

# **Der Einfluss von Neddylierung auf Oligodendrozyten und die Myelinisierung im Zebrafisch**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

**Leonie Céline Bourauel**

aus Bonn

2022

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Benjamin Odermatt
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Christian Henneberger

Tag der Mündlichen Prüfung: 14.12.2021

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie  
Direktor: Prof. Dr. med. Karl Schilling

Und dem Institut für Physiologie II  
Direktor (kommissarisch): Prof. Dr. rer. nat. Valentin Stein

Für meine Eltern  
Jutta und Christoph



## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>8</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>10</b>
1.1 Der Zebrafisch als Modellorganismus .....	10
1.2 Myelinisierung durch Oligodendrozyten im zentralen Nervensystem .....	12
1.3 NEDD8 und seine Bedeutung in der Modifikation von Proteinen .....	16
1.4 Fragestellung und Ziele.....	20
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>22</b>
2.1 Materialien.....	22
2.1.1 Pharmakologische Substanzen.....	22
2.1.2 Antikörper.....	22
2.1.3 Plasmide .....	23
2.1.4 Oligonukleotide .....	24
2.1.5 Fischlinien .....	24
2.1.6 Chemikalien .....	25
2.1.7 Mikroskopie und Laborausstattung .....	26
2.1.8 Enzym-Kits.....	27
2.1.9 Software .....	28
2.1.10 Pufferlösungen .....	28
2.2. Methoden .....	30
2.2.1 Fischhaltung und -aufzucht .....	30
2.2.2 Vorbereitung von Mikroinjektionen .....	31
2.2.3 Mikroinjektion von MLN4924.....	31
2.2.4 Mikroinjektion von Morpolino-Oligonukleotiden.....	31
2.2.5 Mikroinjektion von Plasmiden.....	32

2.2.6 Bilddatengewinnung .....	34
2.2.6.1 Fluoreszenz-In-vivo-Imaging .....	34
2.2.6.2 Zwei-Photonen-Imaging .....	34
2.2.6.3 Hellfeldmikroskopie .....	34
2.2.7 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion.....	35
2.2.8 Western Blot.....	35
2.2.8.1 Probenherstellung .....	35
2.2.8.2 Protokoll .....	35
2.2.8.3 Quantifizierung .....	36
2.2.9 Bildanalyse .....	36
2.2.9.1 Vermessung ganzer Larven .....	36
2.2.9.2 Vermessung von Internodien .....	36
2.2.10 Statistische Analyse .....	37
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>39</b>
3.1 Expression von NEDD8 und Ubc12 in Zebrafisch-Larven.....	39
3.2 Selektive Hemmung der Neddylierung durch MLN4924 im Zebrafisch .....	40
3.4 Effekte des dominant-negativen Ubc12-Konstruktes auf einzelne Oligodendrozyten .....	51
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>61</b>
4.1 Diskussion von Material und Methoden .....	61
4.2 Diskussion der Ergebnisse.....	67
4.4 Klinische Schlussfolgerung .....	68
4.5 Wissenschaftliche Schlussfolgerung .....	69
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>70</b>
<b>6. Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>71</b>
<b>7. Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>73</b>

<b>8. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>74</b>
<b>9. Danksagung.....</b>	<b>84</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
AMP	Adenosin-Monophosphat
ATP	Adenosin-Triphosphat
ANOVA	Analysis of variance
BSA	Bovines Serumalbumin
Bp	Basenpaare
c-Cbl	Casitas B-lineage Lymphoma Proto-oncogene
DMSO	Dimethylsulfoxid
dpf	Days post fertilization
ECL	Chemilumineszenz
EtOH	Ethanol
HCl	Chlorwasserstoffsäure
hpf	Hours post fertilization
MBP	Myelin basic protein
MCS	multiple cloning site
MLN4924	((1S,2S,4R)-4-(4-(((S)-2,3-dihydro-1H-inden-1-yl)amino)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-7-yl)-2-hydroxycyclo-pentyl)Methyl Sulfamat
MO	Morpholino
NaCl	Natriumchlorid
Nae1	NEDD8 activating enzyme 1
NaOH	Natriumhydroxid
NEDD8	Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated 8
NPC	Neuronal precursor cell
OL	Oligodendrozyt
pMN	Motor neuron progenitor
OPC	Oligodendrocyte precursor cell
PBS	Phosphate buffered saline
PBST	PBS mit 0.1 % Tween-20



PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGFR $\alpha$	Platelet-derived growth factor $\alpha$
PLP	Proteolipid Protein
PNS	Peripheres Nervensystem
PSD-95	Postsynaptic density protein 95
PTU	1-Phenyl-2-thiourea
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RING	Really Interesting New Gene
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SENP8	Sentrin-specific protease 8
Shh	Sonic hedgehog
T-Test	Hypothesen-Test
TBS	Tris-buffered saline
TBST	TBS mit Tween-20
Ubc12	Ubiquitin conjugating enzyme E2 M
UCH-L3	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L3
UI	Uninjected (nicht-injiziert)
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 1. Einleitung

### 1.1 Der Zebrafisch als Modellorganismus

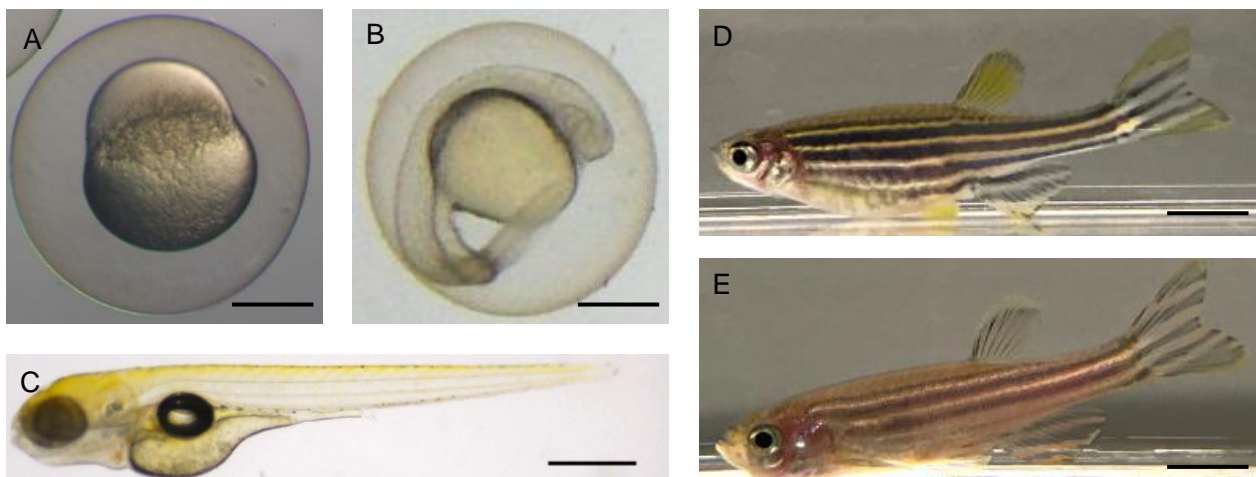
Der *Brachydanio rerio*, auch Zebrafisch oder Zebraabärbling genannt, gehört zur Familie der Karpfenfische, sein natürliches Vorkommen begrenzt sich hauptsächlich auf das tropische Stromgebiet des Ganges. In den letzten Jahrzehnten hat die Nutzung des Zebrafisches als Wirbeltiermodell zu Zwecken der Erforschung neurodegenerativer Erkrankungen und des Screenings für therapeutische Ansätze kontinuierlich zugenommen. Hierfür gibt es mehrere Gründe: die Länge eines ausgewachsenen Zebrafisches beträgt nur zwei bis vier Zentimeter und die Entwicklung zur Geschlechtsreife nimmt lediglich drei bis vier Monate in Anspruch (Driever et al., 1994; Streisinger et al., 1981). Natürlicherweise bilden sich ausschließlich kleine Schwärme von fünf bis 20 Individuen (Lawrence, 2007), es erfolgt daher weder eine Beanspruchung noch eine Verteidigung von Lebensraum. Insgesamt stellen Zebrafische nur geringe Ansprüche an die Umgebungsbedingungen, es ergibt sich hieraus eine vergleichsweise einfache Haltung einer großen Anzahl von Zebrafischen in ihren Aquarien bei angepasster Wasser- und Raumtemperatur (Mullins und Nüsslein-Volhard, 1993; Westerfield, 2007).

Ein Fischpaar produziert im wöchentlichen Rhythmus ca. 100 bis 300 Eier, sodass mehrere Hundert Eier für ein Experiment zur Verfügung stehen; die Voraussetzungen sind daher ideal für genetische Analysen während der frühen Entwicklungsphase (Culp et al., 1991; Driever et al., 1994). Die Embryogenese des Zebrafisches erfolgt im Vergleich zu anderen Wirbeltiermodellen deutlich schneller, durch die externe Befruchtung und Entwicklung außerhalb des Mutterleibes wird eine Bildgebung – auch mehrfach, da die Tiere zwischenzeitlich in ihr Wachstumsmedium zurück transferiert werden können - am lebenden Organismus möglich (Nüsslein-Volhard und Dahm, 2002; Bin und Lyons, 2016). Die Entwicklung des Zebrafisch-Embryos ist im Detail beschrieben (Kimmel et al., 1995), aus der Eizelle entwickelt sich innerhalb der ersten Tage eine schwimmende, nur wenige Millimeter große Larve. Bereits zwölf Stunden nach der Befruchtung weisen Embryonen die ersten typischen Merkmale eines Vertebraten auf (siehe Abb. 1; Kimmel, 1989). Während der ersten 24 bis 48 Stunden sind die Larven fast durchsichtig, durch Anwendung von Phenylthiourea (PTU) besteht eine chemische

Möglichkeit, die Pigmententwicklung auch darüber hinaus zu hemmen (Karlsson et al., 2001). Hieraus ergibt sich die Eignung für groß angelegte Screenings im Bereich der Genforschung oder der Pharmakologie.

Mit der Produktion von homozygoten diploiden Zebrafisch-Klonen wurden durch die AG Streisinger bereits in den 1980er Jahren erste genetische Manipulationen etabliert (Streisinger et al., 1981). Heutzutage ist die Injektion von DNA in das Ein- bis Vierzellstadium eine einfache Methode, um genetische Mutationen zu forcieren. Die Injektion von translationshemmenden Oligonukleotid-Morpholinos bewirkt die Blockade zellulärer Prozesse. Fluoreszierende Marker werden auf ähnliche Weise eingebracht, um die Entwicklung einzelner Zellen beispielsweise während der Embryonalphase gezielt verfolgen zu können.

Die Darstellung der Myelinisierung im Zebrafisch erfreut sich einer großen Beliebtheit, da selbst im adulten Fisch noch eine Reparatur von Myelinschäden im zentralen Nervensystem (ZNS) gelingt und somit die Funktionalität wiederhergestellt werden kann (Rasmussen und Sagasti, 2016). Auch wenn dies in Säugetieren meist nicht gelingt, so sind doch die zellulären Vorgänge und physiologischen Prozesse häufig konserviert. Es besteht eine hohe Ähnlichkeit zwischen menschlichem und Fisch-Genom, rund 71 % der menschlichen Gene besitzen zumindest ein Zebrafisch-Ortholog (Howe et al., 2013). Alle bisher bekannten für die Myelinisierung relevanten Proteine sind (mit gewissen Ab-



**Abb. 1:** Entwicklung des Zebrafisches. (A) Eizelle kurz nach der Befruchtung. (B) Embryo an 1 dpf. (C) Frei schwimmende Larve an 5 dpf (days post fertilization). (D) Adulter weiblicher Zebrafisch, erkennbar an dem rundlichen Körper sowie der gelblichen Streifen. (E) Adulter männlicher Zebrafisch, erkennbar durch schlanke Körperform und orangene Streifung. Eigene Aufnahmen, Maßstab A) bis C): 350 µm, D) und E): 0,5 cm.

weichungen innerhalb der Sequenzen) im Fisch vorhanden. Hierbei ist zu beachten, dass Zebraabärblinge als Strahlenflosser im Vergleich zu den meisten anderen Vertebraten beinahe doppelt so viele Gene besitzen, so auch den Menschen. Dabei haben sich zunehmend Hinweise auf eine dritte Genomduplikation im Zeitalter des Devon ergeben (sogenannte 1-2-4-8-Regel, Meyer und Schartl, 1999). Dafür spricht, dass diverse Genfamilien häufig annähernd die doppelte Anzahl an Mitgliedern aufweisen, einzelne Gene jedoch nicht auf dem gleichen Chromosom zu finden sind (Amores et al., 1998). Es kann dabei auch zu einer Ausdifferenzierung der Funktion zwischen den einzelnen Genen kommen, des Weiteren sind bei dem gleichen Gen mitunter unterschiedliche Funktionen bei Fisch und Mensch zu beobachten (Wittbrodt et al., 1998). Es ist daher bei der Untersuchung von Genen im Zebrafisch auf eine eventuelle Kopie zu achten.

## 1.2 Myelinisierung durch Oligodendrozyten im zentralen Nervensystem

Um eine effektive Informationsleitung zu gewährleisten, erfolgt bei Vertebraten im zentralen Nervensystem die Myelinisierung durch die Oligodendrozyten. Hierbei bilden die Zellen einen oder mehrere Ausläufer ihrer Plasmamembran und umhüllen mit diesen jeweils Abschnitte benachbarter Axone (Internodien). Lediglich kleine Segmente – die sogenannten Ranvierschen Schnürringe – zwischen den Internodien bleiben unmyelinisiert. Dies führt zu einer elektrischen Isolierung der Axone und über die dadurch entstehende saltatorische Erregungsleitung zu einer Beschleunigung der Nervenleitungsgeschwindigkeit um das bis zu Einhundertfache im Vergleich zu unmyelinisierten Axonen der gleichen Größe (Czopka, 2016; Hartline und Colman, 2007; Waxman und Bennett, 1972). Sowohl die Dicke als auch die Länge der Myelin-Ummantelung sind hierbei modulierende Faktoren (Almeida und Lyons, 2017; Arancibia-Cárcamo et al., 2017). Myelinisierung bildet folglich die Grundlage für schnelle motorische, sensorische und kognitive Funktionen (Nave und Werner, 2014).

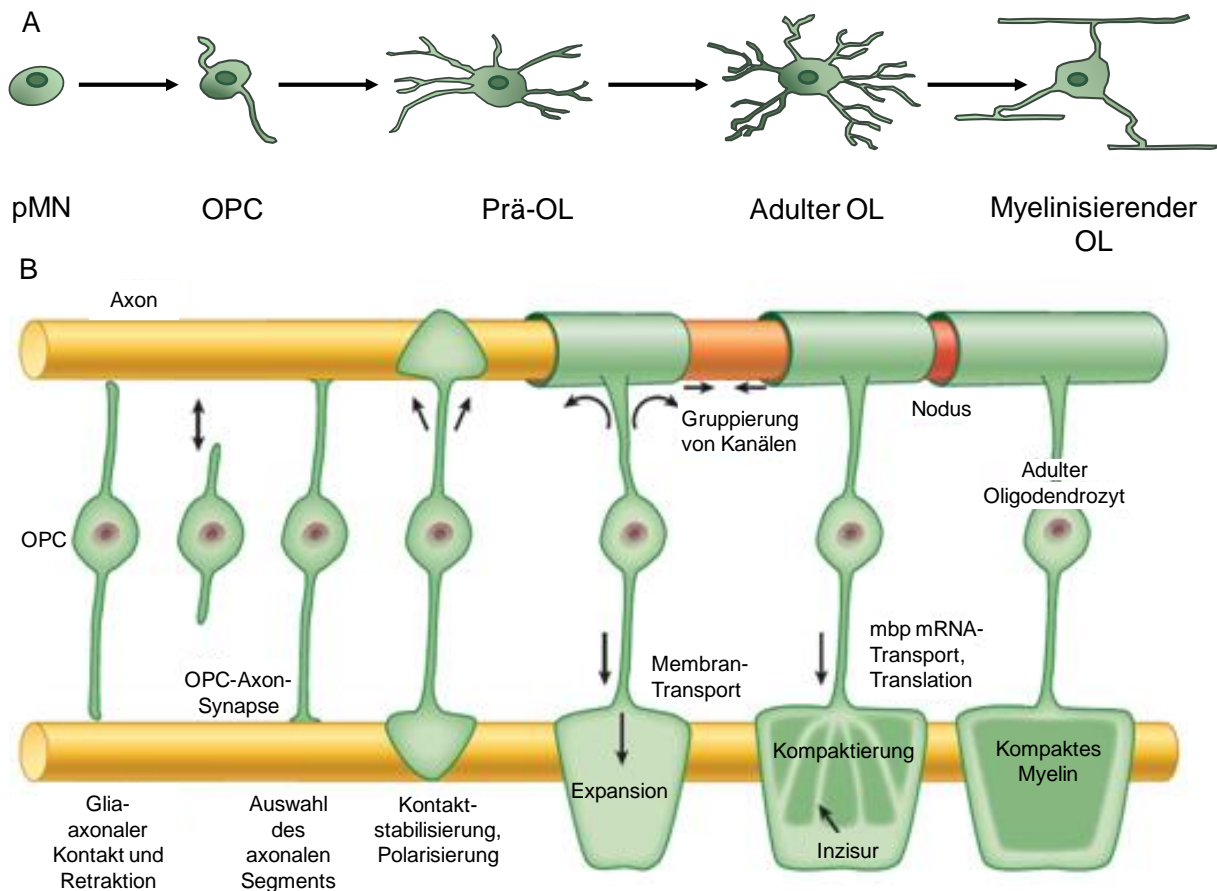
Darüber hinaus erfüllen Gliazellen, zu denen die Oligodendrozyten gezählt werden, diverse weitere Funktionen. Wurden Glia bei ihrer Entdeckung durch Rudolph Virchow noch als „Nerven kitt“ bezeichnet (Virchow, 1846), so steht heute fest, dass sie weit davon entfernt sind nur eine Füllmasse zu sein. Es existieren mehrere Zelllinien und eine jede von ihnen erfüllt spezifische Funktionen. So leisten Oligodendrozyten auch

unabhängig von dem Prozess der Myelinisierung Unterstützung bei der metabolischen Versorgung der Axone und sichern so deren Überleben und ihre Funktionsfähigkeit (Fünfschilling et al., 2012; Lee et al., 2012). Des Weiteren wird mittlerweile eine Myelin-Plastizität auch im Erwachsenen vermutet, was relevant für Lernmechanismen zu sein scheint (Wang und Young, 2014; McKenzie et al., 2014).

Myelin ist im Vergleich zu anderen Membranen zu einem geringeren Anteil hydriert. Der Anteil von Lipiden an der Trockenmasse von Myelin beträgt etwa 70 %, vor allem Cholesterin, Phospho- und Glycolipide; die restlichen 30 % sind Proteine, hauptsächlich MBP (Myelin basic protein) und PLPs (Proteolipid proteins). Dieser für eine Membran ungewöhnliche Lipidreichtum ist Voraussetzung für die isolierende Eigenschaft des Myelins (Baumann und Pham-Dinh, 2001).

Oligodendrozyten entstehen aus Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (OPC), welche hauptsächlich in der pMN-Domäne (Motor neuron progenitor) der ventralen ventrikulären Zone des sich entwickelnden Neuralrohres gebildet werden (Kuhn et al., 2019; Timsit et al., 1995). Einen gemeinsamen Ursprung haben Neurone und Glia in der neuralen Vorläuferzelle (NPC). Durch An- oder Abwesenheit diverser Marker wie beispielsweise Shh (Sonic hedgehog) und PDGFR $\alpha$  (Platelet-derived growth factor  $\alpha$ ) erfolgt die Differenzierung in eine der beiden Zellreihen (Abb. 2; Traiffort et al., 2016). Alle Zellen der oligodendroglialen Linie exprimieren unter anderem die Marker Olig2 (Oligodendrocyte transcription factor), SOX10 (SRY-box transcription factor 10) und Nkx2.2 (NK2 homeobox 2), für deren Identifikation und Beobachtung im Zebrafisch verschiedene fluoreszierende Reportlinien existieren (Kirby et al., 2006; Ng et al., 2005; Shin et al., 2003).

Von der ventralen ventrikulären Zone migrieren OPC zur gleichmäßigen Besiedlung des restlichen ZNS, die Verteilung wird durch Zell-Zell-Interaktionen reguliert (Czopka, 2016). OPCs bilden mehrere feine Fortsätze, welche auf der Suche nach einem zu myelinisierenden Axon verlängert und bei Kontakt mit anderen OPC zurück gezogen werden können (Kirby et al., 2006), sie sind außerdem die proliferativsten Zellen im ZNS und in der Lage, lebenslang myelinisierende Oligodendrozyten zu erzeugen (Allen und Lyons, 2018). Gemeinsam mit Astrozyten und Mikroglia begleiten OPC junge Axone zu ihrem Ziel (Meng et al., 2016). Studienergebnisse der letzten Jahre konnten zeigen, dass sich die Entwicklung von Oligodendrozyten aus OPC in Säugern und im Zebrafisch



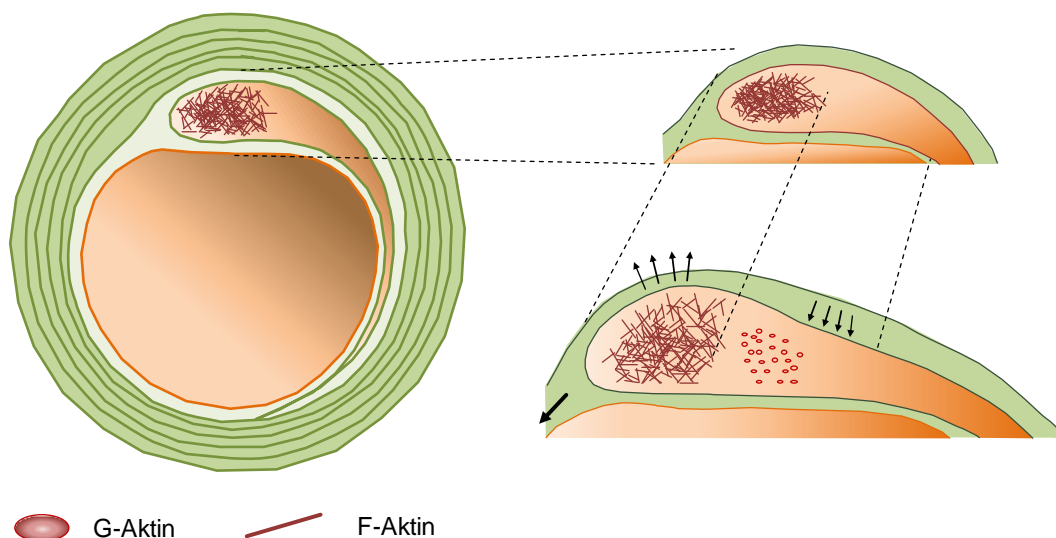
**Abb. 2:** Die Entwicklung von Oligodendrozyten. (A) Vereinfachtes Schema zur Entwicklung eines Oligodendrozyten (OL) aus einer neuralen Vorläuferzelle (motor neuron progenitor, pMN). NPC entwickeln sich in der ventralen ventrikulären Zone des Rückenmarks während der Embryonalphase. Die entstehenden OPC migrieren in das gesamte ZNS und beginnen, filamentöse Fortsätze zu bilden. An ihrem Ziel angelangt werden Axone myelinisiert und nicht notwendige Fortsätze zurückgezogen (modifiziert nach Traiffort et al., 2016 und Kuhn et al., 2019). (B) Schematischer Ablauf der Myelinisierung durch OL. OPC verlängern oder retrahieren Fortsätze, bis erste Kontakte stabilisiert werden. Es entsteht eine Polarisierung hin zum Axon. In der unteren Bildhälfte sind Expansion und Kompaktierung dargestellt, in der oberen Hälfte die Entstehung eines Ranvierschen Schnürrings (adaptiert nach Nave und Werner, 2014).

gleichen und die Prozesse sowohl während der Embryonalphase als auch im erwachsenen ZNS ähnlich ablaufen (Almeida und Lyons, 2017).

Sind OPC an ihrem Ziel angekommen, entwickelt sich die Mehrzahl zu adulten Oligodendrozyten, entstandene Kontakte zu umliegenden Axonen können dann entweder stabilisiert oder aufgelöst werden. Bei einer Stabilisierung wird eine spezielle Membrandomäne zur weiteren axoglialen Kommunikation geschaffen wodurch eine Polarisierung der Zelle hin zum Axon erfolgt (Nave und Werner, 2014). Anschließend expandiert die Membran sowohl radial als auch longitudinal entlang des Axons

(,Wrapping‘). Die Wachstumszone befindet sich an der Spitze und schiebt sich dabei immer unter der zuletzt gebildeten Lamelle unmittelbar am Axon entlang, gleichzeitig verbreitert sie sich und legt sich auch lateral zwischen Axon und die zuvor gebildete Lamelle (Snaidero et al., 2014). Weiter abaxonal liegende - also ältere - Myelinlamellen werden durch spezifische adhäsive Proteine kompaktiert, letztendlich befindet sich kein Zytoplasma mehr zwischen den Membranen (Nave und Werner, 2014). Es bleiben zunächst zytoplasmatische Kanäle für den intrazellulären Transport offen, welche während der Kompaktierung nach und nach geschlossen werden (Chang et al., 2016). So wird adaxonal Platz für neue Myelinlamellen geschaffen.

Nawaz et al. konnten als Motor für das ,Wrapping‘ ein Zusammenspiel von Aktin-Polymerisierung und –Depolymerisierung ausmachen (Abb. 3; Nawaz et al., 2015). Die Polymerisierung zu filamentösem Aktin konzentriert sich an der Wachstumszone, sodass nicht-adhäsive Protrusionen gebildet werden. Die Depolymerisierung wandelt diese in flächige Lamellen um, wodurch die Oberflächenspannung verringert und in der Folge die laterale Expansion und Adhäsion befördert wird.



**Abb. 3:** Schema zum Vorgang der Myelinisierung durch Oligodendrozyten im ZNS. Die Polymerisierung zu F-Aktin treibt die führende Schicht des Oligodendrozyten-Fortsatzes vorwärts, unter der vorhergehenden Myelinlage direkt am Axon entlang. Depolymerisiertes G-Aktin hinter der Wachstumszone hingegen sorgt für die Expansion und Adhäsion der neuen Myelin-Schicht. Ein stetiger Wechsel zwischen Polymerisierung und Depolymerisierung (Pfeile) sorgt so für die Ausbildung neuer Lamellen (modifiziert nach Nawaz et al., 2015).

Myelinisierende Oligodendrozyten im Zebrafisch exprimieren ebenso wie adulte Schwann-Zellen im peripheren Nervensystem (PNS), die Marker MBP und ClaudinK, auch hier wurden bereits fluoreszierende transgene Reporter-Linien etabliert (z.B. Almeida et al., 2011; Münzel et al., 2012). Störungen der Myelinisierung treten einerseits regulär mit dem höheren Alter auf (Bartzokis, 2004), andererseits führt aber auch eine krankhafte Demyelinisierung zu einer Beeinträchtigung der Leitgeschwindigkeit und langfristig zu einem Untergang von Neuronen. Demyelinisierung ist auch ein klassisches klinisches Merkmal beispielsweise bei der Multiplen Sklerose oder nach Verletzungen des Hirns oder des Rückenmarks (Preston und Macklin, 2015; Richardson et al., 2010; Waxman, 1989). Auch wenn Remyelinisierung in experimentellen Modellen wie dem Zebrafisch bereits möglich und vielversprechend ist, konnte bisher keine suffiziente Remyelinisierung im ZNS im Menschen erreicht werden (Czopka, 2016; Franklin und ffrench-Constant, 2008; Münzel et al., 2014).

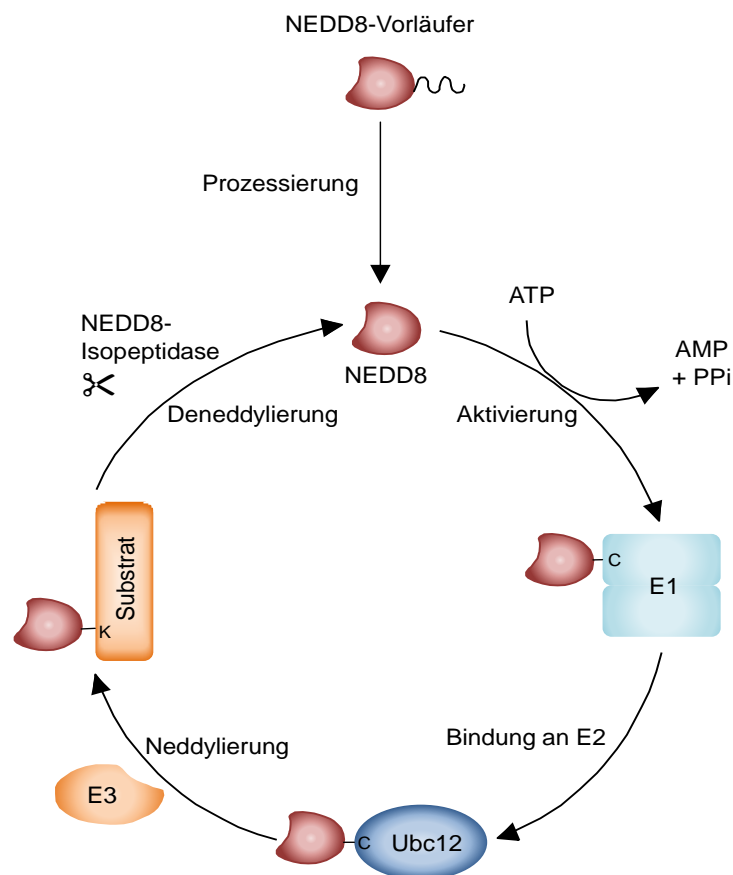
### 1.3 NEDD8 und seine Bedeutung in der Modifikation von Proteinen

Neddylierung ist eine posttranslationale Modifikation, welche mit der Ubiquitinierung verwandt ist. Durch die Konjugation des Ubiquitin-ähnlichen Proteins NEDD8 (Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated 8) an einen Lysin-Rest verschiedener Zielmoleküle kann sowohl eine regulatorische Kontrolle über den Zellzyklus als auch über die Proliferation erreicht werden (für einen Überblick siehe Rabut und Peter, 2008; van der Veen und Ploegh, 2012). Initial wurde NEDD8 zusammen mit einer Reihe weiterer Gene beschrieben, die sich im Embryonalstadium im Mäusehirn nachweisen ließen und anschließend postnatal und in der adulten Maus herunter reguliert waren (Kumar et al., 1992).

NEDD8 weist mit einer ca. 80 % homologen und 60 % identischen Aminosäure-Sequenz zu Ubiquitin die höchste Ähnlichkeit aller ‚Ubiquitin like proteins‘ auf und ist nicht nur in Vertebraten, sondern auch in Pflanzen und Pilzen zu großen Teilen konserviert (Burroughs et al., 2007; Kumar et al., 1993). NEDD8 konnte in den meisten Geweben nachgewiesen werden, so auch im ZNS, im Herz und in der Skelettmuskulatur (Dil Kuazi, 2003; Hori et al., 1999).



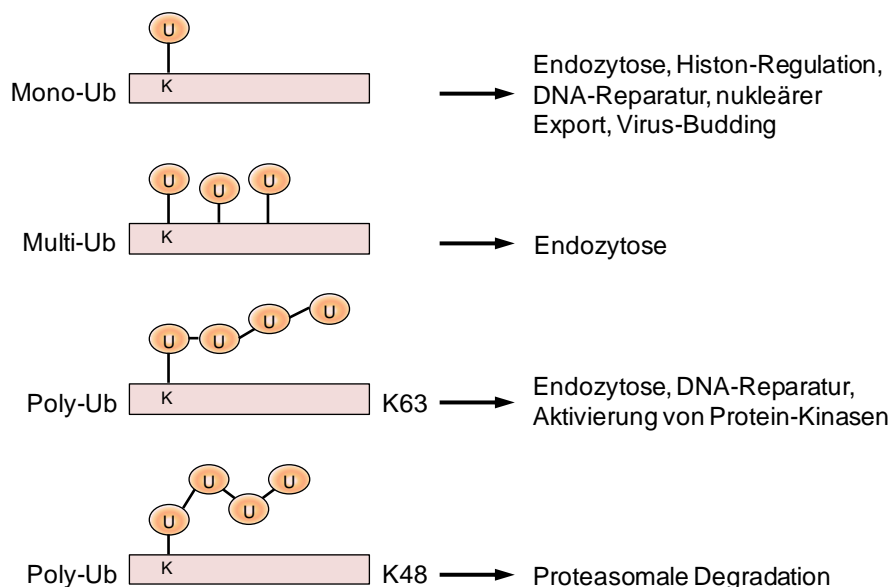
Bevor NEDD8 an Substrate konjugiert werden kann, ist eine Prozessierung des Vorläufermoleküls nötig, um den Diglycinrest freizulegen, über welchen dann NEDD8 gebunden werden kann. Einerseits konnte bereits gezeigt werden, dass das Deubiquitinierungsenzym UCH-L3 (Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L3) auch das C-terminale Ende von NEDD8 abspaltet (Wada et al., 1998). Andererseits existiert mit SENP8 (Sentrin-specific protease 8) eine NEDD8-spezifische Protease, welche das Vorläufermolekül prozessieren kann (Mendoza et al., 2003). Anschließend erfolgt eine ATP-abhängige Aktivierung des C-Terminus durch die heterodimere E1-Ligase Nae1 (NEDD8 activating enzyme 1, Gong und Yeh, 1999; Liakopoulos et al., 1998; Walden et al., 2003). In der Folge wird NEDD8 auf die E2-Ligase Ubc12 (Ubiquitin conjugating enzyme E2 M) transferiert, welche selektiv an NEDD8 bindet (Liakopoulos et al., 1998). Die Spezifität ergibt sich aus der Oberflächenstruktur, welche lediglich eine Bindung von



**Abb. 4:** Schematische Darstellung der Neddylierung. Darstellung der Prozessierung des Vorläufermoleküls, Aktivierung von NEDD8 durch die E1 (Nae1), Übertragung auf die E2 (Ubc12) und Konjugation über verschiedene E3-Ligasen an das Substrat. Deneddylierung und Wiederherstellung von freiem NEDD8 möglich mittels NEDD8-Isopeptidasen (Modifiziert nach Rabut und Peter, 2008).

Ubc12 an ein mit NEDD8 beladenes Nae1 erlaubt (Huang et al., 2005; Huang et al., 2008). In einem letzten Schritt wird NEDD8 an das jeweilige Substrat konjugiert, was durch verschiedene spezifische und bisher noch weitgehend unbekannte E3-Ligasen katalysiert wird (Brockmann et al., 2019). Die bisher bekannten Enzyme sind Ubiquitin-E3-Ligasen wie c-Cbl (Casitas B-lineage lymphoma proto-oncogene), die ebenfalls als NEDD8 E3-Ligasen fungieren können (Oved et al., 2006). Eine Deneddylierung ist über NEDD8-Isopeptidasen, beispielsweise SENP8, möglich (vereinfachte schematische Darstellung siehe Abb. 4; Gan-Erdene et al., 2003).

Bereits Kumar et al. nahmen an, dass NEDD8 für die Entwicklung des ZNS während der Embryonalphase relevant sein könnte (Kumar et al., 1992). Neuere Untersuchungen legen die Vermutung nahe, dass NEDD8 auch in der postembryonalen Entwicklung vorhanden ist (Vogl et al., 2015). So besteht eine Ähnlichkeit zwischen NEDD8 und Ubiquitin nicht nur in ihrer Aminosäuresequenz, sondern auch in den vielfältigen Vorgängen, die durch Neddylierung bzw. Ubiquitinierung ausgelöst werden können. Mono- oder Polyubiquitinierung führen beispielsweise zu einer proteasomalen Degradation, bewirken Endozytose oder induzieren DNA-Reparaturmechanismen (Abb. 5; Haglund



**Abb. 5:** Ubiquitin-Modifikationen (Ub) und deren resultierende zellulären Funktionen. Es können entweder einzelne Ub an einen (Mono-Ub) oder mehreren (Multi-Ub) Lysinresten (K) konjugiert werden, ebenso kann eine Kette aus mehreren Ub an einen Lysinrest an verschiedenen Positionen (Poly-Ub) angehängt werden (adaptiert nach Haglund und Dikic, 2005).

und Dikic, 2005). In einer ähnlichen Weise bewirkt die Neddylierung Konformationsänderungen, modifiziert Protein-Protein-Interaktionen und schafft neue Bindungsstellen für weitere interagierende Proteine (Rabut und Peter, 2008). Kettenbildung durch mehrere NEDD8-Moleküle scheint *in vitro* und *in vivo* möglich zu sein, die Funktion einer physiologischen Polyneddylierung ist zum heutigen Zeitpunkt nicht bekannt (Santonico, 2020). Aktuell ist unklar, ob Culline, welche bereits als Substrate identifiziert wurden, mono- oder multineddyliert sind (Enchev et al., 2015).

Bisher sind vergleichsweise wenige Substrate von NEDD8 bekannt, die am besten dokumentierte Konjugation von NEDD8 erfolgt an die Cullin-Gerüstproteine, welche die Aktivität der Cullin-RING E3 Ligasen im Ubiquitinierungsprozess beeinflussen (Pan et al., 2004; Petroski und Deshaies, 2005; Schwechheimer, 2018). Auch das Tumorsuppressorgen p53 scheint neddyliert zu sein (Xirodimas et al., 2004). Eine Neddylierung neuronaler Proteine konnte bisher aber nur in wenigen Fällen nachgewiesen werden. Die Neddylierung des mit dem Morbus Parkinson assoziierten Parkin führt zu einer erhöhten E3-Ligase-Aktivität, es ist daher zu vermuten, dass eine Beeinflussung des NEDD8-Signalweges einen möglichen Anteil an der Entwicklung des Morbus Parkinson hat (Choo et al., 2012). Darüber hinaus konnten Vogl et al. zeigen, dass eine Neddylierung des Gerüstproteins PSD-95 (postsynaptic density protein 95) für eine regelhafte Ausreifung der dendritischen Spines sowie eine korrekte synaptische Informationsweiterleitung nötig ist (Vogl et al., 2015). Brockmann et al. vermuteten, dass weitere synaptische Proteine neddyliert sein könnten, da sich eine Blockade der Neddylierung auf die synaptische Neurotransmission auswirkt (Brockmann et al., 2019).

Durch immunohistochemische Untersuchungen von menschlichem Hirngewebe konnte die Beteiligung von NEDD8 an der Bildung ubiquitinerter Einschlüsse in verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen festgestellt werden (Mori et al., 2005). Darüber hinaus wurde eine Überexpression von NEDD8 und seinen Konjugationsenzymen auch in mehreren Tumoren des Menschen gefunden (Chairatvit und Ngamkitidechakul, 2007; Salon et al., 2007). Im Zebrafisch konnte zudem eine Modulierung der antiviralen Immunantwort durch Neddylierung gezeigt werden (Yu et al., 2019).

Zur Blockade der Neddylierung kann die niedermolekulare Verbindung MLN4924 verwendet werden (Soucy et al., 2009). Sie hemmt selektiv Nae1 und wird zurzeit als Pevonedistat in klinischen Studien zur Behandlung verschiedener Malignome verwendet

(u. a. bei Glioblastom und Lymphomen; Han et al., 2019; El-Mesery et al., 2019). Eine Blockade durch MLN4924 in HEK-Zellen führt zu einer vermehrten Polymerisierung von G-Aktin zu F-Aktin und damit zu einem Anstieg der F/G-Aktin-Ratio. Weiterhin charakterisieren neue Untersuchungen den Lysinrest an Position 112 des Depolymerisierungsfaktor Cofilin1 als Bindungsstelle für NEDD8 (Vogl et al., 2020). Dies bestätigt bisher unpublizierte Daten von Einsfelder, Stein und Kollegen und macht eine Beeinflussung der neuronalen Aktin-Organisation durch neddyliertes Cofilin1 wahrscheinlich.

Wie schon zuvor erwähnt, besitzt der Zebrafisch durch eine vermutete zusätzliche Genomduplikation häufig Gene zweifach auf unterschiedlichen Chromosomen. Dies ist auch der Fall bei NEDD8, welches sich auf Chromosom 7 befindet. Eine zu 99 % identische Kopie befindet sich im Zebrafisch auf Chromosom 2 (Uniprot-Alignment), ist jedoch in Mensch und Maus nicht vorhanden. Nach Prozessierung zum reifen NEDD8 besteht zwischen den Aminosäuresequenzen kein Unterschied mehr. Bisher sind abgesehen von der Sequenz und der Lokalisation keine weiteren Informationen über das sogenannte NEDD8Like bekannt.

#### 1.4 Fragestellung und Ziele

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss der Neddylierung im Zebrafisch insgesamt sowie in einzelnen myelinisierenden Oligodendrozyten im Speziellen. Hierbei stand vor allem die Frage im Raum, ob eine fehlerhafte oder fehlende Neddylierung das Entstehen demyelinisierender Erkrankungen begünstigt. Da bisher keinerlei Daten zu diesem Thema existieren, sollte diese Arbeit erste Erkenntnisse über Neddylierung und Myelinisierung im sich entwickelnden Zebrafisch während der ersten fünf Tage nach Fertilisation liefern. Dazu wurden mehrere Ansätze gewählt, sodass zunächst eine Zuordnung der beobachteten Effekte zu einer blockierten Neddylierung möglich war und anschließend eine detaillierte Untersuchung einzelner Oligodendrozyten mittels Zwei-Photon-Mikroskopie folgen konnte.

Folgende Fragestellungen sollten durch diese Arbeit beantwortet werden:

- Ist ein Nachweis aller bisher bekannten, für die Neddylierung relevanten Gene auch im Zebrafisch möglich?

- Ist eine effektive Hemmung der Neddylierung mittels MLN4924 im Zebrafisch möglich? Welche phänotypischen Folgen können beobachtet werden? Kann eine Veränderung auch auf Protein-Ebene nachgewiesen werden?
- Ist ein vergleichbarer Effekt mittels translationsblockierenden Morpholinos gegen NEDD8 erreichbar?
- Welchen Anteil an der Neddylierung hat das im Zebrafisch vorhandene NEDD8Like?
- Welche Folgen hat das Einbringen einer dominant-negativen Ubc12-Mutation für einzelne sich entwickelnde Oligodendrozyten im Zebrafisch?
- Beeinflusst die Neddylierung über eine Regulation von Aktin-Polymerisierung und -Depolymerisierung die Myelinisierung?

## 2. Material und Methoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit dem Zebrafisch experimentiert, um den Einfluss der Neddylierung auf die Entwicklung der myelinisierenden Oligodendrozyten im ZNS zu beurteilen. Wie bereits erläutert sind Zebrafische als Modellorganismus hervorragend geeignet, unter anderem wegen ihrer einfachen Haltung, der kurzen Generationszeit und ihrer Transparenz in den ersten Tagen. Eine gesonderte Tierversuchserlaubnis musste folglich auch nicht beantragt werden, da sämtliche Versuche vor 5 dpf durchgeführt wurden. Die für die Durchführung der Versuche benötigten Geräte und Reagenzien sind im Folgenden aufgeführt. Zebrafische werden in der AG Odermatt gezüchtet, die Herkunft der verschiedenen Linien ist in Kap. 2.1.5 zu finden, Zucht und Haltung werden in Kap. 2.2.1 beschrieben.

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Pharmakologische Substanzen

Die in dieser Arbeit verwendete Substanz zur Blockierung der Neddylierung, MLN4924 (Pevonedistat), wird aktuell in präklinischen Studien als Chemotherapeutikum zur Therapie verschiedener Tumoren eingesetzt. Im Zebrafisch-Modell wurde unter anderem die Wirkung auf humane Uveal-Melanomzellen getestet (van der Ent et al., 2014). Handelsname und Hersteller sind in Tabelle 1 aufgeführt.

**Tab. 1:** Verwendetes Chemotherapeutikum zur Inhibierung der Neddylierung.

Name	Hersteller, Produktnummer
MLN4924 (Pevonedistat)	Active Biochem LTD, Kowloon, Hong Kong, A-1139

#### 2.1.2 Antikörper

Die Western Blots für diese Arbeit wurden mit Hilfe der in Tabelle 2 aufgeführten Antikörper erstellt. Durchgeführt wurden die Western Blots teilweise mit Hilfe von (Morpholino-Blots) und teilweise auch durch Ulf Einsfelder (MLN-Blots) in der AG Stein

(selbstständige Probenvorbereitung in allen Fällen). Angegeben sind der Hersteller, die Produktnummer und die verwendete Verdünnung.

**Tab. 2:** Verwendete Antikörper für die Durchführung von Western Blots.

Name	Hersteller, Produktnummer	Verdünnung
Anti- $\beta$ -Aktin	Cell Signaling Technology, Inc, Danvers, MA, #4967	1:1000
Anti-NEDD8	Abcam plc, Cambridge, Vereinigtes Königreich, ab81264	1:1000
Anti-NEDD8	Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale, NY, #210-194-R200	1:1000
Goat Anti-Rabbit HRP	Cell Signaling Technology, Inc, Danvers, MA, #7074	1:1000

### 2.1.3 Plasmide

Es wurden zwei verschiedene Plasmide zur Mikroinjektion in Fischlarven eingesetzt (Tabelle 3). Diese wurden in unserem Labor durch Dr. Changsheng Liu hergestellt, um ein memTdTomato gemeinsam mit einem mutierten Ubc12 beziehungsweise einer CFP-Kontrolle unter dem ClaudinK-Promotor im Fisch zu exprimieren. Entsprechende Vektorkarten sind im Methodenteil abgebildet.

**Tab. 3:** Verwendete Plasmide zur Erzeugung transienter Zebrafischlarven.

Name	Hersteller
pB-ClaudinK-memTdTomato-P2A-Zf-DN-Ubc12	Changsheng Liu, AG Odermatt Universität Bonn
pB-ClaudinK-memTdTomato-P2A-NLS-CFP	Changsheng Liu, AG Odermatt Universität Bonn
pB-ClaudinK-Lifeact-TdTomato-P2A-Zf-DN-Ubc12	Changsheng Liu, AG Odermatt Universität Bonn
pB-ClaudinK-Lifeact-TdTomato-P2A-NLS-CFP	Changsheng Liu, AG Odermatt Universität Bonn

#### 2.1.4 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit für Injektionen verwendeten Morpholino-Oligonukleotide wurden durch die Firma Gene Tools, LLC (Philomath, Oregon, USA) hergestellt. Die für die RT-PCRs benötigten Primer wurden von Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA) geliefert. Ihre Sequenzen sind in Tabelle 4 angegeben.

**Tab. 4:** Oligonukleotide für Morpholino-Injektionen und PCRs.

Name	Hersteller	Sequenz (5'-3')
Standard-Kontroll-MO	Gene Tools, LLC, Philomath, OR	CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA
NEDD8-MO	Gene Tools, LLC, Philomath, OR	ATTAGCATTGTGACTTCTTCTGTTT
NEDD8like-MO	Gene Tools, LLC, Philomath, OR	ACGAATACGATGGTAAGAGATGTTT
Forward Primer NEDD8	Sigma Aldrich, St. Louis, MO	CATCATGACGTGGAAGAAAACCCCGGTCCT ATGCTAATTAAAGTCAAGACACTCAG
Reverse Primer NEDD8	Sigma Aldrich, St. Louis, MO	CATCATGCGGCCGCTTACATATTTAGGAGA AGCCGGTCGGG
Forward Primer Ubc12	Sigma Aldrich, St. Louis, MO	CATCATGACGTGGAAGAAAACCCCGGTCCT ATGATCAAGCTTTTCTCGCTGAAGC
Reverse Primer Ubc12	Sigma Aldrich, St. Louis, MO	CATCATGCGGCCGCTATTTTCAGGCAGCGC TCGAAGTAGG

#### 2.1.5 Fischlinien

Die Injektionen der verschiedenen Substanzen wurden an Wildtyp- und transgenen Reporterlinien durchgeführt. Alle Linien wurden bereits veröffentlicht (entsprechende



Linien und Referenzen sind in Tabelle 5 zusammengefasst) und uns durch die entsprechenden Arbeitsgruppen freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

**Tab. 5:** Verwendete Fischlinien für Mikroinjektionen.

Name	Erhalten von
TU Wildtyp	EZRC, KIT
TL Wildtyp	EZRC, KIT
Brass Wildtyp	EZRC, KIT
Tg( <i>ClaudinK:eGFP</i> )	Münzel et al., 2012; Erhalten von AG Becker, Edinburgh
Tg( <i>ClaudinK:memGFP</i> )	Münzel et al., 2012; Erhalten von AG Becker, Edinburgh
Tg( <i>hspGFP62A</i> )	Asakawa et al., 2008; Yamanaka et al., 2013; Erhalten von AG Kawakami, Mishima
Tg( <i>Olig2:eGFP</i> )	Shin et al., 2003; Erhalten von AG Becker, Edinburgh

#### 2.1.6 Chemikalien

Nachfolgend sind in Tabelle 6 diverse Chemikalien aufgeführt, welche für die Herstellung von Injektionslösungen, Durchführung von Western Blots sowie die Betäubung der Fische zur Bilddatengewinnung benötigt wurden.

**Tab. 6:** In dieser Arbeit verwendete Chemikalien für diverse Versuche.

Name	Hersteller
Ampuwa Wasser für Injektionszwecke	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Zulassungs-Nr. 40676.00.00
Clarity Western ECL Substrate	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, #1705061
CutSmart Puffer	New England Biolabs GmbH, Ipswich, MA, #B7204S
Dulbecco's Phosphate-buffered saline (DPBS)	ThermoFisher Scientific Germany GmbH, #14190144

**Tab. 6:** Fortsetzung

Name	Hersteller
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,D8418
Instant Ocean® Meersalz	Instant Ocean, Backsburg, VA, SS15-10
4x Laemmli-Puffer	Bio-Rad Laboratories Inc., #161-0747
MS-222 (Tricain-Methansulfonat)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, #886-86-2
Natriumhydrogencarbonat	Merck KGaA, Darmstadt, #144-55-8
Phenolrot	Sigma-Aldrich Chemie GmbH,P0290

### 2.1.7 Mikroskopie und Laborausstattung

In Tabelle 7 sind die genutzten Mikroskope für Screenings und die definitive Bilddatengewinnung gelistet sowie die entsprechenden Laser und angeschlossenen Kameras zusammengefasst. Hier finden sich auch die verwendeten Zentrifugen und PCR-Geräte.

**Tab. 7:** Mikroskopie und Laborausstattung, u.a. für Screening und Bilddatengewinnung.

Name	Hersteller
AZ100 Multizoom Fluoreszenzmikroskop	Nikon Instruments Europe B.V.
Axioskop 2 Mot	Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
Biofuge® Heraeus® pico 17	Thermo Fisher Scientific Corporation Waltham, MA
Biofuge® Heraeus® primo R	Thermo Fisher Scientific Corporation
Digital Sight DS-U3 Camera controller	Nikon Instruments Europe B.V.
DS-QiMc / DS-Vi1 / DS-Fi2 Mikroskop-Kameras	Nikon Instruments Europe B.V.
Eclipse Ni-U Hellfeldmikroskop	Nikon Instruments Europe B.V.
Gel Doc™ 2000	Bio-Rad Laboratories Inc.
GFP-A Basic Filter Set für Nikon AZ 100	Semrock, IDEX Health& Science, LLC., Rochester, NY

**Tab. 7:** Fortsetzung

Name	Hersteller
HC-Filter Set mCherry für Nikon AZ100	Semrock, IDEX Health& Science, LLC.
InSight™ DeepSee™ Dual Laser	Spectra-Physics, Newport Corporation, Mountain View, CA
Intensilight C-HGFI Epifluoreszenz Illuminator	Nikon Instruments Europe B.V.
Immun-Blot® PVDF-Membran	Bio-Rad Laboratories Inc.
SMZ745 Stereomikroskop	Nikon Instruments Europe B.V.
Stemi 508 Stereomikroskop	Zeiss MicroImaging GmbH
Stemi 1000 Stereomikroskop	Zeiss MicroImaging GmbH
T100 Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories Inc.
TriMScope II Zwei-Photon Exzitations- mikroskop	LaVision GmbH

### 2.1.8 Enzym-Kits

Die angegebenen Kits (Tabelle 8) wurden zur Herstellung von cDNA, Plasmiden und für die Durchführung von PCRs verwendet. Sofern nicht anders angegeben wurden die Kits nach Herstellerangaben verwendet.

**Tab. 8:** Enzym- und Fertig-Kits zur Herstellung von PCR-Proben und Plasmiden.

Name	Hersteller
iScript Reverse Transkriptase Supermix	Bio-Rad Laboratories Inc.,#1708841
NucleoBond Xtra Midi EF	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG,#740420.50
NucleoSpin Plasmid	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG,#740588.50
NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG,#740948.50
Qubit RNA HS Assay Kit	Life Technologies, Carlsbad, CAQ32852
TRIzol RNA Isolation	Life Technologies,#15596018

### 2.1.9 Software

Für die Vermessung der Internodien wurde die Software Fiji verwendet. Fusion Capt. wurde für die Quantifizierung der Western Blots, GraphPad Prism für sämtliche statistischen Analysen verwendet. Die weiteren Programme wurden für die Bild-datengewinnung oder zur Abfassung dieser Arbeit genutzt. Alle Programme sind mit Bezugsquelle in Tabelle 9 gelistet.

**Tab. 9:** Verwendete Software, u.a. zur Datenauswertung.

Name	Hersteller
Fiji is just ImageJ	Schindelin et al., 2012
Fusion Capt. Advance	Vilber Lourmat GmbH
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, San Diego, CA
ImSpector	LaVision GmbH
Microsoft Office 2010	Microsoft Corporation, Redmond, WA
NIS Elements Basic Research	Nikon Instruments Europe B.V.
Serial Cloner 2.6	Serial Basics

### 2.1.10 Pufferlösungen

In den Tabellen 10 bis 12 werden die für die Fischhaltung und Western Blots benötigten Pufferlösungen mit ihrer jeweiligen Zusammensetzung aufgelistet. Falls vorhanden wird zunächst die Vorratslösung angegeben, auf diese folgt die in den Versuchen verwendete Verdünnung.

**Tab. 10:** Danieau-Puffer zur Aufzucht der Fischlarven während der ersten Tage.

<b>3x Danieau-Puffer (2,5 l)</b>	
dH <sub>2</sub> O	2050 ml
2,9 M NaCl	150 ml
70 mM KCl	75 ml
40 mM MgSO <sub>4</sub>	75 ml
60 mM Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> × 4 H <sub>2</sub> O	75 ml
0,5 M HEPES	75 ml

**Tab. 10:** Fortsetzung**30% Danieau-Puffer (10 l)**

dH <sub>2</sub> O	9 l
3x Danieau-Puffer	1 l

**30% Danieau-Puffer mit PTU (1 l)**

30% Danieau-Puffer	980 ml
50x PTU	20 ml

**30% Danieau-Puffer mit Methylenblau (1 l)**

30% Danieau-Puffer	998 ml
500x Methylenblau	2 ml

**Tab. 11:** Verwendeter Laufpuffer für die SDS-PAGE.**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<sub>2</sub>O auffüllen

**1x SDS-PAGE Laufpuffer (1 l)**

dH <sub>2</sub> O	890 ml
10x Laufpuffer	100 ml
10% SDS	10 ml

**Tab. 12:** Verwendete Puffer und Lösungen für Western Blot.**10x TBS (1 l)**

TRIS	12,11 g
NaCl	87,66 g

Auf 1 l mit dH<sub>2</sub>O auffüllen, pH bei 7,6 einstellen (ca. 5 ml 37 %ige HCl nötig)

**1x TBST (1 l)**

dH <sub>2</sub> O	900 ml
10x TBS	100 ml
Tween-20	0,1 ml

**Tab. 12:** Fortsetzung**Transfer-Puffer (1 l)**

10x Laufpuffer	100 ml
Methanol	200 ml
dH <sub>2</sub> O	700 ml

Aufbewahrung bei 4 °C

**Milchpulver-Lösung (500 ml)**

Milchpulver	25 g
1x TBST	500 ml

**Stripping-Puffer (1 l)**

Glycin	15 g
SDS	1 g
Tween-20	10 ml

Auf 1 l mit dH<sub>2</sub>O auffüllen, pH bei 2,2 einstellen (ca. 8-9 ml 37%ige HCl nötig)

## 2.2. Methoden

### 2.2.1 Fischhaltung und -aufzucht

Die Fischlinien der AG Odermatt wurden gemäß internationalen Standards in Aquarien mit einer konstanten Temperatur von 28 °C und einer Leitfähigkeit von 500 µS gehalten (Lawrence, 2007; Westerfield, 2007). Anpassungen der Leitfähigkeit erfolgten mittels Zugabe von Instant Ocean® Meersalz, die Einstellung des pH-Wertes auf 7,4 mit Hilfe von Natriumhydrogencarbonat (NaHCO<sub>3</sub>). Ein regelmäßiger Tag-Nacht-Rhythmus wurde mit 14 Stunden Licht und 10 Stunden Dunkelheit simuliert. In den Aquarien herrschte über einen Ein- und einen Ausflussstrom eine kontinuierliche Zirkulation. Die Reinigung des Wassers erfolgte über mechanische und biologische Filter sowie durch UV-Licht. Adulte Zebrafische erhielten zwei Mal täglich Trockenfutter und zusätzlich 24 Stunden alte lebende Artemienlarven. An Wochenenden wurde einmal täglich mit Trockenfutter und eingefrorenen Artemienlarven gefüttert.

Die Zebrafischembryonen wurden bei 28 °C in einem Inkubator aufgezogen. In den ersten 24 Stunden wurde 30 %-iger Danieau-Puffer mit 0,00001 % Methylenblau versetzt, um einer Verbreitung von Krankheiten vorzubeugen. Nach 24 Stunden konnte

dem 30 %-igen Danieau-Puffer bei Bedarf PTU zur Inhibition der Pigmentbildung hinzugefügt werden.

### 2.2.2 Vorbereitung von Mikroinjektionen

Für Mikroinjektionen in Zebrafischeier unmittelbar nach der Befruchtung wurden Agaroseplatten und Injektionsnadeln benötigt. Die Platten wurden aus 2 %-iger Agarose gegossen und mit Hilfe einer passenden Schablone so geformt, dass die fertige Platte mehrere abgeschrägte Rillen aufwies, in denen die Eier für die Injektion platziert werden konnten. Glaskapillaren wurden unter Erhitzung in zwei Teile gezogen, jeweils mit spitzen verschlossenen Enden. Unter dem Mikroskop konnten diese mit einer Pinzette dann zu feinen Nadeln aufgebrochen werden. Die entsprechende Injektionslösung wurde anschließend in die Nadel eingefüllt und das Injektionsvolumen über den Sphärendurchmesser in Öl kalibriert.

### 2.2.3 Mikroinjektion von MLN4924

MLN4924 wurde in unserem Labor von ActiveBiochem bezogen, die Aufbewahrung erfolgte gelöst in 100 % DMSO mit einer Konzentration von 10 mM bei -20 °C. Für Injektionen wurde der Stock mit DPBS, 0,5-fach CutSmart-Puffer und Phenolrot auf eine Konzentration von 2 mM verdünnt. Als Kontrolle diente reines DMSO, die Arbeitslösung wurde analog zur MLN-Lösung hergestellt. Das Injektionsvolumen betrug 0,524 nl, die Endkonzentration im Ei lag damit bei ungefähr 16,5 µM. Die Endkonzentration des DMSO mit ca. 0,16 % kann als nicht toxisch angesehen werden (Hallare et al., 2006; Maes et al., 2012). Injiziert wurde ca. eine Stunde nach Befruchtung (1 hpf) in den Dottersack von Eiern im Ein- bis Vierzellstadium.

### 2.2.4 Mikroinjektion von Morpholino-Oligonukleotiden

Die in dieser Arbeit verwendeten Morpholino-Oligonukleotide wurden konzipiert, um die Translation von NEDD8 und seiner Kopie, NEDD8Like, zu inhibieren. Die Herstellung erfolgte durch Gene Tools LLC. Aufbewahrt wurden die Morpholinos gelöst in Ampuwa mit einer Konzentration von 2 mM bei Raumtemperatur. Für die verwendete Arbeitslösung wurden die Morpholinos mit Ampuwa, 0,5-fach CutSmart-Puffer und Phenolrot auf eine optimale Konzentration von 0,64 mM (NEDD8-/NEDD8Like-MO) beziehungs-

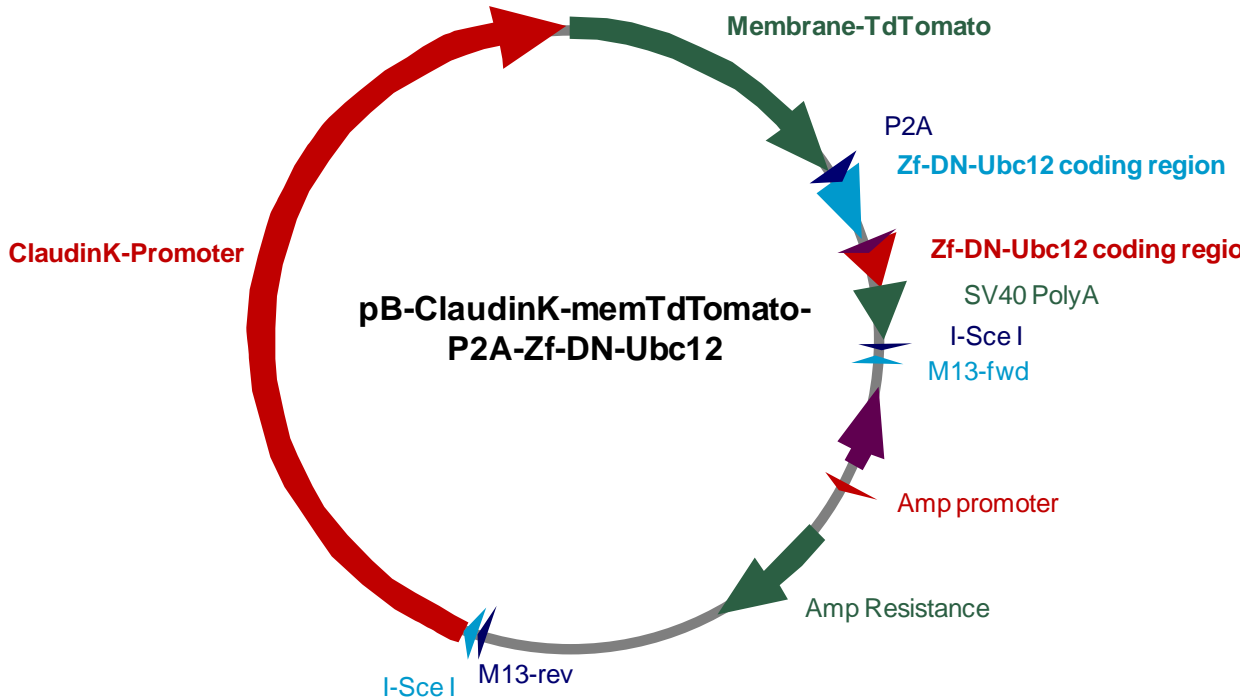
weise 1,28 mM (Kontroll-MO, MO-Mix) verdünnt. Die Arbeitslösung selbst konnte mehrfach verwendet werden und musste vor Nutzung für fünf Minuten bei 65 °C erhitzt werden.

Das Injektionsvolumen betrug 1,76 nl, sodass die Konzentration im Ei bei ca. 17,3 µM (9,5 ng) pro Morpholino lag. Da beide NEDD8-Morpholinos ebenfalls im Mix injiziert wurden, betrug dort die Gesamtkonzentration an Morpholinos ca. 34,4 µM (19 ng), sodass auch die Konzentration des Kontroll-Morpholinos bei ca. 34,4 µM lag, um eine Schädigung der Fische lediglich durch die Injektion oder die toxische Wirkung der Oligonukleotide ausschließen zu können. Die Injektion erfolgte bei ca. 1 hpf, während sich die Zellen im Ein- bis Vierzellstadium befanden. Die Morpholinos wurden ausschließlich in den Dottersack injiziert.

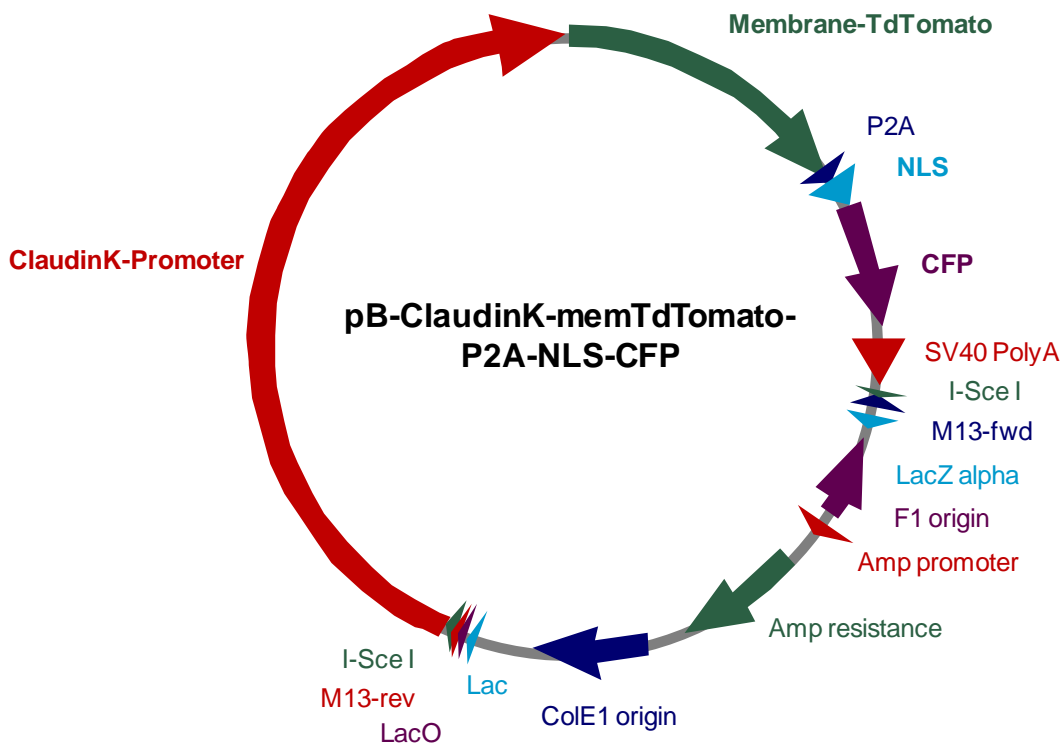
#### 2.2.5 Mikroinjektion von Plasmiden

Alle benötigten Plasmide sind Modifikationen von schon in der AG vorhandenen Vorläufern und wurden vorab von Dr. Changsheng Liu hergestellt. Die Stocks wurden bei -20 °C verwahrt, Arbeitslösungen mit Ampuwa, 0,5-fach CutSmart-Puffer, Phenolrot und dem Enzym I-Sce-1 (Rembold et al., 2006) hergestellt. Ein Plasmid enthielt die Sequenz der NEDD8-E2-Ligase Ubc12 mit einer dominant-negativen Mutation an Position 113 der Aminosäuresequenz, sodass NEDD8 in den die Mutation exprimierenden Zellen zwar an Ubc12 binden, aber nicht auf die E3-Ligasen übertragen werden konnte (Abb. 6, Wada et al., 2000). Über einen P2A-Link (Kim et al., 2011) erfolgte die Koexpression von memTdTomato. Das Kontrollplasmid enthielt hinter dem P2A-Link die Sequenz für NLS-CFP (Abb. 7). Beide Plasmide enthielten als Promotor ClaudinK, das im Fisch ab 3 dpf in Oligodendrozyten exprimiert wird. Die Injektionen erfolgten in Eier der Linie Tg (*ClaudinK:eGFP*) so schnell wie möglich nach Befruchtung im Ein- oder Zweizellstadium. Zu Beginn wurden einige Testinjektionen durchgeführt, um das geschätzte Injektionsvolumen auf ca. ein Viertel der Zellgröße zu kalibrieren. Die Konzentration der Stocks betrug 1 µg/µl.





**Abb. 6:** Vektor-Karte des Plasmids pB-ClaudinK-memTdTTomato-P2A-Zf-DN-Ubc12 zur Etablierung einer dominant-negativen Mutation im Zebrafisch.



**Abb. 7:** Vektor-Karte des Plasmids pB-ClaudinK-memTdTTomato-P2A-NLS-CFP als Kontrollplasmid, um den Erfolg der Injektion überprüfen zu können.

## 2.2.6 Bilddatengewinnung

### 2.2.6.1 Fluoreszenz-In-vivo-Imaging

Im Anschluss an die Plasmid-Injektionen erfolgte an 4 dpf ein Screening der Fischlarven unter einem Low-Resolution Fluoreszenz-Mikroskop auf TdTomato-exprimierende Zellen. Dazu wurde 30 %-iger Danieau-Puffer mit dem Muskelrelaxans MS222 versetzt, um die Fortbewegung der Fische zu unterbinden. Gewünscht war eine Koexpression des eGFP in Oligodendrozyten des Rückenmarks und des TdTomato in einzelnen Oligodendrozyten. Doppelt positive Fische wurden an 5 dpf unter dem Zwei-Photonen-Mikroskop geimaged.

### 2.2.6.2 Zwei-Photonen-Imaging

Die Fischlarven wurden zunächst an 5 dpf mit MS222 betäubt und in 1,25 % Low-gelling Agarose eingebettet, die ebenfalls MS222 enthielt. Low-gelling Agarose verfestigt sich schnell bei Raumtemperatur und verhindert eine Bewegung der Larven, ist jedoch flüssig genug damit die Fische weiterhin atmen können. Bis zu fünf Fische wurden in Seitenlage in einem Tropfen Agarose eingebettet. Anschließend wurde die Agarose mit einem Tropfen 30 %-igem Danieau-Puffer versetzt mit MS222 befeuchtet, um ein Austrocknen der Fische zu verhindern. Des Weiteren benötigte das Immersionsobjektiv Kontakt zum Wasser, um eine höhere Auflösung für die Bilder zu gewährleisten.

Das Imaging wurde mit einem TriMScope II Zwei-Photonen-Exzitationsmikroskop und der Software ImSpector von LaVision durchgeführt. Ein InSight™ DeepSee™ Dual Laser (SpectraPhysics) wurde bei einer Exzitations-Wellenlänge von 930 nm für eGFP, und für TdTomato von 1040 nm bzw. 1100 nm genutzt. Das Wasserimmersionsobjektiv besaß einen Arbeitsabstand von 2,3 mm, eine 20-fache Vergrößerung und eine numerische Apertur von 1,0. Fotos wurden als Z-Stacks mit einer Auflösung von 0,08 bis 0,16  $\mu\text{m}/\text{pixel}$  und im Abstand von 1  $\mu\text{m}$  aufgenommen. Um Hintergrundrauschen zu vermindern, wurde jeder Einzelscan doppelt aufgenommen und anschließend gemittelt.

### 2.2.6.3 Hellfeldmikroskopie

Grobe Screenings, das Aussortieren von toten Larven und Längenmessungen von Fischlarven an 5 dpf wurden in Hellfeldmikroskopie mit dem Stemi 508 Stereomikroskop von Carl Zeiss durchgeführt. Lediglich bei Längenmessungen war eine Betäubung mit

MS222 erforderlich. Diese erfolgte zu Beginn der Vermessung, anschließend wurden jeweils ca. 20 Larven im Sichtfeld des Mikroskops gruppiert und über eine Mikroskop-Kamera fotografiert. Das Objektiv besaß eine 1,25 x 0,63-fache Vergrößerung (Objektiv x Okular).

### 2.2.7 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

Jeweils zehn Larven an Tag eins bis fünf wurden gesammelt und mit TRIzol-Reagenz nach Herstellerangaben ihre RNA extrahiert. Die gesamte RNA-Menge wurde mit dem Qubit RNA HA Assay Kit entsprechend der Herstellerangaben gemessen, anschließend wurde mit dem iScript Reverse Transcription Supermix aus 1 µg RNA die cDNA generiert. Die RT-PCR selbst wurde mit NEB Phusion durchgeführt, hierbei erfolgte eine initiale Denaturierung bei 95 °C für 30 Sekunden, gefolgt von 30 Amplifikations-Zyklen (5 sec bei 95 °C, 10 sec bei 60 °C, 2 sec bei 72 °C), abgeschlossen mit 10 min bei 72 °C. Die Sequenzen der verwendeten Primer befinden sich im Material-Teil unter dem Punkt Oligonukleotide (siehe Tab. 4). Die PCR-Produkte wurden in einer Gelelektrophorese aufgetrennt und die sichtbaren Banden mit den bekannten Größen der gesuchten DNA verglichen.

### 2.2.8 Western Blot

#### 2.2.8.1 Probenherstellung

An 2 dpf wurden pro Gruppe 20 dechorionierte Larven mit MS222 betäubt und in 1,5 ml Eppis gesammelt. Wasser wurde abgezogen und die Larven möglichst trocken auf Eis gelagert. Anschließend wurden 50 µl Ladepuffer mit 5 µl Mercaptoethanol zugegeben und bei 98 °C 2 Minuten erhitzt. Mit einem Douncer wurden die Larven homogenisiert, dann 50 µl einer 1:1 Mischung aus dH<sub>2</sub>O und 3,5 %-igem SDS hinzugefügt und die Proben für 30 bis 45 Minuten bei 98 °C inkubiert. Schließlich wurden die Proben bei 13.000 rpm für 1 Minute zentrifugiert und das Pellet verworfen.

#### 2.2.8.2 Protokoll

Die SDS-Kammer wurde mit 1-fach Laufpuffer gefüllt, 15 bis 25 µl der zuvor hergestellten Proben auf das Gel geladen und bei 80 bis 100 V für 90 bis 120 Minuten aufgetrennt, bis die Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte. Eine PVDF-Membran wurde in

100 % Methanol aktiviert, mit dH<sub>2</sub>O gewaschen und in 1-fach Transfer-Puffer equilibriert, mit dem Gel in einer Blotkammer geschichtet und für ca. eine Stunde bei 250 mA geblotet. Anschließend wurde die PVDF-Membran für ca. ein bis zwei Stunden in Milchpulverlösung blockiert und danach mit dem ersten Antikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Membranen drei Mal für 10 Minuten mit 1-fach TBST gewaschen und für ca. eine Stunde mit einem HRP-gekoppelten zweiten Antikörper inkubiert. Letztlich wurde die Membran noch drei Mal für 10 Minuten mit 1-fach TBST gewaschen und mit ECL-Substrat auf Femtogramm-Level-Sensitivität (Biorad) entwickelt.

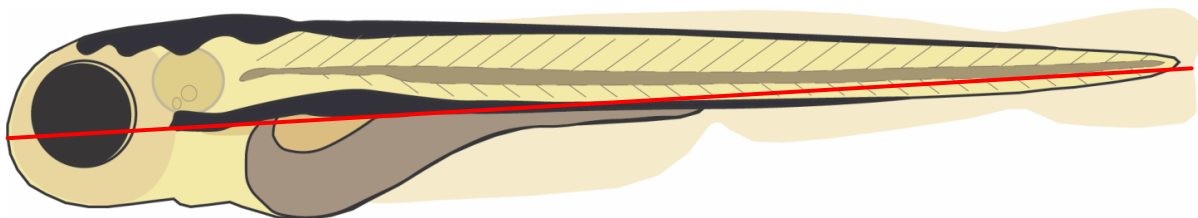
### 2.2.8.3 Quantifizierung

Die Intensität der einzelnen Banden wurde mittels Fusion Capt. Advance quantifiziert. Normiert wurde zum einen auf die stärkste Bande der uninjizierten Kontrollgruppe, zum anderen auf beta-Aktin.

### 2.2.9 Bildanalyse

#### 2.2.9.1 Vermessung ganzer Larven

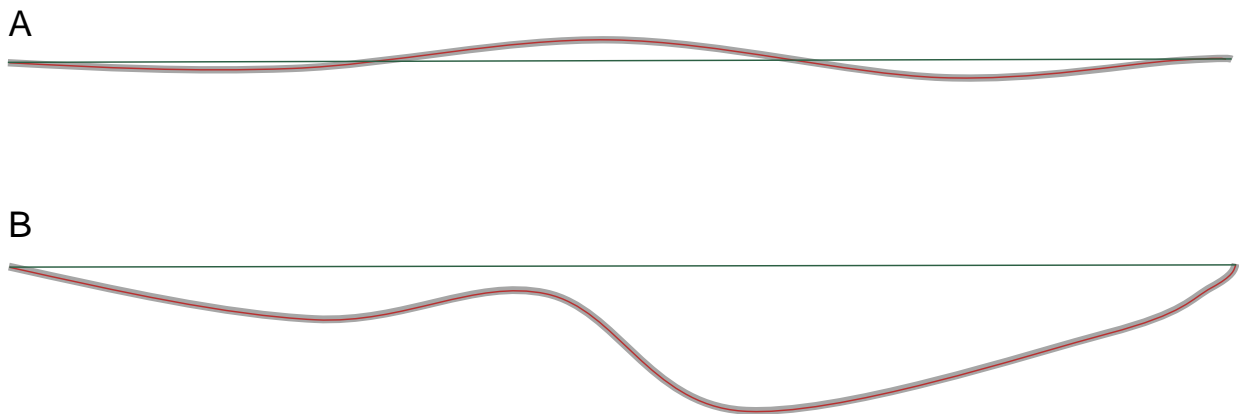
Die mit MLN- und Morpholino-injizierten Fischlarven wurden an 5 dpf mit Hilfe des Programmes NIS Elements Basic Research von Nikon vermessen. Die Fische aus den verschiedenen Gruppen wurden nacheinander fotografiert, sodass ca. 20 Fische pro Bild zu vermessen waren. Die Vergrößerung wurde eingegeben und damit ein Maßstab festgelegt, anschließend konnte die Länge der einzelnen Fische vom Kiefer bis zur Spitze der Schwanzflosse angegeben werden (vgl. Abb. 8).



**Abb. 8:** Vermessung einer Fischlarve an 5 dpf, modifizierte Zeichnung von Bhuvanewari Nagarajan.

### 2.2.9.2 Vermessung von Internodien

Die mit dem Zwei-Photonen-Mikroskop aufgenommenen Bilder wurden für die Vermessung der Internodien verblindet und in Fiji als Z-Project abgespeichert, da eine Messung in den Z-Stacks nicht möglich war. Vermessen wurden einzeln liegende Internodien, deren Verlauf klar erkennbar war. Zunächst wurde der exakte Verlauf eines Internodiums verfolgt und rot markiert. Anschließend folgte eine End-zu-End-Messung in grün (vgl. Abb. 9). Werte beider Messungen wurden in Tabellen übernommen und der Wert der roten Messung durch den der grünen Messung dividiert, um einen Quotienten zu erhalten, der die Längenunterschiede zwischen beiden Messungen klarer hervorhebt.



**Abb. 9:** Skizze zur Vermessung von Internodien. (A) Wildtyp-Internodien (graue Linie) sind annähernd linear, daher entspricht die Länge der direkten Messung zwischen den Enden (grüne Linie) fast der genauen Messung (rote Linie). (B) Internodien von DN Oligodendrozyten (graue Linie) verlaufen eher gekrümmt, daher ist die Länge der direkten Messung (grüne Linie) deutlich kürzer als die der genauen Messung (rote Linie).

### 2.2.10 Statistische Analyse

Alle in dieser Arbeit dargestellten Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt (N=3), n gibt dabei die Anzahl an Fischlarven an, die insgesamt in einer Versuchsreihe verwendet wurden. Statistische Analysen und Graphen wurden mit GraphPad Prism 6.0 erstellt. Für eine Analyse der Kaplan-Meier-Kurven wurden die einzelnen Gruppen gegeneinander mittels Log-Rank Test auf statistisch signifikante Unterschiede getestet. Längenmessungen der MLN- und Morphinolarven wurden mit dem ‚D’Agostino & Pearson omnibus normality test‘ auf eine Gaußsche Normalverteilung getestet. Da keine der durchgeführten Versuchsreihen eine Gaußsche Verteilung aufwies, mussten aus-

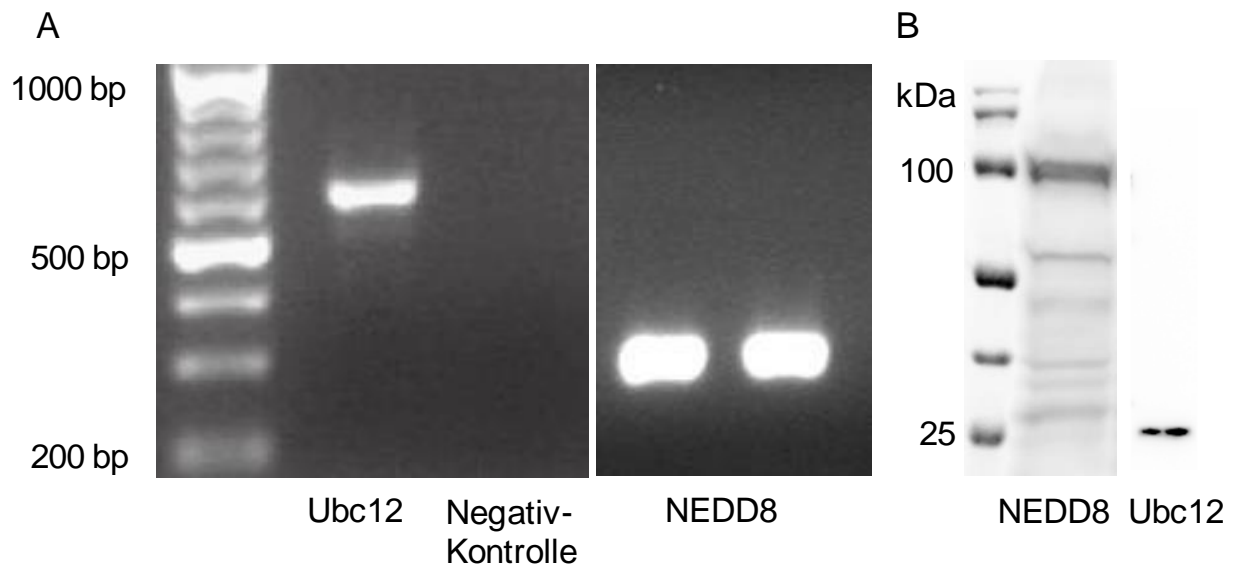
schließlich Tests für nicht-normalverteilte Daten verwendet werden. Für Versuche mit zwei Gruppen wurde der ‚Mann-Whitney U test‘, ein nicht parametrischer Test, genutzt. Für drei oder mehr Gruppen wurde der nicht parametrische ‚Kruskal-Wallis ANOVA‘ und im Anschluss ‚Dunn´s multiple comparison post-hoc test‘ angewendet, in denen alle Gruppen miteinander verglichen wurden. In allen Graphen zeigen vorhandene Fehlerbalken den Standardfehler des Mittelwertes an, p-Werte sind als Sterne angegeben (\* steht für ein  $p \leq 0,01$ , \*\* für  $p \leq 0,001$ , \*\*\* für  $p \leq 0,0001$  und \*\*\*\* für  $p \leq 0,00001$ ).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Expression von NEDD8 und Ubc12 in Zebrafisch-Larven

Da es bisher keine Daten zum Einfluss der Neddylierung auf die Myelinisierung im Zebrafisch gab, wurde mit dem Versuch eines Nachweises der NEDD8- und Ubc12-cDNA begonnen. In der RT-PCR (vgl. Abb. 10A) konnten Banden auf Höhe der für NEDD8 und Ubc12 angegebenen Größen im Zebrafisch nachgewiesen werden.

Im Western Blot konnten die für neddylierte Proteine typischen multiplen Banden mit einem starken Signal bei ca. 100 kDa gezeigt werden, eine Höhe, die mit der Größe der neddylierten Cullin-RING-Ligasen übereinstimmt (vgl. Abb. 10B). Im Ubc12-Blot konnte wie erwartet eine Bande bei ca. 25 kDa nachgewiesen werden, sodass eine weitere Untersuchung dieser beiden Proteine und deren Einfluss auf den Zebrafisch sinnvoll erschien.



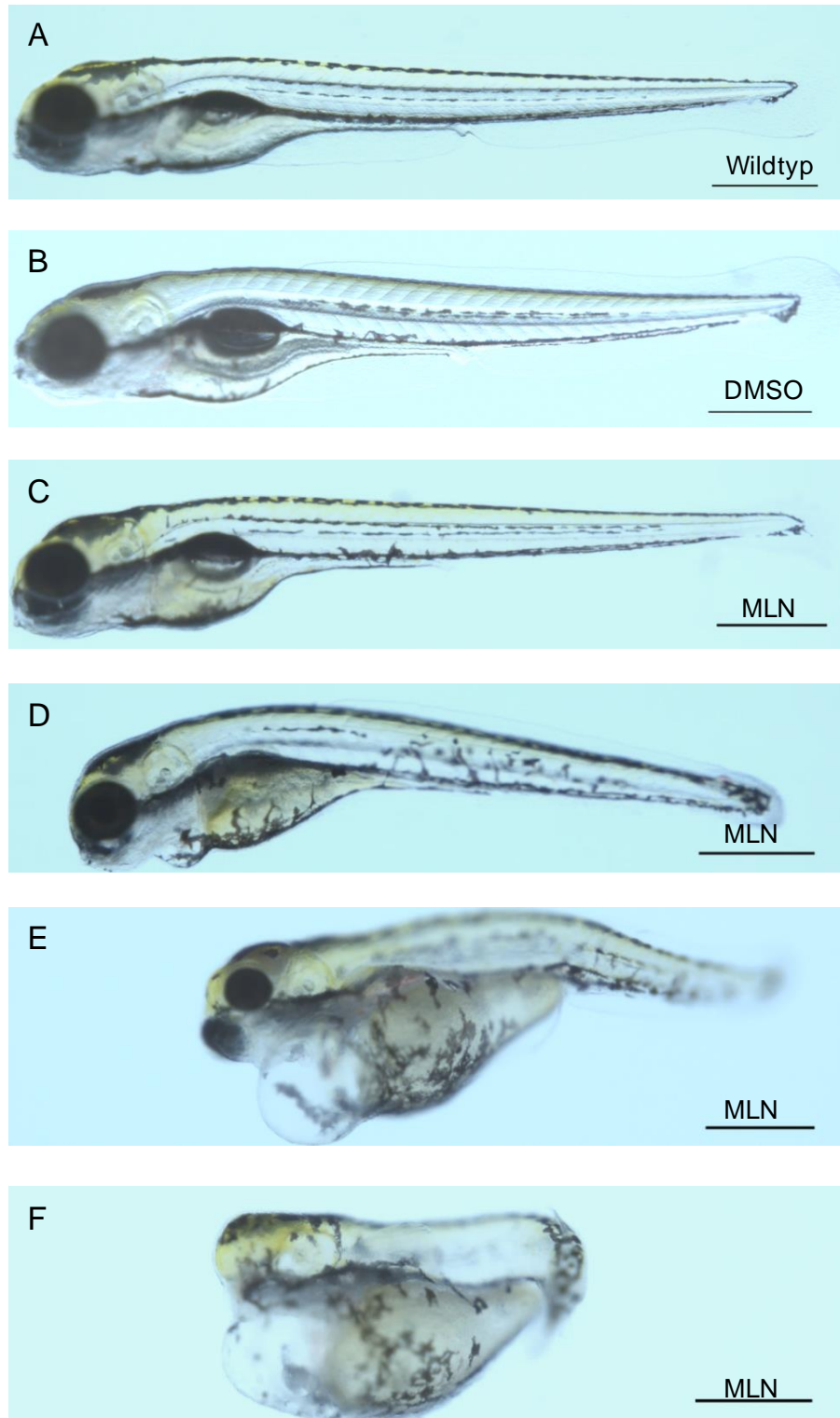
**Abb. 10:** Nachweis von für die Neddylierung relevanten Genen im Zebrafisch. (A) RT-PCR von Ubc12- und NEDD8-cDNA aus ein bis fünf Tage alten Fischlarven. Ubc12 ist nachweisbar bei ca. 600 bp, NEDD8 bei ca. 300 bp. (B) Western Blots gegen NEDD8 und Ubc12 aus zwei bis fünf Tage alten Larven. Ein starkes Signal bei 100 kDa im NEDD8-Blot weist auf neddylierte Cullin-RING-Ligasen hin, weitere neddylierte Proteine werden in verschiedenen Höhen detektiert. Ubc12 kann bei 25 kDa nachgewiesen werden. N=3, n=30

### 3.2 Selektive Hemmung der Neddylisierung durch MLN4924 im Zebrafisch

In einem ersten Ansatz wurde der selektive Nae1-Inhibitor MLN4924 genutzt, um die Neddylisierung im gesamten Zebrafisch zu blockieren und dessen Effekte auf die Entwicklung der Larven zu studieren. Da die Inkubation von Larven in MLN-haltigem Danieau keine Veränderung der Morphologie oder des Verhaltens gezeigt hatte, wurde in einem zweiten Versuch MLN4924 in steigenden Konzentrationen zu verschiedenen relevanten Entwicklungspunkten, wie z.B. in der Embryonalperiode bis 5 dpf in die Larven injiziert. Hierdurch konnte ein idealer Injektionszeitpunkt von einer Stunde nach der Befruchtung und eine optimale Konzentration von ca. 16,5  $\mu\text{M}$  in der Fischlarve etabliert werden, welche sich durch steigendes Injektionsvolumen bei gleichbleibender Konzentration des Stocks ergab. Bei der genannten Konzentration war ein Effekt von MLN4924 am Phänotyp der Larven gut erkennbar, gleichzeitig war die Überlebensrate in der MLN-injizierten Gruppe bis 5 dpf so hoch, dass eine Quantifizierung der verschiedenen Phänotypen möglich blieb. Als Kontrollsubstanz wurde DMSO verwendet, da dieses auch als Lösungssubstanz für MLN4924 genutzt wurde. Die Konzentration lag bei ca. 0,16% und konnte damit als nicht-toxisch für die Larven angesehen werden.

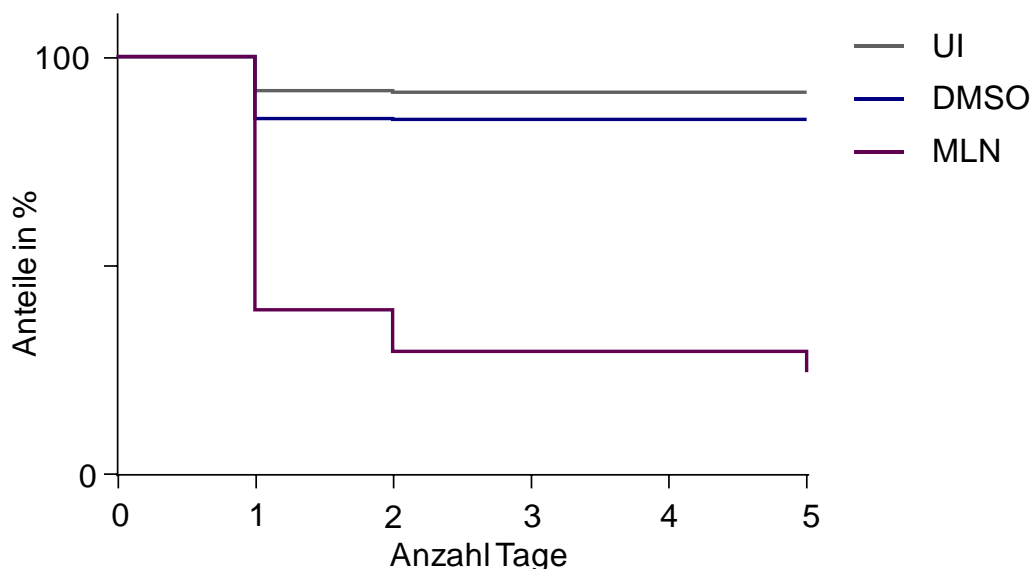
Die Fischlarven wurden an 1, 2 und 5 dpf unter dem Hellfeldmikroskop betrachtet, wobei sich bis 5 dpf eine unvollständige Penetranz und variable Expressivität der Beeinträchtigungen durch MLN4924 zeigte. Im Vergleich zu der nicht-injizierten und der DMSO-Kontrollgruppe reichte das Spektrum von phänotypisch gesunden Larven (vgl. Abb. 11C) über eine leichte Verkrümmung der Körperachse und ein unspezifisches leichtes Herzbeutelödem (vgl. Abb. 11D) bis hin zu unzureichender Ausbildung des Schwanzes und der Flossen. Zudem waren teilweise eine Unterentwicklung oder das vollständige Fehlen von Augen, Innenohr sowie starken Herzbeutel- und Dottersacködemen (vgl. Abb. 11E und F) möglich. Insgesamt zeigten die phänotypisch durch MLN4924 beeinträchtigten Larven eine ungleichmäßig ausgeprägte Wachstumsretardierung, des Weiteren auch eine uneinheitliche Störung der Pigmentbildung und -migration und einen langsameren Verbrauch des Dottersacks. Die typische Anordnung der schwarzen Pigmentstreifen erfolgte teils verspätet oder nur unvollständig (vgl. Abb. 11D). In einigen Fischen konnten Verzögerungen, die an 2 dpf bestanden, allerdings bis 5 dpf wieder aufgeholt werden.





**Abb. 11:** Injektion von DMSO und MLN an 1 hpf. Vergleich der Phänotypen von MLN-Larven (C-F) mit denen der Wildtyp- (A) und DMSO-Kontrolle (B) an 5 dpf. MLN bewirkt nicht bei allen Larven die gleichen Fehlbildungen. Besonders häufig waren Fehlbildungen der Augen (E, F) und der Schwanzflosse (D-F) in unterschiedlicher Ausprägung anzutreffen sowie eine Wachstumsretardierung und eine Störung der Pigmentbildung und -migration (D-F). Des Weiteren zeigten sich Ödeme des Herzbeutels und des Dottersackes (D-F). (Maßstab 500  $\mu\text{m}$ )

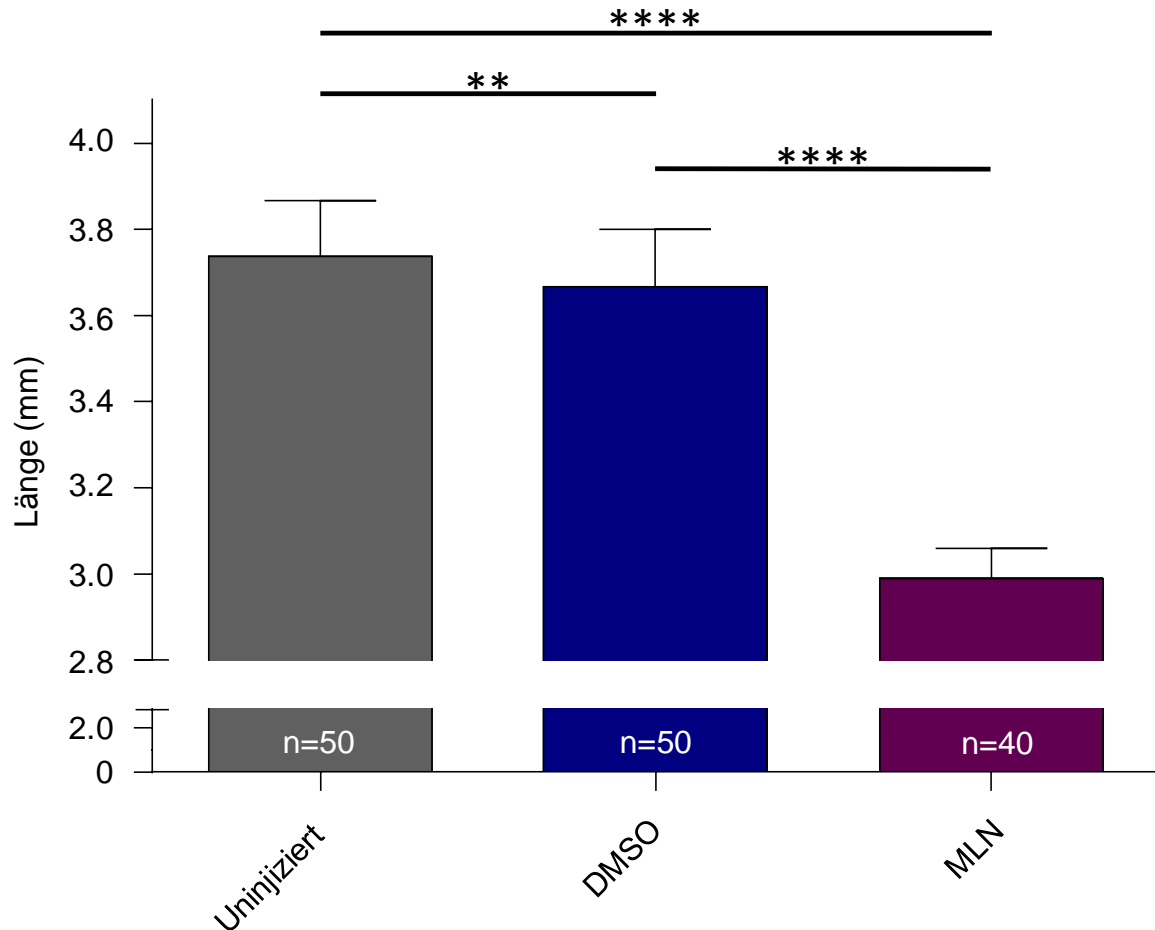
An 1, 2 und 5 dpf wurden jeweils in den Gruppen die gestorbenen Larven gezählt und mit GraphPad Prism eine Kaplan-Meier-Überlebenskurve erstellt (Vgl. Abb. 12). Bis Tag 5 fiel der Anteil an überlebenden Larven in der MLN-Gruppe kontinuierlich ab. Im Vergleich zur nicht-injizierten Kontrollgruppe zeigten sich in der DMSO-Kontrolle nur geringe Verluste, die mit dem durch die Injektion hervorgerufenen Trauma sowie mit dem Anteil an unbefruchteten Eiern vereinbar waren. Der Anteil an gestorbenen Fischen in der MLN-Gruppe ging an allen drei Messpunkten über dieses Maß hinaus. Höhere Verluste bis 2 bzw. 5 dpf kamen im Gegensatz zur MLN-Gruppe weder bei der nicht-injizierten noch der DMSO-Kontrolle vor. Der Log-Rank Test ergab statistisch signifikante Unterschiede zwischen allen drei Gruppen (UI vs. DMSO  $p=0,0009$ ; UI vs. MLN  $p<0,0001$ ; DMSO vs. MLN  $p<0,0001$ ).



**Abb. 12:** Kaplan-Meier-Überlebenskurve zur Auswertung der Anzahl an gestorbenen Larven bis 5 dpf in nicht-injizierter Kontrollgruppe (UI), DMSO-Kontrolle und MLN-Gruppe. Bis 5 dpf sinkt der Anteil der überlebenden Larven in der MLN-Gruppe auf ca. 25 % ab (UI = 91 %, DMSO-Kontrolle = 85 %).  $N=3$ ,  $n(\text{UI})=330$ ,  $n(\text{DMSO})=300$ ,  $n(\text{MLN})=300$

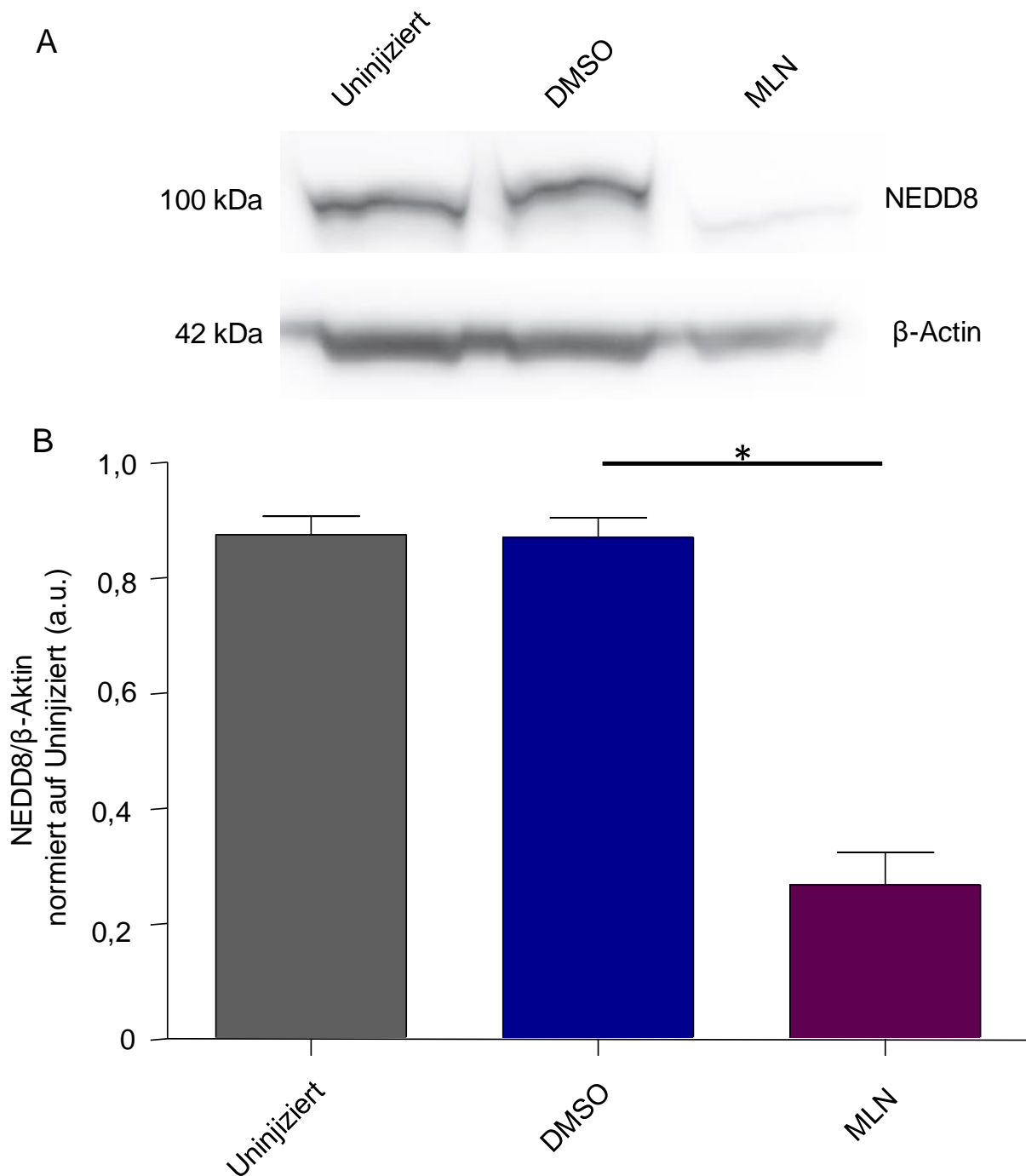
Um die subjektiv wahrnehmbare Wachstumsretardierung der Larven besser quantifizieren zu können, wurden mehrere Larven pro Gruppe an 5 dpf vermessen (vgl. Abb. 13). Es zeigte sich im Durchschnitt eine deutliche Verkürzung der Larven aus der MLN-Gruppe von 19 % im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Die DMSO-Kontrolle wiederum wies eine geringe Verminderung des Längenwachstums im Durchschnitt von 2 % im

Vergleich zur nicht-injizierten Kontrollgruppe auf, was mit einer unspezifischen Reaktion auf das durch die Injektion verursachte Trauma vereinbar war.



**Abb. 13:** Auswertung der Längenvermessung von DMSO- und MLN-injizierten Larven an 5 dpf. Signifikanter Unterschied zwischen DMSO-Kontrolle (bzw. nicht-injizierter Kontrolle, UI) und MLN (16,5  $\mu$ M). Der Kruskal-Wallis-Test ergab einen P-Wert von  $<0,0001$ , Dunn's Multiple comparison test gab für den Vergleich UI - DMSO, \*\*, für UI - MLN, \*\*\*\*, ebenso für DMSO - MLN, \*\*\*\*. N=3

Um einen Effekt der NEDD8-Blockade beziehungsweise der Neddylierung auf Proteinebene quantifizieren zu können, wurden Western Blots gegen NEDD8 von zwei Tage alten MLN-injizierten Fischlarven durchgeführt (Abb. 14A und B). Hierbei konnte eine Reduktion von NEDD8 um 69 % in der MLN-Gruppe im Vergleich zur DMSO-Kontrolle festgestellt werden. Ein signifikanter Unterschied zwischen der nicht-injizierten Kontrolle und der DMSO-Kontrolle war nicht nachweisbar. Eine quantitative Messung des freien NEDD8 war aufgrund der geringen Bandenstärke im Bereich von 10 bis 15 kDa nicht möglich.



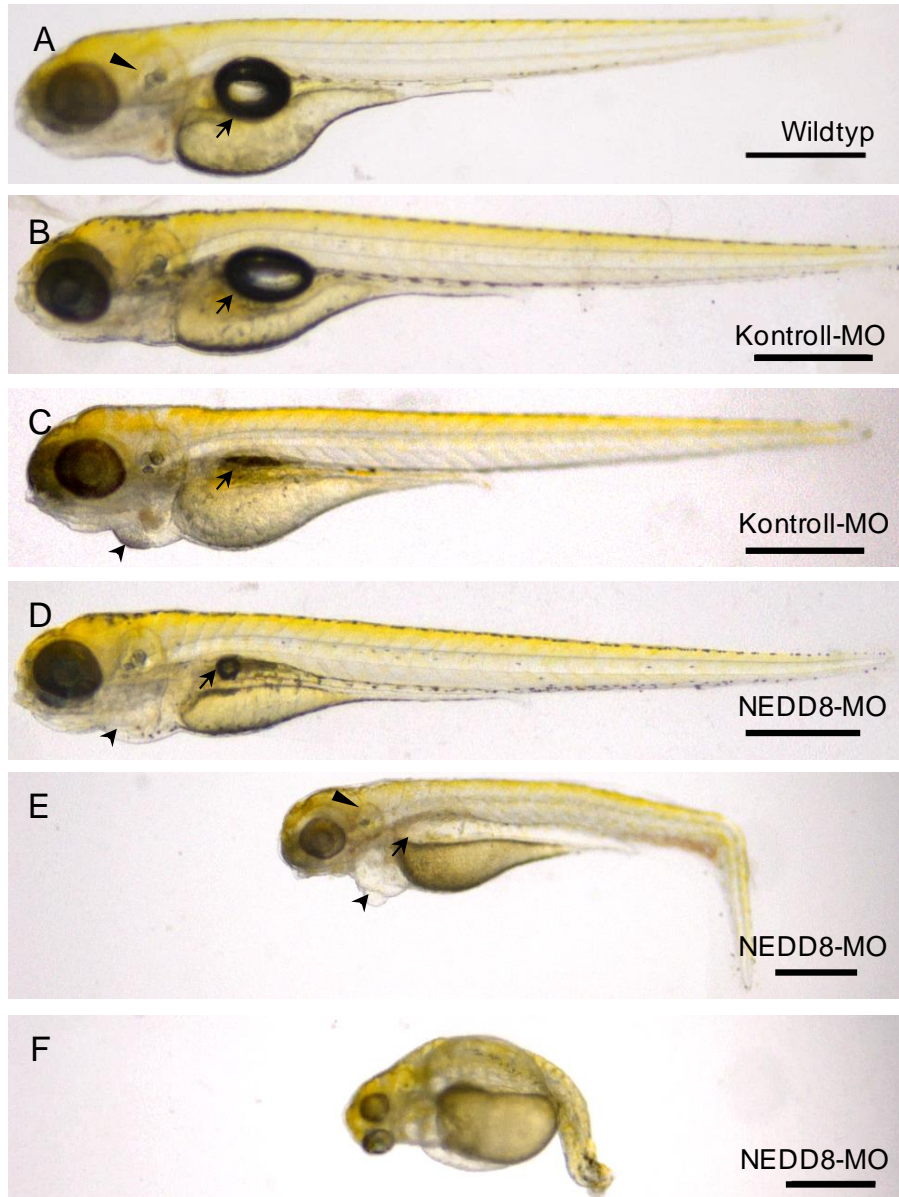
**Abb. 14:** Anti-NEDD8 Western Blots von zwei Tage alten MLN-injizierten Larven. (A) Beispiel für einen Anti-NEDD8-Blot von MLN-injizierten Larven,  $\beta$ -Aktin-Kontrolle vorhanden. Eine Reduktion der Bande bei 100 kDa in der MLN-Gruppe ist gut sichtbar. (B) Die Quantifizierung der Bandenstärke bei 100 kDa zeigt eine signifikante Verringerung von NEDD8 um 69 % im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Der ungepaarte t-Test ergab einen p-Wert von 0,0001 (\*\*\*) , der Mann-Whitney-Test ein p von 0,0294 (\*). N=3, n=20

### 3.3 Analoge Wirkung von NEDD8-blockierenden Morpholinos zu MLN4924

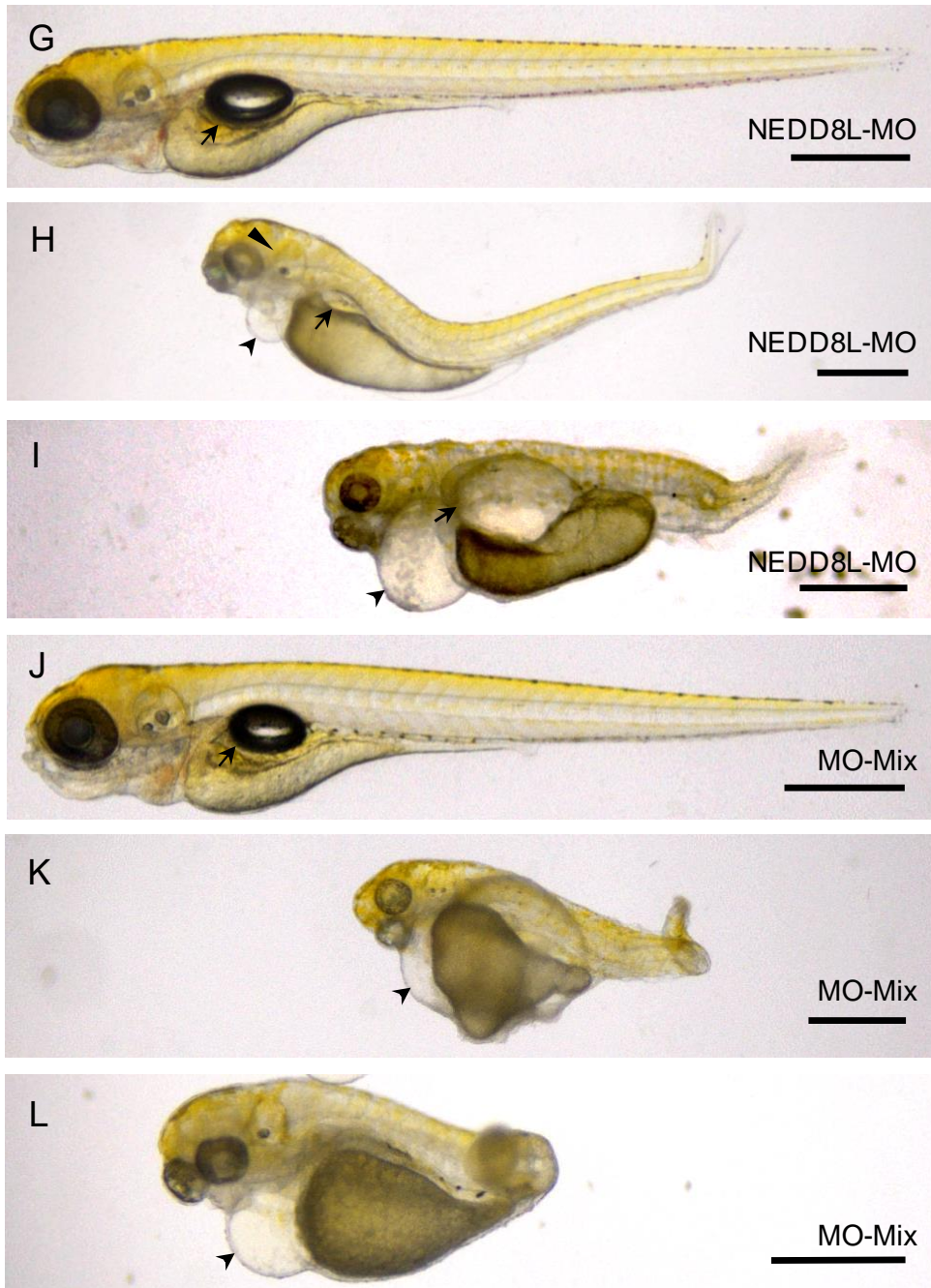
Um zu verifizieren, dass die oben beschriebenen Veränderungen in den MLN-injizierten Fischen eine spezifische Wirkung der Neddylierungs-Blockade sind, wurde im Anschluss mit der Injektion von NEDD8-blockierenden Morpholinos begonnen. Da der Zebrafisch eine Kopie des NEDD8-Gens besitzt, wurden zwei translationsblockierende Morpholinos beschafft, je einen spezifischen Morpholino für NEDD8 und NEDD8Like. Des Weiteren wurden beide Morpholinos auch in einem Mix injiziert. Als Kontrolle wurde der ‚Standard Control Morpholino‘ von Gene Tools, LLC genutzt, welcher keine Bindungsstelle im Fisch besitzt.

Die Injektion der Morpholinos erfolgte an 1 hpf mit einer Konzentration von 9,5 ng pro Morpholino. Anschließend wurden die Larven an 1, 2 und 5 dpf betrachtet. Bis 5 dpf konnten bei den Fischen mit blockierenden Morpholinos ähnliche Veränderungen beobachtet werden, wie sie die Larven auch nach Injektion von MLN4924 gezeigt hatten. In dieser Versuchsreihe waren auch nicht alle Fische innerhalb einer Gruppe in gleichem Maße von der Injektion betroffen, es zeigten sich eine unvollständige Penetranz sowie eine variable Expressivität. Wiederum konnten in den Gruppen mit Neddylierungs-Blockade Fehlbildungen der Schwanzflosse, der Augen, Herzbeutel- und Dottersack-ödeme beobachtet werden (vgl. Abb. 15E/F/H/I/K/L). Im Gegensatz zu der Injektion mit MLN4924 hatten einige Fische der NEDD8-Morpholino-Gruppen auch Fehlbildungen oder Unterentwicklung der Schwimmblase (vgl. bspw. Abb. 15D). Auch das Innenohr könnte den folgenden Abbildungen nach von einer Unterentwicklung betroffen sein, einige Fische entwickelten zudem eine intestinale Schwellung (vgl. Abb. 15E).

Eine Verformung des Dottersacks durch Ödembildung war bei den NEDD8-Morpholino-injizierten Fischen deutlich stärker ausgeprägt als bei den MLN-injizierten Fischen (vgl. bspw. Abb. 15K). Ein verlangsamter Verbrauch des Dottersacks konnte in allen injizierten Gruppen, vor allem aber bei Fischen mit einer Wachstumsretardierung, festgestellt werden. Eine fehlende Protrusion des Kiefers fiel ebenfalls in den NEDD8-Morpholino-Gruppen bei der Betrachtung der gesamten Gruppe stärker auf als in der Kontrollgruppe. Jedoch waren leichte Herzbeutelödeme und eine Unterentwicklung der Schwimmblase auch bei einzelnen Fischen der Kontroll-Morpholino-Gruppe zu erkennen (vgl. Abb. 15C). Eine definitive Aussage über die Pigmentierung konnte nicht gemacht wer-



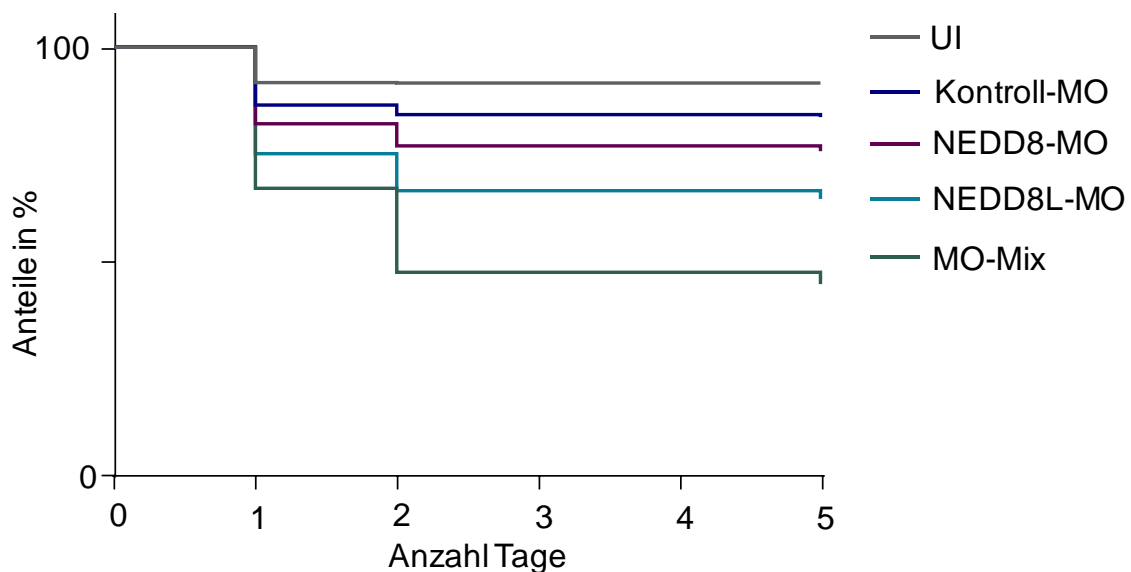
**Abb. 15:** Injektion von NEDD8- und NEDD8L-Morpholino sowie eines Morpholino-Mix an 1 hpf. Imaging zum Vergleich der Phänotypen an 5 dpf. Innerhalb der NEDD8- (C-E), NEDD8L- (F-H), und der MO-Mix-Gruppe (I-K) zeigten sich uneinheitliche Reaktionen auf die Morpholinos. (A) Eine phänotypisch unauffällige Wildtyp-Kontrolle, Schwimmblase (Pfeil) und Innenohr (Dreieck) sichtbar. (B) Entsprechend ihrem Alter entwickelte Kontroll-MO-Larve, auch hier Schwimmblase vorhanden. (C) Kontroll-MO-Fisch mit leichtem Entwicklungsdefizit – leichtes Herzbeutelödem, flache Schwimmblase. (D) Einige Larven der NEDD8-MO-Gruppe weisen nur minimale Veränderungen auf, hier ein leicht vergrößerter Herzbeutel und eine kleine Schwimmblase. (E) Die Larve ist stärker beeinträchtigt, eine Fortbewegung ist durch die abgeknickte Schwanzflosse nicht mehr möglich. Des Weiteren zeigten sich ein Herzbeutel- und ein Intestinalödem. Eine Schwimmblase ist nicht sichtbar. (F) Stark unterentwickelte Larve mit unvollständig ausgebildeten Kopf, Augen, Innenohr und Schwanzflosse, eine gekrümmte Körperachse sowie leichtem Herzbeutel- und starkem Dottersacködem. (Maßstab 1000 µm)



**Abb. 15 (Fortsetzung):** (G) Phänotypisch gesunde Larve der N8L-Gruppe. Die Schwimmblase ist hier wieder gut zu erkennen. (H) Analog zu (E) zeigten sich auch in der N8L-Gruppe Larven mit Herzbeutelödemen, einer verkrümmten Schwanzflosse und in diesem Fall unterentwickelten Augen. Die Schwimmblase ist hypoplastisch. (I) Fischlarven wie diese sind durch die stark verkürzte und gekrümmte Schwanzflosse, die ebenfalls deutlich ausgeprägten Ödeme des Herzbeutels und des Intestinaltraktes sowie die nicht zeitgerecht entwickelten Augen nicht mehr fähig, sich zu bewegen. (J) Phänotypisch gesunde Larve der MO-Mix-Gruppe. Auch hier zeigte sich eine zeitgerecht entwickelte Schwimmblase. (K) und (L) Ein Großteil der Larven der MO-Mix-Gruppe zeigte ausgeprägt die schon zuvor beschriebenen Fehlbildungen von Kopf, Herzbeutel, Dottersack und Schwimmblase. Vor allem die Krümmung und Verkürzung der Körperachse und Schwanzflosse variierte. (Maßstab 1000 µm)

den, da in der verwendeten Fischlinie eine Brass-Linie eingekreuzt wurde, wodurch nicht alle Nachkommen Pigment entwickelten.

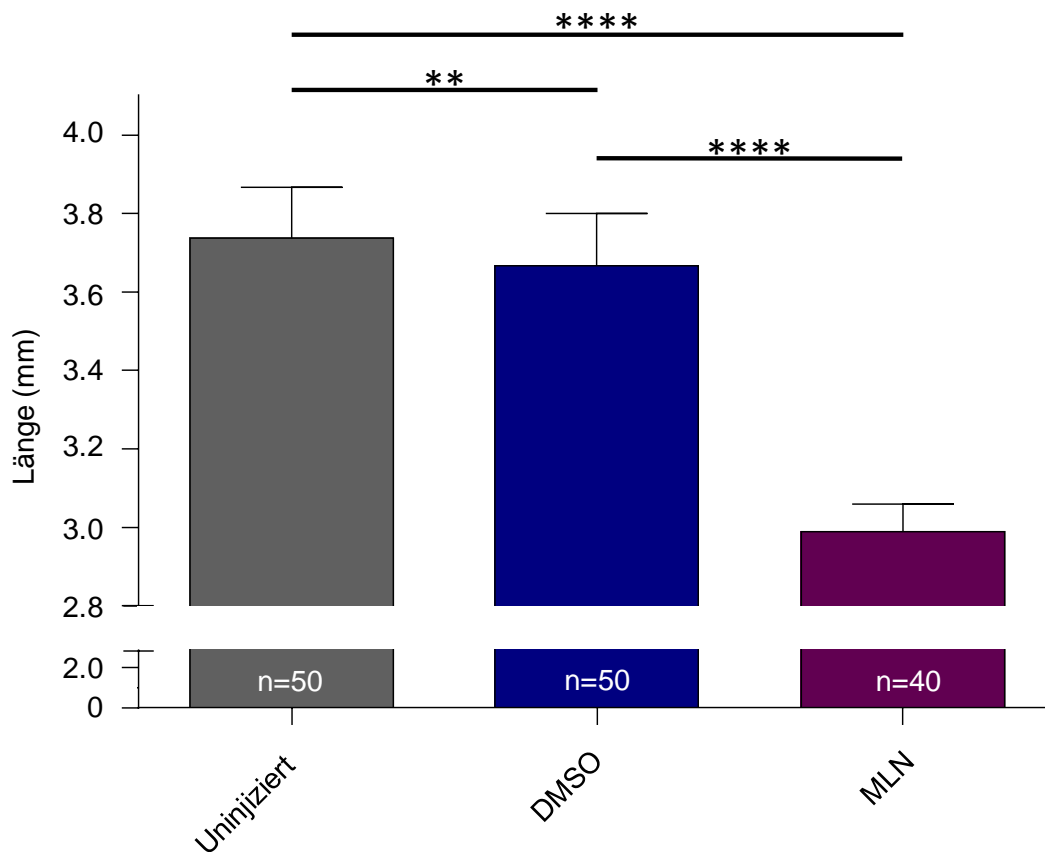
Auch die MO-Gruppen wurden über fünf Tage beobachtet, die Anzahl der verstorbenen Larven in den einzelnen Gruppen miteinander verglichen und in einer Kaplan-Meier-Kurve dargestellt (Vgl. Abb. 16). In den NEDD8-Morpholino-Gruppen starben mehr Larven als in der uninjizierten und in der Kontroll-Morpholino-Gruppe (Log-Rank Test jeweils  $p \leq 0,0002$ ), außerdem zeigte der Morpholino-Mix in der Anzahl der bis 5 dpf verstorbenen Larven einen stärkeren Effekt als die einzeln injizierten Morpholinos ( $p < 0,0001$ ). Darüber hinaus beeinträchtigte der NEDD8Like-Morpholino alleine das Überleben der Fische mehr als der NEDD8-Morpholino ( $p < 0,0001$ ). Der Kontroll-Morpholino wies im Vergleich zur nicht-injizierten Kontrolle ebenfalls erhöhte Zahlen an toten Larven auf ( $p < 0,0001$ ), die allerdings geringer waren als die Zahl der verstorbenen Larven mit einem NEDD8-Knockdown ( $p < 0,0001$ ).



**Abb. 16:** Kaplan-Meier-Kurve zur Anzahl an gestorbenen Larven bis 5 dpf in nicht-injizierter Kontrollgruppe, Kontroll-MO-, NEDD8-, NEDD8L- und MO-Mix-Gruppe. Bis 1 dpf zeigt sich ein höherer Anteil an toten Larven in Kontroll-MO- (13,33%), NEDD8- (17,95 %), NEDD8L- (24,83 %) und MO-Mix-Gruppe (33,09 %) im Vergleich zur nicht-injizierten Gruppe (7,97 %). Dieser Trend setzte sich bis 5 dpf fort. Insgesamt verstarben in der Mix-Gruppe (68,42 %) deutlich mehr Larven als in den anderen Gruppen (8,14 % (nicht-injiziert), 17,04 % (Kontroll-MO), 25,75 % (NEDD8), 38,99% (NEDD8L)).  $N=4$ ,  $n(\text{nicht-injiziert})=330$ ,  $n(\text{Kontroll-MO})=170$ ,  $n(\text{NEDD8-MO})=180$ ,  $n(\text{NEDD8L-MO})=180$ ,  $n(\text{MO-Mix})=175$ .



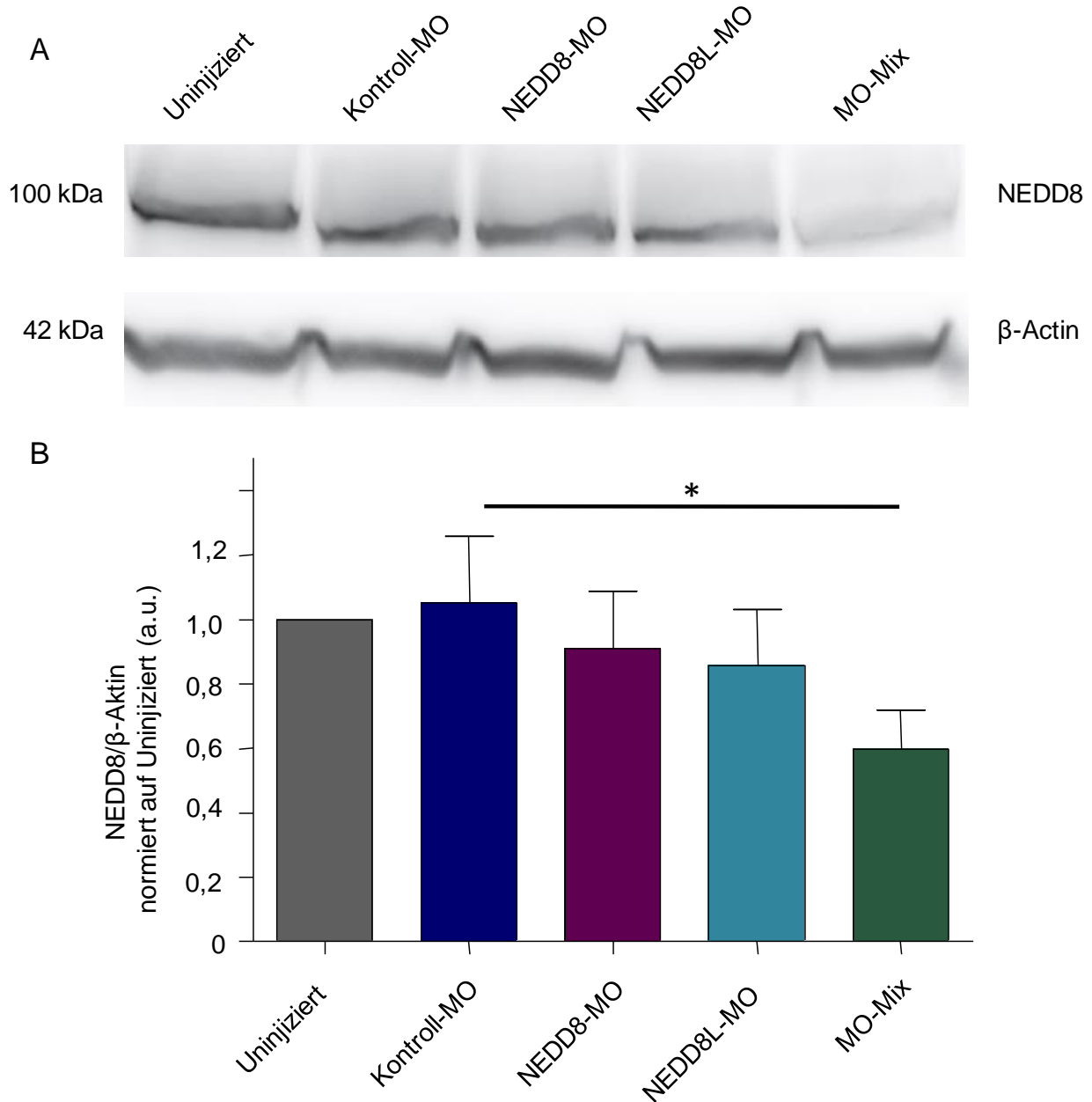
Die Längenmessung der Larven an 5 dpf ist in Abbildung 17 dargestellt. Hier ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll-Morpholino- und den NEDD8-Morpholino-Gruppen. Sowohl eine Blockade von NEDD8 als auch von NEDD8Like bewirkten ein Defizit des Längenwachstums, wobei der Effekt einer NEDD8Like-Blockade ausgeprägter zu sein schien. Wurden beide Morpholinos im Mix injiziert, so erzielte dies wiederum eine noch stärkere Beeinflussung des Wachstums. Dieser Effekt war jedoch nur zwischen NEDD8 und dem Mix aber nicht im Vergleich von NEDD8Like und dem Mix signifikant messbar. Eine Längendifferenz zwischen uninjizierten und Kontroll-Morpholino-injizierten Fischen ließ sich nicht in einem signifikanten Maß nachweisen.



**Abb. 17:** Auswertung der Längenvermessung von Morpholino-injizierten Larven an 5 dpf. Signifikanter Unterschied zwischen Kontroll-MO (bzw. nicht-injizierter Kontrolle, nicht eingezeichnet) und jeweils NEDD8-, NEDD8L-MO und MO-Mix. Es war kein signifikanter Unterschied zwischen nicht-injizierten Larven und Kontroll-MO-Gruppe erkennbar. Ebenso war der Unterschied zwischen NEDD8-, NEDD8L-MO und MO-Mix nicht signifikant. N=6

Um den Effekt der Neddylierungsblockade auf Protein-Ebene quantifizieren zu können wurden analog zu den MLN-Injektionen auch zu den Morpholinos Western Blots durch-

geführt. Die Blots wurden mit Proben von zwei Tage alten Larven angefertigt, die Detektion von NEDD8 erfolgte auch hier mit Hilfe des Anti-NEDD8-Antikörpers von Abcam.



**Abb. 18:** Anti-NEDD8 Western Blots von zwei Tage alten MO-injizierten Larven. (A) Beispiel für einen Anti-NEDD8-Blot von MO-injizierten Fischen, mit  $\beta$ -Aktin-Kontrolle. Eine Reduktion der Bande bei 100 kDa in der MO-Mix-Gruppe ist deutlich sichtbar, in den Gruppen der einzelnen Morpholinos ist eine Reduktion gegenüber dem Kontroll-Morpholino nicht erkennbar. (B) Die Quantifizierung der Bandenstärke bei 100 kDa zeigt eine signifikante Verringerung von NEDD8 um 43 % in der Mix-Gruppe im Vergleich zum Kontroll-Morpholino. Der ungepaarte t-Test ergab einen p-Wert von 0,0135 (\*), der Mann-Whitney-Test ein p von 0,0286 (\*). Signifikante Unterschiede zwischen den anderen Gruppen konnten nicht ermittelt werden. N=3, n=20

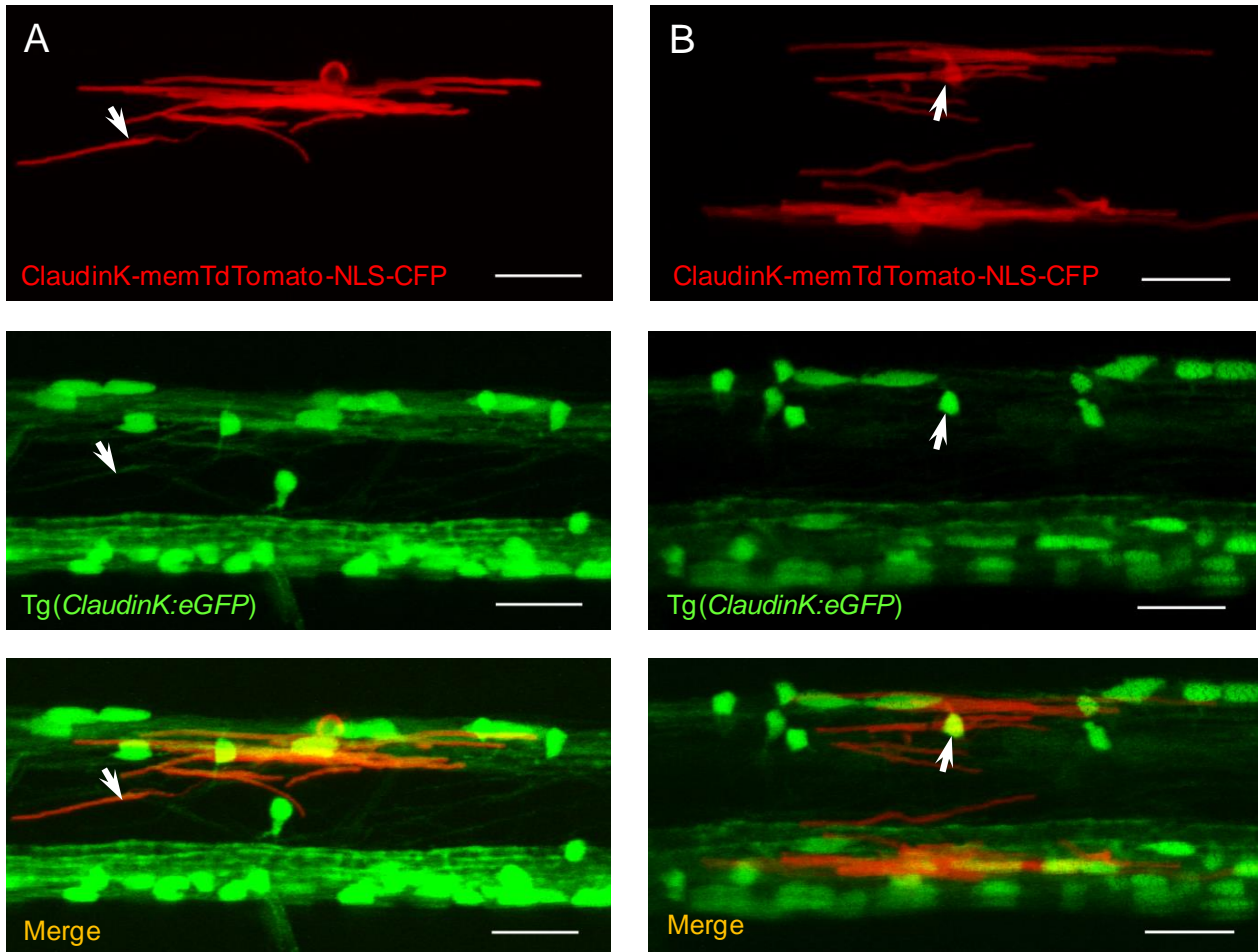
Abbildung 18 zeigt die Auswertung der kräftigsten Bande bei 100 kDa. Diese ergab nach Verrechnung mit der  $\beta$ -Aktin-Kontrolle eine Abschwächung von 14 % in der NEDD8-MO-Gruppe, von 17 % in der NEDD8L-MO-Gruppe und von 43 % in der MO-Mix-Gruppe im Vergleich zum Kontroll-Morpholino. Einzig die Blockade beider Kopien durch die Mix-Injektion wies eine signifikante Differenz auf, die alleinige Blockade von NEDD8 beziehungsweise NEDD8Like wies eine geringere Wirkung auf, was mit einem Ausgleich durch das jeweils andere, nicht blockierte, Gen vereinbar wäre. Wie bei den Western Blots mit MLN war auch im Rahmen dieser Versuchsreihe keine Quantifizierung des freien NEDD8 möglich, da die Bandenstärke dafür nicht stark genug ausgeprägt war.

### 3.4 Effekte des dominant-negativen Ubc12-Konstruktes auf einzelne Oligodendrozyten

Eine gezielte Untersuchung der Myelinisierung durch Oligodendrozyten mit Blick auf die Neddylierung erfolgte mittels zweier cDNA-Konstrukte. Davon enthielt das erste Ubc12 mit einer dominant-negativen Mutation, um die Neddylierung zu unterbinden. Als Kontrollplasmid wurde das gleiche Konstrukt ohne ein dominant-negativ mutiertes Ubc12 injiziert.

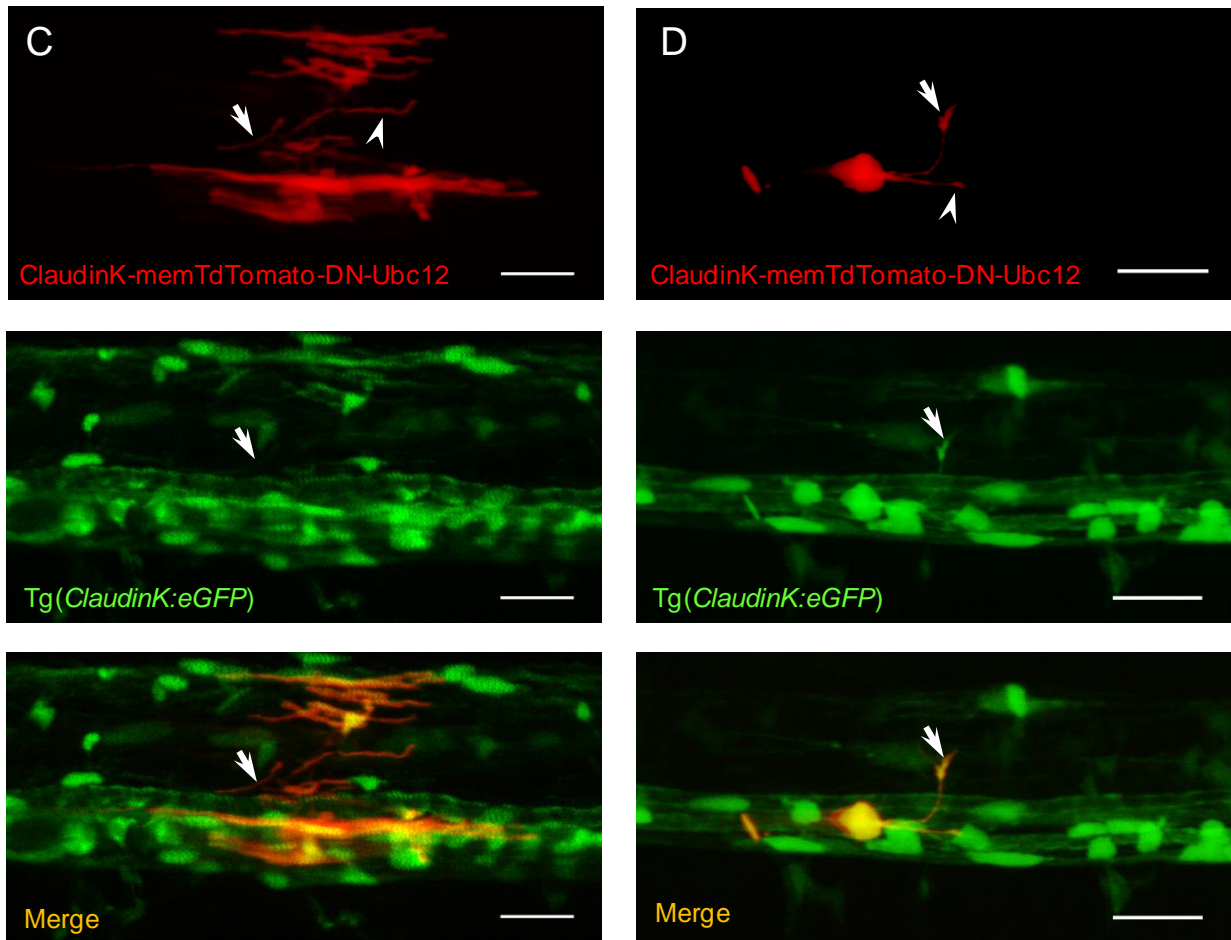
Die Injektion erfolgte bei 1 hpf, dabei wurde die DNA in einer Konzentration von 80 ng/ $\mu$ l in Eier im Einzellstadium eingespritzt. Das Injektionsvolumen betrug dabei ungefähr 10 % der gesamten Zellgröße. Ein erstes Screening erfolgte an 3 und 4 dpf, das Imaging tdTomato-positiver Larven wurde anschließend an 5 dpf unter einem Zwei-Photon-Mikroskop durchgeführt. Der zweite Kanal bildete dabei ClaudinK-eGFP ab, welches als Kontrollhintergrund diente, um überprüfen zu können, dass es sich bei den abgebildeten Zellen tatsächlich um Oligodendrozyten handelte.

Eine erste Gegenüberstellung der zwei Konstrukte ließ bereits eine Veränderung der Oligodendrozyten mit Mutation vermuten (vgl. Abb. 19). Diese wirkten in ihrer Struktur oftmals ungeordneter als die Oligodendrozyten der nichtmutierten Kontrolle. Im Allgemeinen war der lineare Verlauf innerhalb eines Rückenmarksanteils noch vorhanden, jedoch wichen einige Zellen völlig von der üblichen Form und dem üblichen Faserverlauf ab. Einzelne Internodien, die von dem vorderen in den hinteren Rückenmarksanteil



**Abb. 19:** Injektion des Plasmids ClaudinK-memTdTomato-DN-Ubc12 in Tg(ClaudinK-EGFP) an 1 hpf, Imaging an 5 dpf. Kranial befindet sich auf den Bildern links, dorsal oben. Der Merge-Channel zeigt, dass es sich tatsächlich um Oligodendrozyten handelt. Pfeile zeigen auf den gleichen Punkt in den verschiedenen Kanälen. (A) Typischer Oligodendrozyt der Kontrollgruppe an 5 dpf, mehrere Internodien sind erkennbar. Diese verlaufen waagrecht und gerade innerhalb des dorsalen Rückenmarksanteils. (B) Es sind mehrere Internodien sichtbar, die vom ventralen in den dorsalen Anteil des Rückenmarks ziehen. Dabei zeigten sie zumeist einen geraden Verlauf. (Maßstab 20  $\mu\text{m}$ )

(oder umgekehrt) wechselten, zeigten einen deutlich variableren Verlauf als die Internodien der Kontrollgruppe (vgl. Abb. 19C). Des Weiteren schien auch der Durchmesser der Internodien leicht zu variieren. Häufig befanden sich mehrere positive Zellen direkt nebeneinander, sodass eine genaue Zuordnung der Internodien zu einer Zelle nicht unbestreitbar möglich war. Da mikroskopisch zudem nicht jeder Zellkern sicher zu identifizieren war, konnte keine genaue Angabe zur Anzahl der Zellen gemacht werden. Durch eine zu geringere Auflösung der Bilder konnte eine Dickenmessung der einzelnen Internodien nicht durchgeführt werden.



**Abb. 19 (Fortsetzung):** (C) Oligodendrozyten, in denen Ubc12 DN-negativ blockiert wurde. Die Internodien sind unregelmäßiger geformt, an einigen Stellen sind Einkerbungen erkennbar (Pfeilspitze). Die zwischen den beiden Rückenmarksanteilen verlaufenden Internodien wirken gewellter als in der Kontrolle (Pfeil, Pfeilspitze). (D) Oligodendrozyten mit DN-negativem Ubc12 bilden teilweise kaum oder gar keine Internodien aus; es zeigen sich verdickte Enden der Ausläufer (Pfeil, Pfeilspitze). (Maßstab 20  $\mu\text{m}$ )

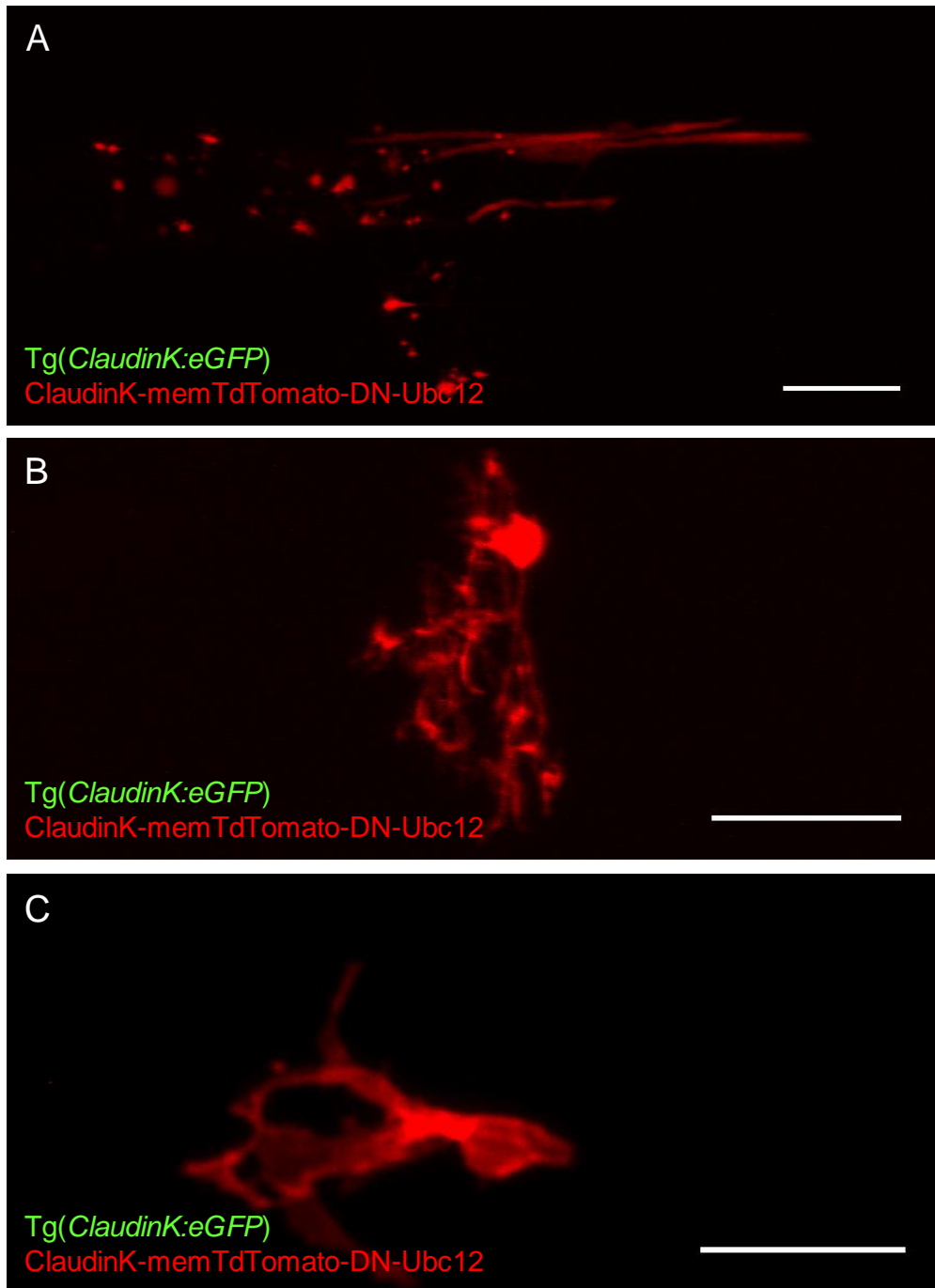
Teilweise bildeten die Oligodendrozyten mit Ubc12-Mutation nur wenige, sehr kurze Internodien. Manche Ausläufer aus dem Zellkörper schienen überhaupt kein Axon zu erreichen, sondern bildeten lediglich filamentöse Fortsätze mit verdickten Enden aus (Abb. 19D, Pfeil).

Schon während des Imaging fielen mehrmals Zellen auf, die in ihrer Form von einem normal entwickelten Oligodendrozyten stark abwichen. Eine Vermessung war aufgrund der Abweichung von der regelrechten Morphologie nicht möglich. Die Zellen mit starken strukturellen Abweichungen wurden ausschließlich in der Gruppe mit dominant-negativer Mutation des Ubc12 beobachtet, in der kontrollinjizierten Gruppe waren diese

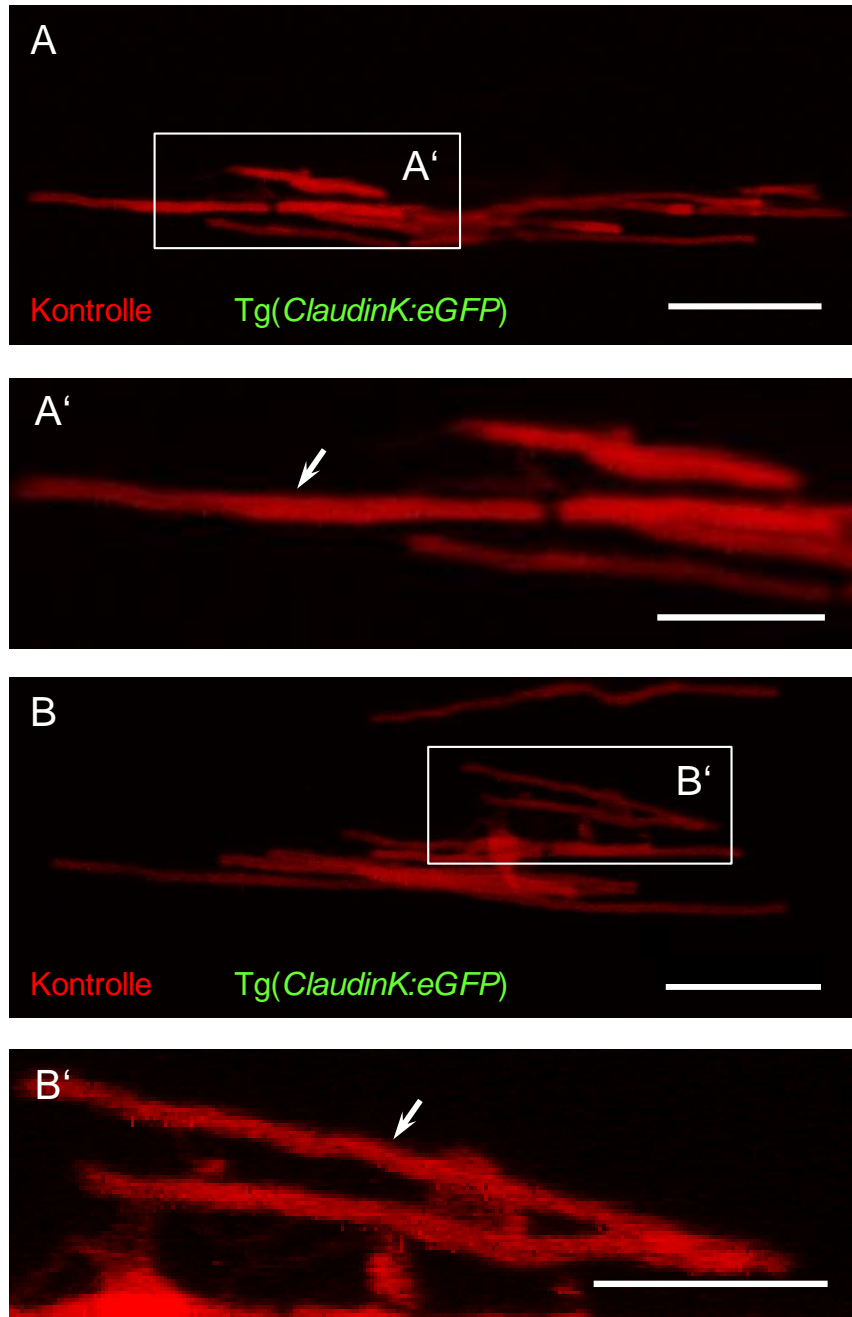
Veränderungen nicht sichtbar. In Abbildung 20 sind beispielhaft drei dieser Zellen dargestellt. Eine Zelle wies neben normalen Internodien in ihrer nahen Umgebung auch mehrere Punkte auf, die die dominant-negative Mutation exprimierten (Abb. 20A). Dies könnte beispielsweise mit einer in diesem Moment ablaufenden Apoptose der Zelle vereinbar sein. Abbildung 20B zeigt eine Zelle, deren Fasern in einem 90°-Winkel zum Verlauf des Rückenmarks ausgerichtet waren. Einzelne Internodien waren bei dieser Zelle nicht auszumachen, stattdessen war an der Zelle eine Vielzahl von feinen Ausläufern erkennbar, die kleine Verdickungen entlang oder am Ende einzelner Ausläufer aufwiesen. Die Myelinisierung von Axonen durch eine solche Zelle konnte nicht überprüft werden. In Abbildung 20C ist eine weitere Zelle dargestellt, welche neben ihrem Zellkörper lediglich einseitig einen kräftigen Fortsatz aufwies, der sich wiederum in drei unförmige Ausläufer teilte. Die typische Form eines myelinisierenden Internodiums war auch bei dieser Zelle nicht erkennbar.

Bei genauerer Betrachtung der Bilddaten fielen weitere Unterschiede zwischen der Ubc12-Mutation und der Kontrolle auf (vgl. Abb. 21). In der Ubc12-Gruppe hatten einige Internodien im Verlauf oder an einem Ende teilweise kleine knötchenartige Verdickungen. In vergrößerten Ausschnitten ließen sich einzeln liegende Internodien der beiden Gruppen gut vergleichen. Internodien der Kontrollgruppe verliefen häufig völlig linear, flache Windungen waren jedoch auch hier bei den meisten Zellen vorhanden. Kaliberschwankungen konnten, soweit beurteilbar, nicht festgestellt werden.

Trotz ihren Veränderungen verliefen die Internodien auch in der Ubc12-Mutationsgruppe meist eng beieinander liegend innerhalb ihres Rückenmarksanteils. Einzelne Internodien dagegen lagen schräg zur Horizontalen, teilweise in gebogener Form und mit den oben beschriebenen knotenartigen Veränderungen. Andere Internodien wiesen breitere Verdickungen auf, ein Übereinanderliegen mehrerer Internodien konnte allerdings ausgeschlossen werden.

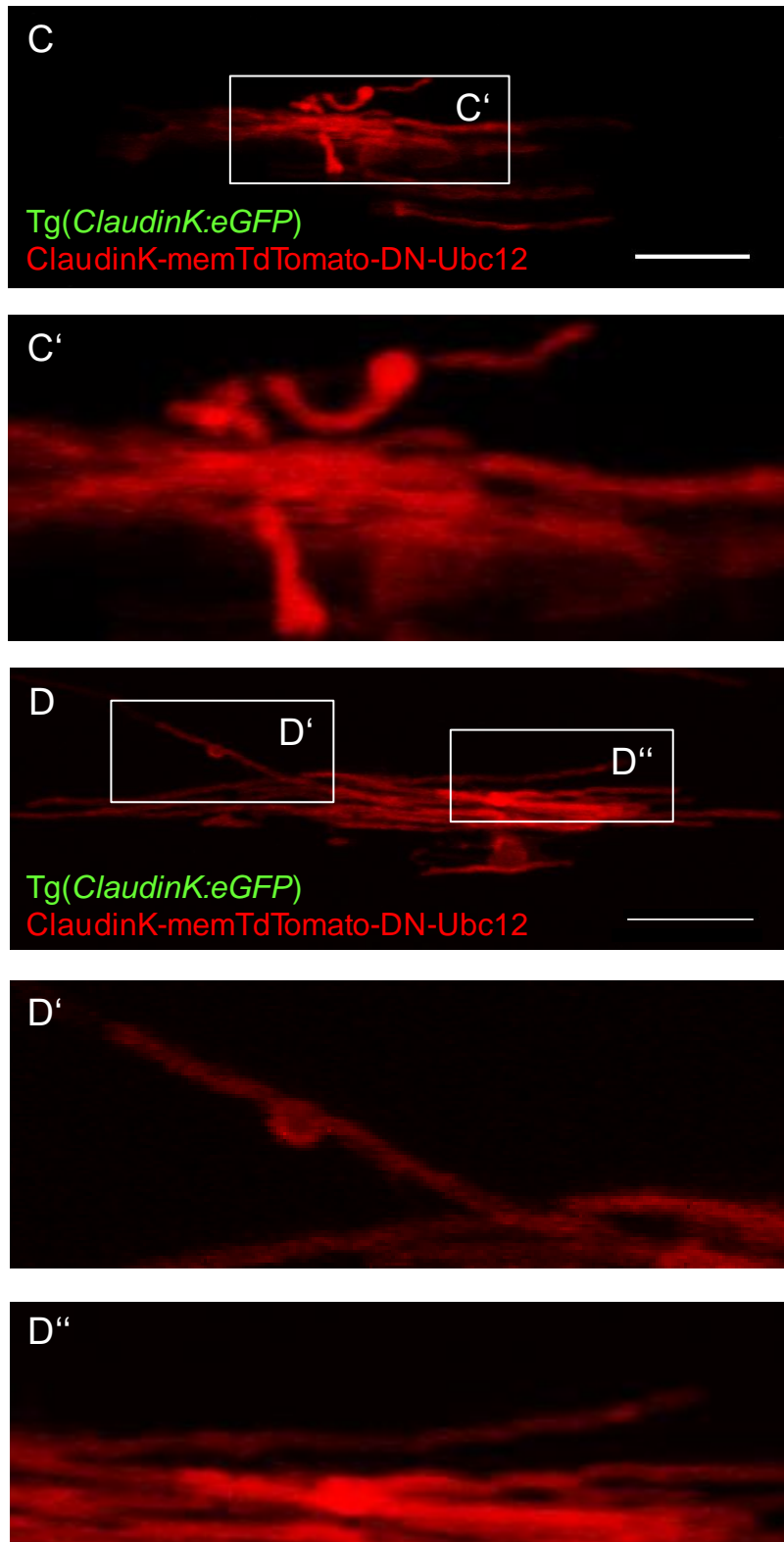


**Abb. 20:** Injektionen in Tg(*ClaudinK:eGFP*)-Zellen mit dominant-negativer Ubc12-Mutation an 5 dpf. Einige Zellen zeigten eine für Oligodendrozyten völlig untypische Form und Struktur. Oben: möglicherweise eine beginnende Apoptose. Mitte: Ausbildung vieler sehr schmaler Internodien in atypischer Ausrichtung. Unten: Ausbildung großer unförmiger Fortsätze. Der eGFP-Kanal wird nicht gezeigt. Maßstab: 20  $\mu$ m



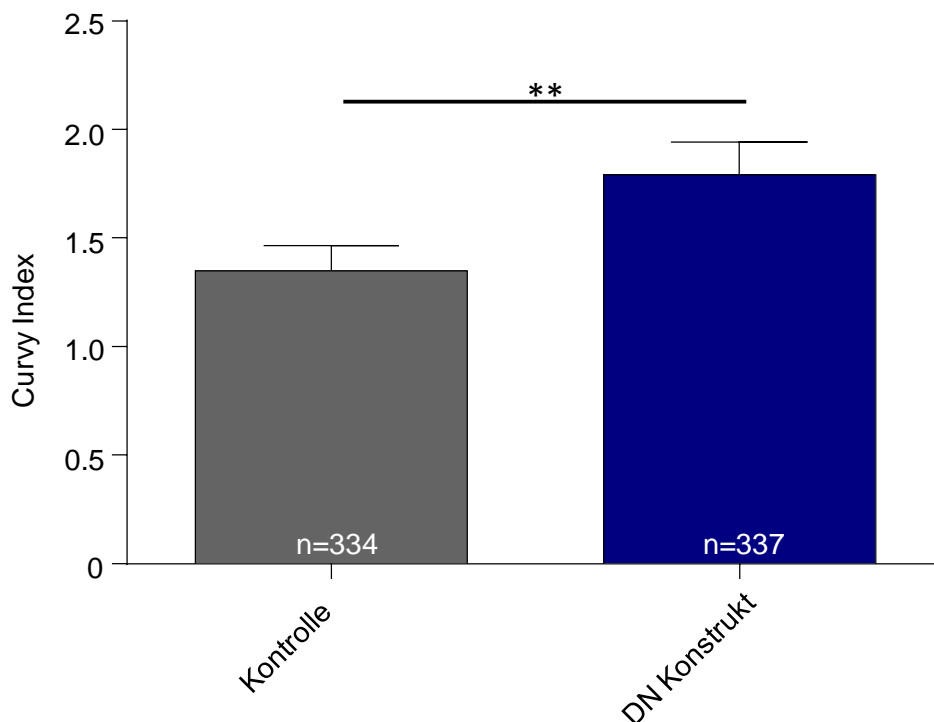
**Abb. 21:** Injektion in Eier der Linie Tg(*ClaudinK-eGFP*) an 1 hpf, Imaging an 5 dpf. Vergleich von Oligodendrozyten der Kontrollgruppe (A, B) mit denen aus Mutationsgruppe (C, D). Internodien der Kontrollgruppe verliefen überwiegend waagrecht innerhalb einer der beiden RM-Anteile und zeigten kaum sichtbare Unterschiede im Durchmesser (Pfeile). Der eGFP-Kanal wird nicht gezeigt. (Maßstab 20 µm, in vergrößerten Ausschnitten Maßstab 10 µm)





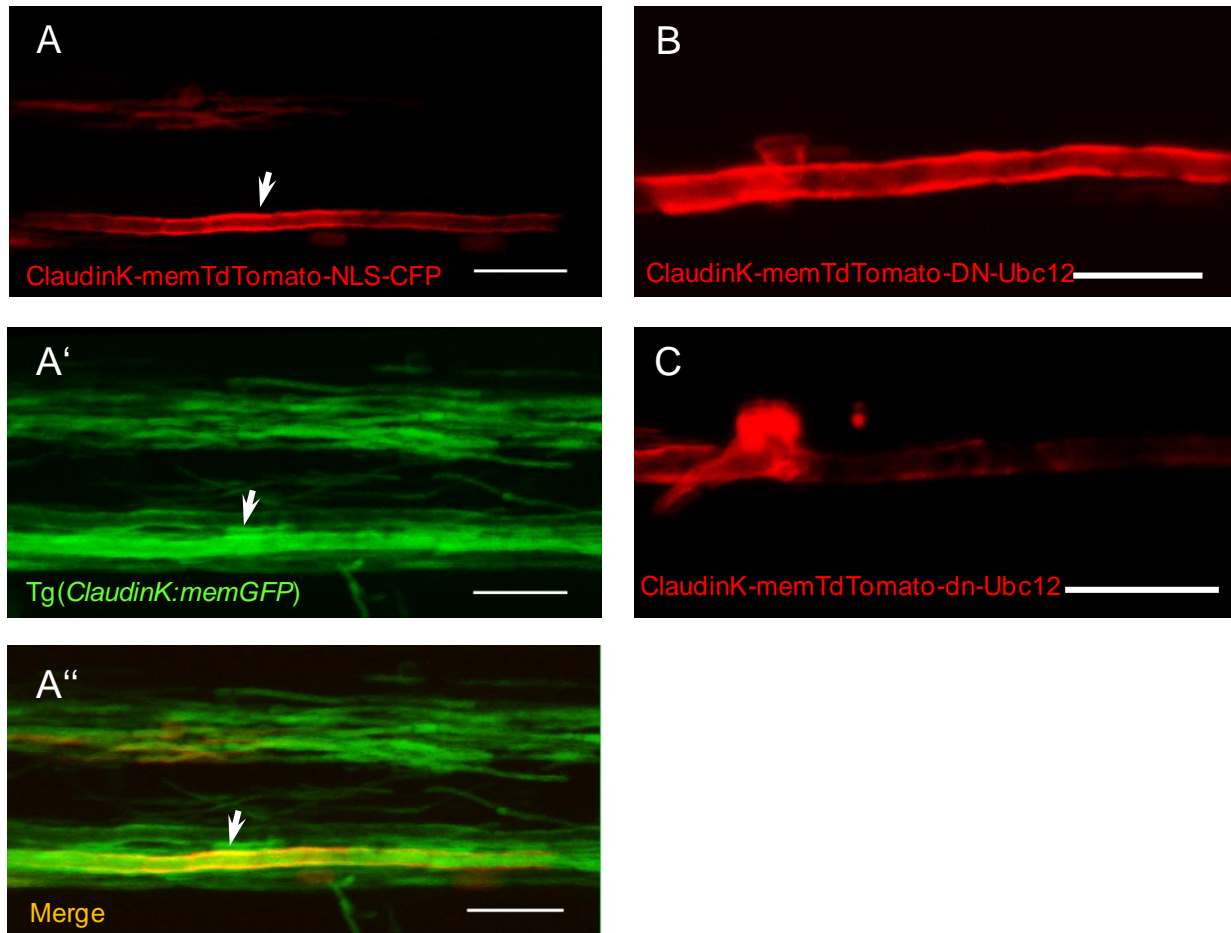
**Abb. 21 (Fortsetzung):** Internodien der DN-negativen Zellen besaßen nicht immer einen konstanten Durchmesser, teilweise zeigten sie einen gewundenen Verlauf (Pfeile). Des Weiteren sind an einigen Internodien kleine Knötchen erkennbar (Pfeilspitzen). Der eGFP-Kanal wird nicht gezeigt. (Maßstab 20 µm, in vergrößerten Ausschnitten Maßstab 10 µm)

Bei der genauen Vermessung einzelner Internodien aus beiden Gruppen zeigte sich eine im Vergleich zur Kontrolle stärkere Windung der Internodien mit Mutationsexpression. Die Kontrollinternodien verliefen nahezu linear und gleichmäßig, wohingegen Internodien mit dominant-negativem Konstrukt vermehrt Wellen, Knicke oder Verdickungen in ihrem Verlauf aufwiesen. Der gebildete ‚Curvy Index‘, die Differenz aus der exakten Messung und der End-zu-End-Messung eines Internodiums, ist daher in der Gruppe mit dominant-negativem Konstrukt höher als in der Kontrollgruppe (vgl. Abb. 22).



**Abb. 22:** Auswertung der Daten aus der Vermessung von Internodien (Kontrolle und DN Konstrukt). Es konnte ein signifikanter Unterschied ( $p=0,0014$ ) in der Höhe des ‚Curvy Index‘ nachgewiesen werden. Dies zeigt an, dass die Internodien der Kontrollgruppe deutlich linearer verlaufen als die der Gruppe mit DN Mutation.  $N=7$  (Anzahl Larven Kontrolle=13, DN-Konstrukt=14)

Das Imaging von Oligodendrozyten, die großkalibrige Axone myelinisieren, erwies sich als kompliziert, da meist mehrere Oligodendrozyten positiv waren sowie eine Zuordnung von einzelnen Internodien zu einem großkalibrigen Axon durch die Überlagerung von anderen Internodien und Axonen erschwert wurde. So konnte letztlich nur in der Kontrollgruppe mit ClaudinK:memGFP als Hintergrund die Myelinisierung eines dicken Axons dargestellt werden. In der Mutationsgruppe konnten lediglich Oligodendrozyten ohne ClaudinK:memGFP gewonnen werden.

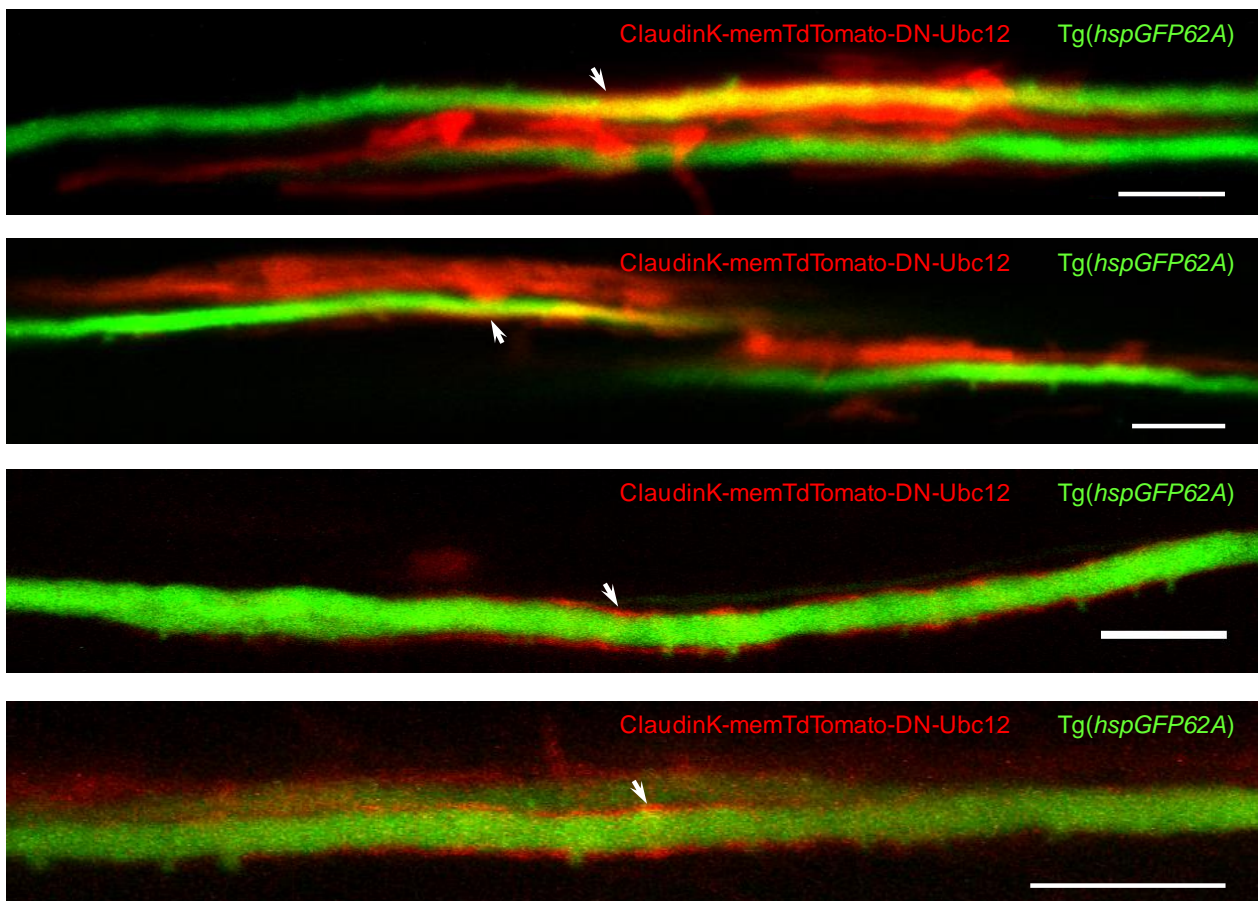


**Abb. 23:** Myelinisierung großkalibriger Axone. (A) In der Kontrollgruppe konnten Oligodendrozyten gezeigt werden, die Axone mit großem Durchmesser myelinisieren (Pfeile). Die Myelinscheide um das Axon ist gut erkennbar. Es wurde Tg(ClaudinK:memGFP) als Hintergrundlinie verwendet. Oben: ClaudinK-memtdTomato, mittig: ClaudinK:memGFP, unten: Merge. Bei der Myelinisierung großer Axone sind keine offensichtlichen Unterschiede zwischen Kontrollgruppe (B) und dominant-negativem Konstrukt (C) erkennbar. ClaudinK:memGFP wurde nicht exprimiert. (Maßstab 20 µm)

In der Kontrollgruppe wurden keine besonderen Auffälligkeiten beobachtet. Einzelne Oligodendrozyten myelinisierten nur einen Abschnitt eines Axons mit großem Durchmesser (vgl. Abb. 23). Weitere Internodien wurden hierbei nicht gebildet. Um die Myelinisierung der dickeren Axone besser einschätzen zu können, wurde das dominant-negative Ubc12-Konstrukt in eine Mauthner-Axon-Linie injiziert. Hier wurden nun einige Oligodendrozyten sichtbar, die anscheinend Axone mit einem größeren Durchmesser myelinisierten. Eine Störung der Myelinisierung fiel im Rahmen dieser Untersuchungen nicht ins Auge, sodass auf weitere Analysen verzichtet wurde.

Die in Abb. 24 in grün gezeigten Axone wiesen in Abschnitten sichtbare Myelinisierung durch Oligodendrozyten auf. Sie zeigte sich als schmaler roter Saum am Rand der Axone. Dabei lässt sich nicht zweifelsfrei sagen, ob es sich in den Bildern lediglich um eine Überlagerung mehrerer Oligodendrozyten handelt. Trotz einer anscheinend korrekt abgelaufenen Myelinisierung könnte es sich auf Grund des unruhigen Bilds in diesem Fall eventuell auch um den Phänotyp des dominant-negativen Konstrukts handeln.

Es lässt sich nicht sagen, ob es sich bei den Oligodendrozyten um mehrere handelt, die sich in den Bildern übereinander projizierten, oder ob hier tatsächlich wieder der Phänotyp des dominant-negativen Konstruktes vorlag, obwohl die Myelinisierung selbst korrekt abgelaufen zu sein schien.



**Abb. 24:** Injektion des pB-ClaudinK-memTdTomato-DN-Ubc12 in Tg(*hspGFP62A*) (grün) an 1 hpf, Imaging an 5 dpf. Zellen mit dominant-negativer Mutation myelinisieren Mauthner-Axone. Es zeigt sich eine Ummantelung der in grün dargestellten Axone (Pfeile). Ob die Unregelmäßigkeiten in den Internodien von der Mutation herrühren oder durch Überlagerung mehrerer Oligodendrozyten verursacht wurden, lässt sich nicht sagen. (Maßstab 20 µm)

## 4. Diskussion

Die Entwicklung der Myelinisierung in Vertebraten ist in der Evolution ein relevanter Schritt hin zu einer Beschleunigung der Nervenleitgeschwindigkeit sowie der metabolischen Unterstützung von Axonen (Czopka, 2016; Sherman und Brophy, 2005). Noch immer sind die exakten zellulären Vorgänge während der initialen Entwicklung und bei Remyelinisierung zu großen Teilen unbekannt. Welche Rolle die Neddylierung bei der Myelinisierung im ZNS spielt, wurde bis dato nicht untersucht. Nach wie vor sind weitere Untersuchungen nötig, um das grundlegende Verständnis für demyelinisierende neurodegenerative Erkrankungen, wie die Multiple Sklerose, die Amyotrophe Lateralsklerose oder Leukodystrophien, zu schärfen (Almeida und Lyons, 2018; Compston und Coles, 2008; Philips und Rothstein, 2014; Pouwels et al., 2014). Ziel dieser Arbeit war es daher, mittels verschiedener Ansätze die Funktion der Neddylierung im Zebrafisch zu untersuchen. So war durch die Blockade der Neddylierung im gesamten Fisch ein ausgeprägter Phänotyp mit unter anderem einem gestörten Längenwachstum, Verkrümmung der Körperachse und Ödemen von Herzbeutel und Dottersack zu beobachten. Im Western Blot war eine Reduktion von neddylierten Proteinen nachweisbar. Oligodendrozyten zeigten bei gestörter Neddylierung eine unregelmäßige, nicht-lineare Myelinisierung, was in einer Verlängerung der Internodien im Vergleich zur Kontrollgruppe resultierte.

### 4.1 Diskussion von Material und Methoden

Der Zebrafisch wurde in den vergangenen zwanzig Jahren bereits als ein wichtiger Modellorganismus bei der Erforschung von Oligodendrozyten und Myelinisierung etabliert (Czopka, 2016; Franklin und ffrench-Constant, 2008). Durch die Entwicklung fluoreszierender Reporterlinien ist die Visualisierung einzelner Oligodendrozyten im lebenden Organismus inzwischen mit dem *In vivo* live Imaging mittels Konfokal- oder Zwei-Photon-Mikroskopie gut möglich (Weber und Köster, 2013). Mithilfe von DNA-Injektionen können Mutationen inseriert und dadurch Mosaikexpressionen oder transgene Linien generiert werden (Almeida et al., 2011; Münzel et al., 2012; Ng et al., 2005; Shin et al.,

2003). Auch die weiteren in dieser Arbeit angewandten Methoden sind bereits im Zebrafisch etabliert.

In Verbindung mit NEDD8 sind bisher keine Studien zur Myelinisierung – weder im Zebrafisch, noch in anderen Organismen – durchgeführt worden. Der eindeutige Nachweis aller für die Neddylierung relevanten Gene im Zebrafisch in der RT-PCR bildete die Grundlage für weitere Untersuchungen. Durch die oben aufgeführten Punkte erschien uns der Zebrafisch sowohl zur erstmaligen Verwendung als auch zur darauffolgenden Etablierung als Modellorganismus zur Untersuchung der Neddylierung geeignet.

Die Wirkung von MLN4924 im Zebrafisch sollte zu Beginn mittels Inkubation der Larven zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten getestet werden (Soucy et al., 2009). Jedoch zeigte sich zwischen einem und fünf dpf kein morphologischer Effekt an den Fischen, auch die Sterberaten der MLN4924-Gruppe wichen nicht relevant von den Kontrollen ab. Zudem war auch in ersten Western Blots keine Veränderung der Neddylierung nachweisbar. Daher erfolgte die MLN4924-Injektion nun kurz nach der Befruchtung in den Dottersack des Eis. Hieraus ergaben sich nun die im Ergebnisteil beschriebenen Fehlbildungen, sodass die weiteren Versuche nach dem beschriebenen Schema der früheren Injektion fortgeführt wurden. Allerdings gibt es mindestens zwei mögliche Gründe für fehlende Effekte der Inkubation: Bei den ersten Western Blots wurde noch ein Anti-NEDD8-Antikörper der Firma Enzo Life Sciences (s.u.) verwendet. Um fehlende Ergebnisse durch diesen anscheinend ungeeigneten Antikörper auszuschließen, wäre eine Wiederholung der Tests mit dem Antikörper von Abcam sinnvoll. Weiterhin konnten Yu et al. zeigen, dass die Inkubation von Zebrafischlarven ab 3 dpf mit einer Zielkonzentration von 1  $\mu$ M negative Folgen für die Immunantwort auf eine Infektion mit dem SVC-Virus hatten (Yu et al., 2019).

Dies könnte darauf hindeuten, dass eine unvollständige Blockade der Neddylierung in einer ansonsten gesunden Larve keine morphologischen Fehlbildungen nach sich zieht. Die Immunantwort schien allerdings bei den getesteten Fischen beeinflusst worden zu sein, was auch weitere mögliche Veränderung impliziert. Folglich stellt sich die Frage, ob auf Zellebene auch die Oligodendrogenese und Myelinisierung gestört sind und ein Nachweis von etwaigen Veränderungen mittels Verwendung fluoreszierender Reporterlinien oder In-situ-Hybridisierung erbracht werden könnte.

In vorbeschriebenen Experimenten konnte mittels Immunoblots von hippocampalen Neuronen der Maus gegen NEDD8 eine klare Auftrennung der Banden beobachtet werden (Vogl et al., 2015), im Gegensatz dazu war in unseren Western Blots eine genaue Differenzierung der Banden nur erschwert möglich. Die Detektion mittels eines Anti-NEDD8-Antikörpers von Enzo Life Sciences ergab nur verwaschene Banden, sodass weder die neddylierten Cullins, noch andere Proteine klar identifiziert werden konnten (Pan et al., 2004; Vogl et al., 2015). Ein Grund hierfür könnte eine möglicherweise fehlende Bindung des Antikörpers an NEDD8 sein, auch wenn die Bindungsstelle des Antikörpers an das prozessierte NEDD8 in Mensch, Maus und Zebrafisch identisch ist (Uniprot Alignment). Weitere Informationen über die spezifische Verwendung dieses Antikörpers im Zebrafisch lagen zu diesem Zeitpunkt allerdings nicht vor. Es erfolgte daher ein Wechsel zur Detektion mittels Anti-NEDD8-Antikörper von Abcam, wobei der Hersteller selbst zwar keine Angabe zur Verwendung im Zebrafisch machte, jedoch einen ersten Bericht zur erfolgreichen Verwendung im Zebrafisch bereitstellte (Kundenbericht vom 6. April 2016, [www.abcam.com/nedd8-antibody-y297](http://www.abcam.com/nedd8-antibody-y297)).

Die für die Neddylierung typische Auftrennung in multiple Banden war nun auch in unseren Western Blots detektierbar, Anpassungen in der Probenherstellung mit Ersatz des RIPA-Puffers durch eine Mischung aus Laufpuffer und SDS führten zudem zu einem saubereren Bandenmuster (siehe Methoden; Abb. 25). Die Quantifizierung der Western Blots wurde dann anhand der stärksten Bande bei 100 kDa vorgenommen, welche der Laufhöhe der neddylierten Cullins in Maus und HEK-Zellen entspricht und das Bandenmuster beim Zebrafisch dem in den genannten anderen Organismen stark ähnelt (Vogl



**Abb. 25:** Darstellung jeweils eines Western Blots gegen NEDD8 vor und nach Anpassung des Protokolls zur Probenauftrennung. Initial war eine Quantifizierung der stärksten Bande bei ca. 100 kDa nicht möglich, da die Proteinauftrennung sehr unscharf erfolgte. Eine Modifikation des ursprünglich in der Arbeitsgruppe verwendeten Protokolls mit einer Erhöhung des SDS-Anteils erbrachte die gewünschte Wirkung.

et al., 2015; unpublizierte Daten von Ulf Einsfelder). Ein Deyolking (Entfernung des Dottersacks) vor der Probenherstellung wurde letztendlich nicht durchgeführt, da der Proteingehalt der Proben dadurch zu stark verringert wurde (Link et al., 2006; Rahlouni et al., 2015). Es sollte daher bedacht werden, dass in dieser Arbeit ganze Fischlarven im Western Blot verwendet wurden und folglich auch Teile des detektierten NEDD8 aus dem Dottersack stammen könnten.

Die Endkonzentration von MLN4924 und DMSO als Kontrolle lagen bei den hier vorgestellten Versuchen deutlich höher als in anderen Arbeiten (ca. 16  $\mu$ M versus 1  $\mu$ M; van der Ent et al., 2014; Yu et al., 2019). Eine toxische Wirkung des DMSO kann trotzdem weitestgehend ausgeschlossen werden, da die DMSO-Kontroll-Injektion lediglich zu leichten unspezifischen Reaktionen führte und die Dosierung von DMSO u.a. laut Hallare et al. als unbedenklich angesehen werden kann (Hallare et al., 2006; Maes et al., 2012). Dies war auch in hier vorgestellten Versuchen erkennbar, da sich in der Kaplan-Meier-Überlebenskurve der DMSO-Kontrollgruppe (vgl. Abb. 12) nur eine geringfügig höhere Sterberate als in der Kontrollgruppe ohne Injektion zeigte. Dass der beobachtete Phänotyp nur zufällig durch eine unspezifische Bindung des MLN4924 ausgelöst wurde, ist ebenfalls eher unwahrscheinlich, da die MO-Injektionen vergleichbare Effekte in den Zebrafischen hervorriefen.

Nach einem Knockdown von NEDD8 und NEDD8like durch MO-Injektionen waren ähnliche Phänotypen wie nach der Injektion von MLN4924 zu beobachten, wobei der Effekt des NEDD8like-MO bei gleicher Konzentration etwas ausgeprägter erschien als der des NEDD8-MO. Die Injektion eines Mixes aus beiden MO führte zu deutlich ausgeprägteren Störungen der Embryogenese, sodass davon ausgegangen werden kann, dass beide Proteine im Fisch zur Neddylierung beitragen. Da außerdem die Injektion von MLN4924 ähnliche Effekte hervorrief, spricht dies für die spezifische Bindung der beiden MOs. Der Kontroll-MO als Injektionskontrolle verursachte nur geringe unspezifische Störungen, weswegen die beobachteten Effekte großteils nicht auf eine unspezifische Wirkung durch das Injektionstrauma oder das Vorhandensein von Oligonukleotiden zurückgeführt werden können.

Eine Quantifizierung des freien NEDD8 war in den angefertigten Western Blots nicht durchführbar, da sich das freie NEDD8 noch in der Lauffront befand. Die Verwendung von höher/niedriger konzentrierten Gelen könnte hier Abhilfe schaffen. Eine



Unterscheidung zwischen NEDD8 und NEDD8like wird im Western Blot aufgrund der nahezu vollständigen Identität nicht machbar sein. NEDD8like sollte ebenfalls durch den Anti-NEDD8-Antikörper detektiert werden, da die Bindungsregion bei beiden Proteinen identisch ist (Uniprot-Alignment).

Insgesamt legen die durchgeführten Injektionen und Western Blots eine lebenswichtige Rolle der Neddylierung im Zebrafisch nahe (Vgl. Abb. 14 und 18). Um den beobachteten Phänotyp in MO- und damit auch in den MLN4924-injizierten Fischlarven zweifelsfrei auf die Substanzen zurückführen zu können, sollte in Zukunft ein Rescue mit NEDD8- bzw. NEDD8Like-RNA durchgeführt werden (Bill et al., 2009; Schulte-Merker und Stainier, 2014). Im Rahmen dieser Arbeit konnte der beschriebene Rescue nicht durchgeführt werden, da die zusätzlich erforderlichen Injektionen die Injektions-Kapazitäten des Labors überstiegen hätten. Ein erster Ansatz zur Verbesserung der Effizienz durch Einsparung von Kapazitäten könnte hier die Injektion lediglich des Mixes einzeln und in Kombination mit RNA sein.

Das Western Blotting nach MLN4924- und MO-Injektionen zur Bestimmung des F/G-Aktin-Ratio erbrachte eher unbeständige Ergebnisse. Die Quantifizierung zeigte keine verwertbaren Tendenzen, da die Bandenstärke zwischen den Blots zu hohen Schwankungen unterworfen war. Ein möglicher Erklärungsansatz könnte in Problemen bei der Probenvorbereitung liegen. Da in den Proben aus den Zebrafischlarven mit phänotypischer Ausprägung bereits eine geringere Konzentration des Gesamtproteins vorhanden war, könnten sich bereits minimale Ungenauigkeiten während der Auftrennung in F- und G-Aktin entscheidend auf das Verhältnis ausgewirkt haben. Eine Wiederholung des Versuches zum Ausschluss von zufälligen Schwankungen wäre gegebenenfalls sinnvoll. Zum Nachweis von Störungen der neuronalen Leitfähigkeit wäre prinzipiell auch eine zusätzliche Durchführung von Verhaltensexperimenten nach dem Protokoll von Bhuvanewari Nagarajan mit den MLN- und MO-injizierten Larven an 5 dpf wünschenswert gewesen (Nagarajan et al., 2020). Allerdings blieb durch den ausgeprägten Phänotyp der injizierten Larven eine genaue Differenzierung zwischen muskulären und neuronalen Defekten unmöglich. Verhaltensexperimente könnten auch nach erneuter Inkubation von Larven in MLN4924 angewendet werden, da diese Larven an 5 dpf kaum morphologische Veränderungen aufwiesen (vgl. Abschnitt 3.2).

Die dominant-negative Ubc12-Mutation wurde unter dem ClaudinK-Promotor exprimiert, da erst adulte Oligodendrozyten feste Kontakte zu Axonen erweitern (Czopka, 2016; Nave und Werner, 2014). ClaudinK ist einer der zum Zeitpunkt des Wrappings exprimierten Oligodendrozyten-Marker, somit war bei dessen Verwendung davon auszugehen, dass mögliche Veränderungen visualisierbar wären. Die Verwendung anderer Promotoren wie beispielsweise Olig2 könnten Aufschluss geben über Funktionen der Neddylierung schon vor Beginn des Wrappings. Der in den Plasmiden verwendete P2A-Linker führt zu einer geringen Expressionsrate mit nur wenigen positiven Zellen pro Fisch (Kim et al., 2011). Eine Optimierung der Methode wäre daher nötig, um einzelne Versuche effektiver zu gestalten.

Die Injektion eines Plasmids, welches ein LifeAct:TdTomato unter dem ClaudinK-Promotor erhielt, führte bedauerlicherweise zu keiner sichtbaren Expression an 5 dpf. Da LifeAct ein 17 Aminosäuren langes Peptid ist, welches spezifisch an F-Aktin bindet, hätte seine Verwendung in dieser Arbeit Aufschluss über Veränderungen der Myelinisierung in Oligodendrozyten mit dominant-negativer Ubc12-Mutation geben können (Riedl et al., 2008). Die Kontrolle des Plasmids ergab keinen wegweisenden Befund, es bleibt lediglich zu vermuten, dass entweder die Bindungsaffinität von LifeAct zu gering oder die Stabilität der Bindung an 3-5 dpf nicht mehr gegeben war (Herstellerinformation, [www.ibidi.com/lifeact-actin-visualization](http://www.ibidi.com/lifeact-actin-visualization)). Da Nawaz et al. bereits LifeAct:RFP unter einem Sox10-Promotor in Oligodendrozyten im lebenden Zebrafisch erfolgreich angewendet haben, sollte bei einem erneuten Versuch der Fokus auf der Anpassung des in dieser Arbeit verwendeten Plasmids liegen (Nawaz et al., 2015).

Der vollständige Knock-Out von NEDD8 in der Maus führt zu einem letalen Phänotyp, der Versuch der Etablierung einer Knockout-Linie im Zebrafisch wurde daher nicht unternommen (Tateishi et al., 2001). Im Gegensatz dazu konnten Yu et al. eine Knockout-Linie im Zebrafisch generieren (Yu et al., 2019). Die Vitalität dieser Linie könnte begründet sein durch das Vorhandensein von NEDD8Like. Ein gezielter Knockout auch von NEDD8Like könnte darüber Klarheit bringen.

## 4.2 Diskussion der Ergebnisse

Die Gene für NEDD8 und Ubc12 konnten in der RT-PCR nachgewiesen werden, Ubc12 war außerdem auf Proteinebene zweifelsfrei detektierbar. Die Konservierung von NEDD8 von HEK-Zellen über Zebrafisch und Maus hin zum Menschen lassen eine Beteiligung an für den Organismus essentiellen Regulationen vermuten (Rabut und Peter, 2008).

Da NEDD8 während der embryologischen Entwicklung in fast allen Geweben exprimiert wird (Kumar et al., 1993), war bei einer Inhibierung der Neddylierung im gesamten Fisch mit multiplen Störungen und Fehlbildungen zu rechnen. Sowohl die Injektion von MLN4924 als auch von translationsblockierenden MOs führten zu Herzbeutel- und Dottersacködemen, intestinalen Schwellungen und Unterentwicklung des Kopfes mit fehlender Protrusion des Unterkiefers, unvollständiger oder fehlender Ausbildung von Augen und Innenohr in variabler Ausprägung und Kombination. Wie von Stainier et al. beschrieben, traten auch in den kontrollinjizierten Gruppen leichte Entwicklungsverzögerungen auf, die morphologischen Veränderungen in den Gruppen mit gestörter Neddylierung gingen jedoch über diese unspezifischen Reaktionen weit hinaus (Stainier et al., 2017). Weitere Dysmorphien sprechen für weit gestreute Funktionen von NEDD8 während der Embryonalphase.

Bei einem Knock-down der Neddylierung durch MLN4924 und Morpholinos war in den Western Blots eine Verminderung des Bandenmusters als ein Ausdruck der verminderten Neddylierung erwartet worden (Soucy et al., 2009; Vogl et al., 2015). Diese Erwartung bestätigte sich mit einer signifikanten Verminderung der Hauptbande bei 100 kDa. Bisher wurden lediglich vollständige zwei Tage alte Fischlarven für Western Blots verwendet. In Zukunft könnten bei ausreichender Gruppengröße Western Blots zu späteren Entwicklungszeitpunkten angefertigt werden, ggf. auch nur von einzelnen Geweben. In der Zusammenschau konnte der Zebrafisch zunächst als Modellorganismus für die Neddylierung etabliert werden, ein weites Feld an möglichen weiteren Untersuchungen hat sich aufgetan.

Im zweiten Teil dieser Arbeit war es das Ziel, mittels einer Blockade der Neddylierung durch eine dominant-negative Ubc12-Mutation in Mosaikexpression eine systemische Wirkung zu verhindern, und gleichzeitig das In-vivo-live-Imaging zu vereinfachen (Wada

et al, 2000). Da F-Aktin die Wachstumszone der Myelinlamelle vorwärts treibt und Cofilin1 neddyliert ist, war die Erwartung, idealerweise eine irreguläre Myelinisierung mit Bildung von langen filamentösen Fortsätzen zu sehen. Ähnliche Beobachtungen konnten Vogl et al. bei der Bildung von dendritischen Spines in hippocampalen Neuronen der Maus machen (Vogl et al., 2015). Im Zebrafisch war die morphologische Ausprägung der Mutation heterogen. Bei subjektiver Betrachtung waren die meisten OL unauffällig, einige wiesen eindeutige Veränderungen wie Knötchen und feine Fortsätze auf. Wenige OL bildeten lediglich kurze, dicke Fortsätze oder Fortsätze außerhalb der klassischen kraniokaudalen Ausrichtung. Die statistische Auswertung ergab, dass auch Internodien von subjektiv unauffälligen OL einen unregelmäßigeren Verlauf hatten als Internodien aus der Kontrollgruppe. Die Zusammenfassung der Messungen in den ‚Curvy-Quotienten‘ verdeutlicht die Längenzunahme einzelner Internodien durch einen nicht-linearen Verlauf bei Insertion der dominant-negativen Mutation. Eine Auskunft etwa zur Anzahl der gebildeten Internodien pro OL oder dem Durchmesser einzelner Internodien konnte nicht gemacht werden, hierfür war die Auflösung der Aufnahmen nicht ausreichend. Zusammenfassend ist zwar keine eindeutige Verbindung zwischen Myelinisierung und Neddylierung nachgewiesen, allerdings scheint der gewählte Ansatz vielversprechend zu sein. Neue Versuche mit LifeAct und Imaging bei einer höheren Auflösung könnten wegweisend sein.

Eine weitere Frage, die zukünftig untersucht werden kann, ist, ob OL mit Mutation tatsächlich Axone myelinisieren oder ob sich die Lamellen auch um andere Strukturen legen. Des Weiteren ist ungeklärt, ob sich durch eine gestörte Neddylierung mit veränderter Myelinisierung die Leitfähigkeit verändert. Auch konnten die gewonnenen Daten keinen Aufschluss über mögliche Unterschiede zwischen Axonen unterschiedlicher Kaliber geben. Zur Beantwortung dieser Fragen sind weitere Versuche mit axonalen Reporterlinien und ggf. Zellkulturen nötig.

#### 4.4 Klinische Schlussfolgerung

Ein genaues Verständnis der Zusammenhänge zwischen Neddylierung und Myelinisierung im zentralen Nervensystem kann essenziell sein für die Erkennung und Behandlung demyelinisierender neurodegenerativer Erkrankungen. Es werden Studien im adul-

ten Zebrafisch nötig sein, um die genaue Rolle von NEDD8 und NEDD8like während der Embryogenese zu charakterisieren. Da diese Arbeit sich mit der Myelinisierung während der Embryogenese beschäftigt, bleibt offen, ob sich die Funktion von NEDD8 im adulten Zebrafisch von der während der Embryogenese unterscheidet.

Nichtsdestotrotz bilden die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zur Neddylierung einen ersten Beitrag in Hinblick auf eine Beteiligung der Neddylierung bei der Entstehung demyelinisierender Erkrankungen und der Entschlüsselung von zellulären Vorgängen im gesunden Organismus.

#### 4.5 Wissenschaftliche Schlussfolgerung

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass während der Myelinisierung relevante Proteine und Marker neddyliert sein könnten. Es werden in Zukunft weitere Untersuchungen während der Embryogenese nötig sein, um diese zweifelsfrei zu identifizieren. Der Zebrafisch hat sich hierfür als ein hervorragender Modellorganismus erwiesen, da allgemeine Entwicklung und Myelinisierung in verhältnismäßig kurzer Zeit ablaufen. Es stehen des Weiteren mannigfaltige Reporterlinien zur Untersuchung der Myelinisierung zur Verfügung, mit MLN4924, den hier verwendeten Morpholino-Oligonukleotiden sowie der dominant-negativen Ubc12-Mutation wurden mehrere Verfahren zur Untersuchung der Neddylierung im Zebrafisch erfolgreich getestet. Dabei kann es durchaus von Interesse sein, die dominant-negative Ubc12-Mutation unter einem anderen oligodendroglialen Promotor zu inserieren, um etwaige Veränderungen zu früheren oder späteren Entwicklungszeitpunkten detektieren zu können. Besonderes Augenmerk sollte zunächst jedoch auf der Etablierung des LifeAct in Verbindung mit der dominant-negativen Ubc12-Mutation liegen, um die Veränderungen des Zytoskeletts während der Myelinisierung bei gestörter Neddylierung untersuchen zu können.

## 5. Zusammenfassung

Oligodendrozyten sind die myelinisierenden Gliazellen des Zentralen Nervensystems. Sowohl während der Entwicklung als auch im adulten Organismus stellen sie die Isolierung und die metabolische Versorgung benachbarter Axone. Neddylisierung von Proteinen führt zu multiplen, bisher weitgehend unbekanntem, regulatorischen Effekten. Daher beschäftigte sich diese Arbeit mit der Frage, ob die Neddylisierung auch einen Einfluss auf die Myelinisierung durch Oligodendrozyten hat.

Für die Durchführung der Experimente fiel die Wahl auf den Zebrafisch, der sich in den letzten Jahren zu einem starken Modellorganismus zur Untersuchung der Myelinisierung entwickelt hat. Da bisher keine Arbeiten zur Neddylisierung mit Blick auf die Myelinisierung im Zebrafisch existierten, sollte die vorliegende Arbeit neue Erkenntnisse in dieser Richtung erbringen.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse deuten auf multiple regulatorische Funktionen von NEDD8 (und NEDD8Like) im gesamten Zebrafisch sowie in myelinisierenden Oligodendrozyten im Speziellen hin. In einem ersten Schritt konnte der Zebrafisch als Modellorganismus zur Untersuchung der Neddylisierung etabliert werden. Der Einsatz des Nae1-Inhibitors MLN4924 und zweier translationsblockierender Morpholinos führte zu vergleichbaren morphologischen Veränderungen und einer Reduktion neddylierter Proteine im Western Blot. In der Folge konnte durch die Insertion einer dominant-negativen Ubc12-Mutation in einzelnen Oligodendrozyten eine Beteiligung der Neddylisierung an einer korrekten initialen Entwicklung von Oligodendrozyten und Myelinisierung nachgewiesen werden.

Da eine genaue Untersuchung der Verbindung zwischen Neddylisierung und Myelinisierung im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war, könnte dies in Zukunft von Interesse sein. Daneben kann die Untersuchung der Neddylisierung während der initialen Myelinisierung und Remyelinisierung im adulten Zebrafisch zum Verständnis neurodegenerativer Erkrankungen beitragen und eventuell sogar das Tor für effektive Behandlungsmöglichkeiten öffnen.

## 6. Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b> Entwicklung des Zebrafisches.....	11
<b>Abb. 2:</b> Die Entwicklung von Oligodendrozyten.....	14
<b>Abb. 3:</b> Schema zum Vorgang der Myelinisierung durch Oligodendrozyten im ZNS.....	15
<b>Abb. 4:</b> Schematische Darstellung der Neddylierung .....	17
<b>Abb. 5:</b> Ubiquitin-Modifikationen (Ub) und deren resultierende zellulären Funktionen ..	18
<b>Abb. 6:</b> Vektor-Karte des Plasmids pB-ClaudinK-memTdTomato-P2A-Zf-DN-Ubc12 zur Etablierung einer dominant-negativen Mutation im Zebrafisch .....	33
<b>Abb. 7:</b> Vektor-Karte des Plasmids pB-ClaudinK-memTdTomato-P2A-NLS-CFP als Kontrollplasmid, um den Erfolg der Injektion überprüfen zu können.....	33
<b>Abb. 8:</b> Vermessung einer Fischlarve an 5 dpf, modifizierte Zeichnung von Bhuvan- wari Nagarajan.....	36
<b>Abb. 9:</b> Skizze zur Vermessung von Internodien.....	37
<b>Abb. 10:</b> Nachweis von für die Neddylierung relevanten Genen im Zebrafisch .....	39
<b>Abb. 11:</b> Injektion von DMSO und MLN an 1 hpf. Vergleich der Phänotypen von MLN- Larven (C-F) mit denen der Wildtyp- (A) und DMSO-Kontrolle (B) an 5 dpf....	41
<b>Abb. 12:</b> Kaplan-Meier-Überlebenskurve zur Auswertung der Anzahl an gestorbenen Larven bis 5 dpf in nicht-injizierter Kontrollgruppe (UI), DMSO-Kontrolle und MLN-Gruppe.....	42
<b>Abb. 13:</b> Auswertung der Längenvermessung von DMSO- und MLN-injizierten Larven an 5 dpf .....	43
<b>Abb. 14:</b> Anti-NEDD8Western Blots von zwei Tage alten MLN-injizierten Larven.....	44

<b>Abb. 15:</b> Injektion von NEDD8- und NEDD8L-Morpholino sowie eines Morpholino-Mix an 1 hpf. Imaging zum Vergleich der Phänotypen an 5 dpf .....	46
<b>Abb. 16:</b> Kaplan-Meier-Kurve zur Anzahl an gestorbenen Larven bis 5 dpf in nicht-injizierter Kontrollgruppe, Kontroll-MO-, NEDD8-, NEDD8L- und MO-Mix-Gruppe .....	48
<b>Abb. 17:</b> Auswertung der Längenvermessung von Morpholino-injizierten Larven an 5 dpf .....	49
<b>Abb. 18:</b> Anti-NEDD8 Western Blots von zwei Tage alten MO-injizierten Larven .....	50
<b>Abb. 19:</b> Injektion des Plasmids ClaudinK-memTdTomato-DN-Ubc12 in Tg(ClaudinK-EGFP) an 1 hpf, Imaging an 5 dpf.....	52
<b>Abb. 20:</b> Zellen mit dominant-negativer Ubc12-Mutation an 5 dpf.....	55
<b>Abb. 21:</b> Injektion in Eier der Linie Tg(ClaudinK-EGFP) an 1 hpf, Imaging an 5 dpf. Vergleich von Oligodendrozyten der Kontrollgruppe (A, B) mit denen aus Mutationsgruppe (C, D).....	56
<b>Abb. 22:</b> Auswertung der Daten aus der Vermessung von Internodien (Kontrolle und DN Konstrukt).....	58
<b>Abb. 23:</b> Myelinisierung großkalibriger Axone .....	59
<b>Abb. 24:</b> Injektion des DN-Ubc12-Konstruktes (rot) in Tg(Mauthner:GFP) (grün) an 1 hpf, Imaging an 5 dpf.....	60
<b>Abb. 25:</b> Darstellung jeweils eines Western Blots gegen NEDD8 vor und nach Anpassung des Protokolls zur Probenauftrennung. ....	63



## 7. Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1:</b> Verwendetes Chemotherapeutikum zur Inhibierung der Neddylierung.....	22
<b>Tab. 2:</b> Verwendete Antikörper für die Durchführung von Western Blots.....	23
<b>Tab. 3:</b> Verwendete Plasmide zur Erzeugung transienter Zebrafischlarven .....	23
<b>Tab. 4:</b> Oligonukleotide für Morpholino-Injektionen und PCRs .....	24
<b>Tab. 5:</b> Verwendete Fischlinien für Mikroinjektionen.....	25
<b>Tab. 6:</b> In dieser Arbeit verwendete Chemikalien für diverse Versuche.....	25
<b>Tab. 7:</b> Mikroskopie und Laborausstattung, für Screening und Bilddatengewinnung ....	26
<b>Tab. 8:</b> Enzym- und Fertig-Kits zur Herstellung von PCR-Proben und Plasmiden .....	27
<b>Tab. 9:</b> Verwendete Software, u.a. zur Datenauswertung .....	28
<b>Tab. 10:</b> Danieau-Puffer zur Aufzucht der Fischlarven während der ersten Tage .....	28
<b>Tab. 11:</b> Verwendeter Laufpuffer für die SDS-PAGE.....	29
<b>Tab. 12:</b> Verwendete Puffer und Lösungen für Western Blot.....	29

## 8. Literaturverzeichnis

Allen NJ, Lyons DA. Glia as architects of central nervous system formation and function. *Science* 2018; 362:181-185

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

Almeida RG, Lyons DA. On myelinated axon plasticity and neuronal circuit formation and function. *J Neurosci* 2017; 37:10023-10034

Amores A, Force A, Yan Y L, Joly L, Amemiya C, Ho RK, Langeland J, Prince V, Wang YL, Westerfield M, Ekker M, Postlethwait JH. Zebrafish hox clusters and vertebrate genome evolution. *Science* 1998, 282:1711-1714

Arancibia-Cárcamo IL, Ford MC, Cossell L, Ishida K, Tohyama K, Attwell D. Node of Ranvier length as a potential regulator of myelinated axon conduction speed. *Elife* 2017; 6:e23329

Asakawa K, Suster ML, Mizusawa K, Nagayoshi S, Kotani T, Urasaki A, Kishimoto Y, Hibi M, Kawakami K. Genetic dissection of neural circuits by Tol2 transposon-mediated Gal4 gene and enhancer trapping in zebrafish. *PNAS* 2008; 105: 1255-1260

Bartzokis G. Age-related myelin breakdown: a developmental model of cognitive decline and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2004; 25: 5-18

Baumann N, Pham-Dinh D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* 2001 81: 871-927

Bill BR, Petzold AM, Clark KJ, Schimmenti LA, Ekker SC. A Primer for morpholino use in zebrafish. *Zebrafish* 2009; 6: 69-77

Bin JM, Lyons DA. Imaging myelination in vivo using transparent animal models. *Brain Plasticity* 2016; 2: 3-29

- Borroughs AM, Lakshminarayan MI, Aravind L. Small but versatile: the extraordinary functional and structural diversity of the beta-grasp fold. *Biol Direct* 2007; 2:18
- Brockmann MM, Döngi M, Einsfelder U, Körber N, Refojo D, Stein V. Neddylation regulates excitatory synaptic transmission and plasticity. *Sci Rep* 2019; 9: 17935
- Chairatvit K, Ngamkitidechakul C. Control of cell proliferation via elevated NEDD8 conjugation in oral squamous cell carcinoma. *Mol Cell Biochem* 2007; 306: 163-169
- Chang K-J, Redmond SA, Chan JR. Remodeling myelination: implications for mechanisms of neural plasticity. *Nat Neurosci* 2016; 19: 190–197
- Choo YS, Vogler G, Wang D, Kalvakuri S, Iliuk A, Tao WA, Bodmer R, Zhang Z. Regulation of parkin and PINK1 by neddylation. *Hum Mol Genet* 2012; 21: 2514-2523
- Compston A, Coles A. Multiple Sclerosis. *Lancet* 2008; 372: 1502-1517
- Culp P, Nüsslein-Volhard C, Hopkins N. High-frequency germ-line transmission of plasmid DNA sequences injected into fertilized zebrafish eggs. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88: 7953–7957
- Czopka T. Insights into mechanisms of central nervous system myelination using zebrafish. *Glia* 2016; 64: 333-349
- Dil Kuazi A, Kito K, Abe Y, Shin R-W, Kamitani T, Ueda N. NEDD8 protein is involved in ubiquitinated inclusion bodies. *J Pathol* 2003; 199: 259-266
- Driever W, Stemple D, Schier A, Solnica-Krezel L. Zebrafish: genetic tools for studying vertebrate development. *Trends Genet* 1994; 5:152-159
- El-Mesery M, Rosenthal T, Rauert-Wunderlich H, Schreder M, Stühmer T, Leich E, Schlosser A, Ehrenschwender M, Wajant H, Siegmund D. The NEDD8-activating enzyme inhibitor MLN4924 sensitizes a TNFR1+ subgroup of multiple myeloma cells for TNF-induced cell death. *Cell Death Dis* 2019; 10: 611
- Enchev R, Schulman BA, Peter M. Protein neddylation: beyond cullin-RING ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2015; 16: 30-44

van der Ent W, Burrello C, Teunisse AF, Ksander BR, van der Velden PA, Jager MJ, Jochemsen AG, Snaar-Jagalska BE. Modeling of human uveal melanoma in zebrafish xenograft embryos. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014; 55: 6612-6622

Franklin RJ, ffrench-Constant C. Remyelination in the CNS: From biology to therapy. *Nat Rev Neurosci* 2008; 9: 839–855

Fünfschilling U, Supplie LM, Mahad D, Boretius S, Saab AS, Edgar J, Brinkmann BG, Kassmann CM, Tzvetanova ID, Möbius W, Diaz F, Meijer D, Suter U, Hamprecht B, Sereda MW, Moraes CT, Frahm J, Goebbels S, Nave K-A. Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. *Nature* 2012; 485: 517–521

Gan-Erdene T, Nagamalleswari K, Yin L, Wu K, Pan Z-Q, Wilkinson KD. Identification and characterization of DEN1, a deneddylase of the ULP family. *J Biol Chem* 2003; 278: 28892-28900

Gong L, Yeh ET. Identification of the activating and conjugating enzymes of the NEDD8 conjugation pathway. *J Biol Chem* 1999; 274: 12036-12042

Haglund K, Dikic I. Ubiquitilation and cell signaling. *EMBO J* 2005; 24: 3353-3359

Hallare A, Nagel K, Köhler H-R, Triebkorn R. Comparative embryotoxicity and proteotoxicity of three carrier solvents to zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Ecotoxicol Environ Saf* 2006; 63: 378-388

Han S, Shin H, Oh J-W, Oh YJ, Her N-G, Nam D-H. The protein neddylation inhibitor MLN4924 suppresses patient-derived glioblastoma cells via inhibition of ERK and AKT signaling. *Cancers (Basel)* 2019; 11:1849

Hartline DK, Colman DR. Rapid conduction and the evolution of giant axons and myelinated fibers. *Curr Biol* 2007; 17: 29–35

Hori T, Osaka F, Chiba T, Miyamoto C, Okabayashi K, Shimbara N, Kato S, Tanaka K. Covalent modification of all members of human cullin family proteins by NEDD8. *Oncogene* 1999; 18: 6829-6834

- Howe K, Clark M, Torroja C, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, Collins JE, Humphray S, McLaren K, Matthews L, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 2013; 496: 498–503
- Huang DT, Paydar A, Zhuang M, Waddell MB, Holton JM, Schulman BA. Structural basis for recruitment of Ubc12 by an E2 binding domain in NEDD8's E1. *Mol Cell* 2005; 17: 341-350
- Huang DT, Ayrault O, Hunt HW, Taherbhoy AM, Duda DM, Scott DC, Borg LA, Neale G, Murray PJ, Roussel MF, Schulman BA. E2-RING expansion of the NEDD8 cascade confers specificity to cullin modification. *Mol Cell* 2009; 33: 483-495
- Karlsson J, von Hofsten J, Olsson P-E. Generating transparent zebrafish: A refined method to improve detection of gene expression during embryonic development. *Mar Biotechnol* 2001; 3: 522-527
- Kim JH, Lee S-R, Li L-H, Park HJ, Park J-H, Lee KY, Kim M-K, Shin BA, Choi S-Y. High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines, zebrafish and mice. *PLoS One* 2011; 6: e18556
- Kimmel CB. Genetics and early development of zebrafish. *Trends Genet* 1989; 5:283-288
- Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the Zebrafish. *Dev Dyn* 1995; 203: 253–310
- Kirby BB, Takada N, Latimer AJ, Shin J, Carney TJ, Kelsh RN, Appel B. In vivo time-lapse imaging shows dynamic oligodendrocyte progenitor behavior during zebrafish development. *Nat Neurosci* 2006; 9: 1506–1511
- Kuhn S, Gritti L, Crooks D, Dombrowski Y. Oligodendrocytes in development, myelin generation and beyond. *Cells* 2019; 8: 1424
- Kumar S, Tomooka Y, Noda M. Identification of a set of genes with developmentally down-regulated expression in the mouse brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 185: 1155-1161

- Kumar S, Yoshida Y, Noda M. Cloning of a cDNA which encodes a novel ubiquitin-like protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 195: 393-399
- Lawrence C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture* 2007; 269: 1-20
- Lee Y, Morrison BM, Li Y, Lengacher S, Farah MH, Hoffman PN, Liu Y, Tsingalia A, Jin L, Zhang PW, Pellerin L, Magistretti PJ, Rothstein JD. Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature* 2012; 487: 443–448
- Liakopoulos D, Doenges G, Matuschewski K, Jentsch S. A novel protein modification pathway related to the ubiquitin system. *EMBO J* 1998; 17: 2208-2214
- Link V, Shevchenko A, Heisenberg C-P. Proteomics of early zebrafish embryos. *BMC Dev Biol* 2006; 6: 1
- Maes J, Verlooy L, Buenafe OE, de Witte PA, Esguerra CV, Crawford AD. Evaluation of 14 organic solvents and carriers for screening applications in zebrafish embryos and Larvae. *PLoS One* 2012; 7: e43850
- McKenzie IA, Ohayon D, Li H, Paes de Faria J, Emery B, Tohyama K, Richardson WD. Motor skill learning requires active central myelination. *Science* 2014; 346: 318-322
- Mendoza HM, Shen L-N, Botting C, Lewis A, Chen J, Ink B, Hay RT. NEDP1, a highly conserved cysteine protease that deNEDDylates cullins. *J Biol Chem* 2003; 278: 25637-25643
- Meng L, Zhang A, Jin Y, Yan D. Regulation of neuronal axon specification by glia-neuron gap junctions in *C. elegans*. *eLife* 2016; 5: e19510
- Mori F, Nishie M, Piao Y-S, Kamitani T, Takahashi H, Wakabayashi K. Accumulation of NEDD8 in neuronal and glial inclusions of neurodegenerative disorders. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2005 31: 53-61

Meyer A, Scharl M. Gene and genome duplication in vertebrates: the one-to-four (-to-eight in fish) rule and the evolution of novel gene functions. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11: 699-704

Mullins MC, Nüsslein-Volhard C. Mutational approaches to studying embryonic pattern formation in the zebrafish. *Curr Opin Genet Dev* 1993; 3: 648-654

Münzel EJ, Schaefer K, Obirei B, Kremmer E, Burton E, Kuscha V, Becker CG, Brösamle C, Williams A, Becker T. ClaudinK is specifically expressed in cells that form myelin during development of the nervous system and regeneration of the optic nerve in adult zebrafish. *Glia* 2012; 60: 253–270

Münzel EJ, Becker CG, Becker T, Williams A. Zebrafish regenerate full thickness optic nerve myelin after demyelination, but this fails with increasing age. *Acta Neuropathol Commun* 2014; 2: 77

Nagarajan B, Harder A, Japp A, Häberlein F, Mingardo E, Kleinert H, Yilmaz Ö, Zoons A, Rau B, Christ A, Kubitschek U, Eiberger B, Sandhoff R, Eckardt M, Hartmann D, Odermatt B. CNS myelin protein 36K regulates oligodendrocyte differentiation through Notch. *Glia* 2020; 68: 509-527

Nave K-A, Werner HB. Myelination of the nervous system: mechanisms and functions. *Annu Rev Cell Dev Bio* 2014; 30: 503-533

Nawaz S, Sánchez P, Schmitt S, Snaidero N, Mitkovski M, Velte C, Brückner BR, Alexopoulos I, Czopka T, Jung SY, Rhee JS, Janshoff A, Wittke W, Schaap IAT, Lyons DA, Simons M. Actin filament turnover drives leading edge growth during myelin sheath formation in the central nervous system. *DevCell* 2015; 34; 139-151

Ng AN, de Jong-Curtain TA, Mawdsley DJ, White SJ, Shin J, Appel B, Dong PD, Stainier DY, Heath JK. Formation of the digestive system in zebrafish: III. Intestinal epithelium morphogenesis. *Dev Biol* 2005; 286: 114–135

Nüsslein-Volhard C, Dahm R. Zebrafish: A practical approach. New York: Oxford University Press, 2002

Oved S, Mosesson Y, Zwang Y, Santonico E, Shtiegman K, Marmor MD, Kochupurakkal BS, Katz M, Lavi S, Cesareni G, Yarden Y. Conjugation to Nedd8 instigates ubiquitilation and down-regulation of activated receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem* 2006; 281: 21640-21651

Pan Z-Q, Kentsis A, Dias DC, Yamoah K, Wu K. Nedd8 on cullin: building an expressway to protein destruction. *Oncogene* 2004; 23: 1985-1997

Petroski MD, Deshaies RJ. Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6: 9-20

Philips T, Rothstein JD. Glial cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurology* 2014; 262B: 111-120

Pouwels PJ, Vanderver A, Bernard G, Wolf NI, Dreha-Kulczewski SF, Deoni SC, Kohlschütter A, Richardson W, French-Constant C, Köhler W, Barkovich AJ. Hypomyelinating leukodystrophies: translational research progress and prospects. *Ann Neurol* 2014; 76: 5-19

Preston MA, Macklin WB. Zebrafish as a model to investigate CNS myelination. *Glia* 2015; 63: 177-193

Rabut G, Peter M. Function and regulation of protein neddylation. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series. *EMBO Rep* 2008; 9: 969-976

Rasmussen JP, Sagasti A. Learning to swim, again: Axon regeneration in fish. *Exp Neurology* 2017; 287: 318-330

Rembold M, Lahiri K, Foulkes NS, Wittbrodt J. Transgenesis in fish: efficient selection of transgenic fish by co-injection with a fluorescent reporter construct. *Nat Protoc* 2006; 1: 1133-1139

Richardson RM, Singh A, Sun D, Fillmore HL, Dietrich III. DW, Bullock MR. Stem cell biology in traumatic brain injury: effects of injury and strategies for repair. *J Neurosurg* 2010; 112: 1125-1138



Riedl J, Crevenna AH, Kessenbrock K, Yu JH, Neukirchen D, Bista M, Bradke F, Jenne D, Holak TA, Werb Z, Sixt M, Wedlich-Soldner R. Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat Methods* 2008; 5: 605-607

Salon C, Brambilla E, Brambilla C, Lantuejoul S, Gazzeri S, Eymin B. Altered pattern of Cul-1 protein expression and neddylation in human lung tumours: relationships with CAND1 and cyclin E protein levels. *J Pathol* 2007; 213: 303-310

Santonico E. Old and new concepts in Ubiquitin and NEDD8 recognition. *Biomolecules* 2020; 10: 566

Schwechheimer C. NEDD8 – its role in the regulation of Cullin RING ligases. *Curr Opin Plat Biol* 2018; 45A: 112-119

Schulte-Merker S, Stainier DY. Out with the old, in with the new: reassessing morpholino knockdowns in light of genome editing technology. *Development* 2014; 141: 3103-3104

Sherman DL, Brophy PJ. Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. *Nat Rev Neurosci* 2005 6: 683–690

Shin J, Park HC, Topczewska JM, Mawdsley DJ, Appel B. Neural cell fate analysis in zebrafish using olig2 BAC transgenics. *Methods Cell Sci* 2003 25: 7–14

Snaidero N, Möbius W, Czopka T, Hekking LHP, Mathisen C, Verkleij D, Goebbels S, Edgar J, Merkler D, Lyons DA, Nave K-A, Simons M. Myelin membrane wrapping of CNS axons by PI(3,4,5)P3-dependent polarized growth at the inner tongue. *Cell* 2014; 156: 277–290

Soucy TA, Smith PG, Milhollen MA, Berger AJ, Gavin JM, Adhikari S, et al. An inhibitor of NEDD8-activating enzyme as a new approach to treat cancer. *Nature* 2009; 458:732-67

Stainier DY, Raz E, Lawson ND, Ekker SC, Burdine RD, Eisen JS, Ingham PW, Schulte-Merker S, Yelon D, Weinstein BM, Mullins MC, Wilson SW, Ramakrishnan L, Amacher SL, Neuhauss SC, Meng A, Mochizuki N, Panula P, Moens CB. Guidelines for morpholino use in zebrafish. *PLoS Genet* 2017; 13: e1007000

- Streisinger G, Walker C, Dower N, Knauber D, Singer F. Production of clones of homozygous diploid zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Nature* 1981; 291:293–296
- Tateishi K, Omata M, Tanaka K, Chiba T. The NEDD8 system is essential for cell cycle progression and morphogenetic pathway in mice. *J Cell Biol* 2001; 155: 571-579
- Timsit S, Martinez S, Allinquant B, Peyron F, Puelles L, Zalc B. Oligodendrocytes originate in a restricted zone of the embryonic ventral neural tube defined by DM-20 mRNA expression. *J Neurosci* 1995; 15: 1012-1024
- Traiffort E, Zakaria M, Laouarem Y, Ferent J. Hedgehog: A key signaling in the development of the oligodendrocyte lineage. *J Dev Biol* 2016; 4: 28
- van der Veen AG, Ploegh HL. Ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Biochem* 2012; 81: 323-357
- Virchow R. Über das granuliertes Aussehen der Wandungen der Gehirnventrikel. *Z Psych* 1846; 2: 242-250
- Vogl AM, Brockmann MM, Giusti SA, Maccarrone G, Vercelli CA, Bauder CA, Richter JS, Roselli F, Hafner A-S, Dedic N, Wotjak CT, Vogt-Weisenhorn DM, Choquet D, Turck CW, Stein V, Deussing JM, Refojo D. Neddylation inhibition impairs spine development, destabilizes synapses and deteriorates cognition. *Nat Neurosci* 2015; 18: 239-251
- Wada H, Kito K, Caskey LS, Yeh ET, Kamitani T. Cleavage of the C-terminus of NEDD8 by UCH-L3. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 251: 688-692
- Wada H, Yeh ET, Kamitani T. A dominant-negative UBC12 mutant sequesters NEDD8 and inhibits NEDD8 conjugation in vivo. *J Biol Chem* 2000; 275: 17008-17015
- Walden H, Podgorski MS, Huang DT, Miller DW, Howard RJ, Minor DL Jr., Holton JM, Schulman BA. The structure of the APPBP1-UBA3-NEDD8-ATP complex reveals the basis for selective ubiquitin-like protein activation by an E1. *Mol Cell* 2003; 12: 1427-1437

Wang S, Young KM. White matter plasticity in adulthood. *Neuroscience* 2014; 76: 148-160

Waxman SG, Bennett MVL. Relative conduction velocities of small myelinated and non-myelinated fibres in the central nervous system. *Nature New Biology* 1972; 238: 217-219

Waxman SG. Demyelination in spinal cord injury. *J Neurol Sci* 1989; 91: 1-14

Weber T, Köster R. Genetic tools for multicolor imaging in zebrafish larvae. *Methods* 2013; 62: 279-291

Westerfield M. *The zebrafish Book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*, 4th Edition, Eugene: University of Oregon Press, 2000

Wittbrodt J, Adam D, Malitschek B, Mäueler W, Raulf F, Telling A, Robertson SM, Scharl M. Novel putative receptor tyrosine kinase encoded by the melanoma-inducing *Tu* locus in *Xiphorus*. *Nature* 1989; 341:415-421

Xirodimas DP, Saville MK, Bourdon J-C, Hay RT, Lane DP. Mdm2-mediated NEDD8 conjugation of p53 inhibits its transcriptional activity. *Cell* 2004; 118:83-97

Yamanaka I, Miki M, Asakawa K, Kawakami K, Oda Y, Hirata H. Glycinergic transmission and postsynaptic activation of CaMKII are required for glycine receptor clustering in vivo. *Genes Cells* 2013;18:211-224

Yu G, Liu X, Tang J, Xu C, Ouyang G, Xiao W. Neddylation facilitates the antiviral response in zebrafish. *Front Immunol* 2019; 10: 1432

## 9. Danksagung

Mein Dank gilt meinen Betreuern Herrn Prof. Dr. Valentin Stein und Herrn Prof. Dr. Benjamin Odermatt für die freundliche Überlassung dieses sehr interessanten Themas und die wissenschaftliche Betreuung. Durch diese Laborarbeit habe ich gelernt, selbstständig wissenschaftlich zu arbeiten.

Herrn Ulf Einsfelder und den Kollegen aus der AG Stein möchte ich für die gute Zusammenarbeit und die Hilfestellungen insbesondere bei der Durchführung der Western Blots danken.

Frau Dr. Bhuvaneshwari Nagarajan, Caroline Kolvenbach, Enrico Mingardo, Öznur Yilmaz, Tobias Lindenberg und dem restlichen Zebrafisch-Team danke ich für die freundschaftliche Unterstützung, die vielen motivierenden Worte und die Hilfestellungen in vielen Laborsituationen. Besonders gerne denke ich an unsere vielen gemeinsamen Abende mit gutem Essen zurück.

Meinen Eltern möchte ich für die uneingeschränkte Unterstützung danken, die mir mein Studium und die Anfertigung dieser Arbeit erst ermöglicht haben. Meinem Vater möchte ich für das kritische Gegenlesen und die Endformatierung danken. Ich danke meinem Bruder Philipp für manche Stunde des Ausgleichs.

Ganz besonders möchte ich meiner guten Freundin Sabrina danken für die vielen gemeinsamen Mittagessen und anregenden Diskussionen bei einer Runde Pokémon Go durch den Botanischen Garten.

Zu guter Letzt danke ich von ganzem Herzen meinem Freund Adrian für seine starken Nerven und die Unterstützung während anstrengender Phasen dieser Arbeit.

Der Bonfor-scimed-Kommission sei für das Promotionsstipendium und das dadurch ermöglichte Freisemester gedankt, das es mir ermöglichte, mich für ein halbes Jahr ganz der Forschung im Labor zu widmen.