

Neurodegeneration live

Alzheimerforschung in transgenen Zebrafischen

DOMINIK PAQUET, CHRISTIAN HAASS

DEUTSCHES ZENTRUM FÜR NEURODEGENERATIVE ERKRANKUNGEN (DZNE), MÜNCHEN; ADOLF-BUTENANDT-INSTITUT, LMU MÜNCHEN

Für das Verständnis der molekularen Pathologie von neurodegenerativen Demenzen und die Entwicklung von Behandlungsstrategien sind Tiermodelle essenziell. Mit transgenen Zebrafischen konnten wir nun erstmals *in vivo* den neuronalen Zelltod direkt beobachten.

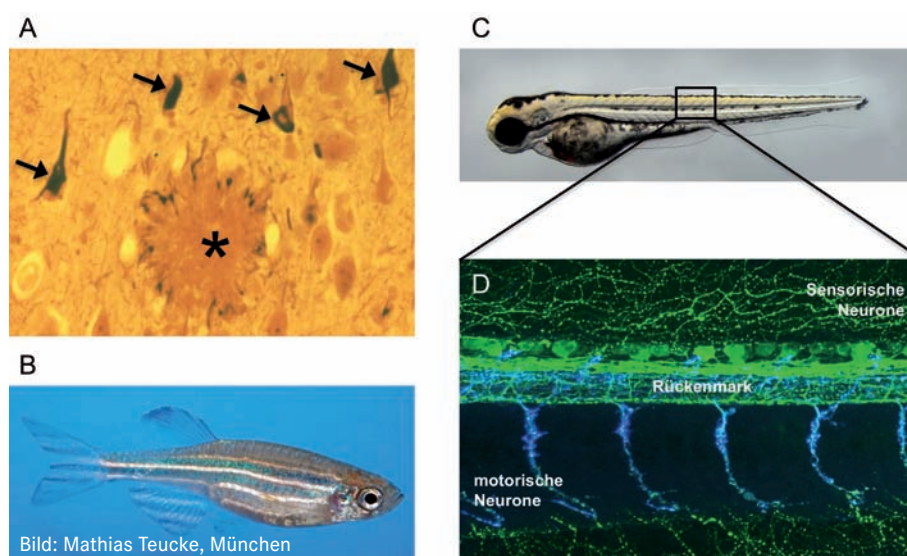
Animal models are essential to understand the molecular pathology of neurodegenerative dementias and to develop treatment strategies. Using transgenic zebrafish we could for the first time observe neuronal cell death *in vivo*.

■ Demenzen vom neurodegenerativen Typ gehören zu den häufigsten neurologischen Erkrankungen. Weltweit sind über 25 Millionen Menschen betroffen, davon eine Million in Deutschland. Bei diesen bisher unheilbaren Erkrankungen kommt es zum Absterben von Neuronen im Gehirn der Patienten, was zum Verlust wesentlicher kognitiver Fähigkeiten führt. Da hohes Alter der Hauptrisikofaktor für ihre Entstehung ist, werden sich die Fallzahlen aufgrund der weltweit steigenden Lebenserwartung bis zum Jahr 2050 verdoppeln.

Die Neuropathologie der häufigsten Demenz, der Alzheimer-Erkrankung, ist durch das Auftreten neurofibrilläres Bündel (Tangles) in Nervenzellen des Gehirns, sowie extrazellulärer Plaques gekennzeichnet (Abb. 1A). Die Tangles bestehen aus Filamenten einer veränderten Form des TAU-Proteins. Tangles sind auch das wesentliche pathologische Merkmal weiterer Demenzerkrankungen, wie z. B. vieler frontotemporaler Demenzen. Neurodegenerative Erkrankungen mit TAU-Pathologie werden daher als Tauopathien bezeichnet [1, 2].

Ein wichtiger Schwerpunkt der heutigen Demenzforschung liegt darin, herauszufinden, welche degenerativen Prozesse in Nervenzellen im Frühstadium der Erkrankung stattfinden und wie man diesen schädlichen Prozess aufhalten kann. Um diese Fragestellungen direkt in einem intakten Nervensys-

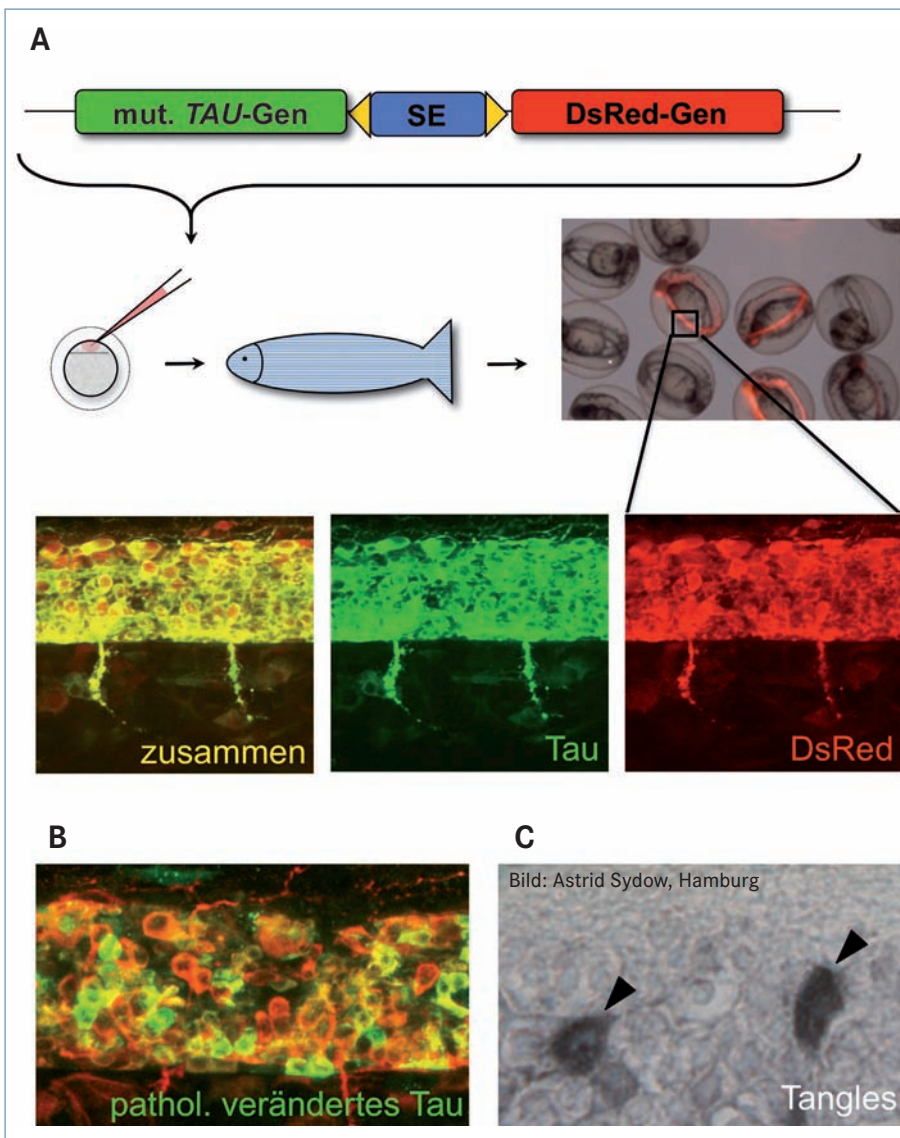
tem untersuchen zu können, verwendet man transgene Versuchstiere, in die mutierte menschliche Gene eingeführt wurden, welche beim Menschen zum beschleunigten Ausbruch einer Demenz-Erkrankung führen [3].



▲ **Abb. 1:** Zebrafische als Tiermodelle für die Erforschung von Tauopathien. **A**, Typische Neuropathologie bei Alzheimer mit neurofibrillären Tangles (Pfeil) und senilen Plaques (Stern). **B**, Seitenansicht eines adulten Zebrafisches. **C**, Seitenansicht einer drei Tage alten Zebrafischlarve. Die Larven sind vollständig durchsichtig und besitzen ein bereits komplex entwickeltes, funktionsfähiges Nervensystem. **D**, Die Immunfärbung des ganzen Tieres zeigt die Nervenzellfortsätze (Grün) und das synaptische Protein Synaptotagmin (Blau).

Transgene Zebrafische als neuartiges Tiermodell für die Demenzforschung

Zebrafischlarven eignen sich aufgrund ihres durchsichtigen, optisch klaren Gewebes und ihrer schnellen Entwicklung optimal für *in vivo*-Beobachtungen des Nervensystems (Abb. 1C, D). Außerdem erlaubt die geringe Dicke und Körpergröße der Larven direkte mikroskopische Beobachtungen zellulärer Prozesse am gesamten Tier in einer bei anderen Wirbeltieren bisher nicht erreichten Auflösung [4, 5]. Um humane Tauopathien im Zebrafisch nachzubilden, haben wir eine mutierte Form des TAU-Gens, die beim Menschen zur Ausbildung einer vererbten neurodegenerativen Demenz führt, in Zebrafischen exprimiert [6]. Die Expression wurde durch einen neuronalen Zebrafisch-Promotor aktiviert. Die TAU-exprimierenden Neuronen wurden dabei durch Ko-Expression des Fluoreszenzproteins DsRed sichtbar gemacht (Abb. 2A).



▲ **Abb. 2:** Herstellung und Charakterisierung *TAU*-transgener Zebrafische. **A**, Das Demenz-assoziierte, mutierte *TAU*-Gen wird mit dem Fluoreszenzgen für DsRed unter Kontrolle der Steuerungseinheit (SE) eines neuronalen Zebrafischpromotors auf einem DNA-Konstrukt kombiniert und in Fischeier injiziert. Die entstehenden transgenen Fische exprimieren *TAU* und DsRed in Neuronen des Nervensystems. Nach wenigen Stunden bildet *TAU* pathologische Veränderungen (AT270-*TAU*, **B**), nach einigen Wochen Proteinablagerungen (Tangles, **C**).

TAU-transgene Zebrafische entwickeln schnell wesentliche Krankheitssymptome von Tauopathien. Dazu gehören biochemische Veränderungen des *TAU*-Proteins, welche mit einer Immunfärbung anhand typischerweise auftretender pathologischer Epitope gezeigt wurden (**Abb. 2B**). Des Weiteren bildet *TAU* mit einer Silberfärbung nachweisbare pathologische Ablagerungen in neurofibrillären Tangles (**Abb. 2C**). Beide Färbemethoden werden auch von Pathologen zur *post mortem*-Diagnose von Tauopathien eingesetzt. Außerdem zeigen die Larven bereits nach wenigen Tagen eine Neurodegeneration. In den transgenen Fischen finden also pathologische Pro-

zesse statt, welche denen in Demenzpatienten sehr ähnlich sind.

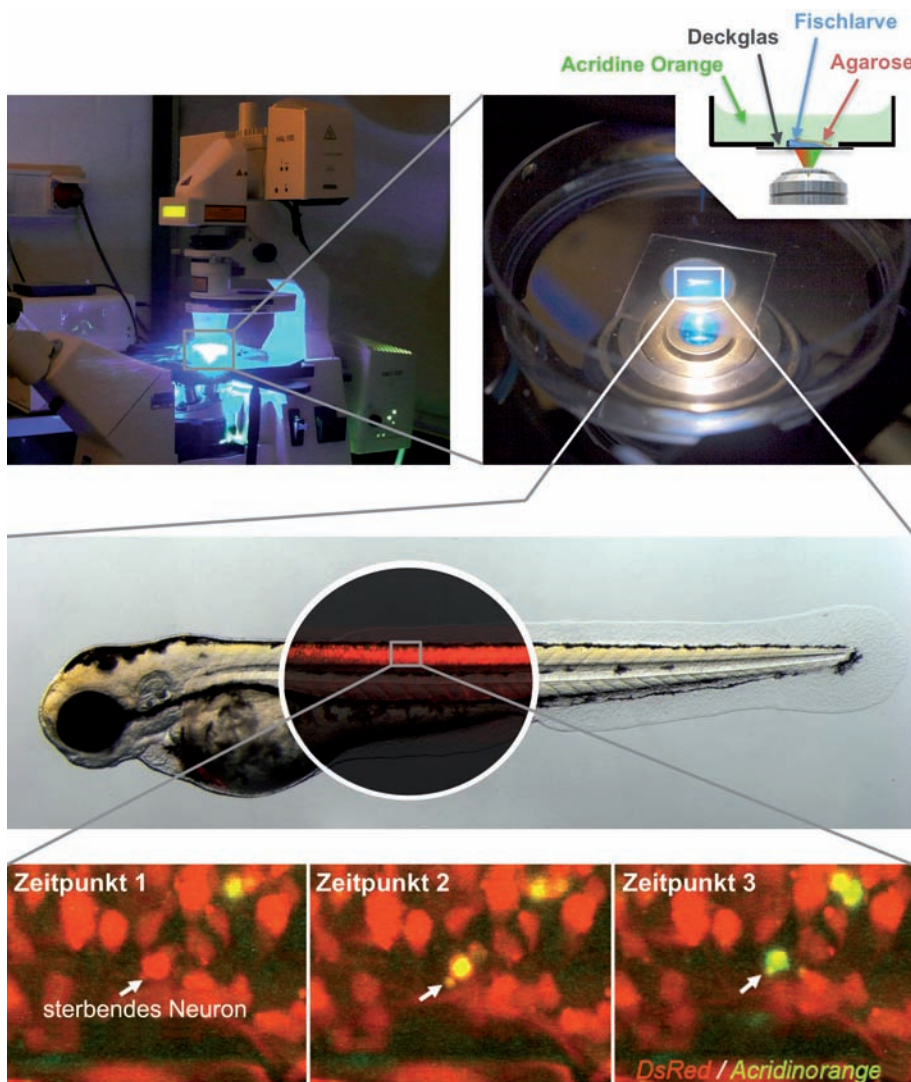
In vivo-Imaging von Neurodegeneration in transgenen Zebrafischen

Durch die schnell auftretende Neurodegeneration konnte in den Fischen das Absterben der Nervenzellen innerhalb eines intakten Nervensystems über einen längeren Zeitraum beobachtet werden. Hierfür wurden Larven mit Acridinorange inkubiert. Dieser Farbstoff färbt spezifisch Nukleinsäuren in absterbenden Zellen an und emittiert nach Anregung bei 488 nm grünes Licht. Das Absterben der Nervenzellen, welche durch die DsRed-

Expression nach Anregung bei 543 nm rot leuchten, konnte daher direkt unter dem Fluoreszenzmikroskop anhand der grün aufleuchtenden Zellkerne beobachtet werden. Die Larven wurden hierfür auf einem Deckglas, welches von unten an eine kleine Petrischale mit einem Loch in der Mitte geklebt wurde, in eine dünne Schicht Agarose eingebettet. Die Petrischale wurde mit Nährmedium mit einer geringen Menge Acridinorange gefüllt (**Abb. 3**, oben). Dann wurde im Rückenmark der Fischlarven über einen Zeitraum von 12 bis 16 Stunden ein rechteckiger Bereich mit einem konfokalen Mikroskop aufgenommen. Die so alle drei Minuten entstandenen Aufnahmen wurden in ein Zeitraffervideo umgerechnet. Absterbende Nervenzellen können dann am Ende dieses Videos anhand der gelbgrünen Fluoreszenz ihres Zellkerns identifiziert und in ihrer Entwicklung zurückverfolgt werden. Das Beispiel in **Abbildung 3** (unten) zeigt eine Nervenzelle, die sich zunächst abrundet und anschließend in mehrere Teile zerfällt, welche Acridinorange aufnehmen. Die Nervenzelle verschwindet schließlich langsam. Die mit diesem Ansatz gewonnenen Erkenntnisse können dazu beitragen, Strategien zu entwickeln, wie man neuronalen Zelltod bei der Alzheimer-Erkrankung und anderen neurodegenerativen Demenzen aufhalten kann.

Fazit und Ausblick

Durch die Untersuchung direkt im Nervensystem eines lebenden, intakten Wirbeltierorganismus kann die Neurodegeneration in bisher nicht erreichter zeitlicher und optischer Auflösung charakterisiert werden. Dies könnte zu einem besseren Verständnis der Prozesse führen, die bei neurodegenerativen Demenzerkrankungen wie Alzheimer zum Absterben der Nervenzellen führen. Außerdem können am Absterben der Nervenzellen beteiligte Prozesse aufgeklärt und Strategien zur Entwicklung spezifischer Wirkstoffe für die Therapie von neurodegenerativen Demenzerkrankungen entwickelt werden. Andere Krankheitsfaktoren, wie die an den pathologischen biochemischen Veränderungen des *TAU*-Proteins beteiligten Enzyme, können nun in den Fischen gezielt ausgeschaltet oder herunterreguliert werden, um ihren Einfluss auf den Zelltod zu bestimmen. Insbesondere eignen sich die transgenen Zebrafischlarven aber auch – als einzige Wirbeltiere – für die Entwicklung von Wirkstoffen in groß angelegten Screens, da die Larven durch ihre geringe Körpergröße beispielsweise in 96 Well-Platten



▲ **Abb. 3:** *In vivo*-Imaging von neuronalem Zelltod in intakten Zebrafischlarven. Die TAU-transgenen Zebrafischlarven werden in Acridinorange inkubiert und über einen Zeitraum von 12 bis 16 Stunden mit einem konfokalen Mikroskop aufgenommen. Aus den entstehenden Bildern wird ein Zeitraffervideo erstellt, mit welchem zum ersten Mal Neurodegeneration direkt in einem Tiermodell dargestellt werden konnte. Absterbende Neuronen (Pfeil, unten) nehmen selektiv Acridinorange auf, wodurch sie grün aufleuchten.

gehalten werden können und zugegebene Substanzen aus dem Wasser aufnehmen [7]. Ein solches Screening könnte interessante Wirkstoffkandidaten liefern, welche die neurotoxischen Effekte des TAU-Proteins unterdrücken und zu einem bei Tauopathien wirk-

samen Medikament weiterentwickelt werden könnten. Wir konnten mit unserem Fischmodell bereits die Wirksamkeit eines neu entwickelten Kinase-Inhibitors bei der Unterdrückung pathologischer Veränderungen von TAU demonstrieren [6]. ■

Literatur

- [1] Goedert M, Spillantini MG (2006) A century of Alzheimer's disease. *Science* 314: 777–781
- [2] Lee VM, Goedert M, Trojanowski JQ (2001) Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci* 24:1121–1159
- [3] Gotz J, Ittner L (2008) Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Nat Rev Neurosci* 9:532–544
- [4] Lieschke GJ, Currie PD (2007) Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet* 8:353–367
- [5] Beis D, Stainier DY (2006) *In vivo* cell biology: following the zebrafish trend. *Trends Cell Biol* 16:105–112
- [6] Paquet D, Bhat R, Sydow A et al. (2009) A zebrafish model of tauopathy allows *in vivo* imaging of neuronal cell death and drug evaluation. *J Clin Invest* 119:1382–1395
- [7] Zon LI, Peterson RT (2005) *In vivo* drug discovery in the zebrafish. *Nat Rev Drug Discov* 4:35–44

Korrespondenzadresse:

Dr. Dominik Paquet
Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen
Adolf-Butenandt-Institut
Ludwig-Maximilians-Universität München
Schillerstraße 44
D-80336 München
Tel.: 089-2180-75-490
Fax.: 089-2180-75-415
dpaquet@med.lmu.de

AUTOREN



Dominik Paquet

Jahrgang 1980. 1999–2004 Biologiestudium an der Universität Tübingen. 2004–2005 Forschungsaufenthalt an der University of Sheffield, UK. 2005–2009 Doktorarbeit an der LMU München, Adolf-Butenandt-Institut bei Prof. Dr. Haass. Seit 2009 Postdoc am Deutschen Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen, Standort München.



Christian Haass

Jahrgang 1960. 1981–1985 Biologiestudium an der Universität Heidelberg, dort 1985–1989 Promotion. 1990–1992 Postdoc an der Harvard Medical School bei Prof. Dr. Selkoe. 1993–1995 Assistant Professor of Neurology, Harvard Medical School. 1995–1999 Professor für Molekulare Biologie am Zentralinstitut für Seelische Gesundheit Mannheim/Universität Heidelberg. Seit 1999 Leiter des Lehrstuhls für Stoffwechselbiochemie an der LMU München. Ab 2009 Leiter des Deutschen Zentrums für neurodegenerative Erkrankungen, Standort München.