.4	Carl Roth GmbH & Co. KG
Kanamycinsulfat	A4789	AppliChem GmbH
Luminata Classico Western HRP substrate	WBLUC0100	Merck KGaA
Leibovitz's L-15 Medium, GlutaMAX Supplement	31415-086	Life Technologies GmbH
Magnesiumchlorid Hexahydrat	A4425	PanReac AppliChem
Methanol	A0688	PanReac AppliChem

Materialien

Bezeichnung	Best.-Nr.	Hersteller/Vertrieb
Mowiol	81381	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Natriumchlorid	A2942	PanReac AppliChem
Natriumdeoxycholat	A1531	PanReac AppliChem
Natriumdodecylsulfat	1137601000	Merck KGaA
Natriumhydrogencarbonat	8551.2	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumhydroxid	S8045	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
N-Phenylthiourea	P7629	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	26619	Fisher Scientific Germany GmbH
Paraformaldehyd	31628.01	Serva Electrophoresis GmbH
Penicillin/Streptomycin	P11-010	PAA Laboratories GmbH
Phenol Rot, Lösung	P0290-100ML	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Poly-L-lysine hydrobromide	P6282	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Proteinase K	A3830,0100	PanReac AppliChem
Ribonukleinsäure aus Torula-Hefe	R6625	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Rinderserumalbumin	K41-001	PAA Laboratories GmbH
RIPA Lysis and Extraction Buffer	89900	Perbio Science Deutschland
Roti-Block, 10x Konzentrat	A151.2	Carl Roth GmbH & Co. KG
Salzsäure 37%	9277.1	Carl Roth GmbH & Co. KG
Schaafserum	S22-100 ml	Merck KGaA
SSC Buffer 20x	93017	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
SuperSignal West Femto	34095	Fisher Scientific Germany GmbH
SuperSignal West Pico	34077	Fisher Scientific Germany GmbH
TEMED	161-0800	Bio-Rad Laboratories GmbH
Tris-Base	5429.3	Carl Roth GmbH & Co. KG
Triton X-100	T8787	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Tween-20	P9416	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ziegenserum	G9023	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Zitronensäure	S1804	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
MDL29,951 (2-carboxy-4,6-dichloro-1H-indole-3-propionic acid)	SEW06645SC	Maybridge
Trichostatin A (TSA)	T8552-1MG	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

2.2 Reinstwasser

Das Reinstwasser wurde mit Hilfe einer Umkehrosmoseanlage (Reverse Osmose Anlage MobilRO 60) aus Leitungswasser hergestellt. Sofern nicht anders angegeben wurde in dieser Arbeit stets Reinstwasser zur Herstellung von Lösungen, Emulsionen oder Suspensionen verwendet.

2.3 Enzyme

Tabelle 2.2: Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme und Enzymkits.

Bezeichnung	Best.-Nr.	Händler
<i>AfeI</i>	R0652S	New England Biolabs GmbH
<i>ApaI</i>	R0114S	New England Biolabs GmbH
<i>BamHI</i>	R0136S	New England Biolabs GmbH
<i>BstBI</i>	R0519S	New England Biolabs GmbH
<i>Clal</i>	R0197S	New England Biolabs GmbH
DNase I, RNase-free	EN0525	Fisher Scientific Germany GmbH
DreamTaq® DNA Polymerase	EP0701	Fisher Scientific Germany GmbH
DyNAmo® Flash Probe qPCR Kit	F-455S	Fisher Scientific Germany GmbH
<i>Eco53kl</i>	R0116S	New England Biolabs GmbH
<i>EcoRI</i>	R0101S	New England Biolabs GmbH
<i>EcoRV</i>	R0195S	New England Biolabs GmbH
FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase	EF0651	Fisher Scientific Germany GmbH
<i>HindIII</i>	R3104S	New England Biolabs GmbH
<i>I-SceI</i>	R0694S	New England Biolabs GmbH
<i>I-SceI</i> , Restriktionsenzym	R0694S	New England Biolabs GmbH
iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR	170-8841	Bio-Rad Laboratories GmbH
<i>KpnI</i>	R3142S	New England Biolabs GmbH
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase	F-534S	Fisher Scientific Germany GmbH
Phusion® Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase	F-537	Fisher Scientific Germany GmbH
PrimeSTAR® Max DNA Polymerase	R045A	Clontech Laboratories
Protein Deglycosylation Mix	P6039S	New England Biolabs GmbH

Bezeichnung	Best.-Nr.	Händler
Rapid DNA Ligation Kit	K1422	Fisher Scientific Germany GmbH
Rapid DNA Ligation Kit	11635379001	Roche Diagnostics Deutschland GmbH
<i>SacI</i>	R0156S	New England Biolabs GmbH
Shrimp Alkaline Phosphatase	EF0511	Fisher Scientific Germany GmbH
<i>SpeI</i>	R0133S	New England Biolabs GmbH
T3-RNA-Polymerase	11031163001	Roche Diagnostics Deutschland GmbH
<i>XhoI</i>	R0146S	New England Biolabs GmbH

2.4 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden bei der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH bestellt. Alle Morpholinos wurden bei der Firma Gene Tools (LLC) bestellt und als Lyophilisat geliefert. Die Morpholinos wurden in Wasser für Injektionszwecke (Ampuwa) zu Endkonzentrationen von 2 mmol/l gelöst.

Tabelle 2.3: Oligonukleotide, die bei Klonierungen verwendet wurden.

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
gpr17a_for_HindIII	AGGATAAAGCTTATGGAGTCCTCCTTGACAGAACTTCC
gpr17a_rev_XhoI	GATGATCTCGAGTCAGAACTCAGACTTTGCACTC
gpr17a for F256Y,	GTCCGTAGCCCAGGATATAAGTTGCACGACTTAAG
gpr17a rev. F256Y,	CTTAAGTCGTGCAACTTATATCCTGGGCTACGGAC
gpr17a_Prom_Teil_1_for	CGGGCCCCCCTCGAGCTCTTAAATGTGACACAAG
gpr17a_Prom_Teil_1_rev	TTTCTAGTATATTTTGGCATAACCATTCTTATACAG
gpr17a_Prom_Teil_2_for	AAGAAATGGTATGCCAAAATATACTAGAAAAGTGTATTG
gpr17a_Prom_Teil_2_rev	GAAGCTTGAGCTCGATTTATAACTGAAAACAGAAGA
for_XmaI_tdTomato	CGACGGTACCGCGGGCCCGGCCACCATGGTGAGC
rev_NotI_tdTomato	TATGATCTAGAGTCGCGGCCGACTTGTACAGCTCG
gpr17a F256Y, for.	CTTAAGTCGTGCAACTTATATCCTGGGCTACGGAC
gpr17a F256Y, rev.	GTCCGTAGCCCAGGATATAAGTTGCACGACTTAAG

Tabelle 2.4: Oligonukleotide, die bei der RT-PCR/qPCR verwendet wurden.

Bezeichnung	Sequenz (5'-3') inkl. Modifizierung	ZFIN ID	Transkript(e)
gpr17a for_RT	CTAGGAAACTGCACAACCTC	ZDB- GENE- 100922- 133	5' RACE Ergebnisse
gpr17a rev_RT	GGAAGTTCTGTCAAGGAG		
gpr17a for_probe_RT	[HEX]CTTCAGCTCAGTCCTTCAGTTCT[BH Q1]		
gpr17b for_RT	GCCAAAAGAAGTCATTTATTTATC	ZDB- GENE- 091204- 118	5' RACE Ergebnisse
gpr17b rev_RT	GGATGTTCTCTGTGTGAG		
gpr17b for_probe_RT	[TxRd]CGGATGCTTCAGTCTATAAACCTC TCA[BHQ2]		
actb1 for_RT	GCCAACAGAGAGAAGATG	ZDB- GENE- 000329-1	<i>actb1-001</i> <i>actb1-002</i> <i>actb1-003</i> <i>actb1-004</i> <i>actb1-005</i>
actb1 rev_RT	GCGTAACCCTCATAGATG		
actb1 rev_probe_RT	[6FAM]ACCATCACCAGAGTCCATCACAA T[BHQ1]		
eef1a111 for_RT	GGAGTGATCTCTCAATCTTG	ZDB- GENE- 990415-52	<i>eef1a111-201</i> <i>eef1a111-202</i> <i>eef1a111-204</i>
eef1a111 rev_RT	CTTCCTTCTCGAACTTCTC		
eef1a111 rev_probe_RT	[6FAM]TCTCTTGTCGATTCCACCGCA[BH Q1]		
mbpa for_RT	CTGGGCAGAAAGAAGAAG	ZDB- GENE- 030128-2	<i>mbpa-002</i> <i>mbpa-006</i> <i>mbpa-007</i> <i>mbpa-010</i> <i>mbpa-011</i> <i>mbpa-012</i>
mbpa rev_RT	GATGACCACGAAATGAAC		
mbpa rev_probe_RT	[HEX]CTCCTCCGAAGAACCTGCTGAT[BH Q1]		
mbpb for_RT	CCACTTTCTGTTTCCAAG	ZDB- GENE- 030429-21	<i>mbpb-001</i> <i>mbpb-002</i>
mbpb rev_RT	CTGCTGTGATGTACTTCA		
mbpb for_probe_RT	[TxRd]ACACATCAATTCAACAGACACGCC [BHQ2]		
plp1a for_RT	GCAAGACAAGAGAGTTTTTC	ZDB- GENE- 001202-1	<i>plp1a-001</i>
plp1a rev_RT	TGGTGGACACAGTATATG		
plp1a for_probe_RT	[TxRd]TCTACATCGCTGCCTTCGCT[BHQ2]		
plp1b for_RT	CAGGAATCACCTTCTTG	ZDB- GENE- 030710-6	<i>plp1b-001</i> <i>plp1b-002</i> <i>plp1b-003</i> <i>plp1b-004</i>
plp1b rev_RT	GAACCTAGCAACGGATTC		
plp1b for_probe_RT	[HEX]CCACCACCTACAACCTACGCTATTCT [BHQ1]		

Tabelle 2.5: Oligonukleotide, die bei der 5' RACE-PCR verwendet wurden.

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
GSP1_gpr17a_rev	GTTGAGCCATTGACTTCTAC
GSP2_gpr17a_rev	GCCATAGACACAATCACCAA
GSP3_gpr17a_rev	ACCACAGCAAGGTATCTGTC
GSP1_gpr17b_rev	CACTCAAATAACCAAAGG
GSP2_gpr17b_rev	TTCTGCCATTCTCTAGTCACT
GSP3_gpr17b_rev	CATGGGGAGCACTAATATG

Tabelle 2.6: Die in dieser Arbeit verwendeten Morpholino-Oligonukleotide der Firma Gene Tools, LLC.

Bezeichnung	Konzentration	Sequenz (5'-3')
<i>gpr17a</i> -Morpholino	2.54 mg (300 nmol), M=8465	GTTCTGTCAAGGAGGACTCCATTT
Standard Kontrolle (Negativkontrolle)	0.833 mg (100 nmol), M=8328	CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA

2.5 Antikörper

Tabelle 2.7: Primäre Antikörper, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Antikörper	Spezies	Klasse	Best.Nr.	Bezugsquelle
Acetyliertes Tubulin	Maus	Monoklonal	T7451	Sigma-Aldrich
<i>gpr17a</i>	Huhn	Polyklonal	Individualherstellung	Perbio Science Deutschland
EGFP JL-8	Maus	Monoklonal	632380	Clontech Laboratories, Inc.

Tabelle 2.8: Sekundäre Antikörper, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Antikörper	Spezies	Klasse	Best.-Nr.	Bezugsquelle
Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	Ziege	Polyklonal	111-035-144	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.
Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	Ziege	Polyklonal	115-035-146	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.

Antikörper	Spezies	Klasse	Best.-Nr.	Bezugsquelle
Goat-anti-Chicken HRP	Ziege	Polyklonal	97150	Abcam,
Goat anti-Chicken IgY (H+L), Alexa Fluor® 546	Ziege	Polyklonal	A-11040	Life Technologies GmbH
Goat anti-Chicken IgY (H+L), Alexa Fluor® 488 conjugate	Ziege	Polyklonal	A-11039	Life Technologies GmbH
Goat anti-Rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor® 546 conjugate	Ziege	Polyklonal	A-11035	Life Technologies GmbH

2.6 Fischzellen, Transgene Zebrafischlinien, Wildtyp-Zebrafischlinien

Tabelle 2.9: Die in dieser Arbeit verwendeten Fischzelllinien.

Bezeichnung	Referenz / Erhalten von
PAC2 Zebrafisch-Fibroblasten	Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Institut für Toxikologie und Genetik (ITG), Arbeitsgruppe Prof. Dr. Nick Foulkes, Dr. Daniela Vallone
<i>Tg(cldnk:GAL4,UAS:EGFP)</i>	Münzel et al., 2012
<i>Tg(olig2:EGFP)</i>	Shin, et al., 2003
<i>Tg(olig2:DSRed)</i>	Kucenas et al.; 2008a
<i>TU (wild-type)</i>	Item # 1173; European Zebrafish Resource Center, Karlsruhe Institute für Technology
<i>TL (wild-type)</i>	Item # 1174; European Zebrafish Resource Center, Karlsruhe Institute für Technology

2.7 Plasmide

Tabelle 2.10: Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.

Bezeichnung	Referenz
pcDNA3.1 (+)	Life Technologies GmbH
pcDNA3.1(+) zfGPR17a	-
pcDNA3.1(+) hGPR17	AG Prof. Kostenis/Uni Bonn
pEGFP-N1	Addgene
tdTomato	Clontech Laboratories
pCR8GW-Claudin k Promoter	(Münzel et al., 2012)
pBluescript II SK (-)	Agilent Technologies

Bezeichnung	Referenz
pBluescript II KS (-) I-SceI Claudin k Promoter KS	Diese Arbeit
pBluescript II KS (-) I-SceI Claudin k Promoter KS EGFP-N1	Diese Arbeit
pBluescript II KS (-) I-SceI gpr17a Promoter KS EGFP-N1	Diese Arbeit
pBluescript II KS (-) I-SceI gpr17a tdTomato	Diese Arbeit
pGEM-T Easy mbpa (Isoform 12)	Nawaz et al., 2013
pBluescript II KS (-) I-SceI	AG Prof. Benjamin Odermatt

2.8 Bakterienstämme

Tabelle 2.11: Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme.

Bezeichnung	Best.-Nr.	Händler
NEB 5-alpha F'I ⁺ Competent <i>E. coli</i> (High Efficiency)	C2002I	New England Biolabs GmbH
Subcloning Efficiency™ DH5α™ Competent Cells	18265-017	Life Technologies GmbH

2.9 Fertigkits

Tabelle 2.12: Die in dieser Arbeit verwendeten Fertigkits.

Bezeichnung	Best.-Nr.	Händler
5'/3' RACE Kit, 2nd Generation	3353621001	Roche Diagnostics Deutschland GmbH
AccuGel 29:1 (40%)	EC-852	National Diagnostics
Amaxa Cell Line Nucleofactor Kit V	VCA-1003	Lonza Group Ltd.
CloneJET PCR Cloning Kit	K1231	Fisher Scientific GmbH
DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)	11175025910	Roche Diagnostics Deutschland GmbH
FISH Tag RNA Multicolor Kit	F32956	Life Technologies GmbH
In-Fusion HD Cloning Plus	638909	Clontech Laboratories
NucleoBond Xtra Midi	740410.50	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
NucleoBond Xtra Midi EF	740420.50	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
NucleoSpin Plasmid	740588.250	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
NucleoSpin RNA Clean-up	740948.50	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
NucleoSpin RNA II	740955.10	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
NucleoSpin RNA Plus	740984.50	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG

Materialien

Bezeichnung	Best.-Nr.	Händler
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	740609.250	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
NucleoSpin Tissue	740952.50	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
Pierce BCA Protein Assay Kit	23227	Fisher Scientific Germany GmbH
Qubit® ds DNA HS Assay Kit	Q32851	Life Technologies GmbH
Qubit® RNA HS Assay Kit	Q32852	Life Technologies GmbH
QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit, 10 Rxn	210518	Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co.KG
Rapid DNA Ligation Kit	11635379001	Roche Diagnostics Deutschland GmbH
Rapid DNA Ligation Kit	K1422	Fisher Scientific Germany GmbH
SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	34095	Fisher Scientific Germany GmbH
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	34077	Fisher Scientific Germany GmbH
Calcium Phosphate Transfection Kit	K2780-01	Fisher Scientific Germany GmbH

2.10 Fischanlage

Die Fischhaltung unterschiedlicher Zebrafischlinien (Wildtyp und transgene Tiere) erfolgte in Aquarieneinheiten (TECNIPLAST S.p.A). Insgesamt wurden vier Aquarieneinheiten autark betrieben, wobei jeweils zwei Einheiten von einer eigenen Umkehrosmoseanlage (Reverse-Osmose Anlage RO20) mit Reinstwasser versorgt wurden. Jede Aquarieneinheit regulierte dabei elektronisch über eigene pH- und Leitfähigkeitspufferlösungen den pH-Wert auf 7,4 und die Leitfähigkeit auf $550 \mu\text{S cm}^{-1}$.

Leitfähigkeitslösung (Fischanlage)

<u>Ausgangsstoff</u>	<u>Menge</u>	<u>Konzentration</u>
InstantOcean Pulver	45 g	4,5%
Reinstwasser	ad 1000 ml	

pH-Pufferlösung (Fischanlage)

<u>Ausgangsstoff</u>	<u>Menge</u>	<u>Konzentration</u>
Natriumhydrogencarbonat	7,5 g	0,75%
Reinstwasser	ad 1000 ml	

Im Kreislaufverfahren wurde das Wasser je Aquarieneinheit kontinuierlich mechanisch und biologisch gereinigt und unter Verwendung von UV-Licht permanent teilentkeimt. Die

biologischen und mechanischen Filter sowie die UV-Einheiten wurden entsprechend der Herstellerangaben regelmäßig gewechselt. Täglich wurde automatisch jeder Aquarieneinheit 20% (ca. 41 l) des Gesamtvolumens an Wasser entnommen und durch Reinstwasser ersetzt. Mithilfe des Wasserwechsels wurde eine niedrige Konzentration von Nitrat und Phosphat gewährleistet, die in hohen Konzentrationen zur Algenbildung führen. Mit Hilfe einer Steuerungseinheit wurde ein Tag-Nacht-Rhythmus (14 h Licht und 10 h Dunkelheit) über eine LED-Zimmerbeleuchtung simuliert. Die Leistungsabgabe der dimmbaren Steckdose für die LED-Zimmerbeleuchtung wurde über die Steuerungseinheit auf 70% reguliert, um eine Algenbildung durch übermäßige Lichtintensität zu verhindern.

2.11 Geräte

Tabelle 2.13: Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte.

Bezeichnung	Best.-Nr.	Händler
AG204 Delta Range	-	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
AquaStar	-	iks ComputerSysteme GmbH
Axioskop 2 Mot	-	Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
Biofuge pico	-	Hereaus, Thermo Fisher Scientific
Biofuge primo	-	Hereaus, Thermo Fisher Scientific
Biofuge primo R	-	Hereaus, Thermo Fisher Scientific
CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System	185-5196	Bio-Rad Laboratories GmbH
Dark Reader Transilluminator	DR-46B	Clare Chemical Research, Inc.
Digital Sight DS-U3	-	Nikon GmbH
DURAPorter Transportboxen	HS120052	Heathrow Scientific LLC
Eppendorf µCuvette® G1.0	6138000018	Eppendorf AG
Eppendorf BioPhotometer® D30	6133000001	Eppendorf AG
Eppendorf Research® plus, Einkanal, variabel, 0,5 – 10 µL, mittelgrau	3120000020	Eppendorf AG
Eppendorf Research® plus, Einkanal, variabel, 100 – 1000 µL, blau	3120000062	Eppendorf AG
Eppendorf Research® plus, Einkanal, variabel, 2 – 20 µL, gelb	3120000038	Eppendorf AG
Eppendorf Research® plus, Einkanal, variabel, 20 – 200 µL, gelb	3120000054	Eppendorf AG
Geldoc 2000	-	Bio-Rad Laboratories GmbH

Materialien

Bezeichnung	Best.-Nr.	Händler
Hybridisierungs-Schrank	BFD 53	H. Saur Laborbedarf
ImageQuant LAS 4000 Mini	-	GE Healthcare Life Sciences, Chalfont St Giles, UK
Infrared Vortex Mixer - WIZARD	F202A0175	VELP Scientifica
Intenslight CHFIE	-	Nikon GmbH
IPP400	IPP400	Memmert GmbH + Co. KG
KL 1500 LED Plus	150 500	Lighting and Imaging SCHOTT AG
KL 200 LED	120 200	Lighting and Imaging SCHOTT AG
KL2500 Led	250 400	Lighting and Imaging SCHOTT AG
Labstyle 303	-	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
MICROMAN M1000, 100–1000 µL	F148506	Gilson, Inc.
Mini Submarine Gel Unit	EM100	Engineering & Design Plastics Ltd
Mini Trans-Blot Module	170-3935	Bio-Rad Laboratories GmbH
Mini-PROTEAN® Tetra Cell	165-8001	Bio-Rad Laboratories GmbH
Model PC-10	-	Narishige
Microinjection capillary holder	-	Narishige
MPPI-3 Pressure Injector	-	Applied Scientific Instrumentation, Inc.
Multifuge 3 S-R	-	Hereaus, Thermo Fisher Scientific
Nikon AZ100	-	Nikon GmbH
Nikon Eclipse Ni-U	-	Nikon GmbH
PerfectSpin Mini	91-PSPIN-M	PEQLAB Biotechnologie GmbH
PG503-S Delta Range	-	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Polyamid-Präzisions-Siebgewebe (Nylon) Maschenweite 200 µM	510-9527	VWR
PowerPac Universal Power Supply	164-5070	Bio-Rad Laboratories GmbH
Precellys 24	91-PCS24	PEQLAB Biotechnologie GmbH
Qubit® 2.0 Fluorometer	Q32866	Life Technologies GmbH
Reverse Osmose Anlage MobilRO 60	Mobil RO60	Wilhelm Werner GmbH
Reverse-Osmose Anlage RO20	RO 20	Wilhelm Werner GmbH
SMZ745	-	Nikon GmbH
STEMI 100	-	Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
SUB Aqua 2 Plus	-	Grant Instubents (Cambridge)Ltd.

Materialien

Bezeichnung	Best.-Nr.	Händler
T100™ Thermal Cycler	186-1096	Bio-Rad Laboratories GmbH
Trans-Blot® Turbo™ Transfer Starter System	170-4155	Bio-Rad Laboratories GmbH
Varioklav 135S	51024302	HP Medizintechnik GmbH
Zählkammer, Neubauer improved	717805	Brand GmbH & Co KG
Zebrafish Microinjection Molds	-	-Diverse Anbieter-
µQuant Mikroplatten Spekt-ralfotometer	-	BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall
Amaxa Nucleofector II	-	Lonza Cologne GmbH
Mehrkanal-Mikroliterpipette Transferpette® -12 electronic	-	Brand GmbH + Co. KG
Zählkammer, BLAUBRAND, Neubauer improved	717805	Brand GmbH + Co. KG
Zebtec Standalone Aquatic System	-	TECNIPLAST S.p.A.
Coolsnap EZ	-	Visitron Systems GmbH
2-Photonenmikroskop	-	LaVision BioTec

2.12 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.14: Die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Best.-Nr.	Händler
Microloader 20 µl	5.242.956.003	Eppendorf AG
Precelly-Keramik-Kit 1,4 mm	91-PCS-CK14	PEQLAB Biotechnologie GmbH
2 ml Tube (Schraubdeckelgefäße) + 1,4 mm Ceramic Beads	70-3-19-627	Bio-Budget Technologies GmbH
Cellulose-Chromatographie-Papier Größe: 46 x 57cm, Dicke: 0.34mm	3030-917	GE Healthcare Life Sciences
Cellulose-Chromatographie-Papier 46 x 57cm, Dicke: 0.92mm	3017-915	GE Healthcare Life Sciences
10 µl XL, graduert, Filterspitze, max. Vol. 20 µl	S1180-3810	Starlab Deutschland GmbH
20 µl Bevelled, Filterspitze	S1180-1810	Starlab Deutschland GmbH
200 µl graduert, Filterspitze	S1180-8810	Starlab Deutschland GmbH
Glass filaments GB 120F F-10 0.69x1.20x100 mm	-	Science Products, Hofheim
CP1000 für Microman M1000	F148560	Gilson, Inc.

Materialien

Bezeichnung	Best.-Nr.	Händler
Zellkulturschalen 9,2 cm ²	93040	TPP Techno Plastic Products AG
Zellkulturschalen 22,1 cm ²	93060	TPP Techno Plastic Products AG
Zellkulturschalen 22,1 cm ²	93100	TPP Techno Plastic Products AG
Objektträger 76 x26x1mm	1000200	Paul Marienfeld GmbH & Co .KG
Mikrofläschchen 15 ml	2-1008	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH
PCR-Gefäße mit Schutzschild 0,5 ml	B1402-5500	Starlab Deutschland GmbH
Mikrozentrifugenröhrchen "Crystal Clear" 1,5 ml	E1415-1500	Starlab Deutschland GmbH
PVDF Membran	IPVH00010	Merck KGaA
Extra Thick Blot Paper	170-3966	Bio-Rad Laboratories GmbH
Röhrchen, 50 ml, pp, 30/115 mm, konischer Boden, Schraubverschluss blau, natur, blau graduiert.	227263	Greiner Bio-One GmbH
Röhrchen, 15 ml, pp, 17/120 mm, konischer Boden, schraubverschluss blau, natur, blau graduiert,	188272	Greiner Bio-One GmbH
Zellkulturtestplatte 24	92424	TPP Techno Plastic Products AG
Zellkulturtestplatte 6	92406	TPP Techno Plastic Products AG
Eppendorf UVette®	4099002005	Eppendorf AG
Eppendorf® Vis Cuvette Makroküvette	0030079345	Eppendorf AG
Pasteur Plast Pipetten	2600111	ratiolab GmbH
Zellkulturflasche 75 cm ²	90075	TPP Techno Plastic Products AG
Corning® Epic® 384 Well Cell Assay Microplate	5040	Corning, Inc
Corning® Epic® 384 Well Fibronectin Coated Cell Assay Microplate	5042	Corning, Inc
Zellkulturflasche 25 cm ²	90025	TPP Techno Plastic Products AG

2.13 Software

Tabelle 2.15: Die in dieser Arbeit verwendeten Softwares.

Name	Hersteller / Bezugsquelle
Serial Cloner 2.6	http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html
OligoArchitect™ Online	SIGMA-ALDRICH®; powered by Beacon Designer™, by PREMIER Biosoft.
Office Professional Plus 2013	Microsoft Corporation
CFX Manager™ Software	Bio-Rad Laboratories GmbH
qbase+	Biogazelle NV
NIS-Elements Viewer 4.20	Nikon Instruments Europe B.V.
REviewer™	http://www.thermoscientificbio.com/webtools/reviewer/
QuikChange® Primer Design Program	http://www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp
Clustal Omega	http://www.clustal.org
Adobe Design Standard CS 3	Adobe, San Jose, America
ImageJ	http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html
GraphPad Prism 5	GraphPad software

3 Methoden

3.1 Zebrafischspezifische Methoden

3.1.1 Fischhaltung und Aufzucht

Die Zebrafische wurden in eigenen Fischanlagen (siehe Kapitel 2.10) bei einer Wassertemperatur von 28°C nach Standardmethoden gehalten und gezüchtet (Westerfield, 2007). Die einzelnen Entwicklungsstufen der Fische wurden nach den Beschreibungen von Kimmel et al. (1995) definiert. Die Zebrafische wurden dreimal täglich mit herkömmlichen Fischtrockenfutter sowie mit selbst hergestellten frisch geschlüpften lebenden Larven des Salinenkrebses (*Artemia salina*) gefüttert. An Wochenenden erfolgte die einmalige Fütterung der Fische mit eingefrorenen Salinenkrebsen sowie mit Trockenfutter. Die Vorbereitung zur Verpaarung von Fischen erfolgte jeweils am späten Nachmittag des Vortags. Zur Verpaarung von Fischen wurden Verpaarungsbehälter (TECNIPLAST S.p.A) verwendet, die eine räumliche Trennung von jeweils zwei weiblichen und männlichen Fischen ermöglichten (Abbildung 3.1).

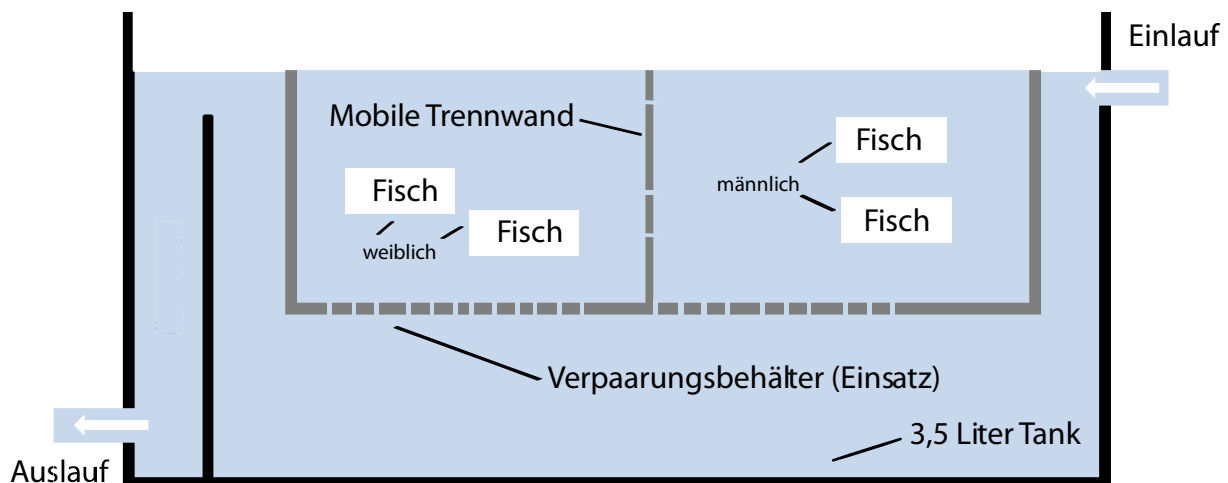


Abbildung 3.1: Schematischer Aufbau einer Verpaarungseinheit.

Ziel der Geschlechtertrennung war es, den Zeitpunkt der Verpaarung auf den manuellen Zeitpunkt des Entfernens der Trennwand am nächsten Morgen zu begrenzen. Nach der Verpaarung erfolgte das Einsammeln der Fischeier, ca. 1 h nach dem Entfernen der mobilen Trennwand. Da der genaue Zeitpunkt der Verpaarung nicht im Detail festzustellen war, wurde

der Zeitpunkt der Befruchtung (Stunde 0) dem Zeitpunkt des Einsammelns der Fischeier gleichgesetzt. Um die Entwicklung von Algen, Mikroorganismen und Pilzen zu verhindern, wurden pro Petrischale maximal 50 bis 100 Fischeier gehalten und in einem Brutschrank (IPP400) bei 28°C inkubiert (Tag-Nacht-Verhältnis). Außerhalb der Fischanlage wurden die Fische statt des Fischwasser aus der Fischanlage mit dem als „Danieau Medium“ bezeichnetem selbst hergestellten Fischwasser versorgt.

0,3x Danieau Medium (Standard-Embryomedium):

<u>Ausgangsstoff</u>	<u>Menge</u>
NaCl	17 mM
KCl	2 mM
MgSO ₄	0,12 mM
Ca(NO ₃) ₂	1,8 mM
HEPES	1,5 mM
pH	7,6

Für die gewöhnliche Fischhaltung außerhalb der Fischanlage wurde das Standard-Embryomedium (0,3x Danieau Medium) verwendet. Methyleneblau wurde dem Standard-Embryomedium bei Bedarf hinzugefügt, um einer vorzeitigen Algenbildung entgegenzuwirken. Des Weiteren wurde PTU dem Standard-Embryomedium hinzugefügt, um eine vorzeitige Pigmentierung der Zebrafische zu verhindern.

3.1.2 Herstellung von Injektionsnadeln und –platten zur Mikroinjektion

Die Injektionsnadeln wurden mit einem horizontalen Glaskanülenzieher (Model PC-10) unter Verwendung von Glaskanülen (Glass filaments GB 120F F-10) hergestellt (Abbildung 3.2A). Die Injektionsnadeln wurden mit zwei kleinen Gewichten in einem Schritt mit dem Erhitzer 2 des Glaskanülenziehers bei 59,6°C gezogen. Es wurde stets die untere der beiden gezogenen Nadeln verwendet. Nach dem Befüllen der Injektionsnadel mit dem jeweiligen Injektionsmaterial wurde die noch geschlossene Spitze vorsichtig mit einer Pinzette aufgebrochen. Danach erfolgte die Mikroinjektion. Zur Herstellung von Injektionsplatten wurden Petrischalen aus Kunststoff mit einem Durchmesser von 10 cm verwendet. In einem ersten Schritt wurde die Petrischale bis zur Hälfte mit 2%iger Agarose gefüllt. Nach dem Erkalten der ersten Schicht wurde gleichermaßen eine zweite Schicht gegossen, in die noch vor dem Erkalten eine Form eingelegt wurde (Zebrafish Microinjection Mold). Die Form diente dazu, in der Agarose mehrere geradlinige Rinnen einzuprägen, in denen später die

Zebrafischeier für die Injektion fixiert werden konnten (Abbildung 3.2B). Nach dem vollständigen Erkalten der Agarose wurde die Form vorsichtig entfernt.

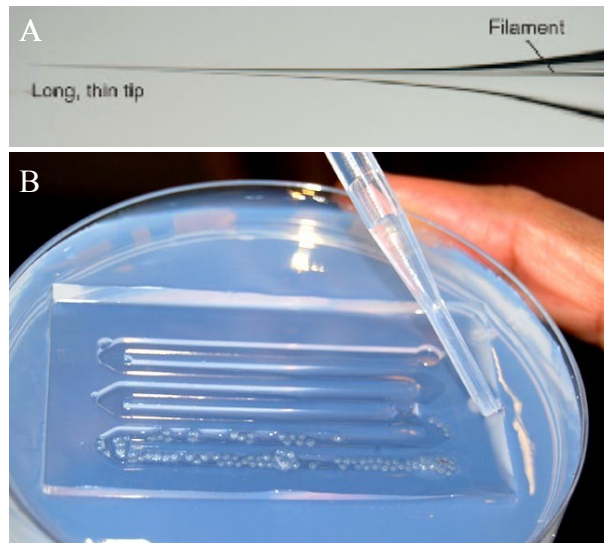


Abbildung 3.2: Nadel und Injektionsplatte zur Mikroinjektion. A, Injektionsnadel aus Glas (Bildquelle: Rembold et al., 2006). B, Petrischale gefüllt mit Agarose und deutlich sichtbaren Form-Rillen, in denen die Fischeier fixiert werden (Bildquelle: <http://www.agnthos.se/home>).

3.1.3 Mikroinjektion von Plasmiden zur Herstellung transgener Fische

Die Mikroinjektion in Zebrafischeier wurde unter Verwendung des I-SceI-Meganuclease-Systems durchgeführt, welches im Protokoll „Transgenesis in fish: efficient selection of transgenic fish by co-injection with a fluorescent reporter construct“ ausführlich beschrieben wurde (Rembold et al., 2006). Ziel der Injektion von Plasmiden mit fluoreszierenden Reportern in Fischeier ist es, durch die Integration der fremden Plasmid-DNA in das Genom des Fisches, transiente oder stabile transgene Fischlinien zu erhalten. Es wurde stets Endotoxin-freie Plasmid-DNA verwendet, die mit dem Kit „NucleoBond Xtra Midi EF“ aufgereinigt wurde. In dieser Arbeit wurde das „I-SceI Meganuclease System“ (Thermes et al., 2002; Rembold et al., 2006) verwendet, um die Insertion der jeweiligen DNA-Sequenz in das Genom des Wildtyp-Fisches zu ermöglichen. Die Grundlage des I-SceI-Meganuclease-System bilden die I-SceI-Restriktionsschnittstellen am 5'- und 3' Ende der multiplen Klonierungsstelle des Plasmids. Nach gleichzeitiger Injektion von Plasmid-DNA und I-SceI wird das Ausschneiden des Inserts des Plasmids durch I-SceI und damit der Einbau des Inserts in das Genom des Zebrafisches ermöglicht. Für jede Injektion wurde zunächst ein Mastermix

mit der folgenden Zusammensetzung hergestellt, ein Teil davon in die Injektionsnadel gefüllt und im Mikromanipulator justiert:

Mastermix	Menge
Phenol Rot, Lösung	1,25 μ l
CutSmart Buffer 10x	1,25 μ l
I-SceI Restriktionsenzym	1,25 μ l
2 μ g Plasmid-DNA	q.s.
Wasser	ad 25 μ l

Vor der Injektion wurden die aus der Verpaarung gesammelten Zebrafischeier schnellstmöglich in der Injektionsplatte verteilt und durch leichtes Andrücken in die Agaroserillen fixiert. Anschließend wurde in jedes Zebrafischei jeweils 1 nl des Mastermixes mithilfe von Injektionsdruck und einem Mikroskop manuell in die Keimbahn injiziert. Die Injektion dafür erfolgte ausschließlich in die Blastomeren und nicht in den Dottersack (Abbildung 3.3).

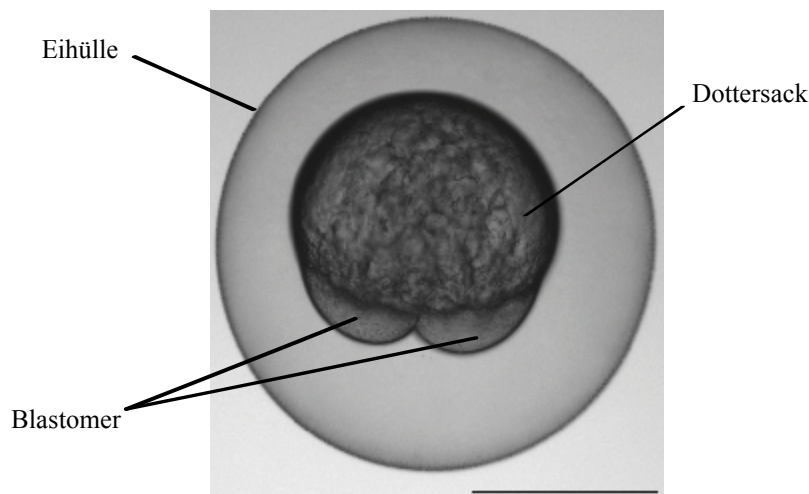


Abbildung 3.3: Zwei-Zellstadium eines Zebrafischembryos. Zellteilung 0,7 h nach der Befruchtung. Maßstab 500 μ m . Zum Aufbau transgener Fischlinien erfolgte die Mikroinjektion in die Blastomere. Die Injektion von Morpholinos erfolgte in den Dottersack.

Nach der Injektion wurden alle injizierten Zebrafischeier in Petrischalen mit Fischwasser überführt und über Nacht bei 28°C inkubiert. Um eine Verunreinigung vorzubeugen, wurde dem Standard-Embryomedium Methylenblau zugesetzt. Am Folgetag wurden tote Zebrafischeier aus der Petrischale entfernt. Die lebenden Fischeier wurden hinsichtlich einer

erfolgreichen Insertion (Vorhandensein einer Fluoreszenz verursacht durch das inserierte Reportergen) sortiert. Nach erfolgreicher Sortierung wurden die Zebrafischeier weiter analysiert.

3.1.4 Mikroinjektion von Morpholinos

Morpholinos sind modifizierte Oligonukleotide mit einer Länge von ca. 25 Basen, die durch komplementäre Basenpaarung die mRNA des entsprechenden Gens binden können und somit durch Hemmung der Translation die Genexpression inhibieren (Gen-Knockdown). Morpholinos tragen statt des Zuckerbestandteiles Ribose einen Morpholin-6er-Ring, der die Zelle darin hindert, den Morpholino durch Nukleasen abzubauen. Die Vorbereitung der Zebrafischeier zur Mikroinjektion erfolgte wie unter dem Punkt 3.1.3 beschrieben. Die Injektionslösung enthielt den Morpholino in einer Endkonzentration von 0,25 mM und war wie folgt zusammengesetzt:

Mastermix	Menge
Phenol Rot, Lösung	2 μ l
CutSmart Buffer 10x	1 μ l
Morpholino (2 mM)	2,5 μ l
Wasser	14,5 μ l

Zur Herunterregulation von *gpr17a* wurde ein Volumen von 1,3 nl (ca. 2,75 ng) in den Dottersack von Zebrafischen injiziert (maximal Zwei-Zellstadium). Als Negativkontrolle wurde ein Kontroll-Morpholino verwendet, der komplementär nicht binden konnte. Zur mikroskopischen Auswertung von Zellzahlen und Zellmorphologien bestimmter Zelltypen nach der Morpholino-Injektion wurden drei biologische Replikate (N=3) erstellt, die jeweils aus vier Zebrafischen (n=4) bestanden.

3.1.5 Applikation von Substanzen in das Fischwasser

Die indirekte Applikation von Substanzen in den Zebrafisch (≤ 5 dpf) über das Fischwasser erfolgte außerhalb der Fischanlage in geeigneten Behältern bei 28°C in Inkubatoren. Die kontinuierliche Exposition der Testsubstanzen erfolgte in unterschiedlichen Konzentrationen durch die direkte Zugabe in das Fischwasser. Je nach Wasserlöslichkeit der Substanzen wurde dem Fischwasser ggf. Dimethylsulfoxid (DMSO) hinzugefügt. In der jeweiligen

Negativkontrolle wurde dem Fischwasser ausschließlich das Lösungsmittel in der entsprechenden Konzentration hinzugefügt.

3.1.6 Whole-mount *in situ* Hybridisierung

Die *in situ* Hybridisierung in Zebrafisch-Embryonen wurde weitestgehend gemäß Abschnitt C des Protokolls „Thisse Lab – In Situ Hybridization Protocol – 2010 update“ (Thisse und Thisse, 2008) durchgeführt, welches über die Datenbank „Zebrafish Model Organism Database, ZFIN.org“ erhältlich ist. Die Lösungen wurden entsprechend dem Protokoll hergestellt. Das Grundprinzip der *in situ* Hybridisierung basiert darauf, dass komplementäre RNA-Sonden mittel der *in vitro* Transkription (siehe Abschnitt 3.2.20) hergestellt werden, die über markierte UTP-Nukleotide verfügen (z.B. Digoxigenin-markiert). Nach der Hybridisierung der markierten RNA-Sonden an die Ziel-mRNA erfolgt mit einem gegen das Digoxigenin gerichteten Antikörper (gekoppelt an eine alkalische Phosphatase) eine zweite Reaktion. Im weiteren Verlauf entstehen abschließend unter Verwendung des NBT/BCIP-Substrates ein oder mehrere blaue Präzipitate, die die Expression und Lage der mRNA im Zebrafischembryo anzeigen.

Fischlarvenfixierung

Für die *in situ* Hybridisierung wurden Zebrafisch-Embryonen der Tage eins, zwei und drei verwendet. Nach Abschluss der Embryogenese (ca. 20 bis 24 hpf) wurde das Fischwasser durch Fischwasser mit 0,0045% PTU (1-Phenyl-2-thiourea) ersetzt. Der Wasserwechsel erfolgte anschließend alle 24 Stunden mit der genannten Konzentration an PTU. PTU inhibiert die Melanogenese, indem es alle Tyrosinase-abhängigen Schritte im Melaninzyklus blockiert und somit die Pigmentierung des Zebrafisches stoppt. Durch die Zugabe von PTU wurde die Transparenz zur späteren mikroskopischen Visualisierung aufrechterhalten bzw. weiter erhöht. Nach dem Erreichen der zu untersuchenden Altersklassen wurden den Fischembryonen nach Bedarf die Eihüllen manuell entfernt und die Fischembryonen wurden einschließlich des Fischwassers aus der Petrischale in ein Mikrofläschchen aus Glas überführt. Anschließend wurde mit einer Pasteurpipette das Wasser soweit wie möglich entfernt und 5 ml einer frisch hergestellten 4%igen PFA-Lösung hinzugefügt. Die Fixierung der Fischlarven erfolgte nun über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag erfolgte die Dehydrierung der Fischlarven mit Methanol bei Raumtemperatur. Zunächst wurde die 4%ige PFA-Lösung soweit wie möglich entfernt. Nachfolgend wurden die Fischembryonen für jeweils 5 Minuten

in 5 ml PBS mit 25% (vol/vol), 50% (vol/vol) und 75% (vol/vol) Methanol inkubiert. Zur vollständigen Dehydrierung erfolgte im letzten Schritt eine Inkubation der Fischlarven in 5 ml 100%igem Methanol. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Fischlarven im Mikrofläschchen in 5 ml frischem 100%igem Methanol bei -20°C gelagert.

Permeabilisierung und Hybridisierung der Fischembryonen

Für die Rehydrierungsschritte wurden 50 ml Röhrchen verwendet, deren Gefäßböden auf Höhe der 30 ml Markierung abgeschnitten und durch ein planes Polyamid-Präzisions-Siebgewebe (Nylon) ersetzt wurden. Das selbst hergestellte siebartige Gefäß aus 50 ml Röhrchen wird nachfolgend als „großer Korb“ bezeichnet. Außerdem wurden aus 1,5 ml-Eppendorf Gefäßen ähnliche siebartige Gefäße hergestellt, die folglich als „kleiner Korb“ bezeichnet werden. Die benötigten Fischembryonen des jeweiligen Alters wurden einschließlich etwas Methanol aus den bei -20°C in Methanol gelagerten Mikrofläschchen mit einer Pasteurpipette entnommen und vorsichtig in den großen Korb überführt. Jeder Korb beinhaltete ausschließlich Fischlarven des gleichen Alters. Nach Abtropfen des Methanols wurde der große Korb für 5 Minuten in ein „Well“ einer 6-Multiwell-Platte getaucht, das 10 ml 100%iges Methanol enthielt. Darauf folgten Inkubationen für jeweils 5 Minuten in 10 ml PBS (pH 5,5) mit 75% Methanol (vol/vol), 50% Methanol (vol/vol) und 25% Methanol (vol/vol). Nach dieser Rehydrierung wurden die Fischlarven 5-Mal in PBST (pH 5,5) gewaschen. Anschließend erfolgte ein Proteinase K-Verdau, um die Permeabilität des Fisches für die RNA-Sonde zu erhöhen. Dazu wurde der große Korb für 30 Minuten in 10 ml einer Lösung aus 10 µg/ml Proteinase K in PBST getaucht. Durch die folgende Inkubation in 10 ml 4%igen PFA für 20 Minuten wurde der Proteinase K-Verdau abgestoppt. Durch erneutes 5-maliges Waschen mit jeweils 10 ml PBST wurden das restliche PFA entfernt. Der große Korb inklusive Fischlarven wurde während der oben genannten Schritte jeweils von „Well“ zu „Well“ ohne weitere Zwischenschritte mitgenommen. Nach dem letzten Waschschrift mit PBST wurden die Fischlarven mit einer Pasteurpipette aus dem großen Korb in ein 2 ml Eppendorf Safe-Lock-Tube überführt. Die PBST-Waschlösung wurde soweit wie möglich aus dem Gefäß entfernt, durch 700 µl Hybridisierungsmix (HM) ersetzt und für 3 Stunden bei 70°C in einem Wasserbad inkubiert. Danach wurde der HM entfernt und durch 200 µl neuen HM mit 2 µl der Digoxigenin-markierten RNA-Sonde ersetzt. Der Ansatz wurde über Nacht bei 70°C auf dem Wasserbad inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Fischlarven mit einer Pasteurpipette aus dem Eppendorf Safe-Lock-Tube entnommen und in den kleinen Korb überführt. Anschließend erfolgte ein schnelles Waschen mit dem HM bei 70°C. Darauf

folgten Waschschr tte bei 70°C für jeweils 10 Minuten in einem Gesamtvolumen von 2 ml mit 75% HM/25% 2xSSC (vol/vol), 50% HM/50% 2xSSC (vol/vol) und 25% HM/75% 2xSSC (vol/vol), 100% 2xSSC. Das kleine Körbchen wurde immer von einem Well zu nächsten Well einer 24-Well Platte überführt und eingetaucht. Anschließend erfolgten zwei Inkubationen von jeweils 30 Minuten in 2 ml 0,2xSSC Lösung bei 70°C. Darauf folgten Waschschr tte bei Raumtemperatur für jeweils 10 Minuten in einem Gesamtvolumen von 2 ml mit 75% 0,2xSSC/25% PBST (vol/vol), 50% 0,2xSSC /50% PBST (vol/vol) und 25% 0,2xSSC /75% PBST (vol/vol), 100% PBST. Nach diesen Waschschr tten wurde das kleine Körbchen für 3 Stunden bei Raumtemperatur in 2 ml einer Blockierlösung, bestehend aus 2mg/ml BSA, 2% Schafserum in PBST, inkubiert. Nach der Blockierung wurde die Blockierlösung entfernt und 500 µl einer neuen Blockierlösung, die den 1:5000 verdünnten Anti-Digoxigenin Antikörper enthielt, hinzugefügt. Dieser Ansatz wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Die weitere Durchführung erfolgte wie im Protokoll „Thisse Lab – In Situ Hybridization Protocol – 2010 update“ beschrieben (Thisse und Thisse, 2008). Abhängig von der Effizienz der RNA-Sonde sowie des Expressionslevels der mRNA wurde die Reaktion nach dem Erscheinen erster blauer Präzipitate abgestoppt. Zur weiteren Lagerung und späteren Betrachtung der Präzipitate unter dem Mikroskop wurden die Zebrafisch-Embryonen in 100%ige Glycerol im Dunklen bei 4°C gelagert. Zur besseren Positionierung unter dem Mikroskop wurde ggf. der Dottersack vorsichtig mit einer Pinzette entfernt.

Zusätzliche Antikörperfärbung

Zur Co-Lokalisation des *in situ* Signals wurde die *in situ* Hybridisierung in transgenen Fischen, die ein grün fluoreszierendes Protein (EGFP) stabil exprimieren, mit nachfolgender Antikörperfärbung gegen das EGFP durchgeführt. Dazu wurden die Zebrafisch-Embryonen nach der *in situ* Hybridisierung mehrmals in PBS gewaschen, um das anheftende Glycerol zu entfernen. Anschließend wurden maximal fünf Zebrafisch-Embryonen für 5 h in einem 2 ml-Eppendorfgefäß in 1 ml der folgenden steril filtrierten Blockierlösung bei 4°C auf einer Wippe inkubiert.

Blockierlösung	Menge
BSA	0,5 g
10% Triton X-100	0,5 ml
Ziegenserum	0,5 ml
1x PBS	ad 50 ml

Anschließend wurden die Zebrafisch-Embryonen in 1:2000 verdünnten primären Antikörper (Anti-EGFP) in frischer Blockierlösung auf der Wippe über Nacht bei 4°C inkubiert. Zur Entfernung des primären Antikörpers wurden die Zebrafisch-Embryonen anschließend mehrmals mit der Blockierlösung gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation des sekundären Antikörper (Anti Mouse AlexaFluor 485) in der Verdünnung von 1:2000 in frischer Blockierlösung über Nacht bei 4°C auf einer Wippe. Vor dem Mikroskopieren wurden die Fische dreimal in PBS gewaschen.

3.1.7 Fixierung von Zebrafisch-Embryonen für *in vivo* Aufnahmen

Für die Untersuchung eines einzelnen Zebrafischembryos mittels 2-Photonenmikroskop (LaVision BioTec) oder Nikon-AZ100-Mikroskop wurde dieser mit einem Gesamtvolumen von ca. 1 ml Fischwasser in die Mitte einer 10 cm breiten Petrischale aus Kunststoff positioniert. Zuvor wurde gegebenenfalls mithilfe einer Pinzette vorsichtig die Eihülle entfernt. Anschließend wurden zu diesem Volumen 20 µl der MS 222-Arbeitslösung hinzugefügt und durch mehrmaliges auf- und abpipettieren verteilt. MS 222 führt innerhalb weniger Sekunden zu einer Betäubung des Fischembryos, wodurch sich dieser unter dem Mikroskop nicht mehr bewegt. Danach wurde das gesamte Volumen so weit wie möglich entfernt und durch 200 µl einer 1,5%igen niedrig schmelzenden Agarose ersetzt. Um die Betäubung auch in der Agarose aufrecht zu halten wurden 10 µl der MS 222-Arbeitslösung hinzugefügt. Anschließend wurde der Fisch in der Agarose in der gewünschten Position mit einer Pinzette fixiert. Nach dem Erkalten der Agarose konnte der Zebrafischembryo unter dem Mikroskop untersucht werden.

3.1.8 DiAsp-Färbung

DiAsp (4 - Di - 2 - ASP) ist ein Fluoreszenzfarbstoff zur Färbung von Haarsinneszellen der oberflächlich liegenden Neuromasten von Zebrafisch-Embryonen. Die Substanz wurde zu einer Endkonzentration von 500 mM gelöst (Chen et al., 2011) und bei 4°C gelagert. Als Lösungsmittel wurde eine Mischung aus 50% DMSO in Reinstwasser verwendet. Zur Färbung der Haarsinneszellen wurden drei Tage alte Zebrafisch-Embryonen, die zuvor im Standard-Embryomedium + PTU inkubiert wurden, für 5 min in einer Petrischale mit Fischwasser, welches 5 mM DiAsp enthielt, gebadet. Anschließend wurden die Zebrafisch-Embryonen mehrmals mit frischem Standard-Embryomedium gebadet, um anhaftenden nicht

gebundenen Fluoreszenzfarbstoff zu entfernen. Anschließend wurde die Färbung der Haarsinneszellen mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops detektiert (Absorption/Emission = 488/607 nm).

3.1.9 Inhibition der Histon-Deacetylase (kurz HDAC)

Zur Inhibition der Histon-Deacetylase (HDAC) und der damit verbundenen Hemmung der Oligodendrozytenentwicklung in Zebrafischen wurde der HDAC-Inhibitor Trichostatin A (TSA) verwendet (Takada und Appel, 2010). 1 mg der Substanz wurde in 1 ml Methanol gelöst und bei -20°C gelagert. Für den experimentellen Versuch wurden Zebrafisch-Embryonen (Wildtyp) ab dem Zeitpunkt 30 hpf bis zum Tag 3 in Fischwasser mit 100 ng/ml TSA inkubiert. Als Negativkontrolle wurde Methanol in der adäquaten Menge verwendet. Drei Tage nach der Befruchtung wurden die Fische experimentell mittels RT-qPCR und der Whole-mount *in situ* Hybridisierung untersucht. Es wurden jeweils drei biologische Replikate untersucht mit jeweils 25 Zebrafisch-Embryonen.

3.2 Molekulargenetische Methoden

3.2.1 Isolation von genomischer DNA aus dem Zebrafisch

Die DNA-Extraktion erfolgte mithilfe des NucleoSpin Tissue Kits aus unterschiedlichen Zebrafischgeweben oder ganzen Zebrafisch-Embryonen. Die Zebrafische wurden zuvor mit MS 222 betäubt und getötet. Es wurden maximal 25 mg des jeweiligen Gewebes in ein Precellys-Homogenisations-Röhrchen (Precellys-Keramik-Kit 1,4 mm) überführt und mit 180 µl T1 Puffer und 25 µl Proteinnase K bei 5000 rpm für 10 Sekunden homogenisiert. Danach wurde das gesamte Röhrchen über Nacht bei 56°C im Eppendorf Thermomixer inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte nach der Lyse des Materials eine Zentrifugation bei 16.000 g für 15 Minuten, um unlösliche Bestandteile vom Überstand zu trennen. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wurden 210 µl Ethanol hinzugefügt. Der sich nach dem Vortexen gebildete schleimige Niederschlag wurde mit einer Pipettenspitze vorsichtig entfernt. Danach wurde der Überstand auf die Säule pipettiert und nach Anleitung des Herstellers weiterverarbeitet. Die gewonnene genomische DNA wurde bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.2 Isolation von Gesamt-RNA aus dem Zebrafisch

Zur Isolation von Gesamt-RNA wurden 50 bis 100 vollständige Zebrafisch-Embryonen mit MS 222 zuerst betäubt und anschließend mit einem Überschuss von MS 222 getötet. Danach wurden die Zebrafisch-Embryonen in ein Precellys®-Homogenisations-Röhrchen (Precellys-Keramik-Kit 1,4 mm) überführt und nach Entfernen des Fischwassers in flüssigem Stickstoff für wenige Sekunden schockgefroren. Im Anschluss daran wurde 1 ml Trizol®-Reagenz (Invitrogen) hinzugefügt und für 10 s bei 5000 rpm homogenisiert (Precellys 24). Die weitere Isolation erfolgte gemäß Anleitung des Trizol-Reagenzes. Die Isolation von Gesamt-RNA aus Gewebeteilen von erwachsenen Zebrafischen wurde analog durchgeführt. Anschließend wurde die Intaktheit der RNA im 0,8%igen Agarosegel überprüft und die extrahierte RNA bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

3.2.3 DNaseI-Verdau der Gesamt-RNA

Um restliche genomische DNA vollständig aus der Gesamt-RNA zu entfernen, wurde ein DNaseI-Verdau mithilfe RNase-freier DNaseI durchgeführt. Nach dem DNaseI-Verdau wurde die RNA mithilfe des NucleoSpin® RNA Clean-up Kits gemäß Herstelleranleitung aufgereinigt und aufkonzentriert. Die aufgereinigte RNA wurde bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

3.2.4 Quantifizierung von DNA und RNA

Photometrische Messung:

Zur Konzentrationsmessung wurden 2 µl des Eluats der DNA- bzw. RNA-Isolation mit 8 µl einer Pufferlösung (5 mM Tris, pH 8.5) verdünnt. Gegebenenfalls wurde eine höhere Verdünnung verwendet, sofern die Konzentration zum Messen zu groß war und daraus eine Fehlermeldung resultierte. Nach dem Vortexen und kurzem Zentrifugieren erfolgte die Konzentrationsmessung der DNA bzw. RNA mit dem „EppendorfBioPhotometer® D30“ bei einer Wellenlänge von 260 nm. Es wurden jeweils 3 µl der Verdünnung unter Verwendung der Küvette „Eppendorf µCuvette G1.0“ vermessen. Die Reinheit der Probe ergab sich aus dem Quotienten der Absorptionwerte bei 260 nm und 280 nm (A_{260}/A_{280}). Dieser Quotient sollte bei reiner DNA bei 1,8 und bei reiner RNA bei 2,0 liegen.

Fluorometrische Messung:

Die fluorometrische Quantifizierung von doppelsträngiger DNA erfolgte mithilfe des Qubit® dsDNA HS Assay Kits für den Messbereich von 10 pg/μl bis 100 ng/μl. Für die Quantifizierung von RNA wurde das Qubit® RNA HS Assay Kit für den Messbereich von 250 pg/μL bis 100 ng/μL verwendet. Beide Kits wurden gemäß der Anleitung des Herstellers verwendet. Die Proben wurden gegebenenfalls vorher verdünnt.

3.2.5 Isolation von Plasmid-DNA

Die Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* Zellen erfolgte je nach zu erzielender Plasmidmenge und Reinheit mit dem NucleoBond® Xtra Midi Kit, dem NucleoBond® Xtra Midi EF Kit oder dem NucleoSpin® Plasmid Kit gemäß Anleitung des Herstellers. Die isolierte Plasmid-DNA wurde mithilfe von Wasser für Injektionszwecke von der Säule eluiert. Zur Plasmidisolation für eine spätere Plasmid-Injektion in Fischereier wurde immer das Endotoxin-freie Aufreinigungskit NucleoBond® Xtra Midi EF verwendet.

3.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die größenabhängige Auftrennung von DNA- und RNA-Fragmenten erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese in horizontalen Elektrophoresekammern (Mini Submarine Gel Unit). In Abhängigkeit von der zu erwartenden Fragmentgrößen wurden unterschiedliche Agarosegele unter Verwendung von Standard- und Spezialagarosen hergestellt. Für Auftrennungen im Bereich von 250 bp bis 10.000 bp wurden 0,5-1,5%ige (w/v) Agarosegele mithilfe von Spezialagarose (Agarose LE) und TBE-Puffer hergestellt. Für Auftrennungen im Bereich von 10 bp bis 300 bp wurden 3%ige (w/v) Agarosegele mithilfe von Spezialagarose (Agarose Phor) und TBE-Puffer hergestellt. Bei der Gelherstellung wurde Ethidiumbromid im Verhältnis 1:25.000 direkt dem Gel hinzugegeben, nachdem dieses vorher in einer Mikrowelle aufgeköcht wurde. Der TBE-Puffer wurde anschließend auch als Laufpuffer verwendet. Zur Visualisierung des Voranschreitens der DNA-Auftrennung wurden verschiedene molekulare Marker verwendet (GeneRuler). Abschließend wurden die Agarosegele mithilfe von UV-Licht unter einem Detektionsgerät (Geldoc 2000) mit einer CCD-Kamera ausgewertet. Um aufgetrennte einzelne DNA-Fragmente mit einem Skalpell aus dem Agarosegel auszuschneiden, wurde das Gele auf einen Transilluminator gelegt (Dark

Reader Transilluminator). Anschließend erfolgte die Aufreinigung der DNA aus den Agarosegelblöcken.

3.2.7 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten oder enzymatischen Verdau-Ansätzen erfolgte mit dem PCR Clean-up Kit gemäß der Anleitung des Herstellers. DNA-Fragmenten, die aus dem Agarosegel ausgeschnitten wurden, wurden mithilfe des NucleoSpin® Gel Kits aufgereinigt und aufkonzentriert.

3.2.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) ist ein Standardverfahren zur Amplifizierung spezifischer DNA-Fragmente. Die Durchführung einer Standard-PCR erfolgte jeweils nach Anweisung des Herstellers und der Spezifikation der jeweiligen DNA-Polymerase im T100™ Thermal Cycler.

3.2.9 Restriktionsverdau von DNA

Der Restriktionsverdau erfolgte mit Restriktionsendonukleasen, welche definierte palindromische DNA-Sequenzen erkennen und anschließend den DNA-Doppelstrang hydrolytisch spalten. Der Restriktionsverdau wurde stets mit einer Ausgangsmenge von maximal 1 µg DNA in einem Ansatzvolumen von 50 µl berechnet. Bei einem Einfachverdau mit nur einem Restriktionsenzym wurde 1 µl des Restriktionsenzym und bei einem Doppelverdau jeweils 1 µl des Restriktionsenzym hinzugefügt. Der richtige Reaktionspuffer wurde in Abhängigkeit von den verwendeten Restriktionsenzymen ausgewählt und der Gesamtansatz bei 37°C über die Nacht oder für 1 Stunde inkubiert. Anschließend erfolgte die Hitzeinaktivierung des Restriktionsenzym je nach Anweisung des Herstellers. Danach wurde die DNA direkt zur Klonierung verwendet oder mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese das benötigte DNA-Fragment separiert, ausgeschnitten und aufgereinigt.

3.2.10 Dephosphorylierung

Um bei der Klonierung eine vorzeitige Re-Ligation des Plasmids zu verhindern, wurden die freien 5'-Phosphatgruppen des Plasmids durch Dephosphorylierung mithilfe einer alkalischen Phosphatase entfernt. Vor Beendigung des regulären Restriktionsverdaus des Plasmids wurde

dem Verdauansatz 1 µl alkalische Phosphatase hinzugefügt. Der gesamte Ansatz wurde für weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Aufreinigung des Restriktionsverdaus.

3.2.11 Ligation von DNA

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte mittels T4-DNA-Ligase gemäß der Anleitung des Ligationskits (Rapid DNA Ligation Kits) und wurde innerhalb von 5 Minuten durchgeführt. Das molare Verhältnis vom Insert und Vektor betrug stets 3:1 und wurde für jede Ligation berechnet (<http://www.insilico.uni-duesseldorf.de>). Der Ligationsansatz wurde sofort verwendet oder bis zur nächsten Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.12 Klonierung multipler DNA-Fragmente

Das Klonieren multipler DNA-Fragmente mithilfe des In-Fusion® HD Cloning Plus Kits ermöglicht die gleichzeitige Klonierung mehrerer DNA-Fragmente (z.B. PCR-Produkte) in einen linearisierten Vektor (Abbildung 3.4). Als Voraussetzung für diese Klonierung mussten die zu klonierenden DNA-Fragmente an beiden Enden komplementäre Überlappungsbereiche von 15 – 20 bp zum benachbarten DNA-Fragment bzw. zum Vektor aufweisen. Im Gegensatz zu einer „normalen Klonierung“ bietet das System die Möglichkeit, sehr lange DNA-Fragmente wie Promotorsequenzen ungeachtet passender Restriktionsschnittstellen in einem Schritt in einen Vektor zu ligieren. Außerdem können mit dieser Methode cDNA-Bibliotheken angelegt werden.

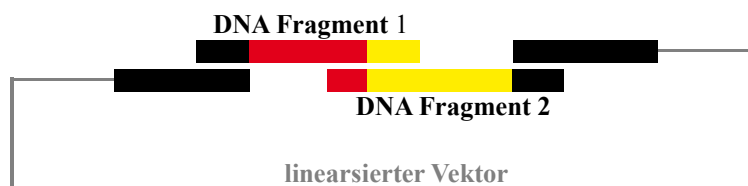


Abbildung 3.4: Schematisches Funktionsprinzip der Klonierung multipler DNA-Fragmente.

3.2.13 Transformation von chemokompetenten *E. coli*-Zellen

Für die Transformation wurden jeweils 50 µl der chemokompetenten *E. coli*-Zellen unterschiedlicher Hersteller verwendet (Subcloning Efficiency™ DH5α™ Competent Cells, NEB 5-alpha F'I^q Competent *E. coli* High Efficiency). Die Durchführung erfolgte gemäß der

Anleitungen der Hersteller. Der Transformationsansatz wurde auf LB Agar-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über die Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.14 Herstellung von Glycerinkulturen

Glycerinkulturen wurden in einem Endvolumen von 1 ml zu gleichen Teilen bestehend aus Glycerin und Kultur angelegt und schnellstmöglich bei -80°C eingefroren.

3.2.15 „Site-directed“ Mutagenese

Mithilfe der „Site-directed“ Mutagenese können einzelne Mutationen in der Sequenz eines Gens generiert werden. Dies erfolgte mittels „QuikChange® Lightning Site-Directed“ Mutagenese Kit gemäß der Anleitung des Herstellers. Dabei wurde das pcDNA.3.1 Plasmid als Grundlage für die Mutagenese verwendet. Die Oligonukleotide für die Mutagenese wurden mit dem Programm „QuikChange® Primer Design Program“ gestaltet.

3.2.16 Reverse Transkriptase (RT) - PCR

Die RT-PCR dient dem Nachweis genspezifischer RNAs und besteht aus zwei Schritten. Zunächst wird mithilfe einer RNA-abhängigen Polymerase, der Reversen Transkriptase, RNA in cDNA umgeschrieben. Im Anschluss daran wird die synthetisierte cDNA mittels PCR amplifiziert.

cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde mit dem Fertigkit „iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR“ durchgeführt. Der iScript™ RT Supermix enthält dabei neben der Reversen Transkriptase auch eine Mischung aus Oligo(dT)-Primern und Random-Hexamer-Primern. Folgender Ansatz wurde standardisiert verwendet:

cDNA-Synthese	
Gesamt-RNA	1 µg
iScript RT Supermix	4 µl
DEPC-Wasser	ad 20 µl

Dieser Ansatz wurde 5 min bei 25°C inkubiert, um eine Anlagerung der Primer an die RNA zu gewährleisten. Anschließend wurde der Ansatz bei 42°C für 30 min inkubiert. Im

Anschluss daran wurde die Reaktion durch eine terminale Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 85°C für 5 min gestoppt. Zur Gewährleistung konstanter Temperaturen bei den einzelnen Schritten wurden diese in einer PCR-Maschine durchgeführt. Die Negativkontrolle wurde mit einem Supermix hergestellt, der keine Reverse Transkriptase enthielt.

PCR

Zum Nachweis einer genspezifischen RNA wurde im zweiten Schritt die synthetisierte cDNA mittels PCR unter Verwendung genspezifischer Primer amplifiziert. Die genspezifischen Primer für die RT-PCR und RT-qPCR dieser Arbeit wurden so ausgewählt, dass jeder Primer vollständig auf einem Exon binden konnte und somit ein Intron flankiert wurde (Abbildung 3.5 B). Es wurden immer 2 µl der jeweiligen cDNA als Template-DNA eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden in einem 0,8%igen Agarosegel analysiert.

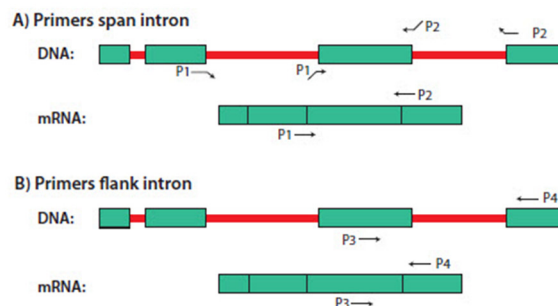


Abbildung 3.5: Unterschiedliches Primerdesign für die RT-PCR/RT-qPCR. Introns sind rot markiert, Exons grün. Bildquelle: Sigma-Aldrich Chemie GmbH; A Technical Guide to PCR Technologies.

3.2.17 Quantitative Real-Time PCR (RT-qPCR)

Im Gegensatz zur gewöhnlichen qualitativen Polymerase-Kettenreaktion (PCR), bei der es sich ausschließlich um eine Endpunktanalyse handelt, wird bei der RT-qPCR nach jedem Amplifikationszyklus ein Fluoreszenzsignal detektiert, was schließlich die Quantifizierung der amplifizierten mRNA-Transkripte ermöglicht. Dieser Effekt wird dadurch erreicht, dass dem RT-qPCR-Ansatz ein dritter Fluoreszenz-markierter Primer (Sonde/Probe) hinzugefügt wird, welcher zwischen dem Forward- und dem Revers-Primer bindet. Diese Sonde trägt am 5' Ende einen Erkennungsfarbstoff (Reporter Dye) und am 3' Ende einen sogenannten Quencher. Dieser Quencher inhibiert die natürliche Fluoreszenz des Reporter Dyes mittels des Förster-Resonanzenergietransfer (Abbildung 3.6), solange beide in engem Kontakt

miteinander stehen. Durch die hydrolytische Abspaltung des 5' Reporters durch die Polymerase kommt es zur Unterbrechung des Förster-Resonanzenergietransfers und somit zur Emission der Fluoreszenz.

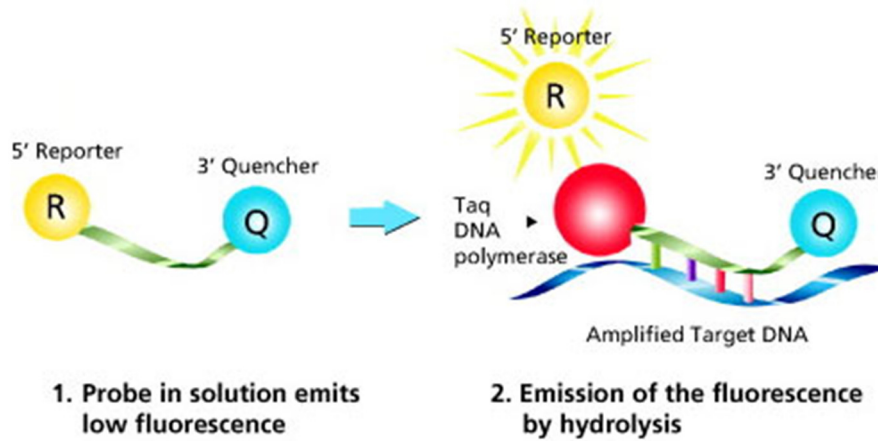


Abbildung 3.6: Funktionsweise des Förster-Resonanzenergietransfer (FRET). Die gemessene Fluoreszenz ist direkt proportional zur Menge der DNA (Bildquelle: Sigma-Aldrich Chemie GmbH).

Zur Detektion können verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe unterschiedlicher Absorption- und Emissionswellenlängen verwendet werden. Grundsätzlich stehen zwei Methoden zur quantitativen Genexpressionanalyse zur Verfügung, die relative- und die absolute Quantifizierung. Bei beiden Methoden müssen die erhaltenen Werte normalisiert werden, um eine Vielzahl von variablen Parametern bei der Probengewinnung und experimentellen Durchführung mit einzubeziehen. Die Normalisierung kann über die genaue Zellzahl der Probe, über die genaue Masse an Nukleinsäuren oder über Referenzgene erfolgen. Die absolute Quantifizierung nutzt häufig einen internen oder externen Standard bekannter Konzentration. Die relative Quantifizierung basiert hingegen auf der relativen Expression eines Zielgens im Vergleich zu einem oder mehreren Referenzgenen. Idealerweise sollte sich die Expression der Referenzgene zwischen den unterschiedlichen Proben und Probenzubereitungen nicht unterscheiden (Vandesompele et al., 2002; Huggett et al., 2005). Bei der relativen Quantifizierung haben sich zwei Methoden etabliert, die $\Delta\Delta C_q$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001) und die davon abgewandelte effizienz-korrigierte Methode (Pfaffl, 2001; Pfaffl et al., 2002). Bei der $\Delta\Delta C_q$ -Methode geht man davon aus, dass die PCR-Effizienz für das Zielgen und das Referenzgen jeweils annähernd einen idealen Wert von $E=2$ aufweist, was bedeutet, dass sich nach jedem Real-Time-PCR-Zyklus sowohl die DNA-Produktmenge als auch die Intensität des Fluoreszenzsignals in allen Proben konstant

verdoppelt. Bei der Berechnung wird die Expression des Zielgens ($Cq_{Zielgen}$) mithilfe der Expression eines internen Referenzgens ($Cq_{Referenzgen}$) normalisiert. Diese Normalisierung wird sowohl in der Behandlungsgruppe als auch in der Kontrollgruppe durchgeführt. In einem zweiten Schritt erfolgt der Vergleich der beiden normalisierten Expressionswerte und man erhält den $\Delta\Delta Cq$ -Wert. Der Expressionsunterschied (R) der relativen Quantifizierung wird anschließend mit der folgenden Formel berechnet (Livak und Schmittgen, 2001):

Behandlungs-/Kontrollgruppe

$$\Delta Cq = Cq_{Zielgen} - Cq_{Referenzgen}$$

$$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq_{Behandlungsgruppe} - \Delta Cq_{Kontrollgruppe}$$

$$R = 2^{-\Delta\Delta Cq}$$

Die von der $\Delta\Delta Cq$ -Methode abgewandelte Berechnungsmethode berücksichtigt die unterschiedlichen PCR-Effizienzen der jeweiligen Ziel- bzw. Referenzgene, da ideale konstante Effizienzwerte von $E=2$, aufgrund von Inhibitoren und weiteren Einflussfaktoren, in den PCR-Ansätzen selten erreicht werden können (Pfaffl, 2001; Pfaffl et al., 2002). Die effizienz-korrigierte relative Quantifizierungsmethode mithilfe mehrerer Referenzgenen ist gemäß den MIQE-Richtlinien (Bustin et al., 2013) die Methode der ersten Wahl und wurde in dieser Arbeit auch zur Berechnung verwendet. Zur Ermittlung der PCR-Effizienz E für jedes Gen (Zielgene und Referenzgene) wurde jeweils eine Standardkurve aus den Cq-Werten, die sich bei der RT-qPCR unterschiedlicher Verdünnungsstufen der cDNA (100 ng – 0,195 ng, jeweils 1:2 verdünnt) ergaben, ermittelt. Die PCR-Effizienz des jeweiligen Gens ergab sich schließlich aus der Steigung der jeweiligen Standardkurve ($E=10^{(-1/\text{Steigung})}$). Der dazugehörige „Single-Threshold-Value“ markiert einen numerischen Punkt, an dem die Fluoreszenz signifikant oberhalb des Hintergrundsignals liegt. Ziel war es, Effizienzwerte zwischen 90% ($E=1,90$) und 110% ($E=2,10$) zu erhalten. Der Expressionsunterschied (R) der effizienz-korrigierten relativen Quantifizierungsmethode wurde anschließend mit der folgenden Formel berechnet:

$$R = \frac{(E_{Zielgen})^{\Delta Cq_{Zielgen} (Kontrolle-Behandlung)}}{(E_{Referenzgen})^{\Delta Cq_{Referenzgen} (Kontrolle-Behandlung)}}$$

Die statistische Auswertung der RT-qPCR-Ergebnisse erfolgte mit der Software „qBase⁺“ und dem darin enthaltenen „geNorm-Algorithmus“ (Vandesompele et al., 2002). Dafür wurden die Rohdaten von der Real-Time-PCR-Maschine entsprechend der Effizienzwerte basislinienkorrigiert und anschließend mit der Software „qBase⁺“ ausgewertet. Normalisiert wurden alle Messungen auf zwei Referenzgene.

Tabelle 3.1: Einteilung der unterschiedlichen Expressionslevel (Quelle: TaqMan Multiplex PCR Optimization. Publication Part Number: MAN0010189).

Expressionslevel	Cq-Bereich
Hoch	$Cq \leq 20$
Mittel	$20 < Cq \leq 27$
Niedrig	$27 < Cq \leq 35$
Kontrolle	$Cq > 35$

Tabelle 3.2: Das in dieser Arbeit verwendete Standard-Pipettierschema (Gesamtvolumen 20 µl).

	Stock-Konzentration	Finale Konzentration	Volumen
DyNAmo TM Flash Probe qPCR Kit	2 x	1 x	10 µl
Forward Primer	25 µmol/l	0,5 µmol/l	0,4 µl
Reverse Primer	25 µmol/l	0,5 µmol/l	0,4 µl
Sonde	25 µmol/l	0,2 µmol/l	0,2 µl
Wasser	-	-	7 µl
cDNA	-	-	2 µl

Tabelle 3.3: Das in dieser Arbeit verwendete PCR-Programm.

Schritt	Temperatur	Dauer in Minuten	
1.	95°C	7:00	Initiale Denaturierung
2.	95°C	0:05	Denaturierung*
3.	60°C	0:30	Annealing / Elongation*
4.	-	-	Detektion des Fluoreszenzsignal*
5.	4°C	∞	

* 40 Zyklen (Schritt 2-4)

3.2.18 5' RACE PCR

Die RACE-PCR dient der „schnellen“ Amplifizierung der cDNA-Enden (engl.: rapid amplification of cDNA ends) und somit der Charakterisierung des 5' Endes einer spezifischen mRNA. Das Prinzip der 5' RACE-PCR ist in Abbildung 3.7 dargestellt. Die 5' RACE-PCR besteht aus der cDNA-Synthese, dem Poly-A-Tailing der einzelsträngigen cDNA und der Amplifizierung der dA-getailten cDNA durch eine Standard-PCR. Die 5' RACE-PCR wurde mithilfe des 5'/3' RACE Kits, 2nd Generation (Roche Applied Science GmbH) nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Im ersten Schritt wurde die Gesamt-RNA mithilfe des Enzyms „Reverse Transkriptase“ und einem genspezifischen Primer (SP1) in einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Hierfür wurden 1 µg Gesamt-RNA aus dem Zebrafisch (Wildtyp) verwendet. Die Degradierung der RNA erfolgte während des Schrittes der cDNA-Synthese durch die RNase H-Aktivität der Reversen Transkriptase. Nach der Aufreinigung der synthetisierten cDNA mithilfe des „High Pure PCR Product Purification“-Kits (Bestandteil des 5'/3' RACE Kit, 2nd Generation) erfolgte das Poly(A)-Tailing am 3' Ende der synthetisierten cDNA nach Anweisung des Herstellers durch die Zugabe von dATP und Terminaler Transferase.

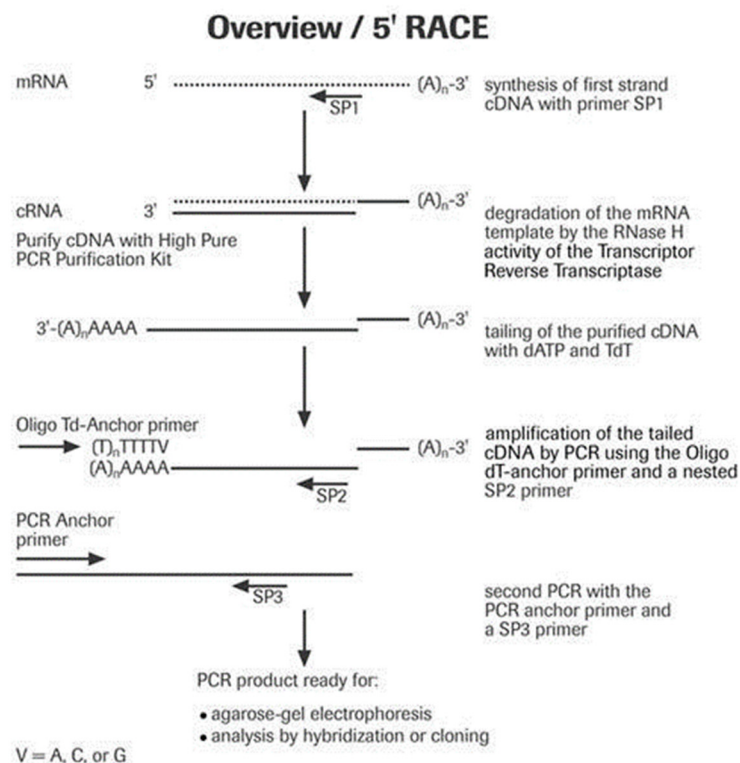


Abbildung 3.7: Schematische Darstellung der 5' RACE-PCR (Abbildung: Roche Applied Science GmbH).

Im dritten Schritt wurde die dA-getailte cDNA mithilfe der Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase unter Verwendung des Oligo dT-Anchor Primers und eines weiteren genspezifischen Primers (SP2) nach folgendem Schema amplifiziert:

Pipettierschema 1. RACE-PCR

dA-getailte cDNA	5 µl
Oligo dT-Anchor Primer	1 µl
SP2	1 µl
dNTP-Mix	1 µl
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase	1 µl
Phusion High-Fidelity Buffer	10 µl
RNase-freies Wasser	ad 50 µl

PCR-Programm 1. RACE-PCR

Schritt 1	Initiale Denaturierung	98°C	30 s
Schritt 2	Denaturierung	98°C	10 s
Schritt 3	Primerhybridisierung	60°C	20 s
Schritt 4	Elongation	72°C	40 s
Schritt 5	Schritt 2 bis Schritt 4 (10-mal)		
Schritt 6	Denaturierung,	98°C	10 s
Schritt 7	Primerhybridisierung	60°C	20 s
Schritt 8	Elongation	72°C	40 s + je 5 s in Schritt 8
Schritt 9	Schritt 6 bis Schritt 8 (25-mal)		
Schritt 10	Finale Elongation	72°C	5 min
Schritt 11		4°C	∞

Die PCR-Produkte dieser 1. RACE-PCR wurden anschließend mithilfe eines 1%igen Agarosegels analysiert. Bei Bedarf wurden die Banden aus dem Gel eluiert und in einer 2. RACE-PCR (nested-PCR) unter Verwendung des PCR Anchor Primers und eines dritten genspezifischen Primers (SP3) erneut amplifiziert:

Pipettierschema 2. RACE-PCR

PCR-Produkt der 1. RACE-PCR	1 µl
PCR-Anchor Primer	1 µl
SP3	1 µl
dNTP-Mix	1 µl
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase	1 µl
Phusion High-Fidelity Buffer	10 µl
RNase-freies Wasser	ad 50 µl

PCR-Programm 2. RACE-PCR

Schritt 1	Initiale Denaturierung	98°C	30 s
Schritt 2	Denaturierung	98°C	10 s
Schritt 3	Primerhybridisierung	60°C	30 s
Schritt 4	Elongation	72°C	30 s
Schritt 5	Schritt 2 bis Schritt 4 (35-mal)		
Schritt 6	Finale Elongation	72°C	7 min
Schritt 7		4°C	∞

Die entstandenen PCR-Produkte wurden erneut mithilfe eines 1%igen Agarosegels analysiert, aus dem Gel eluiert, aufgereinigt (NucleoSpin Gel and PCR Clean-up) und mithilfe des zuletzt verwendeten genspezifischen Primers (SP2 oder SP3) sequenziert, um das 5' Ende des untersuchten Genes zu ermitteln.

3.2.19 DNA-Sequenzierung

Für Standardsequenzierungen wurde der Service der Firma GATC Biotech AG aus Konstanz verwendet. Anspruchsvollere Sequenzierungen, beispielsweise für die RACE-PCR, wurden von der Firma Sequiserve GmbH aus Vaterstetten durchgeführt.

3.2.20 *In vitro* Transkription

Die *in vitro* Transkription wurde in dieser Arbeit als Voraussetzung für die Whole-mount *in situ* Hybridisierung (siehe Kapitel 3.1.6) benötigt, um Digoxigenin-markierte RNA-Sonden

des Hauptstranges und Gegenstranges einer Gensequenz (Sense und Antisense) zu generieren. Die *in vitro* Transkription wurde weitestgehend gemäß dem Protokoll der Firma Roche „DIG Application Manual for Nonradioactive In Situ Hybridization, 4th Edition, Chapter 4, V“ durchgeführt. Für die *in vitro* Transkription wurde die zu transkribierende Gensequenz in ein geeignetes Plasmid wie z.B. pBluescript II SK (-) kloniert, dessen multiple Klonierungsstelle am 5' Ende bzw. am 3' Ende durch die Erkennungssequenzen für später verwendete RNA-Polymerasen (z.B. SP6, T7, T3) flankiert wird. Nach erfolgreicher Transformation des jeweiligen Plasmids in *E. coli* DH5 α und anschließender Plasmidisolierung mit dem NucleoBond Xtra Midi-Kit wurde das Plasmid zunächst mit zwei verschiedenen nah beieinander schneidenden Restriktionsenzymen am 5' Ende oder am 3' Ende der multiplen Klonierungsstelle linearisiert, je nachdem ob anschließend der Hauptstrang (Restriktion am 3' Ende) oder der Gegenstrang (Restriktion am 5' Ende) des Plasmidinserts transkribiert werden sollte. Der Verdau wurde mit dem NucleoSpin Gel and PCR Clean-up-Kit aufgereinigt. Je nach Klonierungsmethode bzw. Richtung der Gensequenz im Plasmid wurde die RNA-Polymerase T7, T3 oder SP6 unter Verwendung des DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)-Kits für die *in vitro* Transkription verwendet. Die abschließende Fällung der Digoxigenin-markierten synthetisierten RNA erfolgte mit Lithiumchlorid (siehe DIG Application Manual for Nonradioactive In Situ Hybridization 4th Edition, Roche). Das im Mikrozentrifugenröhrchen entstandene Pellet wurde für eine Stunde unter der Sterilbank im geöffneten Gefäß auf einer Mischung aus Eis und Trockeneis getrocknet, in 100 μ l DEPC-Wasser aufgenommen und bei -80°C gelagert. Zur Überprüfung der *in vitro* Transkription wurde ein 1%iges Agarosegel mit TBE-Puffer gegossen. Zuvor wurde die Elektrophoresekammer mit Spülmittel und warmen Wasser gründlich gereinigt. Nach einer Vorlaufzeit bei 90 Volt für 15 min wurde das Gemisch aus 5 μ l Eluat + 2 μ l Ladepuffer aufgetragen und für 1 h bei 70 Volt im Agarosegel aufgetrennt. Anschließend konnte der Erfolg der *in vitro* Transkription sowie die Reinheit und Größe der Digoxigenin-markierten RNA-Sonde überprüft werden.

3.2.21 FACS-Analyse

Mithilfe der FACS-Analyse (fluorescence-activated cell sorting) können Fluoreszenz-markierte Zellen hinsichtlich ihrer Fluoreszenz von anderen Zellen getrennt und weiter analysiert werden. In dieser Arbeit wurde für die FACS-Analyse die transgene Fischlinie *Tg(olig2:EGFP)* verwendet. Die Vorbereitung der Proben für die FACS-Analyse inklusive

der Dissoziation der Gesamtzellen des Zebrafisches in Einzelzellen wurde gemäß dem Protokoll von Manoli und Driever (2012) durchgeführt. Die Sortierung der Zellen auf Basis der Durchflusszytometrie erfolgte an der Flow Cytometry Core Facility (FCCF) der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn (Arbeitsgruppe Dr. Elmar Endl) und am Limes-Institut der Universität Bonn (AG Dr. Andreas Schlitzer). Die Trennung der dissoziierten einzelnen Zellen erfolgte in EGFP-positive Zellen und in EGFP-negative Zellen. Aus den getrennten Zellen wurde im Anschluss die RNA extrahiert und mittels RT-qPCR weiter analysiert.

3.3 Weitere Methoden

3.3.1 Proteingewinnung aus Zebrafischen

Zur Isolierung von Proteinen aus ganzen Zebrafischen wurden die lebenden Zebrafische entsprechend dem zu analysierenden Entwicklungszeitpunkt mit einer Pasteurpipette in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und mit einigen Tropfen MS 222 betäubt und letztendlich getötet. Nach Entfernung des überstehenden Fischwassers folgte die Schockfrostung des 1,5 ml Eppendorfgefäßes mit dem verbleibenden Fischpellet in flüssigem Stickstoff. Danach wurden dem Fischpellet 200 µl Lysierungspuffer (RIPA Lysis and Extraction Buffer), sowie 8 µl eines Proteaseinhibitors (Complete Protease Inhibitor) hinzugefügt. Der gesamte Inhalt wurde in ein Precellys- Homogenisations-Röhrchen (Precellys-Keramik-Kit 1,4 mm) überführt. Die Probe wurde anschließend im Precellys 24 Homogenisator bei Raumtemperatur für 10 s bei 5000 rpm homogenisiert. Aufgrund der starken Schaumentwicklung wurde der gesamte Inhalt des Röhrchen inklusive der noch enthaltenen Homogenisationskugeln für 10 s mit der Tischzentrifuge (PerfectSpin Mini) zentrifugiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 5 h bei 4°C im Kühlschrank. Danach wurde der gesamte Inhalt des Röhrchens in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und für 15 min bei 4°C und 15.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand, der nun das isolierte Proteingemisch enthielt, wurde abgenommen, in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und nach der Bestimmung der Proteinkonzentration (siehe Kapitel 3.3.2) bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte auf Grundlage der bekannten Biuretreaktion mithilfe des Pierce BCA Protein Assay Kits. Das einzusetzende Volumen von 100 µl für die Proteinbestimmung wurde gegebenenfalls durch eine 1:10-Verdünnung der Probe mit Reinstwasser (10 µl Proteinprobe + 90 µl Reinstwasser) erreicht. Die Standards wurden ebenfalls mit Reinstwasser hergestellt. Die Arbeitslösung des Kits (50:1, Reagenz A:B) wurde nach der angloamerikanischen Berechnungsmethode hergestellt: 50 ml Reagenz A und 1 ml Reagenz B. Anschließend wurden die zu messenden Proben sowie die Standards in Einmalküvetten (Eppendorf® Vis Cuvette Makroküvette) überführt, mit 2 ml der Arbeitslösung gut vermischt und bei 37°C für 30 min inkubiert. Danach wurde die Küvette für 5 min auf Raumtemperatur abgekühlt. Jede Messung wurde mit Reinstwasser kalibriert. Nach der Abkühlphase wurden alle Standards und Proben innerhalb von 10 min photometrisch mithilfe des Eppendorf BioPhotometer® D30 vermessen. Die Messergebnisse der Standards und der Proben wurden im Photometer gespeichert und automatisch berechnet. Der Standard wurde für weitere Messungen im Photometer hinterlegt. Die Probenvolumen von 100 µl wurde so hergestellt bzw. so mit Reinstwasser verdünnt, dass die Absorption der Messung innerhalb des Arbeitsbereiches des Standards (20-2000 µg/ml) lag.

3.3.3 Westernblot

Die isolierten Proteine aus dem Zebrafisch wurden mithilfe der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt und auf Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membranen geblottet. Zum Gießen der 1 mm dicken Gele und für die Elektrophorese wurde das Mini-PROTEAN® Tetra Cell-System mit den darin angegebenen Lösungen gemäß der Anleitung des Herstellers verwendet. Die Trenngele wurden mit 10er-Kämmen abhängig von der Proteingröße in Konzentrationen von 9 - 12% und die Sammelgele in Konzentrationen von 5% jeweils frisch hergestellt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele aus den Glasplatten gelöst und zweimal für 7 min in Towbin-Transfer-Buffer equilibriert. Zum Blotten wurde das Trans-Blot Turbo Blotting System mit dem 30-minütigen Standard Semi-Dry Verfahren verwendet. In jeder der zwei Blotting-Kammern konnten zwei Gele entsprechend des Formates „Mini“ geblottet werden. Die PVDF-Membranen wurden in Größen von 6 cm x 8,3 cm entsprechend des Trenngels vorgeschritten, mit einem Bleistift markiert, für 30 s unter dem Abzug in Methanol aktiviert, für 2 min in Reinstwasser

gewaschen und abschließend ebenfalls für 10 min in Towbin-Transfer-Buffer equilibriert. Der Zusammenbau jedes einzelnen Blots erfolgte von der Anode zur Kathode der Blotting-Kammer in der folgenden Reihenfolge: ein in Towbin-Transfer-Buffer getränktes 2,4 mm starkes „Extra Thick Blot Paper“-Filterpapier, die PVDF-Membran, das Gel und erneut ein in Towbin-Transfer-Buffer getränktes 2,4 mm starkes „Extra Thick Blot Paper“-Filterpapier. Nach dem 30-minütigen Blot wurde die PVDF-Membranen für 2 min in 15 ml TBS gewaschen und für 1 h bei Raumtemperatur entweder in 50 ml 5%igen Milchpulver „Non-Fat Dry Milk“ oder 5 %igen Rinderserumalbumin in TBS blockiert. Nach dem Blockieren wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit dem ersten Antikörper (gelöst in TBS) inkubiert. Anschließend wurden die Membranen dreimal für 10 min in TBS gewaschen und es folgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper (HRP-konjugiert) bei Raumtemperatur für 1-3 h. Der zweite Antikörper wurde im Verhältnis 1:20.000 mit 0,5%igen Milchpulver in TBS verdünnt. Nach mehrmaligem Waschen in TBS wurde anschließend der gebundene Antikörper mit dem Chemilumineszenz-Substrat SuperSignal West Pico im ImageQuant LAS 400 mini detektiert.

3.3.4 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz ist eine Methode zum Nachweis bestimmter Proteinstrukturen mithilfe Fluoreszenz-markierter Antikörper. Als Voraussetzung für die Immunfluoreszenz wurden zunächst HEK 293-Zellen (Kapitel 3.4.2) oder PAC2-Zebrafisch-Fibroblasten (Kapitel 3.4.1) auf Deckgläsern unter entsprechenden Bedingungen kultiviert. Nach dem Erreichen einer Zelldichte von ca. 80% wurde das Zellmedium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und für 15 min in 4%igem PFA fixiert. Die fixierten Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und anschließend für 10 min in einer Lösung von 0,25% Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Danach folgten drei Waschschritte mit PBS und die Inkubation für 1 h in der Blockierlösung (1% BSA, 10% Ziegenserum, PBS). Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper (verdünnt in der Blockierlösung) über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurde die Antikörperlösung von den Zellen entfernt und dreimal mit PBS gewaschen. Danach folgte die einstündige Inkubation mit dem zweiten Antikörper verdünnt in der Blockierlösung. Abschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und auf einen Glasobjektträger in Mowiol eingebettet. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mit dem Axioskop 2 und der Coolsnap EZ Kamera betrachtet und ausgewertet.

3.3.5 Dynamische Massenumverteilung

Die Corning Epic Technologie (www.corning.com) basiert auf der Messung der dynamischen Massenumverteilung (Dynamic Mass Redistribution, DMR) innerhalb einer ganzen Zelle, die beispielsweise der Erfassung der Signalwegsaktivierung ($G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_s$, $G\alpha_{q/11}$ and $G\alpha_{12/13}$) eines 7-transmembranären Rezeptors durch einen Agonisten dient (Abbildung 3.8). Die Technik ist dafür geeignet, zellbasierte- und biochemische Experimente durchzuführen. Bei zellbasierten Experimenten können rekombinante Zellen und native Zellen/Zelllinien, wie z.B. HEK 293-Zellen oder Primärzellen, verwendet werden.

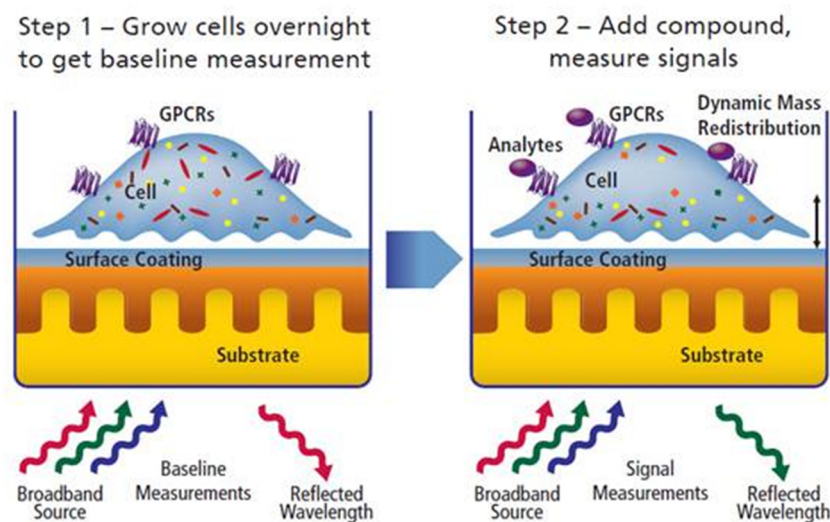


Abbildung 3.8 Schematische Darstellung der Corning® Epic® Technologie (Bildquelle: <http://www.perkinelmer.com>).

Kernstück der Technologie ist ein optischer Biosensor (Resonant Waveguide Grating Biosensor) im Boden von 96-Well oder 384-Well Mikroplatten (Corning® Epic® 384 Well), der die Massenumverteilung detektiert (Schröder et al., 2011). Bei dieser Methode handelt es sich um eine markierungsfreie Methode (label-free), das heißt, die Proben müssen nicht mit Digoxigenin oder anderweitig markiert werden. Die dynamische Massenumverteilung innerhalb der Zelle verursacht eine Änderung des Brechungsindexes und damit verbunden eine Änderung der reflektierten Wellenlänge. Die Änderung der Wellenlänge wird als „Response“ (R) bezeichnet und in der Dimension Pikometer (pm) angegeben.

Probenvorbereitung und Messung

Am Vortag der Messung wurden native oder transfizierte HEK 293-Zellen in einer Zelldichte von 18.000 je Well in eine mit Fibronectin beschichtete 384-Well-Platte mit Biosensor (Sensorplatte) in 30 μl Medium ausgesät (siehe Kapitel 3.4.2). Anschließend wurde die gesamte Platte für 30 s bei 120 x g zentrifugiert. Die Inkubation der Sensorplatte erfolgte über Nacht im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt. Am nächsten Tag erfolgte kurz vor dem Erreichen der konfluenten Wachstumsphase das Absaugen des Mediums mit einem Manifold (Absaugvorrichtung), so dass pro Well nach dem Absaugen immer ein Restvolumen von 10 μl vorhanden war. Anschließend erfolgte ein zweimaliges Waschen mit 30 μl des Probenpuffers (HBSS + 20 mM HEPES + 0,4% DMSO) und jeweils ein Absaugen mit dem Manifold. Im nächsten Schritt wurden 20 μl Probenpuffer auf die verbliebenen 10 μl aus dem Waschschrift davor hinzugegeben (Gesamtvolumen pro Well 30 μl). Vor der Inkubation der gesamten Sensorplatte bei 28°C für 1 h wurde die Platte erneut bei 120 x g für 30 s zentrifugiert. Während der Inkubationszeit wurde die zu applizierende Substanz so vorbereitet, dass jedes Well einer neuen 384-Well-Platte (Compound-Platte) 20 μl der zu applizierenden Substanz in der 4-fachen Konzentration der gewünschten Endkonzentration gelöst im Probenpuffer enthielt. Die Compound-Platte wurde für 1 h bei 28°C inkubiert. Vor der Durchführung der Messung erfolgte für 300 s eine initiale Normalisierung (baseline read) jedes einzelnen Wells der 384-Well-Platte mit den Zellen. Ausgehend von den normalisierten Werten pro Well erfolgte anschließend die finale Messung nach der Zugabe von jeweils 10 μl von der Compound-Platte auf die Sensorplatte. Nach der Zugabe des Wirkstoffes wurde die dynamische Massenumverteilung (Änderung der Wellenlänge im Vergleich zum baseline read) innerhalb von 60 bis 120 min durch das System gemessen. Zur Kontrolle der Zellviabilität der ausgesäten transfizierten und nativen HEK 293-Zellen wurde die Substanz Carbachol verwendet. Carbachol wirkt in HEK 293-Zellen über endogen exprimierte muskarinerge Rezeptoren.

3.3.6 Statistik

Zur Ermittlung von Signifikanzen wurde stets von einer Normalverteilung der Werte aus drei Replikaten ausgegangen und ein ungepaarter t-Test durchgeführt. Ein p-Wert von $\leq 0,05$ zeigte eine statistische Signifikanz an.

3.4 Zellkultur

3.4.1 PAC2-Zebrafisch-Fibroblasten

Die aus 24 h alten Zebrafisch-Embryonen gewonnenen, adhärent wachsenden PAC2-Zebrafisch-Fibroblasten (Culp, 1994; Amsterdam et al., 1999; Chen et al., 2002; Senghaas and Koster, 2009) wurden in unterschiedlich großen Zellkulturflaschen bei einer Raumtemperatur von 20-25°C inkubiert. Dabei wurden die Zellkulturflaschen in luftdicht verschlossenen Transportbehältern (DURAPorter) zur Vermeidung von Kontaminationen der Gefäßoberflächen im Raum der Zellkultur aufbewahrt. Die Transportbehälter wurden ausschließlich unter der Sterilbank geöffnet und geschlossen. Die PAC2-Zellen wurden bei Bedarf nach dem Erreichen einer Konfluenz einmal pro Woche passagiert (umgesetzt). Es war jedoch auch möglich die konfluent gewachsenen PAC2-Zellen ohne Passagieren bis zu einen Monat aufzubewahren (Vallone et al., 2007). In diesem Fall wurde einmal pro Woche das Medium gewechselt (Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4: Zusammensetzung des Mediums zur Kultivierung von PAC2-Zellen.

Produktname	Volumen	Endkonzentration
Leibovitz L-15	500 ml	90 %
Rinderserumalbumin	+ 50 ml	9 %
Penicillin/Streptomycin	+ 5 ml	0,9 %
Gentamycin	+ 0,5 ml	0,09 %
Gesamtvolumen	555,5 ml	ca. 100 %

Zur Vervielfältigung der PAC2-Zellen wurde die mit PAC2-Zellen konfluent bewachsene Zellkulturflasche mit DPBS kurz gewaschen. Anschließend wurde zum Ablösen der Zellen vom Gefäßboden für 5 min 1 ml einer Trypsin-EDTA-Lösung (0,5 % Trypsin-EDTA (10x), no Phenol Red) hinzugefügt. Es durfte jedoch maximal so viel Trypsin-EDTA-Lösung dazugegeben werden, dass der Gefäßboden gerade so benetzt war. Nach dem Ablösen der Zellen vom Gefäßboden wurde die Wirkung der Trypsin-EDTA-Lösung durch die Zugabe von PAC2-Medium gestoppt. Die Zellen wurden anschließend im Verhältnis 1:2 oder 1:4 in neue Zellkulturflaschen ausgesät. Am Folgetag wurde zum Entfernen abgestorbener Zellen das Medium gewechselt. Die transiente Transfektion von PAC2-Zellen erfolgte mittels

Elektroporation (Amaya Nucleofector II) unter Verwendung des Transfektionskits „V“ (Amaya Cell Line Nucleofector Kit V) und dem dazugehörigem Elektroporation-Programm T27 (He et al., 2006). Zur Vorbereitung der Elektroporation wurde 3 Tage vor der Durchführung der Elektroporation eine mit PAC2-Zellen konfluent gewachsene Zellkulturflasche im Verhältnis 1:2 neu ausgesät. Die Aussaat von einer Zelldichte von 50% ermöglichte ein exponentielles Wachstum. Am Tag der Transfektion wurden die Zellen mit DPBS gewaschen und zum Ablösen vom Gefäßboden trypsiniert. Die Trypsinierung wurde mit einem Überschuss von PAC2-Medium gestoppt. Anschließend wurden die Zellen bei 100 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in frischem PAC2-Medium wieder aufgenommen. Für jede einzelne Elektroporation wurden eine Million Zellen bei 100 x g zentrifugiert und das Pellet in 100 µl der Nucleofector-Lösung des Kits resuspendiert. Im Anschluss daran erfolgte die Elektroporation nach Anweisung des Herstellers mit 1 µg DNA und danach das Ausplattieren in 12-Well-Platten in frischem Medium.

3.4.2 Humane embryonale Nierenepithelzellen (HEK 293-Zellen)

Die Kultivierung der HEK 293-Zellen erfolgte nach Standardmethoden in der Zellkultur. Die transiente Transfektion wurde mittels Calciumphosphat-Transfektion unter Verwendung des Calcium Phosphate Transfection Kits (Fisher Scientific Germany GmbH) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Calciumphosphat-Transfektion basiert auf der Bildung von Calciumphosphat-DNA Präzipitaten, die anschließend durch Endozytose in die Zelle aufgenommen werden. Für jede transiente Transfektion wurden 3,5 bis 4,5 Millionen HEK 293-Zellen in 10 cm Petrischalen ausgesät. 24 h nach der Aussaat (Tag 2) erfolgte die Transfektion gemäß dem Protokoll des Herstellers. Am folgenden Tag (Tag 3) erfolgte die Aussaat auf beschichtete Deckgläser oder auf spezielle Platten für die Messungen der dynamischen Massenumverteilung (siehe Kapitel 3.3.5).

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung von Gpr17 im Zebrafisch

4.1.1 Datenbankrecherche zu Gpr17

Um die bisherige Datenlage zum genetischen Hintergrund von *gpr17* im Zebrafisch zu erfassen, wurden zunächst verschiedene Genombrowser dahingehend durchsucht. Die Datenbankrecherche unter Verwendung des automatisierten Genombrowser „Ensembl“ (www.ensembl.org) ergab ein Gen mit dem Namen *gpr17* (ZDB-GENE-100922-133) im Zebrafisch. Das Gen ist auf dem Hauptstrang von Chromosom 6 an den Positionen 28.133.832 bis 28.134.851 (Genome assembly: GRCz10; GCA_000002035.3) lokalisiert und besteht aus nur einem Transkript. Laut der Ensembl-Datenbank besteht dieses *gpr17*-Transkript (Transkript-Identifizierungsnummer: ENSDART00000089195) ausschließlich aus einem Exon, welches zunächst nur den ORF von 1020 bp abbildet und keine weiteren untranslatierten Regionen am 5'- bzw. 3' Ende enthält. Identische Angaben für das *gpr17*-Gen lieferte der manuell annotierte Genombrowser Vega (Vertebrate genome annotation, <http://vega.sanger.ac.uk/index.html>) mit der Transkript-Identifizierungsnummer OTTDART00000043780. Anschließend wurde die kurze Form des humanen GPR17-Proteins (339 aa) auf Proteinebene gegen das gesamte Zebrafischgenom (GRCz10) geblastet (Bläsius et al., 1998). In dieser Arbeit wird die Bezeichnung GPR17 für die kurze Form des humanen GPR17-Proteins verwendet. Dieser Blast bestätigte mit der ersten Position des Blast-Ergebnisses das Vorhandensein eines orthologen *gpr17*-Gens im Zebrafisch (ZDB-GENE-100922-133), dessen Proteinsequenz ebenfalls aus 339 Aminosäuren besteht und eine Übereinstimmung von 55% im Vergleich zum humanen GPR17 aufweist. Dieses *gpr17*-Gen wird in dieser Arbeit nachfolgend als *gpr17a* bezeichnet. Abbildung 4.1 zeigt das „Alignment“ zwischen Gpr17a und dem humanen GPR17 auf Proteinebene, welches mit der webbasierten kostenlosen Software „Clustal Omega“ (<http://www.clustal.org/omega/>) (McWilliam et al., 2013) durchgeführt wurde. Des Weiteren wurden die Proteinstrukturen von Gpr17a aus dem Zebrafisch und dem humanen GPR17 hinsichtlich ihrer Transmembrandomänen mithilfe eines internetbasierten kostenlosen Analyseprogramms analysiert (TMHMM Server v. 2.0) (Krogh et al., 2001). Wie die roten Markierungen in

Abbildung 4.1 zeigen, weist Gpr17a sieben dem humanen GPR17 sehr ähnliche Transmembrandomänen auf.

Gpr17a	MESSLTELPTLLPNQSM---DSCPPVENTAENMMFGIYYIIVFLLALSGNSLALWIFARQ	57
GPR17	MNGLEVAPPGLITNFSLATAEQC-GQETPLENMLFASFYLLDFILALVGNTLALWLFIRD	59
Gpr17a	RNNSSPANVFLHLAVADLFYVFIPLRATYHLTGGHWPFGIIPCRLAGFFFYVNMYSAL	117
GPR17	HKSGTPANVFLMHLAVADLSCVLLVLPTRLVYHFSGNHWPFGIACRLTGFLFYLNMYASI	119
Gpr17a	YFLACVAGDRYLAVVHAVRSLKVRPHYAHIASFALWILVIVSMAPLLITKQTVVEVNGST	177
GPR17	YFLTCSADRFLAIVHPVKSCLKLRRPLYAHLACAFWVWVAVAMAPLLVSPQTVQTNHTV	179
Gpr17a	VCLQLYREKASWRALVSLVVAFTPPFIATLSCYLLIVNSLRKGSRLPALKLRALRTIGL	237
GPR17	VCLQLYREKASHHALVSLAVAFTFPFIITVTCYLLIIRSLRQGLRVEKRLKTKAVRMIAI	239
Gpr17a	VMFIYVVCFLPYHLSRATFILGYGHPDLSCQIKRGLALANRLTSSLTCLNGGLDPLVYLF	297
GPR17	VLAIFLVCFVPHYVNRVSVYVLHYRSHGASCATQRILALANRITSCLTSLNGALDPIMYFF	299
Gpr17a	AAEKFRGSRVRRIFCRDKSGGSGATSGELKGTHESSLSAKSEF	339
GPR17	VAEKFRHALCNLLCGKRLKGPSPF--EGKTNESSLSAKSEL	339

Abbildung 4.1: Alignment zwischen Gpr17a (Zebrafisch) und dem humanen GPR17 auf Proteinebene. Die grauen Hinterlegungen der einzelnen Aminosäuren kennzeichnen die 100%igen Übereinstimmungen zwischen beiden Proteinsequenzen. Die roten Buchstaben kennzeichnen die jeweiligen Transmembrandomänen.

An zweiter Position des Proteinblasts der kurzen Form des humanen GPR17-Proteins (339 aa) gegen das gesamte Zebrafischgenom (GRCz10) folgte mit einer Übereinstimmung von 40% das Zebrafischgen *si:dkey-96n2.3* (ZDB-GENE-091204-118), welches auf dem Hauptstrang von Chromosom 24 lokalisiert ist. In dieser Arbeit wird nachfolgend die hypothetische Abkürzung *gpr17b* für das Zebrafischgen *si:dkey-96n2.3* verwendet. Das Zebrafischgen *gpr17b* besteht laut Ensembl-Datenbank aus den zwei sich überlagernden Transkripten *si:dkey-96n2.3-201* (999 bp) und *si:dkey-96n2.3-001* (879 bp). Abbildung 4.2 zeigt das Alignment der beiden Transkripte auf Proteinebene. Beide Transkripte weisen in den aktuellen Genombrowsern inhaltlich Unvollständigkeiten hinsichtlich des Aufbaus auf. Beide Transkripte bestehen ausschließlich aus einem Exon. Angaben zu den untranslatierten Regionen am 5'- bzw. 3' Ende fehlen. Für beide Transkripte wurden in der Datenbank translatierte Bereiche dargestellt, die jedoch nur teilweise ein Start- bzw. Stoppcodon aufweisen (Abbildung 4.2). In dieser Arbeit wurde für das Alignment zwischen Gpr17b und dem humanen GPR17 auf Proteinebene das längere Gpr17b-Protein (*si:dkey-96n2.3-201*) verwendet, welches bereits ein Stoppcodon enthielt. Aufgrund des fehlenden Startcodons wurde die Sequenz dieses Proteins am 5' Ende bis zum ersten Startcodon „ATG“ (Methionin-Rest, Abbildung 4.2) gekürzt (314aa), welches im Leseraster zum Stoppcodon steht.

Ergebnisse

Abbildung 4.3 zeigt das Alignment zwischen Gpr17b und dem humanen GPR17 auf Proteinebene sowie deren Transmembrandomänen.

```

si:dkey-96n2.3-201      NLSDTYFDSTAQRLEGQTMSNHSEVGIYLSSHTENILLAVFYMLVFILSVPSNALALWLF
si:dkey-96n2.3-001      -----ENILLAVFYMLVFILSVPSNALALWLF
                               *****

si:dkey-96n2.3-201      CHRNTTKTPSKVYLKHLAIADMSYILVLP  
MRVIYHLSDC  
HWPLGEVACR  
VAGFLFYV  
NLYCHRNTTKTPSKVYLKHLAIADMSYILVLP  
MRVIYHLSDC  
HWPLGEVACR  
VAGFLFYV  
NLY
si:dkey-96n2.3-001      *****

si:dkey-96n2.3-201      CSMYFMACISVDRL  
LACVLP  
HKAKNMRKTR  
NSNVVCAV  
LWVMVTIS  
MMPVLF  
SRSQVTRECSMYFMACISVDRL  
LACVLP  
HKAKNMRKTR  
NSNVVCAV  
LWVMVTIS  
MMPVLF  
SRSQVTRE
si:dkey-96n2.3-001      *****

si:dkey-96n2.3-201      WQNVTVCEKLYIETSSNPTGALVSIAV  
SFLVPLV  
ILSVSYIL  
IFWRVKQ  
MTFQEQT  
PAQRWQNVTVCEKLYIETSSNPTGALVSIAV  
SFLVPLV  
ILSVSYIL  
IFWRVKQ  
MTFQEQT  
PAQR
si:dkey-96n2.3-001      *****

si:dkey-96n2.3-201      KAMRMIVLTVVNFVIAFV  
PYHIHRL  
FFIKQHE  
DMSRSE  
SERRML  
YLGNRIT  
SALTCV  
SGVKAMRMIVLTVVNFVIAFV  
PYHIHRL  
FFIKQHE  
DMSRSE  
SERRML  
YLGNRIT  
SALTCV  
SGV
si:dkey-96n2.3-001      *****

si:dkey-96n2.3-201      LDPV  
MYFFL  
ARNYQ  
ETLLQ  
LCGKS  
PKYE  
QSTTLDPV  
MYFFL  
ARNYQ  
ETLLQ  
LCGKS  
PK-----
si:dkey-96n2.3-001      *****

```

Abbildung 4.2: Alignment der beiden Gpr17b-Proteine gemäß Ensembl-Datenbank. Das potentielle Startcodon (Methionin-Rest) des längeren Gpr17b-Proteins ist unterstrichen dargestellt.

```

Gpr17b  -----MSNHSEVGIYLSHTENILLAVFYMLVFILSVPSNALALWLFCHRN  46
GPR17   MNGLEVAPPGLITNFSLATAEQCGQETPLENMLFASFYLLDFILALVGNTLALWLFIRDH  60

Gpr17b  TTKTPSKVYLKHLAIADMSYILVLPMRVIYHLSDCHWPLGEVACRVAGFLFYVNLYCSMY  106
GPR17   KSGTPANVFLMHLAVADLSCVLVLPTRLVYHFSGNHWPFGEIACRLTGFLFYLNMYASIY  120

Gpr17b  FMACISVDRL  
LACVLP  
HKAKNMRKTR  
NSNVVCAV  
LWVMVTIS  
MMPVLF  
SRSQVTRE  
WQNV
GPR17   FLTCISADRFLAIVHPVKS  
LKLRRP  
LYAHLACA  
FLWVVAV  
AMAPLLV  
SPQTVQT--NHT  178

Gpr17b  TVCEKLYIETSSNPTGALVSIAVSFLVPLVILSVSYILIFWRVKQMTFQEQT  
PAQRKAMR  226
GPR17   VVCLQLYREKAS--HHALVSLAVAFTFPFITTVTCYLLIIRSLRQG-LRVEKRLKTKAVR  235

Gpr17b  MIVLTVVNFVIAFVPYHIHRLFFIKQHE  
DMSRSE  
SERRML  
YLGNRIT  
SALTCV  
SGVLDPV  286
GPR17   MIAIVLAIFLVCFVPYHVNRSVYVLHYRSHGASCATQRI  
LALANRIT  
SCLTSL  
NGALDPI  295

Gpr17b  MYFFLARNYQETLLQ-LCGK-----PKYEQSTT-----  314
GPR17   MYFFVAEKFRRHALCNLLCGKRLKGPSPFEGKTNESSLSAKSEL  339

```

Abbildung 4.3: Alignment zwischen Gpr17b (Zebrafisch) und dem humanen GPR17 auf Proteinebene. Die grauen Hinterlegungen der einzelnen Aminosäuren kennzeichnen die 100%igen Übereinstimmungen zwischen beiden Proteinsequenzen. Die roten Buchstaben kennzeichnen die jeweiligen Transmembrandomänen.

4.1.2 Nachweis und Charakterisierung des 5' Endes von *gpr17a*

Bisher wurde das 5' Ende des Zebrafischgens *gpr17a* nicht charakterisiert. Im Rahmen dieser Arbeit sollte mittels 5' RACE-PCR (siehe Kapitel 3.2.18) das 5' Ende von *gpr17a* detektiert werden, um nähere Informationen zum *gpr17a*-Transkript inklusive der untranslatierten Region am 5' Ende zu erhalten. Dafür wurde gepoolte Gesamt-RNA von 1 bis 10 Tage alten Zebrafischlarven mithilfe des genspezifischen Primers GSP1_*gpr17a_rev* (SP1) in cDNA umgeschrieben. Als Negativkontrolle (NK) wurde statt der Gesamt-RNA genomische DNA aus dem Zebrafisch verwendet. Nach dem Poly(A)-Tailing der cDNA erfolgte die 1. RACE-PCR mit dem genspezifischen Primer GSP2_*gpr17a_rev* (SP2) und dem Oligo-dT-Anchor Primer. Anschließend wurden jeweils 10 µl der entstandenen PCR-Produkte in einem 1%igen Agarosegel analysiert (Abbildung 4.4).

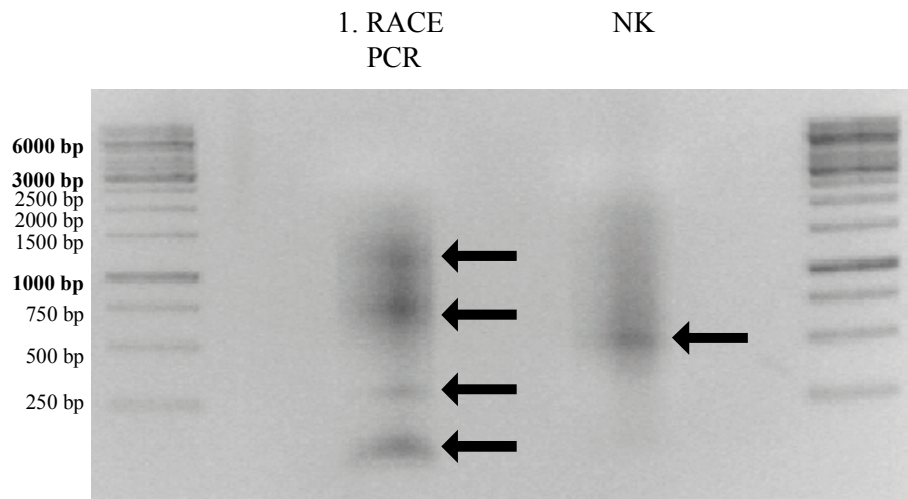


Abbildung 4.4: Übersicht der 5' *gpr17a*-RACE-PCR-Produkte nach der 1. RACE-PCR. Die schwarzen Pfeile markieren die entstandenen PCR-Produkte. NK: Negativkontrolle

Wie Abbildung 4.4 zeigt, kam es sowohl bei der 1. RACE-PCR, als auch bei der Negativkontrolle zu einer Schmierbildung, was auf die Entstehung mehrerer PCR-Produkte hinweisen könnte. Bei der 1. RACE-PCR waren trotz der Schmierbildung vier deutliche Banden bei ca. 1250 bp, 750 bp, 260 bp sowie < 100 bp erkennbar. Es kamen jedoch nur die PCR-Produkte bei 1250 bp und 750 bp für spezifische RACE-PCR-Produkte von *gpr17a* in Frage, da bereits der Primer GSP2_*gpr17a_rev* 485 bp entfernt stromabwärts vom Startcodon von *gpr17a* an die cDNA anlagerte (Abbildung 4.6). Addiert man dazu noch die Länge des angehängten Poly-(A)-Schwanzes inklusive Anchor von 38 bp (16 bp + 22 bp), so wurde für die spezifische 1. RACE-PCR von *gpr17a* mit einer Bande von > 523 bp gerechnet. Bei

kleineren Banden musste es sich um unspezifische PCR-Produkte handeln. Eine Kontamination der cDNA mit genomischer DNA konnte mithilfe der Negativkontrolle ausgeschlossen werden, da neben einer leichten Schmierbildung nur eine Bande auf der Höhe von 500 bp auftrat, die in der 1. RACE-PCR nicht vorhanden war. Um die Schmierbildung durch Verringerung störender Faktoren weiter einzugrenzen und die Spezifität der RACE-PCR-Produkte zu erhöhen, wurden die PCR-Produkte der 1. RACE-PCR inklusive der Negativkontrolle jeweils 1:10 und 1:20 verdünnt. Bei der 2. RACE-PCR wurde dann jeweils 1 µl der jeweiligen Verdünnung als Template sowie der PCR-Anchor Primer und der genspezifische Primer GSP3_ *gpr17a_rev* (SP3) eingesetzt. Anschließend wurden jeweils 10 µl der entstandenen PCR-Produkte der 2. RACE-PCR im 1%igem Agarosegel analysiert (Abbildung 4.5).

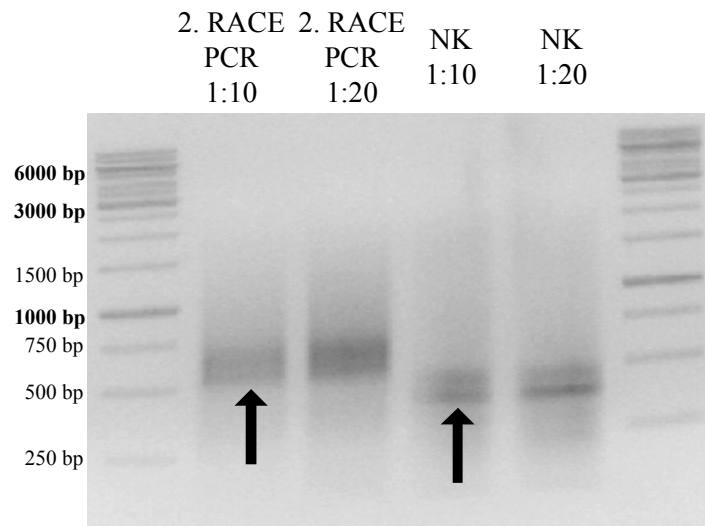
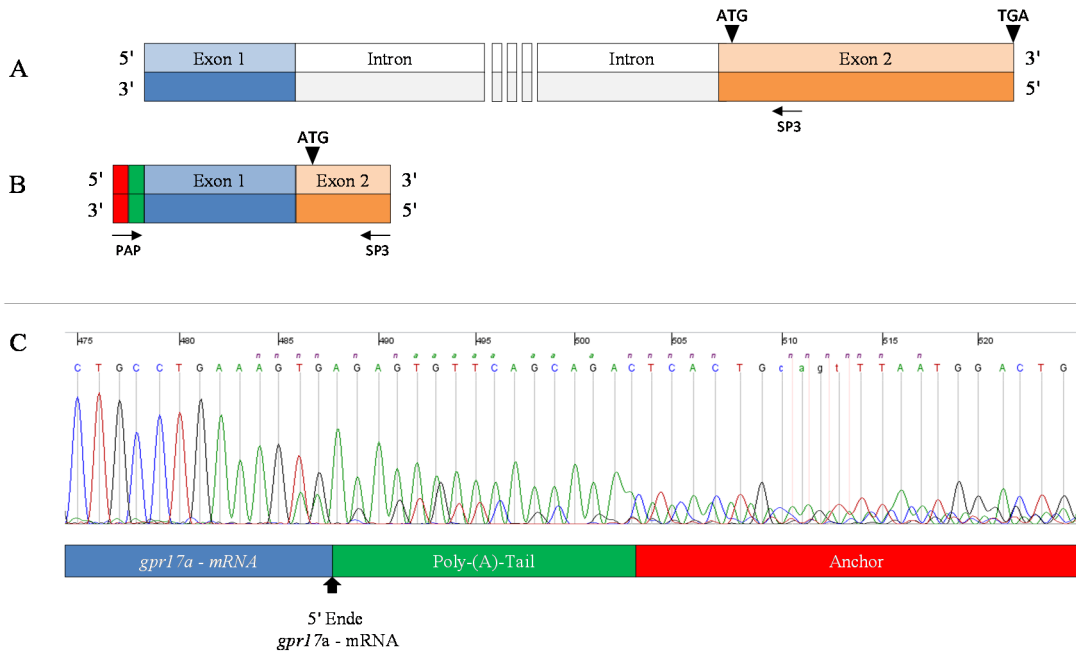


Abbildung 4.5: Übersicht der 5' *gpr17a*-RACE-PCR-Produkte nach der 2. RACE-PCR. Die schwarzen Pfeile markieren die anschließend aus dem Gel eluierten und zur Sequenzierung eingeschickten PCR-Produkte. NK: Negativkontrolle

Wie Abbildung 4.5 zeigt, entstand bei der 2. RACE-PCR bei beiden Verdünnungsstufen jeweils eine Art Doppelbande bei ca. 550 bp und 700 bp mit leichter Schmierbildung. Ein Unterschied zwischen den 1:10 und 1:20 Verdünnungen war nicht festzustellen. Im Gegensatz zur 1. RACE-PCR waren die Banden kompakter und die Schmierbildung im Agarosegel reduziert. Da sich GSP3_ *gpr17a_rev* im Vergleich zu GSP2_ *gpr17a_rev* 90 bp näher zum 5' gelegenen ATG von *gpr17a* an die cDNA anlagerte, ist davon auszugehen, dass das spezifische PCR-Produkt der 1. RACE-PCR genau um diesen Abstand verkürzt sein muss. Demzufolge muss es sich bei der 750 bp-Bande der 1. RACE-PCR um das spezifische

RACE-PCR-Produkt von *gpr17a* gehandelt haben. Die Gründe für die Bildung der Doppelbande konnten hier nicht weiter festgestellt werden. Bei der Negativkontrolle entstand bei beiden Verdünnungen ein unspezifisches PCR-Produkt, welches im Agarosegel ebenfalls als Doppelbande bei ca. 400 bp und 450 bp erkennbar war. Da diese Doppelbande im Agarosegel der 2. RACE-PCR nicht vorhanden war, konnte eine Kontamination der cDNA mit genomischer DNA eindeutig ausgeschlossen werden. Um die entstandenen PCR-Produkte der 2. RACE-PCR zu sequenzieren, wurde die Doppelbande der 1:10 Verdünnung aus dem Agarosegel ausgeschnitten, aufgereinigt und zur Sequenzierung mit dem Primer GSP3_ *gpr17a_rev* eingeschickt. Zur Kontrolle wurde auch die entstandene Doppelbande der Negativkontrolle aus dem Gel ausgeschnitten, aufgereinigt und mit demselben Primer zum Sequenzieren geschickt. Die Sequenzierung der Doppelbande der Negativkontrolle zeigte eindeutig, dass es sich hierbei um die Amplifizierung genomischer DNA im Bereich von *gpr17a* handelte, da das 5' Ende des PCR-Produktes die Sequenz des Introns abbildete. Mithilfe der Sequenzierung der Doppelbande der 2. RACE-PCR bei 550 – 700 bp konnte hingegen das 5' Ende (+1) des *gpr17a*-Transkriptes detektiert werden (Abbildung 4.6). Wie Abbildung 4.6B, C und D zeigen, konnte der Transkriptionsstartpunkt (TSP, +1) auf einem bisher unbekanntem Exon 1 identifiziert werden. Da sich der für die Sequenzierung verwendete Primer GSP3_ *gpr17a_rev* 559 bp entfernt von dem neu detektierten TSP an die cDNA anlagerte, handelte es sich bei dem 2. RACE-PCR-Produkt (550 - 700 bp) eindeutig um das sequenzierte *gpr17a*-Transkript (559 bp + 38 bp (Anchor) = 597 bp). In Abbildung 4.6C zeigt das Elektropherogramm der Sequenzierung deutlich erkennbar den Poly-(A)-Schwanz aus 16 Adenin-Resten und die sich anschließende Sequenz des Anchors. Die Sequenz des *gpr17a*-Transkriptes konnte bis zu ihrem 5' Ende eindeutig und ohne Untergrund-Signale detektiert und editiert werden. Die neue genetische Organisation von *gpr17a* im Zebrafisch besteht demzufolge aus einem 104 bp großen nicht translatierten Exon 1, welches durch ein 6273 bp großes Intron von Exon 2, auf dem der gesamte translatierte Bereich von *gpr17a* lokalisiert ist, getrennt wird (Abbildung 4.6A, B, D). Da im Elektropherogramm der Sequenzierung ab der Position des Poly-(A)-Schwanzes eine Mischsequenz detektiert wurde, die die Sequenz von *gpr17a* enthielt, ist es möglich, dass weitere *gpr17a*-Transkripte generiert werden. Die TSPs dieser *gpr17a*-Transkripte wären ebenfalls auf dem neuen Exon 1 lokalisiert, wären jedoch bis zu 82 bp strangaufwärts des hier detektierten TSP (+1) zu finden.

5' RACE der *gpr17a* - mRNA



D

Exon1 ⁺¹
 CACTTTCAGGCAGCTCTAGGAAACTGCACAACTCCCTCTGCTCTCAGATCAGCTTCAGCTCAGTC
 CTTTCAGTTCTGCACAGGCTGTTGAAGGAACAGCACTGCT

Intron1 GGTGAGTCACTTAC ATTCTTCTGTTTTCA

Exon2
 GTTATAAAAATGGAGTCCCTCCTTGACAGAACTTCCCACCTTGCTGCCCAACCAGTCCATGGACAGC
 TGCCACCCGGTGGAAAACACAGCAGAGAACATGATGTTTGGAACTACTACATCAGTTTTCCCT
 CCTGGCATAAGCGCAATAGCCTTGCCCTGTGGATCTTTGCCCGCCAGAGAAACAACCTCCTCAC
 CAGCTAACGTCTTCTGCTCCACCTTGCTGTTGCCGACTTGTGTTTATGCTTTTATTTACCCCTT
 AGGGCCACTTATCA'TTAACTGGAGGTCA'TGGCCAT'TGGTGAAATCCC'TTGT'CGT'CTGGCAGG
 CTTTTCTTCTATGTCAACATGTATGCCAGTTTGTACTTTCTGGCCTGTGTTGCAGGTGACAGAT
ACCTTGCTGTGGTGCATGCTGTACGCTCCCTCAAGTTCAGACGTCCTCATTACGCTCACATAGCC
 AGTTTTGCAC'TTTGGATT'TTGGTGATTGTGTCTATGGCACCCTGCTGATCACCAAGCAGACTGT
AGAAGTCAATGGCTCAACCGTATGTTTGCAACTGTACAGAGAAAAGGCCCTCGTGGCGTGCCTAG
 TCTCTCTTGTGTAGCTTTCACACCACCCTTTCATGTACACTTTCCCTGCTATCTGCTGATAGTT
 AACAGTCTGCGCAAGGTTCAAGGCTGGAGCCAGCCCTGAAACTCCGGGCTCCTCGTACCATCGG
 TCTGGTCATGTTTATCTATGTAGTGTGCTTTTTGTCCTTATCACTTAAGTCGTGCAACTTTTATCC
 TGGGCTACGGACACCCAGACCTGTCTGCCAAATCAAAGAGGACTAGCTCTGGCTAACCGTCTT
 ACCCTCCTGCCTGACCTGCCTGAATGGGGTCTGGATCCTCTGGTTTACCTGTTTGCAGCAGAGAA
 GTTCAGGGGAAGCGTTCGCAGGATTTTTTGGCCAGACAAGTCAGGAGGGTCTGGCGCTACTAGCG
 GGGAGCTAAAAGGGACACATGAGAGTTCTCTGAGTGCAAAGTCTGAGTTCTGA

Abbildung 4.6: Genetische Organisation von *gpr17a* am 5' Ende. **A**, genomische Organisation von *gpr17a* im Zebrafisch. SP3 kennzeichnet die Lage des 3. genspezifischen Primers. **B**, Schematische Darstellung des 2. RACE-PCR-Produktes von *gpr17a* inklusive Poly-(A)-Tail (grün) und Anchor (rot). PAP kennzeichnet die Lage des PCR-Anchor Primers. **C**, Elektropherogramm der Sequenzierung des 2. RACE-PCR-Produktes von *gpr17a* (in gegenläufiger Orientierung). **D**, Sequenzausschnitt von *gpr17a*. Start- and Stoppcodon sind unterstrichen und der detektierte Transkriptionsstartpunkt ist mit +1 gekennzeichnet. Primerpositionen: GSP1_ *gpr17a*_rev - blau, GSP2_ *gpr17a*_rev - rot, GSP3_ *gpr17a*_rev - grün, *gpr17a*_for_RT - orange, *gpr17a*_rev_RT - violett.

Die detektierte Doppelbande der 2. RACE-PCR könnte jedoch auf das Vorhandensein dieser Nebentranskripte hinweisen. Zur Überprüfung des Ergebnisses der RACE-PCR und zur Bestätigung des Introns wurde anschließend eine Standard-PCR mit dem Primerpaar *gpr17a_for_RT* und *gpr17a_rev_RT* und der cDNA als Template durchgeführt. Der Primer *gpr17a_for_RT* lagerte sich dabei auf dem neuen Exon 1 und der Primer *gpr17a_rev_RT* auf Exon 2 an die cDNA an, sodass bei der PCR ein Produkt von 123 bp entstand (Abbildung 4.7). Als Negativkontrolle wurde genomische DNA als Template verwendet. Hier entstand jedoch, wie erwartet, kein PCR-Produkt, da die Elongationszeit von 10 s nicht ausreichte, um das PCR-Produkt inklusive Intron von 6396 bp zu amplifizieren.

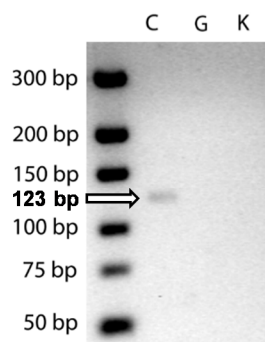


Abbildung 4.7: 3%iges Agarosegel (Phor Agarose) mit dem PCR-Produkt von *gpr17a* (C: cDNA als Template; G: genomische DNA als Template; K: Wasserkontrolle).

Das aufgereinigte PCR-Produkt von 123 bp wurde anschließend mithilfe des Primers *gpr17a_rev_RT* sequenziert.

Zusammenfassend konnten mithilfe der 5' RACE-PCR neue Erkenntnisse zum Aufbau des *gpr17a*-Transkriptes im Zebrafisch gewonnen werden, die belegen, dass das Transkript aus zwei Exons besteht, die auf genomischer Ebene durch ein ca. 6 kb großes Intron voneinander getrennt werden. Der Transkriptionsstartpunkt (+1) des Haupttranskriptes von *gpr17a* konnte genau detektiert werden (Abbildung 4.6D).

4.1.3 Nachweis und Charakterisierung des 5' Endes von *gpr17b*

Identisch zur Charakterisierung des 5' Endes von *gpr17a* wurde die Charakterisierung des 5' Endes von *gpr17b* mittels 5' RACE-PCR (siehe Kapitel 3.2.18) durchgeführt. Die gepoolte Gesamt-RNA von 1 bis 10 Tage alten Zebrafischlarven wurde mithilfe des genspezifischen Primers GSP1_*gpr17b_rev* (SP1) in cDNA umgeschrieben. Als Negativkontrolle (NK) wurde genomische DNA aus dem Zebrafisch verwendet. Nach dem Poly-(A)-Tailing der cDNA

erfolgte die 1. RACE-PCR mit dem genspezifischen Primer GSP2_gpr17b_rev (SP2) und dem Oligo-dT-Anchor Primer. Anschließend wurden jeweils 10 µl der entstandenen PCR-Produkte in einem 1%igen Agarosegel analysiert (Abbildung 4.8).

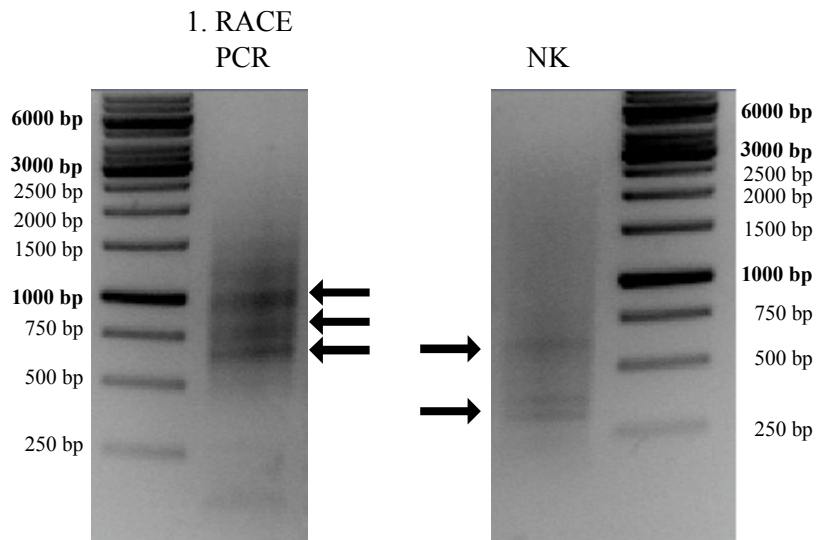


Abbildung 4.8: Übersicht der 5' *gpr17b*-RACE-PCR-Produkte nach der 1. RACE-PCR. Die schwarzen Pfeile markieren die entstandenen PCR-Produkte. NK: Negativkontrolle

Wie Abbildung 4.8 zeigt, waren bei der 1. RACE-PCR drei deutliche Banden bei ca. 1000 bp, 750 bp und 650 bp erkennbar. Da sich der Primer GSP2_gpr17b_rev 497 bp entfernt stromabwärts vom Startcodon von *gpr17b* an die cDNA anlagerte, konnten alle drei PCR-Produkte der 1. RACE-PCR spezifische RACE-PCR Produkte sein. Eine Kontamination der cDNA mit genomischer DNA konnte mithilfe der Negativkontrolle zum Teil ausgeschlossen werden, da eine sehr schwache Bande auf der Höhe von 300 bp auftrat, die in der 1. RACE-PCR nicht vorhanden war und unterhalb der berechneten 497 bp lag. In der Negativkontrolle war jedoch eine weitere, wenn auch sehr schwache Bande auf der Höhe von 600 bp erkennbar. Um die Spezifität der RACE-PCR-Produkte daher zu erhöhen, wurden die PCR-Produkte der 1. RACE-PCR inklusive der Negativkontrolle jeweils 1:20 verdünnt. Bei der 2. RACE-PCR wurden dann jeweils 1 µl der jeweiligen Verdünnung als Template sowie der PCR-Anchor Primer und der genspezifische Primer GSP3_gpr17b_rev (SP3) eingesetzt. Anschließend wurden jeweils 10 µl der entstandenen PCR-Produkte der 2. RACE-PCR im 1%igen Agarosegel analysiert (Abbildung 4.9).

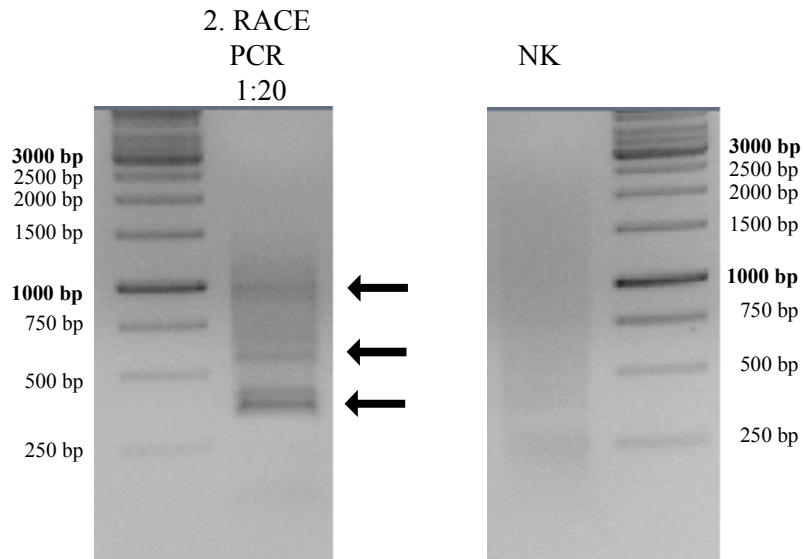


Abbildung 4.9: Übersicht der 5' *gpr17b*-RACE-PCR-Produkte nach der 2. RACE-PCR. Die schwarzen Pfeile markieren die anschließend aus dem Gel eluierten und zur Sequenzierung eingeschickten PCR-Produkte. NK: Negativkontrolle

Wie Abbildung 4.9 zeigt, entstand bei der 2. RACE-PCR eine deutliche Doppelbande bei ca. 350 - 400 bp und eine Schmierbildung mit leichter Tendenz zur Bildung von sehr schwachen Banden im Bereich von 600 bp und 1000 bp. Im Gegensatz dazu war in der Negativkontrolle keine Bande zu sehen. Eine Kontamination der cDNA mit genomischer DNA konnte somit eindeutig ausgeschlossen werden. Da sich GSP3_*gpr17b*_rev im Vergleich zu GSP2_*gpr17b*_rev 260 bp näher zum 5' gelegenen ATG von *gpr17b* an die cDNA anlagerte, ist davon auszugehen, dass das spezifische PCR-Produkt der 1. RACE-PCR in der 2. RACE-PCR genau um diesen Abstand verkürzt sein musste. Demzufolge müsste es sich bei der 650 bp-Bande der 1. RACE-PCR um das spezifische RACE-PCR-Produkt von *gpr17b* gehandelt haben ($\sim 650 \text{ bp} - 260 \text{ bp} = \sim 390 \text{ bp}$ (Doppelbande 350 - 400 bp)). Um die entstandenen PCR-Produkte der 2. RACE-PCR zu sequenzieren, wurden die Doppelbande bei 350 - 400 bp sowie die Banden bei 600 bp und 1000 bp aus dem Agarosegel ausgeschnitten, aufgereinigt und zur Sequenzierung mit dem Primer GSP3_*gpr17b*_rev eingeschickt. Die Sequenzierungen der sehr schwachen Banden bei 600 bp und 1000 bp konnten nicht durchgeführt werden, da der Primer nicht an die zu sequenzierenden PCR-Produkte binden konnte. Aus diesem Grund muss es sich bei den beiden Banden mit einer Länge von 600 bp und 1000 bp um unspezifische PCR-Produkte gehandelt haben. Mithilfe der Sequenzierung der Doppelbande der 2. RACE-PCR bei ca. 350 - 400 bp konnten hingegen zwei verschiedene 5' Enden (+1) von *gpr17b* detektiert werden (Abbildung 4.10).

5' RACE der *gpr17b* - mRNA

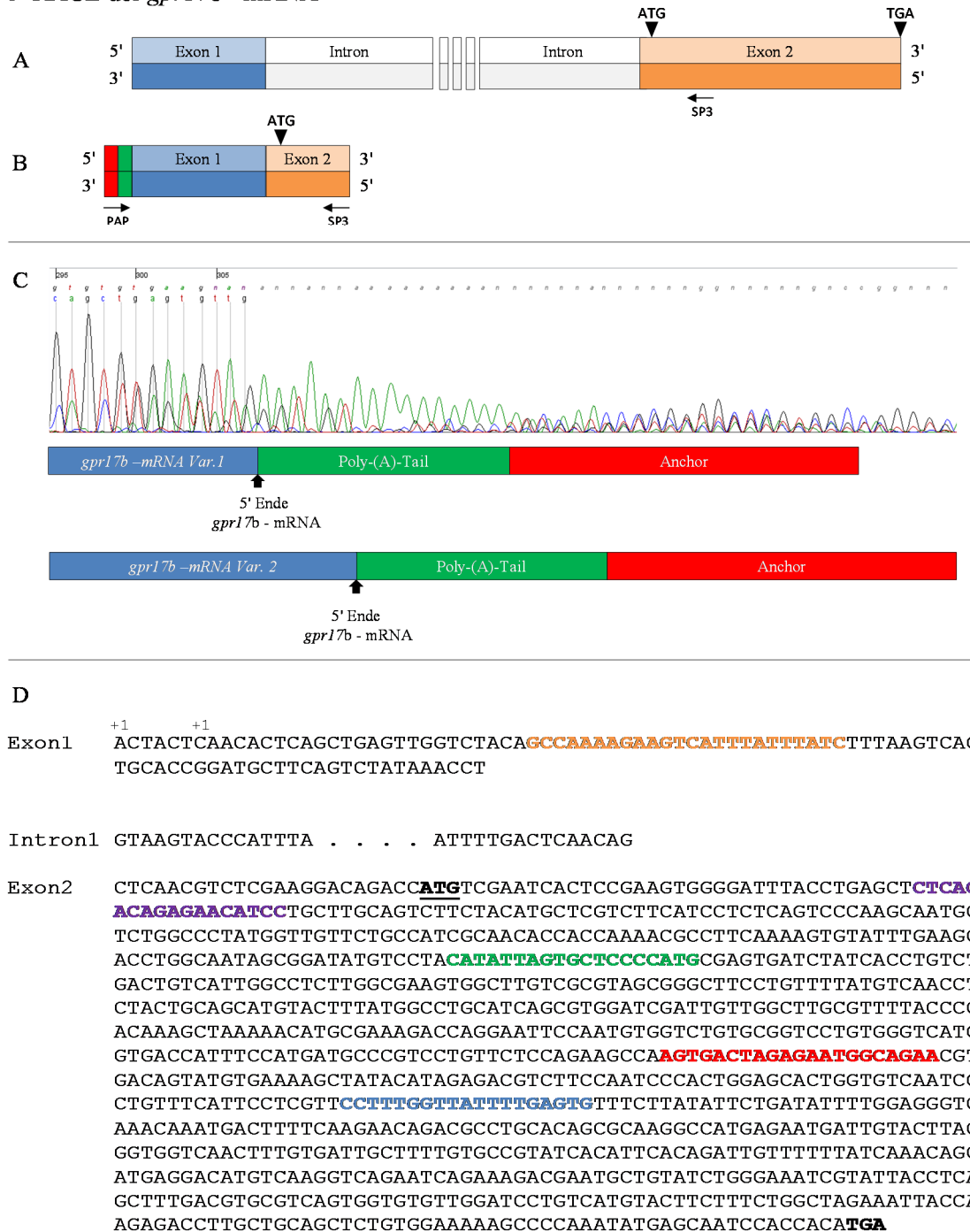


Abbildung 4.10: Genetische Organisation von *gpr17b* am 5' Ende. A, Genomische Organisation von *gpr17b* im Zebrafisch. SP3 kennzeichnet die Lage des 3. genspezifischen Primers. B, Schematische Darstellung des 2. RACE-PCR-Produktes von *gpr17b* inklusive Poly-(A)-Tail (grün) und Anchor (rot). PAP kennzeichnet die Lage des PCR-Anchor Primers. C, Elektropherogramm der Sequenzierungen des 2. RACE-PCR-Produktes von *gpr17b* (in gegenläufiger Orientierung). D, Sequenzausschnitt von *gpr17b*. Start- und Stoppcodon sind unterstrichen und die detektierten Transkriptionsstartpunkte sind mit +1 gekennzeichnet. Primerpositionen: GSP1_ *gpr17b*_rev - blau, GSP2_ *gpr17b*_rev - rot, GSP3_ *gpr17b*_rev - grün, *gpr17b*_for - orange, *gpr17b*_rev - violett.

Wie Abbildung 4.10C und D zeigen, konnten zwei Transkriptionsstartpunkte (TSP, +1) von *gpr17b* auf einem bisher unbekanntem Exon 1 identifiziert werden, die nur 6 bp voneinander entfernt sind (*gpr17b*-mRNA Var. 1 und *gpr17b*-mRNA Var. 2). Die Sequenz der *gpr17b*-mRNA Var. 1 konnte bis zu ihrem 5' Ende eindeutig detektiert und editiert werden, obwohl im Elektropherogramm eine leichte Untergrundsequenz erkennbar ist. Das Elektropherogramm der Sequenzierung in Abbildung 4.10C zeigt einen deutlich erkennbaren Poly-(A)-Schwanz aus 16 Adenin-Resten und die sich anschließende Sequenz des Anchors. Da im Elektropherogramm die ersten 6 bp des für *gpr17b*-mRNA Var. 1 beschriebenen Poly-(A)-Schwanzes eine deutliche Mischsequenz erkennbar war, die ebenfalls die Sequenz von *gpr17b* abbildet, wurde hier davon ausgegangen, dass es sich um ein weiteres *gpr17b*-Transkript handeln könnte (*gpr17b*-mRNA Var. 2). Der für die Sequenzierung verwendete Primer GSP3_ *gpr17b*_rev lagerte sich 326 bp bzw. 332 bp entfernt von den neu detektierten TSPs an die cDNA an, was darauf hindeutet, dass es sich bei dem 2. RACE-PCR-Produkt (350 - 400 bp) eindeutig um die sequenzierten *gpr17b*-Transkripte (326 / 332 bp + 38 bp (Anchor) = 364 / 370 bp) handelte. Die neue genetische Organisation von *gpr17b* im Zebrafisch besteht demzufolge aus einem 87 bp bzw. 93 bp großen nicht translatierten Exon 1, welches durch ein 4234 bp großes Intron von Exon 2, auf dem der gesamte translatierte Bereich von *gpr17b* lokalisiert ist, getrennt wird (Abbildung 4.10A, B, D). Zur Überprüfung des Ergebnisses der RACE-PCR und zur Bestätigung des Introns wurde anschließend eine Standard-PCR mit dem Primerpaar *gpr17b*_for_RT und *gpr17b*_rev_RT und der cDNA als Template durchgeführt. Der Primer *gpr17b*_for_RT lagerte sich dabei auf dem neuen Exon 1 und der Primer *gpr17b*_rev_RT auf Exon 2 an die cDNA an, sodass bei der PCR ein Produkt von 140 bp entstand (Abbildung 4.11).

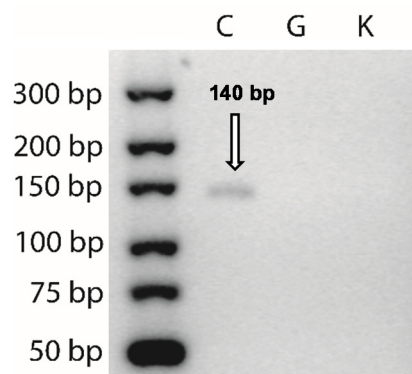


Abbildung 4.11: 3%iges Agarosegel (Phor Agarose) mit dem PCR-Produkt von *gpr17b* (C: cDNA als Template; G: genomische DNA als Template; K: Wasserkontrolle).

Der *gpr17b_for_RT* Primer berücksichtigt beide *gpr17b*-Transkripte auf Exon 1. Als Negativkontrolle wurde genomische DNA als Template verwendet. Hier entstand jedoch, wie erwartet, kein PCR-Produkt, da die Elongationszeit von 10 s nicht ausreichte, um das PCR-Produkt inklusive Intron von 4234 bp zu amplifizieren.

4.2 Expression von Gpr17 im Zebrafisch

4.2.1 Qualitativer Nachweis von *gpr17a* und *gpr17b*

Im Anschluss an die 5' RACE-PCR beider Gene sollte mittels RT-PCR (siehe Kapitel 3.2.16) die Expression dieser Gene in unterschiedlichen Entwicklungsstufen und Geweben des Zebrafisches nachgewiesen werden. Zu diesem Zweck wurde Gesamt-RNA aus 1 bis 10 Tage alten Zebrafisch-Embryonen sowie aus unterschiedlichen Gewebeteilen ausgewachsener Zebrafische isoliert (siehe Kapitel 3.2.2).

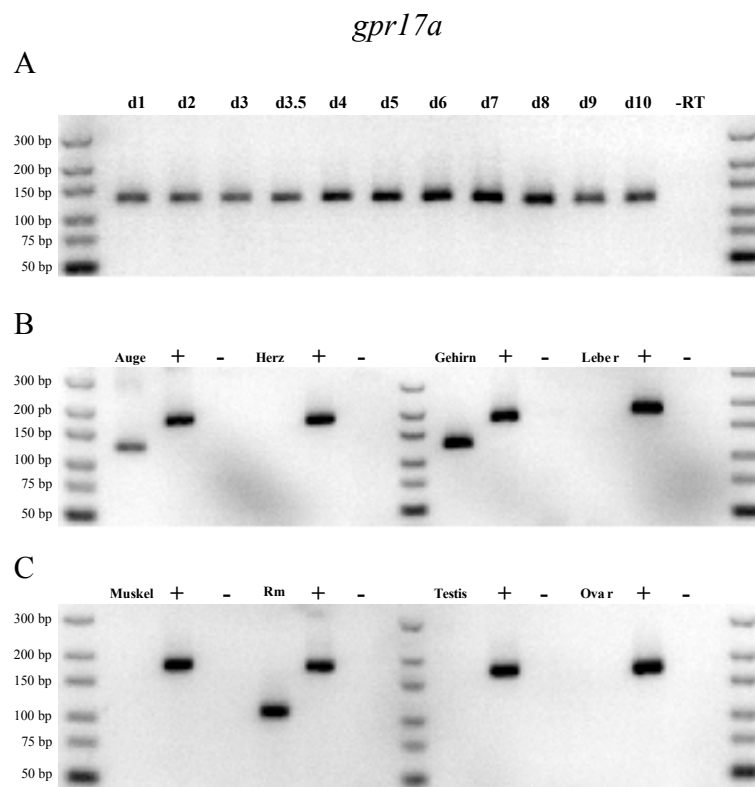


Abbildung 4.12: Qualitative RT-PCR zur Expression von *gpr17a* (123 bp). A, Expression in Zebrafischen der Entwicklungsstufen von Tag 1 (d1) bis Tag 10 (d10) im Vergleich zur Negativkontrolle (-RT). B/C, Expression in unterschiedlichen Geweben im Vergleich zur Positivkontrolle (+) und zur Negativkontrolle (-). Rm=Rückenmark

Zum Nachweis der Expression von *gpr17a* wurde das Primerpaar *gpr17a_for_RT* und *gpr17a_rev_RT* (siehe Abbildung 4.6) verwendet, wobei sich *gpr17a_for_RT* auf Exon 1 und *gpr17a_rev_RT* auf Exon 2 an die cDNA anlagerte. Bei der Negativkontrolle wurde gepoolte RNA von 1 bis 10 Tage alten Zebrafisch-Embryonen verwendet. Abbildung 4.12A zeigt, dass *gpr17a* (123 bp) im Vergleich zur Negativkontrolle (-RT) an den Tagen 1 bis 10 kontinuierlich exprimiert wird. Die Untersuchung hinsichtlich der Expression in unterschiedlichen Geweben erwachsener Zebrafische zeigte eine Expression von *gpr17a* im Auge, im Gehirn und im Rückenmark im Vergleich zur Negativkontrolle (Abbildung 4.12B und C). Im Herz, in der Leber, im Muskel sowie in den Testes und im Ovar konnten keine mRNA-Transkripte von *gpr17a* nachgewiesen werden. Als Positivkontrolle wurde das Referenzgen *actb1* verwendet, welches mithilfe der Primer *actb1_for_RT* und *actb1_rev_RT* in allen Geweben amplifiziert werden konnte. Das zuvor beschriebene Experiment wurde auf gleiche Weise für *gpr17b* unter Verwendung der Primer *gpr17b_for_RT* und *gpr17b_rev_RT* durchgeführt, wobei sich *gpr17b_for_RT* auf Exon 1 und *gpr17b_rev_RT* auf Exon 2 an die cDNA anlagerte.

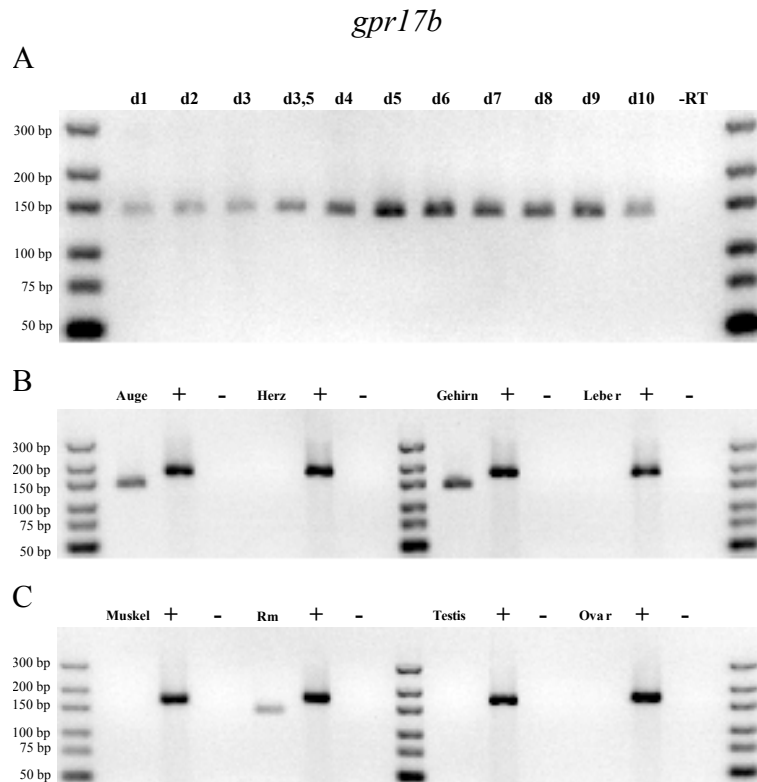


Abbildung 4.13: Qualitative RT-PCR zur Expression von *gpr17b* (140 bp). **A**, Expression in Zebrafischen der Entwicklungsstufen von Tag 1 (d1) bis Tag 10 (d10) im Vergleich zur Negativkontrolle (-RT). **B/C**, Expression in unterschiedlichen Geweben im Vergleich zur Positivkontrolle (+) und zur Negativkontrolle (-). Rm=Rückenmark

Wie Abbildung 4.13A zeigt, wird auch *gpr17b* an den Tagen 1 bis 10 kontinuierlich exprimiert, da an allen Tagen ein PCR-Produkt von 140 bp im Vergleich zur Negativkontrolle (-RT) entstand. Außerdem konnte die Expression von *gpr17b* im Auge, im Gehirn und im Rückenmark im Vergleich zur Negativkontrolle (Abbildung 4.13 B und C) nachgewiesen werden. Im Herz, in der Leber, im Muskel sowie in den Testes und im Ovar konnten hingegen keine mRNA-Transkripte von *gpr17b* detektiert werden. Als Positivkontrolle wurde das Referenzgen *actb1* verwendet, welches mithilfe der Primer *actb1_for_RT* und *actb1_rev_RT* in allen Geweben amplifiziert werden konnte. Zusammenfassend konnte mithilfe dieser qualitativen RT-PCR gezeigt werden, dass *gpr17a* und *gpr17b* bei verschiedenen Entwicklungsstufen des Zebrafisches sowie in verschiedenen Geweben gleiche Expressionsmuster aufweisen.

4.2.2 Quantitativer Nachweis von *gpr17* und weiteren Myelin-assoziierten Genen

Ziel der Quantitativen Real-Time PCR (siehe Kapitel 3.2.17) war es, die unterschiedlichen Expressionslevel der mRNA-Transkripte von *gpr17a* und *gpr17b* sowie der Myelin-assoziierten Gene *mbpa*, *mbpb*, *plp1a* und *plp1b* während der ersten zehn Tage der Zebrafiscentwicklung zu ermitteln. Als Referenzgene zur Normalisierung wurden die Gene *actb1* und *eef1a111* verwendet (Vanhouwaert et al., 2014). Die Ergebnisse wurden dabei auf den Durchschnitt aller Proben des jeweiligen Gens skaliert. Was bedeutet, dass der Durchschnitt aller unbekanntenen Proben bei der Skalierung auf eins gesetzt wurde (Grundeinstellung des Programmes qbase⁺). Zunächst wurde Gesamt-RNA aus jeweils 50 Zebrafisch-Embryonen der Tage eins bis zehn isoliert (siehe Kapitel 3.2.2) und mittels der Reverse-Transkriptase (siehe Kapitel 3.2.16) in cDNA umgeschrieben. Für die RT-qPCR wurden die Primer und Sonden aus Tabelle 2.4 verwendet. Vor der regulären RT-qPCR des jeweiligen Gens, wurde die Effizienz jedes einzelnen Primerpaares in Verbindung mit der Sonde gemessen. Die Effizienzmessung erfolgte mit gepoolter cDNA (Kalibrator-cDNA). Ausgehend von einer Ausgangsmenge von 100 ng gepoolter cDNA wurde die cDNA neunmal im Verhältnis 1:2 verdünnt und mittels RT-qPCR analysiert. Aus den ermittelten Standardkurven ergaben sich folgende Effizienzen und Single-Threshold-Values für die jeweiligen Gene, die für alle weiteren RT-qPCR-Berechnungen in dieser Arbeit verwendet wurden (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Ermittelte PCR-Effizienzwerte.

Zebrafischgen	Single Threshold Value	R ²	PCR-Effizienz (E)
<i>gpr17a</i>	35,399	0,997	1,994
<i>gpr17b</i>	85,721	0,995	1,843
<i>mbpa</i>	91,598	0,996	1,928
<i>mbpb</i>	24,057	0,998	1,959
<i>plp1a</i>	114,144	0,997	1,987
<i>plp1b</i>	35,543	0,998	1,974
<i>actb1</i>	15,929	0,995	1,961
<i>eef1a111</i>	103,818	0,998	1,985

Wie Tabelle 4.1 zeigt, liegen alle Korrelationskoeffizienten R² über 0,99 und die errechneten PCR-Effizienzen (E) zwischen 1,843 (84,3%) und 1,994 (99,4%). Diese Effizienzen liegen alle im angestrebten Effizienzbereich, sodass die jeweiligen Primerpaare sowie die jeweiligen Sonden für die RT-qPCR geeignet sind. Im Anschluss daran wurde mittels RT-qPCR die Expression der genannten Gene während der ersten zehn Tage der Zebrafiscentwicklung unter Verwendung der qbase⁺-Software und Berücksichtigung der jeweiligen PCR-Effizienzen und Single-Threshold-Values ermittelt. Die normalisierten Expressionslevels in den Abbildungen 4.14 und 4.15 wurden auf den durchschnittlichen Expressionswert aller 10 Tage pro Target skaliert. Das bedeutet, dass das durchschnittliche Expressionslevel der 10 Tage auf 1 gesetzt wurde. Es wurden jeweils drei biologische Replikate analysiert. Abbildung 4.14 zeigt die Expression von *gpr17a* und *gpr17b* an Tag 1 bis Tag 10. Das Expressionslevel von *gpr17a* bleibt an den ersten drei Tagen auf einem sehr niedrigen Niveau, mit relativen Expressionswerten zwischen 0,0931 und 0,3318. Nach dreieinhalb Tagen wurde hingegen ein signifikanter Expressionsanstieg um das 11-fache detektiert (3,6988 an Tag 3,5). An den darauffolgenden Tagen nahm das Expressionslevel von *gpr17a* tendenziell ab und erreichte an Tag 10 das niedrigste Level von 1,0233. Der Expressionsverlauf von *gpr17b* startete am ersten Tag mit einem relativen Expressionslevel von 0,1595 und erreichte an Tag 6 seinen höchsten Wert mit einer relativen Expression von 2,223. An den Tagen 8 - 10 war eine abnehmende Tendenz der *gpr17b*-mRNA Transkripte zu erkennen. Grundsätzlich war die Expression von *gpr17a* innerhalb der ersten zehn Tage der Zebrafiscentwicklung etwas höher als die Expression von *gpr17b*.

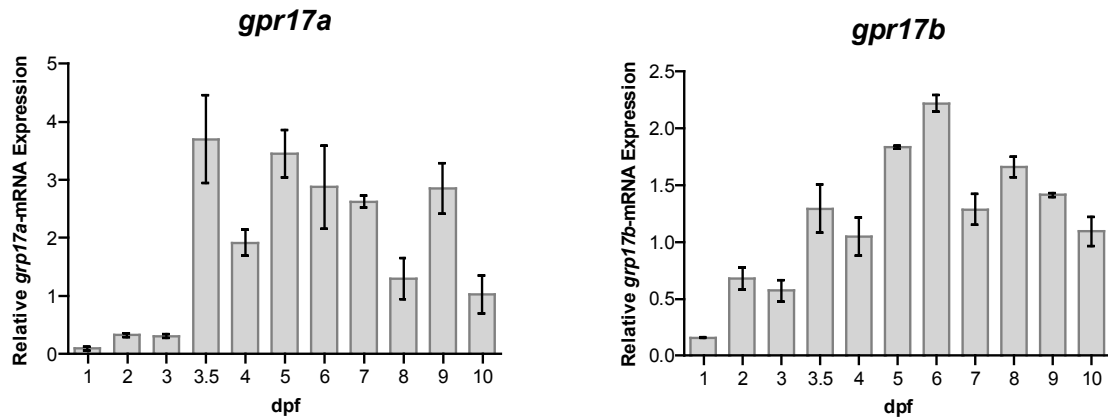


Abbildung 4.14: Relative mRNA-Expressionslevels von *gpr17a* und *gpr17b* während der ersten zehn Tage der Zebrafiscentwicklung. Der jeweilige Fehlerbalken zeigt den Standardfehler an.

Anschließend wurden die Expressionslevel weiterer Myelin-assoziiierter Gene während der ersten zehn Tage der Zebrafiscentwicklung analysiert. Abbildung 4.15 zeigt die Expression von *mbpa* und *mbpb*.

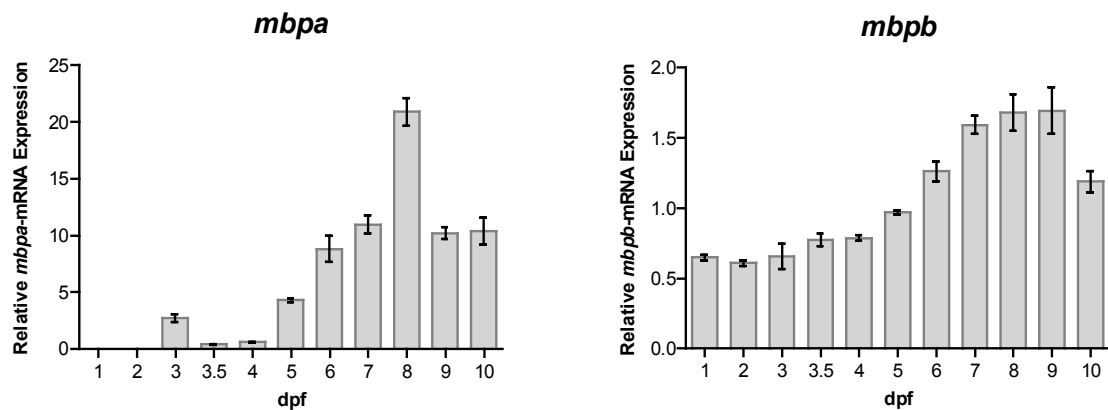


Abbildung 4.15: Relative mRNA-Expressions-Level von *mbpa* und *mbpb* während der ersten zehn Tage der Zebrafiscentwicklung. Der jeweilige Fehlerbalken zeigt den Standardfehler an.

Hier ist deutlich erkennbar, dass die Expression von *mbpa* im Vergleich zu *mbpb* innerhalb der analysierten zehn Tage durchschnittlich um das 6-fache höher war. Die relative Expression von *mbpa* war an den ersten beiden Tagen mit 0,0004 (Tag 1) und 0,0050 (Tag 2) sehr gering und stieg an den folgenden Tagen bis Tag 4 nur langsam an. Ab Tag 5 konnte ein deutlicher Anstieg des Expressionslevels von *mbpa* detektiert werden, welches an Tag 8 mit 20,9100 sein Maximum erreichte. Anschließend sank das Expressionslevel auf die Hälfte ab und blieb konstant. Im Gegensatz zu *mbpa* konnte für *mbpb* von Tag 1 bis Tag 9 ein kontinuierlicher leichter Anstieg der Expression von 0,6500 (Tag 1) bis 1,6953 (Tag 9)

detektiert werden. Anschließend wurde auch hier ein geringer Abfall der Expression an Tag 10 festgestellt. Wie Abbildung 4.16 zeigt, konnte für *plp1a* und *plp1b* ein gegensätzlicher Expressionsverlauf während der ersten zehn Tage der Zebrafischentwicklung detektiert werden. Die relative Expression lag bei beiden Genen auf einem ähnlich hohen Level. Interessanterweise wurde für *plp1a* am ersten Tag der höchste relative Expressionswert mit 9,3820 gemessen, mit einer kontinuierlich abnehmenden Tendenz an den folgenden Tagen. Der Expressionsverlauf für *plp1b* zeigt mit Ausnahme von Tag 3 einen umgekehrten Verlauf. Die Expression stieg von 0,0342 an Tag 1 auf ein maximales relatives Expressionslevel von 6,3843 an Tag 8. Am folgenden Tag sank das Expressionslevel leicht ab und blieb anschließend konstant.

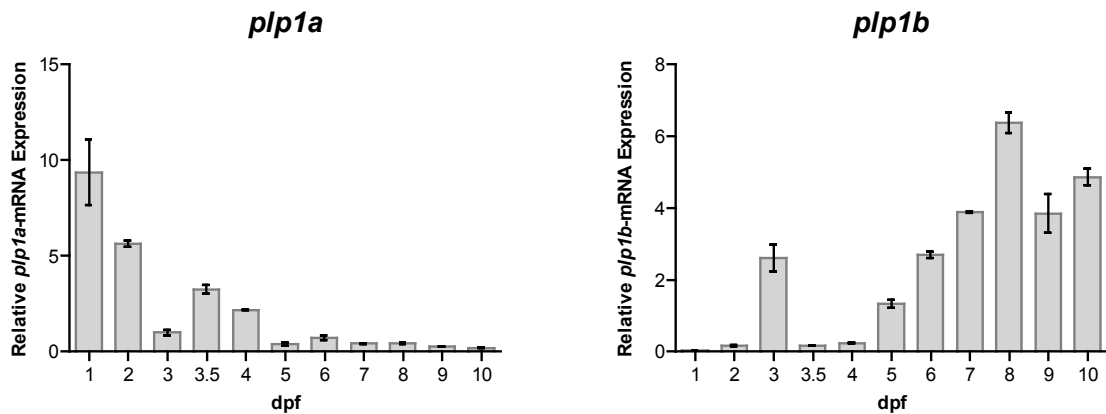


Abbildung 4.16: Relative mRNA-Expressions-Levels von *plp1a* und *plp1b* während der ersten zehn Tage der Zebrafischentwicklung. Der jeweilige Fehlerbalken zeigt den Standardfehler an.

4.2.3 Quantitativer Nachweis nach Morpholino-Injektion

Um einen möglichen Einfluss von *gpr17a* auf das Expressionsverhalten der Myelin-assoziierten Gene *mbpa*, *mbpb*, *plp1a* und *plp1b* sowie auf das Gen *gpr17b* festzustellen, wurde mittels Morpholino-Injektion *gpr17a* auf mRNA-Ebene herunterreguliert (siehe Kapitel 3.1.4). Dafür konnte auf Basis der RACE-Ergebnisse ein *gpr17a*-Morpholino mit hoher Spezifität ausgesucht und bestellt werden, der im Bereich des Startcodons inklusive einem Bereich der 5' UTR von *gpr17a* mit einer Länge von 24 bp binden konnte. Zu diesem Zweck wurde der *gpr17a*-Morpholino bzw. der Kontroll-Morpholino (siehe Tabelle 2.6) in das Ein- bis Zwei-Zellstadium von Zebrafischeiern injiziert (Wildtyp-Zebrafischeier). Als Zeitpunkt für die Untersuchung wurde Tag 4 nach der Morpholino-Injektion gewählt, da an Tag 4 mit einem maximalen Effekt des *gpr17a*-Morpholinos gerechnet werden konnte. Nach

4 Tagen erfolgte die Isolation von RNA (siehe Kapitel 3.2.2) aus jeweils 50 Zebrafischen. Diese wurde anschließend in cDNA umgeschrieben (siehe Kapitel 3.2.16). Im Anschluss daran wurde die Expression der genannten Gene an Tag 4 der Zebrafischentwicklung unter Berücksichtigung der jeweils ermittelten PCR-Effizienzen und Single-Threshold-Values (siehe Kapitel 4.2.2) mittels RT-qPCR ermittelt (siehe Kapitel 3.2.17). Zur Normalisierung wurden die Referenzgene *actb1* und *eef1a111* verwendet. Die Auswertung der unterschiedlichen Expressionslevels für jedes Gen erfolgte durch den Vergleich zwischen der Expression der Behandlungsgruppe (*gpr17a*-Morpholino) und der Kontrollgruppe (Kontroll-Morpholino). Hierbei wurde die Expression der Kontrollgruppe stets auf den Wert 1.0 (100%) gesetzt. Abbildung 4.17 zeigt die relativen mRNA-Expressionslevels der analysierten Gene.

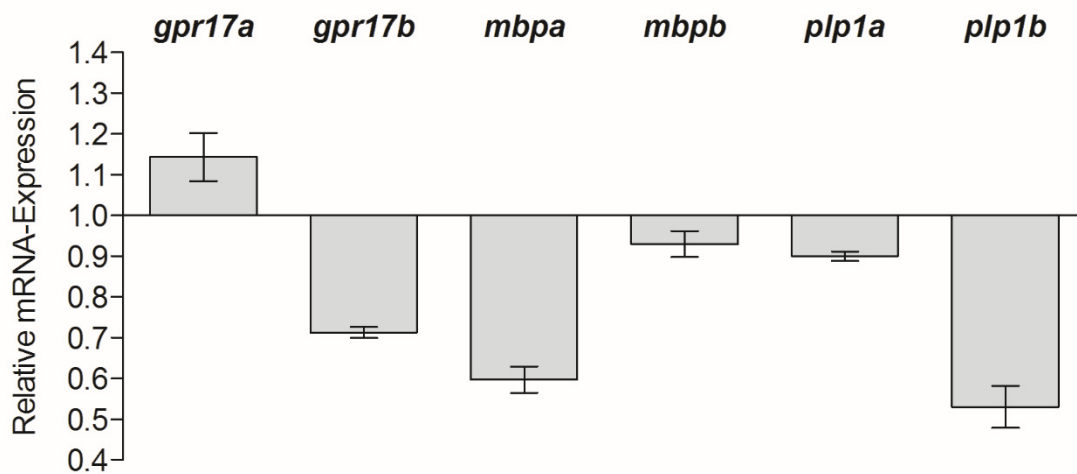


Abbildung 4.17: Relative mRNA-Expressionslevel von *gpr17a*, *gpr17b*, *mbpa*, *mbpb*, *plp1a* und *plp1b* nach der Morpholino-Injektion. Die hellgrauen Säulen kennzeichnen die relativen Expressionslevel an Tag 4 nach der Injektion des *gpr17a*-Morpholinos im Vergleich zur Kontrollgruppe (Injektion des Kontroll-Morpholinos, Expression = 1.0 (100%)). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an.

In Abbildung 4.17 ist zu erkennen, dass - abgesehen von *gpr17a* - an Tag 4 alle Gene durch den Einfluss des *gpr17a*-Morpholinos auf mRNA-Ebene herunterreguliert wurden. Die Myelin-assoziierten Gene *plp1b* und *mbpa* wurden dabei am stärksten herunterreguliert, wobei die Expression von *plp1b* um 46,9% und die Expression von *mbpa* um 40,4% im Vergleich zur Expression nach Behandlung mit dem Kontroll-Morpholino reduziert war. Die relative mRNA-Expression von *gpr17b* wurde durch den *gpr17a*-Morpholino um 28,9% reduziert. Eine erhöhte relative Expression um 14,3% konnte hingegen für *gpr17a* selbst festgestellt werden.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass der Knockdown von *grp17a* die Expression der Myelin-assoziierten Gene *mbpa*, *mbpb*, *plp1a* und *plp1b*, sowie die Expression von *grp17b* beeinflusst.

4.2.4 Testung des Gpr17a-Antikörpers

Morpholinos inhibieren die Genexpression durch eine Hemmung der Translation. Um nach der Injektion des *grp17a*-Morpholinos den Knockdown des Gens *grp17a* auf Proteinebene nachzuweisen, wurde zunächst ein spezifischer polyklonaler Antikörper gegen Gpr17a (siehe Tabelle 2.7) individuell hergestellt und getestet (Perbio Deutschland GmbH). Der Hersteller des Antikörpers injizierte dafür nach einem bestimmten Immunisierungsprotokoll mehrmals das spezifische Antigen KGTHESSLSAKSEF in Hühner. Dieses Antigen wurde zuvor vom Hersteller mithilfe des Antigen Profilers (Thermo Fisher Scientific Inc.) ausgewählt und stellte ein Peptid dar, das homolog zum C-Terminus von Gpr17a ist. Vor der Immunisierung wurde aus den Eiern der Tiere ein Kontrollserum gewonnen (Serum Tag 0), welches keine Antikörper gegen das Immunogen enthielt. Anschließend wurde an Tag 56 nach der Immunisierung ein weiteres Mal Serum gewonnen, aus dem schließlich der finale Antikörper aufgereinigt werden konnte. Um die Spezifität des Serums und des Antikörpers gegen Gpr17a zu überprüfen, wurden aus jeweils 50 Zebrafisch-Embryonen von Tag 1 bis Tag 10 die Gesamtproteine isoliert (siehe Kapitel 3.3.1), per Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Westernblot auf eine Membran geblottet (siehe Kapitel 3.3.3). Zur Detektion von Gpr17a wurde die Membran über Nacht mit dem Serum bzw. mit dem Gpr17a-Antikörper (1:200 bzw. 1:1000) inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran mit dem zweiten Antikörper (Goat-anti-Chicken HRP) im Verhältnis 1:20.000 mit 0,5%igen Milchpulver in TBS verdünnt inkubiert und mittels dem Chemilumineszenz-Substrat SuperSignal West Pico detektiert. Abbildung 4.18 zeigt den Westernblot zur Überprüfung der Spezifität des Gpr17a-Antikörpers. Abbildung 4.18A zeigt, dass unter Verwendung des Serums von Tag 56 eine deutliche Proteinbande bei ca. 37 kDa detektiert werden konnte, die unter Verwendung des Serums von Tag 0 (Kontrollserum) nicht vorhanden war, da dieses keine Antikörper gegen Gpr17a enthielt. Zusätzlich wurden unterhalb von 15 kDa drei weitere schwache Banden detektiert, die im Kontrollserum zum Teil nur sehr schwach oder gar nicht detektiert werden konnten. Bei diesen Banden handelte es sich höchstwahrscheinlich um unspezifische Banden.

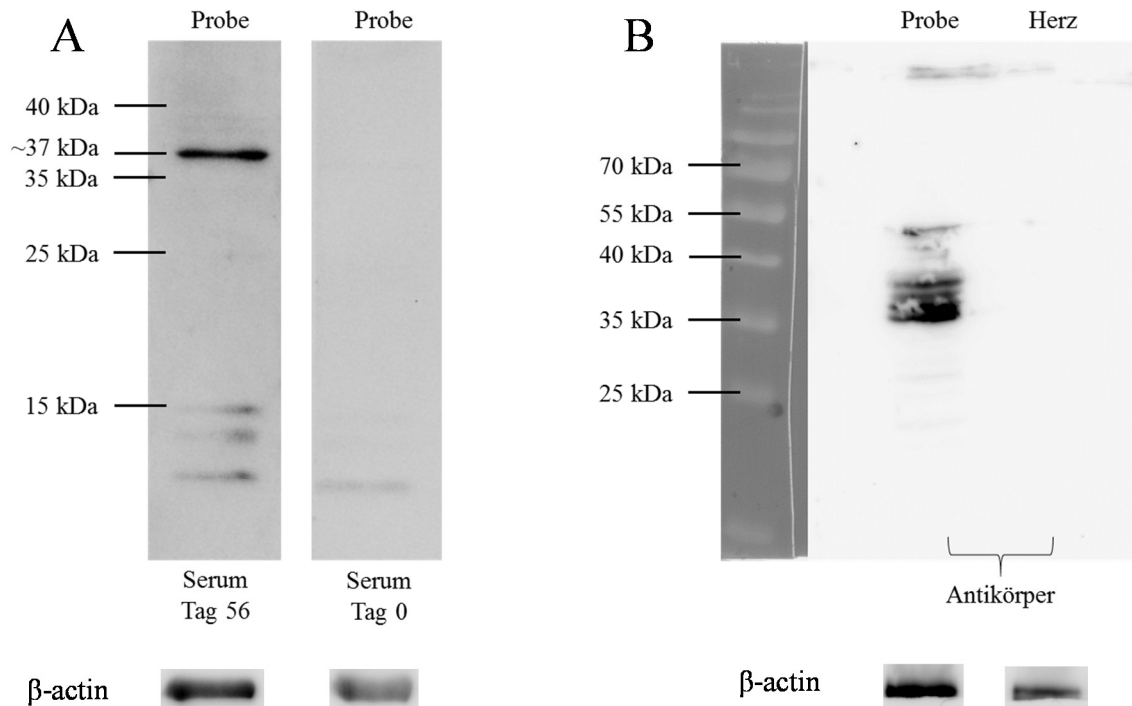


Abbildung 4.18: Westernblot zur Überprüfung der Spezifität des Serums (A) und des Antikörpers (B) zur Detektion von Gpr17a (~37 kDa). Als Probe wurden jeweils 30 µg gepoolte Gesamtproteine der Tage 1 bis 10 verwendet. In A wurde das Serum von Tag 0 als Negativkontrolle verwendet. Als Negativkontrolle in B (Herz) wurden 30 µg der Gesamtproteine aus dem Herz des Zebrafisches verwendet. Als Ladekontrolle wurde der Antikörper β-actin verwendet.

Wie Abbildung 4.18B zeigt, konnten unter Verwendung des primären Antikörpers gegen Gpr17a, der aus dem Serum von Tag 56 aufgereinigt wurde, im Bereich von 35 kDa bis knapp über 40 kDa mehrere einzelne Banden detektiert werden. Eine stärkere Bande konnte jedoch auch auf der Höhe von ca. 37 kDa detektiert werden. Aufgrund der Tatsache, dass *gpr17a* mittels RT-PCR nicht im Herz nachgewiesen werden konnte (siehe Kapitel 4.2.1), wurde die Proteinprobe aus dem Herzen als Negativkontrolle verwendet und zeigte demzufolge keine Bande.

Des Weiteren wurde der Gpr17a-Antikörper in der Zellkultur getestet. Um eine transiente Expression von Gpr17a in HEK 293-Zellen (siehe Kapitel 3.4.2) zu erzielen, wurde zunächst der kodierende Abschnitt des *gpr17a*-Gens mit dem Primerpaar *gpr17a_for_HindIII* und *gpr17a_rev_XhoI* mit genomischer DNA als Template durch eine Standard-PCR amplifiziert. Das entstandene PCR-Produkt wurde anschließend über die Schnittstellen *HindIII* und *XhoI* in den Vektor pcDNA3.1 (+) kloniert. Nach der Transformation des Plasmids in *E. coli* NEB 5-alpha F'Iq, der Plasmidisolierung, des Testverbaus sowie einer Sequenzierung wurde das Plasmid pcDNA3.1 (+) *gpr17a* (Abbildung 4.19) mittels Calciumphosphat-Transfektion

(Calcium Phosphate Transfection Kit, Fisher Scientific Germany GmbH) in HEK 293-Zellen eingebracht (siehe Kapitel 3.4.2).

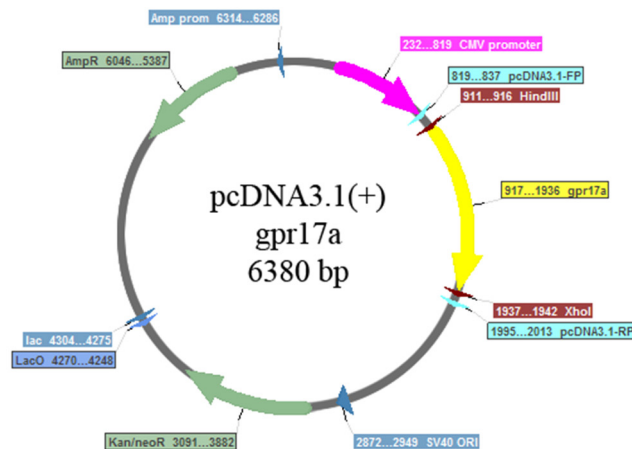


Abbildung 4.19: Plasmidkarte von pcDNA3.1 (+) gpr17a.

Nach 48-72 h wurden die transfizierten HEK 293-Zellen hinsichtlich der transienten Expression des Gpr17a-Rezeptors mithilfe der Immunfluoreszenz-Färbung (siehe Kapitel 3.3.4) am Fluoreszenzmikroskop untersucht (Abbildung 4.20). Der aufgereinigte Gpr17a-Antikörper wurde in einer 1:500-Verdünnung verwendet. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper (AlexaFluor 488) in einer 1:20.000 Verdünnung.

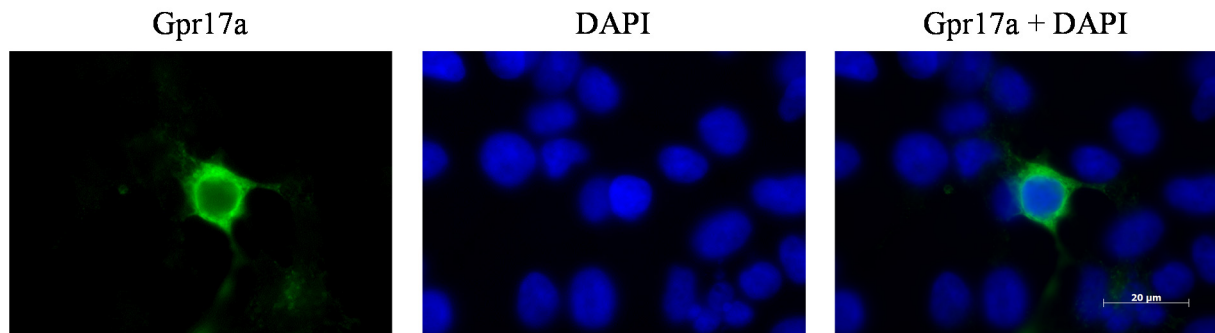


Abbildung 4.20: Testung des Gpr17a-Antikörpers in HEK 293-Zellen, die transient Gpr17a exprimieren. Die grüne Fluoreszenz zeigt die Immunfluoreszenz von Gpr17a. Die blaue Immunfluoreszenz mit DAPI markiert die Nuklei der transfizierten HEK293-Zellen.

Die grüne Fluoreszenz in Abbildung 4.20 zeigt, dass der Gpr17a-Rezeptor auf der Membran der HEK293-Zellen exprimiert wurde und der aufgereinigte Antikörper spezifisch an diese Gpr17a-Rezeptoren binden konnte. Als Negativkontrolle wurde der Leervektor pcDNA3.1 (+) in HEK 293-Zellen transfiziert. Nach der Antikörperfärbung konnte hier keine grüne Fluoreszenz detektiert werden.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass der aufgereinigte Antikörper spezifisch an das C-terminale Ende von Gpr17a bindet und in folgenden Experimenten zur sicheren Detektion des Gpr17a-Proteins verwendet werden kann.

4.2.5 Auswirkung der Morpholino-Injektion auf Proteinebene

Um den Einfluss des Gen-Knockdowns von *gpr17a* mittels Westernblot zu analysieren, wurde zunächst der *gpr17a*-Morpholino bzw. der Kontroll-Morpholino (siehe Tabelle 2.6) in das Ein- bis Zwei-Zellstadium von Zebrafischeiern (Wildtyp-Zebrafischeier) injiziert. An Tag 3, 4 und 5 wurden aus jeweils 40 Zebrafisch-Embryonen die Gesamtproteine isoliert (siehe Kapitel 3.3.1). Abbildung 4.21 zeigt den Westernblot zur Detektion von Gpr17a nach der Injektion des *gpr17a*-Morpholinos bzw. des Kontroll-Morpholinos.

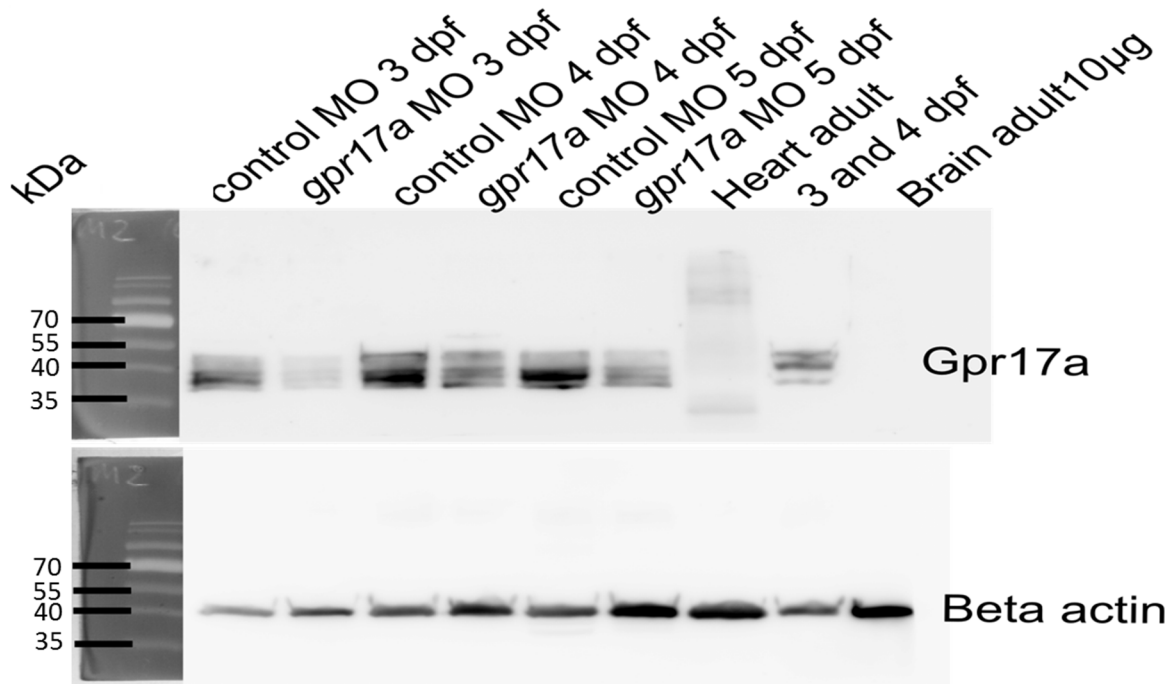


Abbildung 4.21: Westernblot von Gpr17a nach erfolgreicher Injektion des *gpr17a*-Morpholinos bzw. des Kontroll-Morpholinos. Es wurden jeweils 35 µg der Gesamtproteine mit Ausnahme der Proteinprobe aus dem Gehirn des Zebrafisches (Brain adult 10 µg) verwendet. Alle Proben zeigen einen positiven Nachweis auf das Referenzprotein Beta actin. Versuchsdurchführung/Bildquelle: Philip Reinoß (Masterarbeit zum Thema „Gpr17“ in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Odermatt).

Die Injektion des *gpr17a*-Morpholinos (*gpr17a* MO) in Zebrafisch-Embryonen führte an Tag 3, 4 und 5 zu einer reduzierten Expression von Gpr17a im Vergleich zur Expression nach

der Injektion des Kontroll-Morpholinos (control MO), was an der Bandenintensität der Banden zwischen 35 kDa und 40 kDa deutlich erkennbar ist. Eine Bande im Bereich von 35 kDa und 40 kDa konnte auch in der Positivkontrolle detektiert werden, für die gepoolte Gesamtproteine aus Wildtyp-Zebrafisch-Embryonen der Tage 3 und 4 isoliert wurden. Für die zweite Positivkontrolle wurden die Gesamtproteine aus dem Gehirn von ausgewachsenen Zebrafischen isoliert. Hier konnte jedoch keine Gpr17a-Bande detektiert werden. Die Gründe hierfür können ausschließlich auf einen unzureichenden Kontakt des Antikörpers mit der Membran während der Inkubation oder auf eine zu geringe Proteinmenge von nur 10 µg zurückzuführen sein. In der Negativkontrolle, für die 35 µg Gesamtproteine aus dem Herzen ausgewachsener Zebrafische isoliert wurden, konnte, wie erwartet, kein Gpr17a nachgewiesen werden. In diesem Westernblot wurde Beta-Aktin als Referenzgen verwendet. Dieses konnte in allen Proben nachgewiesen werden, wobei auffällig war, dass die Bandenstärke von Beta-Aktin in den Proben nach der Injektion des *gpr17a*-Morpholinos im Vergleich zur Injektion des Kontroll-Morpholinos sogar etwas ausgeprägter war.

4.2.6 Einfluss des *gpr17a*-Knockdowns in der Fischlinie *Tg(olig2:EGFP)*

Im Bereich des Rückenmarks des Zebrafisches sind die primären neuronalen Progenitorzellen (pMN – primary motoneuron domain) lokalisiert, die unter anderem den Transkriptionsfaktor Olig2 exprimieren. Ravanelli und Appel (2015) zeigten, dass sich höchstwahrscheinlich aus verschiedenen primären neuronalen Progenitorzellen zunächst Motoneurone und zu einem späteren Zeitpunkt Oligodendrozyten-Vorläuferzellen und Oligodendrozyten bilden. Um den Einfluss von *gpr17a* auf die Differenzierung zu Motoneuronen und Oligodendrozyten zu analysieren, wurde der *gpr17a*-Morpholino bzw. der Kontroll-Morpholino in die transgene Zebrafischlinie *Tg(olig2:EGFP)* injiziert (Shin et al., 2003) und die Anzahl dorsal des pMNs migrierender *olig2*⁺-Zellen gezählt. Die Injektion des jeweiligen Morpholinos erfolgte in das Ein- bis Zwei-Zellstadium der transgenen Zebrafischeier (siehe Kapitel 3.1.4). Als weitere Kontrollen dienten Zebrafischeier der transgenen Fischlinie *Tg(olig2:EGFP)*, die keiner Morpholino-Injektion unterzogen wurden (hier als WT bezeichnet). Nach vier Tagen wurden die Fische für *in vivo*-Aufnahmen mit dem 2-Photonenmikroskop in Agarose fixiert (siehe Kapitel 3.1.7) und analysiert. Hierfür wurden drei biologische Replikate (N=3) erstellt, die jeweils aus vier Zebrafischen (n=4) bestanden. Zum Auszählen der *EGFP*⁺-*olig2*-Zellen wurden „Composite Z image stacks“ mithilfe der Software ImageJ angelegt, die jeweils den

gleichen Ausschnitt des Rückenmarks der Zebrafisch-Embryonen abbildeten (Abbildung 4.22A).

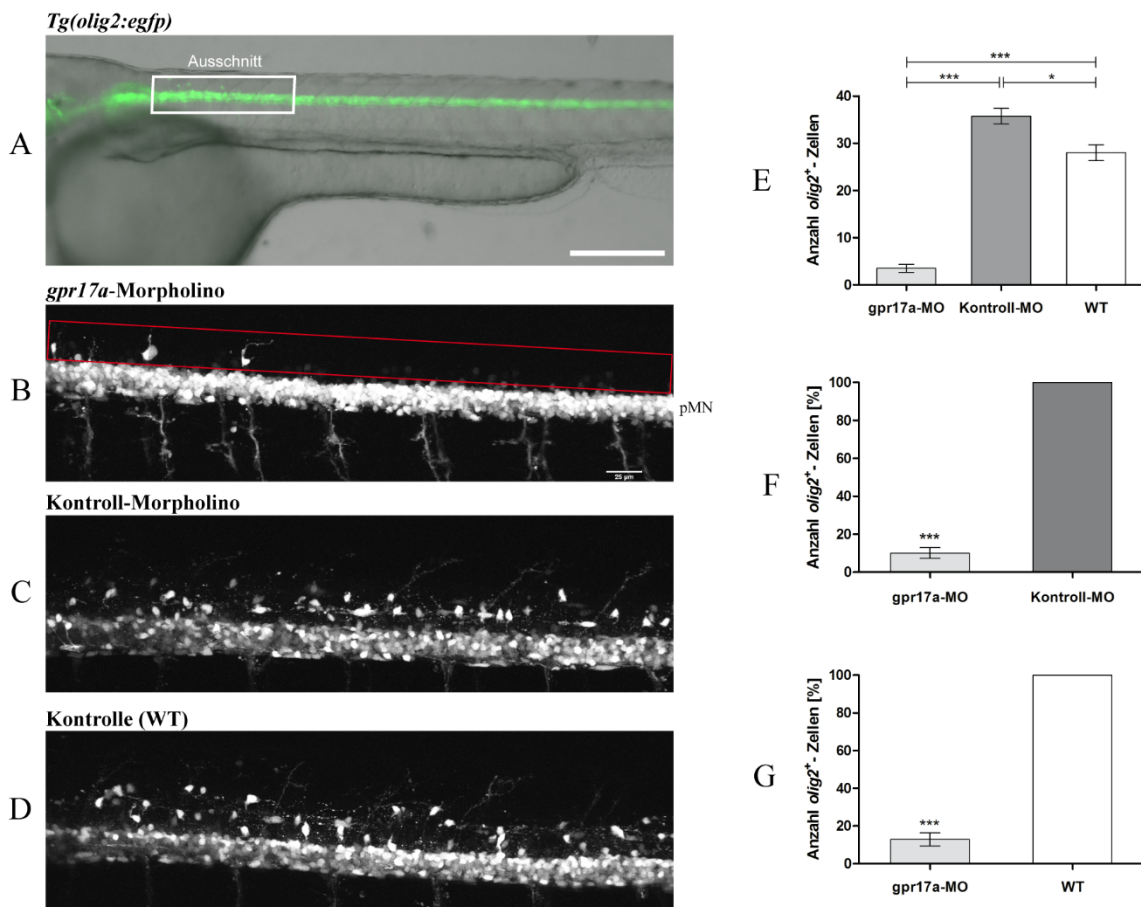


Abbildung 4.22: Einfluss des *gpr17a*-Morpholinos auf die Anzahl *EGFP⁺-olig2*-Zellen in vier Tage alten Zebrafisch-Embryonen im Vergleich zu den Kontrollen. **A;** Übersichtsbild eines Zebrafisch-Embryo der transgenen Zebrafischlinie *Tg(olig2:EGFP)* erstellt mithilfe des Fluoreszenzmikroskops (Hellfeld/Fluoreszenz). Der Ausschnitt (weißes Quadrat) kennzeichnet den Bereich im Zebrafischembryo, der für die Auswertungen mit dem 2-Photonenmikroskop betrachtet wurde. Die *EGFP⁺-olig2*-Zellen leuchten grün. Die Bilder A-D zeigen eine seitliche Ansicht des Zebrafisches mit dem Kopf nach links und dem Rücken nach oben. **B, C, D;** Aufnahmen des genannten Ausschnittes mit dem 2-Photonenmikroskop, in denen die grüne Fluoreszenz jeweils in weiß dargestellt wird. Die mikroskopischen Bilder zeigen jeweils ein repräsentatives Beispiel der analysierten Daten (N=3). pMN: primary motor neuron **E, F, G;** Anzahl (E) bzw. prozentualer Anteil (F, G) *EGFP⁺-olig2*-Zellen nach Injektion des *gpr17a*-Morpholinos im Vergleich zu den Kontrollen (Injektion des Kontroll-Morpholinos, WT – transgene Fischembryonen ohne Morpholino-Injektion). Die statistischen Auswertungen wurden mithilfe der Prism Software durchgeführt. Die Sternchen geben die *p*-Werte des jeweiligen zweiseitigen, ungepaarten t-Tests an (* = *p* < 0,05; ** = *p* < 0,01; *** = *p* < 0,001). Maßstab. A: 500 µm. B,C,D: 25 µm.

In jedem „image stack“ wurden in allen vom 2-Photonenmikroskop aufgenommenen Ebenen die dorsal des pMNs migrierenden grün-fluoreszierenden Zellen markiert und ausgezählt (Abbildung 4.22B, roter Bereich). Abbildung 4.22 zeigt nun den Einfluss der Injektion des *gpr17a*-Morpholinos auf die Migration bzw. Differenzierung der *olig2*⁺ neuronalen Progenitorzellen zu Oligodendrozyten bzw. Oligodendrozyten-Vorläuferzellen im Vergleich zu den Kontrollen. Wie Abbildung 4.22A zeigt, wurde der Transkriptionsfaktor Olig2, wie bereits von Ravanelli und Appel (2015) beschrieben, sowohl in den primären neuronalen Progenitorzellen entlang des Rückenmarks, als auch in dorsal migrierenden Oligodendrozyten bzw. Oligodendrozyten-Vorläuferzellen der vier Tage alten Zebrafisch-Embryonen der Linie *Tg(olig2:EGFP)* exprimiert (grüne Fluoreszenz). Die Untersuchungen zeigten, dass nach der Injektion des *gpr17a*-Morpholinos die Anzahl der *EGFP*⁺-*olig2*-Zellen dorsal des pMNs (Abbildung 4.22, roter Bereich) im Vergleich zur Behandlung mit dem Kontroll-Morpholino bzw. ohne Injektion eines Morpholinos (WT) signifikant ($p < 0,001$) reduziert war (Abbildung 4.22B, C, D, E). Während nach der Injektion des *gpr17a*-Morpholinos durchschnittlich nur vier *EGFP*⁺-*olig2*-Zellen detektiert werden konnten, wurden nach der Injektion des Kontroll-Morpholinos mit durchschnittlich 36 *EGFP*⁺-*olig2*-Zellen und ohne Morpholino-Injektion (WT) mit durchschnittlich 28 *EGFP*⁺-*olig2*-Zellen deutlich mehr *EGFP*⁺-*olig2*-Zellen erfasst (Abbildung 4.22E). Die Ursachen und Gründe für die leichte Steigerung der Anzahl der *olig2*⁺-Zellen dorsal des pMNs nach Injektion des Kontroll-Morpholinos im Vergleich zur Kontrolle ohne Morpholino-Injektion sind bisher nicht bekannt. Die Abbildung 4.22F und G zeigen schließlich, dass die Injektion des *gpr17a*-Morpholinos zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl der dorsal migrierenden *EGFP*⁺-*olig2*-Zellen um 90% im Vergleich zum Kontroll-Morpholino bzw. um 87% im Vergleich zum Wildtyp führte ($p < 0,001$).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Herunterregulierung der *Gpr17a*-Expression durch den Einfluss des *gpr17a*-Morpholinos die Migration der *EGFP*⁺-*olig2*-Oligodendrozyten bzw. *EGFP*⁺-*olig2*-Oligodendrozyten-Vorläuferzellen dorsal des pMNs inhibiert.

4.2.7 Einfluss des *gpr17a*-Knockdowns in der Fischlinie *Tg(cldnk:GAL4,UAS:EGFP)*

Münzel et al. (2012) veröffentlichten erstmalig Daten über die transgene Zebrafischlinie *Tg(cldnk:GAL4,UAS:EGFP)*, mit deren Hilfe Claudin k exprimierende Zellen detektiert werden konnten. Diese transgene Fischlinie wurde unter Verwendung des Tol2-Gal4-UAS

Systems (Halpern et al., 2008) hergestellt. Münzel et al. (2012) zeigten schließlich, dass das Gen *claudin k* (ZDB-GENE-040801-201) bzw. dessen Promotor als Myelinmarker zur *in vivo* Analyse der Differenzierung von Oligodendrozyten und Schwann-Zellen geeignet ist. Um für die Untersuchungen in dieser Arbeit eine vergleichbare transgene Fischlinie generieren zu können, wurde uns von Frau Dr. Dr. Eva Jolanda Münzel (AG Prof. Catherina G. Becker, Universität Edinburgh) das Plasmid pCR8GW-Claudink (siehe Anhang: Abbildung A1), welches die Promotorsequenz von *claudin k* enthält, zugesendet. Die exakte Promotorsequenz von *claudin k* ist bisher nicht bekannt, befindet sich jedoch innerhalb eines 4192 bp großen Abschnitts stromaufwärts des Startkodons von *claudin k* (Münzel et al., 2012). Das 4192 bp große Insert des Plasmids pCR8GW-Claudink besteht aus dem gesamten untranslatierten Bereich von Exon 2 stromaufwärts des ATG-Startkodons, dem gesamten Intron 1, dem Exon 1 sowie weiteren 906 bp stromaufwärts von Exon 1 (Münzel et al., 2012). Um für die Untersuchungen dieser Arbeit transiente Fischlarven zu generieren, mit der ebenfalls Claudin k exprimierende Zellen detektiert werden können, wurde das I-SceI-Meganuclease-System (Rembold et al., 2006) verwendet (siehe Kapitel 3.1.3). Für die Klonierung wurde zunächst der gesamte Promotor von *claudin k* mithilfe des Restriktionsenzym *BstBI* (TT/CGAA) aus dem Plasmid pCR8GW-Claudink ausgeschnitten und über das kompatible Restriktionsenzym *Clal* (AT/CGAT) in das Plasmid pBluescript II KS I-SceI (siehe Anhang: Abbildung A2) kloniert. Das entstandene Plasmid pBluescript II KS I-SceI-claudin k-Promotor enthielt nun den Promotor von *claudin k*, der an beiden Enden der multiplen Klonierungsstelle von dem Meganukleasenenzym I-SceI flankiert wurde (siehe Anhang: Abbildung A3). Anschließend wurde die kodierende Sequenz des „enhanced green fluorescent proteins“ (EGFP-N1) aus dem Plasmid pEGFP-N1 (siehe Anhang: Abbildung A4) mit den Restriktionsenzymen *AfeI* und *SspI* ausgeschnitten und über die Schnittstellen *EcoRV* und *Eco53kl* stromabwärts des Promotors von *claudin k* in das Plasmid kloniert, sodass das Plasmid pBluescript II KS I-SceI claudin k EGFP entstand (Abbildung 4.23). Die so klonierte EGFP-N1-Sequenz beinhaltet neben dem verstärkten grün-fluoreszierenden Protein EGFP eine Kozak-Konsensussequenz sowie Polyadenylierungssignale (SV 40 poly A). Nach der Transformation des Plasmids in *E. coli* NEB 5-alpha F'I^q, einer Plasmidkultur und eines Testverdaus sowie einer Sequenzierung wurde das Plasmid pBluescript II KS I-SceI-claudin k-Promotor-EGFP zusammen mit dem Meganuklease-Enzym I-SceI in Fischeier des Wildtyps injiziert (siehe Kapitel 3.1.3) und somit transiente Fischlarven zu generieren (Abbildung 4.24).

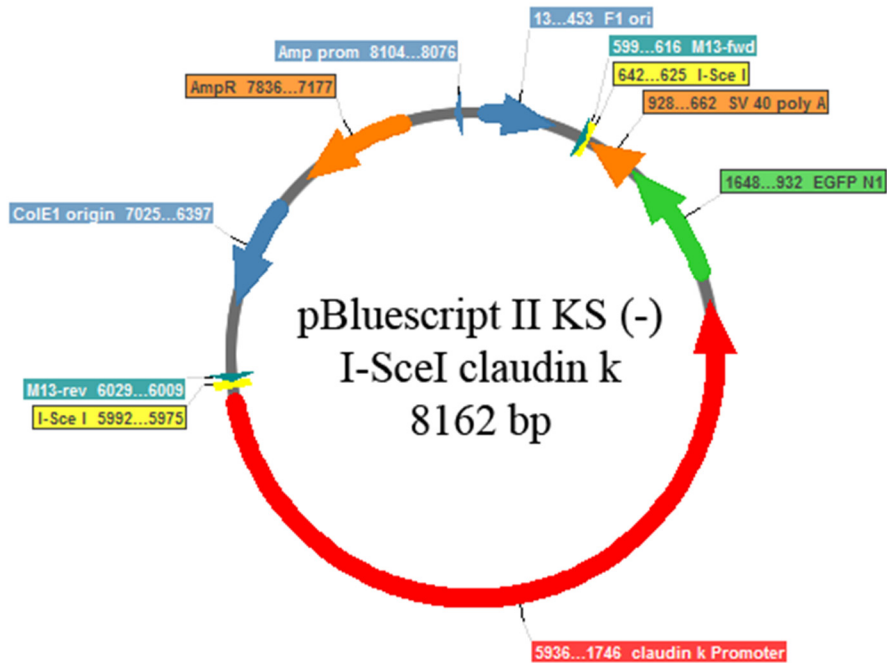


Abbildung 4.23: Plasmidkarte von pBluescript II KS I-SceI claudin k EGFP. Das Plasmid enthält den Promotor von claudin k (rot) sowie das Gen EGFP N1 (grün) flankiert durch die Schnittstellen des Meganuklease-Enzyms I-SceI (gelb).



Abbildung 4.24: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der transienten Fischlarve mit dem Plasmid pBluescript II KS I-SceI Claudin k EGFP. Die weißen Pfeile kennzeichnen die Expression EGFP auf beiden Seiten des Fisches entlang des Seitenlinienorgans (lateral line). Die Pfeilspitze kennzeichnet die Expression von EGFP unter Kontrolle des Claudin k-Promotors im Bereich des Rückenmarks. Der Bildausschnitt zeigt den Zebrafisch von oben mit dem Kopf nach links. Maßstab 100 μm .

In der Abbildung ist deutlich zu erkennen, dass eine Expression von EGFP unter der Kontrolle des Claudin k-Promotors sowohl in den myelinisierenden Schwann-Zellen entlang des Seitenlinienorgans, als auch in den myelinisierenden Oligodendrozyten entlang des Rückenmarkes detektiert werden konnte, wie es bereits in der transgenen Fischlinie *Tg(cldnk:GAL4,UAS:EGFP)* beschrieben wurde (Münzel et al., 2012).

Um nun den Einfluss von *gpr17a* auf die Entwicklung von Oligodendrozyten zu analysieren, wurde der *gpr17a*-Morpholino bzw. der Kontroll-Morpholino in die transgene Zebrafischlinie *Tg(cldnk:GAL4,UAS:EGFP)* injiziert und die Anzahl und Form *EGFP⁺-cldnk*-Zellen oberhalb des Rückenmarks gezählt (Abbildung 4.25). Die Injektion des jeweiligen Morpholinos erfolgte in das Ein- bis Zwei-Zellstadium der transgenen Zebrafischeier (siehe Kapitel 3.1.4). Als weitere Kontrollen dienten Zebrafischeier der transgenen Fischlinie *Tg(cldnk:GAL4,UAS:EGFP)*, die keiner Morpholino-Injektion unterzogen wurden (hier als WT bezeichnet). Nach drei Tagen wurden die Fische für die *in vivo*-Aufnahmen mit dem 2-Photonenmikroskop in Agarose fixiert (siehe Kapitel 3.1.7) und analysiert. Hierfür wurden drei biologische Replikate (N=3) erstellt, die jeweils aus vier Zebrafischen (n=4) bestanden. Zum Auszählen und zur Bestimmung der Form der *EGFP⁺-cldnk*-Zellen wurden „Composite Z image stacks“ angelegt, die jeweils den gleichen Ausschnitt des Rückenmarks der Zebrafisch-Embryonen abbildeten (Ausschnitt siehe Abbildung 4.22A). In jedem „image stack“ wurden in allen vom 2-Photonenmikroskop aufgenommenen Ebenen die dorsal des pMNs migrierenden grün-fluoreszierenden Zellen markiert, ausgezählt und ihre Zellmorphologie bestimmt. Abbildung 4.25 zeigt den Einfluss der Injektion des *gpr17a*-Morpholinos auf die Claudin k exprimierenden Oligodendrozyten im Vergleich zu den Kontrollen. Die Untersuchungen zeigten, dass nach der Injektion des *gpr17a*-Morpholinos die gesamte Anzahl der *EGFP⁺-cldnk*-Zellen dorsal des pMNs (Abbildung 4.25A, weiß umrandeter Bereich) im Vergleich zur Behandlung mit dem Kontroll-Morpholino signifikant ($p < 0,05$) reduziert war (Abbildung 4.25A, B, D, E). Während nach der Injektion des *gpr17a*-Morpholinos durchschnittlich 15 *EGFP⁺-cldnk*-Zellen detektiert werden konnten, wurden nach der Injektion des Kontroll-Morpholinos durchschnittlich 24 *EGFP⁺-cldnk*-Zellen detektiert (Abbildung 4.25D). Die Anzahl der *cldnk⁺*-Zellen wurde somit auf 61% reduziert (Abbildung 4.25F). Die Anzahl der *cldnk⁺*-Zellen ohne Morpholino-Injektion (WT) betrug durchschnittlich 18 (Abbildung 4.25D), was lediglich einer Reduktion auf 80% entsprach (Abbildung 4.25E). Im Vergleich zur Anzahl der Zellen nach der Injektion des *gpr17a*-Morpholinos, war hier kein signifikanter Unterschied zu erkennen.

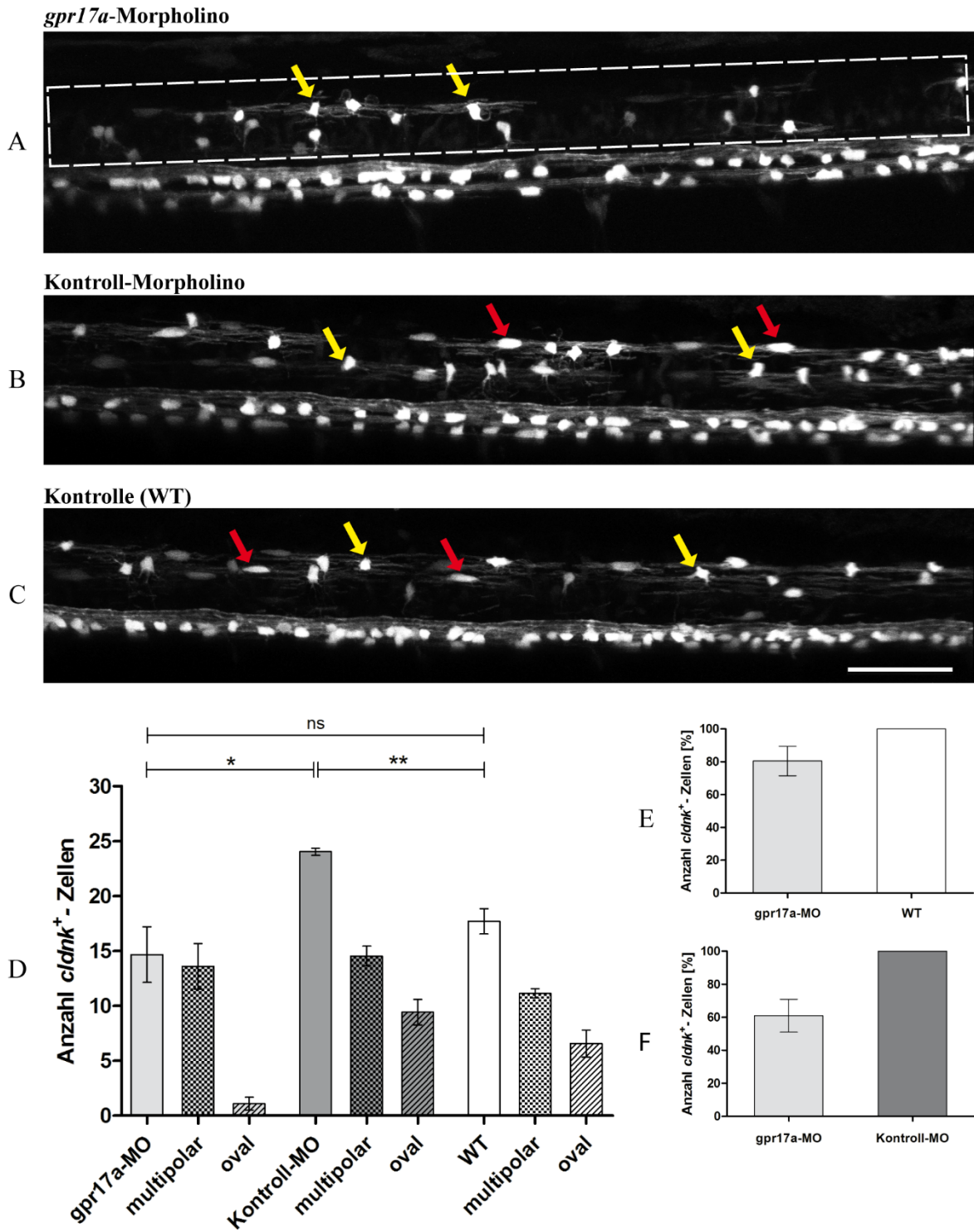


Abbildung 4.25: Einfluss des *gpr17a*-Morpholinos auf die Anzahl und Form *EGFP*⁺-*cldnk*-Zellen in drei Tage alten Zebrafisch-Embryonen im Vergleich zu den Kontrollen. A, B, C; Aufnahmen eines Ausschnittes des Rückenmarks (siehe Abbildung 4.22A) mit dem 2-Photonenmikroskop, in denen die grüne Fluoreszenz in weiß dargestellt wird. Die mikroskopischen Bilder zeigen jeweils ein repräsentatives Beispiel der analysierten Daten (N=3). Der Ausschnitt (weißes Rechteck) kennzeichnet den Bereich im Zebrafischembryo, der für die Auswertungen mit dem 2-Photonenmikroskop betrachtet wurde. Die gelben Pfeile kennzeichnen beispielhaft multipolare *EGFP*⁺-*cldnk*-Zellen und

die roten Pfeile ovale *EGFP⁺-cldnk*-Zellen. Die Bilder A-C zeigen eine seitliche Ansicht des Zebrafisches mit dem Kopf nach links und dem Rücken nach oben. **D, E, F**; Anzahl (D) bzw. prozentualer Anteil (E, F) der *EGFP⁺-cldnk*-Zellen nach der Injektion des *gpr17a*-Morpholinos (hellgraue Säulen) im Vergleich zu den Kontrollen (Injektion des Kontroll-Morpholinos (dunkelgraue Säulen), WT – transgene Fischembryonen ohne Morpholino-Injektion (weiße Säulen)). Die Anzahl der multipolaren *EGFP⁺-cldnk*-Zellen sind kariert und die Anzahl der ovalen *EGFP⁺-cldnk*-Zellen sind quergestreift dargestellt (D). Die statistischen Auswertungen wurden mithilfe der Prism Software durchgeführt. Die Sternchen geben die *p*-Werte des jeweiligen zweiteiligen, ungepaarten t-Tests an (ns = nicht signifikant; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$). Maßstab. A,B,C: 50 μm .

Die Ursachen und Gründe für die Steigerung der Anzahl der *EGFP⁺-cldnk*-Zellen nach Injektion des Kontroll-Morpholinos im Vergleich zur Kontrolle ohne Morpholino-Injektion sind bisher nicht bekannt, sind jedoch ziemlich wahrscheinlich auf den mechanischen Eingriff während der Injektion des Morpholinos zurückzuführen. Auffällig war, dass die dorsal des pMNs detektierten *EGFP⁺-cldnk*-Zellen verschiedene Formen aufwiesen. Es konnten sowohl multipolare, als auch ovale *EGFP⁺-cldnk*-Zellen ausgezählt werden. Während bei beiden Kontrollen jeweils ca. 60% der Zellen eine multipolare und ca. 40% eine ovale Form aufwiesen (Abbildung 4.25D), wurden nach Injektion des *gpr17a*-Morpholinos mit einem Anteil von 93% (durchschnittlich 14 Zellen) fast ausschließlich multipolare *EGFP⁺-cldnk*-Zellen detektiert. Der Anteil der ovalen *EGFP⁺-cldnk*-Zellen entsprach somit nur ca. 7% (durchschnittlich 1 Zelle). Absolut gesehen, blieb die Anzahl der multipolaren *EGFP⁺-cldnk*-Zellen nach der Injektion des *gpr17a*-Morpholinos (durchschnittlich 14 Zellen) im Vergleich zu beiden Kontrollen (Kontroll-MO: 15 Zellen; WT: 11 Zellen) nahezu konstant.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Herunterregulierung der *Gpr17a*-Expression durch den Einfluss des *gpr17a*-Morpholinos die Gesamtzahl der *EGFP⁺-cldnk*-Oligodendrozyten im dorsalen Bereich des Rückenmarks negativ beeinflusst. Interessanterweise konnte festgestellt werden, dass durch den Einfluss des *gpr17a*-Morpholinos die Anzahl ovaler Zellen im Vergleich zu den multipolaren Zellen erheblich reduziert war.

4.3 Lokalisation von Gpr17a im Zebrafisch

4.3.1 *In situ* Hybridisierung

Nach dem quantitativen und qualitativen Nachweis von *gpr17a* und *gpr17b* war es von besonderem Interesse, die Expression von *gpr17a* auf mRNA-Ebene im Zebrafischembryo auch visuell mittels der *in situ* Hybridisierung zu lokalisieren. Aufgrund der höheren Homologie von Gpr17a zum humanen *GPR17* im Vergleich zu Gpr17b wurde die auf der Antisense-Technik basierende *in situ* Hybridisierung (siehe Kapitel 3.1.6) ausschließlich für das Zebrafischgen *gpr17a* in 1 bis 3 Tage alten Zebrafisch-Embryonen (dpf) durchgeführt. Zunächst wurde das *gpr17a*-Gen vom Startkodon bis zum Stoppkodon mithilfe einer Standard-PCR (siehe Kapitel 3.2.8) unter Verwendung gepoolter cDNA von ein bis zehn Tage alten Zebrafisch-Embryonen (siehe Kapitel 3.2.16, cDNA-Synthese) als Template sowie dem Primerpaar *gpr17a_for_HindIII* und *gpr17a_rev_XhoI* amplifiziert. Das Produkt wurde anschließend über die Schnittstellen *HindIII* und *XhoI* in das Plasmid pBluescript II SK (-) (siehe Anhang: Abbildung A5) kloniert. Abbildung 4.26 zeigt das entstandene Plasmid pBluescript II SK (-) *gpr17a* mit der kodierenden Sequenz von *gpr17a* als Insert. Die Herstellung der Digoxigenin-markierten RNA-Sonden für die *in situ* Hybridisierung erfolgte mithilfe der *in vitro* Transkription (siehe Kapitel 3.2.20). Das Plasmid pBluescript II SK (-) *gpr17a* wurde zunächst für die Synthese der Antisense-Sonde mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *EcoRI* und für die Synthese der Sense-Sonde (Kontrolle) mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *KpnI* linearsiert. Anschließend wurde die Synthese der Antisense-Sonde von *gpr17a* mit der T7-RNA-Polymerase und die Sense-Sonde mit der T3-RNA-Polymerase unter Verwendung Digoxigenin-markierter Nukleotide durchgeführt. Als Positivkontrolle und Vergleichskontrolle wurde das Plasmid pGEM-T EASY mbpa (Isoform 12, (siehe Anhang: Abbildung A6)) verwendet (Nawaz et al., 2013). Für die Antisense-Sonde wurde das Plasmid mit den Restriktionsenzymen *SpeI* und *SacI* linearsiert und mit der T7-RNA-Polymerase synthetisiert. Für die Sense-Sonde wurde das Plasmid hingegen mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und *ApaI* linearsiert und mit der SP6-RNA-Polymerase synthetisiert.

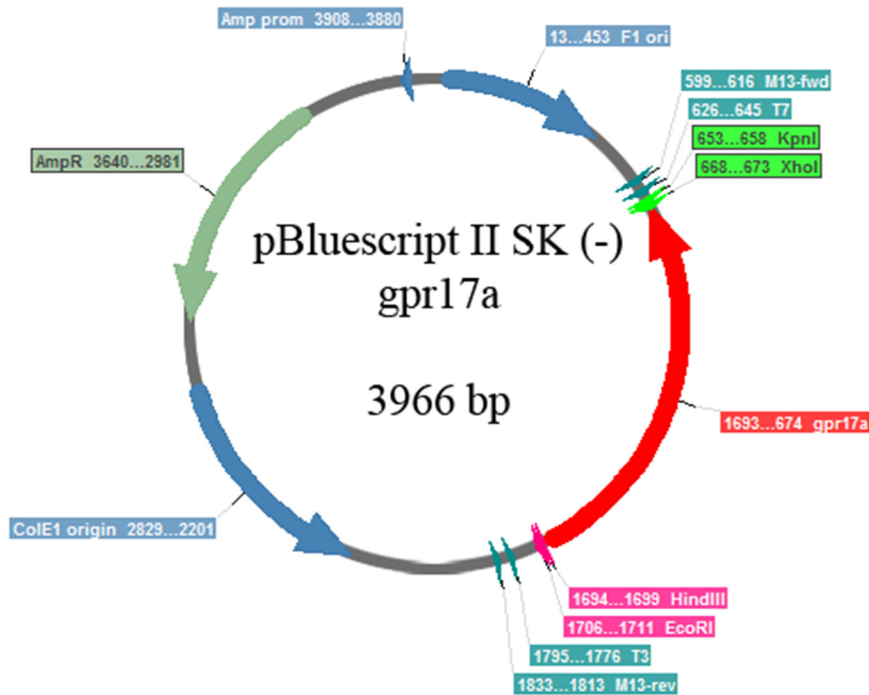


Abbildung 4.26: Plasmid pBluescript II SK (-) gpr17a zur Gegenstrangsynthese und Hauptstrangsynthese mittels *in vitro* Transkription.

Die Durchführung der *in situ* Hybridisierung erfolgte wie in Kapitel 3.1.6 beschrieben. Abbildung 4.27 zeigt die mikroskopischen Aufnahmen der *in situ* Hybridisierung mithilfe der *gpr17a*-Antisense-Sonden in 24 h, 48 h und 72 h alten Zebrafisch-Embryonen im Vergleich zur Kontrolle. Wie Abbildung 4.27 zeigt, konnten bereits in 24 h alten Zebrafisch-Embryonen schwache *gpr17a*-Signale unter Verwendung der Digoxigenin-markierten RNA-Antisense-Sonde von *gpr17a* detektiert werden. Die Signalintensität nahm nach 48 h und 72 h deutlich zu. Bei den jeweiligen Negativkontrollen konnten unter Verwendung der Digoxigenin-markierten RNA-Sense-Sonde von *gpr17a* keine Signale detektiert werden. Mithilfe dieser ersten mikroskopischen Aufnahmen konnte die mRNA von *gpr17a* oberhalb und entlang des Notochords im Rückenmark (ZNS) des Zebrafisch-Embryonen lokalisiert werden.

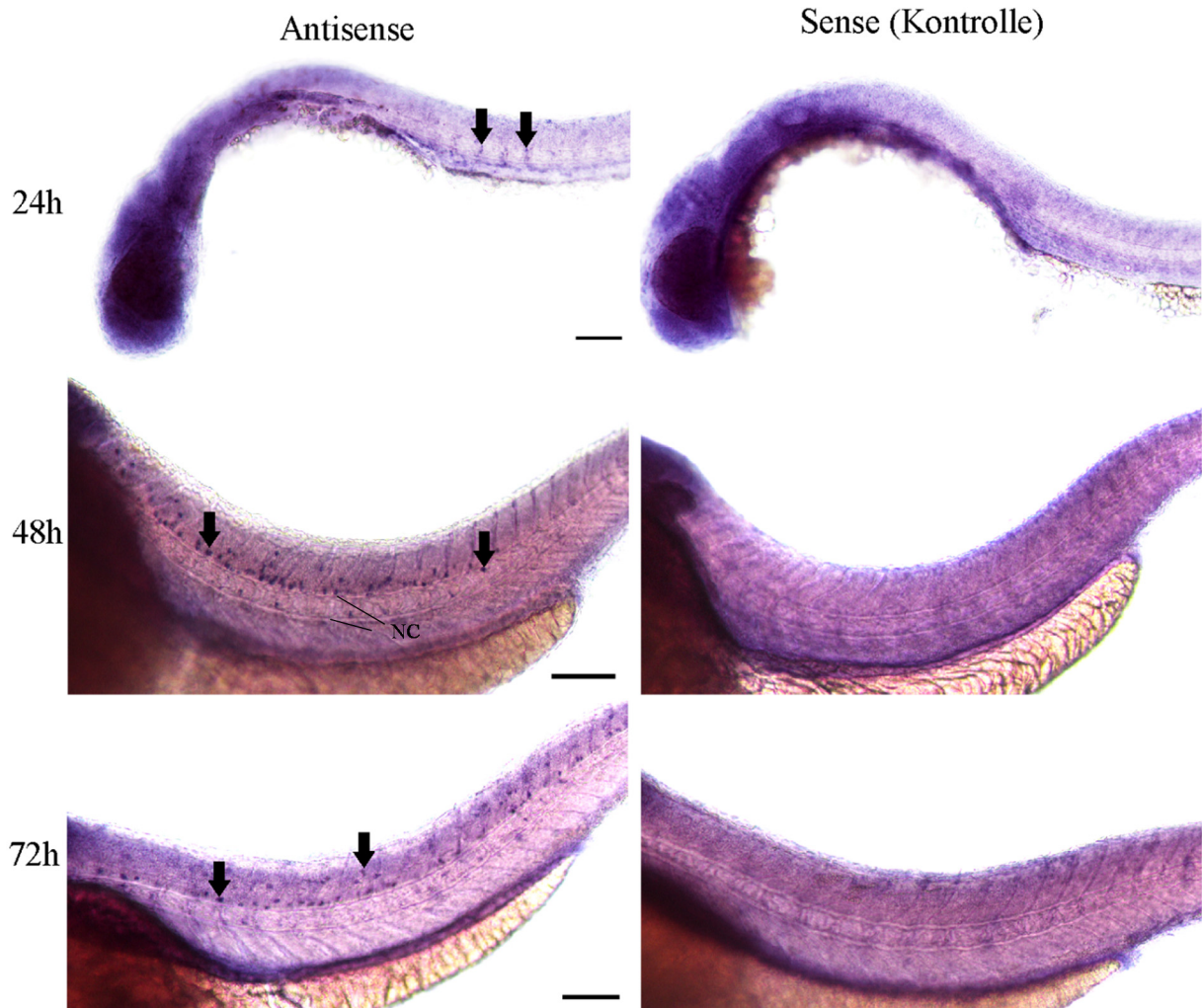


Abbildung 4.27: Mikroskopische Hellfeld-Aufnahmen der *in situ* Hybridisierung mithilfe einer *gpr17a*-Antisense-Sonde in ein bis drei Tage alten Zebrafisch-Embryonen (linke Spalte) im Vergleich zur Sense-Kontrolle (rechte Spalte). **24h;** Erste *gpr17a*-Signale im Vergleich zur Kontrolle. **48h/72h;** Vermehrte Detektion von *gpr17a*-Signalen entlang und oberhalb des Notochords (NC) im Vergleich zur Kontrolle. Die schwarzen Pfeile kennzeichnen beispielhaft *gpr17a*-Signale in allen Bildern. Alle Bilder zeigen seitlich liegende Zebrafisch-Embryonen, die mit dem Kopf nach links und mit dem Rücken nach oben gerichtet sind. Maßstab: 100 μm .

Für die genauere Lokalisation der *gpr17a*-mRNA-Expression wurde die *in situ* Hybridisierung anschließend nur mit drei Tage alten Zebrafisch-Embryonen wiederholt und das zuvor beschriebene Gen *mbpa* (Nawaz et al., 2013) als Referenz bzw. Myelin-Marker (Antisense-Sonde) hinzugezogen (Abbildung 4.28).

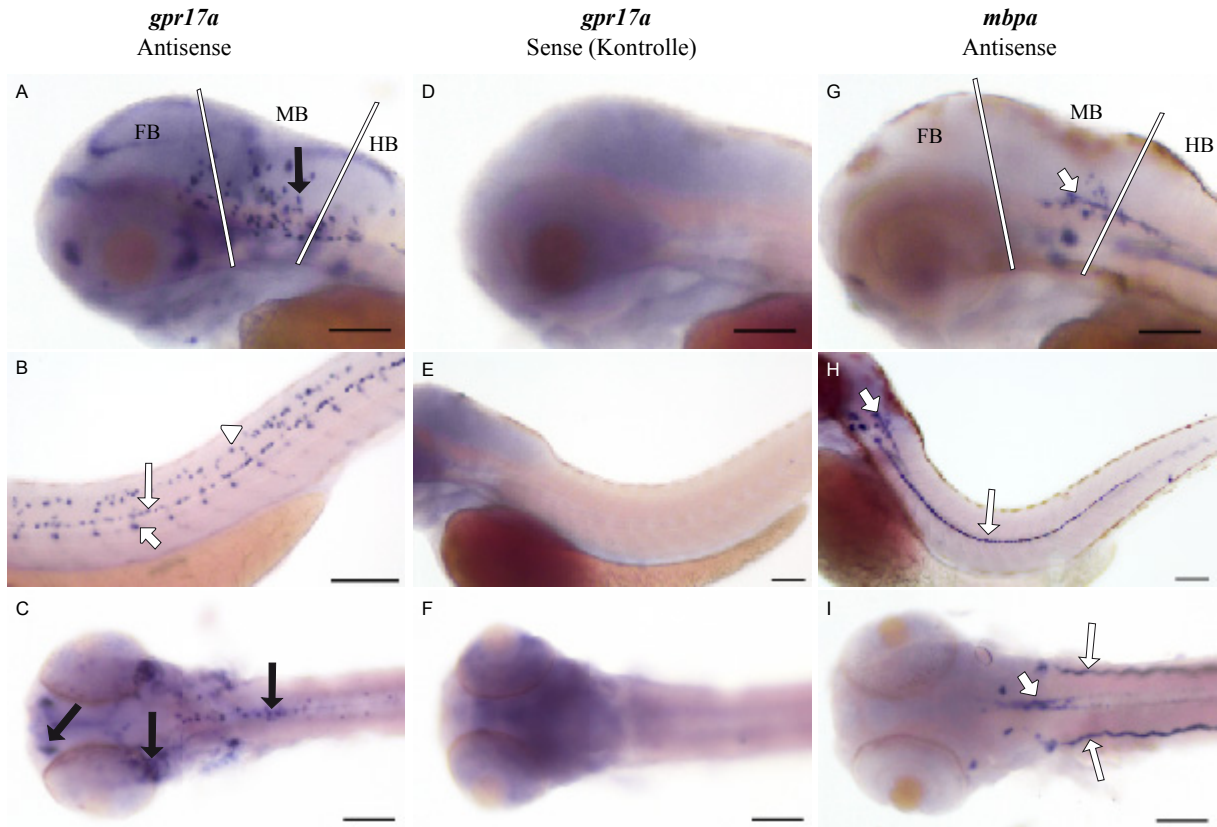


Abbildung 4.28: Mikroskopische Hellfeld-Aufnahmen der *in situ* Hybridisierungen von *gpr17a* (A-F) und *mbpa* (G-I) in drei Tage alten Zebrafisch-Embryonen. A/D, mRNA-Expression von *gpr17a* (Antisense-Sonde) im Vorderhirn (FB) sowie im Bereich des Mittelhirn (MB) und Hinterhirn (HB) im Vergleich zur Kontrolle (Sense-Sonde). Der schwarze Pfeil kennzeichnet beispielhaft ein *gpr17a*-Signal. B/E, Expression von *gpr17a* im dorsalen Bereich des Notochords in der Ebene der Bodenplatte des Rückenmarkes (Bodenplatte, langer Pfeil), im Bereich des *Fasciculus longitudinalis dorsalis* (Pfeilspitze) und auf Höhe des Notochords (kurzer Pfeil) im Vergleich zur Kontrolle. C/F, Expression von *gpr17a* entlang des Rückenmarks, im Bereich des Auges und im Bereich der Epiphyse. Die schwarzen Pfeile kennzeichnen beispielhaft die *gpr17a*-Signale. G, Expression von *mbpa* im Bereich des Mittelhirns (MB) und des Hinterhirns (HB). Der weiße Pfeil kennzeichnet beispielhaft ein *mbpa*-Signal. H/I; Expression von *mbpa* im Bereich des Rückenmarks (kurzer Pfeil) und entlang der posterioren Laterallinien (PLL, lange Pfeile). Die Pfeile kennzeichnen beispielhaft die *mbpa*-Signale. Die Bilder A/B/D/E/G und H zeigen den Zebrafisch seitlich mit dem Kopf nach links und dem Rücken nach oben. Die Bilder C/F und I zeigen den Zebrafisch von oben mit dem Bauch nach unten und mit dem Kopf nach links. Maßstab: 100 μ m.

Wie die Abbildung 4.28A und D zeigen, konnten im Kopfbereich des Zebrafisches im Vorderhirn, im Mittelhirn und im Hinterhirn *gpr17a* mRNA-Transkripte im Vergleich zur Sense-Kontrolle detektiert werden. Abbildung 4.28B zeigt die Lokalisierung verschiedener

„Gruppen“ von *gpr17a*-Signalen an unterschiedlichen Stellen im Schwanzbereich des Zebrafisches im Bereich des horizontalen Myoseptums auf der Höhe der Laterallinie des Zebrafisches. Abbildung 4.29 zeigt einen vergrößerten Ausschnitt von Abbildung 4.28B. Es konnten 3 Gruppen von *gpr17a*-Signalen detektiert werden: Gruppe 1 dorsal des Notochords in der Ebene der Bodenplatte des Rückenmarks (langer Pfeil) sowie einige Signale im Bereich der Dachplatte (Gruppe 2, Pfeilspitzen) detektiert werden. Interessanterweise zeigen die Abbildung 4.28B und Abbildung 4.29 weiterhin sehr gleichmäßig verteilte *gpr17a*-Signale (Gruppe 3, kurzer Pfeil), die von der seitlichen Ansicht her auf Höhe des Notochords bzw. des horizontalen Myoseptums im Bereich jeder einzelnen Somitengrenze liegen.

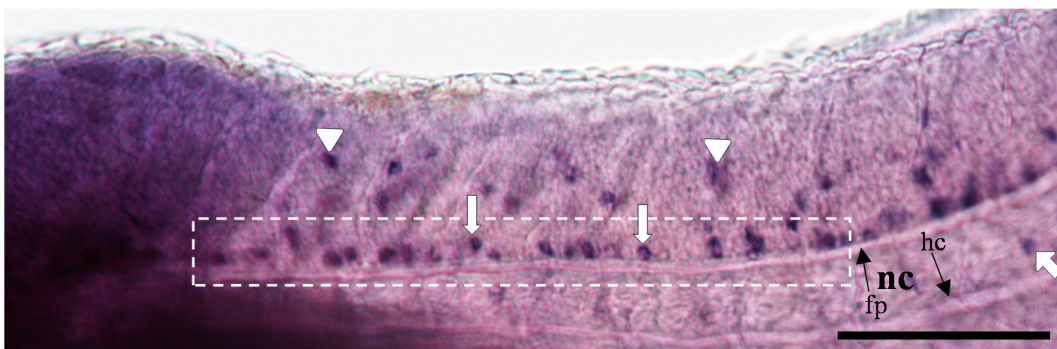


Abbildung 4.29: Vergrößerte mikroskopische Hellfeld-Aufnahme der *in situ* Hybridisierung gegen *gpr17a* im Bereich des Rückenmarks eines drei Tage alten Zebrafisch-Embryos. Die weißen Pfeile innerhalb des weiß gestrichelten Rechtecks kennzeichnen beispielhaft *gpr17a*-Signale in der Ebene der Bodenplatte (Gruppe 1), die weißen Pfeilspitzen kennzeichnen *gpr17a*-Signale im Bereich des *Fasciculus longitudinalis dorsalis* (Gruppe 2) und der weiße kurze Pfeil kennzeichnet beispielhaft ein *gpr17a*-Signale im Bereich des horizontalen Myoseptums (Gruppe 3). Seitliche Ansicht des Zebrafisches mit dem Kopf nach links und dem Rücken nach oben. Maßstab: 100 μ m. nc: notochord; fp: floorplate (Bodenplatte); hc: hypochord.

Die Abbildung 4.28 G,H und I zeigen die mikroskopischen Aufnahmen der *in situ* Hybridisierung mithilfe der Antisense-Sonde gegen *mbpa* als Myelin-Referenzgen (Nawaz et al., 2013). Wie bereits von Nawaz et al. (2013) beschrieben wurde, konnten deutliche *mpba*-Signale im Mittel- und Hinterhirn entlang des Rückenmarks (kurze Pfeile) sowie entlang der posterioren Laterallinien (PLL, lange Pfeile) detektiert werden. Die Versuche von Nawaz et al. (2013) wurden in dieser Arbeit dazu reproduziert, um hinsichtlich der Lokalisation der *gpr17a*-Signale einen direkten Vergleich der Daten zu ermöglichen. Eine *in situ* Hybridisierung mithilfe der Sense-RNA-Sonde von *mbpa* (Negativkontrolle) wurde ebenfalls durchgeführt. In diesen mikroskopischen Aufnahmen konnten, wie bei der *gpr17a* Sense-

Sonde, keine Signale detektiert werden. Um die beobachteten *gpr17a*-Signale auf Höhe des Notochords bzw. des horizontalen Myoseptums (Gruppe 3) näher zu charakterisieren und diese möglicherweise als sich in dieser Region bildende primäre Neuromasten zu identifizieren, wurde eine Vitalfärbung von primären Neuromasten in Zebrafisch-Embryonen vorgenommen (siehe Kapitel 3.1.8). Abbildung 4.30 zeigt die Ergebnisse der Vitalfärbung der primären Neuromasten mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiAsp (Chen et al., 2011) in einem drei Tage alten Zebrafisch-Embryo.

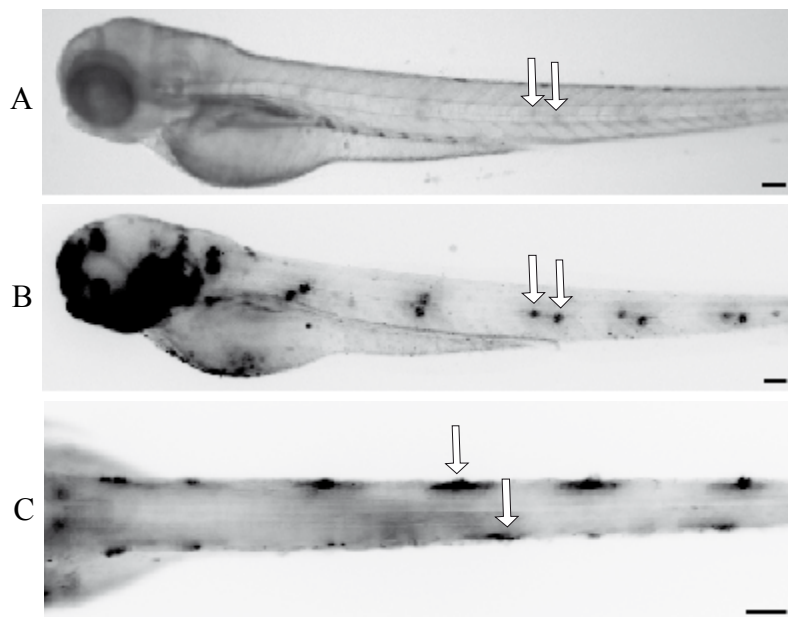


Abbildung 4.30: Neuromasten-Färbung in einem drei Tage alten Zebrafisch-Embryo. A; Mikroskopische Hellfeldaufnahme. B/C; Aufnahme mit dem Fluoreszenzmikroskop. Die Pfeile zeigen beispielhaft durch den Farbstoff angefärbte primäre Rumpfneuromasten entlang der medialen Rumpflinie des Lateralliniensystem. Die Abbildungen A und B zeigen den Zebrafisch seitlich gelegen mit dem Kopf nach links und dem Rücken nach oben. Die Abbildung C zeigt den Fisch von oben mit dem Bauch nach unten und dem Kopf nach links gerichtet. Maßstab: 100 μ m.

Die mikroskopische Hellfeldaufnahme (Abbildung 4.30A) zeigt ein Übersichtsbild, auf dem sowohl der Notochord als auch die intersomatischen Grenzen (Somitengrenzen) zu erkennen sind. Die weißen Pfeile deuten selbst in der Hellfeldaufnahme bereits auf eine erfolgte Färbung der primären Neuromasten mit dem Fluoreszenzfarbstoff hin. Die Fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Abbildung 4.30B und C zeigen deutlich die Färbung und Lage der primären Neuromasten. Die Anordnung der primären Neuromasten zeigt ein deutlich anderes Verteilungsmuster als die beobachteten *gpr17a*-Signalen, die in der seitlichen Ansicht zwar auf Höhe des horizontalen Myoseptum lokalisiert waren, jedoch

weiter innen als das horizontale Myoseptum lokalisiert waren (Abbildung 4.28B, kurzer Pfeil, Gruppe 3). Die primären Neuromasten sind im Vergleich zu den detektierten *gpr17*-Signalen der *in situ* Hybridisierung in geringerer Anzahl vorhanden und sind weniger an den Somitengrenzen vorzufinden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der *in situ* Hybridisierung, dass *gpr17a*-Transkripte an unterschiedlichen Stellen im zentralen Nervensystem des Zebrafisches und im Bereich des horizontalen Myoseptums in der Ebene des Notochords detektiert werden konnten.

4.3.2 Einfluss von Trichostatin A auf die *gpr17a*-Expression

Um zu untersuchen, ob *gpr17a* in Oligodendrozyten bzw. Oligodendrozyten-Vorläuferzellen exprimiert wird, wurden die Zebrafisch-Embryonen mit Trichostatin A (TSA), einem Inhibitor der Histon-Deacetylase (HDAC), behandelt wie in Kapitel 3.1.9 beschrieben. Zahlreiche Veröffentlichungen zeigten, dass die Hemmung von HDAC die Entwicklung und Spezifizierung von Oligodendrozyten negativ beeinflusst (Marin-Husstege et al., 2002; Cunliffe und Casaccia-Bonnel, 2006; Takada und Appel, 2010).

Im ersten Experiment wurde die Expression von *gpr17a*, *mbpa* und *plp1b* in TSA-behandelten Zebrafisch-Embryonen im Vergleich zur Kontrolle mittels RT-qPCR untersucht. Dazu wurde zum Zeitpunkt 3 dpf aus jeweils 25 Zebrafisch-Embryonen RNA isoliert (siehe Kapitel 3.2.2). Im Anschluss erfolgte die cDNA-Synthese (siehe Kapitel 3.2.16) sowie die Messung der Expressionslevel der genannten Gene unter Berücksichtigung der jeweils zuvor ermittelten PCR-Effizienzen und Single-Threshold-Values (siehe Kapitel 4.2.2) mittels RT-qPCR (siehe Kapitel 3.2.17). Zur Normalisierung wurden die Referenzgene *actb1* und *eef1a111* verwendet. Die Auswertung der unterschiedlichen Expressionslevels für jedes Gen erfolgte durch den Vergleich zwischen der Expression der Behandlungsgruppe (100 ng/ml TSA) und der Kontrollgruppe (ohne TSA). Hierbei wurde die Expression der Kontrollgruppe stets auf den Wert 1.0 (100%) gesetzt. Abbildung 4.31 zeigt die relativen mRNA-Expressionslevels der analysierten Gene.

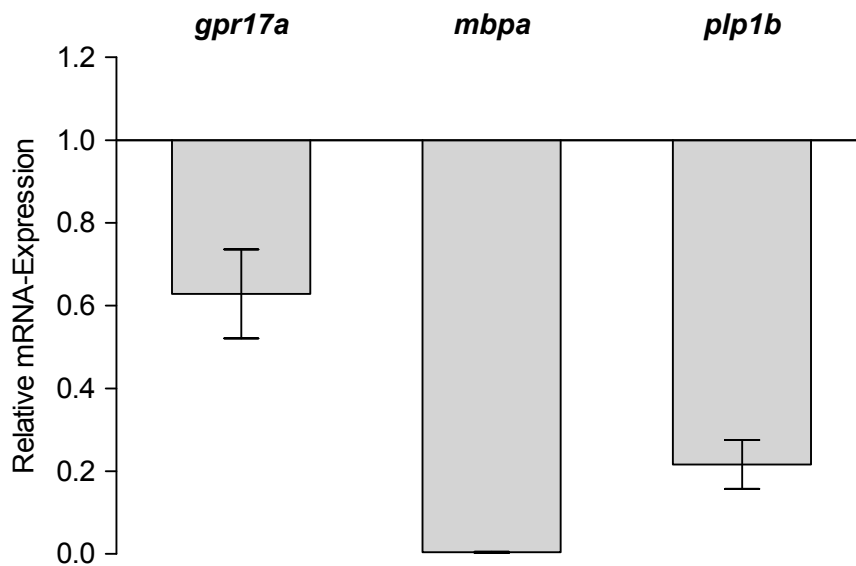


Abbildung 4.31: Relative mRNA-Expressionslevels von *gpr17a*, *mbpa* und *plp1b* nach der Behandlung mit TSA (100 ng/ml) in drei Tage alten Zebrafisch-Embryonen (3 dpf) im Vergleich zur Kontrolle. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler von drei biologischen Replikaten an.

Wie Abbildung 4.31 zeigt, führte die Behandlung der Zebrafisch-Embryonen mit TSA zu einer deutlichen Hemmung der Expressionslevels von *gpr17a* und der Myelin-assoziierten Gene *mbpa* und *plp1b* im Vergleich zur Kontrolle. In diesem Experiment führte die Behandlung mit TSA zu einer nahezu vollständigen Abwesenheit der relativen *mbpa*-Expression (Reduktion um 99,996%), wie es bereits von Takada und Appel (2010) beschrieben wurde. Die Expressionslevel von *plp1b* und *gpr17a* hingegen waren nach der Behandlung mit TSA um 78,4% und 37,1% reduziert.

Da TSA die Entwicklung von Oligodendrozyten hemmt bzw. die Anzahl der dorsal des pMNs migrierenden $Olig2^+$ -Oligodendrozyten-Vorläuferzellen reduziert (Takada und Appel, 2010), wurde im Anschluss an die RT-qPCR eine *in situ* Hybridisierung (siehe Kapitel 3.1.6) zur Detektion von *gpr17a*-exprimierenden Zellen nach der Behandlung mit TSA durchgeführt, um zu untersuchen, ob *gpr17a* in Oligodendrozyten bzw. $olig2^+$ -Oligodendrozyten-Vorläuferzellen exprimiert wird. Für das zweite Experiment wurden ebenfalls Zebrafisch-Embryonen (3dpf) verwendet, die mit Trichostatin A (TSA) behandelt wurden (siehe Kapitel 3.1.9). Die Herstellung der *gpr17a*-Antisense-Sonde sowie die Durchführung der Detektion von *gpr17a*-Signalen erfolgte wie im Ergebnisteil 4.3 beschrieben. Abbildung 4.32 zeigt die mikroskopischen Aufnahmen der *in situ* Hybridisierung mithilfe der *gpr17a*-Antisense-Sonde in 72 h alten Zebrafisch-Embryonen im Vergleich zur Kontrolle.

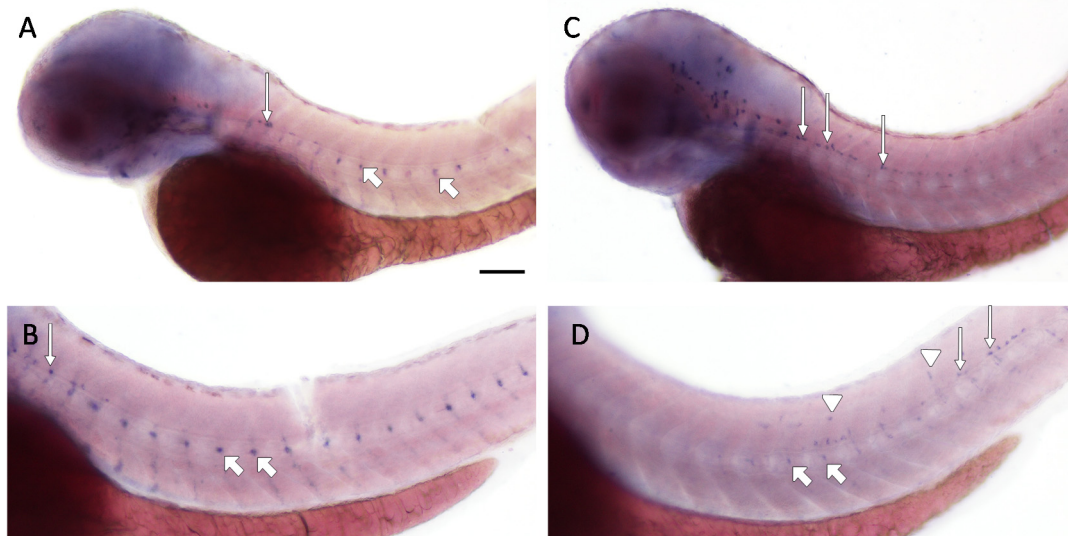


Abbildung 4.32: Mikroskopische Hellfeld-Aufnahmen der *in situ* Hybridisierung mithilfe einer *gpr17a*-Antisense-Sonde nach der Behandlung mit TSA (100 ng/ml) in einem drei Tage alten Zebrafisch-Embryo (A, B) im Vergleich zur Kontrolle (C, D). Die weißen kurzen Pfeile kennzeichnen beispielhaft *gpr17a*-Signale im Bereich des horizontalen Myoseptums (Gruppe 3). Die langen Pfeile kennzeichnen beispielhaft *gpr17a*-Signale in der Ebene der Bodenplatte (Gruppe 1). Die weißen Pfeilspitzen kennzeichnen *gpr17a*-Signale im Bereich der Dachplatte (Gruppe 2). Die Bilder zeigen repräsentative Ausschnitte von seitlich liegenden Zebrafisch-Embryonen, die mit dem Kopf nach links und mit dem Rücken nach oben gerichtet sind. Maßstab: 100 μ m.

Wie Abbildung 4.32 zeigt, konnten in mit TSA behandelten Zebrafisch-Embryonen unter Verwendung der Digoxigenin-markierten RNA-Antisense-Sonde starke *gpr17a*-Signale im Bereich des horizontalen Myoseptums (Gruppe 3) sowie einige wenige Signale im Bereich der Bodenplatte (Gruppe 1) detektiert werden. Im Vergleich dazu konnten in der Kontrolle ohne TSA-Behandlung alle *gpr17a*-Signal-Typen detektiert werden (Gruppe 1, 2 und 3). In den mit TSA behandelten Zebrafisch-Embryonen konnten in Vergleich zur Kontrolle deutlich weniger mRNA-Signale von *gpr17a* im Kopfbereich detektiert werden. Die Kontrollen bestätigen die Ergebnisse aus Kapitel 4.3.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass unter Einwirkung des Histon-Deacetylase-Inhibitors TSA keine bzw. äußerst wenige *gpr17a*-Signale oberhalb des Notochords im Rückenmark (ZNS) lokalisiert werden konnten.

4.3.3 Promotoranalyse von *gpr17a*

Um die bisher unbekannte Lage des *gpr17a*-Promotors vor dem Startkodon des Gens etwas einzugrenzen und mithilfe der Promotorsequenz von *gpr17a* den Zelltyp, in dem *gpr17a* exprimiert wird, ergänzend zu der *in situ* Hybridisierung noch genauer zu charakterisieren, wurde ein 9,5 kb großer Sequenzabschnitt stromaufwärts des Startkodons von *gpr17a* in das Plasmid pBluescript II KS I-SceI EGFP kloniert und das entstandene Plasmid für die im folgenden beschriebene Promotoranalyse verwendet. Ziel war es, mit dem 9470 bp großen Sequenzabschnitt die Promotorsequenz von *gpr17a* zu erfassen sowie mögliche unbekannt regulierende Elemente (Enhancer und Silencer) mit einzuschließen. Die 9470 bp große genomische Region umfasste 3128 bp stromaufwärts von Exon 1, sowie das gesamte Exon 1 (104 bp), das gesamte Intron 1 (6230 bp) und 8 bp von Exon 2, die vor dem Startkodon lokalisiert sind (siehe genetische Organisation von *gpr17a* Abbildung 4.6). Dieser 9470 bp große Sequenzabschnitt wird im Folgenden als *gpr17a*-Promotor bezeichnet. Aufgrund der Größe und der Komplexität der zu klonierenden Promotorregion, wurde diese zunächst in zwei Teile unterteilt. Der weiter vom Startkodon entfernte Teil der Promotorregion wurde mit dem Primerpaar *gpr17a_Prom_Teil_1_for* und *gpr17a_Prom_Teil_1_rev* unter Berücksichtigung des Systems zur Klonierung multipler DNA Fragmente (siehe Kapitel 3.2.12) mittels Standard-PCR unter Verwendung der PrimeSTAR® Max DNA Polymerase und genomischer DNA als Template amplifiziert. Der näher am Startkodon gelegene Teil der Promotorregion wurde gleichermaßen unter Verwendung des Primerpaares *gpr17a_Prom_Teil_2_for* und *gpr17a_Prom_Teil_2_rev* amplifiziert. Anschließend wurde das Plasmid pBluescript II KS I-SceI *claudin k* EGFP (siehe Abbildung 4.23) mit dem Restriktionsenzym *XhoI* verdaut und aufgereinigt, um den enthaltenen *claudin k*-Promotor zu entfernen. Um nun beide PCR-Produkte der Promotorregion von *gpr17a* in einem Schritt nahtlos mittig zu verbinden und gleichzeitig in das Plasmid zu klonieren, wurden die Primer der einzelnen Promorterteile zuvor so ausgewählt, dass die Primerenden komplementär zueinander bzw. komplementär zu den Schnittstellen des zuvor linearisierten Plasmids waren (siehe Abbildung 3.4). Abbildung 4.33 zeigt das entstandene Plasmid pBluescript II KS I-SceI *gpr17a* EGFP.

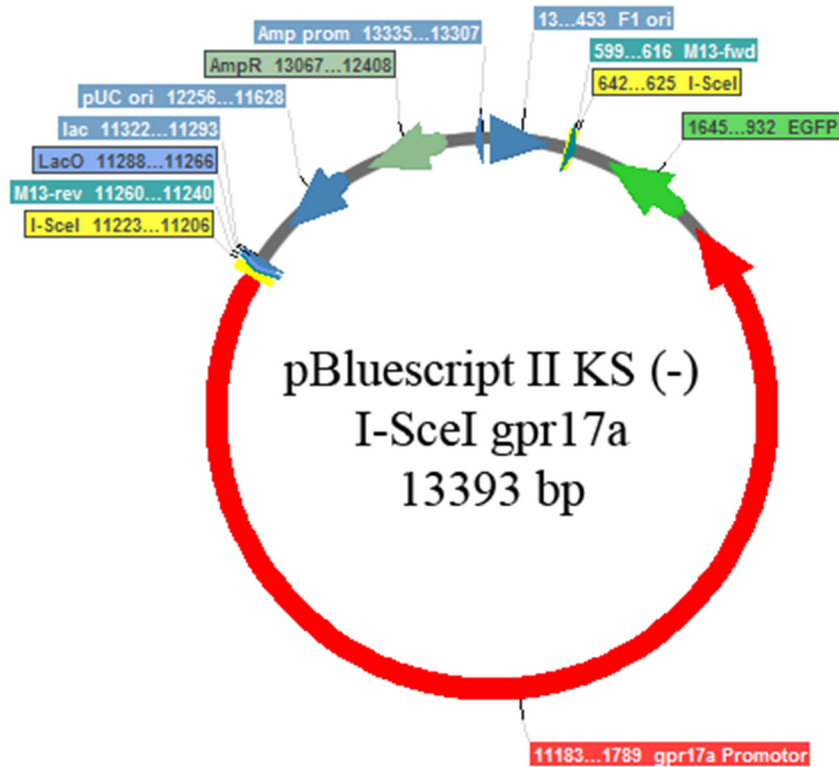


Abbildung 4.33: Plasmidkarte von pBluescript II KS I-SceI gpr17a EGFP. Das Plasmid enthält die Promotorregion von *gpr17a* (rot) sowie das Gen EGFP N1 (grün) flankiert durch die Schnittstellen des Meganuklease-Enzyms I-SceI (gelb).

Nach der Transformation des Plasmids in *E. coli* NEB 5-alpha F'I^q, einer Plasmidkultur, einem Testverdau sowie einer Sequenzierung wurde der Mastermix, welcher unter anderem das Plasmid pBluescript II KS I-SceI *gpr17a* EGFP sowie das Meganuklease-Enzyms I-SceI enthielt, in Fischeier des Wildtyps injiziert (siehe Kapitel 3.1.3). Diese injizierten Zebrafisch-Embryonen wurden in den nachfolgenden Tagen hinsichtlich einer transienten Expression von EGFP unter der Kontrolle des potentiellen *gpr17a*-Promotors mit dem Fluoreszenzmikroskop und dem 2-Photonenmikroskop analysiert. Abbildung 4.34 zeigt, dass EGFP in 4 Tage alten Zebrafisch-Embryonen unter der Kontrolle des *gpr17a*-Promotorfragments in vier verschiedenen Zelltypen mit verschiedenen Morphologien und Lokalisierungen exprimiert wird.

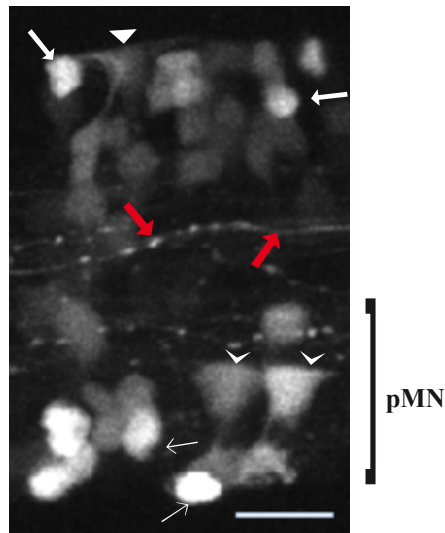


Abbildung 4.34: Lokalisation der Expression von *gpr17a:EGFP* in 4 Tage alten Zebrafisch-Embryonen. Mikroskopische Aufnahmen mit dem 2-Photonenmikroskop (Max Intensity Z-Projection). Die dünnen Pfeile im Bereich des pMNs deuten auf den Zelltyp 1 hin (runde bis multipolare Zellen). Die dicken weißen Pfeile deuten auf den Zelltyp 2 im dorsalen Bereich oberhalb des pMNs hin (runde bis multipolare Zellen). Die dünnen Pfeilspitzen zeigen die Sanduhr-ähnlichen bzw. palisadenartigen Zellen im Bereich der Bodenplatte (Zelltyp 3). Die dicke Pfeilspitze markiert die Sanduhr-ähnlichen bzw. palisadenartigen Zellen im dorsalen Bereich oberhalb pMNs (Zelltyp 4). Die roten Pfeile kennzeichnen Axone und Dendriten. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen seitlichen Ausschnitt aus dem Bereich des Rückenmarks. Der Kopf des Fisches zeigt nach links und der Rücken zeigt nach oben. pMN: primäre neurale Progenitorzellen (primary motoneuron domain), Maßstab: 12 μm.

Runde bis multipolare Zellen konnten im Bereich der Bodenplatte (Zelltyp 1) und dorsal des pMNs (Zelltyp 2) detektiert werden. Interessanterweise exprimierten jedoch gleichzeitig Sanduhr-ähnliche bzw. palisadenartige Zellen im Bereich der Bodenplatte (Zelltyp 3) und dorsal des pMNs (Zelltyp 4) EGFP unter Kontrolle des potentiellen *gpr17a*-Promotors. Um die genaue Position der detektierten Zelltypen zu untersuchen, wurden weitere Aufnahmen mithilfe des Fluoreszenzmikroskops erstellt. Abbildung 4.35 sowie Abbildung 4.36 zeigen jeweils in B und C Übersichtsbilder zur Lokalisierung der detektierten Zelltypen. In dem Bilderpaar B/C der Abbildung 4.35 ist zu erkennen, dass EGFP unter der Kontrolle des potentiellen *gpr17a*-Promotors im Bereich der Bodenplatte des Neuralrohrs direkt oberhalb des Notochords exprimiert wird. In Abbildung 4.35B ist der Sanduhr-ähnliche Zelltyp 3 deutlich zu erkennen, während der multipolare Zelltyp 1 nur in den höher aufgelösten 2-Photonen-Aufnahme in Abbildung 4.34 gut zu erkennen ist. Die Zellen des Zelltyps 3

ähneln der Form einer Sanduhr und werden am oberen und unteren Ende durch andere nicht genau definierte Zellkompartimente begrenzt (Abbildung 4.35D).

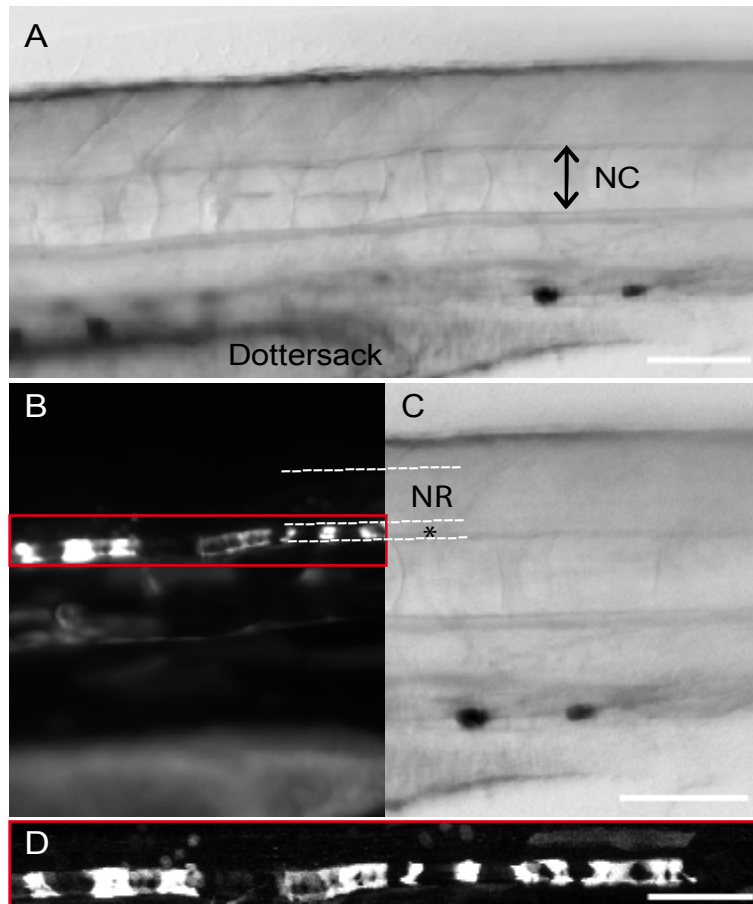


Abbildung 4.35: Lokalisation von *gpr17a*:EGFP in einem 4 Tage alten Zebrafisch-Embryo (palisadenartiger Zelltyp 3). A; Mikroskopische Hellfeldaufnahme des Zebrafischembryos als Übersichtsbild mit dem Notochord und dem darüber liegenden ZNS. B/C; Gemeinsamer zusammenhängender Ausschnitt aus A, wobei B ein Fluoreszenzbild und C ein Hellfeldbild ist. D; Vergrößerter Ausschnitt des roten Rechtecks aus B mit dem 2-Photonenmikroskop aufgenommen. Alle Bilder zeigen eine seitliche Ansicht mit dem Kopf nach links und dem Rücken nach oben. Maßstab: in A-C 100 μ m, in D 50 μ m. NR= Neuralrohr. * = markiert den Bereich der Bodenplatte (Floorplate). NC=Notochord

In dem Bilderpaar B/C der Abbildung 4.36 ist zu erkennen, dass EGFP unter der Kontrolle des *gpr17a*-Promotors im Bereich des Neuralrohrs detektiert werden konnte. Abbildung 4.36B zeigt, dass sich die länglichen Zellkörper des Zelltyps 4 annähernd von den Zellen der Deckenplatte (roof plate) des Rückenmarks bis hin zu den Zellen der Bodenplatte (floor plate) erstrecken. Abbildung 4.36D lässt vermuten, dass die Zellen am oberen und unteren Ende durch andere hier nicht genau definierte Zellkompartimente begrenzt werden. Der multipolare

Zelltyp 2 ist hier nur in den höher aufgelösten 2-Photonenmikroskop-Aufnahme in Abbildung 4.36D neben den Zellen des Zelltyps 4 zu erkennen.

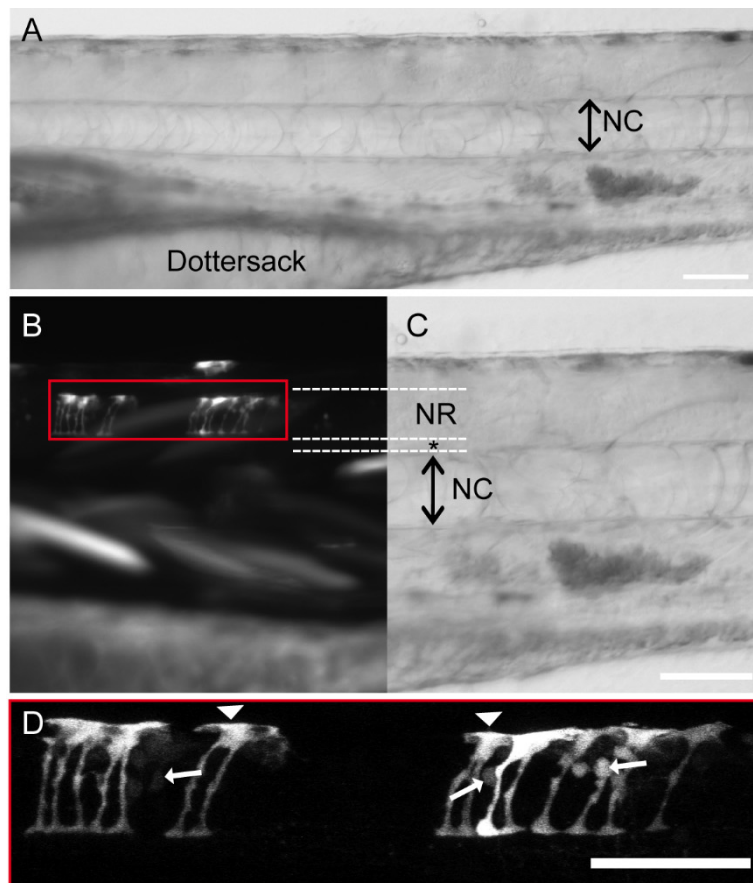


Abbildung 4.36: Lokalisation von *gpr17a:EGFP* in einem 4 Tage alten Zebrafisch-Embryo (multipolarer Zelltyp 2 und palisadenartiger Zelltyp 4). **A;** Mikroskopische Hellfeldaufnahme des Zebrafischembryos als Übersichtsbild mit dem Notochord und dem darüber liegenden Neuralrohr. **B/C;** Gemeinsamer zusammenhängender Ausschnitt aus A, wobei B ein Fluoreszenzbild und C ein Hellfeldbild ist. **D;** Vergrößerter Ausschnitt des roten Rechtecks aus B mit dem 2-Photonenmikroskop aufgenommen. Die Pfeilspitzen kennzeichnen den palisadenartigen Zelltyp 4, die Pfeile den multipolaren Zelltyp 2. Alle Bilder zeigen eine seitliche Ansicht mit dem Kopf nach links und dem Rücken nach oben. Maßstab: in A-C 100 μ m, in D 50 μ m. NR= Neuralrohr, * = markiert den Bereich der Bodenplatte (Floorplate). NC=Notochord.

Aufgrund der transienten Expression waren die detektierten Zelltypen unterschiedlich stark vertreten. Während in einigen untersuchten Fischen alle Zelltypen gleichzeitig detektiert werden konnten, wiesen andere Fische nur jeweils einige der Zelltypen auf. Auch die Verteilung der Zelltypen in dem jeweiligen Kompartiment war in den verschiedenen untersuchten Fischen der transienten Fischlinie unterschiedlich.

4.3.4 Co-Lokalisationsstudien zur Expression von *gpr17a*

Mosaikexpression von *gpr17a:EGFP* in *Tg(olig2:DsRed2)*

Um zu untersuchen, ob die Expression von *gpr17a* und *olig2* im Zebrafisch in demselben Zelltyp lokalisiert ist, wurde das Plasmid pBluescript II KS I-SceI *gpr17a* EGFP (siehe Abbildung 4.33), welches EGFP unter der Kontrolle des potentiellen *gpr17a*-Promotors exprimiert, in die transgene Zebrafischlinie *Tg(olig2:DsRed2)* (Kucenas et al., 2008a) injiziert (siehe Kapitel 3.1.3), um eine Mosaikexpression von *gpr17a:EGFP* in *Tg(olig2:DsRed2)* zu erzielen. Anschließend wurden diese Zebrafisch-Embryonen an Tag 4 nach der Befruchtung der Eizelle hinsichtlich einer Co-Lokalisation mittels 2-Photonenmikroskop analysiert. Abbildung 4.37 zeigt die transiente Expression von EGFP unter der Kontrolle des *gpr17a*-Promotors in der *olig2:DsRed2* stabil exprimierenden transgenen Zebrafischlinie *Tg(olig2:DsRed2)*.

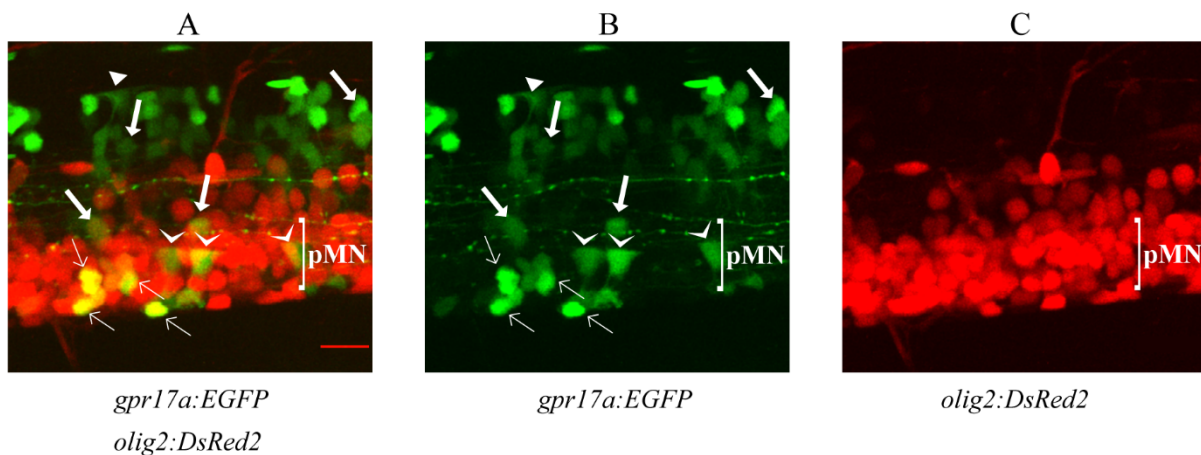
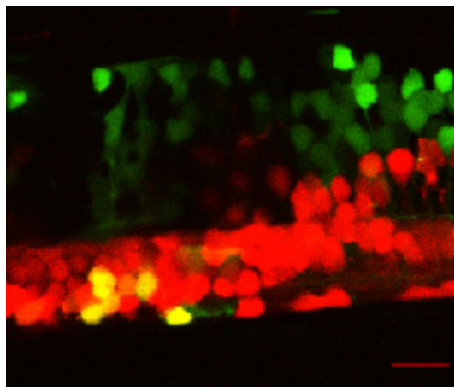


Abbildung 4.37: Co-Lokalisation der Expression von *gpr17a:EGFP* (grün) und *olig2:DsRed2* (rot) in 4 Tage alten Zebrafisch-Embryonen. Mikroskopische Aufnahmen mit dem 2-Photonenmikroskop (Max Intensity Z-Projection). A; Überlagerung der Fluoreszenzbilder aus B und C. Die gelben Zellkompartimente zeigen Zellen, in denen *gpr17a:EGFP* (B, grün) und *olig2:DsRed2* (C, rot) gleichzeitig exprimiert werden (Zelltyp 1=dünne Pfeile, Zelltyp 3=dünne Pfeilspitzen, Zelltyp 2= dicke Pfeile). Die dicke Pfeilspitze markiert die Sanduhr-ähnlichen bzw. palisadenartigen Zellen im Bereich der Deckenplatte (Zelltyp 4). Die Abbildung zeigt einen repräsentativen seitlichen Ausschnitt aus dem Bereich des Rückenmarks. Der Kopf des Fisches zeigt nach links und der Rücken zeigt nach oben. pMN: primäre neurale Progenitorzellen (primary motor neuron), Maßstab: 12 μm .

Abbildung 4.37B zeigt die Expression von EGFP unter der Kontrolle des *gpr17a*-Promotors sowohl in den Zellen im Bereich dorsal des pMNs (Zelltyp 2 und 4), als auch in den Zellen im Bereich der Bodenplatte (Zelltyp 1 und 3), wie es bereits in Kapitel 4.3.3 beschrieben wurde. In Abbildung 4.37C ist die Expression von DsRed2 (rotes Fluoreszenzprotein) unter der Kontrolle des *olig2*-Promotors zu sehen, die Oligodendrozyten-Vorläuferzellen und Oligodendrozyten im Bereich des pMNs und im Bereich dorsal des pMNs markiert. Die Überlagerung der beiden beschriebenen Fluoreszenzbilder in Abbildung 4.37A zeigt exemplarisch, dass im multipolaren Zelltyp 1 sowie im Sanduhr-ähnlichen Zelltyp 3 im Bereich der Bodenplatte eine Co-Expression von *gpr17a:EGFP* und *olig2:DsRed2* vorliegt (gelbe Färbung). Auch die Überlagerung von nur 4 optischen Schnittebenen (1 µm pro Schnittebene, Max Intensity Z-Projection) mittels 2-Photonenmikroskop bestätigt die Co-Lokalisation.



gpr17a:EGFP
olig2:DsRed2

Abbildung 4.38: Co-Lokalisation (gelb) der Expression von *gpr17a:EGFP* (grün) und *olig2:DsRed2* (rot) in 4 Tage alten Zebrafisch-Embryonen (4 optische Ebenen, Max Intensity Z-Projection).

In den dorsal migrierenden Oligodendrozyten-Vorläuferzellen konnte mithilfe dieses Experiments leider keine eindeutige Co-Expression von *gpr17a:EGFP* und *olig2:DsRed2* detektiert werden. Es konnten lediglich zwei leicht gelb fluoreszierende Zellen dorsal des pMNs auf eine Co-Expression der beiden Gene hinweisen (Zelltyp 2). In den Sanduhr-ähnlichen Zellen des Zelltyps 4 dorsal des pMNs konnte keine Co-Expression von *gpr17a:EGFP* und *olig2:DsRed2* detektiert werden. Zu beachten ist hierbei, dass es sich lediglich um eine Mosaikexpression von *gpr17a:EGFP* handelt, sodass möglicherweise auch

unspezifische Zellen grün fluoreszieren und bei spezifischen *gpr17a*-exprimierenden Zellen die Fluoreszenz ausbleibt.

Mosaikexpression von *gpr17a:tdTomato* in *Tg(cldnk:GAL4,UAS:EGFP)*

Im folgenden Experiment sollte untersucht werden, ob die Expression von *gpr17a* und *cldnk* im Zebrafisch in demselben Zelltyp lokalisiert ist. Um eine Co-Lokalisation detektieren zu können, musste zunächst das grüne Fluoreszenzprotein EGFP, das unter der Kontrolle des *gpr17a*-Promotors exprimiert wird, auf dem Plasmid pBluescript II KS I-SceI *gpr17a* EGFP (siehe Abbildung 4.33) durch das rote Fluoreszenzprotein tdTomato ersetzt werden. Dazu wurde mit dem Primerpaar for_XmaI_tdTomato und rev_NotI_tdTomato eine Standard-PCR mit dem Plasmid ptdTomato-C1 (siehe Anhang: Abbildung A7) als Template durchgeführt. Danach wurde über die Schnittstellen *XmaI* und *NotI* das grün fluoreszierende EGFP entfernt und über dieselben Schnittstellen das entstandene aufgereinigte PCR-Produkt von tdTomato in das Plasmid kloniert. Abbildung 4.39 zeigt das entstandene Plasmid pBluescript II KS I-SceI *gpr17a* tdTomato.

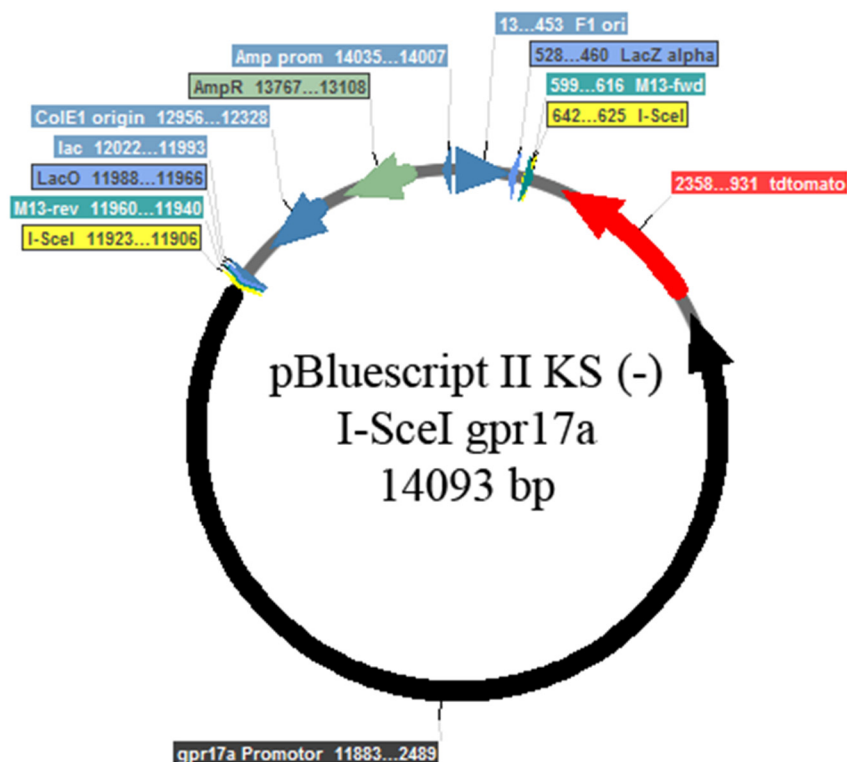


Abbildung 4.39: Plasmidkarte von pBluescript II KS I-SceI *gpr17a* tdTomato. Das Plasmid enthält die Promotorregion von *gpr17a* (schwarz) sowie das Gen *tdTomato* (rot) flankiert durch die Schnittstellen des Meganuklease-Enzyms *I-SceI* (gelb).

Das Plasmid pBluescript II KS I-SceI *gpr17a* tdTomato wurde in die stabile transgene Zebrafischlinie *Tg(cldnk:GAL4,UAS:EGFP)* injiziert (siehe Kapitel 4.2.7). Anschließend wurden die Zebrafisch-Embryonen an Tag 4 nach der Befruchtung der Eizelle hinsichtlich einer Co-Lokalisation mittels 2-Photonenmikroskop analysiert. Abbildung 4.40 zeigt die transiente Expression von tdTomato unter der Kontrolle des potentiellen *gpr17a*-Promotors in der *cldnk:EGFP* stabil exprimierenden transgenen Zebrafischlinie *Tg(cldnk:GAL4,UAS:EGFP)*.

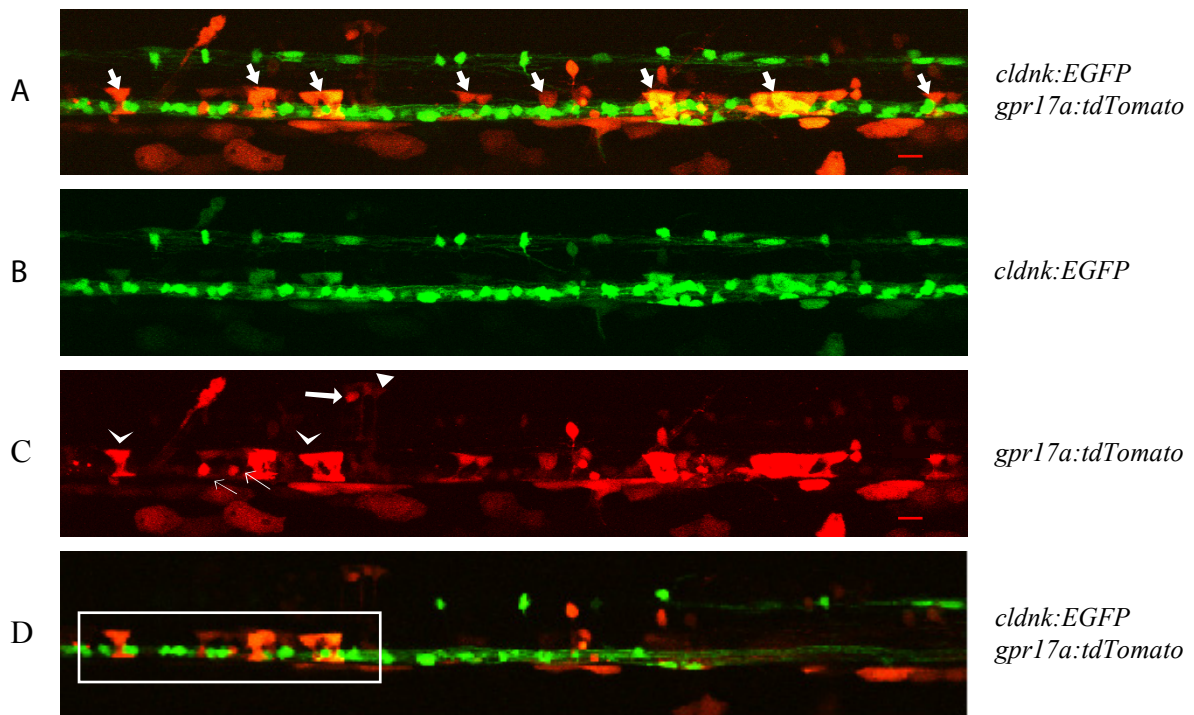


Abbildung 4.40: Expression von *gpr17a:tdTomato* (rot) und *Tg(cldnk:Gal4/UAS:GFP)* (grün) in 4 Tage alten Zebrafisch-Embryonen. Mikroskopische Aufnahmen mit dem 2-Photonenmikroskop (Max Intensity Z-Projection). **A**; Überlagerung der Fluoreszenzbilder aus B und C. Die weißen Pfeile zeigen falsch-positive gelbe/rote Zellkompartimente, da tdTomato auch bei der Wellenlänge, mit der EGFP angeregt wird, fluoresziert und den EGFP-Emissionsfilter passieren kann. **B**; Expression von grün fluoreszierenden *EGFP⁺-cldnk*-Zellen. **C**; Expression von rot fluoreszierenden *tdTomato⁺-gpr17a*-Zellen. Zelltyp 1=dünne Pfeile, Zelltyp 2= dicke Pfeile, Zelltyp 3=dünne Pfeilspitzen). Die dicke Pfeilspitze markiert die Sanduhr-ähnlichen bzw. palisadenartigen Zellen im Bereich der Deckenplatte (Zelltyp 4). **D**; Max Intensity Z-Projektion von nur vier optischen Schnittebenen (1 μ m pro Schnittebene). Die rot/gelb gefärbten Zellkompartimente innerhalb des weißen Rechtecks zeigen falsch-positive Co-Lokalisationen. Seitlicher Ausschnitt aus dem Bereich des Rückenmarks. Der Kopf des Fisches zeigt nach links und der Rücken zeigt nach oben. Maßstab: 12 μ m.

Abbildung 4.40C zeigt die Expression von tdTomato unter der Kontrolle des *gpr17a*-Promotors. Wie bereits in Kapitel 4.3.3 beschrieben, konnte auch hier eine Expression des roten Fluoreszenzproteins tdTomato in den Zelltypen 1 und 3 im Bereich der Bodenplatte sowie in den Zelltyp 2 und 4 im Bereich des Neuralrohrs detektiert werden. In Abbildung 4.40B fluoreszieren neben den *EGFP⁺-cldnk*-Zellen auch einige Zellen des Zelltyps 3 (Sanduhr-ähnlich), die in den bisherigen Untersuchungen (Kapitel 4.2.7) nie als Claudin k exprimierende Zellen identifiziert wurden. Daher zeigt Abbildung 4.40A eine falsch-positive Gelbfärbung des Zelltyps 3 (weiße Pfeile), bei der die Rotfärbung von *gpr17a:tdTomato* durchscheint. Beides sind Hinweise darauf, dass es sich hierbei nicht um eine Co-Lokalisation der Expression von *gpr17a:tdTomato* und *cldnk:EGFP* im Zelltyp 3 handelt. Auch die Ansicht von nur 4 optischen Ebenen (Max Intensity Z-Projection, 1 μm pro Ebene) mittels 2-Photonenmikroskop bestätigt, dass es sich um keine echte Co-Lokalisation handelt (Abbildung 4.40D). Die Co-Lokalisationen innerhalb des weißen Rechtecks zeigen orangene Zellen, die bei einer eindeutigen Co-Lokalisation gelb erscheinen müssten. Die Ursache für dieses falsch-positive Ergebnis ist höchstwahrscheinlich die Tatsache, dass die Absorptionsspektren beider Fluoreszenzproteine zu nah beieinander liegen und sich die Emissionsspektren überlagern, sodass tdTomato bei der Wellenlänge, bei der EGFP angeregt wird, eine leichte grüne Fluoreszenz emittiert.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass in den in Zelltypen 1 und 3 im Bereich der Bodenplatte (siehe Kapitel 4.3.3) eine gleichzeitige Expression von Genen, die unter der Kontrolle des *gpr17a*- sowie des *olig2*-Promotors exprimiert werden, stattfindet. Eine Co-Lokalisation der Expression von *gpr17a:tdTomato* und *cldnk:EGFP* konnte mithilfe der Mosaikexpression nicht festgestellt werden.

Co-Lokalisation der Expression von *Tg(olig2:dsRed2)* und *Tg(cldnk:GAL4,UAS:EGFP)*

Für einen direkten Vergleich der Expressionen von *cldnk:EGFP* und *olig2:dsRed2* hinsichtlich der Lokalisation wurden Zebrafische beider stabiler Zebrafischlinien miteinander verpaart und die Zebrafisch-Embryonen mittels 2-Photonenmikroskop analysiert (Abbildung 4.41).

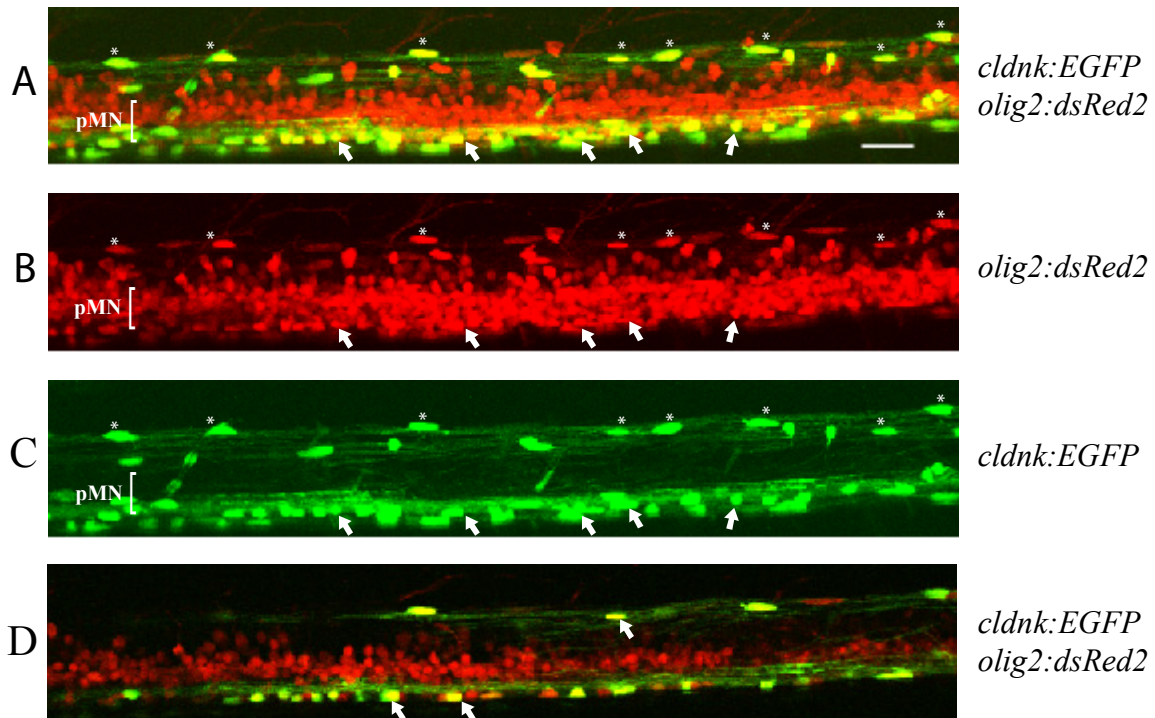


Abbildung 4.41: Co-Lokalisation der Expression von *olig2:dsRed2* (rot) und *cldnk:EGFP* (grün) in einem 4 Tage alten Zebrafisch-Embryo in einer lateralen Ansicht. Mikroskopische Aufnahmen mit dem 2-Photonenmikroskop (Max Intensity Z-Projektion). **A**; Überlagerung der Fluoreszenzbilder aus B und C. Die weißen Pfeile sowie die Sternchen kennzeichnen beispielhaft die gelben Zellkompartimente, in denen *olig2:dsRed2* (B, rot) und *cldnk:EGFP* (C, grün) gleichzeitig exprimiert werden (Sternchen=ovale Zellen dorsal des pMNs, Pfeile=ovale bis multipolare Zellen im Bereich des pMNs) **B**; Expression von rot fluoreszierenden *dsRed2*⁺-*olig2*-Zellen. **C**; Expression von grün fluoreszierenden *EGFP*⁺-*cldnk*-Zellen. **D**; Überlagerung (Max Intensity Z-Projektion) von nur 4 optischen Ebenen mittels 2-Photonenmikroskop (1 μm pro Ebene). Seitlicher Ausschnitt aus dem Bereich des Rückenmarks. Der Kopf des Fisches zeigt nach links und der Rücken zeigt nach oben. Maßstab: 25 μm .

Wie Abbildung 4.41A zeigt, konnte sowohl im Bereich des pMNs, als auch dorsal des Bereiches des pMNs eine Co-Lokalisationen der Expression von *olig2:dsRed2* (rot) und *cldnk:EGFP* (grün) detektiert werden. Die Morphologie der gelben Zellen innerhalb des pMNs weist einen multipolaren Charakter auf, dessen Zellen eher rund erscheinen und mit zahlreichen Fortsätzen versehen sind. Die gelben Zellen, die dorsal des pMNs *olig2:dsRed2* und *cldnk:EGFP* gleichzeitig exprimieren, weisen hingegen eine ovale Form auf. Einige wenige Zellen in diesem Bereich sind ebenfalls multipolar. Auffällig war, dass in nahezu allen grün fluoreszierenden *EGFP*⁺-*cldnk*-Zellen (Abbildung 4.41C, Abbildung 4.42C) auch *olig2:dsRed2* exprimiert wurde, während besonders im Bereich des pMNs Zellen auftraten,

die ausschließlich *olig2:dsRed2* exprimierten (Abbildung 4.41B, Abbildung 4.42B). Die Echtheit der Co-Lokalisation zeigt Abbildung 4.41D, da die Analyse von nur 4 optischen Ebenen eine deutliche Gelbfärbung aufweist.

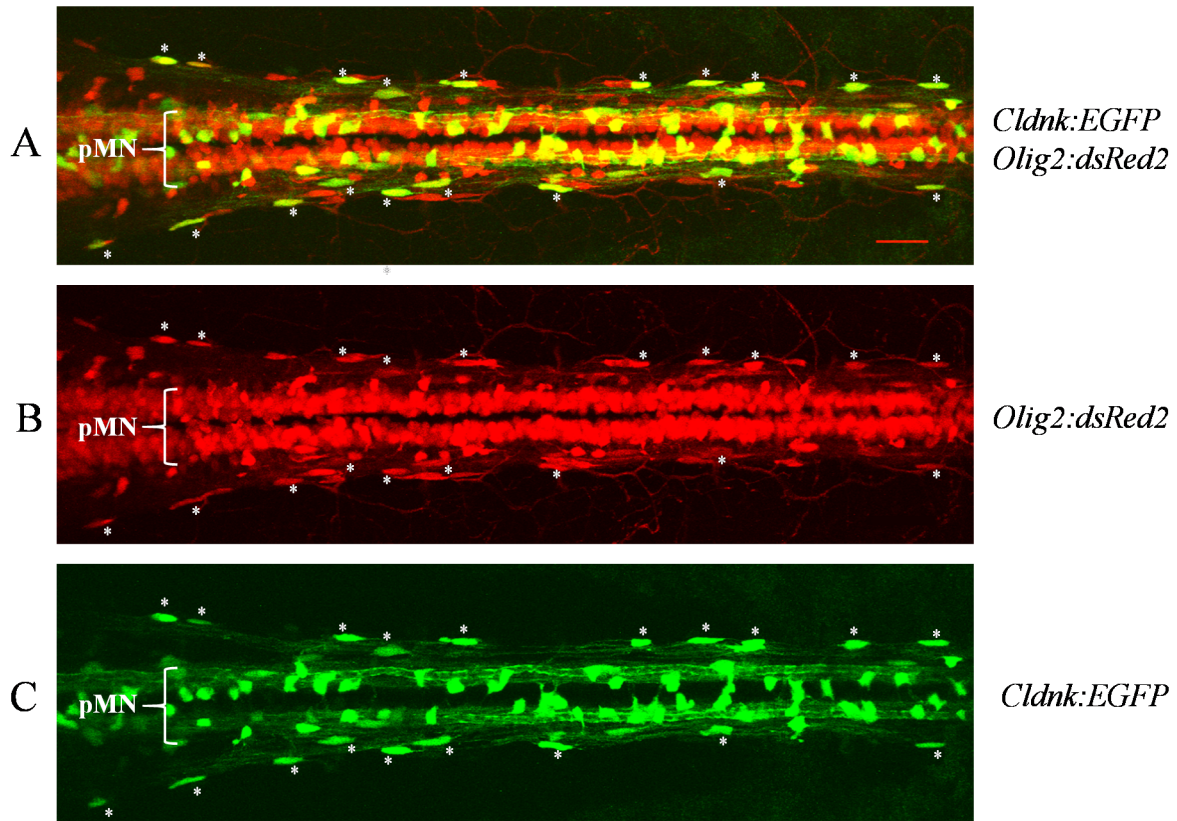


Abbildung 4.42: Co-Lokalisation der Expression von *olig2:dsRed2* (rot) und *cldnk:EGFP* (grün) in einem 4 Tage alten Zebrafisch-Embryo in einer dorsalen Ansicht. Mikroskopische Aufnahmen mit dem 2-Photonenmikroskop (Max Intensity Z-Projection). A; Überlagerung der Fluoreszenzbilder aus B und C. Zellkompartimente, in denen *olig2:dsRed2* (B, rot) und *cldnk:EGFP* (C, grün) gleichzeitig exprimiert werden, erscheinen gelb. Co-Lokalisationen, die in ovalen Zellen dorsal und seitlich des pMNs detektiert wurden, sind durch weiße Sternchen gekennzeichnet. Die Bilder zeigen den Zebrafisch von oben mit dem Bauch nach unten und mit dem Kopf nach links gerichtet. Maßstab 25 μm .

Um weitere Aussagen über die Lage der detektierten Zelltypen, in denen *olig2:dsRed2* und *cldnk:EGFP* co-exprimiert werden, treffen zu können, wurden die Zebrafisch-Embryonen dieser transgenen Fischlinien ebenfalls in der dorsalen Ansicht untersucht (Abbildung 4.42). Grundsätzlich zeigt Abbildung 4.42 die gleichen Ergebnisse wie Abbildung 4.41. Interessanterweise konnte hier jedoch bildlich gezeigt werden, dass die ovalen Zellen dorsal des pMNs, in denen sowohl *olig2:dsRed2* als auch *cldnk:EGFP* exprimiert wird, oberhalb und seitlich auf beiden Seiten des pMNs lokalisiert sind (Abbildung 4.42, Sternchen), was in den

seitlichen mikroskopischen Aufnahmen der Max Intensity Z-Projektionen bisher nicht zu erkennen war.

4.3.5 Expression von *gpr17a* in Olig2-exprimierenden Zellen (FACS-Analyse)

Die bisherigen Untersuchungen zeigten, dass *gpr17a* die Oligodendrogenese positiv beeinflusst. Zum einen wurde festgestellt, dass durch die Einwirkung des *gpr17a*-Morpholinos die Expression der Oligodendrozyten-assoziierten Genen *plp1b* und *mbpa* reduziert war und die Anzahl dorsal migrierender *EGFP⁺-olig2-* und *EGFP⁺-cldnk*-Zellen vermindert war. Außerdem wurden die mittels *in situ* Hybridisierung detektierten *gpr17a*-Signale dorsal des pMN nach der Behandlung mit TSA nicht mehr detektiert, was ebenfalls auf eine Expression von *gpr17a* in OPCs oder Oligodendrozyten hinweist.

Um schlussendlich zu beweisen, dass *gpr17a* im Zebrafisch in dorsal migrierenden Olig2-positiven OPCs bzw. in Olig2-positiven reifen Oligodendrozyten exprimiert wird, wurden 400 Zebrafisch-Embryonen der transgenen Zebrafischlinie *Tg(olig2:EGFP)* ab dem Zeitpunkt 30 hpf bis zum Tag 3 in Fischwasser mit 100 ng/ml TSA in Methanol bzw. nur in Methanol (Kontrolle) inkubiert und anschließend für die Trennung mittels FACS (fluorescence-activated cell sorting) vorbereitet wie in Kapitel 3.2.21 beschrieben. Mithilfe der FACS-Analyse wurden die *olig2:EGFP*-Zellen der Zebrafische von den EGFP-negativen Zellen getrennt. Bei der Auftrennung der dissoziierten Zellen der mit Methanol behandelten 400 Fische konnten im Durchschnitt 3,85 Millionen *olig2:EGFP*-Zellen (MeOH GFP+) und 5,3 Millionen EGFP negative Zellen (MeOH GFP-) voneinander getrennt werden. In den mit Proben der mit TSA behandelten 400 Fischen konnten im Durchschnitt 4,05 Millionen *olig2:EGFP*-Zellen (TSA GFP+) und 7 Millionen EGFP negative Zellen (TSA GFP-) voneinander getrennt werden. Im Anschluss daran wurde die Gesamt-RNA der vier Proben präpariert, in cDNA umgeschrieben und mittels RT-qPCR hinsichtlich der Expression von *gpr17a* (2 Replikate) bzw. *mbpa* (1 Replikat) untersucht (Abbildung 4.43).

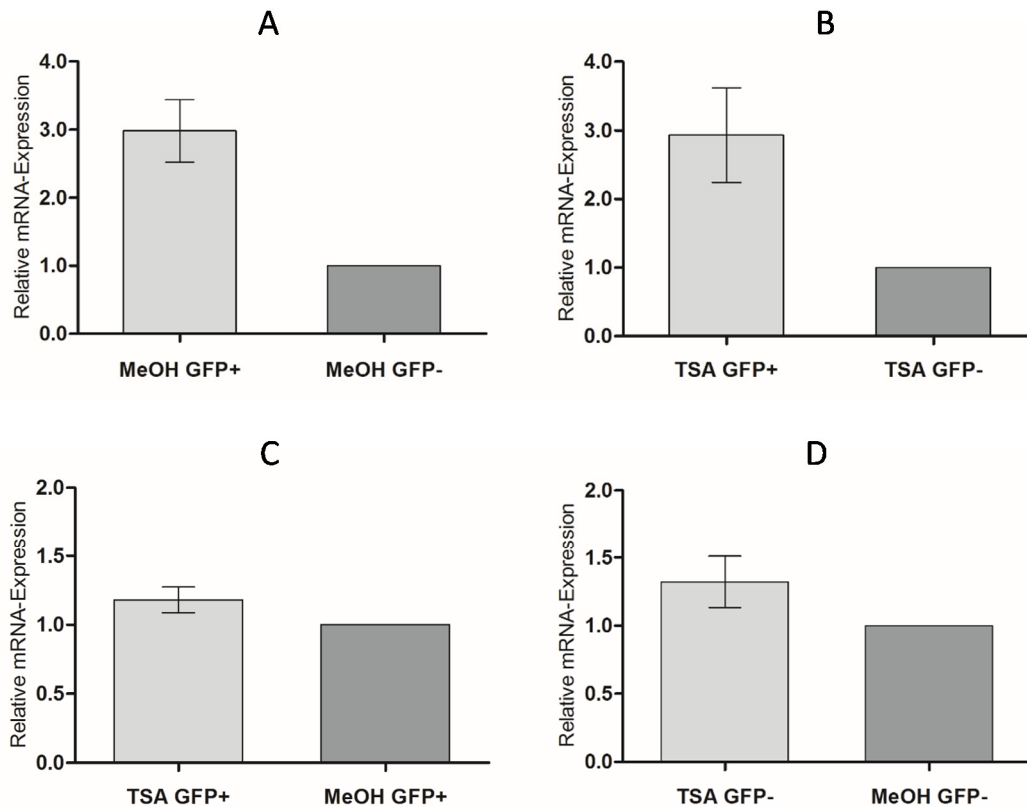


Abbildung 4.43: Relative mRNA-Expressionslevel von *gpr17a* in *EGFP*⁺-*olig2*-Zellen (GFP+) und *EGFP*⁻-Zellen (GFP-) nach der Behandlung mit TSA (TSA) und ohne TSA (MeOH). Die hellgrauen Säulen kennzeichnen die relativen Expressionslevel im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe (dunkelgraue Säule; Expression = 1.0 (100%)). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an.

Grundsätzlich konnte *gpr17a* in jeder Probe detektiert werden. Abbildung 4.43A zeigt, dass die relative Expression von *gpr17a* in den *EGFP*⁺-*olig2*-Zellen der unbehandelten Probe (MeOH GFP+) im Vergleich zu den *EGFP*⁻-Zellen der gleichen Probe dreifach erhöht war. Das beweist eindeutig, dass *gpr17a* in Olig2-positiven Zellen, jedoch auch in Olig2-negativen Zellen des Zebrafisches exprimiert wird. Die Behandlung der Fische mit TSA sorgte dafür, dass die Differenzierung der Olig2-positiven OPCs zu dorsal migrierenden OPC und reifen Oligodendrozyten nicht stattfinden konnten. Dies konnte mithilfe der RT-qPCR in einem ersten Replikate bestätigt werden, da das ausschließlich von reifen Oligodendrozyten exprimierte Gen *mbpa* in beiden mit TSA behandelten Proben *EGFP*⁺-*olig2*-Zellen und *EGFP*⁻-Zellen nicht detektierbar war. Abbildung 4.43B zeigt jedoch eindeutig, dass *gpr17a* in den mit TSA behandelten Proben im nahezu gleichen Verhältnis wie in den unbehandelten Proben (Abbildung 4.43A) noch exprimiert wird. Vergleicht man nun die Expression von *gpr17a* in den *EGFP*⁺-*olig2*-Zellen der behandelten und unbehandelten Fische, so konnte eine

leichte Erhöhung der relativen Expression von *gpr17a* bei den mit TSA behandelten Fischen detektiert werden (Abbildung 4.43C). Interessanterweise war das Verhältnis der relativen *gpr17a*-Expressionslevel in den *EGFP*-Zellen der behandelten und unbehandelten Fische vergleichbar, was darauf hinweisen könnte, dass *gpr17a* im Zebrafisch sowohl in frühen Olig2-positiven OPCs als auch in Olig2-negativen OPCs exprimiert wird. Das erhöhte Expressionslevel von *gpr17a* in den mit TSA behandelten Fischen im Vergleich zu den unbehandelten Fischen weist darauf hin, dass *gpr17a* eher nicht in reifen Oligodendrozyten exprimiert wird.

4.4 Untersuchungen des Gpr17a-Rezeptors in HEK 293-Zellen

4.4.1 Dynamische Massenumverteilung nach Applikation von MDL29,951

Die Substanz MDL29,951 (2-carboxy-4,6-dichloro-1H-indole-3-propionic acid) wird mit der spezifischen Aktivierung von GPR17 in Verbindung gebracht (Hennen et al., 2013; Simon et al., 2016). Hennen et al. (2013) konnten unter Verwendung der Corning® Epic® Technologie zeigen, dass in transfizierten HEK 293-Zellen, die den humanen GPR17-Rezeptor exprimierten, nach der Behandlung mit MDL29,951 eine Änderung der Massenumverteilung in der Zelle stattfand, was auf die Aktivierung des humanen GPR17-Rezeptors durch MDL29,951 hinwies. Um nun zu testen, ob der Gpr17a-Rezeptor des Zebrafisches auf eine ähnliche Art und Weise wie der humane GPR17-Rezeptor auf MDL29,951 reagiert, wurde dieser von Hennen et al. (2013) beschriebene Funktionalitätstest hier mit dem Gpr17a-Rezeptor aus dem Zebrafisch adäquat und in Zusammenarbeit mit der AG Kostenis durchgeführt (siehe Kapitel 3.3.5).

Um eine transiente Expression von Gpr17a in HEK 293-Zellen zu erzielen, wurde das Plasmid pcDNA3.1 (+) *gpr17a* (Abbildung 4.19) mittels Calciumphosphat-Transfektion (Calcium Phosphate Transfection Kit, Fisher Scientific Germany GmbH) in HEK 293-Zellen transfiziert, wie es in Kapitel 4.2.4 beschrieben wurde. Als Negativkontrolle wurde der Leervektor pcDNA3.1 (+) in HEK 293-Zellen transfiziert. Als Positivkontrolle wurden HEK 293-Zellen verwendet, die den humanen GPR17-Rezeptor transient exprimierten. Diese Positivkontrolle wurde freundlicherweise von der AG Kostenis (Universität Bonn) zur Verfügung gestellt. Die Probenvorbereitung sowie die anschließende Messung erfolgte wie in Kapitel 3.3.5 beschrieben. Abbildung 4.44A zeigt die Funktionalität des humanen GPR17-Rezeptors und bestätigt die Ergebnisse von Hennen et al. (2013). Die mit dem humanen

GPR17-Rezeptor transfizierten HEK 293-Zellen weisen eine konzentrationsabhängige Massenumverteilung (DMR-Antwort) nach Applikation der Substanz MDL29,951 auf (Abbildung 4.44A).

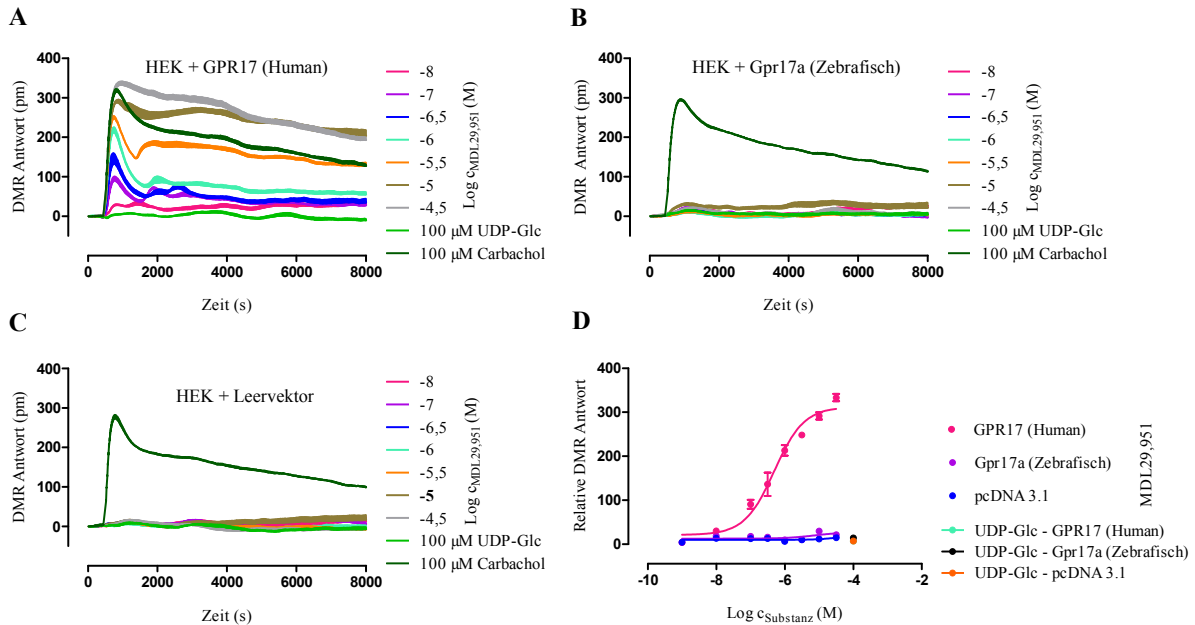


Abbildung 4.44: Dynamische Massenumverteilung in verschiedenen HEK 293-Zellen nach der Applikation verschiedener Konzentrationen von MDL29,951. **A;** DMR-Antwort in HEK 293-Zellen, die transient den humanen GPR17-Rezeptor exprimieren (Positivkontrolle). **B;** DMR-Antwort in HEK 293-Zellen, die transient den Gpr17a-Rezeptor aus dem Zebrafisch exprimieren. **C;** DMR-Antwort in HEK 293-Zellen, die mit dem Leervektor transfiziert wurden (Negativkontrolle). **D;** Dosis-Wirkungs-Kurve von A-C. Die angegebenen Daten zeigen die Mittelwerte \pm Standardfehler von drei biologischen Replikaten. Die transfizierten HEK 293-Zellen wurden in den angegebenen Konzentrationen behandelt und mittels der Corning Epic Technologie ausgewertet. Die Änderungen der Wellenlängen [pm] über die Zeit [s] wurden gemessen als funktionelle Aktivität. Die angegebenen Werte sind Baseline-korrigiert durch Subtraktion der funktionellen Aktivität des verwendeten Puffers. Carbachol wurde als Positivkontrolle für die Zellviabilität verwendet und UDP-Glucose war eine weitere Testsubstanz.

Als Positivkontrolle für die Zellviabilität der HEK 293-Zellen wurde die Substanz Carbachol verwendet, da Carbachol einen endogen exprimierten muskarinergen Rezeptor der HEK 293-Zellen aktiviert und somit eine zelluläre Antwort in Form einer Massenumverteilung zeigt. Die Substanz UDP-Glucose verursachte in den HEK 293-Zellen keine Massenumverteilung, was Hennen et al. (2013) bereits zeigten. Abbildung 4.44B zeigt die dynamische Massenumverteilung in HEK 293-Zellen, die transient den Gpr17a-Rezeptor aus dem

Zebrafisch exprimierten. Der direkte Vergleich zum humanen GPR17-Rezeptor zeigt deutlich, dass MDL29,951 über den gesamten Konzentrationsbereich keine zelluläre Massenumverteilung als Folge einer Aktivierung des Gpr17a-Rezeptors aus dem Zebrafisch verursacht. Eine mangelhafte Zellviabilität der HEK 293-Zellen sowie eine mangelhafte Transfektionseffizienz des Plasmids pcDNA3.1 (+) gpr17a konnte als Ursache für die ausbleibende zelluläre Massenumverteilung nach der Zugabe von MDL 29,951 ausgeschlossen werden, was darauf hinweist, dass MDL29,951 keine Aktivierung des Gpr17a-Rezeptors im Zebrafisch hervorruft. Nach der Zugabe von Carbachol (Positivkontrolle) war der Verlauf der DMR-Antwort in den HEK 293-Zellen, die den Gpr17a-Rezeptor aus dem Zebrafisch exprimierten, vergleichbar mit der DMR-Antwort in den HEK 293-Zellen, die den humanen GPR17-Rezeptor exprimierten. Dies weist auf eine vergleichbare Lebensfähigkeit der HEK 293-Zellen nach der Transfektion hin. Um als Ursache für die ausbleibende DMR-Antwort bei dem Gpr17a-Rezeptor aus dem Zebrafisch eine mangelhafte Effizienz bei der Transfektion des Plasmids pcDNA3.1 (+) gpr17a in die HEK 293-Zellen auszuschließen, wurde eine Effizienzmessung der Calciumphosphat-Transfektion mithilfe Immunfluoreszenzfärbung mit Gpr17-Antikörpern durchgeführt (siehe Kapitel 3.3.4). Die Transfektionseffizienz betrug demnach mindestens 60%, was auf eine Expression des Gpr17a-Rezeptors bei 60% der HEK 293-Zellen hinwies und ausreichend für eine Auswertung mittels der Corning® Epic® Technologie war. Die Negativkontrolle (Abbildung 4.44 C), die ausschließlich HEK 293-Zellen enthielt, die mit dem Leervektor pcDNA3.1 (+) transfiziert wurden, zeigte nur nach Applikation von Carbachol eine zelluläre Massenumverteilung als Zeichen einer positiven Zellviabilität. Eine DMR-Antwort nach der Applikation von MDL29,951 bzw. UDP-Glucose blieb aus. Abbildung 4.44D zeigt eine deutliche Dosis-Wirkungs-Beziehung von MDL29,951 am humanen GPR17-Rezeptor, die sowohl bei dem Gpr17a-Rezeptor des Zebrafisches, als auch bei der Negativkontrolle (Leervektor) ausblieb. Die Substanz UDP-Glucose führte unabhängig von der Konzentration an keinem der Rezeptoren zu einer dynamischen Massenumverteilung in den HEK 293-Zellen.

Unveröffentlichte Untersuchungen der AG Kostenis (Universität Bonn) zeigen die funktionellen Aminosäurereste des humanen GPR17 in Bezug auf die Bindung des Agonisten MDL29,951. Vergleiche der Proteinsequenzen des humanen GPR17 und des Gpr17a aus dem Zebrafisch ergaben einen interessanten Aminosäureaustausch (Y258F bezogen auf die Proteinsequenz des humanen GPR17). Die übrigen Aminosäurereste waren identisch. Um zu

untersuchen, ob dieser unterschiedliche Aminosäurerest im Zebrafisch die Aktivität von MDL29,951 am Gpr17a-Rezeptor negativ beeinflusst hat, wurde mithilfe des QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit an Stelle 256 des Gpr17a-Proteins (adäquat zu Position 258 des humanen GPR17-Rezeptors) Phenylalanin (F) zu Tyrosin (Y) ausgetauscht. Das dabei entstandene Plasmid pcDNA3.1 (+) gpr17a F256Y (Abbildung 4.45) wurde schließlich wie bereits beschrieben in HEK 293-Zellen transfiziert. Danach wurde auch in diesen Zellen die Aktivierung von Gpr17a(F256Y) durch MDL29,951 per Dynamischer Massenumverteilung adäquat zu den oben beschriebenen Untersuchungen inklusive Kontrollen gemessen.

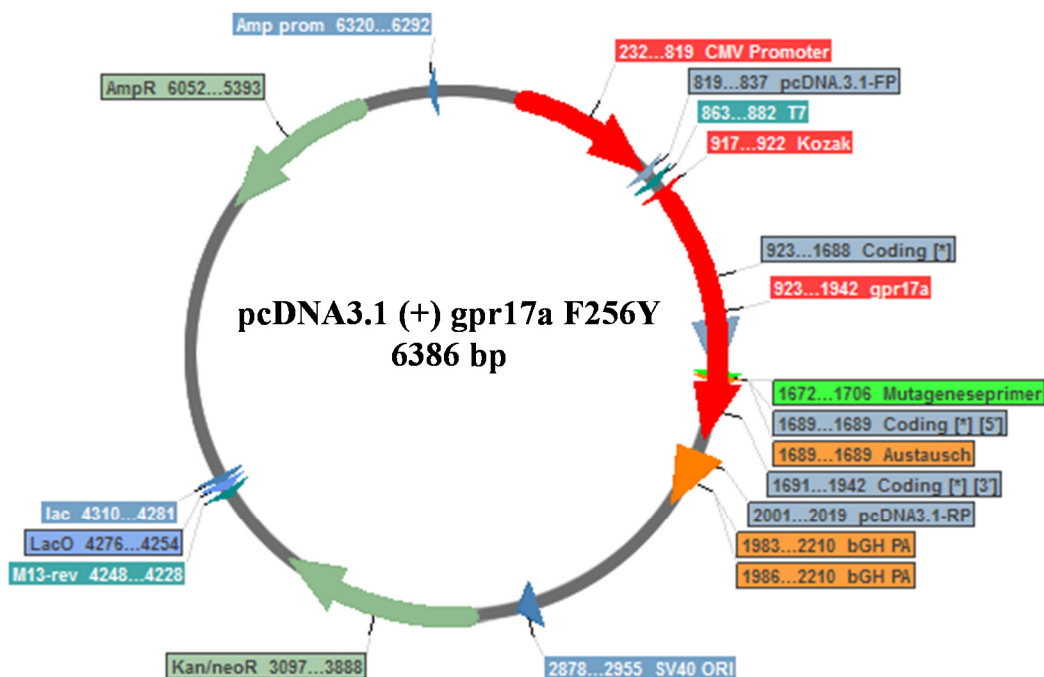


Abbildung 4.45: Plasmidkarte von pcDNA3.1 (+) gpr17a F256Y.

Leider konnte auch nach der Mutation keine Aktivierung von Gpr17a (F256Y) gemessen werden. Die Grafiken sind identisch zu Abbildung 4.44 und wurden demzufolge nicht extra aufgeführt.

Zusammenfassend zeigten diese Ergebnisse, dass MDL 29,951 keine Aktivierung des Gpr17a-Rezeptors des Zebrafisches, der in HEK 293-Zellen exprimiert wurde, verursacht.

4.4.2 Quantitativer Nachweis nach Inkubation in MDL29,951

Um den Einfluss von MDL29,951 auf die Expression der Myelin-assoziierten Gene und auf *gpr17a* und *gpr17b* im Zebrafisch zu analysieren, wurden zwei Tage alte Zebrafisch-Embryonen bis zum fünften Tag der Zebrafischentwicklung in 30 μ M MDL29,951 inkubiert (siehe Kapitel 3.1.5). Für diesen Versuch wurde Fischwasser mit 0,4% DMSO verwendet, da die genannte Substanz in dieser Lösung eine bessere Löslichkeit aufwies. Als Kontrolle wurden die Zebrafisch-Embryonen vom zweiten Tag in Fischwasser mit 0,4% DMSO ohne die Zugabe von MDL29,951 inkubiert. Nach 5 Tagen erfolgte die Isolation von RNA (siehe Kapitel 3.2.2) aus jeweils 50 Zebrafischen, sowie die Herstellung von cDNA (siehe Kapitel 3.2.16). Im Anschluss daran wurde die Expression der genannten Gene an Tag 5 der Zebrafischentwicklung unter Berücksichtigung der jeweils ermittelten PCR-Effizienzen und Single-Threshold-Values (siehe Kapitel 4.2.2) mittels RT-qPCR ermittelt (siehe Kapitel 3.2.17). Zur Normalisierung wurden die Referenzgene *actb1* und *eef1a111* verwendet. Die Auswertung der unterschiedlichen Expressionslevels erfolgte jeweils zwischen der Behandlungsgruppe (Inkubation mit MDL29,951) und der Kontrollgruppe (ohne Behandlung), wobei die Expression der Kontrollgruppe stets auf einen Wert von 1.0 (100%) festgelegt wurde.

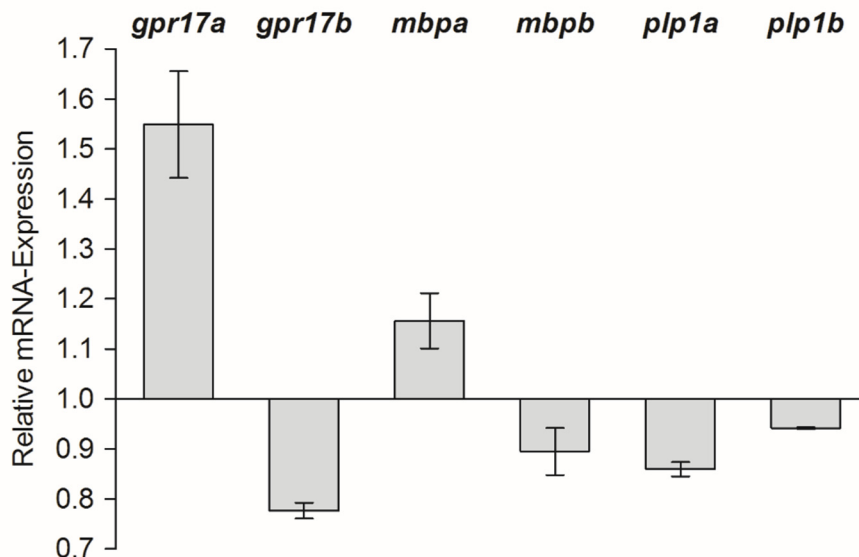


Abbildung 4.46: Relative mRNA-Expressionslevel von *gpr17a*, *gpr17b*, *mbpa*, *mbpb*, *plp1a* und *plp1b* nach der Behandlung mit MDL29,951 im Vergleich zur Kontrollgruppe. Gezeigt sind die relativen Expressionslevel an Tag 5 der Zebrafischentwicklung, wobei an Tag 2 die Behandlung mit MDL29,951 startete. Das Expressionslevel der Kontrollgruppe wurde stets auf den Wert 1.0 (100%) gesetzt. Der jeweilige Fehlerbalken zeigt den Standardfehler an.

Abbildung 4.46 zeigt die relativen Expressionslevel der analysierten Gene nach der Behandlung mit MDL29,951 im Vergleich zur Kontrollgruppe. In Abbildung 4.46 ist zu erkennen, dass *gpr17a* auf mRNA-Ebene um 55% im Vergleich zur Kontrollgruppe hochreguliert wurde. Die relative mRNA-Expression von *gpr17b* wurde durch die Zugabe von MDL29,951 hingegen um 22% reduziert (gemessen an Tag 5 nach der Befruchtung der Eizelle). Im Vergleich zu den anderen Myelin-assoziierten Genen konnte für *mbpa* eine erhöhte relative Expression um 16% festgestellt werden. Die übrigen Myelin-assoziierten Gene wurden hingegen durch die Behandlung mit MDL29,951 weniger exprimiert. Für *mbpb* liegt eine Verringerung um 11%, für *plp1a* um 14% und für *plp1b* um 6% vor. Die unterschiedlichen Expressionslevel im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigen, dass die über das Fischwasser applizierte Substanz MDL29,951 einen Einfluss auf die Expression dieser Gene hat.

5 Diskussion

5.1 Der genomische Aufbau von *gpr17* im Zebrafisch

Das Gen des G-Protein-gekoppelten Rezeptors 17 ist evolutionstechnisch in zahlreichen Spezies zu finden, u.a. in Primaten, Nagetieren und auch in Fischen (NCBI Genbank). Im Jahr 2008 zeigten Lecca et al. erstmalig, dass GPR17 in transgenen Mäusen einen regulierenden Einfluss auf die Myelinisierung im ZNS hat und somit ein potentielles Target für die Therapie demyelinisierender Erkrankungen, wie der Multiplen Sklerose, darstellt. Um weiterführend die Funktion von GPR17 bei der Myelinisierung im ZNS untersuchen zu können, wurden in dieser Arbeit die homologen Gene im Zebrafischmodell detektiert und charakterisiert. Das Zebrafischmodell hat den Vorteil, dass - im Vergleich zum Maus/Ratten-Modell - die frühe Phase der Oligodendrogenese visuell sehr gut zu beobachten ist (Van Houcke et al., 2015).

Für den Zebrafisch wird in Datenbanken wie der Ensembl-Datenbank das Vorhandensein eines *gpr17*-Gens mit einem Transkript angegeben, welches aus nur einem Exon besteht auf dem der gesamte ORF mit 1020 bp abgebildet wird. Die Angaben dazu entstanden durch automatisierte Prozesse aufgrund von Homologien ohne näher auf wissenschaftlicher Basis charakterisiert zu werden. In dieser Arbeit konnte erstmalig die Rolle von Gpr17 im Zebrafisch näher beschrieben und charakterisiert werden. Durch den Proteinblast der humanen kurzen Form von GPR17 (Bläsius et al., 1998) gegen das gesamte Zebrafischgenom (GRCz10) konnte mit einer Übereinstimmung von 55% das durch automatisierte Prozesse in der Datenbank bereits so benannte *gpr17*-Gen (ZDB-GENE-100922-133) identifiziert werden. An zweiter Stelle des Proteinblasts konnte ein mögliches paraloges Protein von Gpr17 mit einer Übereinstimmung von 40% bezogen auf das humane GPR17 im Zebrafisch identifiziert werden (*si:dkey-96n2.3*; ZDB-GENE-091204-118). Aufgrund einer möglichen Genomduplizierung einiger Gene im Zebrafisch (Meyer und Schartl, 1999; Postlethwait et al., 1999) wurden die hier detektierten Gene als *gpr17a* (55% homolog) und *gpr17b* (40% homolog) bezeichnet. Wichtig zu erwähnen ist, dass *gpr17a* des Zebrafisches in einem ähnlichen genomischen Umfeld wie das humane *GPR17* liegt. In der direkten Umgebung findet man beispielsweise sowohl beim humanen *GPR17* als auch bei *gpr17a* die Gene *MYO7B* und *SAB130*. Für die genomische Umgebung von *gpr17b* konnten keine Ähnlichkeiten im Vergleich zum humanen *GPR17* festgestellt werden. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren weisen eine hoch konservierte strukturelle Topologie auf, die aus einem

extrazellulären N-Terminus, einem intrazellulären C-Terminus sowie aus drei extrazellulären und drei intrazellulären Schleifen besteht, die durch sieben Transmembranhelices miteinander verbunden sind (Horn et al., 1998; Horn et al., 2003). Für GPR17 aus Nagetieren wurde diese Struktur bereits von Ciana et al. (2006), Parravicini et al. (2008) und Chen et al. (2009) beschrieben. Die theoretischen Vorhersagen zur Proteinstrukturen von Gpr17a und Gpr17b ergaben, dass beide Proteine ebenfalls sieben Transmembrandomänen aufweisen. Außerdem konnte in dieser Arbeit das konservierte H-X-X-R-Motiv in der Transmembrandomäne 6 von Gpr17a und Gpr17b im Zebrafisch identifiziert werden. Dieses Motiv, insbesondere der basische Arginin-Rest, ist typisch für P2Y- und CysLT-Rezeptoren und wird für die Erkennung von Liganden benötigt (Abbracchio et al., 2006; Lecca et al., 2008). Für das humane GPR17 wurde bereits gezeigt, dass Arg255 für die Ligandenbindung verantwortlich ist (Parravicini et al., 2010). Diese beschriebenen Merkmale weisen darauf hin, dass die im Zebrafisch identifizierten Gene *gpr17a* und *gpr17b* homologe Gene des humanen *GPR17* sind.

Die Charakterisierung des 5' Endes von *gpr17a* und *gpr17b* wurde mittels RACE-PCR durchgeführt. Im Gegensatz zu den bisher in den Datenbanken hinterlegten Genen konnten dabei für beide Gene Transkripte mit zwei Exons identifiziert werden, die durch ein Intron voneinander getrennt waren. Die genetische Organisation von *gpr17a* im Zebrafisch besteht demzufolge aus einem 104 bp großen nicht translatierten Exon 1, welches durch ein 6273 bp großes Intron von Exon 2, auf dem der gesamte translatierte Bereich von *gpr17a* lokalisiert ist, getrennt wird. *Gpr17b* besteht hingegen aus einem 87 bp bzw. 93 bp großen nicht translatierten Exon 1, einem 4234 bp großen Intron sowie aus Exon 2, auf dem der gesamte translatierte Bereich von *gpr17b* lokalisiert ist. Im Falle von *gpr17b* konnten mithilfe der RACE-PCR zwei mögliche Transkriptionsstartpunkte, die wenige Basenpaare voneinander entfernt waren, detektiert werden. Da jeweils bei den zweiten 5' RACE PCR-Produkten Doppelbanden im Gel auftraten, ist es möglich, dass neben den genannten Haupttranskripten noch weitere Nebentranskripte existieren könnten. Die genaue Länge von Exon 2 konnte bisher nicht detektiert werden, da die Auswertung der 3' RACE bei beiden Genen bisher aus unbekanntem Gründen nicht möglich war. Die Aufklärung der 5' untranslatierten Region von *gpr17a* und *gpr17b* aus dem Zebrafisch ermöglichte die Etablierung einer Intron-flankierenden PCR beider Gene, sodass die Expression der Gene *gpr17a* und *gpr17b* sowie die Promotorregion von *gpr17a* weiter untersucht werden konnte.

5.2 Die Expression von *gpr17a* und *gpr17b* im Zebrafisch

Basierend auf den Ergebnissen zur genomischen Struktur von *gpr17a* und *gpr17b* im Zebrafisch konnte mithilfe der RT-PCR unter Verwendung intron-flankierender Primer erstmalig gezeigt werden, dass im Zebrafisch sowohl *gpr17a* als auch *gpr17b* auf mRNA-Ebene exprimiert werden. Die Expressionsanalysen in einzelnen Geweben zeigten, dass *gpr17a* sowie *gpr17b* ausschließlich im Gehirn, im Rückenmark und im Auge von adulten Zebrafischen exprimiert werden. In der Leber, im Muskel, im Herz sowie in den Geschlechtsorganen konnte hingegen keine Expression von *gpr17a* und *gpr17b* festgestellt werden. Analog zu diesen Ergebnissen wurden der humane GPR17-Rezeptor sowie der GPR17-Rezeptor aus der Ratte vorrangig im Gehirn, jedoch in geringerem Maße auch im Herz und in den Nieren nachgewiesen (Ciana et al., 2006). Interessanterweise wird GPR17 in den menschlichen Organen exprimiert, deren Gewebe anfällig für ischämische Erkrankungen sind (Ciana et al., 2006). Weiterhin konnten Chen et al. (2009) mithilfe einer Northern-Blot-Analyse zeigen, dass GPR17 in Mäusen ausschließlich im Gehirn exprimiert wird. Die Untersuchungen zur Expression von GPR17 in der Maus und in der Ratte haben *in vitro* und *in vivo* gezeigt, dass GPR17 hauptsächlich in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen exprimiert wird (Lecca et al., 2008; Chen et al., 2009; Boda et al., 2011; Fumagalli et al., 2011). In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass *gpr17a* und *gpr17b* im Zebrafisch an jedem der ersten 10 Tage nach der Befruchtung exprimiert wird. Im Agarosegel der RT-PCR zur Expression von *gpr17a* konnten an den ersten 3 Tagen nur schwache Banden der PCR-Produkte detektiert werden, wohingegen von Tag 4 bis einschließlich Tag 8 deutlich stärkere Banden der PCR-Produkte zu erkennen waren. Eine abnehmende Bandenintensität war von Tag 9 an festzustellen. Vergleichbare Expressionslevel konnten im Agarosegel der RT-PCR von *gpr17b* vermutet werden. Die genauere Analyse der Expression von *gpr17a* mittels RT-qPCR zeigte schließlich eine sehr schwache relative Expression von *gpr17a* von Tag 1 bis Tag 3 und einen signifikanten Expressionsanstieg an Tag 3,5 um das 11-fache, der das Expressionsmaximum innerhalb der 10 Tage nach der Befruchtung darstellte. Ab Tag 3,5 nahm die Expression von *gpr17a* tendenziell wieder ab. Dieser detektierte Expressionsverlauf von *gpr17a* würde zeitlich zu der Differenzierung von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen passen, die erst ab dem Zeitpunkt 3 dpf im Bereich des Rückenmarkes von Zebrafisch-Embryonen beginnen sich zu differenzieren und dorsal des pMNs zu migrieren (Kirby et al., 2006). Zu einem früheren Zeitpunkt (bis 36 hpf) wurde gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor

Olig2 vorrangig in Motoneuronen, ventralen Interneuronen und Radialglia exprimiert wird, wohingegen die Expression von Olig2 in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen erst ab 36 hpf anstieg (Takada und Appel, 2010). Der in meiner Arbeit festgestellte Expressionsverlauf von *gpr17a* ist vergleichbar mit dem Expressionsverlauf von *Gpr17* in der Ratte, sofern man von einem ähnlichen Entwicklungsstadium der Oligodendrozyten-Vorläuferzellen ausgeht. Diesbezüglich zeigten Fumagalli et al. (2011) für Oligodendrozyten-Vorläuferzellen aus der Ratte eine sehr geringe Expression von *Gpr17*-mRNA in der frühen Entwicklungsphase der bipolaren Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (Tag 2 bis 3) und mit voranschreitender Differenzierung der Oligodendrozyten-Vorläuferzellen einen starken Expressionsanstieg, der an Tag 6 in multipolaren premyelinisierenden Oligodendrozyten sein Maximum erreichte und dann bis Tag 14 wieder abfiel. In reifen Oligodendrozyten der Ratte wurde keine *Gpr17*-mRNA detektiert. Außerdem wurde in dieser Studie gezeigt, dass ab Tag 6 die Expression des Myelin-assoziierten Gens *Mbpa* deutlich anstieg (Fumagalli et al., 2011). Im Zebrafisch wird *mbpa* ausschließlich in reifen myelinisierenden Oligodendrozyten und myelinisierenden Schwann-Zellen exprimiert (D'Rozario et al., 2017). In dieser Arbeit wurde der plötzliche Expressionsanstieg von *mbpa* an Tag 5 nach der Befruchtung nachgewiesen, während an den vorherigen Tagen die Expression von *mbpa* sehr gering war. Nach Tag 5 blieb die Expression auf diesem höheren Niveau, wobei an Tag 8 ein Maximum zu verzeichnen war. Dieses Ergebnis bestätigt die Untersuchungen von Brösamle und Halpern (2002), die in 2 Tage alten Zebrafisch-Embryonen zunächst eine Expression von MBP, PLP sowie P0 im Hinterhirn des Fisches und erst in den folgenden 8 Tagen eine steigende Expression dieser Gene im Rückenmark detektiert haben. Die Untersuchungen von Nawaz et al. (2013) zeigten ebenfalls, dass in Zebrafischembryonen 11 Stunden nach der Befruchtung kein *mbpa* exprimiert wird. Für das Myelin-assoziierte Gen *plp1b* konnte ein ähnlicher Expressionsanstieg ab Tag 5 beobachtet werden, der bei der Expressionsanalyse von Fumagalli et al. (2011) in der Ratte zu einem etwas späteren Zeitpunkt zu verzeichnen war. Die tendenzielle Abnahme der *gpr17a*-Expression ab Tag 4 nach der Befruchtung könnte ein erster Hinweis darauf sein, dass *gpr17a* vorrangig für die Initiation der Differenzierung von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen benötigt wird und in reifen Oligodendrozyten eher nicht exprimiert wird, wie es Fumagalli et al. (2011) bereits für GPR17 aus der Ratte beschrieben. Chung et al. (2011) zeigten diesbezüglich, dass es sich bei den Olig2- und Sox10-exprimierenden Oligodendrozyten-Vorläuferzellen des Zebrafisches an Tag 2 nach der Befruchtung vorrangig um Oligodendrozyten-Vorläuferzellen handelt, während ab Tag 5 nach Befruchtung vorrangig

reife Oligodendrozyten detektiert wurden. Diese Untersuchungen gehen konform mit dem in dieser Arbeit detektierten Expressionsanstieg der in Oligodendrozyten exprimierten Gene *mbpa* und *plp1b* ab Tag 5 nach der Befruchtung.

Für die paralogen Gene *gpr17b* und *mbpb* konnten deutlich geringere Expressionslevels im Vergleich zu *gpr17a* und *mbpa* detektiert werden. Diese unterschiedlichen Expressionsniveaus der paralogen Gene im Zebrafisch wurden bereits für *mbpa* und *mbpb* beschrieben (Nawaz et al., 2013). Die Expression von *gpr17b* war ungefähr zweifach geringer als die Expression von *gpr17a*, stieg bis zum Tag 6 kontinuierlich an und viel anschließend wieder leicht ab. Für *mbpb* konnte hier ein ungefähr zehnfach geringeres Expressionsniveau im Vergleich zu *mbpa* über einen Zeitraum von 10 Tagen detektiert werden, welches von Tag 1 bis Tag 9 kontinuierlich anstieg und anschließend wieder leicht abfiel. Vergleichbare Ergebnisse konnten bereits von Nawaz et al. (2013) im Zebrafisch gezeigt werden. Die Rolle von *Gpr17b* im Zebrafisch wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Für das Myelin-assoziierte Gen *plp1a* wurde ein ähnliches Expressionsniveau wie für das paraloge Gen *plp1b* beobachtet. Interessanterweise konnte hier eine gegenläufige Expression dieser Gene detektiert werden, wobei *plp1a* direkt nach der Befruchtung ein hohes Expressionslevel zeigte, das anschließend bis zum Tag 5 abfiel und danach auf einem sehr niedrigen Niveau blieb. Die Expression von *plp1b* hingegen stieg wie beschrieben erst ab Tag 5 mit voranschreitender Differenzierung der Oligodendrozyten-Vorläuferzellen auf ein höheres Expressionsniveau an. Die Unterschiede der Aminosäuresequenzen der paralogen Gene in Zebrafisch weisen jeweils auf unterschiedliche Funktionen und Spezifikationen der Proteine im Zebrafisch hin (Schweitzer et al., 2006). Die Untersuchungen von Takada und Appel (2010) wiesen bereits darauf hin, dass *plp1a* im Zebrafisch eher in einem frühen Differenzierungsstadium der Oligodendrozyten-Vorläuferzellen exprimiert wird, während die Expression von *plp1b* in reifen myelinisierenden Oligodendrozyten detektiert wurde (Brösamle und Halpern, 2002). Die hier detektierten gegenläufigen Expressionsverläufe von *plp1a* und *plp1b* bestätigen dies. Da die transgene Zebrafischlinie *Tg(Mmu.Plp1:EGFP)^{cc1Tg}* von Yoshida und Macklin (2005) EGFP unter der Kontrolle des PLP-Promotors aus der Maus exprimiert und in der Maus keine Genduplikation dieses Gens vorhanden ist, bei der die jeweiligen paralogen Gene verschiedene Funktionen einnehmen, macht es durchaus Sinn, dass die EGFP-Expression in dieser Zebrafischlinie die Zellen der gesamten Oligodendrozyten-Entwicklung markiert.

Zusammenfassend weisen die Untersuchungen zur Expression von *gpr17a* und *gpr17b* darauf hin, dass es sich bei diesen Genen um homologe Gene des *GPR17* von Mensch, Ratte und Maus handeln könnte, da die Expression einen sehr ähnlichen Verlauf hat und zeitlich zur Differenzierung von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen im Zebrafisch passt.

5.3 Einfluss von Gpr17a auf die Oligodendrogenese

5.3.1 Beeinflussung der Oligodendrogenese mittels *gpr17a*-Morpholino

Um die Funktion und den Einfluss von Gpr17a auf die Oligodendrogenese im Zebrafisch zu analysieren, wurde die Translation von Gpr17a mittels eines Morpholinos herunterreguliert. Sowohl das Design als auch die Synthese des Morpholinos erfolgte durch die Firma GeneTools. Die Funktionalität des Morpholinos konnte unter Verwendung eines spezifischen individuell hergestellten Antikörpers gegen das Gpr17a-Protein im Zebrafisch mithilfe eines Westernblots nachgewiesen werden, da im Vergleich zum Kontroll-Morpholino nach der Injektion des *gpr17a*-Morpholinos in 3-5 Tage alten Zebrafisch-Embryonen deutlich schwächere Proteinbanden im SDS-Gel detektiert wurden. Der in dieser Arbeit verwendete polyklonale Gpr17a-Antikörper wurde bei der Firma Perbio Deutschland GmbH in Auftrag gegeben. Das für die Immunisierung in Hühnern verwendete Peptid wurde von der Firma mithilfe des Antigen Profilers (Thermo Fischer Scientific) ausgewählt und anschließend synthetisiert. Das Peptid wies eine Sequenz auf, die homolog zum C-Terminus von Gpr17a des Zebrafisches war. Zur Überprüfung der Spezifität des Antikörpers wurden zuvor Seren aus drei immunisierten Tieren mittels Westernblot getestet. Anschließend erfolgte die Gewinnung des Antikörpers aus dem Serum, welches im Vergleich zu den beiden anderen Seren die höchste Spezifität aufwies. Die Funktionalität des individuell hergestellten Antikörpers konnte unter Verwendung von transfizierten HEK 293-Zellen, die auf der Oberfläche Gpr17a exprimierten, mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Wie zu erwarten war, konnte im Zytosol keine Immunfluoreszenz des Gpr17a-Antikörpers detektiert werden. Ausschließlich in der Membran der HEK 293-Zellen wurde der Gpr17a-Rezeptor mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen, wie es für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren typisch ist. Ähnliche Ergebnisse zum Beweis der membranständigen Expression von GPR17 zeigten Lecca et al. (2008) in Schnitten aus dem Mausgehirn durch Verwendung eines spezifischen GPR17-Antikörpers. Mithilfe der transgenen Zebrafischlinie *Tg(olig2:EGFP)* konnten Olig2-exprimierende Zellen detektiert werden, da diese EGFP unter der Kontrolle des *olig2*-

Promotors exprimieren (Shin et al., 2003). Olig2 ist ein Transkriptionsfaktor, der im Rückenmark in primären neuralen Progenitorzellen (pMN) exprimiert wird, aus denen sich zunächst Motoneurone und zu einem späteren Zeitpunkt (ab 3 dpf) Oligodendrozyten-Vorläuferzellen bilden, die anschließend zu myelinisierenden Oligodendrozyten ausdifferenziert werden (Park et al., 2004; Chung et al., 2013). Park et al. (2002) konnten zeigen, dass Motoneurone im Zebrafisch vorwiegend während der Proliferationsphase Olig2 exprimieren und ungefähr nach 24 hpf Olig2 herunterreguliert wird, damit eine Differenzierung der Motoneurone stattfinden kann. Undifferenzierte Oligodendrozyten-Vorläuferzellen befinden sich an Tag 2 nach der Befruchtung in der grauen Substanz des ventralen Rückenmarks. Ungefähr ab Tag 2 nach der Befruchtung beginnen diese Oligodendrozyten-Vorläuferzellen sich zu differenzieren und migrieren in die weiße Substanz des dorsalen Rückenmarks, wo sie sich ungefähr ab Tag 3 nach der Befruchtung zu reifen myelinisierenden Oligodendrozyten entwickeln (Brösamle und Halpern, 2002; Kirby et al., 2006; Takada und Appel, 2010; Chung et al., 2011). Chung et al. (2011) zeigten, dass Sox10⁺ EGFP-exprimierende Oligodendrozyten-Vorläuferzellen der *Tg(olig2:EGFP)* Zebrafischlarven ab Tag 2 nach der Befruchtung beginnen sich zu reifen Oligodendrozyten zu differenzieren und von der grauen Substanz des ventralen Rückenmarks in die weiße Substanz des Rückenmarks zu migrieren. In der hier vorliegenden Arbeit führte die Herunterregulation von Gpr17a unter Verwendung des *gpr17a*-Morpholinos in der transgenen Zebrafischlinie *Tg(olig2:EGFP)* an Tag 4 nach der Befruchtung zu einer signifikanten Reduktion dorsal migrierender *olig2*⁺-Zellen um 90% im Vergleich zum Kontroll-Morpholino. Interessanterweise wurde nach der Behandlung mit Trichostatin A, einem Inhibitor der Oligodendrozyten-Differenzierung, eine vergleichbare Reduktion dorsal migrierender Olig2⁺-Oligodendrozyten-Vorläuferzellen detektiert (Takada und Appel, 2010). Ab dem 3. Tag nach der Befruchtung bilden sich aus den primären neuralen Progenitorzellen Oligodendrozyten-Vorläuferzellen und migrieren anschließend dorsal des pMNs in die weiße Substanz (Takada und Appel, 2010). Grundsätzlich migrieren Oligodendrozyten-Vorläuferzellen während ihrer Differenzierung zu myelinisierenden Oligodendrozyten und legen im Zebrafisch große Distanzen zurück, um sich im Rückenmark zu verteilen (D'Rozario et al., 2017).

Zusammenfassend hatte die Herunterregulation von Gpr17a im Zebrafisch einen negativen Einfluss auf die Differenzierung und Migration von Olig2⁺-Oligodendrozyten-Vorläuferzellen. Das beschrieben im Umkehrschluss auch die Untersuchungen von Dougherty et al. (2012), die zeigten, dass die Behandlung von murinen neuralen Stammzellen

mit dem GPR17-Agonisten UDP *in vitro* zu einem drastischen Anstieg der Gesamtzahl von Olig2⁺-Zellen führte. Des Weiteren beschrieben Fumagalli et al (2011), dass die Herunterregulation des GPR17-Rezeptors durch kleine eingreifende RNAs (siRNAs) in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen aus der Ratte die Fähigkeit hemmte, reife Oligodendrozyten zu bilden. Die Einwirkung dieser spezifischen siRNA reduzierte sowohl die Anzahl GPR17-positiver Zellen als auch die Anzahl differenzierter MPB-positiver Zellen in der Zellkultur und letztendlich konnte auch die Zugabe des GPR17-Agonisten UDP-Glucose die Differenzierung der Oligodendrozyten-Vorläuferzellen ohne Anwesenheit des GPR17-Rezeptors nicht weiter fördern (Fumagalli et al., 2011). Chen et al. (2009) zeigten hingegen, dass in GPR17-Knock-Out-Mäusen die Myelinisierung schneller bzw. frühzeitiger vonstattengeht, was auf eine negative Regulierung der Myelinisierung durch GPR17 unter physiologischen Bedingungen hinwies. Außerdem führte die Überexpression von GPR17 in transgenen Mäusen *in vivo* und *in vitro* zu einer Hemmung der Oligodendrozyten-Reifung und zu einer Abnahme der *MBP*-Expression (Chen et al., 2009). Chen et al. (2009) zeigten, dass die negative Regulation der frühen Oligodendrogenese teilweise über einen ID2- und ID4-Protein vermittelten Mechanismus vonstattengeht. ID2 und ID4 sind Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktoren (Kondo und Raff, 2000; Wang et al., 2001), die über eine DNA-Bindung den Transkriptionsfaktor Olig1 inhibieren und somit die Oligodendrozyten-Differenzierung blockieren (Samanta und Kessler, 2004). Die Überexpression von GPR17 führte zu einer Translokation von ID2 und ID4, wodurch Olig1 und somit die Reifung der Oligodendrozyten zu einem gewissen Teil inhibiert wurde (Chen et al., 2009). Diese Untersuchungen widersprechen den Untersuchungen von Fumagalli et al. (2011) jedoch nicht komplett, da man die GPR17-Expression immer im zeitlichen Zusammenhang der Oligodendrogenese betrachten muss und ein dauerhafter GPR17-Knock-Out bzw. eine dauerhafte GPR17-Überexpression nicht die Expression unter physiologischen Bedingungen darstellt. Chen et al. (2009) und Fumagalli et al. (2011) zeigten letztendlich beide, dass GPR17 während der frühen Differenzierung der Oligodendrozyten-Vorläuferzellen exprimiert wird und die Oligodendrogenese zu diesem Zeitpunkt verlangsamt (negativ reguliert), um die Zellen für die terminale Reifung zu myelinisierenden Oligodendrozyten vorzubereiten. Für diese Phase der Oligodendrogenese könnte man GPR17 als negativen Regulator auffassen, der jedoch für die schlussendliche Reifung benötigt wird und damit im Endeffekt die Reifung fördert. Während der terminalen Reifung muss GPR17 hingegen herunterreguliert werden (Chen et al., 2009; Fumagalli et al., 2015). GPR17 gilt somit als wichtige Komponente, die

die zeitliche Abfolge der Oligodendrozyten-Differenzierung kontrolliert und den Übergang von unreifen zu reifen myelinisierenden Oligodendrozyten koordiniert.

In dieser Arbeit konnte mittels RT-qPCR gezeigt werden, dass - nach der Injektion des *gpr17a*-Morpholinos - die Herunterregulation von Gpr17a die mRNA-Expressionslevel von *plp1b* und *mbpa* in vier Tage alten Zebrafisch-Embryonen im Vergleich zur Kontrolle um mehr als 40% reduzierte, gefolgt von *plp1a* und *mbpb*. Da im Zebrafisch insbesondere mit voranschreitender Oligodendrogenese ungefähr ab dem 4. Tag (dpf) verstärkt die Gene *mbp* und *plp1b* exprimiert werden (Brösamle und Halpern, 2002), zeigt die hier detektierte Herunterregulation von *mbpa* und *plp1b* nach der Injektion des *gpr17a*-Morpholinos im Umkehrschluss, dass Gpr17a im Wildtyp-Fisch einen positiven Einfluss sowohl auf die Anzahl dorsal migrierender *olig2⁺*-Zellen als auch auf die Differenzierung von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen zu *mbpa*- und *plp1b*-exprimierenden Oligodendrozyten hat. In den Experimenten dieser Arbeit wurde Gpr17a im Zebrafisch direkt nach der Befruchtung durch den Einfluss des Morpholinos herunterreguliert, was möglicherweise den wichtigen Einfluss von Gpr17a in der frühen Phase der Oligodendrozyten-Vorläuferzellen inhibierte und somit eine spätere Differenzierung und Migration der *Olig2⁺*-Zellen hemmte. Der Einfluss des *gpr17a*-Morpholinos konnte jedoch keine vollständige Hemmung der Oligodendrozyten-Entwicklung bewirken, was daran zu erkennen war, dass an Tag 4 die Expression von *mbpa* und *plp1b* nicht vollständig inhibiert war. Da der Morpholino direkt nach der Befruchtung in den Dottersack injiziert wurde und der Dottersack innerhalb der ersten 48-60 Stunden der Embryogenese langsam abgebaut wird, kann an Tag 4 keine 100%ige Verteilung des *gpr17a*-Morpholinos auf alle Zellen des Zebrafisches gewährleistet werden. Des Weiteren wurde nach 4 Tagen für *gpr17a* auf mRNA-Ebene trotz Zugabe des *gpr17a*-Morpholinos eine leichte Expressionserhöhung im Vergleich zum Kontroll-Morpholino detektiert. Dies stellt jedoch die Wirkung des Morpholinos nicht in Frage, da dieser auf Proteinebene eindeutig eine Reduktion der Proteinmenge von Gpr17a an den Tagen 3-5 nach der Befruchtung im Vergleich zur Kontrolle verursachte. Es ist denkbar, dass *gpr17a* auf mRNA-Ebene hochreguliert wird, da durch die Einwirkung des Morpholinos zu wenig Gpr17a-Protein translatiert wird – eine Art Feedback-Mechanismus als Reaktion des Organismus auf den Morpholino. Da diese zusätzlichen *gpr17a*-mRNAs durch ausreichende Mengen an *gpr17a*-Morpholino blockiert werden müssen, um die Translation zu Gpr17a zu inhibieren, könnte es sein, dass die Wirkung des Morpholinos nach Tag 3 langsam abnimmt. Aufgrund dessen wird es bei diesem Experiment immer Oligodendrozyten-Vorläuferzellen

geben, die es schaffen sich zu Oligodendrozyten zu differenzieren. Es ist jedoch auch denkbar, dass es Oligodendrozyten-Vorläuferzellen gibt, die sich unabhängig von *gpr17a* differenzieren können und schließlich zu Oligodendrozyten ausreifen, die *mbpa* und *plp1b* exprimieren.

Ergänzend konnte in dieser Arbeit mithilfe der Herunterregulation von *Gpr17a* in der Fischlinie *Tg(cldnk:GAL4,UAS:EGFP)* ein negativer Einfluss auf die Expression von Claudin k (*Cldnk*)-exprimierenden Zellen im ZNS nachgewiesen werden. *Cldnk* gehört zu den Myelin-assoziierten Proteinen des Zebrafisches und konnte sowohl in „Tight Junctions“ von Oligodendrozyten als auch in myelinisierenden Schwann-Zellen lokalisiert werden. *Cldnk* spielt eine wichtige Rolle bei der Bildung und Aufrechterhaltung des Myelins sowie bei der Regeneration des Myelins nach einer Läsion (Münzel et al., 2012). Diese Fischlinie exprimiert EGFP unter der Kontrolle des *cldnk*-Promotors. Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Münzel et al. (2012) konnte auch hier eine Expression von *cldnk* im Bereich des Seitenlinienorgans in den Schwann-Zellen des PNS sowie im Bereich der Mauthner-Axone im ZNS nachgewiesen werden. Die Herunterregulierung der *Gpr17a*-Expression durch den Einsatz des *gpr17a*-Morpholinos bewirkte in drei Tage alten Zebrafischembryonen eine signifikante Reduktion der *cldnk*⁺-Zellen dorsal des pMNs um 39% im Vergleich zum Kontroll-Morpholino. Diese Reduktion entsprach der Reduktion der *mbpa*- und *plp1b*-Expressionslevel, die nach der Einwirkung des *gpr17a*-Morpholinos mittels qRT-PCR detektiert wurden. In der Kontrolle konnten sowohl multipolare als auch ovale *cldnk*⁺-Zellen dorsal des pMNs detektiert werden. Nach der Behandlung mit dem *gpr17a*-Morpholino wurden hingegen fast ausschließlich multipolare *cldnk*⁺-Zellen im Bereich der Bodenplatte als auch dorsal des pMNs detektiert. Die gleichzeitige Reduktion der *mbpa*- und *plp1b*-Expressionslevel an Tag 4 nach der Behandlung mit dem *gpr17a*-Morpholino weist darauf hin, dass es sich bei den bipolaren ovalen *cldnk*⁺-Zellen der Kontrolle um myelinisierende Oligodendrozyten handeln müsste, deren Entwicklung von *Gpr17a* abhängig ist und nach der Behandlung mit dem *gpr17a*-Morpholino ausblieb. Bei den multipolaren *cldnk*⁺-Zellen müsste es sich um premyelinisierende und/oder reife Oligodendrozyten handeln, deren Differenzierung wegen einer unvollständigen Wirkung und Verteilung des Morpholinos zuvor nicht gehemmt wurde oder bei denen *gpr17a* bereits herunterreguliert worden sein könnte, um die terminale Reifung zu fördern. Bei diesen multipolaren *cldnk*⁺-Zellen wäre auch eine Differenzierung unabhängig von *gpr17a* denkbar. Fumagalli et al. (2011) zeigten, dass die Expression von *Gpr17* in der Ratte während der Differenzierung von bipolaren

Oligodendrozyten-Vorläuferzellen zu multipolaren premyelinisierenden Oligodendrozyten ansteigt und anschließend in reifen multipolaren Oligodendrozyten ausbleibt, um die terminale Reifung zu ermöglichen. Ein ähnlicher Expressionsverlauf kann auch für den Zebrafisch angenommen werden, weshalb die Entwicklung eines Teils der myelinisierenden $Cldnk^+$ -Oligodendrozyten nach der Behandlung mit dem *gpr17a*-Morpholino ausblieb.

In einem weiteren Experiment wurden mithilfe der Verpaarung von Fischen der stabilen Fischlinien *Tg(olig2:dsRed2)* und *Tg(cldnk:GAL4,UAS:EGFP)* und anschließender Untersuchung der Zebrafisch-Embryonen mittels 2-Photonenmikroskop die premyelinisierenden und myelinisierenden Oligodendrozyten im ZNS des Zebrafisches eindeutig detektiert. Die gelbe Fluoreszenz markierte die Zellen, die *Cldnk* und *Olig2* gleichzeitig exprimieren. Bei diesen Zellen handelt es sich nachweislich um premyelinisierende und myelinisierende Oligodendrozyten (Münzel et al., 2012; D'Rozario et al., 2017). Hiermit konnte gezeigt werden, dass sowohl die bipolaren als auch die multipolaren $CldnK^+$ -Zellen gleichzeitig *Olig2* exprimieren. Diese Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Oligodendrozyten im Zebrafisch verschiedene Morphologien einnehmen können, wie es bereits Goldshmit (2012) für die Gliazellen des Zebrafisches im Vergleich zu den Gliazellen des Menschen zeigten. Goldshmit (2012) beschrieben, dass durch Fgf induzierte Gliazellen im Zebrafisch eine bipolare Morphologie aufweisen und somit als Brücke bzw. Verbindung der beiden voneinander getrennten Abschnitte des Spinalganges (Läsion) dienen können, was die Migration der regenerierenden Axone im Zebrafisch ermöglicht. Die in der hier vorgelegten Arbeit detektierten bipolaren Oligodendrozyten des Zebrafisches könnten demzufolge Oligodendrozyten sein, die remyelinisierende Eigenschaften besitzen. Der Großteil dieser Oligodendrozyten befindet sich demnach ventral des pMNs, während dorsal des pMNs weniger Oligodendrozyten detektiert wurden. Die dorsale Ansicht des Zebrafisches unter dem 2-Photonenmikroskop zeigte, dass die multipolaren Oligodendrozyten dorsal des pMNs direkt oberhalb des pMNs lokalisiert waren, während die bipolaren Oligodendrozyten eher dorsal und lateral (seitlich orientiert) waren (siehe Abbildung 4.42).

Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse dieses Teils meiner Arbeit den positiven Einfluss von *gpr17a* auf die Initiation der Differenzierung von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen im Zebrafisch. GPR17 gilt als Marker der intermediären Phase der Differenzierung der Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (Mitew et al., 2014). Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit zeigen, dass Gpr17a im Zebrafisch diese Funktion als Marker der intermediären Phase

der Differenzierung der Oligodendrogenese ebenfalls übernehmen könnte. Ob die Aktivierung von Gpr17a die Differenzierung der Oligodendrozyten-Vorläuferzelle direkt fördert oder die Differenzierung verlangsamt, um die Vorbereitung auf die terminale Reifung zu gewährleisten, wie es in der Maus und in der Ratte gezeigt wurde (Fumagalli et al., 2011), sollte in weiterführenden Experimenten zu dieser Arbeit geklärt werden.

Dass G-Protein-gekoppelte Rezeptoren auch im Zebrafisch einen Einfluss auf die Myelinisierung haben können, zeigten neben den Untersuchung der hier vorliegenden Arbeit auch die Untersuchungen von Ackerman et al. (2015), Giera et al. (2015) sowie Petersen et al. (2015). Während Gpr126 im Zebrafisch einen positiven Effekt auf die Myelinisierung von Schwann-Zellen hat (Petersen et al., 2015), wurde für Gpr56 eine Rolle als positiver Regulator der Oligodendrozytenentwicklung beschrieben (Ackerman et al., 2015). Bei beiden genannten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren handelt es sich um Rezeptoren der Adhäsions-Klasse. Der humane GPR17-Rezeptor gehört jedoch zur Rhodopsin-Klasse der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Zu welcher Klasse der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren Gpr17a des Zebrafisches gehört, ist bisher unklar. Die Untersuchungen der hier vorliegenden Arbeit zeigen jedoch Ähnlichkeiten von Gp17a und Gpr56 im Zebrafisch hinsichtlich der Expression in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen und der Auswirkung auf die Myelinisierung.

5.3.2 Einfluss von MDL29,951 auf den Gpr17a-Rezeptor im Zebrafisch

In zahlreichen Studien wurden verschiedene Agonisten und Antagonisten des GPR17-Rezeptors des Menschen, der Ratte und der Maus kontrovers diskutiert (Eberini et al., 2011; Fumagalli et al., 2015; Simon et al., 2017). Da der GPR17-Rezeptor als potentiell pharmakologisches Target bei demyelinisierenden Erkrankungen des ZNS (Lecca et al., 2008), sowie bei der Regulierung der Nahrungsaufnahme bei Adipositas-Patienten (Ren et al., 2012; Ren et al., 2015) und bei der Demenz-Erkrankung (Marschallinger et al., 2015) von großer Bedeutung sein könnte, ist es dringend notwendig die physiologische Funktion des Rezeptors weiter zu untersuchen und die endogenen Liganden sicher zu detektieren.

In den Studien von Lecca et al. (2008) und Ciana et al. (2006) wurde die spezifische Rolle von GPR17 in der Oligodendrozytenentwicklung im Mausmodell mithilfe der potentiellen endogenen Liganden der Gruppe der Uracil-Nukleotide und Cysteinyl-Leukotriene beschrieben. Mithilfe von UDP-Glucose und Leukotriene D4 (LTD4) konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Aktivierung des GPR17-Rezeptors durch diese Liganden die

Differenzierung von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen zu reifen Oligodendrozyten fördert und gleichzeitig die Expression von MBP erhöht war (Lecca et al., 2008). Weiterhin zeigten Fumagalli et al. (2011), dass der Ligand und Agonist UDP-Glucose die Reifung zu Oligodendrozyten fördert und auf der anderen Seite die GPR17-Antagonisten Cangrelor und Montelukast die Reifung zu Oligodendrozyten verlangsamen. In den Untersuchungen von Marschallinger et al. (2015) wurde Montelukast ebenfalls als Inhibitor des GPR17-Rezeptors beschrieben. Betrachtet man die Wirkung von GPR17 auf die Differenzierung der Oligodendrozyten-Vorläuferzellen in einem zeitlichen Zusammenhang, so wurde gezeigt, dass GPR17 für die Initiation der Differenzierung der Oligodendrozyten-Vorläuferzelle in einem frühen Stadium benötigt wird und anschließend herunterreguliert wird, um die terminale Reifung zum myelinisierenden Oligodendrozyten in der späten Phase der Differenzierung zu gewährleisten (Chen et al., 2009; Boda et al., 2011; Fumagalli et al., 2011). In einem frühen Stadium der Oligodendrozyten-Vorläuferzelle der Ratte führt die Aktivierung von GPR17 beispielsweise durch Uracil-Nukleotide zu einer Senkung der intrazellulären cAMP-Konzentration (via G α i-Untereinheit des Rezeptors), was dazu führt, dass die Oligodendrozyten-Vorläuferzellen sich differenzieren, aber zunächst in einem premyelinisierenden Zustand verbleiben, um für die bevorstehende Reifung zu myelinisierenden Oligodendrozyten vorbereitet werden zu können (Fumagalli et al., 2011). Zu einem späteren Zeitpunkt – wenn die Oligodendrozyten-Vorläuferzellen zur terminalen Differenzierung übergehen – wird GPR17 hingegen herunterreguliert (Chen et al., 2009) und es kommt zur Agonisten-induzierten Internalisierung des GPR17-Rezeptors (Fratangeli et al., 2013; Daniele et al., 2014), was folglich die intrazelluläre cAMP-Konzentration erhöht, schlussendlich die Expression von MBP fördert und die Myelinisierung ermöglicht.

Die im Kapitel 5.3.1 beschriebenen Morpholino-Experimente weisen auf eine adäquate Funktion von Gpr17a bei der Oligodendrogenese im Zebrafisch hin, da der Knockdown von Gpr17a durch den Morpholino 4 Tage nach der Befruchtung zu einer Hemmung der Oligodendrogenese führte. Interessanterweise stellten die Studien von Hennen et al. (2013) und Simon et al. (2017) die Wirkung der potentiellen endogenen Liganden in Frage und beschrieben den GPR17-Rezeptor weiterhin als ‚Orphan Receptor‘. In acht verschiedenen Assays zeigten Uracil-Nukleotide und Cysteinyl-Leukotriene keine Aktivierung des GPR17-Rezeptors aus Mensch, Maus und Ratte in verschiedenen zellulären Hintergründen (Simon et al., 2017). Diese Arbeitsgruppe negierte ebenfalls die Hemmung von GPR17 durch Cangrelor und Ticagrelor. Hennen et al. (2013) und Simon et al. (2016) beschrieben hingegen den neuen

GPR17-Agonisten MDL29,951, der durch die selektive Aktivierung von GPR17 die Reifung von primären Oligodendrozyten der Maus inhibierte, was in GPR17-Knockout-Mäusen, welche als Kontrolle verwendet wurden, nicht der Fall war (Hennen et al., 2013). Die Aktivierung von GPR17 durch MDL29,951 führte zu einer Aktivierung der $G\alpha_{i/o}$ -Signalkaskade und verminderte die intrazelluläre cAMP-Konzentration durch Hemmung der Adenylatzyklase (AC). Diese reduzierte Aktivität der Adenylatzyklase-cAMP-PKA-cAMP-Signalkaskade führte zu einer verminderten Phosphorylierung des CREB-Bindeproteins, einem Co-Aktivatoren der Transkription von Genen, die in die Myelinisierung bzw. in die Reifung von Oligodendrozyten involviert sind (z.B. MBP) sowie zu einer verringerten Aktivierung von EPAC (Exchange Protein Directly Activated by cAMP), wodurch es ebenfalls zu einer Hemmung der Differenzierung von Oligodendrozyten kam (Simon et al., 2016).

Die beschriebene Wirkung der genannten potenziellen Agonisten und Antagonisten wurde bisher jedoch nicht für Gpr17a aus dem Zebrafisch getestet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mithilfe der Corning Epic Technologie die dynamische Massenumverteilung in transfizierten HEK 293-Zellen, die transient Gpr17a exprimierten, nach der Behandlung mit MDL29,951 und UDP-Glucose gemessen. Im Vergleich zum humanen GPR17-Rezeptor zeigte der Gpr17a-Rezeptor nach der Behandlung mit MDL29,951 keine DMR-Antwort. UDP-Glucose aktivierte weder den humanen GPR17-Rezeptor, wie es bereits von Simon et al. (2017) beschrieben wurde, noch den Gpr17a-Rezeptor des Zebrafisches. Eine mangelhafte Zellviabilität der HEK 293-Zellen sowie eine mangelhafte Transfektionseffizienz des Plasmids pcDNA3.1 (+) gpr17a konnten ausgeschlossen werden. Diese Ergebnisse bestätigen die konzentrationsabhängige Aktivierung des humanen GPR17-Rezeptors durch MDL29,951, während eine Wirkung am Gpr17a-Rezeptor des Zebrafisches nicht detektiert werden konnte. Das Ausbleiben der DMR-Antwort bei dem Gpr17a-Rezeptor kann verschiedene Gründe haben.

Zum Beispiel ist hierbei interessant, dass das Alignment der Proteinsequenzen von Gpr17a und des humanen GPR17 ergab, dass mit Ausnahme von zwei Aminosäureaustauschen (N254S und Y258F bezogen auf die Proteinsequenz des humanen GPR17) alle Aminosäurereste, die am humanen GPR17-Rezeptor auf der Basis einer Mutagenese-Studie als essentiell für die agonistische Wirkung von MDL29,951 am humanen Rezeptor beschrieben wurden, konserviert sind (unveröffentlichte Daten der AG Kostenis, Universität Bonn). Die beiden nicht konservierten Aminosäurereste flankieren bzw. sind Bestandteil des

H-X-X-R-Motives, das für die Ligandenbindung am humanen GPR17-Rezeptor als sehr wichtig beschrieben wurde (Abbracchio et al., 2006; Lecca et al., 2008). Dies könnte ein Grund dafür sein, warum MDL29,951 den Gpr17a-Rezeptor des Zebrafisches nicht aktivieren konnte. Interessanterweise führte die Mutation Y258F beim humanen GPR17-Rezeptor nur zu einer Hemmung der Aktivierung durch MDL29,951, während die Mutation Y258A die Wirkung am Rezeptor ausschaltete (unveröffentlichte Daten der AG Kostenis, Universität Bonn). Man könnte folglich davon ausgehen, dass die Wirkung von MDL29,951 am Gpr17a-Rezeptor durchaus messbar sein müsste. Die Mutagenese von Phenylalanin (F) zu Tyrosin (Y) an Stelle 256 des Gpr17a-Proteins (adäquat zu Position 258 des humanen GPR17-Rezeptors) führte jedoch auch nicht zu einer mittels Dynamischer Massenumverteilung gemessenen Aktivierung des Gpr17a-Rezeptors nach Behandlung mit MDL29,951. Der Aminosäureaustausch N254S (N252S bezogen auf Gpr17a) wurde bisher nicht weiter untersucht, könnte jedoch auch einen Einfluss auf die Ligandenbindung von MDL29,951 am Gpr17a-Rezeptor haben. Das Alignment der beiden Proteinsequenzen ist in Abbildung 4.1 dargestellt. Auffällig ist, dass die 6. Transmembrandomäne des Gpr17a aus dem Zebrafisch bis zur Aminosäure 255 des Proteins geht, während die Transmembrandomäne des humanen GPR17-Rezeptors 4 Aminosäuren vor dem betroffenen Aminosäurerest endet. Das könnte ebenfalls die Ligandenbindung von MDL29,951 beeinflusst haben. Möglich ist auch, dass die humane Zelllinie HEK 293 nicht die geeignete Zelllinie war, um die Aktivität des Zebrafisch-Rezeptors zu zeigen. Als Alternative zu den HEK 293-Zellen wurde das Plasmid ebenfalls in PAC2-Zellen des Zebrafisches transfiziert, um anschließend eine DMR-Messung nach Behandlung mit MDL29,951 durchführen zu können. Aufgrund einer zu geringen Transfektionseffizienz führten diese Untersuchungen bisher leider zu keinem Ergebnis. Zukünftig sollte dieser Versuch weiter etabliert und wiederholt werden. Um dennoch eine mögliche Wirkung von MDL29,951 auf die Oligodendrogenese im Zebrafisch zeigen zu können, wurden zwei Tage alte Zebrafisch-Embryonen bis zum fünften Tag nach der Befruchtung in Fischwasser mit 30µM MDL29,951 und 0,4% DMSO inkubiert. Die Kontrollfische wurden hingegen nur in Fischwasser mit 0,4% DMSO inkubiert. Nachweislich konnte in der Doktorarbeit von Stephanie Monika Hennen (Elucidating agonist-induced signaling patterns of human G protein-coupled receptor GPR17 and uncovering pranlukast as a biased mixed agonist-antagonist at GPR17, 2011) gezeigt werden, dass eine Konzentration von 0,4% DMSO keinen detektierbaren Effekt auf die Zellen in der Zellkultur hatte. Die Inkubation der Fische mit MDL29,951 führte zu einer um 55% erhöhten Expression von

gpr17a auf mRNA-Ebene im Vergleich zur Kontrolle, was darauf hindeuten könnte, dass MDL29,951 den Gpr17a-Rezeptor auch im Zebrafisch beeinflusst. Es wäre denkbar, dass durch die Bindung von MDL29,951 am Rezeptor die endogenen Liganden des Rezeptors nicht binden konnten, sodass als Antwort darauf, die Expression des Rezeptors hochreguliert wurde. Interessanterweise konnte an Tag 5 nach der Befruchtung eine um 16% erhöhte Expression von *mbpa* nach der Behandlung mit MDL29,951 detektiert werden (siehe Abbildung 4.45). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die Einwirkung von MDL29,951 von Tag 2 bis Tag 5 nach der Befruchtung die Oligodendrogenese und die Reifung von *mbpa*-exprimierenden myelinisierenden Oligodendrozyten förderte. Im Gegensatz dazu zeigten Hennen et al. (2013) *in vitro*, dass die Aktivierung des GPR17-Rezeptors primärer Pre-Oligodendrozyten der Maus durch die Behandlung mit 30 μ M MDL29,951 für 3 Tage die Reifung zu myelinisierenden Oligodendrozyten hemmte und folglich der prozentuale Anteil MBP-exprimierender Oligodendrozyten in der Kultur um ca. 15% reduziert war. Dieses Phänomen der Zellreduktion konnte in GPR17-negativen primärer Pre-Oligodendrozyten der Maus nicht detektiert werden, was die Selektivität von MDL29,951 am GPR17-Rezeptor bestätigt (Hennen et al., 2013). Die Gründe für die gegensätzlichen Wirkung von MDL29,951 auf die *mbpa*-Expression im Zebrafisch können sehr vielseitig sein und konnten bisher nicht geklärt werden. Zu beachten ist hierbei, dass Substanzen, die über das Fischwasser appliziert werden Off-Target-Effekte verursachen können, die die Ergebnisse verfälschen können (D'Rozario et al., 2017). Es könnte folglich sein, dass MDL29,951 die Oligodendrogenese im Zebrafisch durch die Bindung an einem anderen Rezeptor beeinflusst. Sollte MDL29,951 im Zebrafisch jedoch selektiv den Gpr17a-Rezeptor aktivieren und dadurch die Expressionssteigerung von *mbpa* verursachen, dann würde dies die Ergebnisse der im vorigen Kapitel beschriebenen Morpholino-Experimente unterstreichen und bestätigen, dass im Zebrafisch die Aktivität von Gpr17a in der frühen Phase der Oligodendrogenese für die Bildung reifer Oligodendrozyten benötigt wird. Auf der anderen Seite wurde die Expression der meist schwächer exprimierten Gene *mbpb* (11%), *plp1a* (14%) und *plp1b* (6%) nach der MDL29,951-Behandlung an Tag 5 nach der Befruchtung leicht vermindert, was hingegen auf eine Hemmung der Oligodendrogenese durch MDL29,951 hinweisen könnte.

Um genauere Aussagen über die Wirkung von MDL29,951 auf die Oligodendrogenese im Zebrafisch treffen zu können, sollten zukünftig weitere Untersuchungen erfolgen. Die bisherigen Ergebnisse weisen jedoch darauf hin, dass MDL29,951 die Oligodendrogenese im Zebrafisch beeinflusst.

5.4 Gpr17a in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen im Zebrafisch

In der Vergangenheit zeigten zahlreiche Studien, dass die Myelinbildung durch verschiedene inhibitorische und aktivierende Moleküle beeinflusst wird (Nave und Werner, 2014). Die Proliferation, Migration und Differenzierung von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen wird durch exogene Signale gesteuert, die beispielsweise die Aktivierung spezifischer intrazellulärer Signalwege verursachen (Mitew et al., 2014; Gonsalvez et al., 2015). Unter anderem spielt der Sonic-Hedgehog-Signalweg eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Motoneuronen und Oligodendrozyten aus pMN-Vorläuferzellen, da über diesen Signaltransduktionsweg die Expression des Transkriptionsfaktors Olig2 im Zebrafisch induziert wird (Park et al., 2002). Als wichtige axonale Signale wurden beispielweise extrazelluläres Adenin (ATP, ADP), Uracil (UTP, UDP) sowie die Nukleotide UDP-Glucose und UDP-Galaktose identifiziert, die purinerge P2X- (Ionenkanal) sowie P2Y-Rezeptoren (G-Protein-gekoppelt) aktivieren (Burnstock und Knight, 2004; Abbracchio und Verderio, 2006). P2Y-Rezeptoren sowie der P2Y-ähnliche Rezeptor GPR17 wurden in zahlreichen Studien im Maus- oder Ratte-Modell auf Oligodendrozyten-Vorläuferzellen sowie auf unreifen nicht myelinisierenden Oligodendrozyten nachgewiesen (Lecca et al., 2008; Chen et al., 2009; Verkhratsky et al., 2009; Fumagalli et al., 2011; Burnstock, 2016). Die bis hierhin beschriebenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Gpr17a-Rezeptor auch im Zebrafisch in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen exprimiert wird. Die im Folgenden diskutierten Untersuchungen konnten diese Hypothese eindeutig bestätigen.

5.4.1 *gpr17a*-exprimierende Zelltypen im ZNS des Zebrafisches

Mittels der *in situ* Hybridisierung konnte in dieser Arbeit erstmalig die zelluläre Expression von *gpr17a* im ZNS des Zebrafisches mikroskopisch analysiert werden. Bereits in 24 Stunden alten Zebrafischembryonen konnten erste schwache Signale von *gpr17a* im Bereich des Kopfes sowie im Bereich des Rückenmarkes detektiert werden. Nach 48 und 72 Stunden konnten die *gpr17a*-Signale deutlicher detektiert werden. Diese Ergebnisse bestätigen die mittels RT-(q)PCR ermittelten *gpr17a*-exprimierenden Gewebe sowie den ermittelten Expressionsverlauf von *gpr17a* im Zebrafisch. Neben der Expression von *gpr17a* im Kopfbereich des Zebrafisches konnten drei weitere Expressionsbereiche von *gpr17a* identifiziert werden. Ein Signalebereich konnte oberhalb des gesamten Notochords im Bereich der Zellen der Bodenplatte detektiert werden (Gruppe 1). Weitere Signale konnten in der

lateralen Zebrafisch-Ansicht in der Ebene des Notochords (Gruppe 3) sowie im dorsalen Bereich des Rückenmarks (Gruppe 2) detektiert werden. Der direkte Vergleich der Expression von *gpr17a*-mRNA-Signalen im Zebrafisch zu der Expression von *mbpa*-Transkripten im Zebrafisch (siehe Abbildung 4.28) zeigt, dass *gpr17a*-mRNA-Signale nicht im PNS, sondern ausschließlich im ZNS lokalisiert sind. Im Maus- und Rattenmodell konnte ebenfalls eine Expression von *gpr17* ausschließlich im ZNS, insbesondere in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen nachgewiesen werden (Lecca et al., 2008; Chen et al., 2009; Boda et al., 2011; Fumagalli et al., 2011). Die Expression von *mbpa* wurde im Zebrafisch hingegen sowohl im ZNS (myelinisierende Oligodendrozyten) als auch im PNS (myelinisierende Schwann-Zellen) nachgewiesen (Nawaz et al., 2013).

Die Lokalisierung der *gpr17a*-positiven Zellen auf Höhe der Bodenplatte (Gruppe 1) sowie im dorsalen Bereich des Rückenmarks (Gruppe 2) konnte in einem weiteren Experiment mittels transienter Expression des Plasmids pBluescript II KS I-SceI *gpr17a* EGFP, welches EGFP unter der Kontrolle des potentiellen *gpr17a*-Promotors exprimiert, in 4 Tage alten Zebrafischen bestätigt werden. Die Analyse mit dem 2-Photonenmikroskop (siehe Abbildung 4.34) zeigte multipolare EGFP-Signale unter der Kontrolle des potentiellen *gpr17a*-Promotors im Bereich der Bodenplatte (Zelltyp 1) sowie dorsal des pMNs (Zelltyp 2). Dies weist darauf hin, dass der 9,5 kb große Sequenzabschnitt stromaufwärts des Startkodons von *gpr17a*, welcher 3128 bp stromaufwärts von Exon 1, das gesamte Exon 1 (104 bp), das gesamte Intron 1 (6230 bp) sowie 8 bp von Exon 2, die vor dem Startkodon von *gpr17a* lokalisiert sind, umfasste, den Promotor von *gpr17a* enthalten müsste. Die Promotorbereiche des humanen *GPR17* sowie von *Gpr17* aus der Maus und aus der Ratte erstrecken sich über einen Bereich von ca. 900 bp, sind in der 5' untranslatierten Region von *Gpr17* lokalisiert und schließen den Bereich des nicht-kodierenden Exon 1 ein (Fratangeli et al., 2013). Interessanterweise wurde EGFP unter der Kontrolle des potentiellen *gpr17a*-Promotors außerdem in Zellen mit Sanduhr-ähnlicher Form exprimiert, die sich jeweils auf Höhe der Bodenplatte (Zelltyp 3) sowie im Bereich dorsalen Mittellinie des Neuralrohrs (Zelltyp 4) palisadenartig erstreckten. Dieser Zelltyp 4 im Bereich der dorsalen Mittellinie des Neuralrohrs ähnelt sehr stark den im Zebrafisch detektierten Zellen der Dachplatte (‘Roofplate Cells‘), bei denen es sich um Radialglia handelt, die den für diese Zellen typischen Marker GFAP (glial fibrillar acidic protein) exprimieren (Kondrychyn et al., 2013). Die Zellen der Dachplatte haben die Aufgabe, die Axone und andere Zellen davor zu schützen, die dorsale Mittellinie durch Migration zu überschreiten (Snow et al., 1990). Radialglia dienen einerseits als strukturelles Element des

ZNS, andererseits aber auch als neuronale Vorläuferzellen und sind dafür verantwortlich neue Neurone, Astrozyten, ependymale Gliazellen sowie Oligodendrozyten in Säugetieren zu bilden (Merkle et al., 2004; Rowitch und Kriegstein, 2010). Außerdem konnten auch in Zebrafischlarven Radialglia im Rückenmark detektiert werden, die einen neuronalen Stammzellcharakter aufweisen und den Transkriptionsfaktor *Olig2* exprimieren, was schließlich die Bildung neuer Oligodendrozyten, jedoch keiner Neurone und Astrozyten ermöglicht (Park et al., 2007; Kim et al., 2008). In diesem Zusammenhang ist es durchaus möglich, dass die in meiner Arbeit detektierten Sanduhr-ähnlichen Zelltypen im Bereich der Bodenplatte (Zelltyp 3) sowie im Bereich dorsal des pMNs (Zelltyp 4) Radialglia sind, die EGFP unter der Kontrolle des *gpr17a*-Promotors exprimieren. Warum diese Sanduhr-ähnlichen Zelltypen mittels *in situ* Hybridisierung nicht detektiert wurden, konnte bisher nicht geklärt werden. Es könnte sein, dass mithilfe des Digoxigenin-Labelings bei der *in situ* Hybridisierung eher die Zellkörper, die multipolar erschienen, detektiert wurden und die Detektion dünner fibrillärer Strukturen der Radialglia ausblieb. Demzufolge wäre es möglich, dass die Zelltypen 3 und 4 unter den detektierten *in situ*-Signalen im Bereich der Bodenplatte (Gruppe 1) und dorsal des pMNs (Gruppe 2) nicht gesondert auffielen. Mithilfe einer *in situ* Hybridisierung gegen *gpr17a* in einem Zebrafisch, in den das Plasmid pBluescript II KS *I-SceI gpr17a EGFP* injiziert wurde, und einer anschließenden Immunfluoreszenz gegen EGFP konnte vorerst nur gezeigt werden, dass die *gpr17a*-Signale beider Untersuchungsmethoden auf Höhe der Bodenplatte sowie dorsal des pMNs jeweils auf der gleichen Höhe lagen. Eine 100%ige Überlagerung der Signale war leider nicht möglich, da die Fluoreszenz einer Zelle, die Digoxigenin-gelabelt ist, nur sehr schwer detektiert werden konnte. Vermutlich blockierte in diesem Fall das Färbeprecipitat der *in situ* Färbung die Fluoreszenz des anti-EGFP-Antikörpers. Die genauere Eingrenzung des Promotorbereiches von *gpr17a* sowie die eindeutige Verifizierung des Promotors erfolgten bisher nicht. Demzufolge könnte es sein, dass die Sanduhr-ähnlichen Zelltypen 3 und 4, die nach der Injektion von pBluescript II KS *I-SceI gpr17a EGFP* grün fluoreszieren, Zellen sind, die EGFP unspezifisch unter der Kontrolle des hier verwendeten *gpr17a*-Promotor-Konstruktes exprimieren. Diese Vermutung kann für den Zelltyp 3 nahezu ausgeschlossen werden, da mithilfe der Mosaikexpression von *gpr17a:EGFP* in der Zebrafischlinie *Tg(olig2:DsRed2)* eine Co-Expression von *gpr17a:EGFP* und *olig2:DsRed2* in den Sanduhr-ähnlichen Zellen der Bodenplatte (Zelltyp 3), in den multipolaren Zellen der Bodenplatte (Zelltyp 1) sowie in wenigen multipolaren Zellen dorsal des pMNs (Zelltyp 2) gezeigt werden konnte (siehe

Abbildung 4.37). Da die Expression von DsRed2 (rotes Fluoreszenzprotein) unter der Kontrolle des *olig2*-Promotors an Tag 3 nach der Befruchtung vorrangig die Oligodendrozyten-Vorläuferzellen und wenige Oligodendrozyten im Bereich des pMNs und im Bereich dorsal des pMNs markiert (Takada und Appel, 2010), weist die detektierte Co-Lokalisierung in den multipolaren Zelltypen 1 und 2 auf eine Expression von *gpr17a* in den Olig2-positiven Oligodendrozyten-Vorläuferzellen hin. Die detektierte Co-Expression von *gpr17a:EGFP* und *olig2:DsRed2* im Sanduhr-ähnlichen Zelltyp 3 im Bereich der Bodenplatte könnte darauf hinweisen, dass Olig2 an Tag 3 nach der Befruchtung in geringem Maße in Radialglia exprimiert wird, die gleichzeitig *gpr17a* exprimieren. Dies würde den Untersuchungen von Takada und Appel (2010) etwas widersprechen, da deren Untersuchungen zeigten, dass in 3 Tage alten Zebrafischen die Expression von Olig2 in Radialglia herunterreguliert war. Andere Veröffentlichungen beschrieben jedoch Radialglia mit neuronalem Stammzellcharakter im Zebrafisch, die Olig2 bis ins Alter eines ausgewachsenen Zebrafisches exprimieren und sich später zu Oligodendrozyten differenzieren können (März et al., 2010). Demzufolge wäre eine gleichzeitige Expression von *gpr17a* in diesen Radialglia durchaus denkbar. Das Ausbleiben einer Co-Expression von *gpr17a:EGFP* und *olig2:DsRed2* im Zelltyp 4 könnte auf ein falsch-negatives Ergebnis aufgrund der Mosaikexpression von *gpr17a:EGFP* zurückzuführen sein oder darauf hinweisen, dass es sich bei Zelltyp 4 um unspezifische falsch-positive *gpr17a:EGFP*-exprimierende Zellen handelt. Dies sollte in weiterführenden Untersuchungen mithilfe der Verifizierung des *gpr17a*-Promotors geklärt werden.

Bei den gleichmäßig verteilten *gpr17a*-Signalen, die nach der *In situ* Hybridisierung in der lateralen Ansicht auf Höhe des Notochords bzw. des lateralen Myoseptums lokalisiert waren (Gruppe 3), handelt es sich nachweislich nicht um Neuromasten. Neuromasten (Sinnesknospen) sind Bestandteil des Seitenlinienorgans von Fischen, die in Form von Kanälen in der Haut vorkommen und beispielsweise Haarsinneszellen enthalten. Diese Neuromasten sind gleichmäßig mit einem bestimmten Abstand über das Seitenlinienorgan verteilt (Chen et al., 2011; Pinto-Teixeira et al., 2013). Die Färbung mittels Neuromasten-Fluoreszenzfarbstoffes DiAsp (Chen et al., 2011) ergab jedoch ein abweichendes Detektionsmuster der Neuromasten gegenüber der *gpr17a*-Signale der Gruppe 3. Diese lagen nicht auf Höhe des Seitenlinienorgans, sondern weiter innen vor dem Notochord, was eine Expression von *gpr17a* im PNS des Zebrafisches ausschließt. An dieser Stelle könnte man spekulieren, dass es sich bei diesen Zellen um Radialglia oder Neurone handeln könnte.

Andererseits könnte es sich auch hierbei um unspezifische *in situ*-Signale handeln. Warum in diesem Zelltyp jedoch kein EGFP unter der Kontrolle des *gpr17a*-Promotors exprimiert wurde, konnte bisher nicht geklärt werden. Es ist jedoch möglich, dass dieser Zelltyp nicht detektiert wurde, weil die untersuchten Zebrafische nur eine transiente und keine stabile Expression von EGFP unter der Kontrolle des *gpr17a*-Promotors aufwiesen. Zusammenfassend weisen die Ergebnisse darauf hin, dass die runden bis multipolaren Zelltypen 1 und 2, in denen EGFP unter der Kontrolle des verwendeten *gpr17a*-Promotor-Konstruktes exprimiert wird, die gleichen Zellen darstellen, die bei der *in situ* Hybridisierung im Bereich der Bodenplatte (Gruppe 1) und dorsal des pMNs (Gruppe 2) detektiert wurden. Demzufolge wurden im Weiteren diese *gpr17a*-exprimierenden Zellen schließlich als Zelltyp 1 (Gruppe 1, Bodenplatte) und Zelltyp 2 (Gruppe 2, dorsal des pMNs) bezeichnet.

5.4.2 Lokalisierung von *gpr17a* in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen

Im Maus- und Rattenmodell konnte eine Expression von *gpr17* insbesondere in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen nachgewiesen werden (Lecca et al., 2008; Chen et al., 2009; Boda et al., 2011; Fumagalli et al., 2011). Im Zebrafisch war es zunächst auffällig, dass die *gpr17a*-Signale der Zelltypen 1 und 2 nach der *in situ* Hybridisierung zum Zeitpunkt 24 hpf noch sehr schwach waren und schließlich nach 48 hpf und 72 hpf viel deutlicher detektiert werden konnten. Weiterhin wurde erst nach 3,5 dpf mittels RT-qPCR ein deutlicher Expressionsanstieg von *gpr17a* im Zebrafisch detektiert. Diese Ergebnisse gaben ergänzend zu der beschriebenen Beeinflussung der Oligodendrogenese durch *gpr17a*, der Lokalisierung der *gpr17a*-Signale im Bereich der Bodenplatte und dorsal des pMNs und der möglichen Co-Expression von *gpr17a* und *olig2* in den Zelltypen 1-3 erste Hinweise darauf, dass Gpr17a in einem Zelltyp exprimiert wird, der sich im Zebrafisch zwischen 24 hpf und 4 dpf differenziert, wie es für Olig2-positive Oligodendrozyten-Vorläuferzellen gezeigt wurde (Park et al., 2002; Takada und Appel, 2010; Chung et al., 2011).

In einem weiterführenden Experiment konnten bei der *in situ* Hybridisierung gegen *gpr17a* in 3 Tage alten Zebrafischembryonen nach der Behandlung mit Trichostatin A (TSA) von 36 hpf bis 3 dpf nur wenige *gpr17a*-Signale im Bereich der Bodenplatte und keine Signale dorsal des pMNs detektiert werden. TSA blockiert die Histon-Deacetylase-Aktivität, die für die Entwicklung der Oligodendrozyten notwendig ist (Marin-Husstege et al., 2002; Cunliffe und Casaccia-Bonnel, 2006). Gleichzeitig führte die Behandlung der Zebrafisch-Embryonen mit TSA zu einer nahezu vollständigen Abwesenheit der relativen *mbpa*-Expression (Reduktion

um 99,996%), wie es zuvor von Takada und Appel (2010) gezeigt wurde. Das Expressionslevel von *plp1b* fiel nach der Behandlung mit TSA ebenfalls um 78,4% ab. Die Expression von *gpr17a* wurde um 37,1% reduziert. Dies zeigt zunächst nur, dass *gpr17a* zum Teil in Zellen exprimiert wird, für deren Entwicklung die Histon-Deacetylase-Aktivität benötigt wird. Die Histon-Deacetylase sorgt dafür, dass die DNA an einer bestimmten Stelle deacetyliert wird, um die Transkription bestimmter Gene, die für die Bildung des in diesem Fall *gpr17a*-exprimierenden Zelltyps verantwortlich sind, zu beeinflussen. Des weiteren zeigten Takada und Appel (2010), dass die Behandlung der Zebrafisch-Embryonen mit TSA dazu führt, dass die Olig2-positiven Oligodendrozyten-Vorläuferzellen undifferenziert im Bereich des ventralen Rückenmarks verbleiben und nicht zu dorsal migrierenden Sox10⁺- und Olig2⁺-Oligodendrozyten-Vorläuferzellen und reifen *mbpa*-exprimierenden Oligodendrozyten differenzieren können. Die Anzahl und Verteilung von Motoneuronen und Radialglia blieb nach der Behandlung mit TSA hingegen gleich (Takada und Appel, 2010). Dies zeigt, dass es sich bei dem *gpr17a*-exprimierenden Zelltyp dorsal des pMNs, der nach der Behandlung mit TSA bei der *in situ* Hybridisierung gegen *gpr17a* fast nicht mehr detektiert wurde, weder um Motoneurone noch um Radialglia handeln kann. Außerdem traten nach der Behandlung mit TSA im Vergleich zur Kontrolle deutlich stärkere gleichmäßig verteilte *gpr17a*-Signale auf, die von der seitlichen Ansicht her auf Höhe des Notochords bzw. des horizontalen Myoseptums im Bereich jeder einzelnen Somitengrenze liegen. Da bisher nicht geklärt werden konnte, um welchen Zelltyp es sich bei diesen Signalen handelt, müssen weiterführende Experimente durchgeführt werden, um die Zunahme dieser *gpr17a*-Signalstärke nach TSA-Behandlung erklären zu können.

Die folgende Abbildung zeigt in einem zusammenfassenden Schema einen Großteil der bis hierhin diskutierten Ergebnisse dieser Arbeit (Abbildung 5.1).

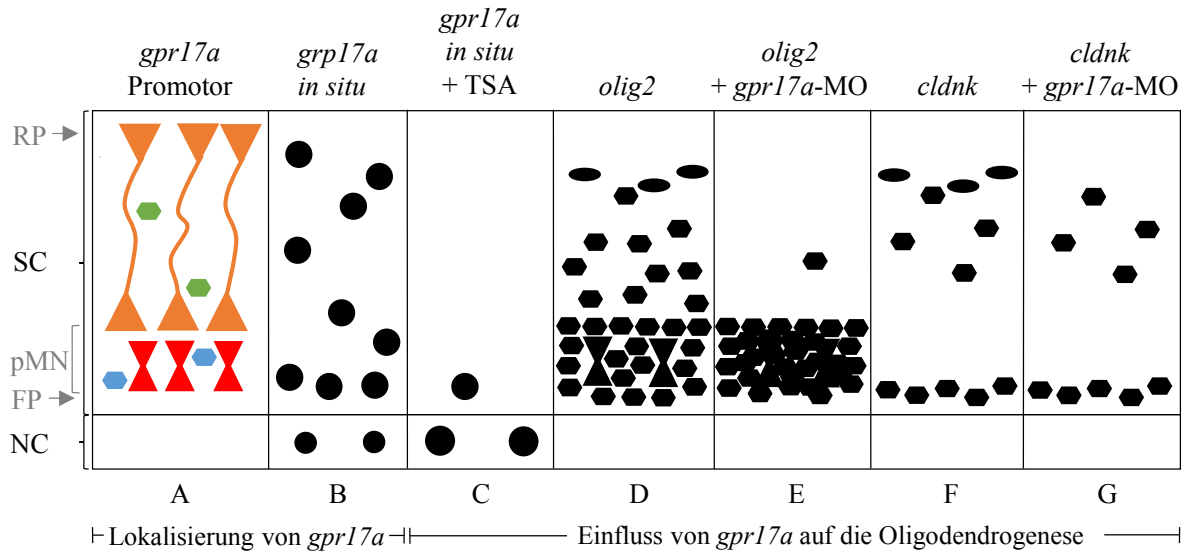


Abbildung 5.1: Zusammenfassendes Schema zur Lokalisierung von *gpr17a* im Zebrafisch und dessen Einfluss auf die Oligodendrogenese. A, Lokalisierung der vier Zelltypen, die *EGFP* unter der Kontrolle des potentiellen *gpr17a*-Promotors exprimieren (Zelltyp 1 (blau): multipolare Zellen im pMN, Zelltyp 2 (grün): multipolare Zellen im dorsalen Rückenmark, Zelltyp 3 (rot): Sanduhr-ähnliche Zellen, Zelltyp 4 (orange): Sanduhr-ähnliche Zellen); B/C, Lokalisierung der *gpr17a*-Signale nach der *in situ* Hybridisierung mit und ohne Behandlung mit TSA; D/E, Lokalisierung der verschiedenen *olig2:EGFP*-Zellen mit und ohne Injektion des *gpr17a*-Morpholinos (MO); F/G, Lokalisierung der verschiedenen *cldnk:EGFP*-Zellen mit und ohne Injektion des *gpr17a*-Morpholinos. SC: ‚spinalchord‘ – (dorsales) Rückenmark; NC: Notochord; RP: ‚roof plate‘ – Dachplatte; FP: ‚floor plate‘ – Bodenplatte; pMN: ‚primary motoneuron domain‘ - primäre neurale Progenitorzellen(domäne)

Um schlussendlich eindeutig zu zeigen, dass es sich bei den *gpr17a*-exprimierenden Zelltypen 1 und 2 definitiv um *Olig2*⁺-Oligodendrozyten-Vorläuferzellen handelt, wurden die Zellen von drei Tage alten Zebrafischembryonen der transgenen Zebrafischlinie *Tg(olig2:EGFP)* mithilfe der FACS-Analyse in *olig2:EGFP*-Zellen und *EGFP*-negative Zellen aufgetrennt. Anschließend wurde die isolierte RNA der *EGFP*-positiven und *EGFP*-negativen Zellen als Template für die RT-qPCR von *gpr17a* verwendet. Mithilfe dieses Experimentes konnte bewiesen werden, dass *gpr17a* sowohl in *Olig2*-positiven Zellen, als auch in *Olig2*-negativen Zellen des Zebrafisches exprimiert wird. Bei den *olig2:EGFP*-Zellen handelt es sich an Tag 3 nach der Befruchtung hauptsächlich um undifferenzierte, sich differenzierende und ein paar wenige reife Oligodendrozyten, da die Expression von *Olig2* in Motoneuronen, ventralen Interneuronen und Radialglia nach 36 hpf deutlich abnimmt und erst

an Tag 5 nach der Befruchtung ein Großteil der Olig2-positiven Zellen reife Oligodendrozyten sind (Park et al., 2002; Takada und Appel, 2010; Chung et al., 2011).

In dieser Arbeit konnte mittels RT-qPCR bestätigt werden, dass nach der TSA-Behandlung sowohl in den *olig2:EGFP*-Zellen, als auch in den *EGFP*-negativen Zellen kein *mbpa* exprimiert wurde. *Gpr17a* konnte jedoch auch nach der Behandlung mit TSA in den *olig2:EGFP*-Zellen sowie in den *EGFP*-negativen Zellen detektiert werden. Die Expression von *gpr17a* in den *olig2:EGFP*-Zellen nach TSA-Behandlung beweist nun endgültig die Expression von *gpr17a* in frühen Oligodendrozyten-Vorläuferzellen, die entweder undifferenziert sind oder bereits beginnen sich zu differenzieren, jedoch noch nicht dorsal des pMNs migrieren. Betrachtet man die relative Expression von *gpr17a* nach der Behandlung mit TSA im Vergleich zur unbehandelten Probe in allen Zellen des Zebrafisches, so war die Expression von *gpr17a* nach der Behandlung mit TSA nicht um 99%, wie bei *mbpa*, sondern nur um 37% reduziert. Diese Reduktion ist auf das Fehlen der dorsal migrierenden Olig2-positiven Oligodendrozyten-Vorläuferzellen zurückzuführen, während die undifferenzierten Olig2-positiven Oligodendrozyten-Vorläuferzellen im Bereich des pMNs sowie weitere nicht genau identifizierte Olig2-negative Zellen unabhängig von TSA weiterhin *gpr17a* exprimierten. Bei diesen Zellen könnte es sich beispielsweise um *gpr17a*-exprimierende Radialglia handeln, die zu diesem Zeitpunkt der Embryogenese kein Olig2 exprimieren und den hier beschriebenen Zelltyp 4 dorsal des pMNs widerspiegeln. Es wäre außerdem denkbar, dass es sich bei den Olig2-negative Zellen um Neurone handelt, die *gpr17a* exprimieren und die Oligodendrogenese nicht beeinflussen. Eine Expression von GPR17 in Neuronen der Maus wurde bereits von Ren et al. (2012, 2015) im Zusammenhang mit der Regulation der Nahrungsaufnahme detektiert. Des Weiteren beschrieben Lecca et al. (2008) sowie Ciana et al. (2006) die Expression von GPR17 in Neuronen der Maus. Auf der anderen Seite zeigten Chen et al. (2009), dass die GPR17-Expression in der Maus ausschließlich in den Zellen, die in die Oligodendrogenese involviert sind, vorzufinden ist.

Des Weiteren könnte es sich bei den *gpr17a*-exprimierenden Olig2-negativen Zellen um eine weitere Gruppe von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen handeln. März et al. (2010) beschrieben im Zebrafisch eine kleine Zellpopulation von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen, die den Marker Sox10 exprimierten, während die Expression von Olig2 ausblieb. Es wäre durchaus denkbar, dass diese Oligodendrozyten-Vorläuferzellen *gpr17a* exprimieren. Sollten sich unter den *olig2:EGFP*-Zellen von 3 Tage alten Zebrafischembryonen dennoch einige Olig2-positive Radialglia befunden haben (Park et al., 2007; Kim et al., 2008; März et al.,

2010), könnten diese Zellen möglicherweise *gpr17a* exprimieren und sich in dem in dieser Arbeit beschriebenen Zelltyp 3 widerspiegeln. Takada und Appel (2010) zeigten zwar, dass TSA die Anzahl und Verteilung von Radialglia nicht verändert, eine geringe Beeinflussung der Genexpression in diesen Zellen konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Interessant ist außerdem das leicht erhöhte Expressionslevel von *gpr17a* in den sortierten *olig2:EGFP*-Zellen nach der Behandlung mit TSA im Vergleich zu den unbehandelten Fischen. Wie die bisherigen Untersuchungen zeigten, sind unter den *olig2:EGFP*-Zellen der unbehandelten Fische sowohl Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (undifferenziert sowie differenzierend und migrierend) als auch reife Oligodendrozyten zu finden. Die Probe mit den *olig2:EGFP*-Zellen der mit TSA behandelten Fische enthielt hingegen nur frühe Oligodendrozyten-Vorläuferzellen des pMN-Bereiches und der Bodenplatte. Da nach dem Sorting für die qRT-PCR bei allen Proben jeweils die gleiche RNA-Menge eingesetzt wurde, könnte die erhöhte *gpr17a*-Expression in den *olig2:EGFP*-Zellen der mit TSA behandelten Fischen darauf zurückzuführen sein, dass die reifen Oligodendrozyten der unbehandelten Probe kein *gpr17a* exprimieren und somit der prozentuale Anteil *gpr17a*-exprimierender Zellen in der unbehandelten Probe geringer war als der in der mit TSA behandelten Probe. Dieses Ergebnis muss zukünftig mit weiteren Replikaten bestätigt werden. Es gibt jedoch einen Hinweis darauf, dass *gpr17a* auch im Zebrafisch eher nicht bzw. nur in sehr geringem Maße in reifen Oligodendrozyten exprimiert wird, was bereits für GPR17 in Nagetieren festgestellt wurde (Lecca et al., 2008; Fumagalli et al., 2011). Diesbezüglich zeigten bereits Lecca et al. (2008) eine nur sehr geringe Co-Lokalisation von GPR17 und MBP in der Maus. Zur Bestärkung dieser Hypothese zeigte auch die Mosaikexpression von *gpr17a:tdTomato* in der stabilen Zebrafischlinie *Tg(cldnk:GAL4,UAS:EGFP)* keine Lokalisation von *gpr17a* in reifen *Cldnk*-exprimierenden Oligodendrozyten. Mithilfe der Expression von *tdTomato* unter der Kontrolle des potentiellen *gpr17a*-Promotors konnten jedoch die gleichen vier Zelltypen (Zelltyp 1-4) wie bei der Expression von *EGFP* unter der Kontrolle des gleichen Promotors detektiert werden. Die Untersuchung der Mosaikexpression von *gpr17a:tdTomato* in der stabilen Zebrafischlinie *Tg(cldnk:GAL4,UAS:EGFP)* sind dennoch etwas mit Vorsicht zu betrachten, da neben den *EGFP⁺-cldnk*-Zellen auch einige *gpr17a*-exprimierende Zellen des Zelltyps 3 (Sanduhr-ähnlich) grün fluoreszierten (falsch-positive Signale), die in den bisherigen Untersuchungen nie als Claudin k-exprimierende Zellen identifiziert wurden. Folglich kam es hier zu einer falsch-positiven Gelbfärbung des Zelltyps 3 (falsch-positive Co-Lokalisation). Beides sind Hinweise darauf, dass es sich hierbei nicht um eine Co-

Lokalisation der Expression von *gpr17a:tdTomato* und *Tg(cldnk:GAL4,UAS:EGFP)* im Zelltyp 3 handelt. Die Ursache für dieses falsch-positive Ergebnis ist höchstwahrscheinlich die Tatsache, dass die Absorptionsspektren beider Fluoreszenzproteine zu nah beieinander liegen und sich die Emissionsspektren überlagern, sodass tdTomato bei der Wellenlänge, bei der EGFP angeregt wird, eine leichte grüne Fluoreszenz emittiert. Diese Untersuchungen müssen folglich in weiterführenden Experimenten optimiert werden.

Zusammenfassend beweisen die Ergebnisse dieser Arbeit eine Expression von *gpr17a* in Olig2-positiven Oligodendrozyten-Vorläuferzellen des Zebrafisches.

5.5 Ausblick

In dieser Arbeit wurde im Zebrafisch erstmals der G-Protein-gekoppelte Rezeptor Gpr17a und in Teilen auch das mögliche paraloge Protein Gpr17b mithilfe zahlreicher Methoden charakterisiert. Die Expression von Gpr17a in Oligodendrozyten-Vorläuferzellen im ZNS des Zebrafisches, sowie die Regulation der Myelin-assoziierten Gene *mbpa/b* und *plp1a/b* nach dem Knockdown von *gpr17a* weisen eindeutig darauf hin, dass Gpr17a im Zebrafisch die Oligodendrogenese positiv beeinflusst. Da die meisten demyelinisierenden Erkrankungen wie beispielsweise die Multiple Sklerose trotz zahlreicher Forschungsergebnisse nicht heilbar sind und alle Therapiemöglichkeiten nur ein Fortschreiten der Erkrankung verlangsamen, ist die intensive Grundlagenforschung auf diesem Gebiet unerlässlich. Im Folgenden werden einige weiterführende Fragestellungen erläutert, die im Hinblick auf die Ergebnisse dieser Arbeit in Zukunft gestellt werden können, um die Rolle von Gpr17a bei der Myelinisierung besser verstehen zu können.

Einfluss von Gpr17a auf die Myelinisierung im Zebrafisch

Um den in dieser Arbeit beschriebenen positiven Effekt von Gpr17a auf die Oligodendrogenese im Zebrafisch weiter zu untersuchen, wäre es sinnvoll einen Gpr17a-Knockout in verschiedenen transgenen Zebrafischlinien sowie im Wildtyp zu generieren und diese Fische mittels RT-qPCR und 2-Photonenmikroskopie auf die Expression verschiedener Myelin-assoziiierter Gene zu untersuchen.

Charakterisierung der *gpr17a*-exprimierenden Zelltypen

Des Weiteren wäre es wichtig, die in dieser Arbeit detektierten vier *gpr17a*-exprimierenden Zelltypen weiter zu charakterisieren. Dazu sollte zunächst die stabile transgene Zebrafischlinie *Tg(gpr17a:EGFP)* generiert werden, die schließlich EGFP unter der Kontrolle des potentiellen *gpr17a*-Promotors exprimieren würde. Im Zuge dessen, sollte auch der Promotorbereich von *gpr17a* näher eingegrenzt und verifiziert werden. Zur Verifizierung des *gpr17a*-Promotors könnte eine fluoreszente *in situ* Hybridisierung gegen *gpr17a* unter Verwendung der oben genannten Zebrafischlinie *Tg(gpr17a:EGFP)* dienen. Die Untersuchungen von transversalen Sektionen des Zebrafisches nach der *in situ* Hybridisierung gegen *gpr17a* könnten weitere Aufschlüsse zur Lokalisation der *gpr17a*-Signale geben. *Tg(gpr17a:EGFP)* könnte schließlich dazu dienen, mittels FACS-Analyse alle *gpr17a*-exprimierenden Zellen zu extrahieren und mittels RT-qPCR auf die Expression verschiedener spezifischer Marker, wie *mbpa* bzw. *mpz* für reife Oligodendrozyten oder *gfap* für Radialglia zu untersuchen. Durch die Verpaarung von *Tg(gpr17a:EGFP)* mit *Tg(olig2:DsRed2)* könnte die Co-Lokalisation beider Proteine in den Zelltypen 1,2 und 3 gezeigt werden. Außerdem wäre es wichtig zu untersuchen, ob es sich bei den Zelltypen 3 und 4 um *gpr17a*-exprimierende Radialglia handelt. Dies könnte mithilfe der stabilen Zebrafischlinie *Tg(gpr17a:EGFP)* und einer Antikörperfärbung gegen GFAP unter dem 2-Photonenmikroskop, einer Co-Lokalisationsstudie nach der Verpaarung von *Tg(gpr17a:EGFP)* mit *Tg(gfap:DsRed2)* oder durch Untersuchung der mittels FACS sortierten EGFP-positiven Zellen der Fischlinie *Tg(gfap:EGFP)* auf die Expression von *gpr17a* gezeigt werden. Zusätzlich könnte man eine fluoreszente *in situ* Hybridisierung gegen *gpr17a* unter Verwendung der oben genannten Zebrafischlinie *Tg(gfap:DsRed2)* etablieren.

Des Weiteren wäre es wichtig zu bestätigen, dass *gpr17a* im Zebrafisch nicht in reifen myelinisierenden Oligodendrozyten exprimiert wird. Hierfür könnten mittels FACS die EGFP-positiven Zellen der Zebrafischlinien *Tg(cldnk:GAL4,UAS:EGFP)*, *Tg(mbp:EGFP)^{ck1Tg}* (Jung et al., 2010) sowie *Tg(mpz[10kb]:EGFP)^{pt408Tg}* (Bai et al., 2014) mittels RT-qPCR auf die Expression von *gpr17a* untersucht werden. Auch Co-Lokalisationsstudien unter Verwendung dieser Zebrafischlinien mit der zu generierenden stabilen Zebrafischlinie *Tg(gpr17a:DsRed2)* wären aufschlussreich. Um den Differenzierungsstatus der ovalen und multipolaren Cldnk-positiven Zellen der Zebrafischlinien *Tg(cldnk:GAL4,UAS:EGFP)* genauer zu untersuchen, könnten

Antikörperfärbungen gegen Mbpa und/oder Mpz die reifen myelinisierenden Oligodendrozyten markieren.

Aktivierung des Gpr17a-Rezeptors durch MDL29,951

Es wäre sehr interessant, die Wirkung von MDL 29,951 auf den Gpr17a-Rezeptor des Zebrafisches weiter zu untersuchen. Diesbezüglich könnte mithilfe einer Mutagenese-PCR der Aminosäureaustausch S252N zusätzlich zu dem bereits untersuchten Aminosäureaustausch F256Y bei Gpr17a generiert werden, um anschließend die Wirkung von MDL29,951 auf den transient auf HEK 293-Zellen exprimierten mutierten Gpr17a-Rezeptor mittels Dynamischer Massenumverteilung testen zu können. Diese Untersuchungen könnten ebenfalls unter Verwendung der Zellkultur von PAC2-Zellen aus dem Zebrafisch etabliert werden. Des Weiteren wäre es interessant zu testen, welchen Einfluss das Inkubieren der transgenen Zebrafischlinien *Tg(olig2:EGFP)* und *Tg(cldnk:GAL4,UAS:EGFP)* in MDL29,951 auf die Anzahl, Morphologie und Lokalisierung der *EGFP⁺-olig2-* bzw. *EGFP⁺-cldnK-Zellen* hat (2-Photonenmikroskop). Diese Untersuchungen könnten folglich auch in Gpr17a-Knockout-Fischen durchgeführt werden.

Charakterisierung von Gpr17b

Gpr17b wurde in dieser Arbeit als potentiell paraloges Gen von *gpr17a* im Zebrafisch identifiziert. Die Expression in Herz, Auge und ZNS sowie die Herunterregulation der Expression von *gpr17b* nach dem Knockdown von *gpr17a* weisen auf einen Einfluss von Gpr17b auf die Oligodendrogenese hin, der zukünftig weiter untersucht werden sollte. Zunächst wäre es interessant zu erfahren, ob *gpr17b* in den mittels FACS sortierten Olig2-positiven beziehungsweise Cldnk-positiven Oligodendrozyten-Vorläuferzellen und / oder in reifen Oligodendrozyten exprimiert wird. Des Weiteren könnten durch eine *in situ* Hybridisierung Rückschlüsse auf die Lokalisation von Gpr17b im Zebrafisch geschlossen werden. Inwiefern Gpr17b die Oligodendrogenese im Zebrafisch beeinflusst, könnte mithilfe eines *gpr17b*-Knockdowns bzw. *gpr17b*-Knockouts und anschließender RT-qPCR untersucht werden. Zusätzliche Untersuchungen in den genannten Reporterfischen wären hier ebenfalls hilfreich.

6 Literaturverzeichnis

(2009) Go Fish! *Genesis* 47:spcone. doi: 10.1002/dvg.20525.

Abbracchio MP, Verderio C (2006) Pathophysiological roles of P2 receptors in glial cells. *Novartis Found Symp* 276:91-103; discussion 103-112, 275-181.

Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Knight GE, Fumagalli M, Gachet C, Jacobson KA, Weisman GA (2006) International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev* 58:281-341.

Ackerman SD, Garcia C, Piao X, Gutmann DH, Monk KR (2015) The adhesion GPCR Gpr56 regulates oligodendrocyte development via interactions with Galpha12/13 and RhoA. *Nature communications* 6:6122.

Almeida RG, Lyons DA (2015) Intersectional Gene Expression in Zebrafish Using the Split KalTA4 System. *Zebrafish* 12:377-386.

Almeida RG, Czopka T, Ffrench-Constant C, Lyons DA (2011) Individual axons regulate the myelinating potential of single oligodendrocytes in vivo. *Development* 138:4443-4450.

Avila RL, Tevlin BR, Lees JP, Inouye H, Kirschner DA (2007) Myelin structure and composition in zebrafish. *Neurochemical research* 32:197-209.

Bai Q, Parris RS, Burton EA (2014) Different mechanisms regulate expression of zebrafish myelin protein zero (P0) in myelinating oligodendrocytes and its induction following axonal injury. *The Journal of biological chemistry* 289:24114-24128.

Bai Q, Sun M, Stolz DB, Burton EA (2011) Major isoform of zebrafish P0 is a 23.5 kDa myelin glycoprotein expressed in selected white matter tracts of the central nervous system. *The Journal of comparative neurology* 519:1580-1596.

- Bläsius R, Weber RG, Lichter P, Ogilvie A (1998) A novel orphan G protein-coupled receptor primarily expressed in the brain is localized on human chromosomal band 2q21. *Journal of neurochemistry* 70:1357-1365.
- Boda E, Vigano F, Rosa P, Fumagalli M, Labat-Gest V, Tempia F, Abbracchio MP, Dimou L, Buffo A (2011) The GPR17 receptor in NG2 expressing cells: focus on in vivo cell maturation and participation in acute trauma and chronic damage. *Glia* 59:1958-1973.
- Bowman TV, Zon LI (2010) Swimming into the future of drug discovery: in vivo chemical screens in zebrafish. *ACS chemical biology* 5:159-161.
- Bradl M, Lassmann H (2010) Oligodendrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica* 119:37-53.
- Brösamle C, Halpern ME (2002) Characterization of myelination in the developing zebrafish. *Glia* 39:47-57.
- Burnstock G (2016) An introduction to the roles of purinergic signalling in neurodegeneration, neuroprotection and neuroregeneration. *Neuropharmacology* 104:4-17.
- Burnstock G, Knight GE (2004) Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int Rev Cytol* 240:31-304.
- Bustin SA et al. (2013) The need for transparency and good practices in the qPCR literature. *Nature methods* 10:1063-1067.
- Chang A, Tourtellotte WW, Rudick R, Trapp BD (2002) Premyelinating oligodendrocytes in chronic lesions of multiple sclerosis. *The New England journal of medicine* 346:165-173.
- Chang A, Staugaitis SM, Dutta R, Batt CE, Easley KE, Chomyk AM, Yong VW, Fox RJ, Kidd GJ, Trapp BD (2012) Cortical remyelination: a new target for repair therapies in multiple sclerosis. *Annals of neurology* 72:918-926.

- Chen X, Lou Q, He J, Yin Z (2011) Role of zebrafish *lhx2* in embryonic lateral line development. *PLoS one* 6:e29515.
- Chen Y, Wu H, Wang S, Koito H, Li J, Ye F, Hoang J, Escobar SS, Gow A, Arnett HA, Trapp BD, Karandikar NJ, Hsieh J, Lu QR (2009) The oligodendrocyte-specific G protein-coupled receptor GPR17 is a cell-intrinsic timer of myelination. *Nature neuroscience* 12:1398-1406.
- Chung AY, Kim S, Kim H, Bae YK, Park HC (2011) Microarray screening for genes involved in oligodendrocyte differentiation in the zebrafish CNS. *Exp Neurol* 20:85-91.
- Chung AY, Kim S, Kim E, Kim D, Jeong I, Cha YR, Bae YK, Park SW, Lee J, Park HC (2013) Indian hedgehog B function is required for the specification of oligodendrocyte progenitor cells in the zebrafish CNS. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33:1728-1733.
- Ciana P, Fumagalli M, Trincavelli ML, Verderio C, Rosa P, Lecca D, Ferrario S, Parravicini C, Capra V, Gelosa P, Guerrini U, Belcredito S, Cimino M, Sironi L, Tremoli E, Rovati GE, Martini C, Abbracchio MP (2006) The orphan receptor GPR17 identified as a new dual uracil nucleotides/cysteinyl-leukotrienes receptor. *The EMBO journal* 25:4615-4627.
- Collins JE, White S, Searle SM, Stemple DL (2012) Incorporating RNA-seq data into the zebrafish Ensembl genebuild. *Genome research* 22:2067-2078.
- Cunliffe VT, Casaccia-Bonnel P (2006) Histone deacetylase 1 is essential for oligodendrocyte specification in the zebrafish CNS. *Mechanisms of development* 123:24-30.
- D'Netto MJ, Ward H, Morrison KM, Ramagopalan SV, Dymment DA, DeLuca GC, Handunnetthi L, Sadovnick AD, Ebers GC (2009) Risk alleles for multiple sclerosis in multiplex families. *Neurology* 72:1984-1988.

- D'Rozario M, Monk KR, Petersen SC (2017) Analysis of myelinated axon formation in zebrafish. *Methods in cell biology* 138:383-414.
- Daniele S, Trincavelli ML, Fumagalli M, Zappelli E, Lecca D, Bonfanti E, Campiglia P, Abbracchio MP, Martini C (2014) Does GRK-beta arrestin machinery work as a "switch on" for GPR17-mediated activation of intracellular signaling pathways? *Cellular signalling* 26:1310-1325.
- Das A, Crump JG (2012) Bmps and id2a act upstream of Twist1 to restrict ectomesenchyme potential of the cranial neural crest. *PLoS genetics* 8:e1002710.
- Dougherty JD, Fomchenko EI, Akuffo AA, Schmidt E, Helmy KY, Bazzoli E, Brennan CW, Holland EC, Milosevic A (2012) Candidate pathways for promoting differentiation or quiescence of oligodendrocyte progenitor-like cells in glioma. *Cancer research* 72:4856-4868.
- Dutton KA, Pauliny A, Lopes SS, Elworthy S, Carney TJ, Rauch J, Geisler R, Haffter P, Kelsh RN (2001) Zebrafish colourless encodes sox10 and specifies non-ectomesenchymal neural crest fates. *Development* 128:4113-4125.
- Dyment DA, Ebers GC, Sadovnick AD (2004) Genetics of multiple sclerosis. *The Lancet Neurology* 3:104-110.
- Eberini I, Daniele S, Parravicini C, Sensi C, Trincavelli ML, Martini C, Abbracchio MP (2011) In silico identification of new ligands for GPR17: a promising therapeutic target for neurodegenerative diseases. *Journal of computer-aided molecular design* 25:743-752.
- Franklin RJ, Ffrench-Constant C (2008) Remyelination in the CNS: from biology to therapy. *Nature reviews Neuroscience* 9:839-855.
- Fratangeli A, Parmigiani E, Fumagalli M, Lecca D, Benfante R, Passafaro M, Buffo A, Abbracchio MP, Rosa P (2013) The regulated expression, intracellular trafficking and

- membrane recycling of the P2Y-like receptor GPR17 in Oli-neu oligodendroglial cells. *The Journal of biological chemistry*.
- Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG, Schioth HB (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Molecular pharmacology* 63:1256-1272.
- Fumagalli M, Lecca D, Abbracchio MP (2015) CNS remyelination as a novel reparative approach to neurodegenerative diseases: the roles of purinergic signalling and the P2Y-like receptor GPR17. *Neuropharmacology*.
- Fumagalli M, Daniele S, Lecca D, Lee PR, Parravicini C, Fields RD, Rosa P, Antonucci F, Verderio C, Trincavelli ML, Bramanti P, Martini C, Abbracchio MP (2011) Phenotypic changes, signaling pathway, and functional correlates of GPR17-expressing neural precursor cells during oligodendrocyte differentiation. *The Journal of biological chemistry* 286:10593-10604.
- Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF, 3rd (2013) ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in biotechnology* 31:397-405.
- Giera S, Deng Y, Luo R, Ackerman SD, Mogha A, Monk KR, Ying Y, Jeong SJ, Makinodan M, Bialas AR, Chang BS, Stevens B, Corfas G, Piao X (2015) The adhesion G protein-coupled receptor GPR56 is a cell-autonomous regulator of oligodendrocyte development. *Nature communications* 6:6121.
- Gilmour DT, Maischein HM, Nusslein-Volhard C (2002) Migration and function of a glial subtype in the vertebrate peripheral nervous system. *Neuron* 34:577-588.
- Glenn TD, Talbot WS (2013) Analysis of Gpr126 function defines distinct mechanisms controlling the initiation and maturation of myelin. *Development* 140:3167-3175.
- Goldshmit Y, Sztal TE, Jusuf PR, Hall TE, Nguyen-Chi M, Currie PD (2012) Fgf-dependent glial cell bridges facilitate spinal cord regeneration in zebrafish. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32:7477-7492.

- Gonsalvez D, Ferner AH, Peckham H, Murray SS, Xiao J (2015) The roles of extracellular related-kinases 1 and 2 signaling in CNS myelination. *Neuropharmacology*.
- Halpern ME, Rhee J, Goll MG, Akitake CM, Parsons M, Leach SD (2008) Gal4/UAS transgenic tools and their application to zebrafish. *Zebrafish* 5:97-110.
- Hans-Christoph Diener CW (2014) Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie " Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose". Deutsche Gesellschaft für Neurologie.
- Hansen T, Skytthe A, Stenager E, Petersen HC, Kyvik KO, Bronnum-Hansen H (2005) Risk for multiple sclerosis in dizygotic and monozygotic twins. *Multiple sclerosis* 11:500-503.
- Hartung HP, Aktas O (2011) Evolution of multiple sclerosis treatment: next generation therapies meet next generation efficacy criteria. *The Lancet Neurology* 10:293-295.
- Hashemian S, Ashrafzadeh F, Akhondian J, Beiraghi Toosi M (2015) Epstein-barr virus encephalitis: a case report. *Iran J Child Neurol* 9:107-110.
- Hennen S et al. (2013) Decoding signaling and function of the orphan G protein-coupled receptor GPR17 with a small-molecule agonist. *Science signaling* 6:ra93.
- Hines JH, Ravanelli AM, Schwindt R, Scott EK, Appel B (2015) Neuronal activity biases axon selection for myelination in vivo. *Nature neuroscience* 18:683-689.
- Hoffmann S, Vitzthum K, Mache S, Spallek M, Quarcoo D, Groneberg D, Uibel S (2009) Multiple Sklerose: Epidemiologie, Pathophysiologie, Diagnostik und Therapie. *Prakt Arbmed* 17:12-18.
- Horn F, Bettler E, Oliveira L, Campagne F, Cohen FE, Vriend G (2003) GPCRDB information system for G protein-coupled receptors. *Nucleic acids research* 31:294-297.

- Horn F, Weare J, Beukers MW, Horsch S, Bairoch A, Chen W, Edvardsen O, Campagne F, Vriend G (1998) GPCRDB: an information system for G protein-coupled receptors. *Nucleic acids research* 26:275-279.
- Howe K et al. (2013) The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496:498-503.
- Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A (2005) Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and immunity* 6:279-284.
- Hughes V (2012) Microglia: The constant gardeners. *Nature* 485:570-572.
- Jung SH, Kim S, Chung AY, Kim HT, So JH, Ryu J, Park HC, Kim CH (2010) Visualization of myelination in GFP-transgenic zebrafish. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 239:592-597.
- Kahana E (2000) Epidemiologic studies of multiple sclerosis: a review. *Biomed Pharmacother* 54:100-102.
- Kettenmann H, Verkhratsky A (2011) [Neuroglia--living nerve glue]. *Fortschr Neurol Psychiatr* 79:588-597.
- Kim H, Shin J, Kim S, Poling J, Park HC, Appel B (2008) Notch-regulated oligodendrocyte specification from radial glia in the spinal cord of zebrafish embryos. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 237:2081-2089.
- Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 203:253-310.
- Kirby BB, Takada N, Latimer AJ, Shin J, Carney TJ, Kelsh RN, Appel B (2006) In vivo time-lapse imaging shows dynamic oligodendrocyte progenitor behavior during zebrafish development. *Nature neuroscience* 9:1506-1511.

- Kondo T, Raff M (2000) The Id4 HLH protein and the timing of oligodendrocyte differentiation. *The EMBO journal* 19:1998-2007.
- Kondrychyn I, Teh C, Sin M, Korzh V (2013) Stretching morphogenesis of the roof plate and formation of the central canal. *PloS one* 8:e56219.
- Kucenas S, Snell H, Appel B (2008a) nkx2.2a promotes specification and differentiation of a myelinating subset of oligodendrocyte lineage cells in zebrafish. *Neuron glia biology* 4:71-81.
- Kucenas S, Takada N, Park HC, Woodruff E, Broadie K, Appel B (2008b) CNS-derived glia ensheath peripheral nerves and mediate motor root development. *Nature neuroscience* 11:143-151.
- Kurtzke JF (1991) Multiple sclerosis: changing times. *Neuroepidemiology* 10:1-8.
- Kuwabara S, Yuki N (2013) Axonal Guillain-Barre syndrome: concepts and controversies. *The Lancet Neurology* 12:1180-1188.
- Lecca D, Trincavelli ML, Gelosa P, Sironi L, Ciana P, Fumagalli M, Villa G, Verderio C, Grumelli C, Guerrini U, Tremoli E, Rosa P, Cuboni S, Martini C, Buffo A, Cimino M, Abbracchio MP (2008) The recently identified P2Y-like receptor GPR17 is a sensor of brain damage and a new target for brain repair. *PloS one* 3:e3579.
- Lees MB, Brostoff SW (1984) Proteins of myelin. In: *Myelin*, pp 197-224: Springer.
- Liebscher I, Schon J, Petersen SC, Fischer L, Auerbach N, Demberg LM, Mogha A, Coster M, Simon KU, Rothmund S, Monk KR, Schoneberg T (2014) A tethered agonist within the ectodomain activates the adhesion G protein-coupled receptors GPR126 and GPR133. *Cell reports* 9:2018-2026.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods* 25:402-408.
- Love S (2006) Demyelinating diseases. *Journal of clinical pathology* 59:1151-1159.

- Manoli M, Driever W (2012) Fluorescence-activated cell sorting (FACS) of fluorescently tagged cells from zebrafish larvae for RNA isolation. *Cold Spring Harbor protocols* 2012.
- Marin-Husstege M, Muggironi M, Liu A, Casaccia-Bonnel P (2002) Histone deacetylase activity is necessary for oligodendrocyte lineage progression. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22:10333-10345.
- Marschallinger J et al. (2015) Structural and functional rejuvenation of the aged brain by an approved anti-asthmatic drug. *Nature communications* 6:8466.
- März M, Schmidt R, Rastegar S, Strähle U (2010) Expression of the transcription factor Olig2 in proliferating cells in the adult zebrafish telencephalon. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 239:3336-3349.
- Meijer AH, Spaink HP (2011) Host-pathogen interactions made transparent with the zebrafish model. *Curr Drug Targets* 12:1000-1017.
- Meijer DH, Kane MF, Mehta S, Liu H, Harrington E, Taylor CM, Stiles CD, Rowitch DH (2012) Separated at birth? The functional and molecular divergence of OLIG1 and OLIG2. *Nature reviews Neuroscience* 13:819-831.
- Merkle FT, Tramontin AD, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2004) Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:17528-17532.
- Meyer A, Schartl M (1999) Gene and genome duplications in vertebrates: the one-to-four (-to-eight in fish) rule and the evolution of novel gene functions. *Current opinion in cell biology* 11:699-704.
- Miller NM, Wang J, Tan Y, Dittel BN (2015) Anti-inflammatory mechanisms of IFN-gamma studied in experimental autoimmune encephalomyelitis reveal neutrophils as a potential target in multiple sclerosis. *Frontiers in neuroscience* 9:287.

- Milo R, Kahana E (2010) Multiple sclerosis: geoeidemiology, genetics and the environment. *Autoimmunity reviews* 9:A387-394.
- Miron VE, Kuhlmann T, Antel JP (2011) Cells of the oligodendroglial lineage, myelination, and remyelination. *Biochimica et biophysica acta* 1812:184-193.
- Mitew S, Hay CM, Peckham H, Xiao J, Koenning M, Emery B (2013) Mechanisms regulating the development of oligodendrocytes and central nervous system myelin. *Neuroscience*.
- Mitew S, Hay CM, Peckham H, Xiao J, Koenning M, Emery B (2014) Mechanisms regulating the development of oligodendrocytes and central nervous system myelin. *Neuroscience* 276:29-47.
- Monk KR, Naylor SG, Glenn TD, Mercurio S, Perlin JR, Dominguez C, Moens CB, Talbot WS (2009) A G protein-coupled receptor is essential for Schwann cells to initiate myelination. *Science* 325:1402-1405.
- Morell P, Quarles R (1999) The Myelin Sheath. In: *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 6th edition. (Siegel GJ AB, Albers RW, et al., ed). Philadelphia: Lippincott-Raven.
- Morris JK, Willard BB, Yin X, Jeserich G, Kinter M, Trapp BD (2004) The 36K protein of zebrafish CNS myelin is a short-chain dehydrogenase. *Glia* 45:378-391.
- Münzel EJ, Becker CG, Becker T, Williams A (2014) Zebrafish regenerate full thickness optic nerve myelin after demyelination, but this fails with increasing age. *Acta Neuropathol Commun* 2:77.
- Münzel EJ, Schaefer K, Obirei B, Kremmer E, Burton EA, Kuscha V, Becker CG, Brösamle C, Williams A, Becker T (2012) Claudin k is specifically expressed in cells that form myelin during development of the nervous system and regeneration of the optic nerve in adult zebrafish. *Glia* 60:253-270.

- Nait-Oumesmar B, Picard-Riera N, Kerninon C, Baron-Van Evercooren A (2008) The role of SVZ-derived neural precursors in demyelinating diseases: from animal models to multiple sclerosis. *Journal of the neurological sciences* 265:26-31.
- Nave KA, Werner HB (2014) Myelination of the nervous system: mechanisms and functions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 30:503-533.
- Nawaz S, Schweitzer J, Jahn O, Werner HB (2013) Molecular evolution of myelin basic protein, an abundant structural myelin component. *Glia* 61:1364-1377.
- Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG (2000) Multiple sclerosis. *The New England journal of medicine* 343:938-952.
- Oppermann U, Filling C, Hult M, Shafqat N, Wu X, Lindh M, Shafqat J, Nordling E, Kallberg Y, Persson B, Jornvall H (2003) Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update. *Chemico-biological interactions* 143-144:247-253.
- Park HC, Shin J, Appel B (2004) Spatial and temporal regulation of ventral spinal cord precursor specification by Hedgehog signaling. *Development* 131:5959-5969.
- Park HC, Mehta A, Richardson JS, Appel B (2002) *olig2* is required for zebrafish primary motor neuron and oligodendrocyte development. *Developmental biology* 248:356-368.
- Park HC, Shin J, Roberts RK, Appel B (2007) An *olig2* reporter gene marks oligodendrocyte precursors in the postembryonic spinal cord of zebrafish. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 236:3402-3407.
- Parravicini C, Ranghino G, Abbracchio MP, Fantucci P (2008) GPR17: molecular modeling and dynamics studies of the 3-D structure and purinergic ligand binding features in comparison with P2Y receptors. *BMC bioinformatics* 9:263.
- Parravicini C, Abbracchio MP, Fantucci P, Ranghino G (2010) Forced unbinding of GPR17 ligands from wild type and R255I mutant receptor models through a computational approach. *BMC structural biology* 10:8.

- Petersen G, Wittmann R, Arndt V, Göppfarth D (2014) Epidemiologie der Multiplen Sklerose in Deutschland. *Der Nervenarzt* 85:990-998.
- Petersen SC, Luo R, Liebscher I, Giera S, Jeong SJ, Mogha A, Ghidinelli M, Feltri ML, Schoneberg T, Piao X, Monk KR (2015) The adhesion GPCR GPR126 has distinct, domain-dependent functions in Schwann cell development mediated by interaction with laminin-211. *Neuron* 85:755-769.
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* 29:e45.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic acids research* 30:e36.
- Pinto-Teixeira F, Muzzopappa M, Swoger J, Mineo A, Sharpe J, Lopez-Schier H (2013) Intravital imaging of hair-cell development and regeneration in the zebrafish. *Front Neuroanat* 7:33.
- Poliak S, Peles E (2003) The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier. *Nature reviews Neuroscience* 4:968-980.
- Postlethwait J, Amores A, Force A, Yan YL (1999) The zebrafish genome. *Methods in cell biology* 60:149-163.
- Prendergast A, Linbo TH, Swarts T, Ungos JM, McGraw HF, Krispin S, Weinstein BM, Raible DW (2012) The metalloproteinase inhibitor Reck is essential for zebrafish DRG development. *Development* 139:1141-1152.
- Raport CJ, Schweickart VL, Chantry D, Eddy RL, Jr., Shows TB, Godiska R, Gray PW (1996) New members of the chemokine receptor gene family. *Journal of leukocyte biology* 59:18-23.
- Ravanelli AM, Appel B (2015) Motor neurons and oligodendrocytes arise from distinct cell lineages by progenitor recruitment. *Genes & development* 29:2504-2515.

- Rembold M, Lahiri K, Foulkes NS, Wittbrodt J (2006) Transgenesis in fish: efficient selection of transgenic fish by co-injection with a fluorescent reporter construct. *Nature protocols* 1:1133-1139.
- Ren H, Cook JR, Kon N, Accili D (2015) Gpr17 in AgRP Neurons Regulates Feeding and Sensitivity to Insulin and Leptin. *Diabetes* 64:3670-3679.
- Ren H, Orozco IJ, Su Y, Suyama S, Gutierrez-Juarez R, Horvath TL, Wardlaw SL, Plum L, Arancio O, Accili D (2012) FoxO1 target Gpr17 activates AgRP neurons to regulate food intake. *Cell* 149:1314-1326.
- Rennekamp AJ, Peterson RT (2015) 15 years of zebrafish chemical screening. *Curr Opin Chem Biol* 24:58-70.
- Rowitch DH (2004) Glial specification in the vertebrate neural tube. *Nature reviews Neuroscience* 5:409-419.
- Rowitch DH, Kriegstein AR (2010) Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature* 468:214-222.
- Samanta J, Kessler JA (2004) Interactions between ID and OLIG proteins mediate the inhibitory effects of BMP4 on oligodendroglial differentiation. *Development* 131:4131-4142.
- Sawcer S et al. (2011) Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* 476:214-219.
- Schaefer K, Brösamle C (2009) Zwilling-A and -B, two related myelin proteins of teleosts, which originate from a single bicistronic transcript. *Molecular biology and evolution* 26:495-499.
- Schebesta M, Serluca FC (2009) olig1 Expression identifies developing oligodendrocytes in zebrafish and requires hedgehog and notch signaling. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 238:887-898.

- Schrage R, De Min A, Hochheiser K, Kostenis E, Mohr K (2015) Superagonism at G protein-coupled receptors and beyond. *British journal of pharmacology*.
- Schulte-Merker S, Stainier DY (2014) Out with the old, in with the new: reassessing morpholino knockdowns in light of genome editing technology. *Development* 141:3103-3104.
- Schweitzer J, Becker T, Schachner M, Nave KA, Werner H (2006) Evolution of myelin proteolipid proteins: gene duplication in teleosts and expression pattern divergence. *Molecular and cellular neurosciences* 31:161-177.
- Shen S, Sandoval J, Swiss VA, Li J, Dupree J, Franklin RJ, Casaccia-Bonnel P (2008) Age-dependent epigenetic control of differentiation inhibitors is critical for remyelination efficiency. *Nature neuroscience* 11:1024-1034.
- Sherman DL, Brophy PJ (2005) Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. *Nature reviews Neuroscience* 6:683-690.
- Shi W, Fang Z, Li L, Luo L (2015) Using zebrafish as the model organism to understand organ regeneration. *Science China Life sciences* 58:343-351.
- Shin J, Park HC, Topczewska JM, Mawdsley DJ, Appel B (2003) Neural cell fate analysis in zebrafish using olig2 BAC transgenics. *Methods in cell science : an official journal of the Society for In Vitro Biology* 25:7-14.
- Simon K, Hennen S, Merten N, Blattermann S, Gillard M, Kostenis E, Gomeza J (2016) The Orphan G Protein-coupled Receptor GPR17 Negatively Regulates Oligodendrocyte Differentiation via Galphai/o and Its Downstream Effector Molecules. *The Journal of biological chemistry* 291:705-718.
- Simon K, Merten N, Schroder R, Hennen S, Preis P, Schmitt NK, Peters L, Schrage R, Vermeiren C, Gillard M, Mohr K, Gomeza J, Kostenis E (2017) The Orphan Receptor GPR17 Is Unresponsive to Uracil Nucleotides and Cysteinyl Leukotrienes. *Molecular pharmacology* 91:518-532.

- Snow DM, Steindler DA, Silver J (1990) Molecular and cellular characterization of the glial roof plate of the spinal cord and optic tectum: a possible role for a proteoglycan in the development of an axon barrier. *Developmental biology* 138:359-376.
- Takada N, Appel B (2010) Identification of genes expressed by zebrafish oligodendrocytes using a differential microarray screen. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 239:2041-2047.
- Thermes V, Grabher C, Ristoratore F, Bourrat F, Choulika A, Wittbrodt J, Joly JS (2002) I-SceI meganuclease mediates highly efficient transgenesis in fish. *Mechanisms of development* 118:91-98.
- Thisse C, Thisse B (2008) High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nature protocols* 3:59-69.
- Trapp BD, Nave KA (2008) Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? *Annual review of neuroscience* 31:247-269.
- Vajn K, Plunkett JA, Tapanes-Castillo A, Oudega M (2013) Axonal regeneration after spinal cord injury in zebrafish and mammals: differences, similarities, translation. *Neuroscience bulletin* 29:402-410.
- Van Houcke J, De Groef L, Dekeyster E, Moons L (2015) The zebrafish as a gerontology model in nervous system aging, disease, and repair. *Ageing Res Rev* 24:358-368.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology* 3:RESEARCH0034.
- Vanhouwaert S, Van Peer G, Rihani A, Janssens E, Rondou P, Lefever S, De Paepe A, Coucke PJ, Speleman F, Vandesompele J, Willaert A (2014) Expressed Repeat Elements Improve RT-qPCR Normalization across a Wide Range of Zebrafish Gene Expression Studies. *PloS one* 9:e109091.

- Venkatakrishnan AJ, Deupi X, Lebon G, Tate CG, Schertler GF, Babu MM (2013) Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature* 494:185-194.
- Verkhatsky A, Krishtal OA, Burnstock G (2009) Purinoceptors on neuroglia. *Mol Neurobiol* 39:190-208.
- Wain HM, Bruford EA, Lovering RC, Lush MJ, Wright MW, Povey S (2002) Guidelines for human gene nomenclature. *Genomics* 79:464-470.
- Wang S, Sdrulla A, Johnson JE, Yokota Y, Barres BA (2001) A role for the helix-loop-helix protein Id2 in the control of oligodendrocyte development. *Neuron* 29:603-614.
- Wegener A, Deboux C, Bachelin C, Frah M, Kerninon C, Seilhean D, Weider M, Wegner M, Nait-Oumesmar B (2015) Gain of Olig2 function in oligodendrocyte progenitors promotes remyelination. *Brain : a journal of neurology* 138:120-135.
- Westerfield M (2007) *The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)* 5th Edition. Univ of Oregon Press, Eugene.
- Willison HJ, Jacobs BC, van Doorn PA (2016) Guillain-Barre syndrome. *Lancet*.
- Yoshida M, Macklin WB (2005) Oligodendrocyte development and myelination in GFP-transgenic zebrafish. *Journal of neuroscience research* 81:1-8.
- Zannino DA, Appel B (2009) Olig2+ precursors produce abducens motor neurons and oligodendrocytes in the zebrafish hindbrain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:2322-2333.

7 Anhang

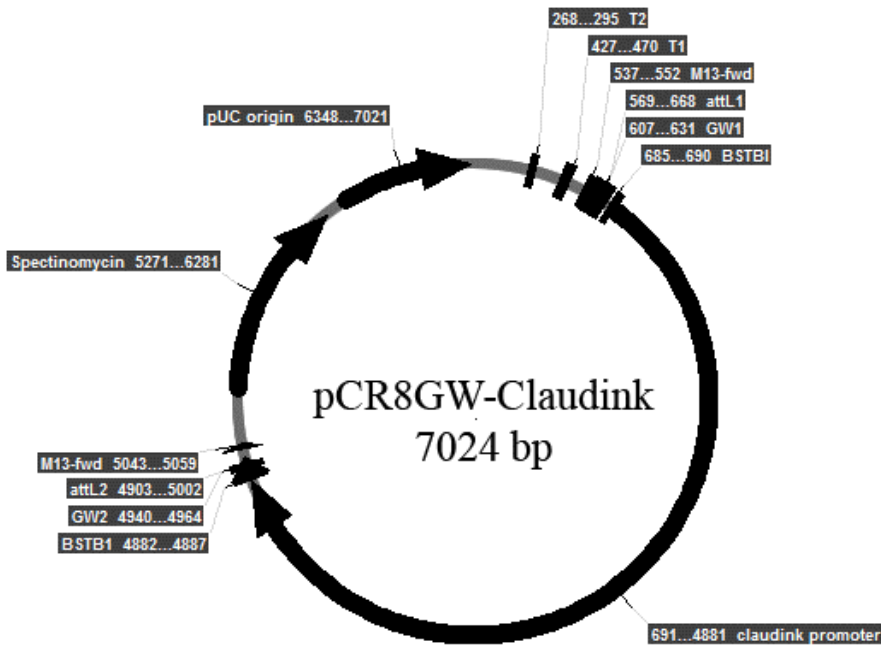


Abbildung A1: Plasmidkarte von pCR8GW-Claudink (Münzel et al., 2012).

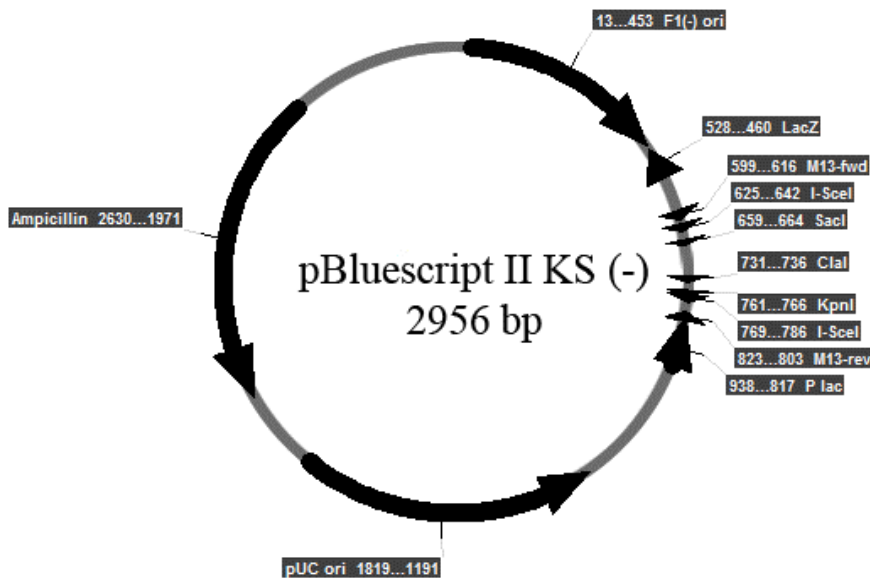


Abbildung A2: Plasmidkarte von pBluescript II KS (-) mit den Schnittstellen I-SceI (AG Odermatt)

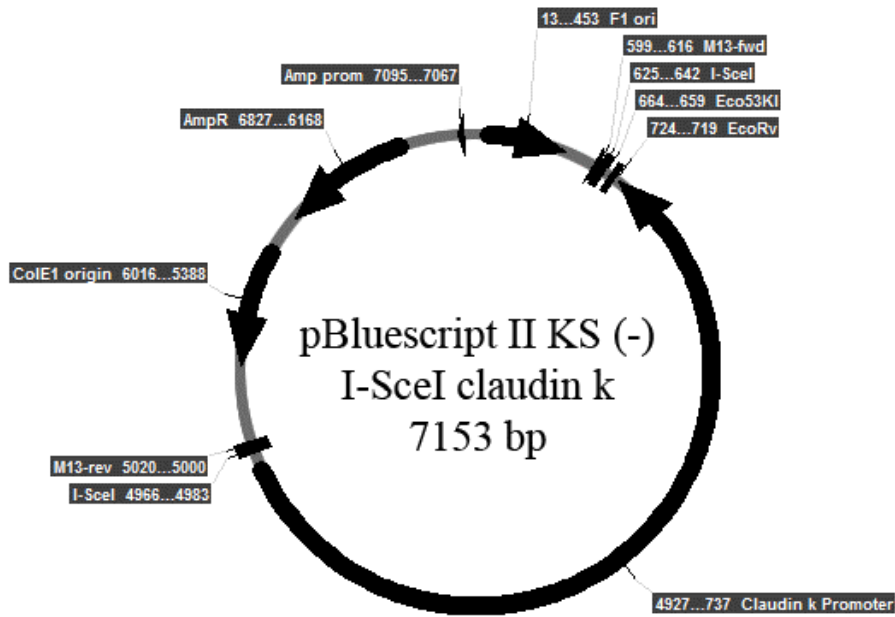


Abbildung A3: Plasmidkarte von pBluescript II KS (-) mit den Schnittstellen I-SceI und dem *claudin k* Promotor.

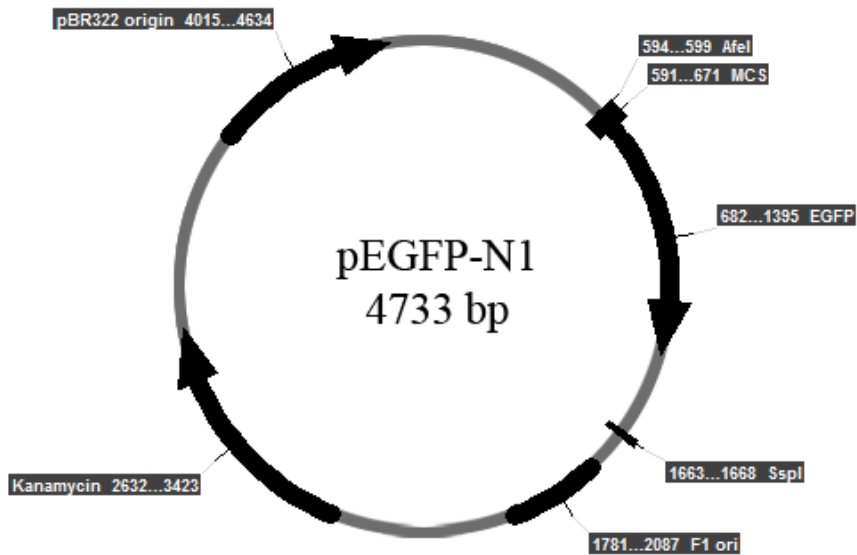


Abbildung A4: Plasmidkarte von pEGFP-N1.

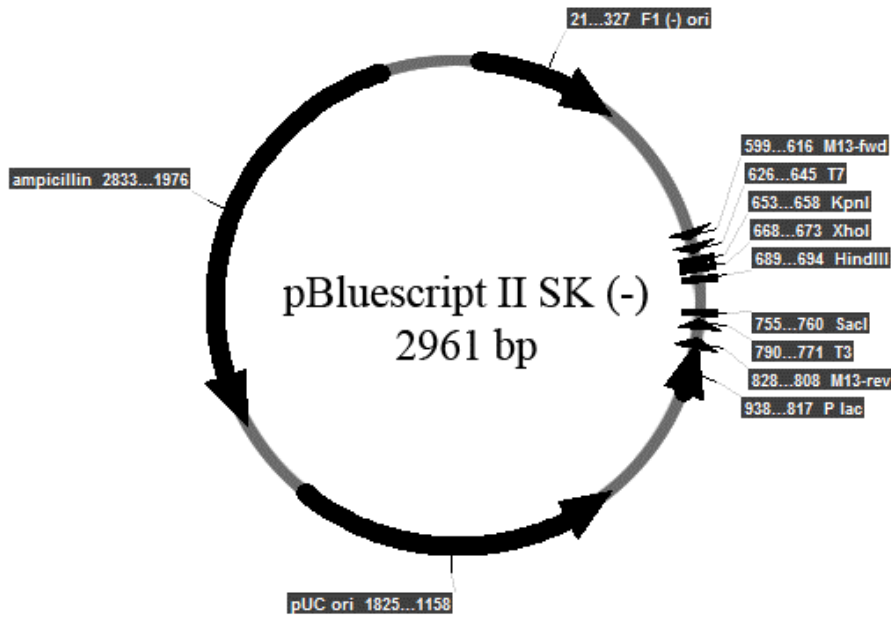


Abbildung A5: Plasmidkarte von pBluescript II SK (-).

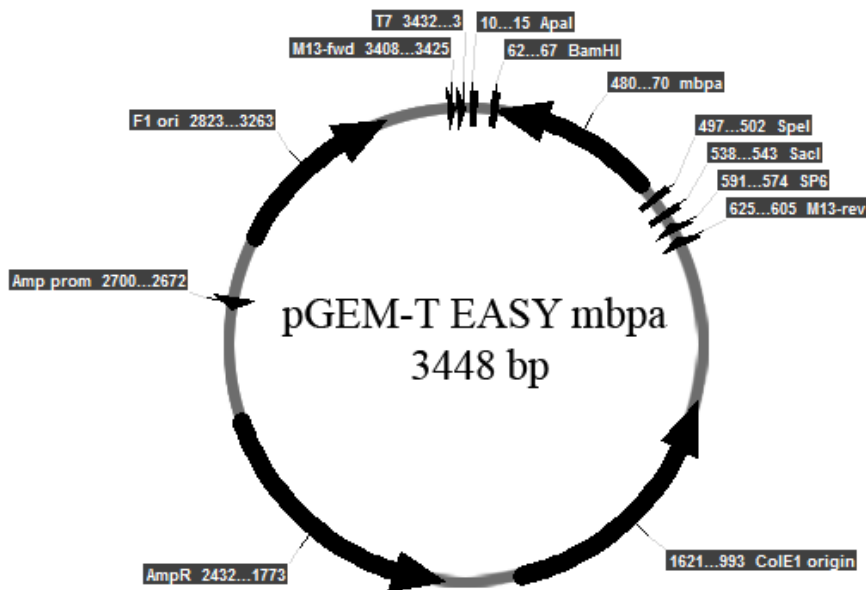


Abbildung A6: Plasmidkarte von pGEM-T EASY mbpa (Nawaz et al., 2013).

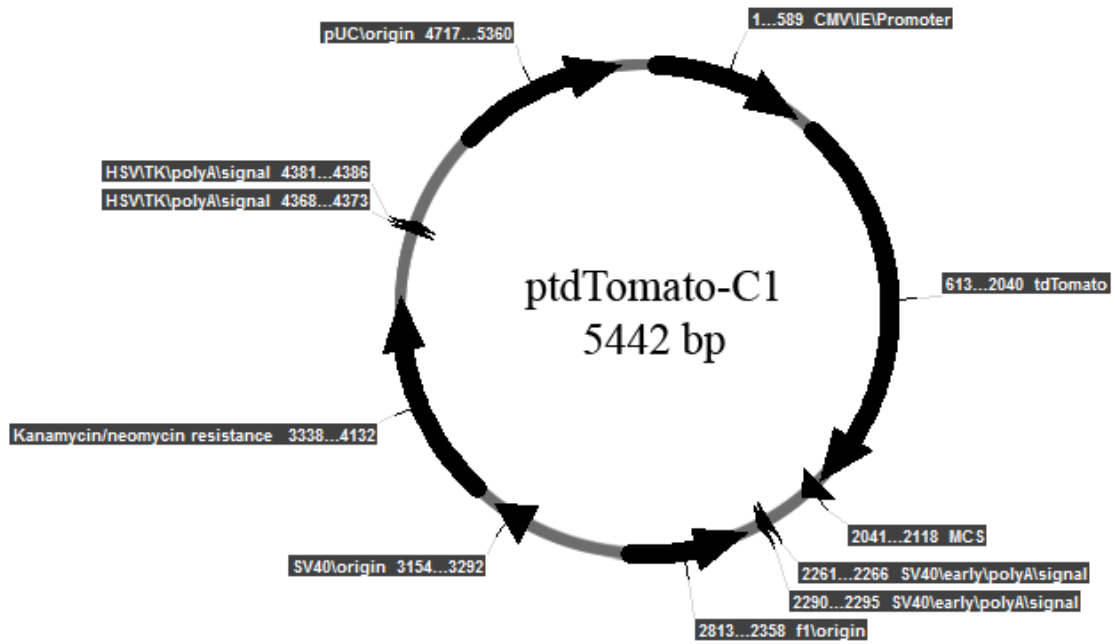


Abbildung A7: Plasmidkarte von ptdTomato-C1.

8 Publikationen

Veröffentlichungen in referierten Zeitschriften

Die Veröffentlichung zum Thema dieser Arbeit befindet sich in der Vorbereitung.

Poster

Kleinert, H., Reinoß, P., Liu, C., Odermatt, B.: “Characterization of Gpr17 in zebrafish and its influence on CNS myelination.”, 19.-21.02.2015, Myelin-Netzwerk e.V. - Current Topics in Myelin Research.