

Der Zebrafisch als Modellorganismus kongenitaler Muskeldystrophien am Beispiel der Protein-O-Mannosyltransferase 1-Defizienz

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Nick Lenzen

aus Troisdorf

2025

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Benjamin Odermatt
2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. MUDr. Valentin S. Schäfer

Tag der Mündlichen Prüfung: 13.08.2025

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie

Ich widme diese Dissertation meinen Eltern

Birgit & Dietmar.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	9
1.1 Aufbau und Funktion der Skelettmuskulatur	9
1.2 Dystrophin-Glykoprotein-Komplex (DGC)	13
1.3 Die Funktion der Protein-O-Mannosyltransferase-I (Pomt1)	16
1.4 Dystroglykanopathien am Beispiel des Walker-Warburg-Syndroms	18
1.5 Der Zebrafisch als Muskel-Modellorganismus.....	22
1.6 Ziele dieser Arbeit	26
2. Material und Methoden	27
2.1 Materialien.....	27
2.1.1 Antikörper	27
2.1.2 Oligonukleotide	28
2.1.3 Fischlinien	29
2.1.5 Pufferlösung	31
2.1.6 Mikroskopie und Laborausstattung	33
2.1.7 Software	34
2.2 Methoden	35
2.2.1 Fischhaltung und Aufzucht	35
2.2.2 Mikroinjektion von Morpholino-Oligonukleotiden	35
2.2.3 Western-Blot	36
2.2.4 Semidünnschnitt-Lichtmikroskopie	37
2.2.5 Transmissionselektronenmikroskopie	37
2.2.6 Immunfluoreszenzmikroskopie	38
2.2.7 Hellfeldmikroskopie	39

3. Ergebnisse	40
3.1 Expression von Pomt1 im Zebrafisch	40
3.2 Strukturelle Effekte des Pomt1-Morpholino auf die Skelettmuskulatur	41
3.3 Ultrastrukturelle Analyse der Zebrafisch-Skelettmuskulatur	51
4. Diskussion	59
4.1 Diskussion von Material und Methoden	60
4.2 Diskussion der Ergebnisse	66
4.3 Klinische Schlussfolgerung	70
4.4 Wissenschaftliche Schlussfolgerung	71
5. Zusammenfassung	72
6. Abbildungsverzeichnis	73
7. Tabellenverzeichnis	75
8. Literaturverzeichnis	76
9. Erklärung zum Eigenanteil	81
10. Danksagung	82

Abkürzungsverzeichnis

α -DG	α -Dystroglycan
ATP	Adenosintriphosphat
β -DG	β -Dystroglycan
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca^{2+}	Calcium
DGC	Dystrophin-Glykoprotein-Complex
dest.	destilliertes
dpf	days post fertilization (Tage nach Befruchtung)
EM	Elektronenmikroskop
ER	endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCMD	Fukuyama congenital muscle dystrophy
FKRP	fukutin related protein
H_2O	Wasser
HE	Hämatoxylin-Eosin
hpf	hours post fertilization
IFM	Immunfluoreszenzmikroskopie
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
MEB	muscle-eye-brain-disease
MgSO_4	Magnesiumsulfat
MO	Morpholino-Oligonukleotid
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
M.	musculus
MS-222	Tricainmesylat
NaCl	Natriumchlorid
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat

NGS	normal goat serum
NO ₃	Nitrat
OH	Hydroxid
PBS	Phosphate buffered saline
PBST	Phosphate buffered saline mit Tween-20
PFA	Paraformaldehyd
PomGnT1	Protein O-Mannose beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase 1
Pomt1	Protein-O-Mannosyltransferase-I
Pomt2	Protein-O-Mannosyltransferase-II
PTU	1-phenyl 2-thiourea
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
sa	secondary antibody
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SERCA	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
TBS	Tris-buffered saline
TBST	Tris-buffered saline mit Tween-20
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
UI	uninjiziert
WB	Western-Blot
WT	Wildtyp
WWS	Walker-Warburg-Syndrom
ZF	Zebrafisch
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Aufbau und Funktion der Skelettmuskulatur

Die Skelettmuskulatur gehört neben der Herzmuskulatur und glatten Muskulatur zu den Muskelgeweben. Zusammen mit den Binde- und Stützgeweben bildet sie den Bewegungsapparat des Organismus und befähigt diesen durch die Verkürzung seiner Komponenten zur aktiven Bewegung. Im Menschen nimmt sie ca. 40% der Gesamtkörpermasse ein und enthält etwa 50-75 % der Proteine des Körpers. Neben der Umwandlung von chemischer in mechanische Energie, dient die Skelettmuskulatur ebenfalls als Energie- und Proteinspeicher sowie als Wärmeproduzent (Frontera und Ochala, 2014). Eine verminderte Muskelmasse führt so zu einer eingeschränkten Fähigkeit des Körpers auf Stress oder Krankheiten zu reagieren (Wolfe, 2006).

Bei der Skelettmuskulatur handelt es sich um ein postmitotisches Gewebe, bei dem während der Embryogenese aktive Myoblasten aus mesenchymalen Vorläuferzellen entstehen. Die Myoblasten fusionieren daraufhin untereinander zu länglichen Myotuben und bilden somit multinukleäre Synzytien, die Myozyten, aus (Chal und Pourquie, 2017). Innerhalb des Muskels sind die Myozyten in länglichen Fasern angeordnet und in Bündeln organisiert. Jede Muskelfaser besitzt eine eigene Basalmembran und ist im Endomysium, einem lockeren kollagenen Bindegewebe, eingebettet. Die Bündel werden vom Perimysium umgeben und als Ganzes ist der Muskel ebenfalls von lockerem kollagenem Bindegewebe, dem Epimysium, umhüllt, welches den Muskel zusammen mit der straffen Faszie in das umliegende Gewebe integriert (Lüllmann-Rauch, 2015).

Wachstum und Regeneration des Muskelsynzytiums erfolgen durch Satellitenzellen. Dies sind adulte Stammzellen des Muskelgewebes, die der Basalmembran der Muskelfaser dicht anliegen (Mauro, 1961), durch myogene Wachstumsfaktoren oder mechanischen Stress aktiviert werden, sich daraufhin mitotisch teilen und mit der Muskelfaser fusionieren (Dumont et al., 2015). Einen schematischen Überblick über den makroskopischen Aufbau eines Muskels illustriert Abbildung 1.

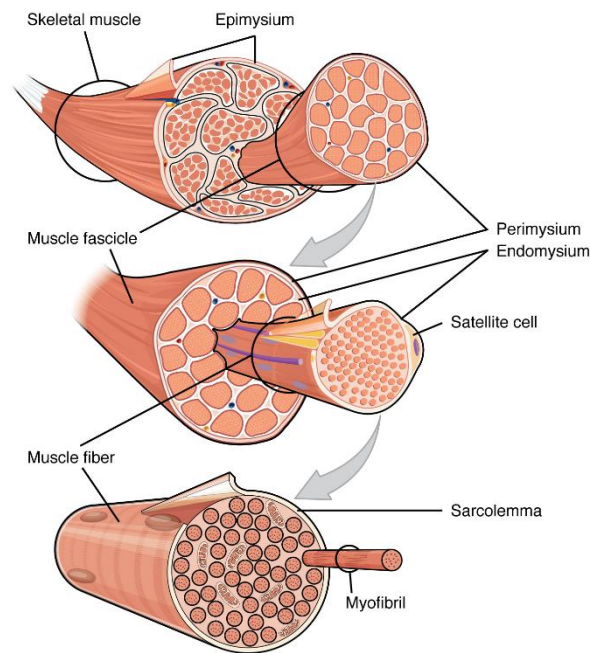


Abb. 1: Schematische Darstellung des makroskopischen Aufbaus eines Skelettmuskels. Nach Entfernung der Faszie wird der Muskel von einer feinen bindegewebigen Membran umhüllt, dem Epimysium. Innerhalb des Muskels sind die Muskelfasern (muscle fibers) in Bündeln (muscle fascicles) organisiert. Zwischen den Bündeln liegt das lockere perimysiale Bindegewebe. Die Muskelfasern sind eingebettet im Endomysium, in dem sich ebenfalls die Satellitenzellen befinden. Jede Muskelfaser wird von einer eigenen Basalmembran umhüllt. Das Sarcolemma entspricht der Plasmamembran der Skelettmuskulatur und definiert den intrazellulären Raum mit den länglich angeordneten Myofibrillen. ("The Three Connective Tissue Layers" von Openstax, lizenziert unter CC BY 4.0)

Dicht unterhalb der Plasmamembran (Sarkolemm) der Muskelfaser befinden sich die ovalen Zellkerne, die jeweils in einem bestimmten Bereich, die nukleäre Domäne, für die Proteinexpression zuständig sind (Hikida, 2011). Der Hauptteil der Muskelfaser wird von den länglich angeordneten Myofibrillen eingenommen, die die zentrale Baueinheit des Myozyten darstellen und sich hauptsächlich aus den zwei Myofilamenten Aktin und Myosin zusammensetzen. Angrenzend an die Myofibrillen liegen die zahlreichen Mitochondrien, die für die Bereitstellung von ATP und als Calcium-Speicher dienen sowie das sarkoplasmatische Retikulum (SR), welches als feines Maschenwerk die Myofibrillen ummantelt. Das SR stellt ein auf die Bedürfnisse der Muskelzelle adaptiertes endoplasmatisches Retikulum (ER) dar, welches hier vor allem die Funktion eines

Calcium-Speichers erfüllt und einen integralen Bestandteil der elektromechanischen Kopplung darstellt (Details s.u.). Die Organisation der zytoplasmatischen Organellen der Skelettmuskelzelle ist in Abbildung 2 veranschaulicht.

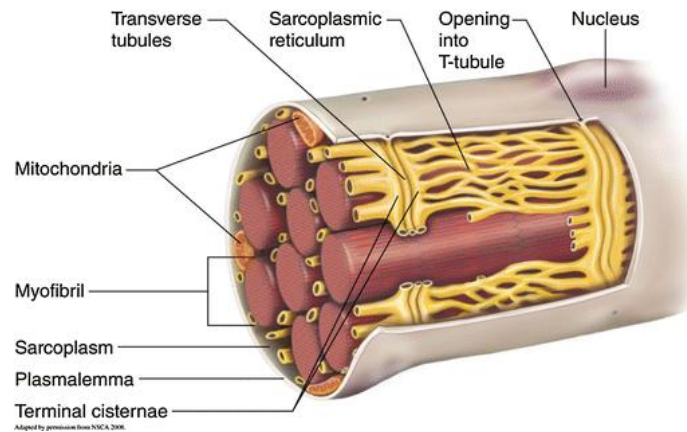


Abb. 2: Schematische Darstellung einer Skelettmuskelzelle in der fenestrierten Aufsicht. Dargestellt sind unter anderem der randständige Zellkern (Nucleus), das SR welches die Myofibrillen als feines Maschenwerk von Kanälen umgibt sowie die Mitochondrien die in unmittelbarer Nähe zu den Myofilamenten liegen und der Bereitstellung von ATP dienen. Zudem sind die transversalen T-Tubuli dargestellt, die als Invaginationen des Sarcolemms in die Tiefe der Zelle eintreten und Teil der elektromechanischen Kopplung sind. (modifiziert nach G.R. Hunter and R.T. Harris, 2008)

Durch die alternierende Anordnung der Aktin- und Myosinfilamente in den Myofibrillen entsteht das Sarkomermuster der Skelettmuskulatur. Das Sarkomer erstreckt sich dabei zwischen zwei Z-Linien mit den dazwischenliegenden Hälften jeweils einer I-Bande und der A-Bande, die so das strukturelle Korrelat der Querstreifung der Skelettmuskulatur bilden. Die vollständige Sarkomerformel lautet demnach:

$$Z - \frac{1}{2} I - A - H - M - H - A - \frac{1}{2} I - Z$$

Die Bezeichnungen dieser Banden leiten sich aus der Polarisationsmikroskopie ab, da hier die A-Bande aufleuchtend (anisotrop) und die I-Banden nicht-aufleuchtend (isotrop) zur Darstellung kommen (Lüllmann-Rauch, 2015). Die Z-Scheiben sind die Verbindungsstücke zweier benachbarter Sarkomere und dienen als Verankerung der Aktinfilamente. Diese Verankerung wird unter anderem durch das Protein α -Aktinin

realisiert (Luther, 2009). Die H-Bande beschreibt den aktinfreien Abschnitt der A-Bande. Ihre Länge ist demnach abhängig vom Kontraktionszustand des Sarkomers und kann bei vollständiger Kontraktion nahezu verschwinden, während ihr Betrag bei maximaler Dehnung am größten ist (de Souza Leite und Rassier, 2020). Die M-Bande unterteilt die A-Bande und dient, analog zur Z-Scheibe, als Verankerung zweier benachbarter Myosinfilamente. Wichtigstes Strukturprotein der M-Scheibe ist dabei das Myomesin-I, das durch seinen elastischen Aufbau zusammen mit Titin als Dehnungssensor des Sarkomers fungiert und mit seinem N-terminalen Ende die α -Helix des Myosins in der M-Bande verankert. (Henderson et al., 2017) (vgl. Abb. 3).

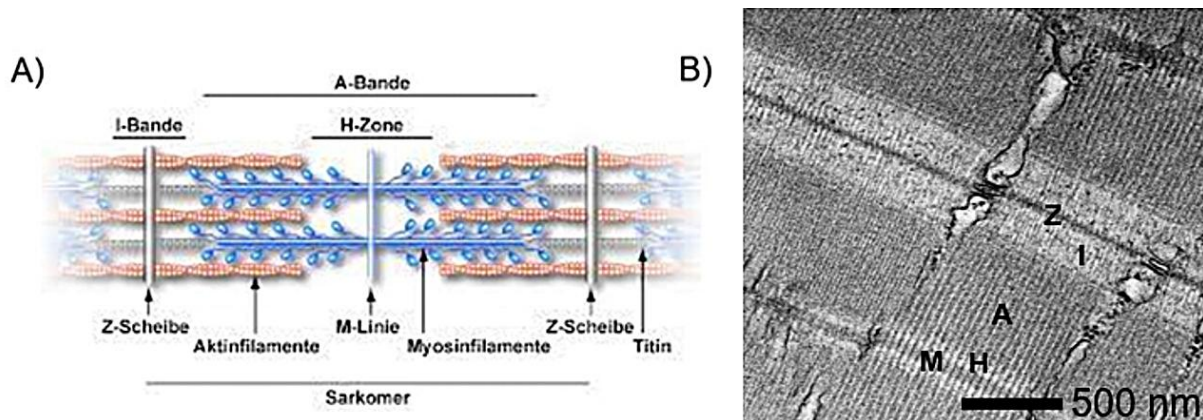


Abb. 3: Schematische Darstellung einer Sarkomereinheit (A) (Davidson, 1996) (Michel, 2019) und elektronenmikroskopische Darstellung eines Sarkomer-Komplexes aus Zebrafisch-Muskulatur mit Markierung der verschiedenen Banden einer halben Sarkomereinheit (B)

Stabilisiert wird das Sarkomer zudem durch die zwei Strukturproteine Nebulin und Titin, die die Myofilamente stabilisieren, indem sie sich zwischen Z-Scheibe und M-Bande aufspannen. Die Myofibrillen sind untereinander durch das Intermediärfilament Desmin jeweils an den Z-Scheiben miteinander verbunden. Dies ermöglicht die nahezu gleichmäßige parallele Anordnung der Myofibrillen in der Muskelfaser. (Henderson et al., 2017). Die eigentliche Kontraktion der Skelettmuskelzelle wird über die zytosolische Calcium-Konzentration bestimmt. Nach Eintreffen des Aktionspotentials über die motorische Endplatte breitet sich der Aktionsstrom über das T-Tubulus System bis tief in die Muskelfaser hinein aus. Hier kommt es über elektromechanische Kopplung, vermittelt

durch den Dihydropyridin-Rezeptor (DHPR) und Ryanodin-Rezeptor (ein Calcium-Kanal in der Membran des SR) zum Ausstrom von Ca^{2+} -Ionen aus dem SR. Calcium vermittelt über Konformationsänderung am Troponin-Tropomyosin-Komplex die ATP-abhängige Muskelkontraktion. Nach Abschluss der Kontraktion wird das Calcium zurück in das SR befördert; dies geschieht ebenfalls ATP-abhängig, über die SERCA (SR/ER Ca^{2+} -ATPase) (Frontera und Ochala, 2014). Histologisches Korrelat dieser elektromechanischen Kopplung ist die sogenannte Triade. Bestehend aus einem T-Tubulus und zwei anliegenden terminalen Zisternen (Abschnitten des SR). Abbildung 4 zeigt eine solche Triade in schematischer und ultrakstruktureller Darstellung.

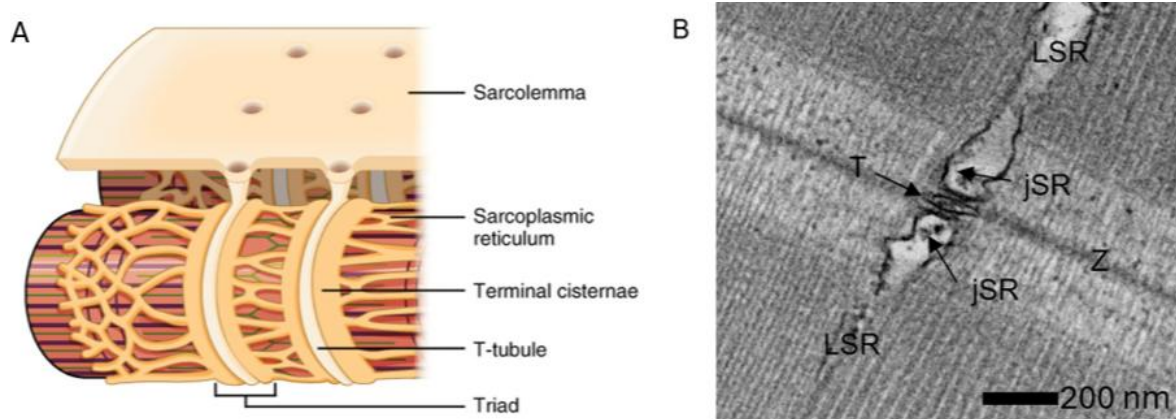


Abb. 4: (A) schematische Darstellung der Muskelfaser in Aufsicht. Dargestellt sind die Triade (Triad), jeweils bestehend aus zwei terminalen Zisternen des sarkoplasmatischen Retikulums und einem T-Tubulus. (modifiziert nach "Narrow T-tubules permit the conduction of electrical impulses" by Phil Schatz, lizenziert unter CC BY 4.0).

(B) elektronenmikroskopische Darstellung eines Triade-Komplexes in der Zebrafisch-Skelettmuskulatur. Markiert sind die drei Strukturen, die den Triade-Komplex bilden: T-Tubulus (T) (eine Invagination der Plasmamembran) sowie flankierend zwei L-Tubuli des SR (LSR), das junctionale sarkoplasmatische Retikulum (jSR).

1.2 Dystrophin-Glykoprotein-Komplex (DGC)

Der DGC ist ein Proteinkomplex in der Membran von Skelett- und Herzmuskulatur (Lapidos et al., 2004). Dieser vielfältige Proteinkomplex sorgt sowohl für mechanische Stabilität als auch für eine Signaltransduktion zwischen Cytoskelett, Plasmamembran und

extrazellulärer Matrix (EZM) (Moore und Hewitt, 2008). Während der Kontraktion kommt es in der Skelettmuskelzelle zu einer erheblichen Deformierung. Um die zelluläre Integrität während der Kontraktion intakt zu halten, müssen die Myofibrillen über eine stabile, aber dennoch flexible Verbindung zum Cytoskelett und zur EZM verfügen. Ohne diese Verbindung käme es zu einer Beschädigung der Plasmamembran während der Kontraktion (Valera et al., 2021). Der DGC beinhaltet sowohl zytoplasmatische, transmembranäre als auch extrazelluläre Proteine. Die Abbildung 5 zeigt eine vereinfachte Übersicht über das komplexe Zusammenspiel der wichtigsten Komponenten des DGC. Dystrophin vermittelt dabei die Verbindung zwischen Aktinfilamenten des Zytoplasmas und Dystrobrevin, welches wiederum über die Familie der Syntrophine Kontakt zu dem transmembranären β -Dystroglycan (β -DG) aufnimmt (Moore und Hewitt, 2008). Das β -DG verbindet den intrazellulären Teil des DGC mit der extrazellulären Komponente α -Dystroglycan (α -DG) (Endo, 2007). Das α -DG besitzt eine ausgeprägte O-Mannosylierung (Details s.u.) über die es in der Lage ist Calcium-vermittelt Verbindung zu EZM-Proteinen wie Laminin oder Perlecan aufzunehmen (Thornhill et al., 2008). Die Stabilisierung der Sarkomere am DGC erfolgt zudem über einen zweiten Weg vermittelt durch das Intermediärfilament Desmin, welches die Z-Scheiben ebenfalls mit Dystrobrevin verbindet und so an den DGC anschließt (Henderson et al., 2017). Dabei variiert die genaue Zusammensetzung des DGC in den verschiedenen Muskeltypen (Lapidos et al., 2004). Eine Auflistung einiger der oben aufgeführten wichtigen Strukturproteine des DGC wird in Tabelle 1 dargestellt. Die funktionelle Beeinträchtigung jeder dieser Komponenten kann zum partiellen Ausfall des DGC führen und damit zur Entstehung einer Muskeldystrophie beitragen (Wilson et al., 2022). Von besonderer Bedeutung ist das α -DG (s.o.). Es ist essentieller Bestandteil des DGC, da es die transmembrane Komponente (β -DG) mit der EZM verbindet. Es besitzt ein Molekulargewicht von 156 kDa und entsteht nach posttranslationaler Modifikation aus einem gemeinsamen Vorläuferprotein mit β -Dystroglycan (Kaufmann, 2003). Essentiell für die Funktion des α -Dystroglykans ist seine O-Glykosylierung (Kanagawa et al., 2021), die im folgenden Kapitel ausführlich dargestellt wird.

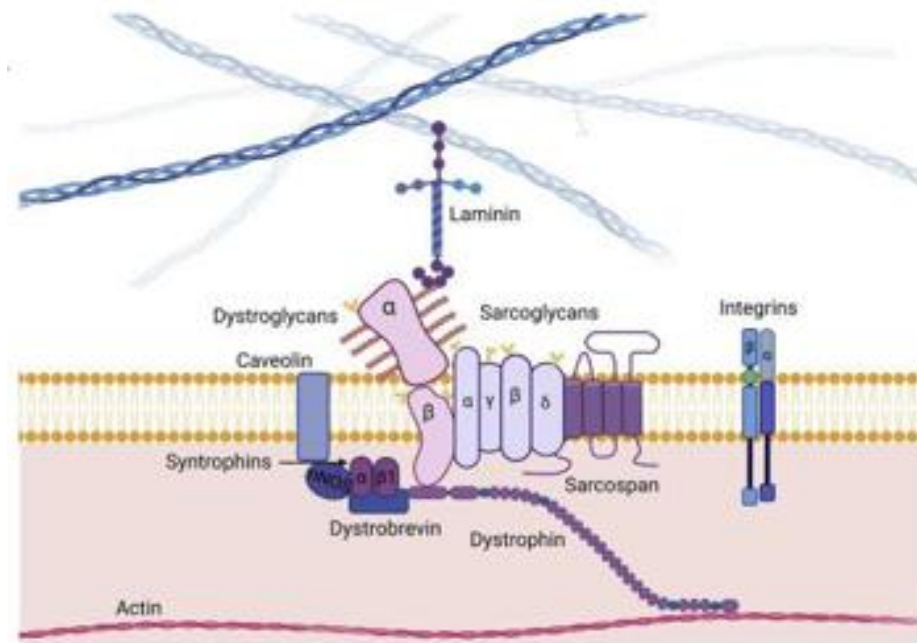


Abb. 5: Diese schematische Abbildung zeigt den Dystrophin-Glycoprotein-Komplex (DGC). Das Aktin-Zytoskelett verbindet die Sarkomere mit dem sarkoplasmatischen Dystrophin. Dieses wiederum tritt, vermittelt über Dystrobrevin und die Syntrophin-Gruppe, in Verbindung mit den Dystro- und Sarcoglykanen. Das β -Dystroglycan ist ein Transmembranprotein, welches intrazellulär Kontakt zu Dystrophin und extrazellulär mit α -Dystroglycan aufnimmt. α -Dystroglycan bindet Calcium-abhängig mit seinen glykosylierten Seitenketten an extrazelluläre Matrixproteine wie Laminin und Perlecan (adaptiert von Valera et al., 2020).

Tab. 1: Tabelle 1 demonstriert die unterschiedliche Expression wichtiger Strukturproteine des DGC in den verschiedenen Muskelarten. Das (+) indiziert dabei das Vorhandensein des jeweiligen Proteins, während ein (-) das Fehlen anzeigt. (adaptiert von Lapidos et al., 2004)

	Skelettmuskulatur	Herzmuskulatur	Glatte Muskulatur
Dystrophin	+	+	+
α -Sarcoglycan	+	+	-
β -Sarcoglycan	+	+	+
γ -Sarcoglycan	+	+	+
δ -Sarcoglycan	+	+	-
ϵ -Sarcoglycan	+	+	+
ζ -Sarcoglycan	+	+	+
Dystroglycan	+	+	+
Syntrophin	+	+	?
Dystrobrevin	+	+	?

1.3 Die Funktion der Protein-O-Mannosyltransferase-I (Pomt1)

Die co- und posttranslationelle O-Glykosylierung stellt eine der häufigsten Modifikationen von Proteinen in menschlichen Zellen dar. Sie erhöht sowohl die morphologische Heterogenität als auch die funktionelle Variabilität der glykosylierten Proteine erheblich. Dies trifft auch auf das von der Pomt1 O-mannosylierte α -DG zu (Dobson et al., 2013). Das *Pomt1*-Gen befindet sich auf Chromosom 9q34.13. Es codiert für das gleichnamige Protein, welches eine Gesamtlänge von 725 AA und ein Molekulargewicht von circa 82,5 kDa besitzt (Jorado et al., 1999). Ihre zelluläre Lokalisation ist die Membran des ER (Hang et al., 2022). Die Pomt1 wird in zahlreichen embryonalen und adulten Zelltypen exprimiert, darunter vor allem im zentralen Nervensystem (ZNS), der Hypophyse sowie der Skelett- und Herzmuskulatur (Hu et al., 2018). Die Pomt1 führt ihre katalytische Aktivität stets im Komplex mit der Pomt2 aus. Ein Ausfall einer der beiden Komponenten verhindert die suffiziente Arbeit des gesamten Komplexes (Manya et al., 2003). Eines der Strukturproteine, das von der Pomt1 posttranslational im ER glykosyliert wird, ist das α -DG in der Skelettmuskulatur. Dabei vermittelt die Pomt1 den ersten katalytischen Schritt

der O-Glykosylierung (Kanagawa et al., 2021). Der genaue enzymatische Vorgang ist in Abbildung 6 vereinfacht dargestellt.

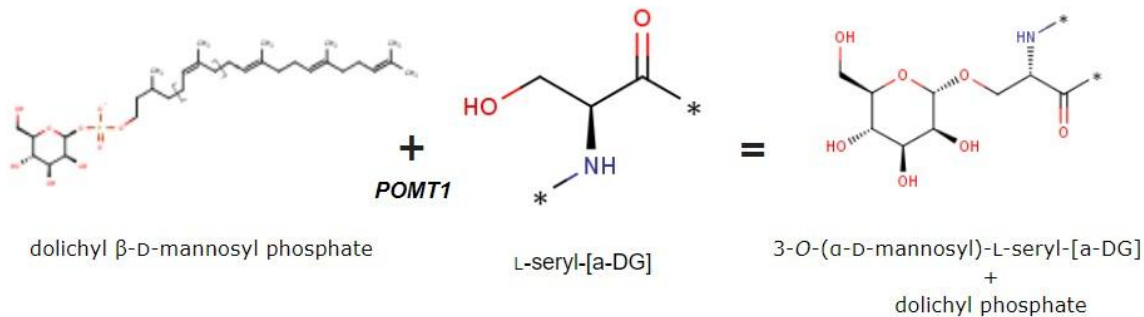


Abb. 6: Pomt1 vermittelt die katalytische Reaktion von dolichol β-D-mannosyl-phosphat an einen L-seryl-Rest des α-DG. Das Dolichyl-Phosphat gibt dabei seinen Mannose-Rest an die OH-Gruppe des Serins ab. (adaptiert von Swiss Institute of Bioinformatics)

Bei diesem ersten katalytischen Schritt vermittelt die Pomt1 die Protein-O-Mannosylierung eines L-Serin-Restes im α-DG unter Mitwirkung von Dolicholphosphat in der Membran des SR. Ein Ausfall dieses Vorgangs zeigt Abbildung 7, in der schematisch illustriert wird, welche Auswirkungen ein Fehlen der Glykosylierung des α-DG auf seine Funktion hat. Die Calcium-vermittelte Verbindung der Glykosyl-Reste zu den extrazellulären Matrixkomponenten wie Laminin oder Perlecan kann nicht mehr geschaffen werden, sodass die strukturelle Integrität des DGC an dieser Stelle aufgehoben wird (Endo, 2003). Mittlerweile sind bis zu 76 krankheitsassoziierte Mutationen der Pomt1 bekannt (Hu et al., 2018), unter denen einige zum Erscheinungsbild der sogenannten Dystroglykanopathien führen, einer sehr heterogenen Gruppe verschiedenster Muskel-Erkrankungen, denen in vielen Fällen ein indirekter Ausfall des α-DG aufgrund insuffizienter Glykosylierung zugrunde liegt (Sabatelli et al., 2003).

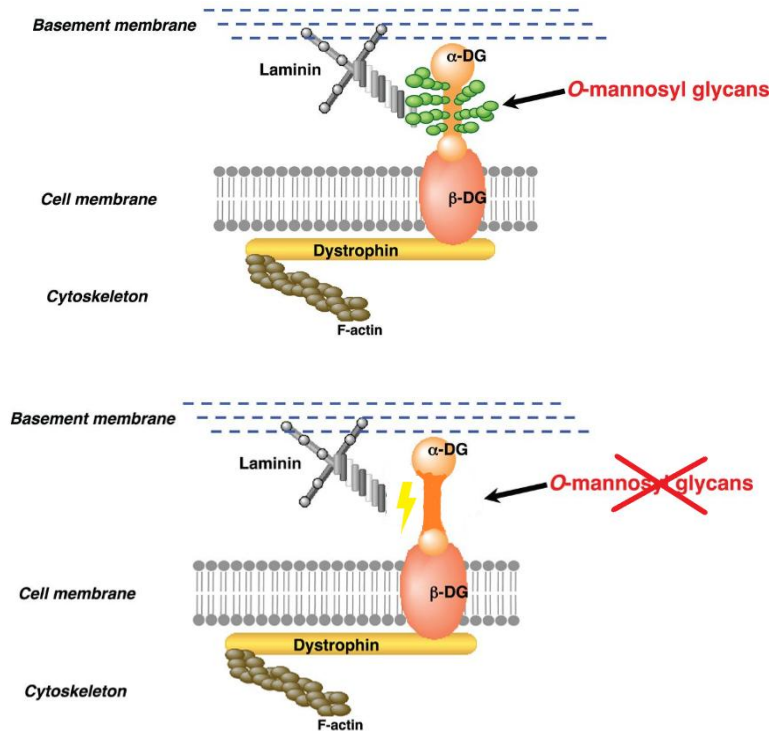


Abb. 7: Die Abbildung demonstriert den Effekt der fehlenden O-Mannosyl-Glykosylierung durch Ausschaltung der Pomt1. Aufgrund der fehlenden Seitenketten kann das α -DG die Calcium-vermittelte Interaktion zu den Proteinen der EZM nicht aufnehmen. Die Integrität des DGC ist damit an dieser Stelle gestört. Infolgedessen können die mechanischen Scherkräfte, die bei der Kontraktion entstehen, nicht adäquat auf die EZM übertragen werden. Es kommt zur Beschädigung der Muskelzelle und konsekutiv zur Muskeldystrophie. (modifiziert nach Endo, 2003)

1.4 Dystroglykanopathien am Beispiel des Walker-Warburg-Syndroms

Die Bezeichnung sekundäre Dystroglykanopathie beschreibt eine Gruppe angeborener Muskeldystrophien, die auf eine abnormale Glykosylierung des α -DG zurückzuführen sind. Es sind mindestens 18 verschiedene Gene bekannt, deren Ausfall zu einem sehr heterogenen Spektrum an klinischen Symptomen führen. Manche Ausprägungen bewirken schwere kongenitale Muskeldystrophien mit hoher frühkindlicher Letalität, während andere einen milderen Phänotyp mit Ausbruch der Symptomatik im frühen Erwachsenenalter zeigen (sog. *adult-onset limb-girdle disease*, LGMD) (Kanagawa et al.,

2021). Aufgrund der multilokulären Expression von α -DG, auch außerhalb der quergestreiften Muskulatur, zeigen sich bei Dystroglykanopathien auch andere Organmanifestationen wie beispielsweise im zentralen Nervensystem (ZNS), hier als Lissenzephalie Typ II, im Herzmuskel sowie im Auge. Daher wird die Gruppe der Dystroglykanopathien auch als *muscle-eye-brain disease* (MEB) bezeichnet. (Tsuchida et al., 2021) Eine dieser Erkrankungen aus der Gruppe der Dystroglykanopathien ist das Walker-Warburg-Syndrom. Benannt ist die Erkrankung nach ihren Erstbeschreibern Arthur Earl Walker, einem US-amerikanischen Neurochirurg und Neurologen (1905-1995), (Bohnenberger, 2017) und Mette Warburg, eine dänische Augenärztin (1926-2015) (Stuart-Smith et al., 2020). Walker beschrieb das Syndrom erstmals 1942 in seiner Abhandlung zum Thema der Lissenzephalie. (A.E. Walker ‚*Lissencephaly*‘, 1942)

Das Walker-Warburg-Syndrom (WWS) ist eine seltene, autosomal-rezessive Erkrankung, die sich klinisch als schwere Muskeldystrophie präsentiert. In den meisten Fällen bleibt die genaue Ursache der Erkrankung unbekannt. Lediglich in 10-20% der Fälle ergeben DNA-Analysen den Nachweis pathogener Mutationen im *Pomt1*-Gen (Vajsar and Schachter, 2006). Auch andere Gene wie beispielsweise das mit *Pomt1* verwandte *Pomt2* sowie *fuktitin* und *FKRP*, sind ursächlich für das WWS identifiziert worden (Falsaperla et al., 2016). Das WWS gehört zu den schwersten kongenitalen Muskeldystrophien, deren Ausprägungen sich meistens bereits bei Geburt oder der frühen Kindheit präsentieren (Lee, 2014). Zu den Symptomen zählen Muskelschwäche, Hypotonie, Entwicklungsverzögerung und mentale Retardierung sowie gelegentlich das Auftreten von Krampfanfällen. Zahlreiche Fehlbildungen der Augen wurden beschrieben, darunter Katarakte, Netzhautablösung sowie Atrophie des N. opticus. Zu den WWS-assoziierten ZNS-Abnormalitäten zählen unter anderem die Lissenzephalie Typ II (Pflasterstein-Lissenzephalie), Hydrozephalus, zerebelläre Malformationen (Dandy-Walker-Syndrom) und Enzephalozelen. Laborchemisch zeigt sich in den meisten Fällen bei den Betroffenen ein deutlich erhöhter Creatinkinase-Spiegel als Ausdruck der Myopathie. (Vajsar and Schachter, 2006). Einige makroskopische ZNS-Veränderungen bei WWS-Patienten sind in Abbildung 8 dargestellt.

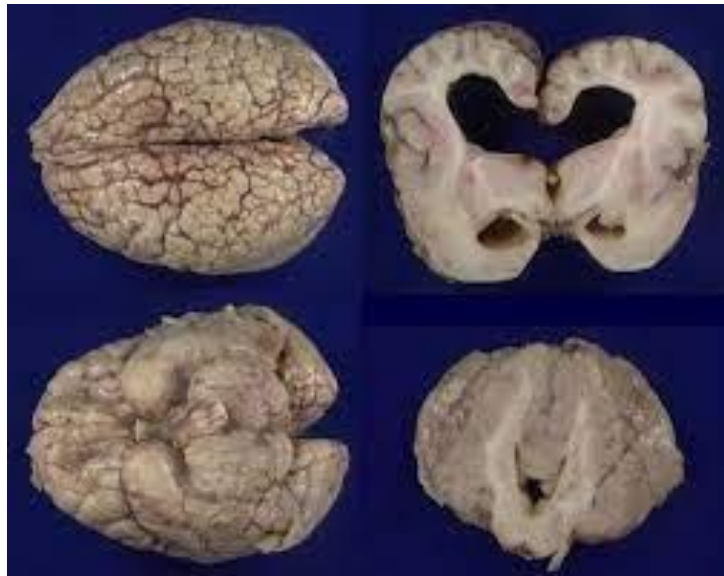


Abb. 8: Post-mortem Präparate eines 9-monate alten Mädchens mit Walker-Warburg-Syndrom. Die Hemisphären zeigen ein abnormales Gyrierungsmuster, welches auch als „Pflastersteinrelief“ (cobblestone lissencephaly) bezeichnet wird. Die basale Sicht auf das Gehirn offenbart einen glatten, pachygyren Temporallappenkortex. Zudem ist im Transversalschnitt deutlich die Erweiterung der inneren Liquorräume sichtbar. (Modifiziert nach Meilleur et al. 2014)

Ursache der Muskeldystrophie ist die fehlerhafte Glykosylierung des α -DG durch die ineffiziente Pomt1 (oder anderer Enzyme im Glykosylierungsprozess). Durch die verminderte Interaktion zwischen EZM und dem DGC kommt es aufgrund der Scherkräfte während der Kontraktion zur Verletzung des Sarkoplasmas und der Basalmembran mit konsekutiver schwerer Muskelnekrose. Bei einer Muskelbiopsie zeigt sich dabei lichtmikroskopisch im Initialstadium eine gestörte Gewebearchitektur mit Rissen und Löchern zwischen den Muskelzellen, welches das histologische Korrelat einer insuffizienten Zell-EZM-Zell-Verbindung darstellt. Zu fortgeschrittenen Krankheitsstadien zeigt sich dann das für kongenitale Muskeldystrophien typische Muster mit fibrolipomatöser Degeneration und Dystrophie des Muskelgewebes (Falsaperla et al. 2016) (vgl. Abb. 9)

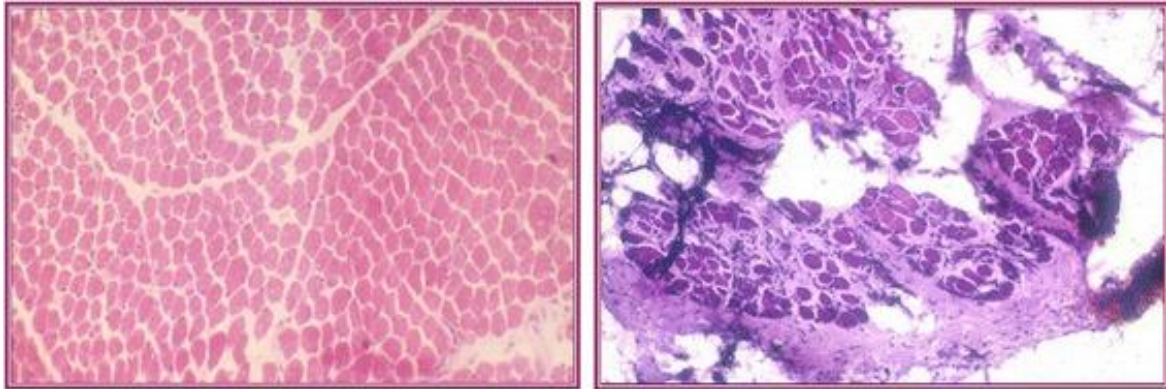


Abb. 9: Histologische Präparate der Skelettmuskulatur eines WWS-Patienten. Sie veranschaulichen die dystrophen Läsionen im Frühstadium der Erkrankung mit initialen Läsionen (links), die sich vor allem als intercellular clefts zeigen, sowie im 14-monatigen Verlauf bei nun stark ausgeprägter Dystrophie und fibrolipomatöser Degeneration (rechts) (Modifiziert nach Falsaperla et. al, 2016).

Diagnostiziert wird das WWS hauptsächlich klinisch, bei der entsprechenden Symptomkonstellation. An den klinischen Verdacht schließen sich laborchemische und molekulargenetische Untersuchungen an, die in einigen Fällen die Diagnose stützen bzw. bei Vorliegen der entsprechenden Mutationen beweisen können. Zu den wichtigsten Differentialdiagnosen des WWS zählen die Fukuyama-Muskeldystrophie (FCMD), die Gruppe der Muscle-Eye-Brain-Erkrankungen (MEB) sowie das breite Spektrum der Muskeldystrophien ohne Augen- und ZNS-Abnormalitäten, wie beispielsweise die Duchenne-Muskeldystrophie. Die therapeutischen Optionen beim WWS sind begrenzt und stets symptomatischer Natur. So besteht möglicherweise bei zusätzlichem Krampfleiden die Notwendigkeit einer antikonvulsiven Therapie. In manchen Fällen ist die Anlage eines VP-Shunts zur Ableitung des Hydrocephalus erforderlich. Physiotherapie stellt die wichtigste Säule in der Behandlung der Muskeldystrophie dar, wenngleich der Effekt dieser Therapie eher gering ist und die Erkrankung stets progredient verläuft. (Vajsar and Schachter, 2006). Die Prognose des WWS ist infaust, die meisten Betroffenen versterben im ersten Lebensjahr. Wenige erreichen das Kleinkindalter (Lee, 2014).

1.5 Der Zebrafisch als Muskel-Modellorganismus

Der Zebraäbrbling (*Danio rerio*), auch Zebrafisch genannt, ist ein kleiner Süßwasserfisch aus Südasien. (Abb. 10) Die einfache Haltung, das ganzjährige Paarungsverhalten und die Transparenz seiner Eier und Larven ließen den Zebrafisch in den letzten Jahren zu einem populären Vertebraten-Modellorganismen der medizinischen Forschung werden. Während nach wie vor insbesondere die Forschung an zentral nervösen Geweben sowie der Herzmuskulatur im Vordergrund steht, werden zunehmend auch weitere Organstrukturen für die Erforschung humaner Pathologien miteinbezogen. Eines dieser Gewebe ist die Skelettmuskulatur des Fisches. (Daya et al., 2020) Die schnelle Entwicklung der Skelettmuskulatur im Zebrafisch - alle 30 segmentalen Myotome sind bereits bei 24 hpf (hours post fertilization) vollständig ausgebildet und sichtbar - sowie die ausgeprägte Konservierung wichtiger Strukturelemente im Vergleich zu Säugetier-Muskulatur machen die Zebrafisch-Larven zu einem alternativen Modellorganismus z.B. im Vergleich zum Maus-(Nager)-Modell auch für Muskelerkrankungen (Maves, 2014). Es ist bereits gelungen, zahlreiche Muskelerkrankungen durch *antisense*-Oligonukleotide (Morpholinos) im Zebrafisch zu rekonstruieren und darüber wichtige Erkenntnisse über deren pathophysiologische Charakteristika zu gewinnen. So ist in Zukunft davon auszugehen, dass zunehmend auch klinisch-pharmakologische Screening-Untersuchungen an Zebrafischmuskel etabliert werden.

Die Skelettmuskulatur ist im Zebrafisch in paarigen Myotomen entlang der Längsachse angeordnet. Unterteilt werden die Myotome durch vertikale und horizontale Myosepten, an denen die Muskelfasern ansetzen. Sie dienen dadurch als Verankerung, ähnlich den tendinösen Strukturen beim Menschen (Abb. 10).

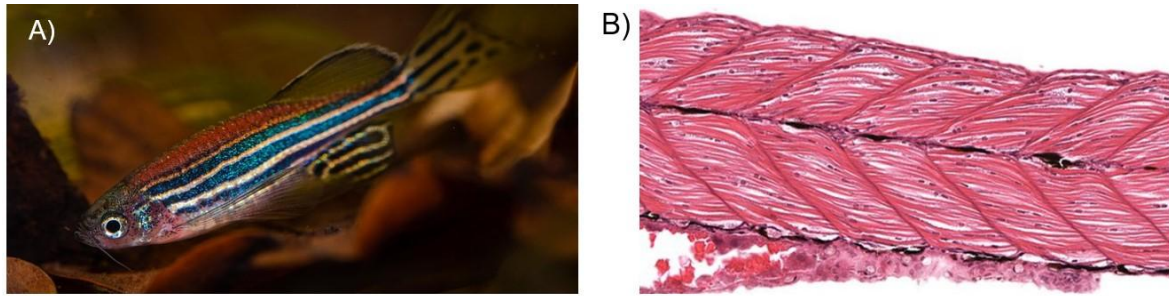


Abb. 10: A) Foto in der seitlichen Aufsicht eines adulten Zebrafisches (*Danio rerio*) B) Sagittaler Ausschnitt aus der Rumpfregion einer 5 dpf alten Zebrafisch-Larve (HE-Färbung). Hier zeigt sich die symmetrische Anordnung der Myotome mit den dazwischenliegenden Myosepten um das zentrale Rückenmark. (Archivbild aus dem ZFIN-Anatomie Atlas)

Auch der Zebrafisch besitzt schnelle und langsame Muskelfasern, entsprechend den Muskelfasern Typ I und II beim Menschen. Anders als beim Säugetier liegen die verschiedenen Muskelfasertypen allerdings nicht mosaikartig geordnet, sondern sind klar im Raum voneinander getrennt in verschiedenen Kompartimenten. Es zeigt sich, dass sich vor allem im Bereich der Rückflosse und der seitlichen Rumpflinien die langsamen Muskelfasern befinden. Die zentralen Kompartimente werden größtenteils von schnellen Fasertypen gebildet. Im Übergangsbereich zwischen schnellen und langsamen Fasern befindet sich ein dünner Streifen eines intermediären dritten Typs. Abbildung 11 illustriert diese Anordnung in einem vereinfachten Schema.

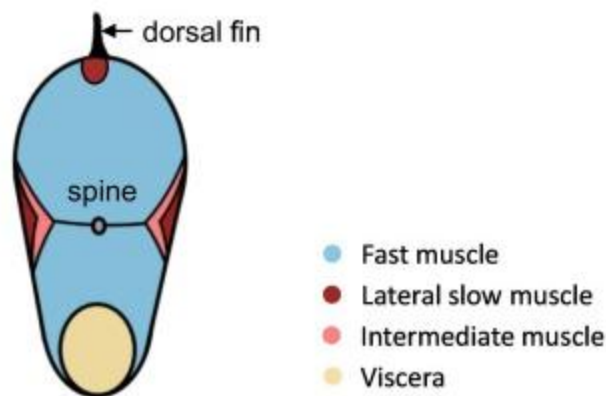


Abb. 11: Schematische Abbildung der verschiedenen Muskelfasertypen und ihre anatomische Verteilung im Koronarschnitt. Zur Orientierung dienen Rückenflosse, Wirbelsäule (spine) sowie die Region der Viszera (beige). Im Bereich der Rückenflosse und Seitenlinienorganen liegen die langsamen Muskelfasern (rot). Große Teile der zentralen Muskelkompartimente wird von schnellen Muskelfasern (blau) besetzt. Im Übergangsbereich zwischen schnellen und langsamen Fasern befinden sich schmale Bereiche eines intermediären Faser-Typs (rosa). (Modifiziert nach Liu et. al, 2022)

Im Bereich der Myosepten befinden sich beim Zebrafisch zudem Muskelprogenitorzellen, die große Ähnlichkeit zu den humanen Satellitenzellen besitzen. Anders als der Mensch, der hauptsächlich auf Hypertrophie zum Muskelwachstum angewiesen ist, generiert der Fisch lebenslang sein Muskelwachstum ebenfalls durch Hyperplasie seiner Muskelzellen (Liu et. al, 2022). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Mensch und Zebrafisch große Gemeinsamkeiten in der Skelettmuskelmorphologie und eine hohe evolutionäre Konservierung muskelassoziierter Gene besitzen (Daya et al, 2020). Dies trifft auch auf das zuvor vorgestellte Pomt1-Gen zu. Da ein Pomt1-Knockdown - aufgrund der essenziellen Rolle glykosylierten α -DGs während der Implantation des Embryos - bei Nagern zu einem embryonalen Absterben führt, wurde zunehmend der Zebrafisch als Modellorganismus für Pomt1-abhängige Veränderungen eingeführt (Karas et al., 2022). Die Arbeitsgruppe um Avsar-Ban et al. konnte in ihrer Publikation zur Bedeutung der Protein-O-Mannosylierung in der frühen embryonalen Entwicklung des Zebrafisches durch genetische Analysen zeigen, dass eine 70% Übereinstimmung der Aminosäuresequenz zwischen humaner Pomt1 und der des Zebrafisches besteht. (vgl. Abb. 12) (Avsar-Ban et al, 2010).

A

hPOMT1	11-----	MGFLKRPVVVTDINLGLVALTQGLLGLMLTYPRAVVFDEVYGGYISFYMKQIFFLDDSGPPF	68
mPOMT1	1MGSHSTGLSETLGVLPNLFCKMRLKRPVVVTDINLGLVALTQGLLGLMLTYPRAVVFDEVYGGYISFYMKQIFFLDDSGPPF	90	
rPOMT1	1MGSRNMGREDTLGVLPNLFCKMRLKRPVVVTDINLGLVALTQGLLGLMLTYPRAVVFDEVYGGYISFYMKQIFFLDDSGPPF	90	
zPOMT1	11-----	MG-CVGLKRVSTVEINVLITAVDMLAEITRLTGTHPRAVVFDEVYGGYISFYMKQVFFLDDSGPPF	67
hPOMT1	69	CHMYLALGQLOGGFCNLFNWRIGASYSSNVFWSLRLLPALAGALSVFMAYQIVLELHFSECAHGAALLMLTENALITQSRIMLESV	158
mPOMT1	91	CHMYLALGQLOGGFCNLFNWRIGASYSSNVFWSLRLLPALAGALSVFMAYQIVLELHFSECAHGAALLMLTENALITQSRIMLESV	180
rPOMT1	91	CHMYLALGQLOGGFCNLFNWRIGASYSSNVFWSLRLLPALAGALSVFMAYQIVLELHFSECAHGAALLMLTENALITQSRIMLESV	180
zPOMT1	68	CHMYLALGQLOGGFCNLFNWRIGASYSSNVFWSLRLLPALAGALSVFMAYQIVLELHFSECAHGAALLMLTENALITQSRIMLESV	157
hPOMT1	159	LIFFNLLAVLSYLKFFNCSHSPFSLGSMWNLTLTGVCSCAVGIKYMCHPTTLVLGIAAVHANKLIGDQTLNNVLSHLLARVALL	248
mPOMT1	181	LIFFNLLAVLSYLKFFNCSHSPFSLGSMWNLTLTGVCSCAVGIKYMCHPTTLVLGIAAVHANKLIGDQTLNNVLSHLLARVALL	270
rPOMT1	181	LIFFNLLAVLSYLKFFNCSHSPFSLGSMWNLTLTGVCSCAVGIKYMCHPTTLVLGIAAVHANKLIGDQTLNNVLSHLLARVALL	270
zPOMT1	158	LIFFNLLAVLSYLKFFNCSHSPFSLGSMWNLTLTGVCSCAVGIKYMCHPTTLVLGIAAVHANKLIGDQTLNNVLSHLLARVALL	243
hPOMT1	249	WVFWYLLFFVHLLVYRSGPHDQIMSSAFQASLGGGLARITQQQLEVAFGSQVTLNVTGKPYPCWLSHSDTYPMIYENRGSGSH	338
mPOMT1	271	WVFWYLLFFVHLLVYRSGPHDQIMSSAFQASLGGGLARITQQQLEVAFGSQVTLNVTGKPYPCWLSHSDTYPMIYENRGSGSH	360
rPOMT1	271	WVFWYLLFFVHLLVYRSGPHDQIMSSAFQASLGGGLARITQQQLEVAFGSQVTLNVTGKPYPCWLSHSDTYPMIYENRGSGSH	360
zPOMT1	244	WVFWYLLFFVHLLVYRSGPHDQIMSSAFQASLGGGLARITQQQLEVAFGSQVTLNVTGKPYPCWLSHSDTYPMIYENRGSGSH	333
hPOMT1	339	QQQVTCYFFFDNNWNIWKDGRHQLVSSPPFVRHGDIVQLVHGMITRSLNTHDVAAPLSPHSQSVSCYIDYNIEMPAQNLRVLDIVN	428
mPOMT1	361	QQQVTCYFFFDNNWNIWKDGRHQLVSSPPFVRHGDIVQLVHGMITRSLNTHDVAAPLSPHSQSVSCYIDYNIEMPAQNLRVLDIVN	450
rPOMT1	361	QQQVTCYFFFDNNWNIWKDGRHQLVSSPPFVRHGDIVQLVHGMITRSLNTHDVAAPLSPHSQSVSCYIDYNIEMPAQNLRVLDIVN	450
zPOMT1	334	QQQVTCYFFFDNNWNIWKDGRHQLVSSPPFVRHGDIVQLVHGMITRSLNTHDVAAPLSPHSQSVSCYIDYNIEMPAQNLRVLDIVN	423
hPOMT1	429	RESERKWKTLSEVRFVHVNTSAHLKLSGAHLPDWGFRQLEVVGEKLSGYSYSSVWNVBEHRYGRSGHOKERELELHSPDQDSRNL	518
mPOMT1	451	RESERKWKTLSEVRFVHVNTSAHLKLSGAHLPDWGFRQLEVVGEKLSGYSYSSVWNVBEHRYGRSGHOKERELELHSPDQDSRNL	540
rPOMT1	451	RESERKWKTLSEVRFVHVNTSAHLKLSGAHLPDWGFRQLEVVGEKLSGYSYSSVWNVBEHRYGRSGHOKERELELHSPDQDSRNL	540
zPOMT1	424	RESERKWKTLSEVRFVHVNTSAHLKLSGAHLPDWGFRQLEVVGEKLSGYSYSSVWNVBEHRYGRSGHOKERELELHSPDQDSRNL	513
hPOMT1	519	SFMARFSELQWMLTLNEDLSHGYSSPLEWTLDTNIAVWLHPRTSAQHLLGNIVIVWESLALAIQMLSLWYLLRRRNVEDLPQ	608
mPOMT1	541	SFMARFSELQWMLTLNEDLSHGYSSPLEWTLDTNIAVWLHPRTSAQHLLGNIVIVWESLALAIQMLSLWYLLRRRNVEDLPQ	630
rPOMT1	541	SFMARFSELQWMLTLNEDLSHGYSSPLEWTLDTNIAVWLHPRTSAQHLLGNIVIVWESLALAIQMLSLWYLLRRRNVEDLPQ	630
zPOMT1	514	SFMARFSELQWMLTLNEDLSHGYSSPLEWTLDTNIAVWLHPRTSAQHLLGNIVIVWESLALAIQMLSLWYLLRRRNVEDLPQ	603
hPOMT1	609	DAKSHVLAGALCGGWANLTPFFLMERVLFLYHYLPALTFOILLPLVQGHASDHLCSQLQNRVFSALVWVYSSACHVSNLRPLT	698
mPOMT1	631	DAKSHVLAGALCGGWANLTPFFLMERVLFLYHYLPALTFOILLPLVQGHASDHLCSQLQNRVFSALVWVYSSACHVSNLRPLT	720
rPOMT1	631	DAKSHVLAGALCGGWANLTPFFLMERVLFLYHYLPALTFOILLPLVQGHASDHLCSQLQNRVFSALVWVYSSACHVSNLRPLT	720
zPOMT1	604	DAKSHVLAGALCGGWANLTPFFLMERVLFLYHYLPALTFOILLPLVQGHASDHLCSQLQNRVFSALVWVYSSACHVSNLRPLT	693
hPOMT1	699	YGDHSLSPCLALRWKDSWDILIRK	725
mPOMT1	721	YGDHSLSPCLALRWKDSWDILIRK	746
rPOMT1	721	YGDHSLSPCLALRWKDSWDILIRK	747
zPOMT1	694	YGDHSLSPCLALRWKDSWDILIRK	720

Abb. 12: Vergleichende Analyse der Pomt1-Aminosäuresequenz im Menschen (hPOMT1), Maus (mPOMT1), Ratte (rPOMT1) und Zebrafisch (zPOMT1). Schwarz unterlegt sind jeweils die Aminosäuren (Ein-Buchstaben-Code), die eine speziesübergreifende Übereinstimmung zeigten. Hierbei ergab sich eine 70% Übereinstimmung zwischen humanem Pomt1 und dem des Zebrafisches. Auch zu den beiden Nagetierspezies zeigt sich eine hohe Übereinstimmung, sodass von einer ausgeprägten evolutionären Konservierung der Proteinstruktur auszugehen ist (Modifiziert nach Avsar-Ban et. al, 2010).

1.6 Ziele dieser Arbeit

Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen, den Zebrafisch als Modellorganismus für Muskeldystrophien weiter zu etablieren und somit perspektivisch ermöglichen, dass klinisch-pharmakologische Forschungen an diesen Krankheitsbildern auch im Zebrafisch-Modell noch spezifischer realisiert werden können. Hierzu wurde die - durch Pomt1-Defekt - verursachte α -Dystroglykanopathie (klinisch Walker-Warburg-Syndrom) als Referenzpathologie gewählt und in Zebrafischlarven rekonstruiert. Diesbezüglich soll in der hier vorliegenden Arbeit insbesondere auf die ultrastrukturellen Veränderungen der muskulären Zytoarchitektur mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie (IFM) sowie Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) eingegangen werden. Aufgegriffen werden hierfür die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Avsar-Ban et al., die mit ihrer Publikation von 2010 über die Wichtigkeit der Protein-O-Mannosylierung in der embryonalen Entwicklung des Zebrafisch die molekulargenetischen Grundlagen dieser Arbeit geschaffen haben. Die hier vorliegende Arbeit soll jetzt diese molekularen Grundlagen aufgreifen, um histomorphologische Erkenntnisse erweitern und hierbei herausfinden, wie gut sich der Zebrafisch als Modellorganismus für Muskeldystrophien am Beispiel des Walker-Warburg-Syndroms eignet.

Folgende Fragestellungen sollen hierzu in dieser Arbeit beantwortet werden:

- Welche Gemeinsamkeiten und Unterschiede zeigen sich in der Ausprägung eines Pomt1-Defektes im Vergleich Zebrafisch zum Menschen?
- Inwieweit gleicht und unterscheidet sich die ultrastrukturelle Architektur der Skelettmuskulatur des Zebrafisches zu Säugetiermodellen?
- Kann ein phänotypisches Korrelat der Muskelerkrankung auch im Fischmodell erzeugt werden und wenn ja, welche Charakteristika zeigen sich hierbei?
- Kann die Etablierung des Pomt1-Moprholinos auch zur Erforschung anderer krankheitsassoziierter Ausprägungen wie beispielsweise Lissenzephalie Typ I oder retinale Veränderung bei Dystroglykanopathien genutzt werden?

2. Material und Methoden

Die Durchführung der in dieser Arbeit angewandten Experimente fand ausschließlich im Anatomischen Institut der Universität Bonn statt. Als Modellorganismus wurden Wildtyp-Zebrafischlarven der AG Odermatt / Core Facility Zebrafische (Med. Fakultät, Uni Bonn) verwendet. Die bei den einzelnen Versuchen verwendeten Chemikalien, die Laborausstattung sowie die detaillierten Abläufe der durchgeführten Experimente werden in den folgenden Kapiteln einzeln aufgeführt.

2.1 Materialien

2.1.1 Antikörper

Für die Durchführung der Immunfluoreszenzmikroskopie und Western Blots (WB) wurden eine Reihe muskelspezifischer und allgemeiner Antikörper akquiriert, die im Detail der unten aufgeführten Tabelle zu entnehmen sind. Die Auswahl der Antikörper verfolgte das Ziel, die Skelettmuskelzelle möglichst umfangreich abzubilden, weswegen auf Zielproteine aus den wichtigsten Zellkompartimenten zurückgegriffen wurde. Die Anwendung der Antikörper erfolgte für WB und für die IFM. Da für die meisten dieser Antikörper vom Hersteller keine Spezifitätsangabe für die Verwendung im Zebrafisch vorlag, sollte in *einem try-and-error* Ansatz eruiert werden, inwieweit sich diese im Zebrafisch implementieren ließen.

Tab. 2: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper (sa) für WB und IFM

Name	Wirtsorganismus	Hersteller	Verdünnung	Klonalität	Katalognummer
α -Dystroglycan	goat	Abcam	1:200	polyclonal	ab105504
Dystrophin	mouse	Abcam	1:200	monoclonal	ab7614
Myomesin-I	rabbit	Antikörper-Online	1:200	polyclonal	ABIN2790069
Cytochrom-C-Oxidase IV	mouse	Abcam	1:200	monoclonal	ab14744
Titin	mouse	Novus	1:200	monoclonal	NB600-1206
Nebulin	mouse	Novus	1:200	polyclonal	NB120-11099
Kollagen-IV	rabbit	Abcam	1:200	polyclonal	ab6586
Acetylcholinesterase	rabbit	Antikörper-Online	1:200	polyclonal	ABIN2786887
Pomt1	rabbit	GeneTex	1:200	monoclonal	GTX109717-100
α -Actinin	rabbit	Abcam	1:200	polyclonal	ABIN2787669
Ryanodin-Rezeptor	mouse	Abcam	1:200	monoclonal	ab2827
AlexaFluor546 Anti-Rabbit (sa)	goat	Invitrogen	1:1000	polyclonal	A11035
AlexaFluor546 Anti-Mouse (sa)	goat	Invitrogen	1:1000	polyclonal	A11030
AlexaFluor546 Anti-Goat (sa)	donkey	Invitrogen	1:1000	polyclonal	A11056

2.1.2 Oligonukleotide

Um die Pomt1-Defizienz im Zebrafischorganismus rekonstruieren zu können, wurde mittels zweier translationsblockierender Morpholino-Oligonukleotide der Firma Gene Tools, LLC (Philomath, Oregon, USA) gearbeitet. Die genauen Nukleotidsequenzen sind der anstehenden Tabelle 3 zu entnehmen.

Tab.3: Oligonukleotide der Morpholino-Injektionen (*Avsar-Ban et. al, 2010*).

Name	Hersteller	Sequenz (5'-3')
Pomt1-MO1	Gene Tools, LLC, Philomath, OR	GACGGGCAGTTTAACACACTGCATG
Pomt1-MO2	Gene Tools, LLC, Philomath, OR	GACTTGATTCAGTTTTTCCTCTGGA
Kontroll-MO	Gene Tools, LLC, Philomath, OR	CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA

2.1.3 Fischlinien

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente erfolgten ausschließlich an Wildtyp-Zebrafischlinien der AG Odermatt des Anatomischen Instituts der Universität Bonn. Die verwendeten Fischlinien sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tab. 4: Verwendete Fischlinien

Name	Ursprung
Tüpfel Long Fin (TL: ZDB-GENO-990623-2)	EZRC, KIT
Tübingen (TU: ZDB-GENO-990623-3)	EZRC, KIT

2.1.4 Chemikalien

Tabelle 5 illustriert eine alphabetische Auflistung aller im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und dem entsprechenden Hersteller.

Tab. 5: Alphabetische Auflistung der verwendeten Chemikalien sowie Hersteller

Name	Hersteller
Ampuwa Wasser	Fresenius Kabi Deutschland GmbH
BSA Albumin Fraction V (pH 7.0)	AppliChem
Cacodylatpuffer	Sigma Aldrich
Chemolumineszenz-Lösung	Thermo Fischer
Citronensäure	Merck KGaA
CutSmart	New England Biolabs GmbH, Ipswich, MA,
dest. Wasser	PanReac AppliChem
Ethanol	PanReac AppliChem
Fluorescent Mounting Medium	Sigma Aldrich
Glutaraldehyd	Agar Scientific
Milchpulver	PanReac AppliChem
MS-222	Sigma Aldrich
NGS (normal goat serum)	Sigma Aldrich
Osmiumtetroxid	Polyscientific
Paraffin	Agar Scientific
Paraformaldehyd	PanReac AppliChem
Phenolrot	Sigma Aldrich
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fischer
Propylenoxid	Sigma Aldrich
Protease-Inhibitor	Roche
Ripa-Puffer	Thermo scientific
SDS-Gel	BIO-RAD
SPURR-Medium	Polysciences
Sucrose	Sigma Aldrich
Toluidinblau	Fa. Merck
TritonX-100	Sigma Aldrich
Tween 20	Sigma Aldrich

2.1.5 Pufferlösung

Die Zusammensetzung der verwendeten Pufferlösungen für Larvenaufzucht, Western Blot und Immunfluoreszenzmikroskopie sind in den Tabellen 6 – 8 aufgelistet.

Tab. 6: Danieau-Puffer für die Larvenaufzucht

3x Danieau-Puffer (2,5 l)	
dH ₂ O	2050 ml
2,9 M NaCl	150 ml
70 mM KCl	75 ml
40 mM MgSO ₄	75 ml
60 mM Ca(NO ₃) ₂ x 4 H ₂ O	75 ml
0,5 M Hepes	75 ml
30% Danieau-Puffer (10 l)	
dH ₂ O	9 l
3x Danieau-Puffer	1 l

Tab. 7: Pufferlösungen für die Durchführung der Western Blots

10x SDS-Page Laufpuffer (1 l)	
1920 mM Glycin	144 g
250 mM TRIS	30,25 g
1% SDS	10 ml
Auf 1 l mit dH ₂ O auffüllen	
1x SDS-PAGE Laufpuffer (1 l)	
dH ₂ O	890 ml
10x Laufpuffer	100 ml
10% SDS	10 ml
10x TBS (1 l)	
TRIS	12,11 g
NaCl	87,66 g
Auf 1 l mit dH ₂ O auffüllen, pH bei 7,6 einstellen	
1x TBST (1 l)	
dH ₂ O	900 ml
10x TBS	100 ml
Tween-20	0,1 ml
Transfer-Puffer (1 l)	
10x Laufpuffer	100 ml
Methanol	200 ml
dH ₂ O	700 ml
Milchpulver-Lösung (500 ml)	
Milchpulver	25 g
1x TBST	500 ml

Tab. 8: Pufferlösungen für die Fluoreszenzmikroskopie

10x PBS (1 l) (Phosphat-Puffer)	
1370 mM NaCl	80 g
27 mM KCl	2 g
100 mM Na ₂ HPO ₄	14,4 g
18 mM KH ₂ PO ₄	2,4g
1x PBS (1 l)	
10x PBS	100 ml
dH ₂ O	900 ml
Tris-EDTA-Puffer (200 ml)	
10 mM Tris-Base	0,242 g
1 mM EDTA	400 µl
0,05% Tween 20	100 µl
Auffüllen auf 200 ml mit dH ₂ O	
Auf pH 9,0 einstellen	

2.1.6 Mikroskopie und Laborausstattung

Tabelle 9 listet die wichtigsten Laborgeräte und Mikroskope, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, auf. Verwendet wurden insbesondere ein TEM der Firma Joel® sowie Fluoreszenz- und Lichtmikroskope der Firmen Nikon® und Zeiss®.

Tab. 9: Laborausstattung und Mikroskopie

Art	Name	Hersteller
Elektronenmikroskop	Joel® 1400 Plus	Joel GmbH
Fluoreszenzmikroskop	Nikon® Eclipse Ti2	Nikon Instruments Europe B.V.
Stereo-Zoom-Mikroskop	AxioZoom.V16	Zeiss MicroImaging GmbH
Lichtmikroskop	Nikon® H550S	Nikon Instruments Europe B.V.
Stereomikroskop	Stemi 508	Zeiss MicroImaging GmbH

Tab. 9: Laborausstattung und Mikroskopie

Thermozykler	T100 Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories Inc.
Blot-Transfer-System	Trans-Blot Turbo	Bio-Rad Laboratories Inc.
Mikrotom	Ultracut- Mikrotom	Leica
Spectrophotometer	µQuant	BIO-TEK Instruments

2.1.7 Software

Für die Erstellung und Bearbeitung der Bilddaten wurden die in Tabelle 10 aufgelisteten Software-Programme verwendet.

Tab. 10: Verwendete Software

Name	Anwendung
ZEN 2.6	Hellfeldmikroskopie
NIS-Elements Nikon®	IFM
Microsoft® Excel	Proteinquantifizierung
TEM Center	TEM

2.2 Methoden

2.2.1 Fischhaltung und Aufzucht

Die Haltung und Aufzucht der in dieser Arbeit verwendeten Zebrafischlinien fand nach international geltenden Standards in Aquarien bei 28°C Wassertemperatur und 500 µS Leitfähigkeit statt. (Lawrence, 2007; Westerfield, 2007). Der pH-Wert wurde durch regelmäßige Kontrollen bei 7,4 gehalten und gegebenenfalls mittels Natriumhydrogencarbonat automatisch justiert. UV-Licht und mechanische sowie biologische Filter sorgten für eine adäquate Reinigung des Wassers. Gefüttert wurden die adulten Zebrafische zweimal täglich mit Artemienlarven und bei Bedarf Trockenfutter. Am Wochenende erfolgte die einmalige Artemien-Fütterung. Über einen kontinuierlichen Ein- und Ausstrom herrschte in den Aquarien eine stete Zirkulation. Die zirkadiane Rhythmik wurde mittels 14-stündiger Licht- und 10-stündiger Dunkelheits-Phasen simuliert. Die Aufzucht der Zebrafischembryonen nach Verpaarung der adulten Wildtyp Zuchttiere erfolgte in 30%igem Danieau-Puffer bei 28°C im Inkubator. Die ersten 24 Stunden nach Injektion erfolgte zudem der Zusatz von 0,00001 % Methylenblau. Dies hilft der Ausbreitung von Krankheiten vorzubeugen und signalisiert durch Blaufärbung des Dottersacks ein Versterben der Larve. Auf die Zugabe von PTU, zur Unterdrückung der Pigmentbildung, wurde bei den angewandten Versuchsreihen verzichtet, da eine in-vivo-Bildgebung nicht durchgeführt wurde.

2.2.2 Mikroinjektion von Morpholino-Oligonukleotiden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Morpholino-Oligonukleotide (MO) der Firma Gene Tools LLC verwendet. Die genaue Nukleotidsequenz der verwendeten Substanzen ist dem Materialteil auf Seite 30 zu entnehmen. Es handelt sich dabei um translationsblockierende Morpholinos, die die Translation der Pomt1-mRNA inhibieren, sowie um einen standardisierten Kontroll-MO der Firma Gene Tools, der keine Wirksamkeit im Zebrafisch besitzt und einzig den Injektionsprozess simuliert.

Die Lagerung der Morpholinos erfolgte luftdicht versiegelt und lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Zur Ansetzung der Injektionslösung wurden 5 µl Pomt1-MO oder 2,5 µl Kontroll-MO mit 2 µl Phenolrot, 1 µl CutSmart-Puffer und 12 bzw. 14,5 µl dest. Wasser

versetzt, sodass jeweils eine 20 µl Proben-Mix pro Fraktion angesetzt wurde. Anschließend erfolgte eine kurze „Aktivierung“ für 10 min bei 70°C auf dem Heizblock. Am darauffolgenden Tag wurde der Morpholino-Mix ein weiteres Mal kurz auf dem Heizblock bei 65°C „aktiviert“. Anschließend wurden jeweils x nl (entsprechend einer Sphere von 150 nm Durchmesser) in den Dottersack der Zebrafisch-Eier injiziert, die sich zu diesem Zeitpunkt im 0-1 hpf Zeitfenster befanden und im Einzellstadium vorlagen. Dies sollte das Risiko einer „Mosaik-Injektion“ verringern.

2.2.3 Western-Blot

An 3 und 5 dpf wurden jeweils 40 Zf-Larven der Gruppen Pomt1-MO1, Pomt1-MO2, Kontroll-MO und WT in 1,5 ml Eppis gesammelt und auf Trockeneis gelagert. Anschließend wurden die Proben jeweils mit 80 µl Ripa-Puffer und 3,2 µl Protease-Inhibitor der Firma Roche versetzt und 30-min auf Eis inkubiert. Mit einem Kunststoff-Mörser wurden die Proben daraufhin homogenisiert und für 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Schließlich erfolgte die Zentrifugation der Proben bei 13.000 rpm für 1 Minute. Der flüssige Protein-Überstand wurde sorgsam ohne Berührung des festen Pellets in ein neues 1,5 ml Eppi überführt und als Probe bei -80°C gelagert. Die Proteinquantifizierung erfolgte nach Protokoll mit Hilfe des Pierce™ BCA Protein Assay Kits der Firma Thermo Fisher® und einer Mess-Absorption von 562 nm.

Am darauffolgenden Tag erfolgte die Erhitzung der Proben bei 95°C auf dem Heizblock. Daran anschließend wurde das zuvor berechnete Volumen der einzelnen Fraktionen in die jeweiligen Taschen des SDS-Gel pipettiert, sodass jede Gel-lane 50 µg Protein beinhaltete. Die SDS-Gel-Kammer wurde mit 1-fach Laufpuffer gefüllt, und die Proben bei 60 bis 90 V für 120 Minuten im Gel aufgetrennt. Eine PVDF-Membran wurde kurz in 100 % Methanol aktiviert, mit dest. H₂O gewaschen und in 1-fach Transfer-Puffer equilibriert. Das Gel wurde anschließend mittels Whatman-Papiers und PVDF-Membran für ca. eine Stunde bei 250 mA geblottet. Daraufhin wurde die Membran mit Milchpulverlösung für ca. eine Stunde blockiert und anschließend die Inkubation mit dem Primärantikörper bei 4°C übernacht. Am darauffolgenden Tag erfolgten 5 x 5 min Waschschrte mit TBST und Inkubation mit Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur. Abschließend wurden der letzte Waschschrte mit 5 x 5 min TBST bei RT, die Zugabe der Chemolumineszenz-Lösung Super Signal West Femto der Firma Thermo Fisher für 5 min

bei RT und darauffolgend die Bildakquisition mittels Spektrophotometer durchgeführt (s. Tab. 9). Die Signalintensitäten der Proben wurden jeweils mit einer β -actin-Kontrolle korreliert.

2.2.4 Semidünnschnitt-Lichtmikroskopie

Fischelarven im Alter von 4 dpf (days post fertilization) wurden mittels einer Überdosis des Narkosemittels MS 222 (Tricain) getötet und die Fische kaudal der Brustflossen durchtrennt, anschließend in Fixierlösung bestehend aus 1,5% Glutaraldehyd, 1% Paraformaldehyd und 3% Sucrose, gelöst in 0,1 M Cacodylatpuffer, fixiert. Für die weitere Aufarbeitung zur Visualisierung im TEM wurden die Proben in Cacodylatpuffer gespült (3x10 Minuten), mit 1% Osmiumtetroxid, gelöst in 0,1 M Cacodylatpuffer nachfixiert und in einer aufsteigender Alkoholreihe (zweimal je 10 Minuten in 30, 50, 70, 80, 90 und dreimal in 100% bei Raumtemperatur) entwässert, für 2 mal 15 Minuten in Propylenoxid inkubiert und in Spurr-Einbettungsmedium überführt. Die Proben wurden zweimal neu in das Medium eingebettet, bevor sie darin ausgebettet wurden. Die Polymerisierung erfolgte zunächst für eine Stunde bei 25°C unter Vakuum, dann bei 60°C für 16 Stunden. Aus den in Spurr-Medium eingebetteten Präparaten, die an der Diamantfräse (Fa. Leica) und mit Glasmessern (aus eigener Herstellung) zugetrimmt werden, erfolgte die Anfertigung der Semidünnschnitte (ca. 1 μ m Schnittdicke), als Übersichtspräparat. Diese Schnitte werden mit Hilfe eines Ultramikrotoms (Power Tome Ultramicrotome) mit einem Histodiamanten geschnitten (ca. 10 μ m Schnittdicke), auf Objektträger in einem Aqua bidest Tropfen aufgefangen und auf der Wärmestreckbank bei 60°C getrocknet. Nach der Trocknung erfolgt die Färbung der Schnitte mit dem Farbstoff Toluidinblau/Pyronin G für 30 bis 60 sec. Anschließend wird der Schnitt mikroskopiert und zur besseren Haltbarkeit mit DepEx mit Hilfe eines Deckgläschens eingedeckelt.

Die Erzeugung der Bilder erfolgte mittels eines Nikon®H550S-Mikroskops bei 100-facher Vergrößerung.

2.2.5 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Probenherstellung für die TEM erfolgte nach demselben Ablauf wie für die Semidünnschnitte (s.o.). Dies wurde extra so gewählt, um nach Betrachtung der

Semidünnschnitte die entsprechenden Proben nachzubehandeln und gezielt die *regions of interest (ROI)* in der TEM abbilden zu können.

Für die Untersuchung im TEM (1400 Plus Jeol®) wurden 70 nm dicke Ultradünnschnitte angefertigt und auf Kupfernetze aufgezogen. Diese wurden mit einer 2%igen Bleizitratlösung kontrastiert und im TEM visualisiert. Die Bildakquisition erfolgte bei 120 kV Elektrodenspannung bei zwei bis zehntausendfacher Vergrößerung in Assistenz von Dr. Jessica Lambertz.

2.2.6 Immunfluoreszenzmikroskopie

Für die Herstellung der Schnitte wurden 4 dpf alte Zebrafischlarven der Fraktionen Pomt1-MO1, Kontroll-Morpholino und uninjizierte Wildtypen in 4%igem Paraformaldehyd (PFA) gesammelt. Anschließend wurden die Larven in Agarose eingebettet. Die Dehydrierung erfolgte daraufhin mit einer aufsteigenden Ethanol-Reihe bei Raumtemperatur. Jeweils eine Stunde in 30, 40, 50, 60 und 70%igem EtOH. Gefolgt von einer nächtliche Inkubation der Proben in 70% EtOH. Am darauffolgenden Tag wurden die Larven in Paraffinblöcke eingebettet. Im Anschluss an die Paraffineinbettung wurden mittels eines Ultracut-Mikrotoms (Leica®) 10 µm dicke Schnitte angefertigt und auf einen Objektträger überführt. Die Entparaffinierung erfolgte durch eine absteigende Alkoholreihe beginnend mit Xylol (3 x 5 min), 100% EtOH (3 x 5 min), 90, 70 und 50% EtOH (jeweils 5 min.). Daran anschließend erfolgten Waschschrte mit destilliertem Wasser (3 x 5 min) und die Überführung der Schnitte in 1x PBS. Daraufhin wurden die Proben für 20 min bei 80°C in Tris-EDTA-Puffer inkubiert (*heat induced antigen retrieval*) und bei Raumtemperatur (RT) abkühlen gelassen. Weitere Waschschrte mit 1x PBS (2 x 5 min). Permeabilisierung der Schnitte mittels in 1x PBS gelöstem TritonX-100 (0.1%) für 10 min bei RT. Erneuter Waschschrte in 1x PBS (2 x 5 min) und darauffolgend die Blockierung mittels NGS für 2 Stunden bei RT. Inkubation mittels in NGS gelöstem Primärantikörper (die verschiedenen Konzentrationen sind der Tab. 2 zu entnehmen) bei 4°C Übernacht.

Am darauffolgenden Tag Entfernen des Primärantikörpers und erneuter Waschschrte in 1x PBS (2 x 5 min). Daran anschließend erfolgt die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Alexa-Fluor546 Invitrogen) für 2 Stunden bei RT. Weitere Waschschrte mit 1x PBS und dest. Wasser (jeweils 2 x 5 min) und abschließend die Eindeckung mit

Fluorescent Mounting Medium. Eine genaue Liste der verwendeten Primär und Sekundärantikörper und ihrer Spezifitäten ist dem Materialteil auf Seite 29 zu entnehmen. Die Anfertigung der Bilddaten wurde mit Hilfe des Nikon-ECLIPSE-Ti2-Fluoreszenz-Mikroskops (Nikon Instruments Europe B.V.) mit Anregungs-Wellenlänge von 561 nm und Emissions-Wellenlänge von 640 sowie dem Software-Programm NIS-Elements realisiert.

2.2.7 Hellfeldmikroskopie

Zur Erzeugung der hellfeldmikroskopischen Bilder wurden Fischlarven der beiden Fraktionen Kontroll-Morpholino und Pomt1-MO1-Morpholino zu den Zeitpunkten 1, 2, 3, 4 und 5 dpf selektioniert und anschließend mittels MS 222 paralyisiert und einzeln unter dem Mikroskop Zeis AXIO-Zoom.V16 aufgenommen. Die Aufnahmen erfolgten bei 16-facher Vergrößerung bei einheitlicher Ausrichtung der Fischlarven.

3. Ergebnisse

3.1 Expression von Pomt1 im Zebrafisch

Um nachzuweisen, dass Pomt1 im Zebrafisch exprimiert wird und um die Spezifität des anti-Pomt1-Antikörpers zu bestätigen, wurde eine Western-Blot-Analyse an 3 dpf (*days post fertilization*) und 5 dpf alten Zebrafisch-Larven durchgeführt. Gleichzeitig konnten bei diesen Versuchsreihen bereits die beiden Pomt1-Morpholinos auf ihre Wirksamkeit bezüglich der Expressionsreduktion von Pomt1 hin untersucht werden. Die WB-Analyse zeigte sowohl die für Pomt1 erwartete Bande bei 82 kDa als auch die deutliche Signalreduktion in der Morpholino1-injizierten Fraktion. Diese Ergebnisse ließen sich ebenfalls auf das 5 dpf Larvenstadium übertragen (vgl. Abb. 13). Zu beachten ist die fehlende Signalreduktion in der MO2 – Fraktion. Da auch die Auswirkungen auf den Phänotypen durch die zweite Morpholino-Sequenz (MO2) deutlich schwächer ausgeprägt waren, wurde im weiteren Verlauf der Experimente nur noch MO1 verwendet. Als Kontrolle der Proteinquantität und Gel-Beladung wurde in dieser Versuchsreihe jeweils ein β -actin Western-Blot angefertigt, der in allen Fraktionen die spezifische Bande bei 42 kDa aufwies.

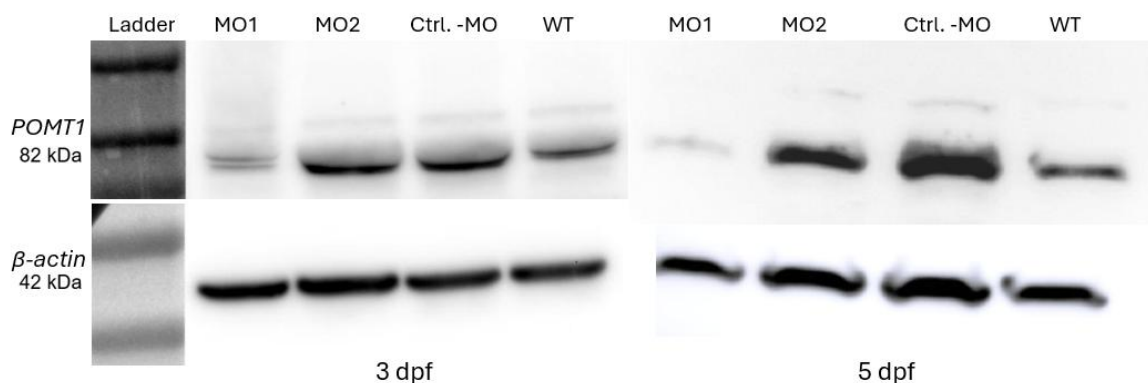


Abb. 13: Western-Blot-Analyse von 3 und 5 dpf alten ZF-Larven. Der obere Bildausschnitt zeigt das für Pomt1 erwartete Bandensignal bei 82 kDa. Zu beiden Zeitpunkten 3 und 5 dpf deutliche Reduktion in der MO1-Fraktion. Die MO2-Fraktion wies zu beiden Zeitpunkten keine signifikante Reduktion auf. Kontroll-MO und uninjizierter WT mit regelrechtem Signal. In der β -actin-Lade-Kontrolle fand sich in allen Fraktionen eine adäquat starke Bande bei 42 kDa.

3.2 Strukturelle Effekte des Pomt1-Morpholino auf die Skelettmuskulatur

Nachdem im ersten Schritt die Effektivität der Translationsblockade durch den Pomt1-Morpholino gezeigt (bzw. reproduziert – siehe Ansar-Ban Paper) werden konnte, sollte nun demonstriert werden, welche Auswirkungen die fehlende Pomt1-Expression auf die Zebrafisch-Skelettmuskulatur hat.

Die Abbildung 14 veranschaulicht in einer ersten hellfeldmikroskopischen Analyse die phänotypischen Auswirkungen auf die allgemeine Entwicklung der Zebrafische im Larvenstadium von 1 bis 5 dpf. Die Pomt1-Morpholino-Gruppe wurden dabei aus Gründen vergleichbarer Untersuchungsbedingungen jeweils mit der Kontroll-Morpholino-Gruppe und nicht mit einer uninjizierten Fraktion verglichen. Dieses Vorgehen wurde auch für die Durchführung aller weiteren Experimente so gewählt. Die morphologische Betrachtung ergab keine signifikanten Strukturanomalien. Die Entwicklung des Kopfes (hier lag insbesondere das Augenmerk auf den Strukturen des Neurocraniums und der Augen, da retinale und neuronale Veränderungen zum erweiterten Pathologie-Spektrum der Dystroglykanopathien gehören), erfolgte unauffällig. Des Weiteren zeigten sich im Bereich der Rumpf- und Schwanzmuskulatur, des Herzens, des Dottersacks sowie der Viszera keine auffälligen Anomalien, sodass von außen betrachtet von einer regelrechten Entwicklung im frühen Larvenstadium ausgegangen werden konnte. Lediglich eine etwas verzögerte *hatching* Geschwindigkeit (das Befreien aus der Eihülle, normalerweise zwischen 2 und 3 dpf) konnten in der MO1- injizierten Larvenpopulation beobachtet werden.

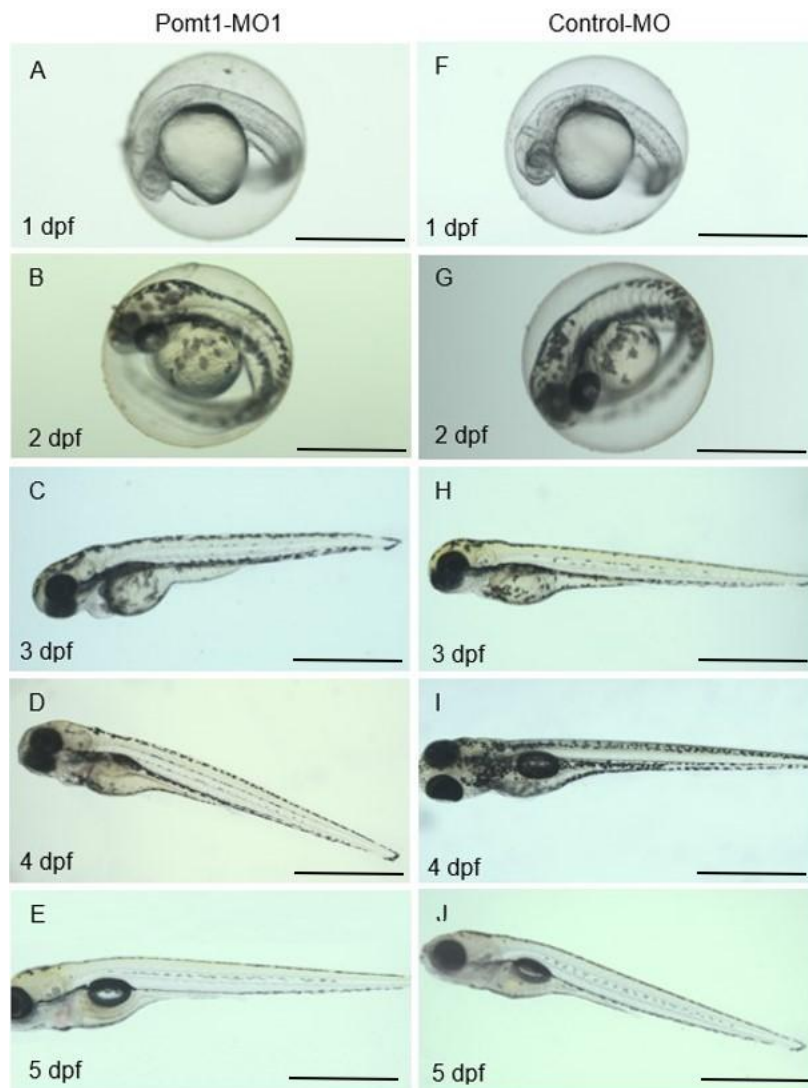


Abb. 14: Hellfeldmikroskopie nach Injektion von Pomt1-MO1. Die linke Spalte (A-E) zeigt die Entwicklung der Larven von 1-5 dpf nach Morpholino-Injektion. Es lassen sich im Vergleich zur Kontroll-Gruppe (F-J) keine auffälligen phänotypischen Veränderungen insbesondere des Kopfes, der Augen oder der Rumpfmuskulatur feststellen (Maßstab 1 mm).

Um zusätzlich zum Western Blot (Abb. 13) den Nachweis zu erbringen, dass Pomt1 in der normalen Zebrafischlarve im Skelett-Muskelgewebe exprimiert wird und unter der Verwendung des Morpholinos supprimiert wird, sowie dass das α -DG durch die Pomt1-Blockade trotz fehlender Glykosylierung nach wie vor an die Außenseite der Zelle transportiert wird, wurde hierfür mittels Immunfluoreszenzmikroskopie (IFM) die in Abb. 15 gezeigte Analyse durchgeführt.

Die Abbildung 15 zeigt Paraffinschnitte von 4 dpf alten ZF-Larven in sagittaler (A, B, E, F) und frontaler (C,D) Ausrichtung bei 40x Vergrößerung unter Verwendung rotfluoreszierender Sekundärantikörper. Die Bilder der rechten Spalte (B,D,F) demonstrieren jeweils die Muskelgewebe-Veränderung in Morpholino-behandelten Fischen, während die linke Spalte (A,C,E) die dazu korrelierenden Schnitte der Kontrollgruppe zeigt. Bei genauerer Betrachtung der Bilder A und B fällt auf, dass das Signal für α -Dystroglykan außerhalb der Zelle entlang der Zellgrenzen liegt.

Es zeigt sich ein unverändertes Signalverhalten der MO1-Gruppe (B) im Vergleich zur Kontrolle (A), was die Annahme bekräftigt, dass α -DG trotz fehlender O-Mannosylierung durch Pomt1-knock-down weiterhin an seinen Platz im DGC transportiert wird. Korrelierend dazu ergab sich das gleiche Bild in der frontalen Ebene. Hier erkennt man das Signal für α -DG, nun zirkumferentiell die Muskelzellen umgebend, während das Signal intrazellulär nur minimal nachzuweisen ist.

Zuletzt sollte dann noch die zu erwartende Suppression von Pomt1 in der Morpholino-Fraktion untersucht werden. Bild F stellt im Vergleich zur Kontrolle (E) ein deutlich vermindertes unspezifisches Fluoreszenzsignal dar, sodass neben dem WB auch die IFM eine adäquate Suppression der Pomt1-Expression zeigt.

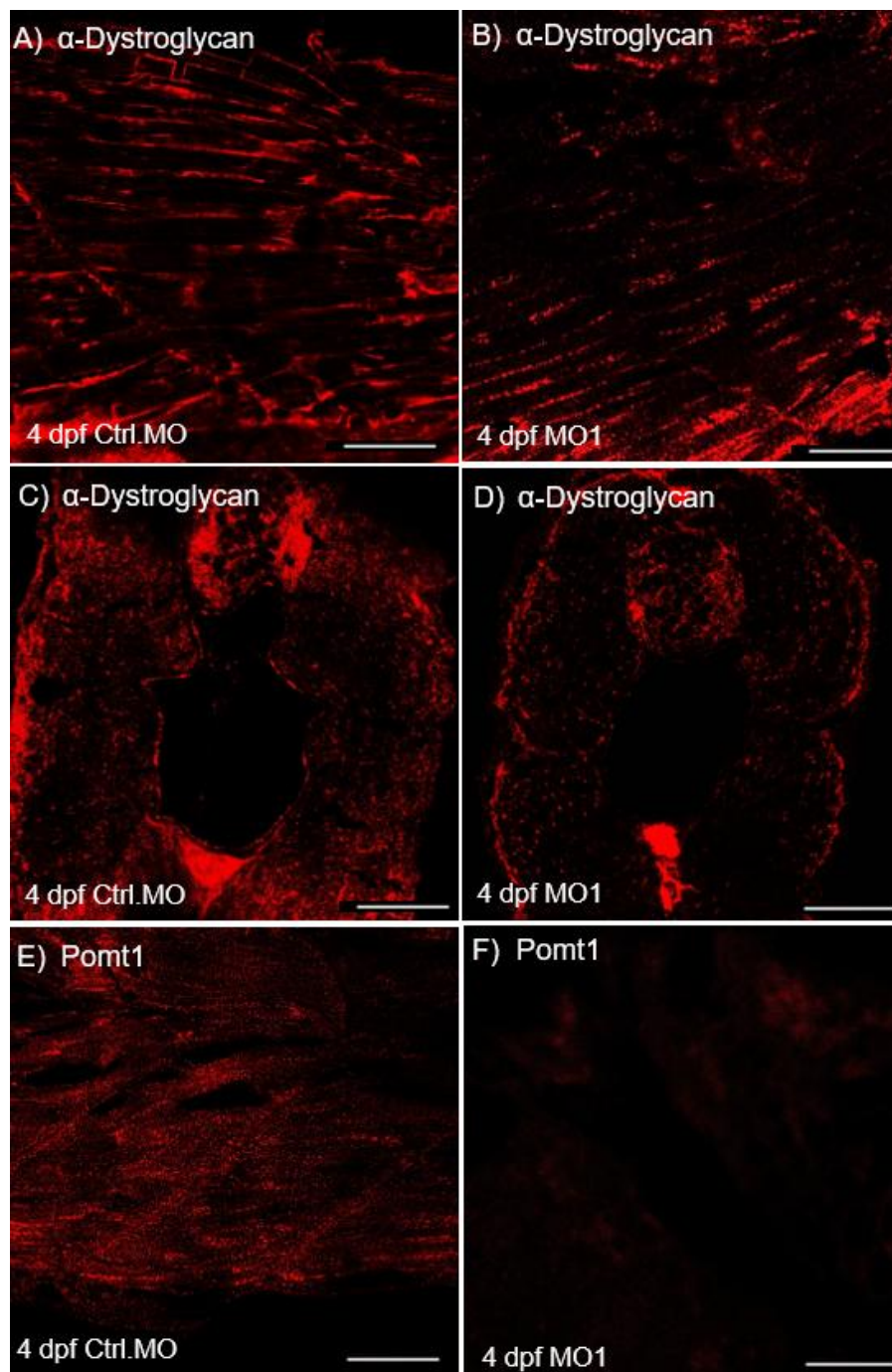


Abb. 15: Immunfluoreszenzmikroskopie von anti- α -DG (A-D) und anti-Pomt1 (E, F) in 4 dpf alten ZF-Larven. Bilder A, C, E zeigen jeweils die Veränderungen in der Ctrl.MO-Fraktion. B, D, F stellen die jeweils korrelierenden Darstellungen in der MO1-Gruppe dar. A-D demonstriert die unveränderte Expression und Lokalisation von α -DG im Pomt1-MO sowohl in sagittaler (A, B) als auch in frontaler (C, D) Ebene. E und F verdeutlichen die Suppression von Pomt1 mit lediglich schwachem und unspezifischem Signalverhalten in

der MO-Fraktion (F) im Vergleich zur Kontrolle (E) (sek. AK. Alexa Fluor 555, Maßstab 0,5 mm).

Nachdem sich in der Hellfeldmikroskopie (Abb. 14) eine regelrechte/normale Entwicklung der Larven veranschaulichen ließ und in der IFM (Abb. 15) der Nachweis der Pomt1 und α -DG Expression bestätigte, sowie der Pomt1 MO-Reduktion, sollten im nächsten Schritt die Auswirkungen des Pomt1-Morpholino-*knock-downs* auf die Zebrafisch-Skelettmuskulatur genauer untersucht werden.

Hierzu wurden in einem ersten Ansatz lichtmikroskopische Semidünnschnitte mit Toluidin-Blau-Färbung angefertigt. Sie demonstrieren exemplarische Ausschnitte aus unterschiedlichen Kompartimenten der paravertebralen Rumpfmuskulatur. Die Abbildung 16 veranschaulicht in der linken Spalte die vier Kontroll-MO-Schnitte, jeweils zwei in der frontalen (A, B) und zwei in der sagittalen Ebene (C, D). Demgegenüber sind repräsentative Vergleichsschnitte aus der MO1-Population (E-H) dargestellt. Es zeigt sich der für Pomt1 defiziente Muskulatur zu erwartende Charakter mit dissoziierten Zellverbänden und unruhigem Gewebeaspekt als lichtmikroskopischem Korrelat der gestörten Zell-Matrix-Interaktion. Insbesondere die frontalen Schnitte stellen eine ähnliche Gewebsarchitektur dar, wie sie in Muskelbiopsien aus WWS-Patienten im Initialstadium beschrieben wurden (vgl. hierzu mit Abb. 8).

Die anderen - auf den Schnitten mitabgebildeten - Organe, wie Rückenmark, Chorda dorsalis, Viszera oder Schwimmblase zeigten keine morphologischen Anomalien in der MO1-Fraktion, sodass sich der pathologische Effekt lediglich auf die Skelettmuskulatur auszuüben scheint.

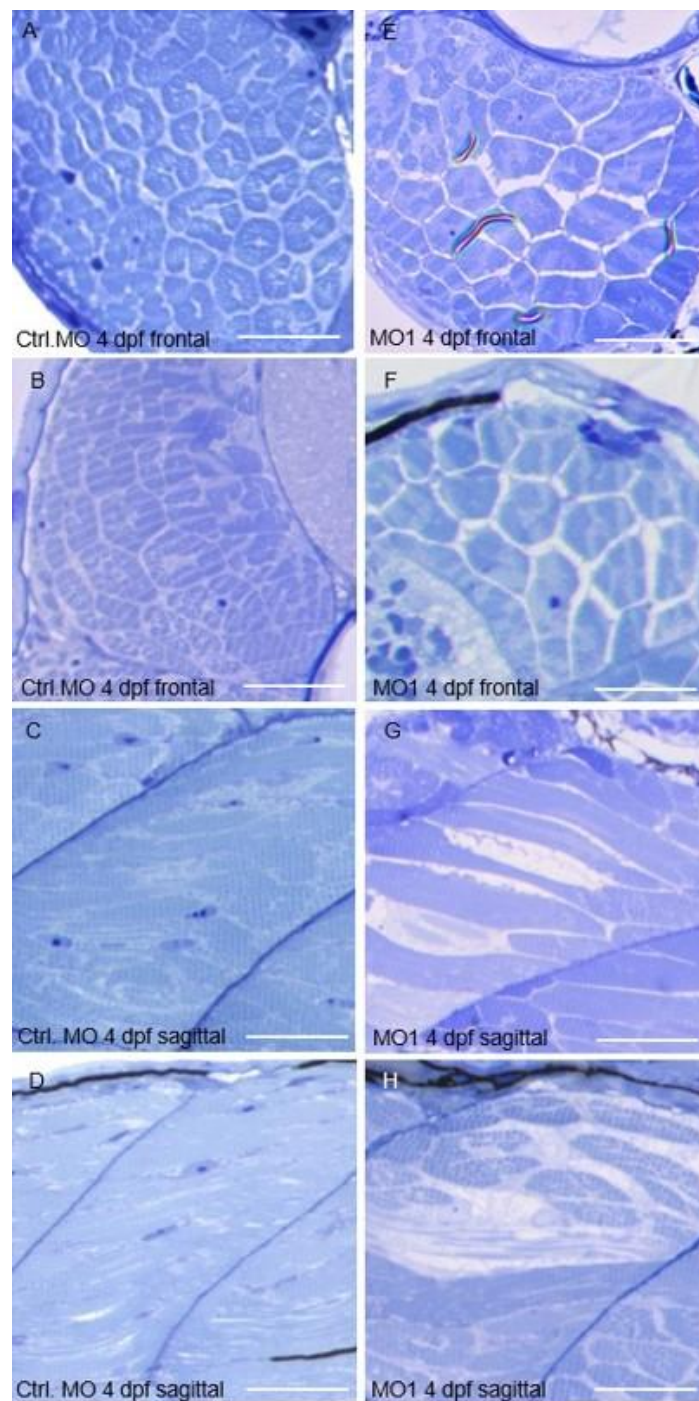


Abb. 16: Lichtmikroskopie von Semidünnschnitten nach Pomt1-MO1 Injektion 4 dpf alter ZF-Larven in frontaler (A,B,E,F) und sagittaler (C,D,G,H) Ebene. Die rechte Spalte zeigt repräsentativ die Veränderungen in der MO1-Fraktion (E,F,G,H). Links sind die Referenzschnitte aus der Kontroll-MO Gruppe dargestellt (A,B,C,D). Bilder E und F demonstrieren im Vergleich zur Kontrolle (A, B) das pathologische Korrelat der Pomt1-Defizienz mit Diskonnektion des Muskel-Zellverbands. Entsprechende Resultate liefert auch die sagittale Ebene (G, H) mit Zelldestruktion und verändertem Muskel-

Gewebeaspekt im Vergleich zur homogenen Struktur in der Kontrolle (C, D) (Färbung Tuloidin-Blau, Maßstab 0,5 mm).

In einem nächsten Schritt sollten dann die in der Lichtmikroskopie gezeigten Anomalien in der ultrastrukturellen Analyse aufgegriffen werden. Hierzu wurden mittels Transmissionselektronenmikroskops (TEM) hochaufgelöste Bildserien erstellt, die die möglichen Veränderungen auf zytologischer Ebene darstellen sollten.

Die Abbildung 17 zeigt sechs solcher TEM-Bilder. Zu sehen sind Zell-Zell-Übergänge aus Präparaten der Rumpfmuskulatur in 4 dpf alten Zebrafisch-Larven. Die Bilder A, C und E zeigen jeweils die Kontroll-Gruppe und die Abbildungen B, D und F die dazu passenden Referenzschnitte aus Pomt1-Morpholino behandelten Larven. Bei genauerer Betrachtung der Bilder A, C, E lassen sich die Zellgrenzen hier als feine Linien zwischen den benachbarten Zellen abgrenzen. Gleichzeitig liefert der Querschnitt einen guten Einblick über die generelle Zytoarchitektur der Zebrafisch-Skelettmuskelzelle im Larvenstadium. Zieht man nun die Bilder B, D, F aus der Morpholino-Fraktion zum Vergleich heran, fällt auf, dass der Zell-Zell-Abstand nun deutlich verbreitert erscheint. Die Zellen verlieren nahezu vollständig den Kontakt zueinander, lediglich an vereinzelten Stellen scheinen die Zellen noch miteinander verbunden zu sein. Ein Beispiel einer solchen Kontaktstelle sieht man unter anderem in Bild D im oberen rechten Bildquadranten. Zudem zeigen sich Bereiche, in denen das Sarkolemm Zeichen der Destruktion mit ausgefranstem oder diskontinuierlichem Verlauf aufweist (vgl. mit *-markiert in D, F).

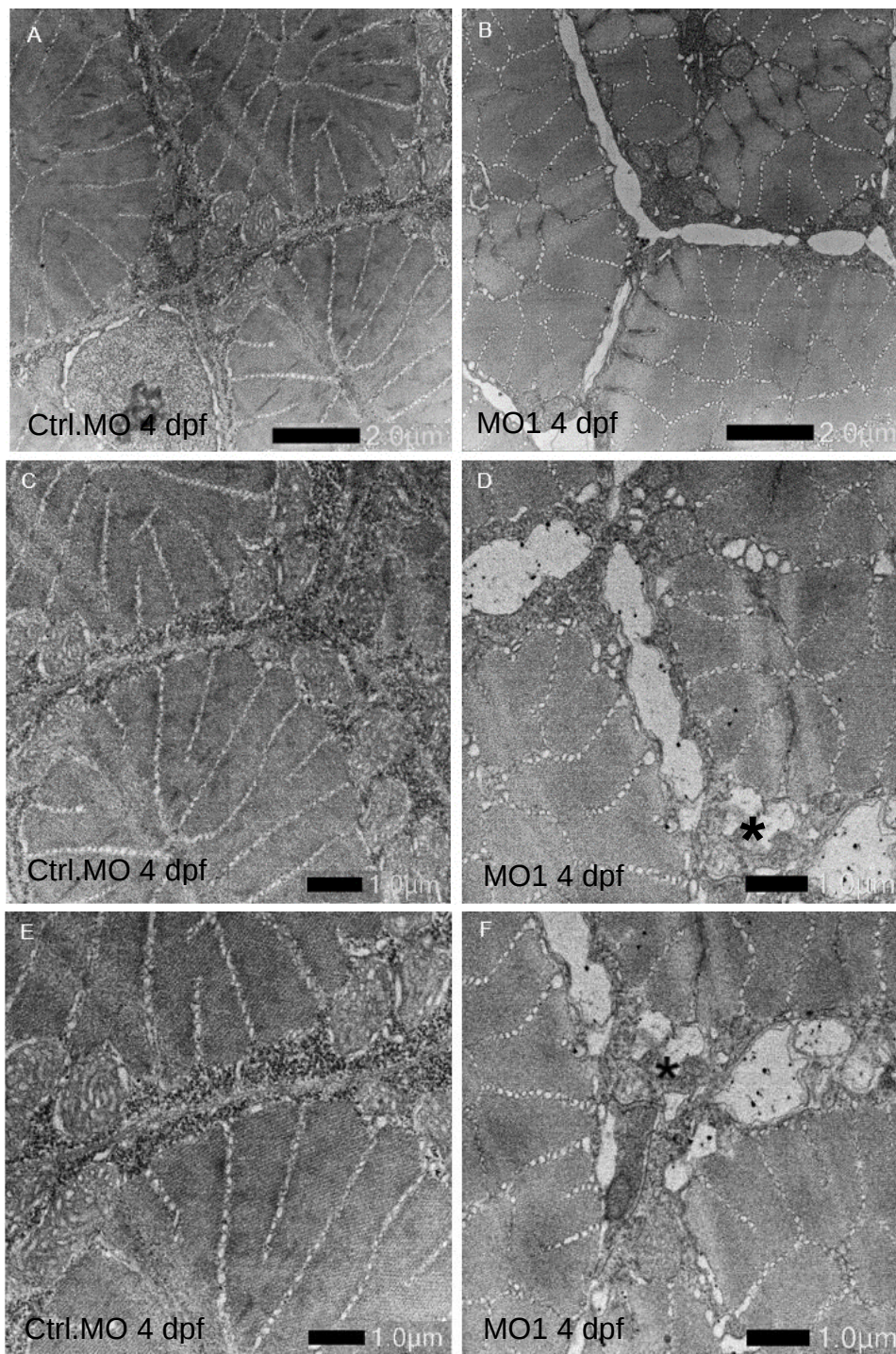


Abb. 17: TEM von Skelettmuskelzellen frontal - 4 dpf alter ZF-Larven nach Pomt1-MO1 Injektion. Bild A, C, E zeigen jeweils benachbarte Muskelzellen der Kontroll-Gruppe in frontaler Schnitfführung. Man beachte die unmittelbare Nähe der Zellen, die lediglich durch die Basalmembran getrennt werden, die als feine Linie zwischen den Zellen abgegrenzt werden kann. Im Vergleich dazu offenbart der Pomt1-MO1 (B, D, F) die α -

DG-Defizienz durch Auftrennung der Zellverbindungen mit Destruktionen im Bereich des Sarkolemmms und der Basalmembran.

Zur Überprüfung und Erweiterung der zuvor hier beschriebenen Befunde wurden zusätzlich elektronenmikroskopischen Aufnahmen in der sagittalen Ebene angefertigt. Auch hierzu wurde wieder Gewebe der Rumpfmuskulatur von 4 dpf alten Zebrafischlarven verwendet. Die Abbildung 18 stellt -vergleichbar mit Abbildung 17- die Kontroll-Gruppe auf der linken Seite (Bilder A, C) und die Morpholino-Gruppe rechts dar (Bilder B, D). Hier stellt sich die quergestreifte Muskelarchitektur mit an den Sarkomeren angrenzenden Bereichen des SR und Mitochondrien dar. Man beachte in Bild (A) die Zell-Zell-Grenze zweier benachbarter Muskelzellen, die als dunkle Linie durch das Bild zu verfolgen ist (markiert durch *). Abbildung C zeigt an dieser Stelle einen T-Tubulus, also eine Einziehung des Sarkolemmms in das Zellinnere.

In Übereinstimmung mit den zuvor beschriebenen Befunden aus den Querschnitten zeigt sich auch hier in den Muskelpräparaten der Pomt1-Morpholino Fische das Bild erweiterter Interzellularräume, mit nahezu vollständiger Dissoziation des Gewebeverbandes. Lediglich an vereinzelt Stellen lassen sich Verbindungen anhand sarkolemmaler Ausziehungen nachweisen. Bild D stellt eine Vergrößerung des linken oberen Bildquadranten von Bild B dar. Zu sehen ist hier ein fokaler Riss des Sarkolemmms, als weiteres Korrelat für die reduzierte Belastbarkeit des Sarkolemmms in Pomt1 defizienten Zebrafisch-Larven.

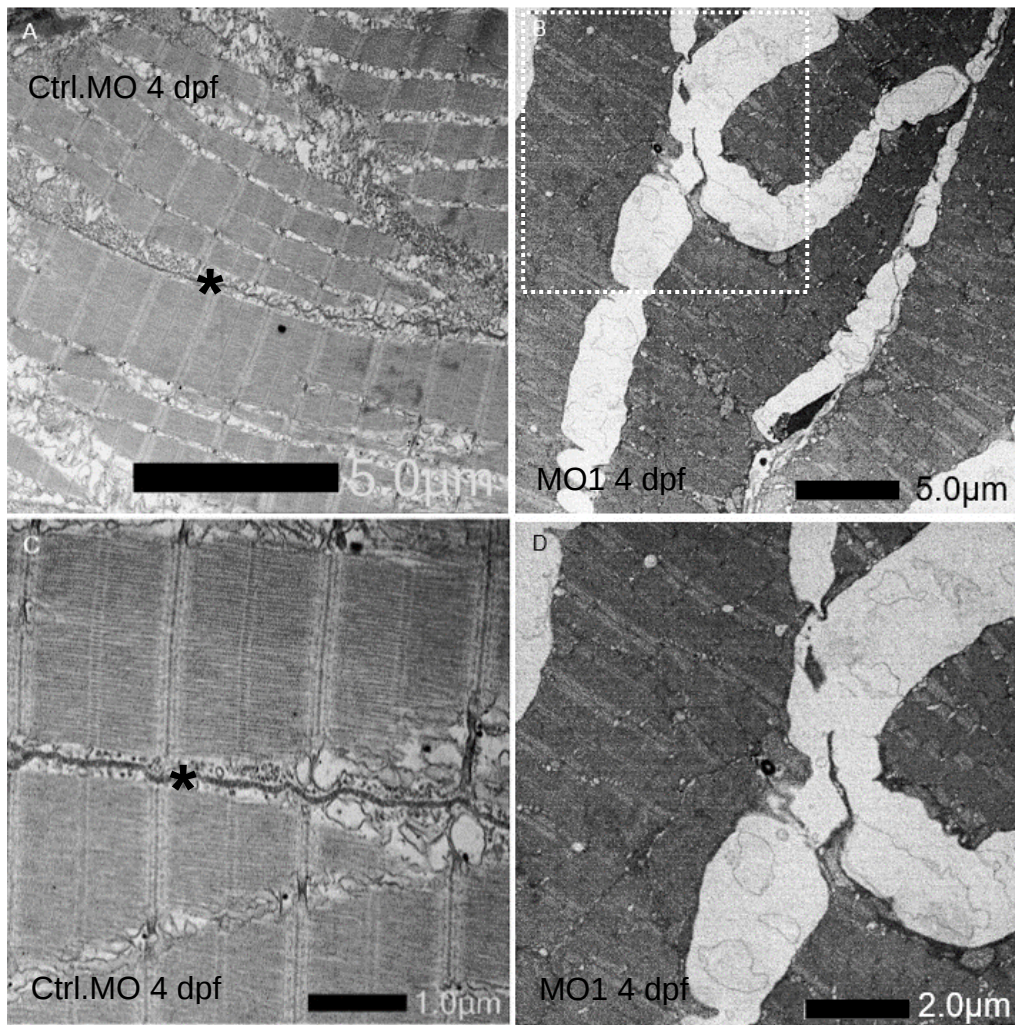


Abb. 18: TEM Skelettmuskelzellen sagittal - 4 dpf alte ZF-Larven nach Pomt1-MO1 Injektion. Ausgeprägte Abscherung des Zellverbands (B, D) mit Einrissen des Sarcolemms (D) und lediglich vereinzelt interzellulären Haftstellen. Bild D ist eine Vergrößerung aus B – weiß gestrichelter Kasten in B. (A) und (C) verdeutlichen den normalen Aspekt zweier unmittelbar angrenzender Muskelzellen. Die angrenzenden Plasmamembranen stellen sich als dunkle Linie zwischen den Sarkomerstrukturen dar. Bild C zeigt rechts-zentral den Eintritt eines T-Tubulus (Einstülpung des Sarcolemms) in das Innere der Muskelzelle. Mit *-markiert wurde die Zell-Zell-Grenze zweier benachbarter Muskelzellen.

3.3 Ultrastrukturelle Analyse der Zebrafisch-Skelettmuskulatur

Mit dem Ziel, die Zebrafischlarve (≤ 5 dpf) als potenten Modellorganismus für das Spektrum der Muskeldystrophie-Erkrankungen und Muskelerkrankungen generell weiter zu etablieren, soll ein zusätzlicher Aspekt dieser Arbeit sich mit der Thematik der allgemeinen Zytoarchitektur der Skelettmuskulatur des Zebrafisches und hier insbesondere der des Larvenstadiums im Vergleich mit der von höherem Vertebraten- wie beispielsweise Mäuse - beschäftigen.

Dafür wurden im Rahmen dieses Projektes licht-, elektronen- sowie fluoreszenzmikroskopische Bildserien von Zebrafischen im Larven- und Adultstadium sowie von Mausmuskelpreparaten aus dem M. quadriceps femoris adulter Mäuse angefertigt. Hierbei lag der Fokus besonders auf der ultrastrukturellen Analyse elektronenmikroskopischer (TEM) Bilder, um Gemeinsamkeiten, aber insbesondere auch Unterschiede in der Skelettmuskulatur bei den verschiedenen Modellorganismen festzustellen. Die Abbildung 19 zeigt exemplarisch ein Übersichtsbild eines kleinen Gewebeverbandes aus der Rumpfmuskulatur einer 4 dpf alten WT-Zebrafischlarve.

Auf dem gezeigten Ausschnitt sieht man ca. sieben einander angrenzende Muskelzellen im Querschnitt. Zentral sind zwei in ihrer vollständigen Zirkumferenz abgebildet. Die gestrichelten schwarzen Pfeile demonstrieren die Zellgrenzen einer der beiden zentralen Zellen. Es zeigt sich hierbei ein nahezu unmittelbarer interzellulärer Kontakt. Die Zellen wirken wie „aneinandergeschweißt“. Ebenfalls abgebildet sind zwei Nuclei (schwarze Pfeile), leicht erkennbar am Nucleolus und dem paranucleärem Raum. Die Position des Zellkerns ist ähnlich wie in der Skelettmuskelzelle höherer Vertebraten zumeist subsarcolemmal. Andere Anschnitte wiesen Zellkerne in zentraler Lokalisation auf, was dafürspricht, dass auch im Zebrafisch eine frühembryonale Wanderung der Zellkerne von zentral nach peripher stattfindet.

Auffälligstes Merkmal der gezeigten Abbildung ist allerdings die Formation der Myofilamente. Anders als beispielsweise in humaner Skelettmuskulatur liegen die Myofilamente in der Zebrafischlarve nicht in einzelnen, von SR und Mitochondrien umgebenden Säulen vor. Vielmehr stellt sich eine ovale einzelne Kolumne dar, die nahezu das gesamte Zellausmaß einnimmt und vom restlichen Cytoplasma gut abgegrenzt erscheint. Diese Struktur, die den quer angeschnitten Myofilamenten (dicke weiße Pfeile)

entspricht, wird von SR „radspeichenartig“ von peripher nach zentral konvergierend, durchzogen (vgl. dünne weiße Pfeile). Die Mitochondrien (gestrichelte weiße Pfeile) liegen in Paketen angeordnet paranucleär und subsarkolemmal in Bündeln geordnet und nicht wie in humaner Skelettmuskulatur unmittelbar angrenzend an die Myofilamente.

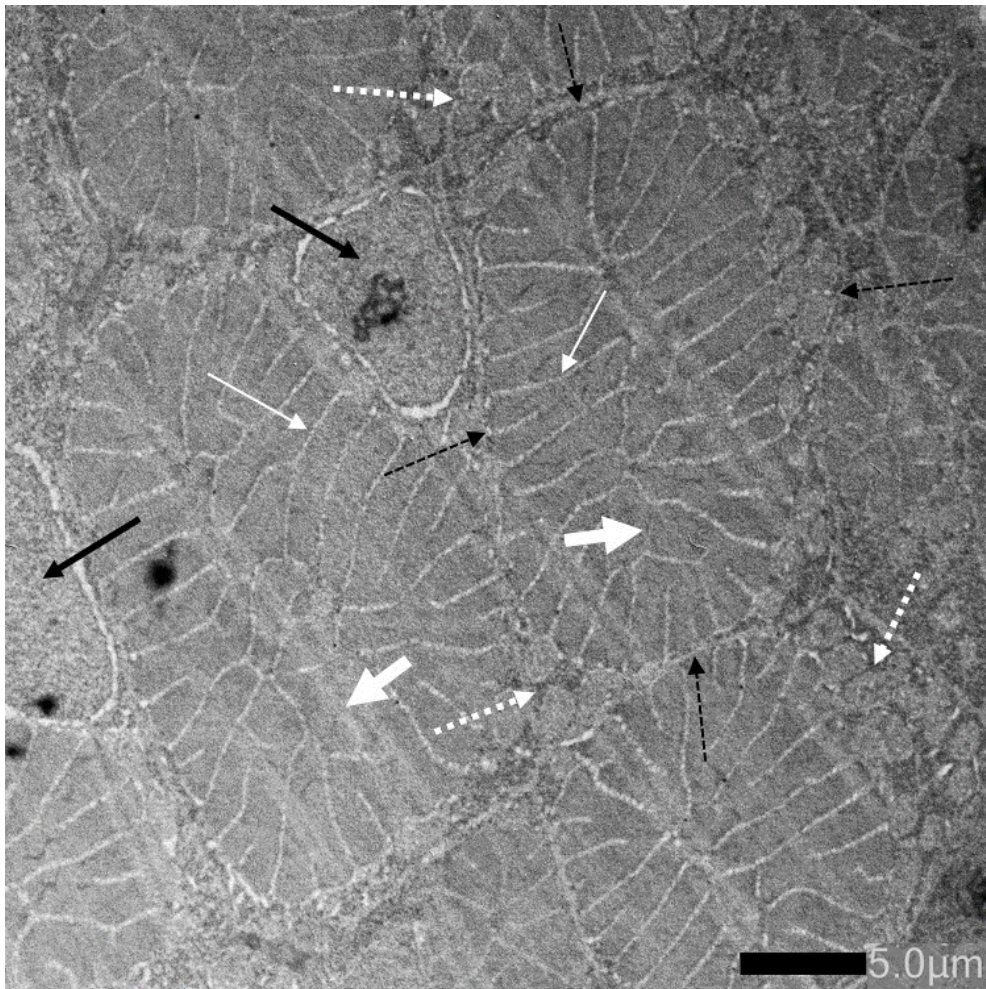


Abb. 19: TEM Skelettmuskulatur frontal - 4 dpf WT-ZF-Larve. Übersicht eines Muskelzellverbands. Man beachte die subsarkolemmale Lage der Nuclei (schwarze Pfeile) und der Mitochondrien (weiße gestrichelte Pfeile), die gruppiert räumlich getrennt von den Myofilamenten (dicker weißer Pfeil) liegen. Das ovale Myofilamentpaket wird radspeichenförmig durchzogen von SR (dünne weiße Pfeile). Zwischen den Zellen, abgrenzbar als feine Linie die Basalmembran (gestrichelte schwarze Pfeile)

Betrachtet man eine solche „Myofilamentsäule“ nun in sagittaler Schnittführung (vgl. Abb. 20), zeigt sich auch in der Zebrafischlarve die geordnete Sarkomerstruktur (gestrichelte schwarze Pfeile weisen auf Z-Linie). Man erkennt ebenfalls die Sarkomerformel

$$\mathbf{Z - \frac{1}{2} I - A - H - M - H - A - \frac{1}{2} I - Z.}$$

Auch die Sarkomerlänge von 1-1,5 µm im vollständig kontrahierten bis 3-3,5 µm im vollständig relaxierten Zustand entspricht der von Säugetieren wie Mensch oder Maus. Angrenzend an die Sarkomere finden sich dünne Bereiche mit SR (schwarze Pfeile), die jeweils auf Höhe der Z-Scheibe eine Triadenstruktur (dicker weißer Pfeil) - bestehend aus einem T-Tubulus (gestrichelte weiße Linie) und zwei angrenzenden L-Tubuli (SR entsprechend) - bilden. Anders als in menschlicher Skelettmuskulatur finden sich hier angrenzend an die Sarkomere keine Mitochondrien.

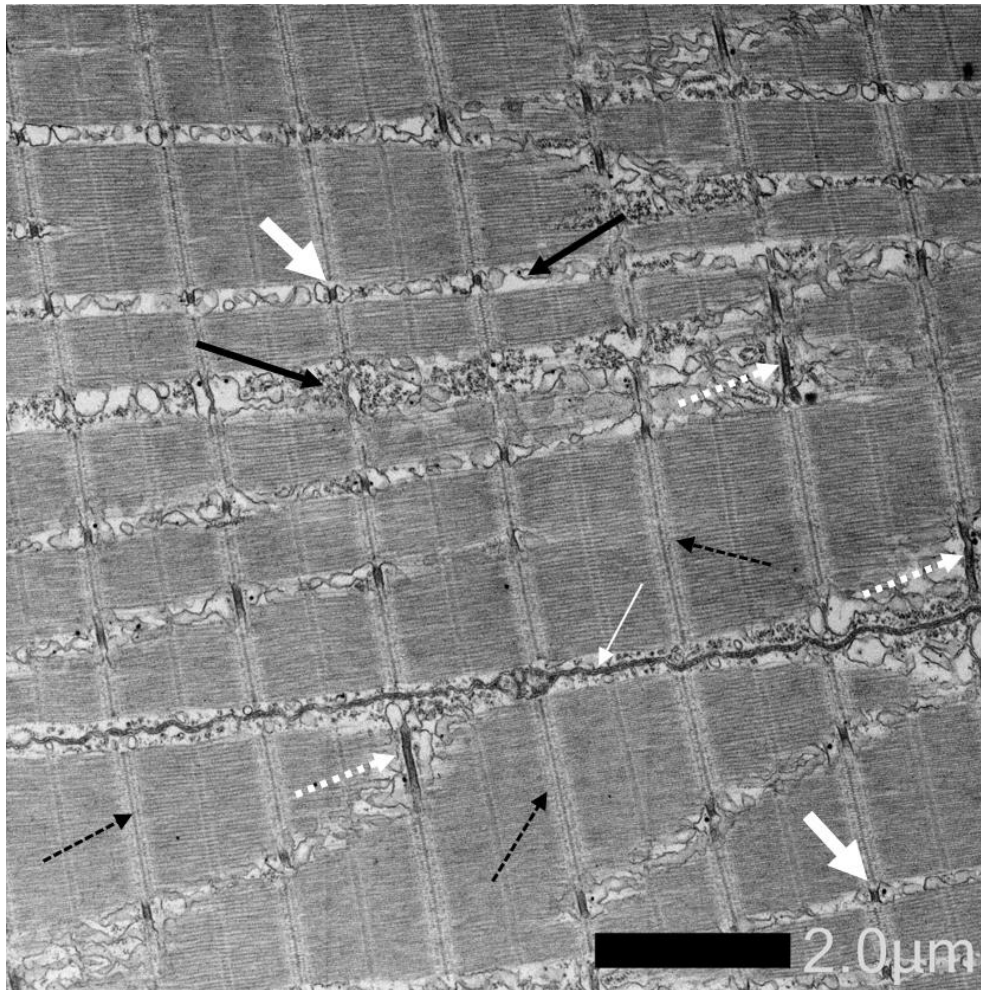


Abb.20: TEM Skelettmuskulatur sagittal - 4 dpf WT-ZF-Larve. Der Ausschnitt demonstriert die Zytoarchitektur zweier benachbarter Muskelzellen, die Trennung ist als schwarze Linie im unteren Drittel des Bildes erkennbar (dünner weißer Pfeil). Man beachte die organisierten Sarkomerformationen mit Z-Scheiben (gestrichelte schwarze Pfeile) und dazwischenliegenden M-Banden. T-Tubuli (gestrichelte weiße Pfeile) treten in das Innere der Zelle ein und bilden auf Höhe der Z-Scheiben zusammen mit dem SR die Triadenstruktur (dicke weiße Pfeile). Außerdem zeigt sich das SR als tubuläres System, die Myofilamente begleitend (schwarze Pfeile).

Vergleicht man die Befunde aus den Zebrafischlarven nun mit adulter Zebrafischmuskulatur (vgl. Abb. 21), stellt sich ein weitestgehend deckungsgleiches Bild dar. Lediglich ein Aspekt scheint verändert. Bild A zeigt ein Übersichtsbild aus der Muskelzelle im Bereich der Myofilamente, vergleichbar mit dem in Abb. 19 dargestellten. Die gestrichelte Ellipse illustriert den Bereich, der in Bild B vergrößert dargestellt wird.

Man beachte die Positionierung der Triade (angezeigt durch den schwarzen Pfeil) in Relation zum Sarkomer und den Z-Scheiben (weiße gestrichelte Pfeile). Die Triade befindet sich nun auf Höhe der M-Bande im Bereich des Aktin-Myosin-Überganges. An anderen Stellen ist sie weiterhin auf Höhe der Z-Scheibe lokalisiert, sodass sich nun ein gemischtes Bild darstellt. Die physiologische Bedeutung dieses *triade switch* ist unklar.

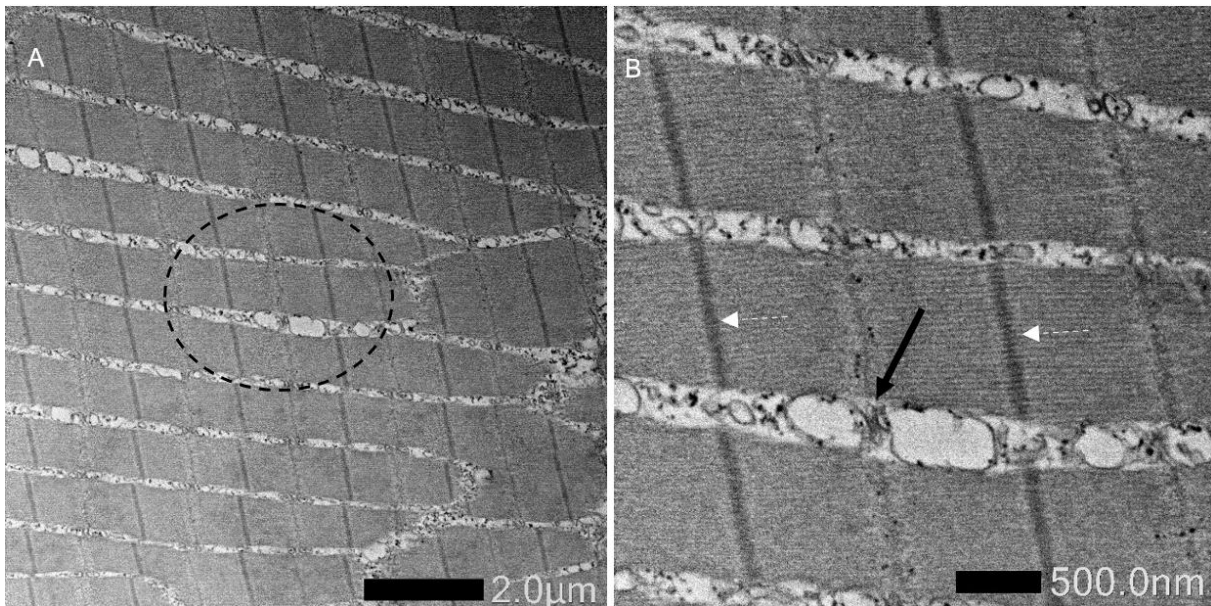


Abb. 21: TEM Skelettmuskulatur sagittal - adulter ZF. Bild A demonstriert die Zytoarchitektur der adulten Muskelzelle mit organisierten Sarkomerformationen und dazwischenliegenden Säulen des SR. Die gestrichelte Ellipse umrandet die Ausschnittvergrößerung in Bild B, die zeigt, dass sich die Triaden nun auf Höhe der M-Bande befinden (schwarzer Pfeil), zwischen zwei benachbarten Z-Scheiben (gestrichelte weiße Pfeile).

Als letzten Aspekt sollen diese Erkenntnisse nun in einen Vergleich gebracht werden mit der Skelettmuskelarchitektur höherer Vertebraten. Hier am Beispiel eines M. quadriceps femoris Präparates einer adulten Maus (vgl. Abb. 22) in sagittaler (Bild A) und frontaler (Bild B) Schnittführung. Hier stellt sich das bekannte mosaikartige Muster der verschiedenen Muskelzelltypen dar, wie sie für die Skelettmuskulatur der Säugetiere typisch ist. Bild B zeigt im oberen rechten Quadranten eine Muskel-Zelle des Typs I oder Typ IIa (erkennbar an den zahlreichen Mitochondrien, schwarze Pfeile) während angrenzend daran sich zwei mitochondrienarme Typ IIx – Muskel-Zell-Fasern befinden.

Bild A stellt die hohe Mitochondrien-Präsenz (schwarze Pfeile) unmittelbar an das Sarkomer angrenzend, zumeist auf Höhe der Z-Scheiben, dar. Dieses Mosaik-Muster der verschiedenen Muskelfasertypen lässt sich so weder in der Larve noch im adulten Zebrafisch finden. Dort liegen die einzelnen Muskel-Fasertypen klar voneinander getrennt in einzelnen Faserkompartimenten vor.

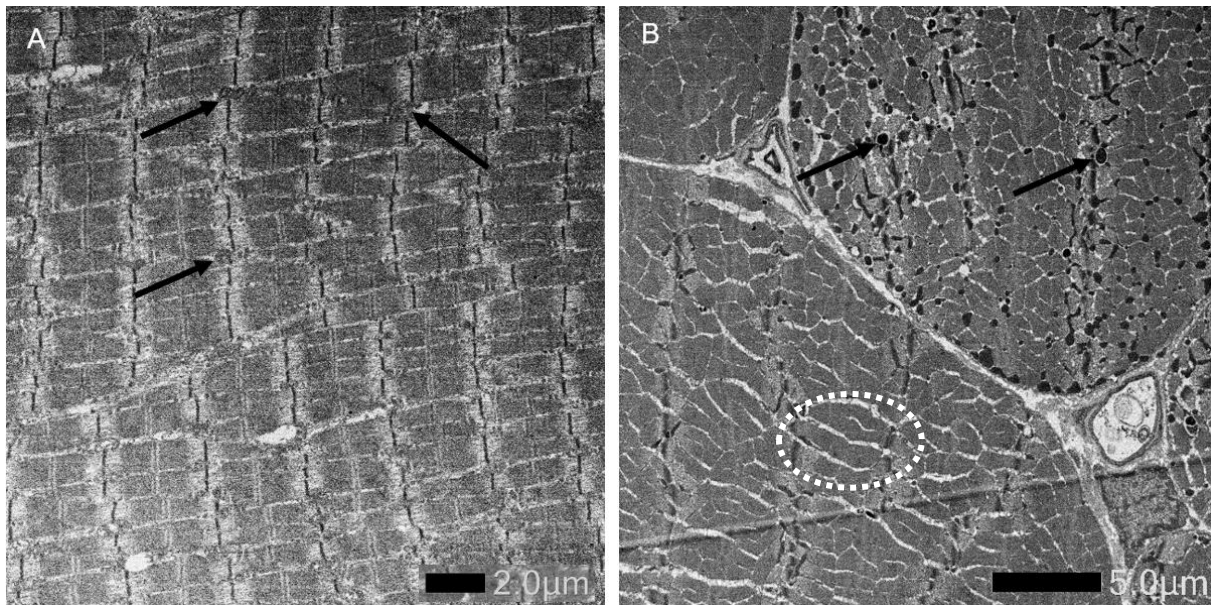


Abb. 22: TEM Skelettmuskulatur sagittal (A) und frontal (B) - adulte Maus. Bild A veranschaulicht den normalen Muskelzellaufbau mit geordneten Sarkomeren, die umgeben werden von sR und Mitochondrien (schwarze Pfeile). In der frontalen Aufsicht (B) stellt sich die mosaikartige Anordnung der verschiedenen Muskelfasertypen dar, unterscheidbar am variierenden Gehalt an Mitochondrien (schwarze Pfeile). Man beachte zudem das sR, das sich manschettenförmig um die Myofilament-Kolumnen legt (vgl. weiß gestrichelte Ellipse in B).

Nachdem die immunhistochemische Darstellung von Pomt1 und α -DG in der Zebrafischlarve im ersten Teil dieser Arbeit gelang (siehe Abb. 15), sollten daran anknüpfend hier eine Reihe weiterer muskelassoziierter Antikörper etabliert werden. Um möglichst die verschiedenen Muskel-Zellkompartimente abzudecken, fiel unsere Wahl auf die Zielproteine α -Actinin (Z-Scheibe), Myomesin-I (M-Bande), Nebulin, Titin (Sarkomer), Ryanodin-Rezeptor (L-Tubuli), Pomt1 (SR), Dystrophin (DGC- intrazellulär), α -Dystroglykan (DGC – extrazellulär), Acetylcholinesterase (BM), Kollagen-IV (EZM/BM) und Cytochrom-C-Oxidase (Mitochondrium).

Abbildung 23 demonstriert eine Auswahl an Antikörpern, die an der für sie erwarteten Lokalisation in der Rumpfmuskulatur der Zebrafischlarve ein spezifisches Signal zeigten. Abgebildet ist die sagittale Rumpfmuskulatur 4 dpf alter Wildtyp-ZF-Larven bei 40x Vergrößerung unter Verwendung eines rotfluoreszierenden Sekundärantikörpers.

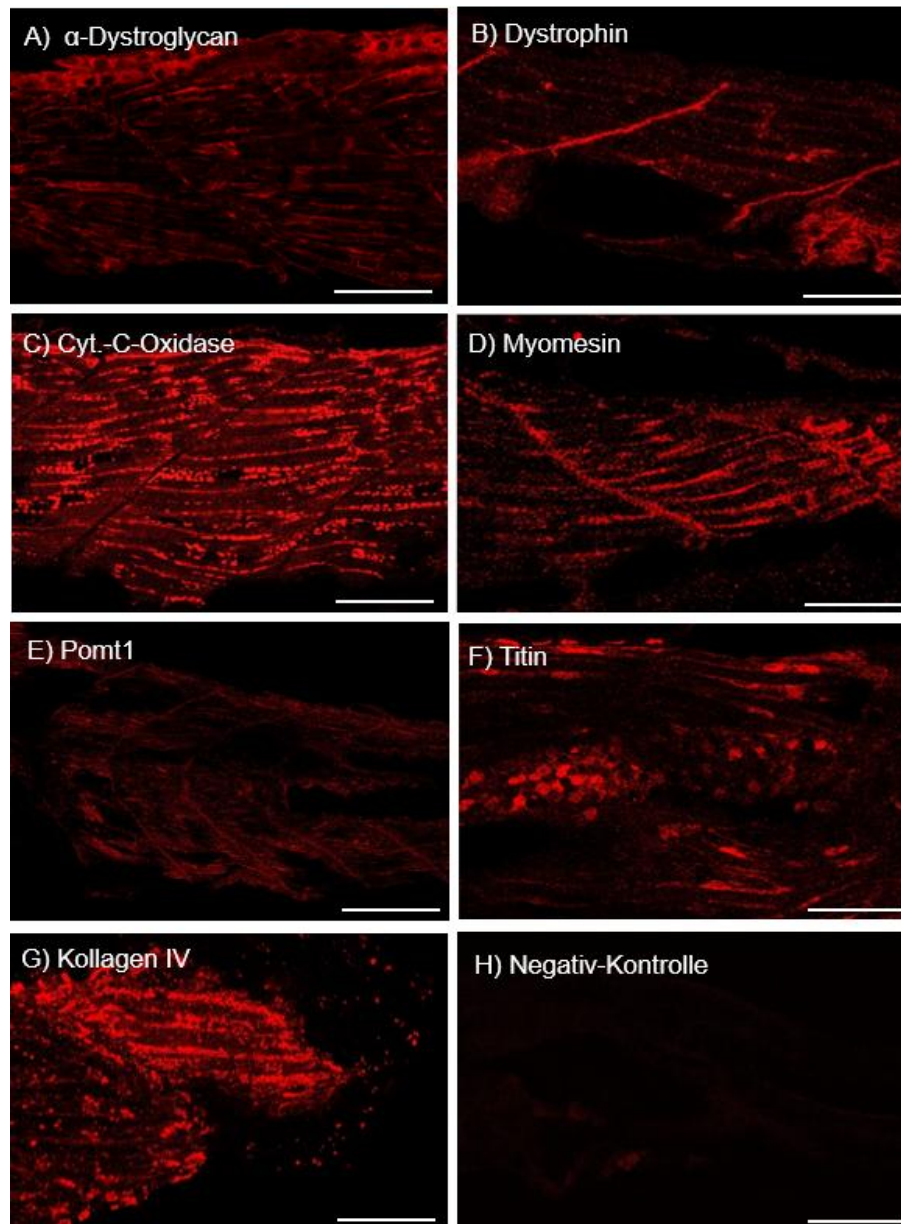


Abb. 23: Immunfluoreszenzmikroskopie ausgewählter AK in 4 dpf alten WT-ZF-Larven. Bild A zeigt die extrazelluläre, an die Plasmamembran angrenzende Anreicherung von α -DG. Ein ähnliches streifenförmiges Signal zeigt Dystrophin, nun allerdings intrazellulär, erkennbar an dem verstärkten Signal im Zellinneren (B). Die mitochondrienspezifische

Cyt.-C-Oxidase demonstriert die subsarcolemmale gruppierte Anordnung der Mitochondrien in der Muskelzelle (C). Die Expression von Myomesin-I erscheint variabel. Mit Anreicherung im Zellinneren (hier v.a. im Bereich der M-Banden), aber auch insbesondere im Myoseptum (D). Pomt1 zeigt ein schwächeres, vor allem intrazelluläres Signal als Korrelation seiner Lokalisation im Bereich des SR (E). Titin reichert intrazellulär an (F). Kollagen-IV ubiquitär mit starken Signalen im Bereich der Zellzwischenräume (G). Die Negativ-Kontrollen ohne Primärantikörper (hier am Beispiel eines anti-Rabbit-Sekundärantikörpers) wiesen lediglich schwach durchscheinend die Autofluoreszenz des Gewebes ohne spezifische Anreicherung auf (H). (Maßstab 0,5 mm)

4. Diskussion

Die posttranslationelle O-Mannosylierung von Proteinen stellt einen elementaren Modifizierungsprozess für zahlreiche Proteine in den verschiedensten Zellarten dar. Die dabei stattfindende enzymatisch katalysierte Glykosylierung ist ein sehr konservierter biologischer Prozess, der vom Bakterium bis zum Menschen nachgewiesen werden kann (Hang et al., 2022).

Aufgrund der hohen Bedeutsamkeit in der Funktionsweise zahlreicher Proteine sind fehlerhafte O-Mannosylierungen als ursächlich für humane Erkrankungen identifiziert worden. Eines dieser Proteine ist α -DG, das beispielsweise in der Skelettmuskulatur als extrazelluläre Komponente Teil des Dystrophin-Glycoprotein-Komplexes ist. Posttranslationell wird α -DG im sarkoplasmatischen Retikulum von dem Enzym Protein-O-Mannosyltransferase-1 (Pomt1) im ersten katalytischen Schritt einer komplexen Glykosylierungskaskade an einem Serin-Rest mannosyliert. Eine fehlerhafte Mannosylierung von α -DG durch Pomt1 wurde als eine der ursächlichen Mutationen für die Entstehung zahlreicher α -DG assoziierter Pathologien identifiziert. Darunter sind Erkrankungen wie das Walker-Warburg-Syndrom, Lissenzephalie-Typ II und viele weitere. Zusammengefasst werden diese Pathologien unter dem Begriff der Dystroglykanopathien.

Die Erforschung der komplexen Abläufe im Zusammenhang mit der Glykosylierung von α -DG haben in den letzten Jahren steigendes Interesse erfahren.

Avsar-Ban et al. zeigten die Wichtigkeit der Protein-O-Mannosylierung von α -DG auch in der embryologischen Entwicklung des Zebrafisches und dass die genetische Information der dabei beteiligten Enzyme im Verlauf der evolutionären Entwicklung der Vertebraten stark konserviert wurde. So auch Pomt1, die ebenfalls im Zebrafisch für den ersten katalytischen Schritt der Glykosylierung von α -DG zuständig ist. (Avsar-Ban et al., 2010). Daher war es das Ziel dieses Forschungsprojektes, diese molekulargenetischen Grundlagen und Erkenntnisse aufzugreifen und in einem experimentellen Ansatz die Veränderungen einer Pomt1-Defizienz auf die Skelettmuskulatur von Zebrafisch-Larven zu übertragen. Die darüber gewonnenen Erkenntnisse über die Funktion von Pomt1 und α -DG im Zebrafisch sollen einen weiteren Beitrag zur Erschließung des Zebrafisches als

potenten Modellorganismus für Muskeldystrophien - und im Speziellen aus dem Kreis der Dystroglykanopathien - leisten.

4.1 Diskussion von Material und Methoden

Der Zebrafisch entwickelte sich im letzten Jahrzehnt immer mehr zu einem interessantem Modellorganismus humanpathologischer Veränderungen. Obwohl das Hauptaugenmerk nach wie vor auf Strukturen des zentralen Nervensystems und der Herzmuskulatur liegt, werden zunehmend auch andere Organsysteme in die klinische Forschung miteinbezogen. So auch die Skelettmuskulatur, die aufgrund ihrer konservierten Gewebearchitektur eine exzellente Vergleichsmöglichkeit bietet, zu muriner und humaner Skelettmuskulatur.

Zur Etablierung eines *Pomt1*-Morpholino *knock-downs* griffen wir auf die Forschungsergebnisse von Avsar-Ban et al. zurück, die bereits zwei translationsblockende Morpholino-Sequenzen von *Pomt1* im Zebrafisch etablieren konnten. Die exakten Sequenzen der beiden Oligonukleotide der Firma GeneTools sind in Teil 2 Material und Methoden im Detail aufgeführt. (vgl. S. 30).

Zur Detektion von *Pomt1* in Western Blot und Immunfluoreszenz wurde ein monoklonaler-Antikörper der Firma GeneTex bestellt. Für diesen war eine Wirksamkeit im Zebrafisch bereits nachgewiesen worden.

Die Injektion des Morpholinos erfolgte ca. 20 min *post fertilization* in den Dotter der Fischlarven mit luftdruckgesteuerten Nadelinjektionssystemen unter dem Lichtmikroskop. Initial injizierten wir sowohl MO1, MO2 als auch der Kontroll-Morpholino der Firma GeneTools. Das MO2-Oligonukleotid zeigte eine deutlich schwächere phänotypische Ausprägung, als auch keine signifikante Signalreduktion in den 3 und 5 dpf Western Blots. Daher entschieden wir uns dazu, bei den daran anschließenden Experimenten auf das MO2-Oligonukleotid zu verzichten und lediglich MO1 zu injizieren. Dieses wies eine deutliche Signalreduktion im Western Blot auf, sowohl bei 3 als auch bei 5 dpf und zudem einige phänotypische Anomalien im Larvenstadium, wie retardiertes *hatching* (die Befreiung aus der Eihülle), was für einen Effekt auf die Skelettmuskulatur sprach. Als Kontrolle verwendeten wir für alle Experimente das Kontroll-Morpholino-Oligonukleotid

der Firma GeneTools. Bei den anschließenden Injektionszyklen stellte sich ein optimales Injektionsvolumen von 150 µl / Larve heraus.

Die Veränderungen der Morpholino-injizierten Fische wurden stets in Vergleich gesetzt zu Larven, denen zum gleichen Zeitpunkt ein Kontroll-Morpholino (Moore CJ et al., 2008) injiziert worden war. Dieses ist das gängige Vorgehen bei der Analyse von Morpholino-Zebrafischen, um Fehlinterpretationen durch unspezifische Veränderungen des Injektionsprozess und den dabei injizierten chemischen Substanzen zu vermeiden.

Häufige Formanomalien, die bei der Morpholino-Injektion auftreten, sind beispielsweise erhöhte Mortalität im frühen Larvenstadium, Perikardergüsse, Schwanzverkürzung oder Verkrümmungen der Körperachse. Unsere Fischlarven zeigten zum größten Teil keine dieser unspezifischen Veränderungen, bei gleichzeitig bestehenden muskelphänotypischen Ausprägungen der MO1-Fraktion, bei unauffälligen Kontroll-MO-Larven, sodass wir von einer spezifischen Wirksamkeit der MO-Oligonukleotide ausgehen konnten.

Der Nachweis der Wirksamkeit des Pomt1-Morpholinos und des anti-Pomt1-Antikörpers erfolgte mittels Western-Blot-Analyse an 3 und 5 dpf alten Zebrafischlarven. Hierzu wurden jeweils 40 Larven aus den vier Fraktionen MO1, MO2, Kontroll-MO und WT (uninjiziert) verwendet. Anschließend wurde eine β -actin-Kontrolle zur semiquantitativen Angabe der Proteinmenge durchgeführt. Die Western-Blots wiesen die für Pomt1 erwartete Bande bei 82 kDa mit spezifischem Signalverhalten auf. Die erwartete Signalreduktion der Morpholino-Fraktionen zeigte sich nur bei MO1. Für MO2 konnte keine signifikante Reduktion festgestellt werden (s.o.). Die β -actin-Kontrollen stellten sich jeweils mit starken Signalen dar, was für eine ausreichende Menge an Protein spricht. Wie man anhand der Western-Blots im Ergebnisteil (vgl. S. 41) sehen kann, beläuft sich das Bandensignal in der MO1 nicht auf 0%, wie man es bei einem vollständigen knock-out des Pomt1-Gens erwarten würde. Dies ist dadurch begründet, dass es sich bei der Morpholino-Methode lediglich um einen knock-down posttranslationeller mRNA handelt. Die Morpholino-Oligonukleotide unterliegen als Ribonukleinsäuren zellulärer Degradation und können keine 100% Unterdrückung aller mRNA-Kopien eines bestimmten Gens garantieren. Zudem wurden für eine Western-Blot-Probe 40 Individuen verwendet, um eine ausreichende Proteinquantität zu generieren. Hier liegt das Risiko darin, das *sample* mit Larven zu „verunreinigen“ bei denen die MO-Injektion im 1-Zell-Stadium nicht

erfolgreich war. Ein möglicher Ansatz, das Bandensignal im Western-Blot weiter zu verbessern, wäre die Durchführung mit einer kleineren *sample size* bis zum „ein-Fisch-Western-Blot“. Bei diesen Verfahren wird mit hochsensitiven *kits* gearbeitet, die mit kleinen Proteinmengen vergleichbare Ergebnisse erzeugen können. Ein weiterer möglicher Ansatz – auch wenn sehr aufwendig in der Zebrafischlarve – wäre die Präparation der Skelettmuskulatur, sodass das sample nicht durch die Beimischung der anderen Organe beeinflusst wird, wie es bei der Verwendung ganzer ZF-Larven zwangsläufig der Fall ist.

Nachdem wir zeigen konnten, dass das Pomt1-MO1-Oligonukleotid und der anti-Pomt1-Antikörper eine gute Wirksamkeit im Zebrafisch besitzen, entschieden wir uns dazu, die histopathologischen Effekte in den Modalitäten Semidünnschnitt-Licht- (SD-LM), Transmissionselektronen- (TEM) und Immunfluoreszenz-Mikroskopie (IFM) zu analysieren. Dies sind etablierte Verfahren für Zebrafisch-Larven, sodass wir die Protokolle auch auf die Larvenmuskulatur anwenden konnten.

Zu Beginn sollten übersichtsartig die Gewebeveränderungen im Lichtmikroskop dargestellt werden. Wir entschieden uns für eine Einbettung der Zebrafischlarven im Stadium 4 dpf, da zu diesem Zeitpunkt die Larven vollständig geschlüpft sind, bei noch guter Wirksamkeit des Morpholinos und einfacherer Präparation der Fischlarven beispielsweise im Vergleich zu 2 oder 3 dpf alten Larven.

Die Einbettung erfolgte in Epoxidharz mit anschließender Anfertigung von sogenannten Semidünnschnitten mit einer Schichtdicke von 10 µm unter Toluidin-Blaufärbung. Diese besondere Vorgehensweise verfolgte das Ziel, bei den Larven die in der SD-LM ausgeprägte Veränderungen im Bereich der Rumpfmuskulatur zeigten, anschließend mit den gleichen Proben, Schnitte – sogenannte *grids* - für die TEM zu generieren.

Dies gelang mit den angewandten Protokollen bereits initial, sodass im weiteren Verlauf der Experimente keine Veränderungen an der Vorgehensweise der Probenherstellung getroffen werden mussten. Eine detaillierte Beschreibung der verwendeten Substanzen und des genauen Ablaufs der Erzeugung der SD-LM und TEM-Schnitte und Bilddaten ist den Seiten 37-39 in Teil 2 Material und Methoden zu entnehmen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte schließlich noch eine genauere Charakterisierung der allgemeinen Zebrafischskelettmuskulatur im Vergleich zu jener, höherer Vertebraten wie Mäuse und Menschen gezeigt werden. Dabei wurden die Morpholino-Injektionen

verlassen und auf reine Wildtyp-Larven zurückgegriffen. Bei diesem experimentellen Ansatz wurden dann auch adulte Zebrafische und Skelettmuskulatur adulter Mäuse als Referenzhistologien herangezogen.

Bei der Präparation der adulten Zebrafische wurden Teile der Rumpfmuskulatur von der Wirbelsäule und den Viszera unter dem Stereo-Mikroskop ab präpariert und zur Weiterverarbeitung erst in 4% Paraformaldehyd (PFA) und anschließend in die jeweiligen Einbettmedien der verschiedenen Modalitäten überführt. Dieser Präparationsschritt war erforderlich, da das Schneiden der Muskulatur bei Belassen der Wirbelsäule zu einer Zerstörung der Ultradünnschnitte geführt hatte. Eine Entkalkung der Präparate vor der Einbettung wäre hier eine denkbare Alternative, wir entschieden uns aber für die Präparation der Muskulatur mit dem Skalpell, da dies unter stereo-mikroskopischer Aufsicht technisch gut durchführbar war und zu guten Ergebnissen führte. Bei der Verwendung der Mausmuskulatur griffen wir – aus ressourcenschonenden Gründen - auf bereits bestehende Muskelproben unseres Instituts zurück, die in einem anderen Kontext angefertigt wurden und sich in Formaldehyd befanden. Die Weiterbehandlung für die TEM erfolgte dann nach etablierten Protokollen, die im Detail in Teil 2 Material und Methoden zu finden sind (vgl. Seite 37-39).

Als letzten Ansatz sollte dann noch die Etablierung zahlreicher, teils muskelspezifischer, teils allgemeiner, aber im Kontext zur Skelettmuskulatur stehender Antikörper in der IFM erfolgen. Dieses Vorgehen verfolgte das Ziel, sowohl die Veränderungen hervorgerufen durch den *Pomt1*-Morpholino immunhistochemisch darzustellen als auch eine Reihe weiterer Antikörper auf ihre Wirksamkeit in der ZF-Muskulatur hin zu untersuchen, da für viele der gängigen erhältlichen Antikörper wichtiger Skelettmuskelproteine lediglich Wirksamkeitsnachweise in Mäusen, Ratten o.ä. höheren Vertebraten vorliegen.

Um ein möglichst umfangreiches Repertoire an Antikörpern in den verschiedenen Zellorganellen abzudecken, entschieden wir uns für Antikörper gegen *α -Actinin* (Z-Scheibe), *Myomesin-I* (M-Bande), *Cytochrom-C-Oxidase* (innere Mitochondrienmembran), *Kollagen IV* (EZM, Basalmembran), *α -Dystroglykan* (DGC), extrazellulär, *Dystrophin* (DGC, intrazellulär), *Titin* (Sarkomer), *Nebulin* (Sarkomer), *Pomt1* (sR), *Ryanodin-Rezeptor* (L-Tubuli) und *Acetylcholin-Esterase* (BM). Die verschiedenen Proteine und ihre zelluläre Lokalisation sind der modifizierten schematischen Darstellung zu entnehmen (vgl. Abb. 24 s.u.).

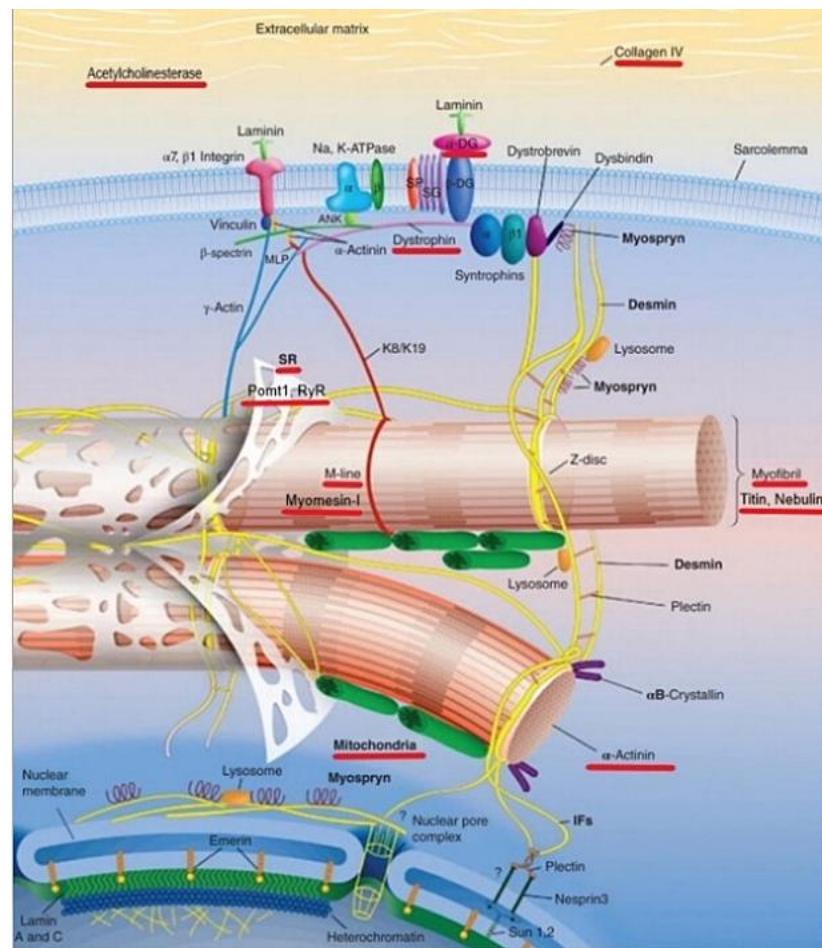


Abb. 24: Schematische Darstellung einer Skelettmuskelzelle und der verwendeten Antikörper in ihrer zellulären und extrazellulären Lokalisation, jeweils markiert durch rote Linien. Die Grafik illustriert die Verbindungen zwischen Myofibrillen und der EZM vermittelt durch den DGC. Der Nucleus (unterer linker Bildabschnitt) deckt seine nukleäre Domäne mit der Proteinexpression ab. Der Hauptteil des Zytoplasmas wird von den länglichen Myofibrillen eingenommen. Das SR (weiß) und die Mitochondrien (grün) liegen den Myofilamenten dicht an. Über Aktin und Desmin stehen die Sarkomere mit subsarcolemmalen Proteinen des DGC in Kontakt. Aktin bindet dabei an Dystrophin während Desmin an Dystrobrevin bindet. Unterstützt durch die Gruppe der Syntrophine und Sarcoglykane stehen die intrazellulären Komponenten mit β -DG in Kontakt, das das Sarcolemm durchspannt und an das extrazelluläre α -DG angeschlossen ist. Das glykosylierte α -DG steht über Ca^{2+} -vermittelte Verbindungen mit EZM-Proteinen wie Laminin oder Perlecan in Kontakt (modifiziert nach Capetanaki et al., 2007)

Die Auswahl und Verwendung der Antikörper erfolgte nach Herstellerinformation, wobei nicht für alle AK eine Spezifität im Zebrafisch angegeben war. Daher wurde in einem ersten Schritt die Antikörper in einem Western Blot auf wirksame Bindung im Zebrafisch erprobt. Die Antikörper, die bereits im Western Blot kein spezifisches Signal zeigten, wurden nicht für die weitere Verarbeitung mittels IFM genutzt. Erwartungsgemäß zeigten die verschiedenen Antikörper in der IFM unterschiedliche Spezifitäten für den Zebrafisch. Während einige ein hochspezifisches Signal in den für sie erwarteten Lokalisationen zeigten, konnte bei anderen lediglich ein unspezifisches Signal nachgewiesen werden. Mögliche Ursache für diese Diskrepanz zwischen WB-Signal und unspezifischem Signal in der IFM sind beispielsweise die extraskellettale Expression, fehlerhafte IFM-Protokolle mit für den Antikörper nicht adäquaten Konzentrationen des primären und sekundären AK oder die Verwendung inadäquater Pufferlösungen. Einen Vergleich zwischen gutem und nicht verwertbarem Signal demonstriert Abb. 25 in der einmal der Antikörper gegen Myomesin-I mit gutem Signal und der Antikörper gegen den Ryanodin-Rezeptor mit unspezifischem Signal verglichen werden.

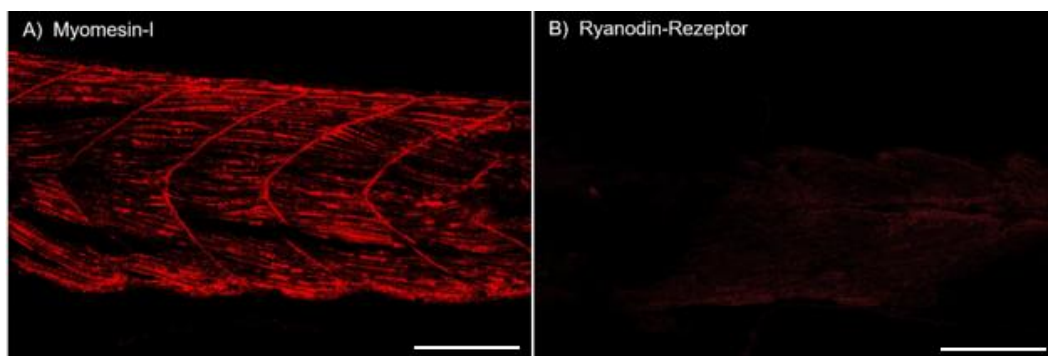


Abb.25: Immunfluoreszenzmikroskopie in 4 dpf alten WT-ZF-Larven. Bild A zeigt eine spezifische Anreicherung des anti-Myomesin-I-Antikörper im Bereich der Rumpfmuskulatur. Im Vergleich dazu lässt sich in Bild B für den anti-Ryanodin-Rezeptor-Antikörper lediglich ein schwaches unspezifisches Signal feststellen, was mitunter nicht von der normalen Autofluoreszenz des Gewebes unterschieden werden kann. (sek. Antikörper: Alexa Fluor 555, Maßstab 0,5 mm)

Zu den Antikörpern, die eine gute Spezifität in der Immunhistochemie zeigten, gehörten anti-Dystrophin, anti- α -Dystroglycan, anti-Pomt1, anti-Myomesin-I, anti-Cyt.C-Oxidase, anti-Titin und anti-Kollagen-IV. Ein eher schwaches oder unspezifisches Signal hingegen

wiesen anti-Nebulin, anti-Ryanodin-Rezeptor, anti-Acetylcholinesterase und α -Actinin auf, sodass im weiteren Verlauf der Experimente auf diese Antikörper verzichtet wurde. Ob diese Antikörper wirklich keine gute Wirksamkeit im Zebrafisch zeigen, kann nicht abschließend beurteilt werden, da abgesehen von Herstellerempfehlungen ein Protokoll für alle Immunfluoreszenzschnitte verwendet wurde und bei denen, die auf dieses Protokoll keine guten Ergebnisse zeigten, keine Anpassungen am Protokoll vorgenommen wurden. Somit kann es sein, dass nach Anpassung beispielsweise der verwendeten Puffersubstanzen oder Veränderung des Antikörpervolumens doch noch spezifische Reaktionen gezeigt werden könnten. Aufgrund der hohen Anzahl an spezifischen AKs führten wir anschließend die weiteren Experimente nur noch mit diesen durch.

Abschließend sei noch einmal vermerkt, dass alle Untersuchungen zu den Veränderungen einer Pomt1-Defizienz im Rahmen dieser Forschungsarbeit mittels Morpholino-Oligonukleotiden erfolgten. Da es sich dabei „nur“ um eine posttranslationelle Blockung der Pomt1-mRNA und nicht um eine vollständige Ausschaltung des Pomt1-Gens handelt, wäre ein Pomt1-knock-out durch gentechnisch modifizierte ZF-Linien ein weiterer Ansatz, um die Pomt1-spezifischen Veränderungen im Zebrafisch- sowohl in der Larve als auch im adulten Fisch – zu analysieren. Dieser Ansatz wurde von Karas et al. in ihrer 2022 publizierten Arbeit bereits verfolgt, in der gezeigt werden konnte, dass ein Pomt1-knock-out bereits nach 30 dpf zu schweren Morphologiestörungen in den Fischlarven führt und ein Überleben über den 70 dpf Zeitpunkt hinaus nicht beobachten werden konnte. Inwieweit Untersuchungen mittels POMT1-knock-out im adulten Zebrafisch (> 90 dpf) möglich sind bleibt abzuwarten, scheint aber aufgrund der schweren Auswirkungen auf ZNS, Retina und Muskulatur unwahrscheinlich zu realisieren.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war es, die molekulargenetischen und evolutionsbiologischen Grundlagen der Forschung zum Thema Protein-O-Mannosylierung im Zebrafisch aufzugreifen und in einem klinisch- histopathologischem Ansatz, am Beispiel von Pomt1, im Zebrafisch als Muskelmodellorganismus zu etablieren.

Dazu griffen wir hauptsächlich auf die Erkenntnisse der 2010 publizierten Studie von Avsar-Ban et al. zurück, die die nahen Verwandtschaftsverhältnisse zwischen humanem und ZF-Pomt1 mittels Genanalysen darstellte und bereits erste phänotypische Veränderungen der einzelnen, an der Glykosylierung von α -DG beteiligten Enzyme, darunter Pomt1, zeigen konnte.

Als Erstes etablierten wir das Morpholino-Oligonukleotid in unserem Zebrafisch-Wildtyp und konnten mittels Western-Blot die Wirksamkeit bestätigen, sodass wir im nächsten Schritt auf die strukturelle Analyse der Pomt1-defizienten ZF-Skelettmuskulatur eingegangen sind.

Die dazu initial angefertigten Semidünnschnitte 4 dpf alter ZF-Larven zeigten im Bereich der Rumpfmuskulatur bei Pomt1-MO behandelten Larven, im Vergleich zum Kontroll-MO, deutlich sichtbare Veränderungen der Gewebearchitektur.

Hier fiel insbesondere auf, dass es zu Abscherungen der Muskelzellen untereinander bis hin zu Gewebedestruktionen gekommen war, was konsistent zu Ergebnissen anderer Forschungsarbeiten zu diesem Thema (vgl. Avsar-Ban et al., 2010 und Karas et al., 2022) und Ergebnissen humaner Biopsien von Patienten, die unter Dystroglykanopathien leiden, ist.

Die Kontrollen stellten im Vergleich dazu homogene Gewebeverbände ohne Anzeichen von pathologischen Auffälligkeiten dar. Im nächsten Schritt sollten dann die Ergebnisse der Lichtmikroskopie um das ultrastrukturelle Spektrum der TEM erweitert werden. Wie man den Bildern im Ergebnisteil entnehmen kann, zeigten sich auch hier die charakteristischen Veränderungen, die bei Pomt1-defizienten Larven zu erwarten waren. Es kam zum Kontinuitätsverlust der Zellverbände und an ausgewählten Stellen - wahrscheinlich im Bereich der Costamere, also Zell-EZM-Verbindungen, vermittelt durch den DGC - zu Zerreißen der Plasmamembran und Kontaktverlust zur EZM. Ergänzt wurden diese Ergebnisse dann noch mittels IMF von Pomt1 und α -DG in MO-Larven. In Abbildung 15 (vgl. S. 45) konnte gezeigt werden, dass der Pomt1-MO knock-down zu einer deutlichen Reduktion des Signals in der MO-Fraktion führt, während in der Kontrolle ein spezifisches Signal intrazellulär in den Skelettmuskelzellen sichtbar wurde. Zudem stellte sich sowohl im MO als auch in der Kontroll-Fraktion ein spezifisches Signal für α -DG extrazellulär dar, angrenzend an die Plasmamembran (vgl. Abb. 15; S. 45), was die

Hypothese bestätigt, dass bei Fehlen von Pomt1 das fehlerhaft glykosylierte α -DG dennoch an seine Position im DGC transportiert wird.

Eine genaue Verhaltensanalyse der Morpholino-Larven und welche Auswirkungen der Pomt1-Morpholino auf die Motilität der Larven hat erfolgte in dieser Arbeit nicht. Diesbezüglich sei ebenfalls auf die Publikation von Daras et al. aus dem Jahr 2022 verwiesen wo dieser Ansatz im knock-out-Modell verfolgt wurde und eine Reduktion in Bewegungsgeschwindigkeit, Beschleunigung und Reaktionszeit gezeigt werden konnte.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde dann der klinisch-histopathologische Aspekt des Pomt1-Morpholinos verlassen und genaueres Augenmerk auf die allgemeine Zebrafischskelettmuskulatur in der Larve und im adulten Fisch gelegt.

Dies erfolgte mit dem Ziel, eine umfassende Darstellung der mikroskopischen Anatomie der ZF-Muskulatur zu generieren als auch diese im Kontext zu Muskulatur höherer Vertebraten wie beispielsweise Mäuse oder Mensch zu betrachten, um einerseits die Grundlagenforschung muskulärer Erkrankungen auch vermehrt im Zebrafisch zu etablieren und andererseits daran anschließend die klinische Forschung im Bereich Muskeldystrophien und im Besonderen Dystroglykanopathien im ZF-Modellorganismus zu ermöglichen.

Besonderes Augenmerk dieser Arbeit lag insbesondere auf der Elektronenmikroskopie, da hochaufgelöste EM-Bilder und die Auseinandersetzung mit der Zytoarchitektur der Zebrafisch-Skelettmuskulatur nur sehr gering in der bestehenden Literatur vorhanden ist (hier sei beispielsweise auf die von Barba et al. 2023 publizierte Studie zur Sarcoglycanopathie im Zebrafisch verwiesen).

Hierzu fertigten wir TEM-Schnitte von 4 dpf alten Zebrafischlarven, adulter Zebrafischmuskulatur und adulter Mausmuskulatur an und setzten diese in einen gemeinsamen Kontext. Wir kamen zu dem Ergebnis, dass die Skelettmuskulatur ein hoch konserviertes Organsystem darstellt, das vom Zebrafisch bis zum Menschen einen sehr ähnlichen Aufbau besitzt. Allerdings ließen sich auch interessante Diskrepanzen darstellen, von denen einige bereits beschrieben wurden, manche aber auch in der gängigen Literatur keine Erwähnung finden. Zu den charakteristischsten Unterschieden gehört zum einen die abweichende Anordnung der einzelnen Muskelfasertypen. Während im Menschen und in der Maus die Fasertypen mosaikartig benachbart liegen, zeigt sich

im Fisch eine schärfere räumliche Trennung in Muskelfaserkompartimente, die an den unterschiedlichen Bedarf an schnelles und langsames Schwimmverhalten angepasst sind (Liu et al., 2022). Intrazellulär findet sich zwar auch die Sarkomerstruktur der Myotubuli, allerdings werden die einzelnen Myotubuli im Fisch nicht manschettenförmig von SR und Mitochondrien umgeben, sondern liegen in einer Art intrazellulärem Kompartiment zusammengefasst, welches radspeichenförmig von SR durchzogen wird. Diese vereinfachte Zytoarchitektur ist möglicherweise darin begründet, dass das Bewegungs- und Koordinationsspektrum der Fische weniger komplex ist als das höherer Vertebraten, was im Laufe der Evolution zu einer immer feineren Anordnung der Myotubuli sowie der umgebenden Mitochondrien und des SR geführt haben könnte. Die Mitochondrien befinden sich -bis auf wenige Ausnahmen- räumlich getrennt von den Myofilamentpaketen subsarcolemmal gruppiert. Meistens finden sich 2-5 Mitochondrien in einer solchen Gruppe. Der Nukleus liegt subsarcolemmal und wird umgeben von weiteren Zellorganellen wie Lysosomen, Ribosomen etc. im paranucleärem Raum. Eine schematische Darstellung im Vergleich zur realen Anatomie ist in Abbildung 26 dargestellt. Weitere Unterschiede betreffen die Anordnung der Triadenstruktur. Während sich in der Muskulatur der Larve die Triade stets auf Höhe der Z-Scheibe befindet, zeigt sie sich im adulten Fisch ebenfalls im Bereich der M-Bande in der Nähe der Übergangszone von Aktion und Myosinfilament und ähnelt in diesem Aspekt menschlicher Herzmuskulatur. Die Literaturrecherche zu dieser Beschreibung war unergiebig und auch die funktionelle Bedeutung dieses *triade switch* ist unklar. Möglicherweise stellt sie eine Adaptation des adulten Fisches auf ein effizienteres Zusammenspiel zwischen Triade und Sarkomer dar, wie man es bei höheren Vertebraten beobachten kann.

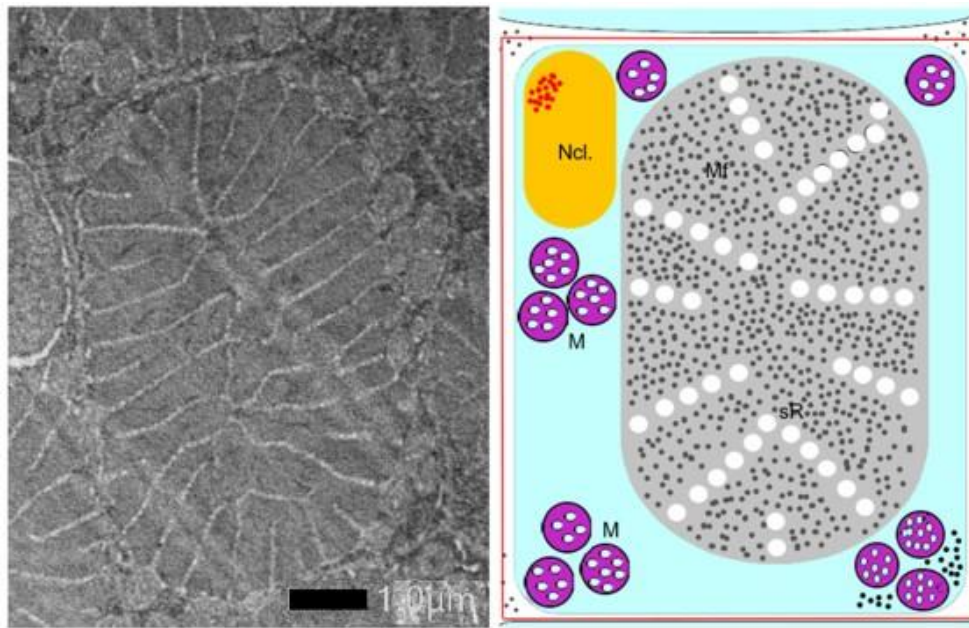


Abb. 26: Links: TEM-Aufnahme einer Skelettmuskelzelle in einer 4 dpf alten WT-ZF-Larve. Rechts: korrelierende schematische Darstellung der Zebrafisch-Muskelzellarchitektur. Das Zytosol erscheint himmelblau. Umgeben wird die Zelle von der Basalmembran (rote Linie). Der Zellkern (Ncl., orange Fläche) liegt subsarcolemmal am Rand und enthält den Nucleolus (rote Punkte). Die Myofilamente (Mf, dunkelgraue Punkte) sind in einer ovalen Kolumne organisiert (graue Fläche) und radspeichenförmig durchzogen von SR (weiße Punkte). Gruppiert und randständig befinden sich die Mitochondrien (M, lila Kreise) und angrenzend weiter Zellorganellen wie Ribosomen oder Lysosomen (schwarze Punkte)

4.3 Klinische Schlussfolgerung

Das Krankheitsspektrum der Dystroglykanopathien und die Bedeutung der Protein-Glykosylierung tritt zunehmend in das Bewusstsein der klinischen Forschung. In Anbetracht des stetig wachsenden Interesses, seltene Erbkrankheiten einer gentechnischen Therapie zuzuführen, steigt auch das Bedürfnis nach Erkenntnissen zu den jeweiligen histopathologischen Veränderungen und deren Implementierung in potenten Modellorganismen. Einer dieser Modellorganismen für das Spektrum der Muskelerkrankungen ist der Zebrafisch bzw. die Zebrafischlarve (Zfl). Wir konnten die Dystroglykanopathien am Beispiel einer *Pomt1*-Defizienz mittels Morpholino-Oligonukleotid in Zebrafischlarven bestätigen und liefern dadurch die Möglichkeit zur

weitergehenden Forschung in diesem Bereich. Ob ein echter Pomt1-knock-out in adulten Zebrafischen hier in Zukunft weitere Erkenntnisse liefern kann, die diese Pathologien zu einem späteren und ausgeprägteren Zustand zeigen, bleibt abzuwarten und erscheint wie bereits zuvor aufgeführt, aufgrund der ausgeprägten ZNS-Expression unrealistisch. Trotz der Unterschiede in der Zytoarchitektur der Skelettmuskulatur zwischen Zebrafisch und Mensch konnte nichtsdestotrotz der Ansatz bestätigt werden, dass sich die ZF-Larve, aufgrund der stark konservierten Skelettmuskelarchitektur und der vereinfachten Anordnung der Myotome, als Muskelmodell-Organismus, und insbesondere für solche aus dem Kreis der Muskeldystrophien, eignet. Interessant wäre hier aus humanpathologischer Sicht beispielsweise der Transfer auf epidemiologisch bedeutsamere Krankheitsbilder wie die Duchenne-Muskeldystrophie oder Erweiterung der Ergebnisse auf das ZNS am Beispiel der Pomt1-assoziierten Lissenzephalie.

4.4 Wissenschaftliche Schlussfolgerung

Im wissenschaftlichen Kontext leistet diese Arbeit einen weiteren Beitrag zur Erschließung der Zebrafischlarve für das Feld der Dystroglykanopathien - ein komplexes Spektrum, das aufgrund der vielseitigen Expression von α -DG in den verschiedenen Organen wie bspw. ZNS, Retina und Skelettmuskulatur zu ganz verschiedenen Krankheitsbildern führt. Auch wenn sich diese Arbeit ausschließlich mit den Auswirkungen auf die Skelettmuskulatur beschäftigt, dürfte sich die Zebrafischlarve und der Pomt1-Morpholino ebenfalls für die ultrastrukturelle Analyse von retinalen oder zentralnervösen Veränderung eignen und in welcher Art und Weise diese Veränderungen überlappen und sich gegenseitig beeinflussen. Ein erster Ansatz dazu findet sich in der Publikation von Daras et al., in der bereits genauer auf die retinalen Veränderungen eingegangen wird.

Zudem beschreiben wir zahlreiche Antikörper wichtiger Muskelstrukturproteine in der Wildtyp-Zebrafischlarve. Dies bietet Möglichkeiten für die Erforschung anderer Muskelpathologien wie beispielsweise solche mit Beteiligung des Sarkomers oder der Mitochondrien.

5. Zusammenfassung

Es sind eine Reihe von Mutationen bekannt, die jeweils die Krankheitsbilder der sekundären Dystroglykanopathien beim Menschen verursachen. Diesen seltenen angeboren, zumeist autosomal-rezessiven Erbkrankheiten liegt eine Stoffwechselstörung der Glykosylierung von α -Dystroglykan zugrunde. Mutationen, die beim Menschen u.a. für die Entstehung des Walker-Warburg-Syndroms, aber auch anderer Formen der Dystroglykanopathie verantwortlich sind, liegen u.a. in den Genen *Pomt1*, *Pomt2*, *PomGnT1*, *LARGE*, *Fukutin* und *Fukutin-assoziiertes Protein (FKRP)*. Beim Menschen verlaufen diese Erkrankungen schwer und äußern sich bereits im frühen Kindesalter mit Gedeihstörungen, ZNS-Anomalien und Muskeldystrophie, sodass die ungefähre Lebenserwartung in den meisten Fällen nur bei wenigen Monaten liegt. Aufgrund der genetischen Ätiologie der Erkrankungen gibt es für die Dystroglykanopathien noch keine kausale Therapie.

Im Rahmen dieser medizinischen Doktorarbeit wurden die histopathologischen Auswirkungen der humanen *Pomt1*-Mutation im Zebrafisch-Modell mithilfe eines translationsblockenden Morpholino-Oligonukleotids charakterisiert. Hierbei wurde insbesondere auf die Elektronenmikroskopie zurückgegriffen und hochaufgelöste Bilder der Skelettmuskulatur und ihrer Zytoarchitektur generiert, welche in dieser Qualität in der aktuellen Literatur selten anzutreffen sind.

Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass sich die Zebrafischlarve als Modellorganismus für der Erforschung der Dystroglykanopathien und im speziellen der *Pomt1*-abhängigen eignet, sodass neben den hier präsentierten Auswirkungen auf die Skelettmuskulatur in Zukunft auch die Analyse retinaler Veränderungen und Auswirkungen auf die neuronale Migration, als pathophysiologischem Korrelat der Lissenzephalie-Typ II, ermöglicht wird.

6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Schematische Darstellung des makroskopischen Aufbaus eines Skelettmuskels.....	10
Abb. 2:	Schema einer Skelettmuskelzelle in der fenestrierten Aufsicht.....	11
Abb. 3:	Schematische und elektronenmikroskopische Darstellung einer Sarkomereinheit.....	12
Abb. 4:	Triadekomplex in schematischer und elektronenmikroskopischer Ansicht.....	13
Abb. 5:	Übersicht über den Dystrophin-Glykoprotein-Komplex.....	15
Abb. 6:	katalytische Reaktion der Protein-O-Mannosyltransferase-I.....	17
Abb. 7:	Effekt einer Pomt1-Defizienz auf die Funktion des α -DG im DGC.....	18
Abb. 8:	makroskopische ZNS-Präparate eines WWS-Patienten.....	20
Abb. 9:	Histologische Präparate der Skelettmuskulatur eines WWS-Patienten.....	21
Abb. 10:	in-vivo Fotografie eines adulten Zebrafärblings und sagittaler HE-Schnitt im Bereich der Rumpfmuskulatur einer 5 dpf alten ZF-Larve.....	23
Abb. 11:	Schematische Abbildung der verschiedenen Muskeltypen des Zebrafisches und ihre anatomische Verteilung im Koronarschnitt.....	24
Abb. 12:	Vergleichende Analyse der Pomt1-Aminosäuresequenz von Mensch, Maus, Ratte, und Zebrafisch.....	25
Abb. 13:	Anti-Pomt1 Western-Blot-Analyse von 3 und 5 dpf alten ZF-Larven.....	40
Abb. 14:	Hellfeldmikroskopie nach Injektion von Pomt1-MO1.....	42

Abb. 15:	IMF von anti- α -DG und anti-Pomt1 in 4 dpf alten ZF-Larven.....	44
Abb. 16:	Lichtmikroskopie nach Pomt1-MO1 Injektion 4 dpf alter ZF-Larven in frontaler und sagittaler Ebene im Vergleich zur Kontrollgruppe.....	46
Abb. 17:	TEM von Skelettmuskelzellen 4 dpf alter ZF-Larven nach Pomt1-MO1 Injektion in frontaler Ebene im Vergleich zu Kontrollgruppe.....	48
Abb. 18:	TEM von Skelettmuskelzellen 4 dpf alter ZF-Larven nach Pomt1-MO1 Injektion in sagittaler Ebene im Vergleich zur Kontrollgruppe.....	50
Abb. 19:	Übersicht eines Muskelzellverbands mittels TEM bei 4 dpf WT-ZF-Larve in frontaler Ebene.....	52
Abb. 20:	Übersicht eines Muskelzellverbands mittels TEM bei 4 dpf WT-ZF-Larve in sagittaler Ebene.....	54
Abb. 21:	TEM der Skelettmuskulatur eines adulten ZF in sagittaler Ebene.....	55
Abb. 22:	TEM Skelettmuskulatur sagittaler und frontaler Ebene des M. quadriceps femoris einer adulten Maus.....	56
Abb. 23:	IMF ausgewählter AK in 4 dpf alten WT-ZF-Larven.....	57
Abb. 24:	Schematische Darstellung einer Skelettmuskelzelle und der verwendeten AK in ihrer zellulären und extrazellulären Lokalisation.....	64
Abb. 25:	IMF von anti-Myomesin-I im Vergleich zu anti-Ryanodin-Rezeptor in 4 dpf alten WT-ZF-Larven in sagittaler Ebene.....	65
Abb. 26:	elektronenmikroskopische und Schematische Darstellung einer Skelettmuskelzelle in der ZF-Larve in frontaler Ebene.....	70

7. Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Expressionsmuster wichtiger DGC-Komponenten in den drei verschiedenen Muskelgeweben.....	16
Tab. 2:	Verwendete Primär- und Sekundärantikörper für WB und IFM.....	28
Tab. 3:	Verwendete Oligonukleotide für Morpholino-Injektionen.....	29
Tab. 4:	Verwendete Fischlinien.....	29
Tab. 5:	Alphabetische Auflistung der verwendeten Chemikalien sowie Hersteller.....	30-31
Tab. 6:	Danieau-Puffer für die Larvenaufzucht.....	31
Tab. 7:	Pufferlösungen für die Durchführung der Western Blots.....	32
Tab. 8:	Pufferlösungen für die Fluoreszenzmikroskopie.....	33
Tab. 9:	Labora Ausstattung und Mikroskopie.....	33-34
Tab.10:	Verwendete Software für die Bilddatenerstellung und -bearbeitung.....	34

8. Literaturverzeichnis

Avsar-Ban E, Ishikawa H, Many H, Watanabe M, Akiyama S, Miyake H, Endo T, Tamaru Y. Protein O-mannosylation is necessary for normal embryonic development in zebrafish. *Glycobiology* 2010; 20 1089-102

Bohnenberger A. "Arthur Earl Walker (1907-1995)". *Embryo Project Encyclopedia* (2017-03-07). ISSN: 1940-5030

Dalla Barba F, Soardi M, Mouhib L, Risato G, Akyürek EE, Lucon-Xiccato T, Scano M, Benetollo A, Sacchetto R, Richard I, Argenton F, Bertolucci C, Carotti M, Sandonà D. Modeling Sarcoglycanopathy in *Danio rerio*. *Int J Mol Sci*. 2023 Aug 11;24(16):12707. PMID: 37628888; PMCID: PMC10454440.

Capetanaki Y, Bloch RJ, Kouloumenta A, Mavroidis M, Psarras S. Muscle intermediate filaments and their links to membranes and membranous organelles. *Exp Cell Res* 2007; 313: 2063-2076

Chal J, Pourquie O. Making muscle: skeletal myogenesis *in vivo* and *in vitro*. *Development* (Cambridge, England) 2017; 144: 2104-2122

Daya A, Donaka R, Karasik D. Zebrafish models of sarcopenia. *Dis Model Mech*. 2020; 13: dmm042689

De Souza Leite F, Rassier DE. Sarcomere Length Nonuniformity and Force Regulation in Myofibrils and Sarcomeres. *Biophysical journal* 2020; 119: 2372-2377

Dobson CM, Hempel SJ, Stalnaker SH, Stuart R, Wells L. O-Mannosylation and human disease. *Cell Mol Life Sci: CMLS* 2013; 70: 2849-57

Dumont NA, Bentzinger CF, Sincennes MC, Rudnicki MA. Satellite Cells and Skeletal Muscle Regeneration. *Comprehensive Physiology* 2015; 5: 1027-59

Endo T. Finding of O-mannosyl glycan in mammals and congenital muscular dystrophies due to glycosylation defects. *Yakugaku Zasshi Japan* 2003; 123: 825-35

Falsaperla R, Pratico AD, Ruggieri M, Parano E, Rizzo R, Corsello G, Vitaliti G, Pavone P. Congenital muscular dystrophy: from muscle to brain. *Ital J Pediatr.* 2016; 42: 78

Frontera WR, Ochala J. Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcified tissue international* 2015; 96: 183-95

Hang J, Wang J, Lu M, Xue Y, Qiao J, Tao L. Protein O-mannosylation across kingdoms and related diseases: From glycobiology to glycopathology. *Biomed Pharmacother.* 2022; 148: 112685

Henderson CA, Gomez CG, Novak SM, Lei MM, Gregorio CC. Overview of the Muscle Cytoskeleton. *Compr. Physiol.* 2017; 7: 891-944

Hikida RS. Aging changes in satellite cells and their functions. *Curr Aging Sci* 2011; 4: 279-97

Hu P, Lamei Y, Hao D. Molecular genetics of the POMT1-related muscular dystrophy-dystroglycanopathies. *Mutation Res Rev Mutat Res* 2018; 778: 45-50

Hunter G.R., Harris R.T. (2008) Structure and Function of the Muscular, Neuromuscular, Cardiovascular, and Respiratory Systems. In: Baechle, T.R. and Earle, R.W., Eds., *Essentials of Strength Training and Conditioning*, 3rd Edition, Human Kinetics, Inc., Champaign, 3-20.

Jorado LA, Coloma A, Cruces J. Identification of a human homolog of the *Drosophila* rotated abdomen gene (POMT1) encoding a putative protein O-mannosyl-transferase, and assignment to human chromosome 9q34.1. *Genomics* 1999; 58: 171-80

Kanagawa M. Dystroglycanopathy: From Elucidation of Molecular and Pathological Mechanisms to Development of Treatment Methods. *Int J Mol Sci* 2021; 22: 13162

Karas BF, Terez KR, Battula N, Gural BM, Flannery KP, Aboussleman G, Mubin N, Manzini C. Removal of *pomt1* in zebrafish leads to loss of α -dystroglycan glycosylation and dystroglycanopathy phenotypes. *bioRxiv* 2022;

Kaufmann P. Dystrophin and Dystrophin-Associated Proteins. *Encyclopedia of the Neurological Sciences* 2003; 67-69

Lapidos KA, Kakkar R, McNally EM. The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma. *Circ Res.* 2004; 94: 1023-31

Lee CY. Walker-Warburg syndrome: rare congenital muscular dystrophy associated with brain and eye abnormalities. *Hong Kong Med J* 2014; 20: 556.e4-5

Liu G, Ito T, Kijima Y, Yoshitake K, Asakawa S, Watabe S, Kinoshita S. Zebrafish *Danio rerio* myotomal muscle structure and growth from a spatial transcriptomics perspective. *Genomics* 2022; 114: 110477

Lüllmann-Rauch R, Azan E. (2015). Taschenlehrbuch Histologie, 5. Auflage. Georg Thieme Verlag. Stuttgart, Deutschland.

Luther PK. The vertebrate muscle Z-disc: sarcomere anchor for structure and signalling. *J Muscle Res Cell Motil.* 2009; 30: 171-85

Manya H, Chiba A, Yoshida A, Wang X, Chiba Y, Jigami Y, Margolis RU, Endo T. Demonstration of mammalian protein O-mannosyltransferase activity: coexpression of POMT1 and POMT2 required for enzymatic activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 500-5

Maves L. Recent advances using zebrafish animal models for muscle disease drug discovery. *Expert opinion on drug discovery* 2014; 9: 1033-45

Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol.* 1961; 9: 493-5

Meilleur KG, Zukosky K, Medne L, Fequiere P, Powell-Hamilton N, Winder TL, Alsaman A, El-Hattab AW, Dastgir J, Hu Y, Donkervoort S, Golden JA, Eagle R, Finkel R, Scavina M, Hood IC, Rorke-Adams LB, Bönnemann CG. Clinical, pathologic, and mutational spectrum of dystroglycanopathy caused by LARGE mutations. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 2014; 73: 425-41

Moore CJ, Goh HT, Hewitt JE. Genes required for functional glycosylation of dystroglycan are conserved in zebrafish. *Genomics* 2008; 92: 159-67

Moore CJ, Hewitt JE. Dystroglycan glycosylation and muscular dystrophy. *Glycoconj J.* 2009; 26: 349-57

Sabatelli P, Columbaro M, Mura I, Capanni C, Lattanzi G, Maraldi MN, de Barnabe DBV, van Bokoven H, Squarzoni S, Merlini L. Extracellular matrix and nuclear abnormalities in skeletal muscle of a patient with Walker-Warburg syndrome caused by POMT1 mutation. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1638: 57-62

Serafini PR, Feyder MJ, Hightower RM, Garcia-Perez D, Vieira NM, Lek A, Gibbs DE, Moukha-Chafiq O, Augelli-Szafran CE, Kawahara G, Widrick JJ, Kunkel LM, Alexander MS. A limb-girdle muscular dystrophy 2I model of muscular dystrophy identifies corrective drug compounds for dystroglycanopathies. *JCI Insight* 2018; 3: e120493

Stuart-Smith J, Cadogan M. Mette Warburg. *Life in the fast lane* 2020;

Thornhill P, Bassett D, Lochmüller H, Bushby K, Straub V. Developmental defects in a zebrafish model for muscular dystrophies associated with the loss of fukutin-related protein (FKRP). *Brain*. 2008; 131: 1551-61

Vajsar J, Schachter H. Walker-Warburg syndrome. *Orphanet J Rare Dis*. 2006; 1: 29

Valera IC, Wacker AL, Hwang HS, Holmes C, Laitano O, Landstrom AP, Parvatiyar MS. Essential roles of the dystrophin-glycoprotein complex in different cardiac pathologies. *Adv Med Sci*. 2021; 66: 52-71

Walker AE. LISSENCEPHALY. *Arch NeurPsych*. 1942; 48: 13–29

Wilson DGS, Tinker A, Iskratsch T. The role of the dystrophin glycoprotein complex in muscle cell mechanotransduction. *Commun Biol*. 2022; 5: 1022

Wolfe RR. The underappreciated role of muscle in health and disease. *Am J Clin Nutr*. 2006; 84: 475-82

9. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde am Anatomischen Institut der Universität Bonn unter Betreuung von Prof. Dr. rer nat Benjamin Odermatt durchgeführt.

Die Konzeption der Arbeit erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. med Dieter Hartmann.

Sämtliche Versuche und Analysen wurden von mir eigenständig und/oder in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Benjamin Odermatt, Tobias Lindenberg, Öznur Yilmaz, Jessica Lambertz oder Birgit Rau des Anatomischen Instituts durchgeführt.

Die Tierversuche wurden durch die Core Facility Zebrafisch der AG Odermatt des Anatomischen Instituts der Universität Bonn durchgeführt.

Das zur Auswertung verwendete Datenmaterial wurde eigenständig generiert.

Ich versichere, die Dissertationsschrift selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

10. Danksagung

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Herr Prof. Dr. Benjamin Odermatt. Er hat meine Begeisterung für die Anatomie aufgegriffen, mir während der letzten Jahre die Erstellung dieser Arbeit ermöglicht und als interessierter und geduldiger Mentor zur Seite gestanden. Danke Ben.

Ein besonderer Dank und Gedenken gilt Prof. Dr. Dieter Hartmann (†), welcher die Idee für diese Arbeit konzipiert hat und uns während des Starts dieses Projekts mit geschätztem Rat zur Seite stand. Leider ist er während der Erstellung dieser Dissertation verstorben. Mein herzliches Beileid gilt seiner Familie und Verwandten.

Ich danke dem Anatomischen Institut der Universität Bonn unter der Leitung von Herr Prof. Dr. Karl Schilling und nachfolgend Frau Prof. Dr. Stefanie Kürten, sowie dem gesamten Team für die freundliche und hilfsbereite Zusammenarbeit während der letzten Jahre. Gesondert hervorheben möchte ich Tobias Lindenberg, Öznur Yilmaz, Jessica Lambertz, Birgit Rau und Hanna Schöpfer, deren Hilfe von großem Wert waren.

Im Weiteren danke ich Herr. Dr. Frank Schürmann, der mich im Rahmen des Deutschlandstipendiums der Universität Bonn jahrelang großzügig unterstützt hat.

Abschließend danke ich meinen Eltern Birgit und Dietmar, meinem Bruder David sowie meinen Freunden & Kommilitonen, die mir während der letzten Jahre stets zur Seite standen.