

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München



EIN TRANSGENES ZEBRAFISCHMODELL ZUR  
ERFORSCHUNG NEURODEGENERATIVER  
ERKRANKUNGEN AM BEISPIEL DER TAUOPATHIEN

vorgelegt von  
Dominik Paquet  
aus Bonn

2009





### Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn Prof. Dr. Christian Haass betreut und von Frau PD Dr. Konstanze F. Winklhofer vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten.

### Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 30. April 2009

.....

Dominik Paquet

Dissertation eingereicht am 30. April 2009

1. Gutachter: Prof. Dr. Christian Haass

2. Gutachterin: PD Dr. Konstanze F. Winklhofer

Mündliche Prüfung am 9. Juli 2009

Für meine Eltern, Großeltern  
und Daniela



# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>11</b>
<b>Summary.....</b>	<b>13</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>15</b>
1.1 <i>Demenzkrankungen und Tauopathien .....</i>	15
1.2 <i>Die Alzheimer-Demenz.....</i>	17
1.3 <i>Die Frontotemporalen Demenzen.....</i>	22
1.4 <i>Das Tau-Protein.....</i>	24
1.4.1 <i>Molekulare und genetische Grundlagen.....</i>	24
1.4.2 <i>Zelluläre Funktion und Lokalisierung.....</i>	25
1.4.3 <i>Mutationen des Tau-Proteins.....</i>	27
1.4.4 <i>Tau-Phosphorylierung und beteiligte Kinasen und Phosphatasen.....</i>	29
1.4.4.1 <i>GSK3<math>\beta</math> .....</i>	33
1.4.4.2 <i>CDK5 .....</i>	34
1.4.4.3 <i>ERK2.....</i>	35
1.4.4.4 <i>Phosphatasen .....</i>	35
1.4.5 <i>Inhibitoren von Tau-Kinasen .....</i>	36
1.5 <i>Tiermodelle zur Erforschung von Tauopathien.....</i>	38
1.5.1 <i>Transgene Mäuse.....</i>	40
1.5.2 <i>Transgene Invertebraten .....</i>	41
1.5.3 <i>Transgene Zebrafische .....</i>	43
1.6 <i>Zielsetzung der Arbeit.....</i>	48
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>51</b>

---

2.1	Material .....	51
2.1.1	Zebrafischlinien.....	51
2.1.2	Vektoren und Plasmide .....	51
2.1.3	PCR-Primer .....	52
2.1.4	Bakterienstämme .....	52
2.1.5	Antikörper .....	53
2.1.6	Chemikalien.....	54
2.1.6.1	Molekularbiologie.....	54
2.1.6.2	Lösungen und Puffer .....	55
2.1.6.3	Medien.....	57
2.1.6.4	Kinaseinhibitoren .....	57
2.1.7	Kits .....	58
2.1.8	Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	58
2.1.8.1	Allgemein .....	58
2.1.8.2	Mikroskopie und Bildbearbeitung.....	60
2.2	Methoden .....	61
2.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	61
2.2.1.1	Transformation kompetenter Bakterien .....	61
2.2.1.2	Amplifikation und Präparation von DNS-Vektoren .....	61
2.2.1.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	61
2.2.1.4	DNS-Agarosegelelektrophorese .....	62
2.2.1.5	Restriktionsverdau von DNS .....	62
2.2.1.6	Herstellung von Blunt Ends.....	63
2.2.1.7	Dephosphorylierung von DNS-Enden .....	63
2.2.1.8	Ligation von DNS-Fragmenten.....	63
2.2.1.9	Konstruktion von DNS-Oligonukleotiden (Primern).....	64
2.2.1.10	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	64
2.2.1.11	Sequenzierungen.....	66
2.2.1.12	Klonierungen zur Erzeugung transgener Fische .....	66
2.2.1.13	Gateway-Klonierung von DNS-Konstrukten.....	72
2.2.1.14	Konstrukte für andere Krankheitsmodelle .....	75
2.2.1.15	mRNS-Synthese.....	76
2.2.2	Haltung der Fische und Behandlung der Embryonen .....	77

2.2.3	Mikroinjektion von Zebrafischeiern.....	78
2.2.4	Inhibitorbehandlungen .....	78
2.2.5	Analyse von Verhaltensphänotypen.....	79
2.2.6	Immunfärbungen an Fischembryonen und -larven .....	79
2.2.7	Zelltodfärbung .....	80
2.2.8	Mikroskopie und Bilderstellung.....	80
2.2.9	Proteinbiochemie.....	82
2.2.9.1	Lyse von Embryonen für Proteinbiochemie.....	82
2.2.9.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	82
2.2.9.3	Proteintransfer auf PVDF-Membran (Western Blot).....	83
2.2.9.4	Detektion und Quantifizierung der Proteinbanden.....	83
2.2.10	Statistik .....	84
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>85</b>
3.1	<i>Gal4/UAS-basierte Vektoren ermöglichen eine hohe Proteinexpression und effiziente Identifizierung transgener Zebrafische .....</i>	<i>85</i>
3.2	<i>Gateway-Klonieren ermöglicht den effizienten Einbau neuer Gene und Promotoren in das Vektorsystem.....</i>	<i>88</i>
3.3	<i>Driver- und Responder-Konstrukte werden stabil und unabhängig voneinander vererbt.....</i>	<i>90</i>
3.4	<i>Tau-transgene Fische entwickeln nach wenigen Stunden pathologische Veränderungen .....</i>	<i>94</i>
3.5	<i>Schnelles Fortschreiten der AD-/FTD-typischen AT8-Phosphorylierung.....</i>	<i>98</i>
3.6	<i>Expression von humanem Tau verursacht eine Veränderung der Motoneuron-Morphologie und des Verhaltens .....</i>	<i>99</i>
3.7	<i>Expression von humanem Tau führt zur Degeneration von Neuronen.....</i>	<i>104</i>
3.8	<i>Die Tau-Kinase GSK3<math>\beta</math> ist im Zebrafisch hochkonserviert.....</i>	<i>105</i>
3.9	<i>Verschiedene GSK3-Inhibitoren zeigen in Zebrafischen unterschiedliche in-vivo-Aktivitäten .....</i>	<i>109</i>

3.10 GSK3-Inhibitoren verringern die pathologische Tau-Phosphorylierung in transgenen Zebrafischen .....	113
3.11 Die Inhibition der GSK3-Aktivität führt nicht zu einer Rettung anderer Tau-induzierter Phänotypen .....	116
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>119</b>
4.1 Herstellung transgener Fische über ein neuentwickeltes Vektorsystem.....	120
4.2 Transgene Zebrafische als Krankheitsmodelle für die in-vivo-Erforschung von Tauopathien.....	126
4.3 Tau-transgene Zebrafische für die Wirkstoffentwicklung zur Therapie von Tauopathien.....	133
4.4 Ausblick.....	139
4.4.1 Detaillierte Charakterisierung der Tanglebildung .....	139
4.4.2 Charakterisierung der Einflüsse des Tau-Proteins auf den axonalen Transport in vivo .....	140
4.4.3 Wechselwirkungen von Tau mit anderen bei neurodegenerativen Krankheiten aggregierenden Proteinen.....	142
4.4.4 Der Einfluss von weiteren Kinasen und ihrer Inhibition auf die Pathogenese von Tauopathien .....	142
4.4.5 Herstellung weiterer Zebrafisch-Krankheitsmodelle mit Gal4/UAS-basierten Vektoren .....	143
4.4.5.1 Vierfach-transgene Alzheimer-Modelle .....	143
4.4.5.2 Modelle zur Erforschung der Parkinson-Erkrankung .....	144
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>149</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>165</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>166</b>
<b>Publikationen .....</b>	<b>167</b>

## Abbildungsverzeichnis

Titelbild oben:	7 Tage alte Zebrafischlarve, gefärbt mit Antikörpern gegen acetyliertes Tubulin (grün), Gesamt-Tau (rot) und AT8-phosphoryliertes Tau (blau)	
Titelbild unten:	30 Stunden alte Zebrafischlarve, gefärbt mit Antikörpern gegen acetyliertes Tubulin (grün), Tau (rot) und Synaptotagmin (blau)	
Abbildung 1:	Dokumentation der neurofibrillären Bündel durch Alois Alzheimer .....	18
Abbildung 2:	Neuropathologische Veränderungen bei der Alzheimer-Erkrankung .....	19
Abbildung 3:	Prozessierung von APP zu A $\beta$ .....	21
Abbildung 4:	Neuropathologische Einordnung Frontotemporaler Demenzen .....	23
Abbildung 5:	Alternatives Spleißen der 14 Exone des <i>MAPT</i> Gens führt zur Bildung von 6 Tau-Isoformen .....	25
Abbildung 6:	Pathologische Veränderung des Zytoskeletts bei Demenzerkrankungen.....	26
Abbildung 7:	Tau-Mutationen .....	28
Abbildung 8:	Phosphorylierung und Aggregation des Tau-Proteins .....	30
Abbildung 9:	Tau-Kinasen, Phosphorylierungsstellen und Phospho-spezifische Antikörper .....	31
Abbildung 10:	Strukturmodelle der Tau-Kinasen CDK5-p25, GSK3 $\beta$ und ERK2.....	32
Abbildung 11:	Spezifische GSK3-Inhibitoren.....	37
Abbildung 12:	Entwicklung und Anwendung transgener Tiermodelle .....	39
Abbildung 13:	Zebrafische als Krankheitsmodelle und zur Entwicklung von Wirkstoffen.....	45



Abbildung 14:	Klonierung des <i>Driver</i> -Konstrukts .....	69
Abbildung 15:	Klonierung der <i>Responder</i> -Konstrukte .....	71
Abbildung 16:	Prinzip der <i>Gateway</i> -Klonierungen .....	73
Abbildung 17:	Klonierung der <i>Gateway</i> -Konstrukte.....	74
Abbildung 18:	Das Gal4/UAS-Expressionssystem zur Herstellung Tau-transgener Fische.....	87
Abbildung 19:	Expression krankheits-assoziiertes Proteins mit dem Gateway-Gal4/UAS-Vektorsystem .....	90
Abbildung 20:	Stabile und unabhängige Vererbung der Transgene .....	92
Abbildung 21:	Pathologische Veränderungen des Tau-Proteins in 32 Stunden bzw. 5 Wochen alten Tau-transgenen Fischen .....	97
Abbildung 22:	Schnelles Fortschreiten der in AD / FTD spät auftretenden AT8-Phosphorylierung .....	100
Abbildung 23:	Die Expression von Tau verursacht eine Veränderung der Motoneuron-Morphologie und des Verhaltens.....	102
Abbildung 24:	<i>In vivo</i> Beobachtung von durch Tau-Expression ausgelöstem neuronalem Zelltod .....	107
Abbildung 25:	Konservierung der Tau-Kinase GSK3 $\beta$ im Zebrafisch .....	108
Abbildung 26:	Chemische und genetische Inhibition der GSK3 $\beta$ -Aktivität im Zebrafisch .....	110
Abbildung 27:	GSK-3-Inhibitoren reduzieren die pathologische Tau-Phosphorylierung in transgenen Zebrafischen.....	115
Abbildung 28:	Die Behandlung mit GSK3-Inhibitoren führt zu einer weiteren Verkürzung der Motoneurone.....	117
Abbildung 29:	Markierung von Mitochondrien in Tau-transgenen Fischen zur Messung des axonalen Transports .....	141
Abbildung 30:	Herstellung vierfach-transgener Zebrafische .....	145
Abbildung 31:	Alpha-Synuclein-transgene Fische als Parkinson-Modelle.....	147

## Zusammenfassung

Demenzen vom neurodegenerativen Typ gehören zu den häufigsten neurologischen Erkrankungen, weltweit sind über 25 Mio. Menschen betroffen, davon eine Million in Deutschland. Die Erkrankungen sind bis heute nicht heilbar. Da hohes Alter der Hauptrisikofaktor für ihre Entstehung ist, werden sich die Fallzahlen aufgrund der weltweit weiter steigenden Lebenserwartung bis zum Jahr 2050 voraussichtlich verdoppeln. Die Neuropathologie der häufigsten Demenz, der Alzheimer-Erkrankung, ist vor allem durch das Auftreten fibrillärer Bündel (*Tangles*) in Nervenzellen des Gehirns, sowie extrazellulärer Plaques bestehend aus dem Amyloid- $\beta$ -Peptid gekennzeichnet. Die *Tangles* bestehen aus Filamenten einer fehlgefalteten und posttranslational veränderten Form des Tau-Proteins. *Tangles* sind auch das wesentliche pathologische Merkmal weiterer Demenzerkrankungen, wie z.B. vieler frontotemporaler Demenzen. Demenzerkrankungen mit Tau-Pathologie werden daher auch als Tauopathien bezeichnet. Die heutigen Demenz-Forschung beschäftigt sich schwerpunktmäßig damit, welche degenerativen Prozesse in Nervenzellen im Frühstadium der Erkrankung stattfinden, warum die Zellen absterben, und wie man diesen schädlichen Prozess aufhalten kann. Um diese Fragen beantworten zu können, benötigt man Versuchstiere. Hierbei verwendet man transgene Tiere, in die ein mutiertes menschliches Gen eingeführt wurde, welches beim Menschen zum beschleunigten Ausbruch einer Demenz-Erkrankung führt. Aufgrund der relativ spät auftretenden Symptome in den vorhandenen transgenen Mausmodellen, und ihrer begrenzten Anwendbarkeit für Beobachtungen degenerativer Prozesse am lebenden Objekt und die Entwicklung neuer Medikamente besteht ein großer Bedarf an alternativen Tiermodellen. In der vorliegenden Arbeit wurden transgene Zebrafische zur Erforschung von Tauopathien entwickelt, welche eine mutierte Form des humanen Tau-Proteins in ihren Nervenzellen produzieren und wesentliche Krankheitssymptome zeigen. Zebrafische eignen

sich aufgrund ihres durchsichtigen Körpers hervorragend für Beobachtungen am lebenden Tier, außerdem erlaubt die geringe Größe der Larven großangelegte Medikamententests. In den Tau-transgenen Zebrafischen waren die ersten pathologischen Veränderungen bereits nach wenigen Stunden sichtbar: das menschliche Tau-Protein veränderte seine Struktur und biochemische Komposition und verlagerte sich außerdem von den Zellfortsätzen in den Zellkörper. Kurz darauf traten die ersten degenerativen Prozesse auf, bei denen im zentralen Nervensystem der Fische Nervenzellen abstarben. Diese für Tauopathien typische Neurodegeneration konnte *in vivo* über mehrere Stunden unter dem Mikroskop dargestellt werden. Außerdem bildeten die Tiere nach einigen Wochen *Tangles*. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Tau-transgenen Fische wesentliche Aspekte von Tauopathien nachbilden und daher gut als Forschungsobjekt geeignet sind. Durch die schnell auftretenden Phänotypen konnte mit diesen Fischen zudem untersucht werden, ob chemische Substanzen die Symptome lindern können. Ein von der Pharmaindustrie neuentwickelter Inhibitor der Tau-Kinase GSK3 reduzierte bei diesem Test die pathologische Veränderung des Tau-Proteins in den Fischen um drei Viertel, und war damit mehr als doppelt so wirksam wie bisher bekannte Inhibitoren. Interessanterweise war ein anderer, chemisch sehr ähnlicher und in Zellkultur ebenso potenter Inhibitor in diesem *in-vivo*-Test - vermutlich durch zu geringe Aufnahme oder Abbau im Nervensystem der Zebrafische - vollständig inaktiv. Dieses Beispiel zeigt eindrucksvoll die Notwendigkeit von Medikamententests an lebenden Modelltieren und die Eignung der vorgestellten Zebrafischmodelle für diese Tests.

Die Experimente veranschaulichen, dass das neuentwickelte Zebrafischmodell zur Erforschung der Prozesse, die zum Absterben der Nervenzellen führen, sowie bei der Suche nach Wirkstoffen für die Therapie von neurodegenerativen Demenzerkrankungen genutzt werden kann. Da es sich um die ersten weltweit verfügbaren transgenen Zebrafische mit Demenztypischer Tau-Pathologie handelt, stellt die Arbeit einen wichtigen Beitrag zur aktuellen Demenzforschung und Entwicklung neuer Therapieansätze dar.

## Summary

Neurodegenerative dementias belong to the most common forms of neurological diseases, more than 25 million people are affected worldwide, among them 1 million in Germany. Currently, no mechanism-based treatments are available. Since age is the major risk factor for these dementias, the number of patients will double until 2050, due to the increasing life expectancies of people around the world. The neuropathology of Alzheimer's disease, the most common form of dementia, is mainly characterized by the appearance of neurofibrillary tangles in neurons of the brain, as well as extracellular deposits of the A $\beta$  peptide, called plaques. Tangles consist of filaments of a misfolded and posttranslationally modified form of the Tau-protein. Tangles are also a hallmark of other dementias, such as certain frontotemporal dementias. Dementias with Tau-pathology are therefore also termed Tauopathies. Current dementia research focuses on the questions, which degenerative processes take place early in the diseased neurons, why the cells die, and how this process could be halted. Animal models are essential tools to study these aspects of neurodegenerative diseases. Researchers mainly use transgenic animals, in which a mutated human gene that accelerates the disease in humans was introduced. Due to the relatively late onset of symptoms in existing transgenic mouse models and the fact that it is not well feasible to use these animals for *in vivo* imaging of disease progression or large scale drug development, there is an unmet need for alternative animal models. Therefore, during the course of this project transgenic zebrafish were developed as a model of Tauopathies, which express a mutant form of the human Tau-protein and rapidly recapitulate major disease symptoms. Zebrafish are well suited for *in vivo* imaging due to the translucent body of the larvae. In addition, the small body size of the larvae allows performing large-scale drug development and *in-vivo*-validation approaches. In the Tau-transgenic zebrafish, the first pathologic alterations were visible after

only a few hours: the human Tau-protein altered its folding and biochemical composition and was relocalized from neuronal projections to the cell body. Thereafter, first degenerative processes could be monitored, during which neurons died in the central nervous system of the transgenic fish. This neurodegeneration, which is typically associated with Tauopathies, could be monitored *in vivo* under the microscope for several hours. In addition, the transgenic animals formed neurofibrillary tangles after some weeks, another pathological hallmark of several dementias including Alzheimer's disease. The results indicate that the Tau-transgenic animals recapitulate the most relevant symptoms of Tau-associated human dementias and therefore, the animals are well suited for Tauopathy research. Due to the rapidly occurring disease symptoms, the fish could also be used to test chemical compounds for their ability to modify disease symptoms. In this test, an inhibitor of the Tau-Kinase GSK3, which was newly developed by a pharmaceutical company, was able to highly reduce the pathologic alterations of the Tau protein. This inhibitor was more than twice as potent as previously published inhibitors. Interestingly, another chemically similar and in cell culture equally potent inhibitor was completely inactive in this *in-vivo*-test, presumably due to low uptake of the compound into the nervous system or rapid breakdown. This example shows the necessity for drug tests in living animals and the suitability of the fish system to rapidly perform these tests.

The experiments illustrate the usefulness of the new Tau-transgenic zebrafish to study early degenerative processes leading to neuronal death in dementias and also their abilities to identify new drug targets. As this is the first zebrafish model of Tau-associated dementias with disease symptoms worldwide, this work is an important contribution to current dementia research and drug identification approaches.



# 1 Einleitung

## 1.1 Demenzerkrankungen und Tauopathien

Eine Demenz, lateinisch "fehlender Geist", ist eine fortschreitende Erkrankung des Gehirns, bei der wichtige Aufgaben wie Erinnerung, räumliche Orientierung und auch Sprache zunehmend schlechter funktionieren. Die geistigen Fähigkeiten sind zunächst beeinträchtigt, bis sie im Endstadium der Erkrankung gänzlich verloren gehen. Demenzerkrankungen gehören zu den häufigsten neurologischen Störungen älterer Patienten. Während Demenzerkrankungen in weniger als einem Prozent der unter 60 Jahre alten Personen auftreten, nimmt ihre Häufigkeit in älteren Menschen mit zunehmendem Alter exponentiell zu. Insgesamt ist etwa ein Zehntel aller Personen über 65 betroffen, in der Altersgruppe über 95 Jahre sogar etwa die Hälfte (Hendrie, 1998; Bornebroek and Breteler, 2004). Insgesamt sind heute mehr als 24 Mio. Menschen weltweit an Demenz erkrankt, davon 1 Mio. in Deutschland; jedes Jahr kommen weltweit fast 5 Mio. neue Fälle hinzu. Der demographische Verlauf in alternden Industriegesellschaften, insbesondere aber die steigende Lebenserwartung in den Entwicklungs- und Schwellenländern bewirken, dass sich die Fallzahlen alle 20 Jahre verdoppeln werden. Im Jahr 2040 rechnet man weltweit mit mehr als 80 Mio. Erkrankten, davon etwa 2 Mio. in Deutschland (Bickel, 2001; Ferri et al., 2005). Sollte es nicht gelingen, diesem dramatischen Anstieg der Krankheitsfälle entgegen zu wirken, wird der Pflegebedarf dieser Patienten nicht nur zu unabsehbaren finanziellen Belastungen unserer Gesundheitssysteme führen, sondern auch weitere große ökonomische und gesellschaftliche Probleme verursachen (Meek et al., 1998; Brookmeyer et al., 2007).

Es werden mehrere Arten von Demenzerkrankungen unterschieden, wobei drei verschiedene Typen vorherrschen: Etwa 60-70 % aller Betroffenen leiden an der Alzheimer-Demenz (AD). Weitere 10-15 % wurden mit

Frontotemporaler Demenz (FTD) diagnostiziert. Bei ca. 10 % der Kranken sind Durchblutungsstörungen die Ursache fortschreitender geistiger Beeinträchtigungen (vaskuläre Demenz, VaD), teilweise liegt auch eine Kombination aus AD und VaD vor. Die übrigen Demenzerkrankungen (ca. 5 bis 10 %) setzen sich aus vielen zum Teil seltenen Erkrankungsformen zusammen (Jorm, 1991; Hendrie, 1998; Bickel, 2001).

Neurodegenerative Demenzerkrankungen wie AD und FTD sind durch ein Absterben von Nervenzellen in bestimmten Gehirnregionen gekennzeichnet. Ein typisches pathologisches Kennzeichen neurodegenerativer Demenzen ist die Bildung abnormal gefalteter Proteine und ihre Ablagerung in unlöslichen Aggregaten. Obwohl die aggregierenden Proteine bei den einzelnen Krankheiten verschieden sein können, lagern sie sich die unterschiedlichen Protein in ähnlicher Weise aneinander und die daraus entstehenden Oligomere und Aggregate weisen oftmals gemeinsame strukturelle Eigenschaften auf (Aguzzi and Haass, 2003; Winklhofer et al., 2008). Es wird derzeit intensiv diskutiert, welche Aggregationsformen der sich ablagernden Proteine die für Nervenzellen toxischen Eigenschaften besitzen. Hierbei rücken immer mehr Oligomere in den Fokus, die nur aus wenigen aneinander gelagerten Proteinmolekülen bestehen. Diese kleinen, löslichen Oligomere könnten direkt die Zellen schädigen, während die größeren Ablagerungen als Reservoir für die Oligomere dienen oder ein Versuch der Zelle sind, die toxischen Spezies durch Ablagerung aus dem Stoffwechsel zu entfernen (Haass and Selkoe, 2007). Eines der Proteine, welches in einer Vielzahl von Demenz- und Lähmungserkrankungen aggregiert, ist das Tau-Protein. Alle Krankheiten mit Tau-Pathologie werden in der Gruppe der Tauopathien zusammengefasst (Tabelle 1) (Lee et al., 2001).

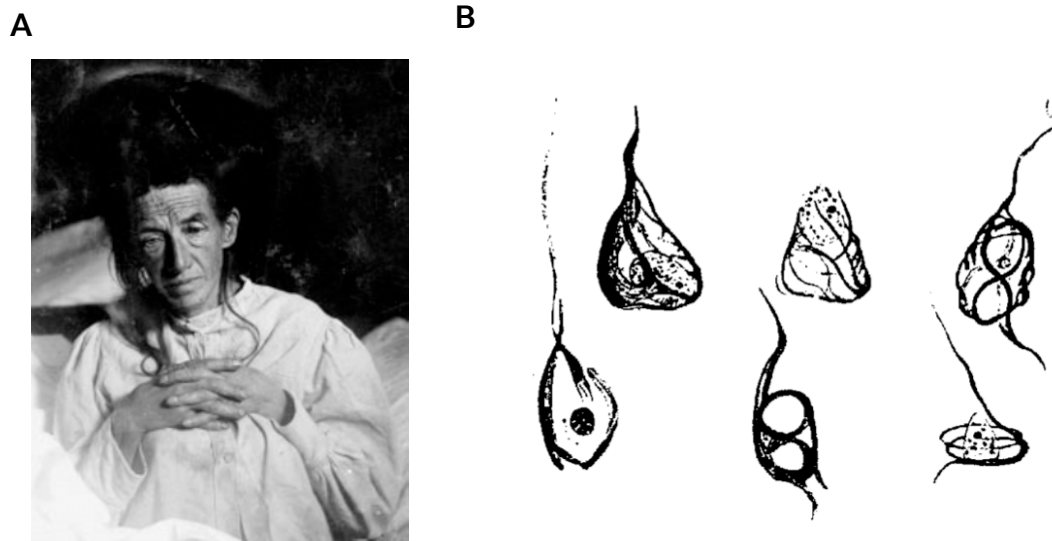
**Tabelle 1: Krankheiten mit neuronaler Tau-Pathologie** (nach Lee et al., 2001)

Alzheimer-Demenz  
Amyotrophe Lateralsklerose  
Silberkornkrankheit  
Kortikobasale Degeneration  
Creutzfeldt-Jakob Erkrankung  
Dementia pugilistica  
Diffuse Neurofibrilläre Bündel mit Kalkablagerungen  
Down-Syndrom  
Frontotemporale Demenz mit Parkinsonismus (FTDP-17)  
Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndrom  
Neurodegeneration mit Eisenablagerung im Gehirn (Hallervorden-Spatz-Syndrom)  
Myotone Dystrophie  
Niemann-Pick Krankheit, Typ C  
Nicht-guamanische Motoneuronerkrankung mit neurofibrillären Bündeln  
Morbus Pick  
Postenzephalitischer Parkinsonismus  
Zerebrale amyloide Angiopathie des Prionproteintyps  
Progressive subkortikale Gliose  
Progressive supranukleäre Parese  
Subakute sklerosierende Panenzephalitis  
Nur-Tangle Demenz

Die häufigsten Tauopatienten sind die Alzheimer-Erkrankung und einige Formen der Frontotemporalen Demenz. Somit spielt das Tau-Protein heute eine wichtige Rolle in der Pathogenese von über 15 Mio. Demenzpatienten weltweit.

## **1.2 Die Alzheimer-Demenz**

Die Alzheimer-Erkrankung wurde zuerst 1901 vom deutschen Arzt Alois Alzheimer bei seiner Patientin Auguste Deter beschrieben (Abbildung 1A) (Alzheimer, 1907). Alzheimer beobachtete im Gehirn seiner Patienten die Bildung von senilen Plaques und gebündelten fibrillären Ablagerungen. Während Plaques bereits früher beobachtet worden waren, beschrieb Alzheimer als erster die neurofibrillären Bündel (Abbildung 1B) (Goedert and Spillantini, 2006). Plaques und neurofibrilläre Bündel sind im menschlichen Gehirn vorwiegend in zerebralem Kortex, Hippocampus und Limbischem System nachweisbar.

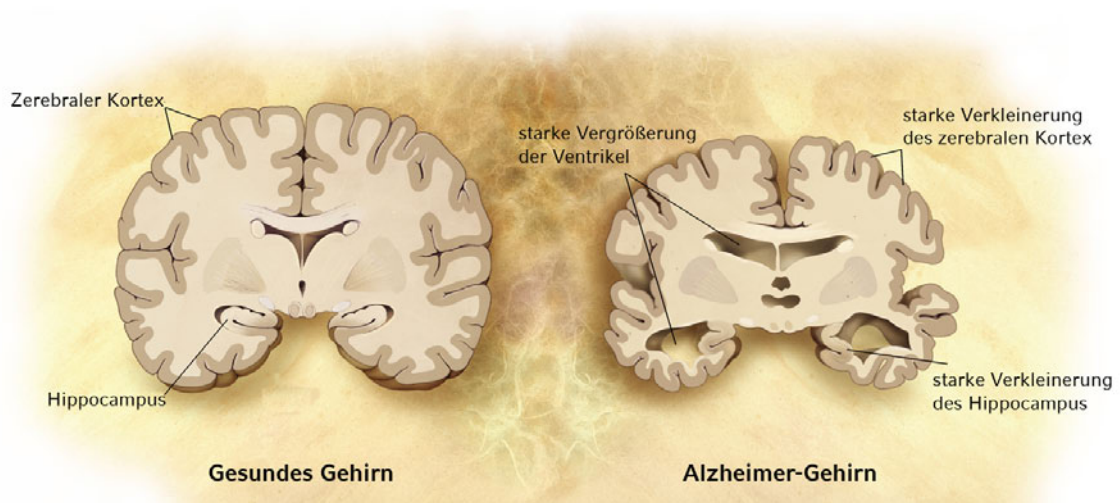


**Abbildung 1: Dokumentation der neurofibrillären Bündel durch Alois Alzheimer**

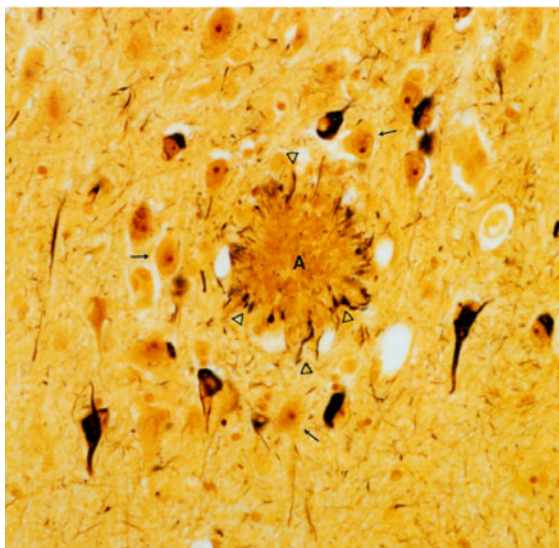
(A) Fotografie der ersten Alzheimerpatientin, Auguste Deter (B) Neurofibrilläre Bündel, erstmals gezeichnet und beschrieben von Alois Alzheimer nach lichtmikroskopischer Untersuchung (Maurer et al., 1997; Goedert and Spillantini, 2006).

In diesen Bereichen, deren strukturelle Integrität Voraussetzung für die Aufrechterhaltung der emotionalen Stabilität, Lernfähigkeit und Erinnerung ist, sterben auch die meisten Nervenzellen ab. Der Verlust der Neuronen ist ein wesentlicher Grund für den dramatischen Verlust an Gehirnmasse, dieser kann bei Patienten im Endstadium der Erkrankung bis zu 60 % betragen (Abbildung 2A). Außerdem wird der Botenstoff Acetylcholin nicht mehr in ausreichenden Mengen produziert, was zu einer allgemeinen Leistungsschwächung des Gehirns führt. Die beiden charakteristischen neuropathologischen Merkmale der Alzheimer Krankheit, Amyloid-Ablagerungen und neurofibrilläre Bündel, werden von Pathologen auch heute noch zur post-mortem Diagnose der Krankheit herangezogen (Abbildung 2B) (Selkoe, 1991, 2001; Hardy, 2006). Interessanterweise lässt die Anzahl der vorhandenen Plaques kaum Rückschlüsse auf die Schwere der bereits entwickelten Demenz zu, während die Tau-Pathologie eng mit dem Fortschreiten der Krankheit korreliert (Braak et al., 1996).

A



B



**Abbildung 2: Neuropathologische Veränderungen bei der Alzheimer-Erkrankung**

(A) Makroskopische Veränderungen der Gehirnstruktur eines AD-Patienten. Der Verlust an Neuronen führt zu einer starken Schrumpfung des zerebralen Kortex und des Hippocampus (modifiziert nach <http://www.nia.nih.gov/Alzheimers/Resources/HighRes.htm>)

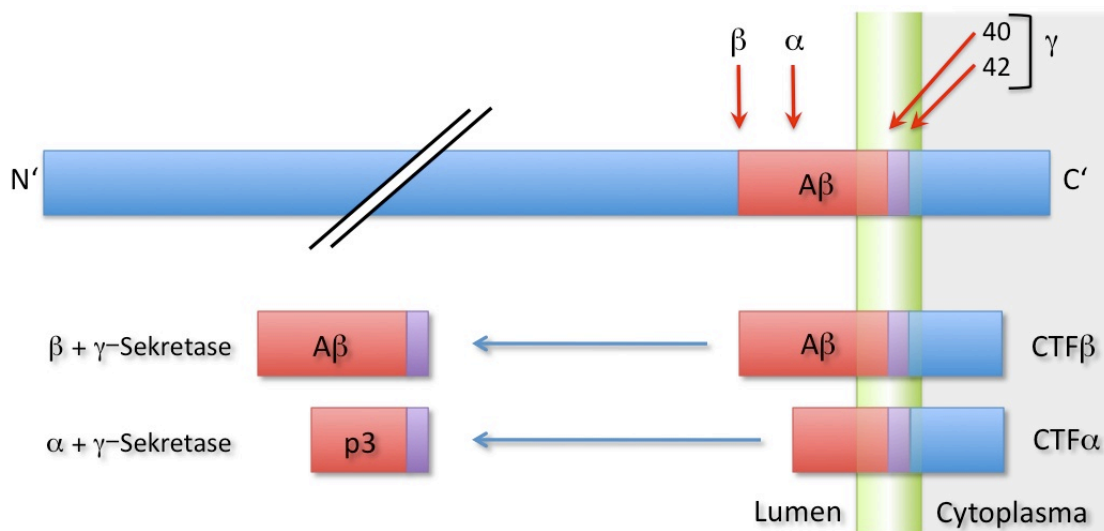
(B) Mikroskopische Aufnahme eines Gehirnschnitts eines AD-Patienten. Die schwarz gefärbten neurofibrillären Bündel füllen fast das gesamte Zellplasma der Pyramidalneurone aus. Der kompakte, braun angefärbte Plaques in der Mitte der Abbildung enthält in seinem Zentrum abgelagertes Amyloid. Um dieses herum befinden sich dunkel gefärbte dystrophe Neuriten (Selkoe, 1991).

Die intensive Erforschung der molekularen Grundlagen der Alzheimer-Erkrankung in den vergangenen 20 Jahren resultierte im heutigen guten Verständnis der biochemischen Vorgänge, welche zur Bildung von Plaques und neurofibrillären Bündeln führen.



Die extrazellulären Proteinablagerungen der Plaques bestehen zum Großteil aus dem Amyloid- $\beta$ -Peptid (A $\beta$ ) (Glennner and Wong, 1984). A $\beta$  wird aus einem Vorläuferprotein, dem *Amyloid-Precursor-Protein* (APP), herausgeschnitten. Interessanterweise ist die Prozessierung von APP zu A $\beta$  nicht auf Demenzpatienten beschränkt, sie findet ständig auch in gesunden Zellen statt (Golde et al., 1992; Haass et al., 1992; Busciglio et al., 1993). APP ist ein integrales Typ I-Transmembranprotein, da sein großer amino-terminaler Anteil ins extrazelluläre Medium ragt, während seine kurze carboxy-terminale Seite innerhalb der Zelle zu finden ist. APP wird von proteinspaltenden Enzymen, den Sekretasen, an und in der Membran gespalten, wodurch verschiedene Spaltprodukte entstehen. Grundsätzlich gibt es zwei Wege, wie APP gespalten werden kann, die von der Kombination der beteiligten Sekretasen bestimmt wird. Im nicht-amyloidogenen Weg wird APP zunächst durch eine  $\alpha$ -Sekretase geschnitten. Dieser Schnitt findet innerhalb der A $\beta$ -Domäne von APP statt, was die Bildung von A $\beta$  verhindert. Der zweite Schnitt durch die  $\gamma$ -Sekretase innerhalb der Transmembrandomäne führt zur Freisetzung des p3-Fragments. Im amyloidogenen Weg wird APP zunächst von der  $\beta$ -Sekretase und nachfolgend von der  $\gamma$ -Sekretase geschnitten. Dieser Schnitt führt zur Freisetzung von A $\beta$ . Hierbei können durch Variation der exakten Schnittstelle 40 oder 42 Aminosäuren lange A $\beta$ -Peptide entstehen (Abbildung 3) (Steiner and Haass, 2000; Walter et al., 2001). Die  $\gamma$ -Sekretase besteht aus den katalytischen Untereinheiten Presenilin 1 oder 2 (PS1, PS2) und den weiteren Einheiten Nicastrin, Pen-2 und Aph-1 (Edbauer et al., 2003), die eine Rolle bei der Substraterkennung oder Enzymregulation spielen könnten (Steiner et al., 2008). Die Schlüsselrolle der Amyloid-Ablagerungen für die Entstehung der Alzheimer Krankheit wurde durch die Entdeckung von autosomal-dominanten Mutationen in APP und einigen an seiner Prozessierung beteiligten Genen untermauert. Die pathogenen Mutationen im APP-Gen oder den Presenilingenen PS1 und PS2 führen entweder zu einer verstärkten Bildung des A $\beta$ -Peptids, wie z.B. die APP<sup>swe</sup>-Mutation (Citron et al., 1992; Haass et al., 1995), oder zu einer spezifischen Erhöhung der längeren, besonders

amyloidogenen A $\beta$ 42-Spezies, wie z.B. die London-Mutationen von APP (Goate et al., 1991) oder die PS1-L166P-Mutation (Moehlmann et al., 2002). Diese Veränderungen führt bei den Trägern einer dieser Mutationen zum frühen Ausbruch der familiären Form der Alzheimer-Demenz (FAD) (Steiner and Haass, 2000; Selkoe, 2001; Haass and Steiner, 2002). Die Pathologie der sehr seltenen, sehr früh auftretenden FAD unterscheidet sich dabei nicht von der deutlich häufigeren, aber spät auftretenden spontanen Form (Selkoe, 1999). Tiermodelle für die Alzheimer-Krankheit belegen ebenfalls die Bedeutung des amyloidogenen Weges der APP-Spaltung. Die Überexpression von APP<sub>sw</sub> führte in Mäusen zu Verhaltensauffälligkeiten, Erinnerungsproblemen und zur Bildung einer Plauepathologie (Games et al., 1995; Borchelt et al., 1996; Hsiao et al., 1996). Dieser Phänotyp konnte durch die Einführung mutierter Presenilingene weiter verstärkt werden (Duff et al., 1996; Sturchler-Pierrat et al., 1997). Zwar führte die Einführung dieser mutierten Gene in Mäusen zur Plauebildung, das Auftreten von neurofibrillären Bündeln oder ausgeprägter Neurodegeneration konnte jedoch nicht erreicht werden.



**Abbildung 3: Prozessierung von APP zu A $\beta$**

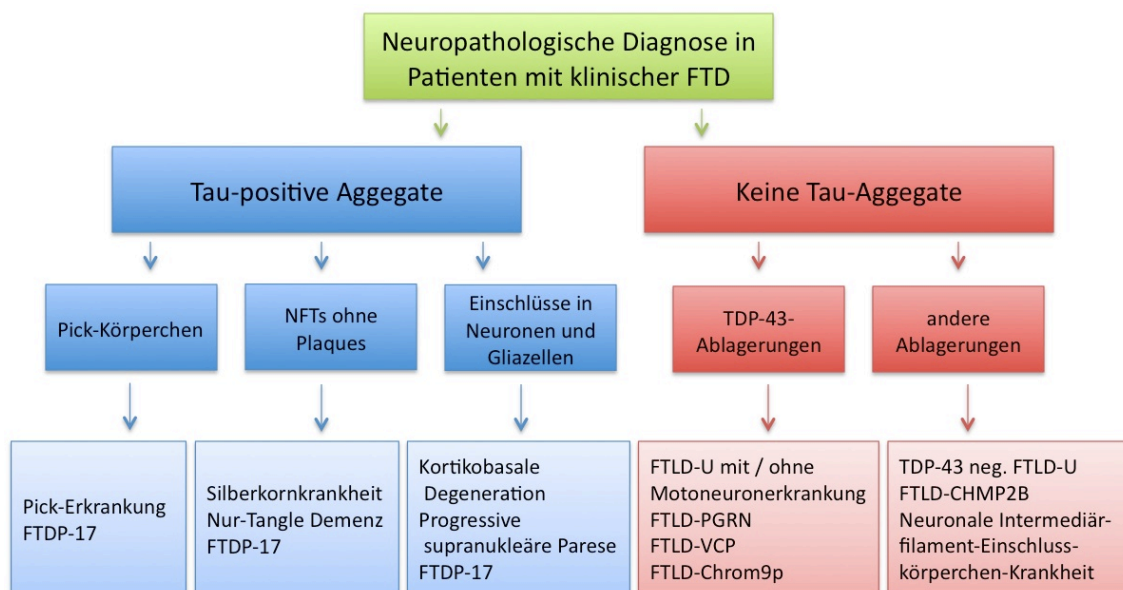
APP wird zunächst von der  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Sekretase an der Außenseite der Zelle geschnitten. Nur der  $\beta$ -Schnitt führt zur Bildung des C-terminalen Fragments  $\beta$  (CTF $\beta$ ), welches von der  $\gamma$ -Sekretase weiter zu A $\beta$  prozessiert wird. Das Spaltprodukt der  $\alpha$ -Sekretase CTF $\alpha$  wird von der  $\gamma$ -Sekretase zum nicht amyloidogenen p3-Peptid prozessiert (nach Steiner and Haass, 2000).

Die Experimente mit transgenen Tiermodellen zeigen die zentrale Rolle von A $\beta$  und den Plaques bei der Ausprägung der Alzheimer-Erkrankung, verdeutlichen aber auch, dass noch weitere wichtige Faktoren an der Pathogenese beteiligt sein müssen. Das zweite neuropathologische Merkmal der AD, die intrazellulär gelegenen neurofibrillären Bündel bestehen aus aggregiertem Tau-Protein. Sie werden von Pathologen gemeinsam mit den Plaques zur Identifizierung der AD und zur Bestimmung des Krankheitsstadiums herangezogen (Braak and Braak, 1991; Braak et al., 1996). In Experimenten mit transgenen Mäusen wurde nachgewiesen, dass für die Entstehung der AD-Pathologie nicht nur A $\beta$  sondern auch Tau wichtig ist: Die Expression von A $\beta$  in Tau-transgenen Mäusen führte zu einer deutlichen Verstärkung der Tau-Pathologie (Gotz et al., 2001; Lewis et al., 2001). Einige Jahre später reduzierte eine Gruppe die Tau-Expression in APP-transgenen Mäusen und konnte nachweisen, dass sich das Verhalten und Erinnerungsvermögen der Mäuse deutlich verbesserte (Roberson et al., 2007). Das Tau-Protein spielt demnach eine zentrale Rolle bei der Alzheimer-Demenz, die es allerdings nur gemeinsam mit A $\beta$  einnehmen kann. So basieren alle bekannten Fälle der vererbten AD auf Mutation im APP-Gen oder den katalytischen Untereinheiten der an seiner Prozessierung beteiligten  $\gamma$ -Sekretase. Es gibt keine Tau-Mutationen, welche die Entstehung von Alzheimer begünstigen. Vor einiger Zeit wurden aber Tau-Mutationen, wie z.B. die Mutation von Prolin 301 zu Leucin (P301L), in Patienten mit einer neurodegenerativen Erkrankung gefunden, die eine Alzheimer-ähnliche Tau-Pathologie, allerdings keine Plaques, aufwies. Diese Erkrankung wurde daher unter dem Namen FTDP-17 (Frontotemporale Demenz mit Parkinsonismus assoziiert mit Chromosom 17) in die Gruppe der Frontotemporalen Demenzen eingeordnet (Hutton et al., 1998).

### **1.3 Die Frontotemporalen Demenzen**

Die Gruppe der Frontotemporalen Demenzen (FTD) umfasst eine Vielzahl heterogener neurodegenerativer Erkrankungen, die durch eine Atrophie des

Frontallappens und weiterer anterior-temporalen Regionen des Großhirns gekennzeichnet sind. Patienten mit FTD weisen Verhaltensauffälligkeiten und Sprachstörungen auf. Die Pathologie der verschiedenen Formen der FTD ist sehr heterogen, aber meist gekennzeichnet durch Gliose, Verlust von Neuronen, spongiforme Degeneration an der Oberfläche des frontalen und/oder temporalen Kortex und das Auftreten Ballon-förmiger Neurone, sogenannter Pick-Zellen. Früher wurden diese Krankheiten auch als Morbus Pick bezeichnet, benannt nach Arnold Pick, der als Erster Erkrankungsfälle beschrieben hatte (Pick, 1892). Allerdings wird diese Bezeichnung heute nur noch für eine Untergruppe der Erkrankungen verwendet, bei denen die zuerst von Alois Alzheimer beschriebenen Pick-Körperchen auftreten (Alzheimer, 1911), was nicht bei allen Erkrankungen der Fall ist (Weder et al., 2007). Die Bezeichnung der verschiedenen FTD-Erkrankungen ist bisher immer noch sehr uneinheitlich, da verschiedene Autoren unterschiedliche Nomenklaturen



**Abbildung 4: Neuropathologische Einordnung Frontotemporaler Demenzen**

Bei der Einordnung wird anhand der Proteinablagerungen zunächst unterschieden, ob Tau in den Aggregaten vorhanden ist. Eine weitere Unterteilung wird durch die neuropathologische Charakterisierung der Einschlüsse erreicht (nach Shaw et al., 2007; Neumann and Kretschmar, 2008).

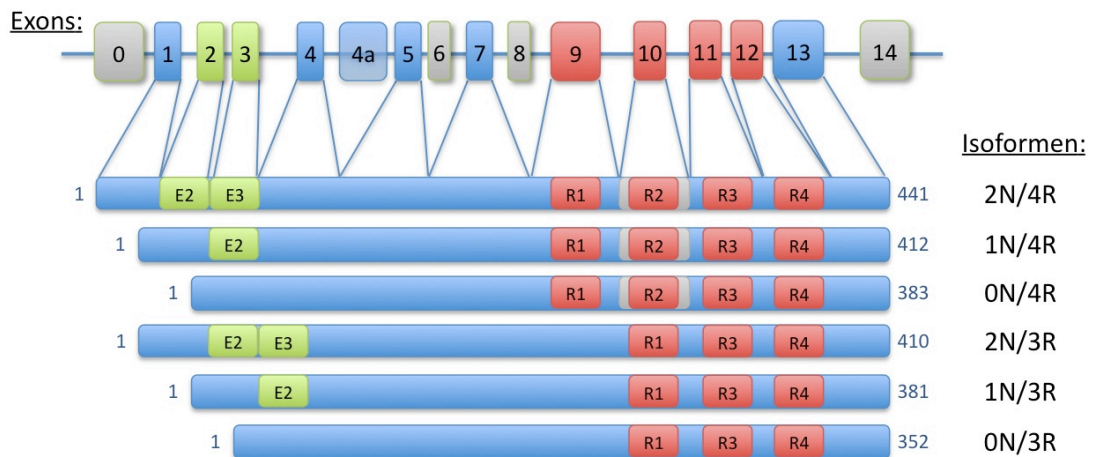
und Eingruppierungen verwenden (Weder et al., 2007). Es setzt sich jedoch zunehmend eine Einordnung nach neuropathologischen Kennzeichen durch, bei der die Krankheiten anhand der vorliegenden Aggregate bzw. Einschlüsse definiert werden (Abbildung 4) (Shaw et al., 2007; Neumann and Kretzschmar, 2008). Hierbei wird zunächst unterschieden, ob Tau-Aggregate vorliegen oder nicht. Die Gruppe der Tau-positiven FTD umfasst z.B. die bereits erwähnte vererbte FTDP-17, und weitere Tauopathien. In die Gruppe der Tau-negativen FTD werden u.a. die kürzlich entdeckten Frontallappendemenzen mit Ubiquitineinschlüssen (FTLD-U) eingeordnet, die durch Mutationen im CHMP2B-Gen (charged multivesicular body protein 2B), im PGRN-Gen (Progranulin) und im VCP-Gen (valosin containing protein) hervorgerufen werden (Van Der Zee et al., 2007). Die letzten beiden sind dabei durch Aggregate des TDP-43-Proteins gekennzeichnet (Neumann et al., 2006).

## **1.4 Das Tau-Protein**

### **1.4.1 Molekulare und genetische Grundlagen**

Das Tau-Protein (englisch *tubulin-associated-unit*) ist der wesentliche Bestandteil der *Tangles*, dem neuropathologischen Kennzeichen der AD, einiger Formen der FTD und anderer Demenzerkrankungen (Greenberg and Davies, 1990; Lee et al., 2001). Tau wurde ursprünglich als Tubulin-bindendes Protein identifiziert (Weingarten et al., 1975; Cleveland et al., 1977a; Lee et al., 1988), welches phosphoryliert wird (Cleveland et al., 1977b). Es wird vorwiegend in Neuronen des zentralen Nervensystems exprimiert, findet sich in geringen Mengen aber auch in Astrozyten und Oligodendrozyten (Binder et al., 1985). Tau wird vom Gen *MAPT* (engl. *microtubule-associated protein tau*) kodiert, welches auf Chromosom 17q21 liegt und aus 16 Exons besteht. Die sechs verschiedenen Tau-Isoformen entstehen durch alternatives Spleißen von elf Exons. Exon 2, 3 und 10 kommen nicht in allen Isoformen vor, wodurch sich die Tau-Isoformen in der Anzahl der in diesen Exons codierten *Inserts* und *Repeats* unterscheiden (Abbildung 5) (Lee et al., 2001; Andreadis, 2005).





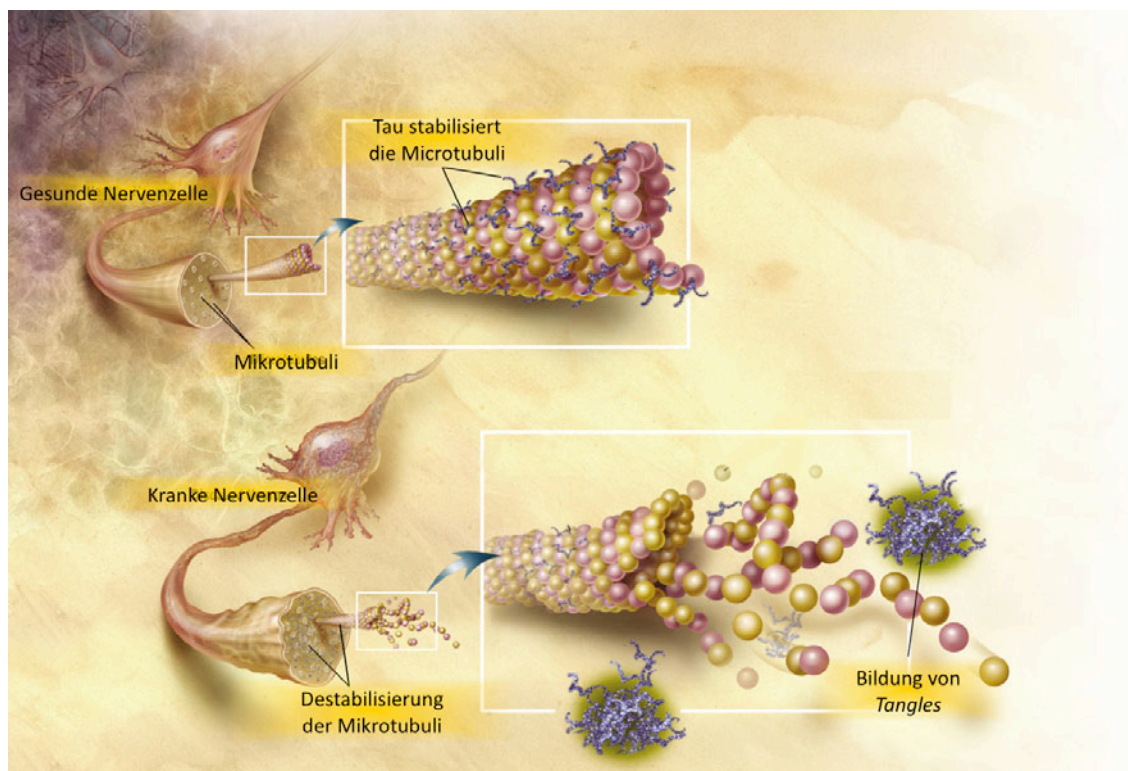
**Abbildung 5: Alternatives Spleißen der 14 Exone des *MAPT* Gens führt zur Bildung von 6 Tau-Isoformen**

Die Isoformen unterscheiden sich durch alternatives Spleißen der Exons E2, E3 und E10, wodurch entweder keine (0N), ein (1N) oder zwei (2N) *Inserts* (hellgrüne Kästchen) sowie drei (3R) oder vier (4R) *Repeats* (rote Kästchen) vorhanden sind.

### 1.4.2 Zelluläre Funktion und Lokalisierung

In gesunden Nervenzellen ist das Tau-Protein in den axonalen Zellfortsätzen mit dem Zytoskelett assoziiert. Die meisten Neuronen sind polar in ein somatodendritisches und ein axonales Kompartiment gegliedert. Die zelluläre Morphologie und Polarität wird hauptsächlich durch die Ausbildung eines zellulären Zytoskeletts bestimmt und ist Voraussetzung für eine effiziente Informationsverarbeitung und -weiterleitung im Nervensystem. Das Zellskelett besteht aus Aktinfilamenten, Mikrotubuli und Intermediärfilamenten. Die Intermediärfilamente sind relativ statische Proteinstrukturen, die vor allem der Stabilisierung der Zelle dienen. Aktinfilamente und Mikrotubuli sind hingegen dynamische Polymere, die nicht nur die Struktur der Zelle stabilisieren, sondern auch für Bewegungsprozesse der Zelle benötigt werden (Alberts et al., 2002). Diese Motilität kann die gesamte Zelle oder Teile betreffen, wie z.B. die Orientierung des Wachstumskegels und das Auswachsen der Neuriten. Zusätzlich dienen die Mikrotubuli auch als Leitstrukturen für den Transport von Substanzen innerhalb der Zelle. Mikrotubuli treten vermehrt in den

Neuriten auf. Dort stabilisieren sie das Axon und werden als Schienen für den axonalen Transport benötigt. Dieser intrazelluläre Transport von Proteinen und Vesikeln versorgt die Nervenendigung mit essentiellen Bestandteilen und ist auch für den Rücktransport von abzubauenen Proteinen und endozytiertem Material in den Zellkörper verantwortlich. Die Integrität des Zytoskeletts und des axonalen Transports ist für die Funktion und das Überleben der langgestreckten Nervenzellen essentiell. Bei der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen werden Abnormalitäten im Zytoskelett und Störungen des axonalen Transports diskutiert (Alberts et al., 2002; Goldstein, 2003; Vale, 2003). Eine zentrale Funktion des Tau-Proteins ist die Förderung der Polymerisation der Mikrotubuli und die Stabilisierung der Polymere. Die Bindung von Tau an die Mikrotubuli wird durch bestimmte Bereiche des



**Abbildung 6: Pathologische Veränderung des Zytoskeletts bei Demenzerkrankungen**

In gesunden Nervenzellen stabilisiert Tau die Mikrotubuli. In Nervenzellen von Demenzerkrankten kann es diese Funktion nicht mehr ausüben, es dissoziiert von den Mikrotubuli und aggregiert im Zytoplasma. Der Verlust von Tau destabilisiert die Mikrotubuli, was schließlich zu ihrem Zusammenbruch führt (modifiziert nach <http://www.nia.nih.gov/Alzheimers/Resources/HighRes.htm>).

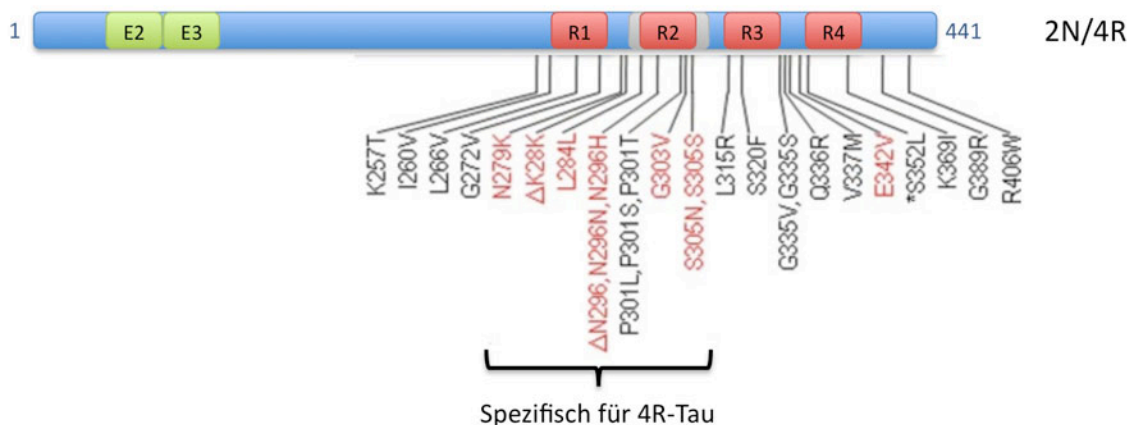
Tau-Proteins vermittelt. Da es mehrere dieser Bereiche gibt, werden sie auch als *Repeats* bezeichnet. Tau spielt damit eine wichtige Rolle bei der Bildung und Aufrechterhaltung der Morphologie der Neurone und beim Transport von Substanzen innerhalb der Zellfortsätze. In Neuronen von Demenzpatienten dissoziiert Tau von den Mikrotubuli und lagert sich im Zytoplasma ab. Dort aggregiert es zu Fibrillen (*paired helical filaments*, PHFs), die stark phosphoryliert sind und sich im Zytoplasma zu bündelartigen Strukturen zusammenlagern (*neurofibrillary tangles*, NFTs). Durch diese Relokalisierung von Tau werden die Mikrotubuli destabilisiert, was schließlich zu einem Zusammenbruch ihrer Struktur und damit des axonalen Transports führt. Durch den nicht mehr funktionierenden axonalen Transport kann das Neuron keine Nährstoffe mehr in die Zellfortsätze und zu den Synapsen liefern und keine Abfallstoffe, wie z.B. fehlgefaltete Proteine abtransportieren, was zum Aushungern und damit zum Absterben der Zellfortsätze und schließlich der gesamten Zelle führt (Abbildung 6).

### **1.4.3 Mutationen des Tau-Proteins**

Die Entdeckung, dass Mutationen im Tau-Gen beim Menschen zur Ausbildung frontotemporaler Demenzen führen, verbesserte das Verständnis der Rolle des Tau-Proteins bei der Pathogenese neurodegenerativer Demenzen wesentlich. Vor 10 Jahren wurde zunächst gezeigt, dass sich autosomal-dominante Tau-Mutationen, die zu FTDP-17 (Frontotemporale Demenz mit Parkinsonismus assoziiert mit Chromosom 17) führen, im Bereich der Mikrotubuli-bindenden *Repeats* befinden. Außerdem wurden Mutationen gefunden, die das Spleißen des Exons 10 beeinflussen, in dem einer der *Repeats* codiert ist. (Hutton et al., 1998; Spillantini et al., 1998). Hierdurch wird mehr Tau mit vier *Repeats* gebildet, was das Gleichgewicht der Bindung und Dissoziation der sechs in Neuronen vorkommenden Tau-Isoformen verändert (Goedert and Jakes, 2005). Die starke Gruppierung der Mutationen um den Bereich der Mikrotubuli-bindenden Domäne des Tau-Proteins legte den Schluss nahe, dass in den betroffenen Patienten eine veränderte Binfähigkeit des Tau-Proteins zur

Degeneration der Neuronen führt. Mit *in-vitro*-Studien könnte außerdem gezeigt werden, dass Mutationen in den Repeats, wie z.B. die P301L-Mutation, die Aggregationsfähigkeit des Tau-Proteins verstärken können (Nacharaju et al., 1999). In transgenen Mäusen konnte durch Expression von Tau-P301L Alzheimer-artige Aggregation des Tau-Proteins in *Tangles* erreicht werden (Lewis et al., 2000), was durch Expression des Wildtyp-Proteins vorher nicht gelungen war (Ishihara et al., 1999). Um eine möglichst schnelle Tauopathie-artige Aggregation zu erreichen, wurde Tau-P301L daher auch in der vorliegenden Arbeit für die Herstellung der transgenen Fischen verwendet.

Insgesamt wurden bis heute über 30 Mutationen gefunden, welche die Bindefähigkeit des Tau-Proteins an die Mikrotubuli, das Spleißen des Exons 10 oder beide Prozesse beeinflussen (Abbildung 7). Die Krankheit wird bei allen Mutation – mit einer Ausnahme (Nicholl et al., 2003) - dominant vererbt und alle betroffenen Patienten weisen Tau-Aggregate auf (Goedert and Jakes, 2005). Dies lässt gemeinsam mit der Beobachtung, dass die Entfernung des Tau-Gens in Mäusen nicht zu Neurodegeneration führt (Dawson et al., 2001),



### Abbildung 7: Tau-Mutationen

Die meisten Mutationen des Tau-Gens gruppieren sich um den Bereich der *Repeats*, mit denen das Tau-Protein an die Mikrotubuli bindet. Einige Mutationen (rote Schriftfarbe) beeinflussen das Spleißen des Exon 10 (grau unterlegt, siehe auch Abbildung 5), wodurch mehr Tau mit 4 *Repeats* gebildet wird. Dies verändert das Gleichgewicht der Mikrotubuli-bindung und -dissoziation der 6 in Neuronen vorkommenden Tau-Isoformen (Wolfe, 2009).

den Schluss zu, dass die Mutationen zu einer toxischen Veränderung der Proteinfunktion führen (*toxic gain-of-function*). Die meisten Mutationen verursachen FTDP-17-ähnliche Symptome, manche führen aber auch zu Phänotypen, die der Pick-Erkrankung, der kortikobasalen Degeneration oder der progressiven supranukleären Parese ähneln (Lee et al., 2001). Es wird vermutet, dass viele dieser Unterschiede von genetischen oder Umwelteinflüssen bestimmt werden (Wolfe, 2009). Die Mutationen im Tau-Protein liefern einen klaren Nachweis, dass das Tau-Protein eine wesentliche Rolle bei der Ausbildung neurodegenerativer Demenzen spielt.

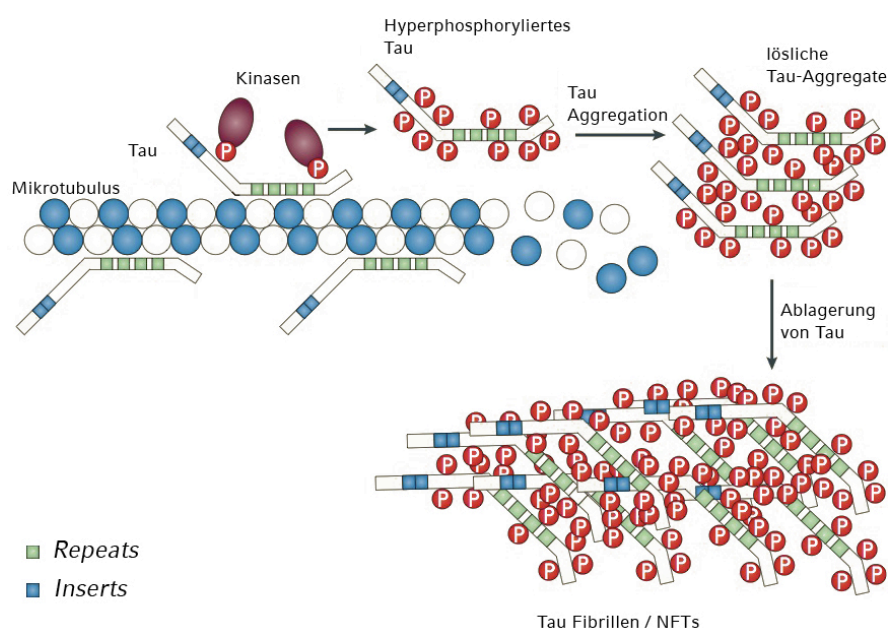
#### **1.4.4 Tau-Phosphorylierung und beteiligte Kinasen und Phosphatasen**

Die Regulierung der Bindeaffinität des Tau-Proteins erfolgt durch die Phosphorylierung bestimmter Aminosäuren im Bereich der *Repeats* (Mandelkow et al., 1995; Lee et al., 2001). Stark phosphoryliertes Tau ist aber auch ein typisches Kennzeichen der neurofibrillären Lesionen in Demenzpatienten (Grundke-Iqbal et al., 1986a; Kosik et al., 1986; Wood et al., 1986). Obwohl einige der Phosphorylierungsstellen, die in Tau-Aggregaten identifiziert wurden, auch unter normalen physiologischen Bedingungen in Nervenzellen zu einem gewissen Maß phosphoryliert werden, ist Tau in PHFs stärker und abnormal phosphoryliert, man spricht von „Hyperphosphorylierung“ (Hasegawa et al., 1992; Mandelkow and Mandelkow, 1998). Die Phosphorylierung von Tau und die daran beteiligten Kinasen sind demnach nicht nur an der Regulierung der Affinität von Tau zu den Mikrotubuli beteiligt, sondern sie spielen auch eine wichtige Rolle bei der pathologischen Aggregation (Abbildung 8) (Stoothoff and Johnson, 2005).

Der direkte Zusammenhang zwischen Tau-Phosphorylierung, der Bildung von PHFs, ihrer Ablagerung zu NFTs und dem Absterben der Nervenzellen ist noch nicht endgültig geklärt. Man geht jedoch davon aus, dass die Hyperphosphorylierung Tau von den Mikrotubuli entfernt, was zu einer Vergrößerung der Menge an ungebundenem Tau führt. Dieses könnte stärker zur Aggregation neigen als gebundenes Tau und so die typischen

Ablagerungen bilden. Nachdem man lange angenommen hatte, dass die NFTs für die zytotoxischen Effekte von Tau verantwortlich seien, legen Experimente mit abschaltbarer Tau-Expression in transgenen Mäusen nun den Schluss nahe, dass möglicherweise die hyperphosphorylierten PHFs als lösliche Aggregationsvorstufen die Neurodegeneration auslösen, ähnlich wie dies auch bei A $\beta$  diskutiert wird (Haass and Selkoe, 2007). In diesen Mäusen kam es nämlich nach Abschalten der Tau-Expression zu einer Verbesserung der kognitiven Leistungsfähigkeit und Stabilisierung der Menge an Nervenzellen, obwohl die vorhandenen NFTs nicht reduziert wurden (Santacruz et al., 2005).

Die längste Tau-Isoform 2N4R besitzt insgesamt 79 phosphorylierbare Serin- und Threoninreste, von denen etwa 30 in normalen Zellen abwechselnd phosphoryliert werden. An der pathologischen Hyperphosphorylierung von Tau sind etwa 25 Phosphorylierungsstellen beteiligt, die teilweise mit den physiologisch phosphorylierten überlappen. Die phosphorylierbaren Reste

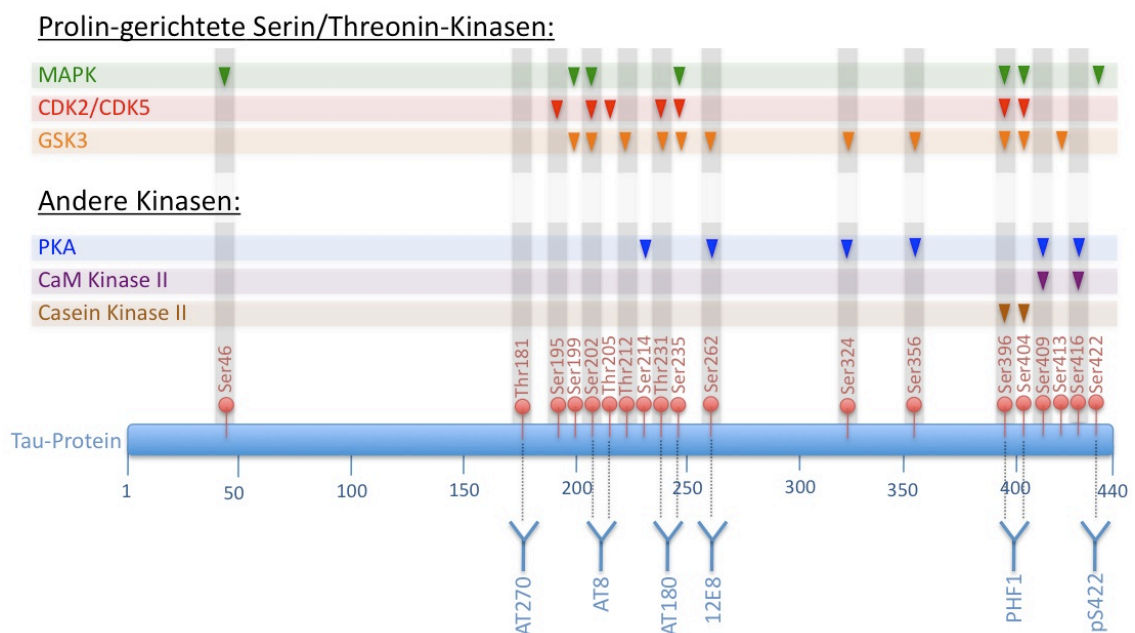


**Abbildung 8: Phosphorylierung und Aggregation des Tau-Proteins**

Während der Pathogenese von Demenzerkrankung wird Tau hyperphosphoryliert, d.h. es wird von mehreren Kinasen im Vergleich zum Normalzustand stärker und an zusätzlichen Stellen phosphoryliert. Hyperphosphoryliertes Tau dissoziiert von den Mikrotubuli, wodurch diese depolymerisieren, und lagert sich in fibrillären Aggregaten ab (nach Gotz and Ittner, 2008).



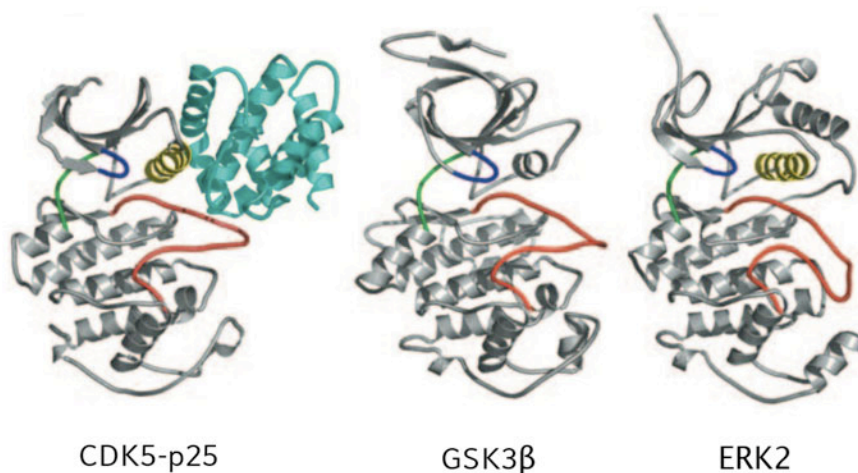
gruppieren sich vor allem um die *Repeats*, mit denen Tau an die Mikrotubuli bindet. Die Phosphorylierung an diesen Stellen hat einen negativen Einfluss auf die Bindeaffinität von Tau zu den Mikrotubuli (Billingsley and Kincaid, 1997; Lee et al., 2001; Stoothoff and Johnson, 2005). Die Tau-Phosphorylierung kann durch ein verlangsamtes Laufverhalten bei der Proteingelektrophorese nachgewiesen werden. Eine vorherige Behandlung mit Phosphatasen revertiert diesen Effekt. Zusätzlich gibt es Antikörper, die pathologisch relevante Epitope des Tau-Proteins nur dann erkennen, wenn diese phosphoryliert sind (Abbildung 9) (Billingsley and Kincaid, 1997). Diese Phosphoepitop-spezifischen Antikörper werden auch von Pathologen zum Nachweis einer Tauopathie verwendet. Die am häufigsten verwendeten Antikörper sind AT8 (Biernat et al., 1992), AT180 und AT270 (Goedert et al., 1994), 12E8 (Seubert et al., 1995), PHF1 (Greenberg et al., 1992) und pS422 (Hasegawa et al., 1996).



**Abbildung 9: Tau-Kinasen, Phosphorylierungsstellen und Phospho-spezifische Antikörper**

Tau wird von Prolin-gerichteten Serin/Threonin- und anderen Kinasen an spezifischen Stellen phosphoryliert. Diese Phosphorylierung kann mit Phosphoepitop-spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden, z.B. für Threonin181 (Antikörper/Phosphoepitop AT270), Serin202/Threonin205 (AT8), Threonin231/Serin235 (AT180), Serin262/Serin356 (12E8), Serin396/Serin404 (PHF1) und Serin422 (pS422).

An der Phosphorylierung von Tau sind vor allem Prolin-gerichtete Serin/Threonin-Kinasen beteiligt, welche vorwiegend Serine und Threonine phosphorylieren, die im Polypeptidstrang von Prolinen flankiert werden (Buee et al., 2000). Diese Proteingruppe schließt Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3) (Hanger et al., 1992) ein, außerdem Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen (MAPK) wie die Extrazellulärsignal-regulierte Kinase 2 (ERK2) (Drewes et al., 1992; Roder et al., 1993), Zyklin-abhängige Kinase 2 (CDK2) und 5 (CDK5) (Baumann et al., 1993), Tau-Tubulin Kinase (TTK) (Takahashi et al., 1995) und Stress-aktivierte Protein-Kinasen wie JNK (Wetzel et al., 2008). Zusätzlich phosphorylieren mehrere andere, also nicht Prolin-gerichtete Kinasen Tau, u.a. die Mikrotubuli-affinitäts-regulierende Kinase (MARK) (Drewes et al., 1997), cAMP-abhängige Protein-Kinase (PKA) (Litersky and Johnson, 1992), Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-abhängige Kinase II (Baudier and Cole, 1987) und Casein-Kinase II (Greenwood et al., 1994) (Abbildung 9). Im Mittelpunkt der heutigen Forschung stehen vor allem die strukturell ähnlichen Kinasen GSK3 $\beta$ , CDK5 und ERK2, da von diesen Kinasen angenommen wird, dass sie für die Pathologie von Demenzerkrankungen eine wichtige Rolle spielen (Abbildung 10) (Lau et al., 2002; Churcher, 2006; Mazanetz and Fischer, 2007).



**Abbildung 10: Strukturmodelle der Tau-Kinasen CDK5-p25, GSK3 $\beta$  und ERK2**

Die drei Kinasen sind strukturell ähnlich aufgebaut, alle verfügen über einen Aktivierungsbogen, (rot), einen Glyzin-reichen Bogen (blau) und eine Scharnierregion (in grün), die gemeinsam die ATP-bindende Tasche bilden (Mazanetz and Fischer, 2007).



#### 1.4.4.1 GSK3 $\beta$

GSK3 $\beta$  ist eine Serin/Threonin-Kinase, die in Neuronen hoch exprimiert ist. Sie besitzt viele verschiedene Funktionen in unterschiedlichen zellulären Prozessen, u.a. im Stoffwechsel, in der Zellvermehrung, bei der Krebsentstehung und Apoptose (Doble and Woodgett, 2003). Außerdem spielt GSK3 $\beta$  eine wichtige Rolle bei der Zelldifferenzierung während der Embryonalentwicklung, da das Enzym im kanonischen Wnt-Signaltransduktionsweg aktiv ist. Die Aktivierung des Signalwegs durch extrazelluläre Wnt-Glykoproteine führt zur Abnahme der Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin durch GSK3 $\beta$ . Das unphosphorylierte  $\beta$ -Catenin wird daraufhin in den Zellkern transferiert, wo es die Transkription von Zielgenen aktiviert (Seidensticker and Behrens, 2000). Aus medizinischer Sicht ist diese Kinase vor allem als mögliches Zielenzym für die Entwicklung von Medikamenten für Typ-II-Diabetes bekannt, da sie eine wichtige Rolle im Glykogenstoffwechsel spielt (Nikoulina et al., 2002). Außer bei den Tauopathien spielt das Enzym auch bei anderen neurologischen Erkrankungen wie Schlaganfall, bipolar-affektiver Störung und Chorea Huntington eine Rolle. Bei Alzheimer-Patienten ist die aktive Form von GSK3 $\beta$  im Gehirn erhöht. Die erhöhte Enzymaktivität wird sowohl mit Veränderungen bei der A $\beta$ -Prozessierung, als auch bei der Tau-Phosphorylierung in Verbindung gebracht (Bhat et al., 2004).

In Zellkultur und auch in APP-transgenen Mäusen hatte die Inhibierung von GSK3 $\beta$  eine verminderte Produktion von A $\beta$  und die Ansammlung von C-terminalen Fragmenten zur Folge, was auf eine Reduktion der APP-Prozessierung vor oder beim Schnitt der  $\gamma$ -Sekretase hinweist. Allerdings waren andere Substrate der  $\gamma$ -Sekretase, wie z.B. Notch nicht betroffen, so dass keine allgemeine Inhibition der  $\gamma$ -Sekretase vorliegen kann. Da APP ein mögliches Substrat von GSK3 $\beta$  ist, könnte die Phosphorylierung von APP am Threonin 668 Einfluss auf die Prozessierung haben (Sun et al., 2002; Lee et al., 2003; Cohen and Goedert, 2004). Es wurde allerdings bisher nicht gezeigt, dass die Inhibition von GSK3 $\beta$  eine Reduktion der Plaquebildung oder gar

Verbesserungen der Verhaltensphänotypen der transgenen Mäuse bewirkt. Daher bleibt abzuwarten, ob die Beteiligung von GSK3 $\beta$  an der APP-Prozessierung für eine Therapieentwicklung medizinisch relevant ist.

GSK3 $\beta$  spielt auch bei der Ausbildung der Tau-Pathologie in AD und anderen Tauopathien wie FTD eine wichtige Rolle. Von allen Tau-Kinasen wurde GSK3 $\beta$  am intensivsten studiert. Die Kinase phosphoryliert mindestens 12 Serin/Threonin-Reste im Tau-Protein (Cohen and Goedert, 2004). Einige dieser Stellen kann GSK3 $\beta$  direkt phosphorylieren, z.B. das in PHF-Tau vorkommende PHF1-Epitop Serin396/Serin404. Bei anderen benötigt das Enzym die vorherige Phosphorylierung benachbarter Reste durch eine andere Kinase, z.B. das ebenfalls pathologisch relevante AT180-Epitop Threonin 231, bei dem das benachbarte Serin235 zunächst durch CDK5 oder ERK2 phosphoryliert werden muss (Ishiguro et al., 1992; Goedert et al., 1994). Andere Serin/Threonin-Reste werden hingegen nicht von GSK3 $\beta$  phosphoryliert, beispielsweise das pS422-Epitop Serin422, welches von einem Vertreter der MAPK phosphoryliert wird (Hasegawa et al., 1996). In transgenen Mäusen wurde gezeigt, dass die Überexpression von GSK3 $\beta$  zur Ausbildung Alzheimer-ähnlicher Symptome, wie der Hyperphosphorylierung von Tau, dem Absterben von Nervenzellen im Hippocampus und kognitiven Störungen führt. In *Drosophila* war die Koexpression von Tau und GSK3 $\beta$  sogar Voraussetzung für die Bildung von NFT-artigen Strukturen (Lucas et al., 2001).

#### 1.4.4.2 CDK5

CDK5 ist eine ebenfalls im Nervensystem hoch exprimierte und mit dem Zytoskelett assoziierte Serin/Threonin-Kinase. Alle CDKs benötigen für ihre Funktion eine regulatorische Untereinheit, meist ein Zyklin. Im Fall von CDK5 sind dies die Proteine p35/p25 und p39, welche fast ausschließlich in postmitotischen Neuronen exprimiert sind. CDK5 kann einen Komplex mit Tau bilden und die Tau-Phosphorylierung erhöhen. Diese Erhöhung stimuliert

auch die Phosphorylierung von Tau durch GSK3 $\beta$  (Billingsley and Kincaid, 1997; Lee et al., 2001). Eine Deregulation von CDK5 hängt bei Tauopathien eng mit der Ausbildung pathologischer Symptome zusammen, eine Erhöhung der Aktivität von CDK5 wurde in Gehirnen von Alzheimer-Patienten beobachtet (Lee et al., 1999; Cruz et al., 2003; Noble et al., 2003). Die Überexpression von CDK5-p25 führte in Mausmodellen zur Ausbildung eines Tauopathie-Phänotyps mit NFTs (Ahlijanian et al., 2000). Außerdem verstärkte die Koexpression von p25 in Tau-transgenen Mäusen die Ansammlung von aggregiertem Tau und die Bildung von NFTs (Noble et al., 2003) In apoptotischen Neuronen ist die Assoziation mit Tau und die Aktivität von CDK5 signifikant erhöht (Zhang and Johnson, 2000).

#### 1.4.4.3 ERK2

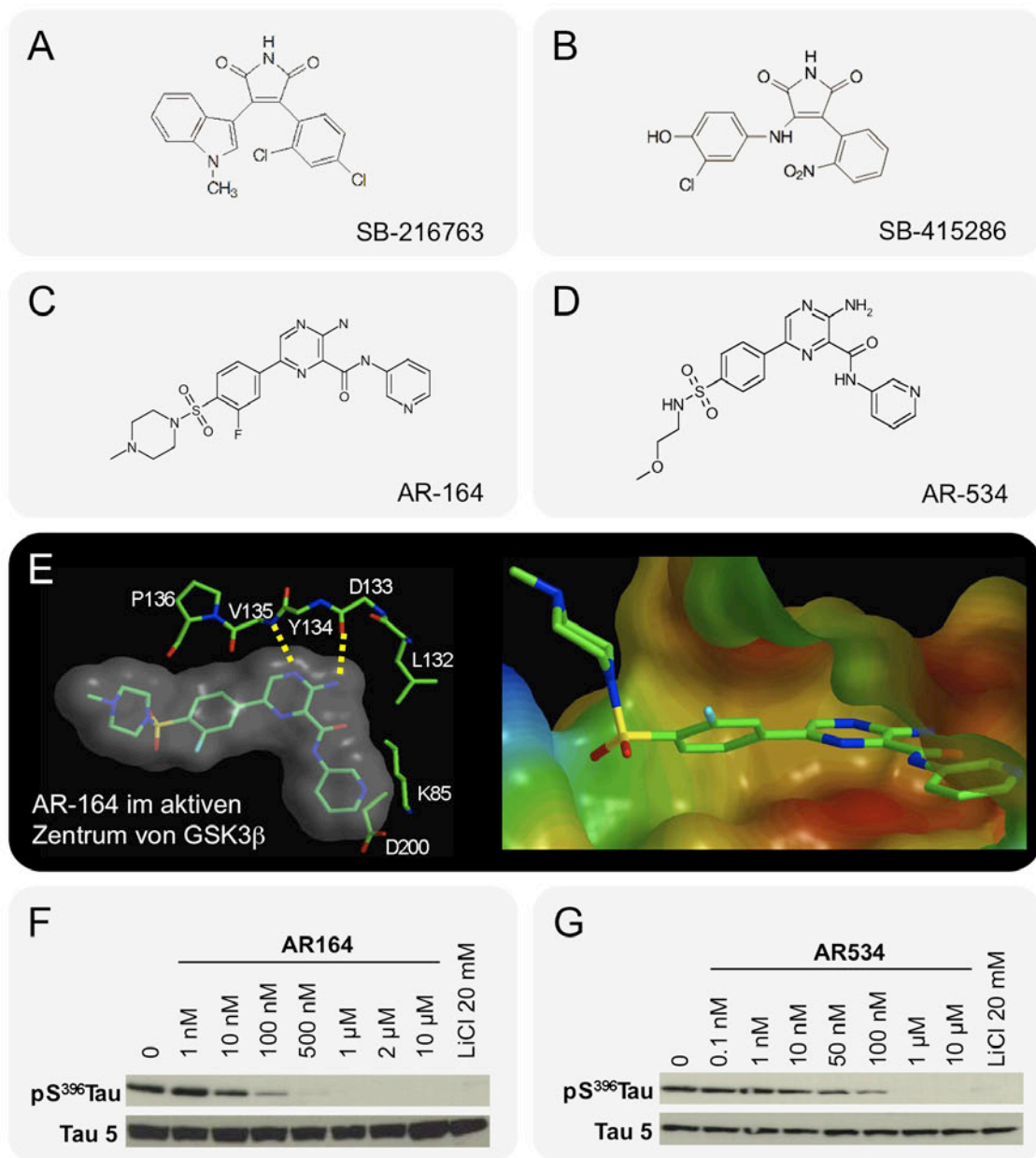
ERK2 ist eine ebenfalls stark in Neuronen exprimierte Kinase. Die Phosphorylierung von Tau durch ERK2 bewirkt eine zehnfach niedrigere Affinität von Tau zu den Mikrotubuli, wodurch Tau diese entsprechend weniger stabilisieren kann (Drechsel et al., 1992). Neben Tau phosphoryliert ERK2 auch das mittelgroße Neurofilament NF-M (Roder and Ingram, 1991). Diese Aktivitäten weisen auf eine Rolle von ERK2 bei der Regulation des Zytoskeletts hin. In einem transgenen Tauopathie-Mausmodell wurde nachgewiesen, dass eine erhöhte Aktivität von ERK2 mit der Hyperphosphorylierung von Tau einhergeht (Sawamura et al., 2001). Außerdem wurde gezeigt, dass ERK2 in Gehirnen von Alzheimer-Patienten in allen Neuronen mit phosphoryliertem Tau aktiviert ist (Perry et al., 1999).

#### 1.4.4.4 Phosphatasen

Der Grad der Phosphorylierung von Tau wird auch durch Protein-Phosphatasen reguliert, welche Phosphorsäureester von Tau abspalten. Mehrere Phosphatasen spielen bei der Tau-Dephosphorylierung eine Rolle: PP1, PP2A, PP2B und PP2C. Die *in-vivo*-Relevanz der einzelnen Enzyme ist jedoch noch völlig unklar (Billingsley and Kincaid, 1997; Lee et al., 2001).

#### **1.4.5 Inhibitoren von Tau-Kinasen**

Es wird allgemein angenommen, dass die Phosphorylierung von Tau durch Tau-Kinasen bei der Bildung von PHFs und NFTs und damit für die Pathogenese von Tauopathien eine zentrale Rolle spielt. Daher sind Tau-Kinasen wichtige Zielenzyme für die Entwicklung von Medikamenten zur Therapie dieser Krankheiten. Man erhofft sich hierbei, durch die Blockade der frühen pathologischen Vorgänge bei Tauopathien, zu denen die Hyperphosphorylierung von Tau gehört, die späteren Vorgänge, wie die Aggregation von Tau und seine Ablagerung in NFTs und die damit einhergehende Neurodegeneration verhindern zu können (Mazanetz and Fischer, 2007). Bei der Entwicklung von Inhibitoren ist die Forschung an GSK3 $\beta$  am weitesten fortgeschritten (Bhat et al., 2004; Cohen and Goedert, 2004). Die Kinase kann durch Lithiumsalze (Stambolic et al., 1996) oder ATP-kompetitive Inhibitoren gehemmt werden, wodurch die Phosphorylierung von Tau reduziert und die Stabilität der Mikrotubuli beeinflusst wird. Lithium inhibiert GSK3 $\beta$  und einige andere Kinasen in relativ unspezifischer Weise kompetitiv durch Verdrängung von Magnesiumionen, außerdem hemmt es andere Enzyme wie die Inositolmonophosphatase und Histondeacetylase (Cohen and Goedert, 2004; Gould and Manji, 2005). Vor einiger Zeit wurden wesentlich effektivere, ATP-kompetitive Inhibitoren entwickelt, wie z.B. SB-216763 und SB-415286 aus der Stoffklasse der Maleimide (Smith et al., 2001). Auch für andere Stoffklassen wie die Indirubine, Paullone und Hymenialdisine wurde eine effektive Hemmung von GSK3 gezeigt, allerdings inhibieren alle diese Substanzen verwandte Kinasen wie CDK5 in ähnlicher Weise, da diese strukturell sehr ähnlich aufgebaut sind (Cohen and Goedert, 2004). Unspezifische Wirkungen von Inhibitoren können bei der Weiterentwicklung zu einem Medikament zu starken Nebenwirkungen führen und sind daher nicht erwünscht. Aus diesem Grund wird weiter intensiv an spezifischeren GSK3-Inhibitoren gearbeitet. Erste Veröffentlichungen haben bereits gezeigt, dass eine Erhöhung der GSK3-Spezifität im Vergleich zu CDK5 und anderen Kinasen durch struktur-basiertes Inhibitor-design möglich ist (Abbildung 11).



**Abbildung 11: Spezifische GSK3-Inhibitoren**

(A-D) Strukturformeln der ATP-kompetitiven GSK3-Inhibitoren SB216763 (A), SB415286 (B) (Cohen and Goedert, 2004), AR-164 (C) und AR-534 (D). (E) Bindung des GSK3-spezifischen Inhibitors AR-164 an die ATP-Bindestelle von GSK3β. Der Inhibitor interagiert mit den Aminosäuren, die das aktive Zentrum bilden. Links Ansicht von oben mit den für die Interaktion wichtigen Aminosäureresten, rechts Seitenansicht. (F-G) Die Western-Blot-Analyse der Tau-Phosphorylierung in Inhibitor-behandelten Zellkulturen zeigt, dass die spezifischen GSK3-Inhibitoren AR-164 (F) und AR-534 (G) die Tau-Phosphorylierung am pathologisch relevanten Serin 396 in Dosis-abhängiger Weise inhibieren. Die Gesamtexpression von Tau (Antikörper Tau-5) bleibt konstant. LiCl wurde in hoher Konzentration als Positivkontrolle verwendet (nach Paquet et al., 2009).

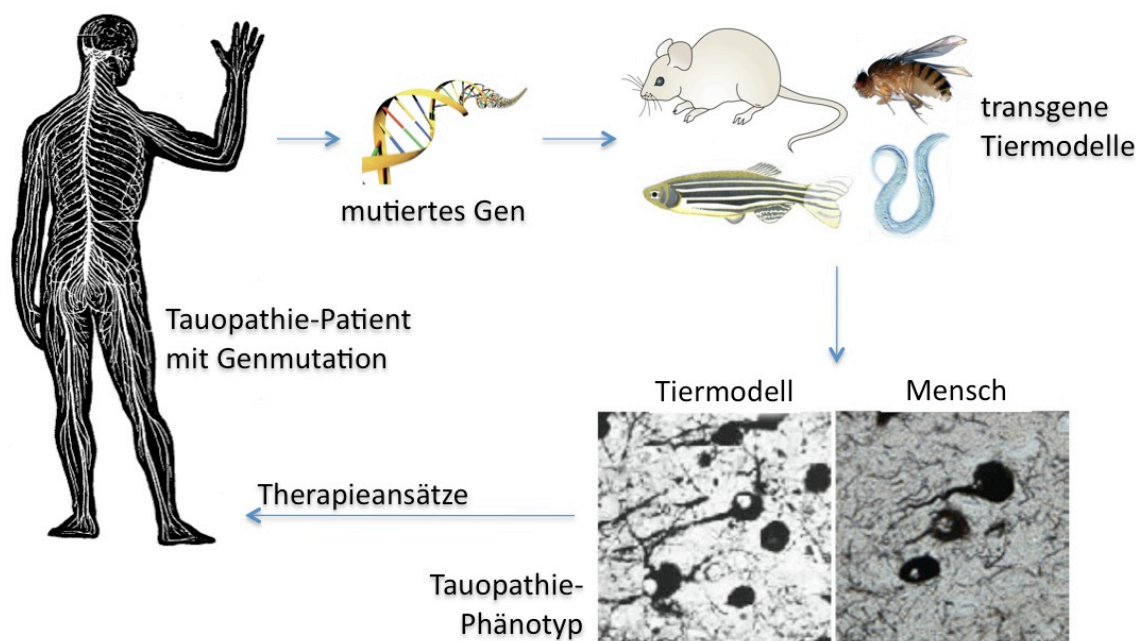
Bei diesem Verfahren wird anhand der Kristallstruktur des zu inhibierenden Enzyms am Computer ein passendes Inhibitormolekül erstellt und anschließend synthetisiert und getestet (Bhat et al., 2003). So konnten zwei neue Inhibitoren, AR-164 und AR-534 entwickelt werden, die in Zellkulturexperimente eine hohe inhibitorische Aktivität auf die Tau-Phosphorylierung aufwiesen. In dieser Arbeit wird die Aktivität der beiden Substanzen nun zum ersten Mal in einem lebenden Tier charakterisiert.

### **1.5 Tiermodelle zur Erforschung von Tauopathien**

Der Pathologie von Demenzerkrankungen liegt eine Degeneration von Neuronen im zentralen Nervensystem zu Grunde. Um die Grundlagen dieser degenerativen Prozesse zu erforschen, benötigt man ein Forschungsobjekt, an welchem man den Krankheitsverlauf studieren kann. Die Untersuchung von Demenzpatienten bietet zwar einen gewissen Einblick in die Pathogenese, allerdings ist eine umfassende Analyse der mikroskopischen oder molekularen Veränderungen im zentralen Nervensystem erst nach dem Tode des Patienten möglich, wodurch Gehirne nur im Endstadium der Erkrankung untersucht werden können. Bei der Demenzforschung direkt am Menschen spielen auch ethische Probleme eine Rolle.

Für die Erforschung früherer Krankheitsstadien verwendet man daher Versuchstiere, in denen man den Krankheitsverlauf durch genetische Veränderungen nachbilden kann. Die Analyse der Funktionen der an der Pathogenese beteiligten Gene setzt ebenfalls ein genetisch manipulierbares Versuchstier voraus, in dem man die Funktion der zu untersuchenden Gene hoch- oder herunterregulieren kann. Die Forschung an transgenen Tieren hat daher einen unverzichtbaren Beitrag zum heutigen Verständnis der molekularen Grundlagen von Demenzerkrankungen geleistet. Während der letzten zehn Jahre wurden viele Tau-transgene Tiermodelle entwickelt, in denen das menschliche Tau-Gen in normaler oder mutierter Form überexprimiert wurde. Diese Tiere entwickelten daraufhin wesentliche Aspekte der Tau-Pathologie und konnten so zur Erforschung der zugrunde liegenden

Mechanismen verwendet werden (Abbildung 12). Die transgenen Tiermodelle haben so unter anderem zum besseren Verständnis der Pathogenese, zur Identifizierung von krankheitsauslösenden oder –verändernden Faktoren und zur Entwicklung von Therapiestrategien beigetragen. Hierbei wurden verschiedene Modellorganismen, wie z.B. Mäuse, *Drosophila*, *C. elegans* und Zebrafische verwendet, die sich aufgrund ihrer individuellen Eigenschaften optimal für bestimmte Experimente eignen (Gotz and Ittner, 2008).



**Abbildung 12: Entwicklung und Anwendung transgener Tiermodelle**

Transgene Tiermodelle werden durch die Einführung eines mit Tauopathien assoziierten Gens hergestellt, welches aus Patienten mit einer Genmutation isoliert wurde. Die transgenen Tiere, wie z.B. Mäuse, *Drosophila*, *C. elegans* und Zebrafische, entwickeln Symptome, die der Tau-Pathologie im Menschen ähnlich ist. Die transgenen Tiermodelle können dann verwendet werden, um die Pathogenese der Erkrankungen zu erforschen und Therapieansätze zu entwickeln und zu testen. Erfolgreiche Therapien werden dann auf den Menschen übertragen.

### 1.5.1 Transgene Mäuse

Mäuse eignen sich aufgrund ihrer schnellen Vermehrungsrate, ihrer genetischen Manipulierbarkeit, eines komplexen und gut analysierbaren Verhaltens und ihrer genetischen und neuromorphologischen Ähnlichkeit zum Menschen recht gut für die Demenzforschung. Sie haben sich deshalb als Standardmodell für die biomedizinische Demenzforschung etabliert.

In den ersten transgenen Mäusen, die nicht mutiertes menschliches Tau in Nervenzellen exprimierten, beobachtete man die Bildung von fibrillären Strukturen und Tau Hyperphosphorylierung, aber keine Bildung von *Tangles* oder Neurodegeneration (Gotz et al., 1995). Dies wurde erst fünf Jahre später in Mäusen erreicht, die größere Mengen des Tau-Proteins mit der P301L-Mutation in Nervenzellen exprimierten (Lewis et al., 2000). Dieses Ergebnis wies darauf hin, dass FTDP-17-Mutationen die Aggregation von Tau beschleunigen und Nervenzellschädigungen und -degeneration verursachen könnten. Wie bereits erwähnt wurde in Mäusen mit induzierbarer Tau-Expression gezeigt, dass nach dem Abschalten des Transgens zwar weiterhin NFTs vorhanden waren, sich die kognitive Leistungsfähigkeit der Mäuse aber stabilisierte. Dieses Experiment weist darauf hin, dass vermutlich lösliche Tau-Aggregate und nicht die NFTs bei Tauopathien die neurotoxische Spezies darstellen (Santacruz et al., 2005). Durch Kreuzungen Tau-transgener Mäuse mit Mäusen, die mutiertes APP überexprimieren, wurden auch Modelle erzeugt, die mit Plaques und NFTs beide wesentliche pathologische Aspekte der Alzheimer-Demenz entwickeln (Lewis et al., 2001). Anschließend wurden dreifach transgene Mäuse hergestellt, die nicht nur mutiertes Tau und APP, sondern auch mutiertes PS1 überexprimierten, wodurch die Ausbildung eines Alzheimer-artigen Phänotyps mit Plaques und NFTs in den Gehirnregionen, die auch bei Alzheimerpatienten betroffen sind, erreicht wurde (Oddo et al., 2003). Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen deutlich die Interaktion zwischen Tau und APP und damit die wichtige Rolle des Tau-Proteins bei der Alzheimer-Demenz. Allerdings kann die Ausbildung dieser Alzheimer-



typischen Pathologie mit Plaques und NFTs in transgenen Mäusen nur durch Koexpression von APP und Tau erreicht werden, nicht durch alleinige Expression von normalem oder AD-mutiertem APP. Diese Beobachtung stellt einen wichtigen Unterschied dieser Tiermodelle zum Menschen dar, da bei AD-Patienten die pathologische Mutation von APP oder PS1 zur Ausbildung von Plaques und Tangles führt, ohne dass Tau gleichzeitig mutiert sein muss.

Alle bislang beschriebenen Experimente verdeutlichen den großen Beitrag, den Experimente an transgenen Mäusen für das Verständnis von Tauopathien geleistet haben. Insbesondere haben sie dabei geholfen, die Rolle der an den Krankheiten beteiligten Gene zu erforschen und die späte Neuropathologie zu charakterisieren. Die heutige Forschung beschäftigt sich jedoch zunehmend mit den frühen Stadien der Pathologie, bevor oder während die ersten Zellen absterben. Ein Einblick in diese frühen Krankheitsstadien ist wichtig um zu verstehen, wie und warum Neuronen absterben, welche zellulären Prozesse beteiligt sind und wie man den Verfall z.B. durch Behandlung mit Medikamenten aufhalten kann. Mäuse sind für Experimente, mit denen diese Fragestellungen untersucht werden können, nicht optimal geeignet, da man hierfür die betroffenen Nervenzellen über einen längeren Zeitraum beobachten müsste. Das erforderliche *in-vivo-imaging* ist in Mäusen allerdings sehr aufwendig und nur für kurze Zeiträume oder mit geringer Aufnahmefrequenz durchführbar (Brecht et al., 2004). Außerdem sind Medikamententest in Mäusen nur in recht kleinem Maßstab und mit großem Aufwand möglich. Weitere Nachteile wie die kostspielige Pflege und der große Platzbedarf erschweren die Arbeit mit transgenen Mäusen. Es besteht daher ein großer Bedarf an neuen Tiermodellen, mit denen diese *in-vivo*-Experimente durchgeführt werden können.

### **1.5.2 Transgene Invertebraten**

Invertebraten-Modelle, insbesondere transgene Fliegen und Fadenwürmer, haben sich ebenfalls als hilfreiche Werkzeuge zur Erforschung neurodegenerativer Krankheiten erwiesen (Gotz and Ittner, 2008). Die Vorteile

der Wirbellosen liegen in der einfachen Handhabung, dem kurzen Generationswechsel und der schnellen Erzeugung transgener Linien, die durch die sehr wirkungsvollen genetischen Werkzeuge, die für Invertebraten zur Verfügung stehen, deutlich vereinfacht wird. Außerdem lassen sich die Tiere günstig und in großen Mengen halten und vermehren.

Die neuronale Expression von Wildtyp- oder R406W-mutiertem Tau verursachte in transgenen *Drosophila*-Fliegen im adulten Tier auftretende, fortschreitende Neurodegeneration und Lethalität. Interessanterweise degenerierten die Neuronen ohne das Auftreten von NFTs (Wittmann et al., 2001). *Tangle*-ähnliche Strukturen konnten erst durch Koexpression von GSK3 $\beta$  hervorgerufen werden, was auf eine Rolle der Phosphorylierung bei der Bildung neurofibrillärer Bündel hinweist (Jackson et al., 2002). In Fliegen wurde auch eine Rolle von oxidativem Stress bei der Pathogenese von Tauopathien nachgewiesen, da in Fliegen mit fehlenden Antioxidations-Enzymen eine erhöhte Tau-Toxizität nachgewiesen wurde (Dias-Santagata et al., 2007). Auch im Fadenwurm *C. elegans* führte die Expression von Wildtyp- oder mutiertem Tau zu neurologischen Störungen wie Verhaltensänderungen, Änderungen der Synapsen und Neurodegeneration. Mutiertes Tau verursachte hierbei im Vergleich zum Wildtyp einen früheren und drastischeren Phänotyp (Kraemer et al., 2003; Miyasaka et al., 2005).

Beide Invertebraten-Modelle sind sowohl aufgrund der großen Mengen an Individuen, die produziert werden können, als auch der kleinen Körpergröße der Tiere gut zur Durchführung von großangelegten Tests, sogenannten Screens, geeignet. Mit genetischen Screens, bei denen eine große Zahl von einzelnen Genen in den transgenen Tieren herunterreguliert wird, wurden bereits weitere an der Tau-Pathologie beteiligte Gene und Stoffwechselwege gefunden (Karsten et al., 2006; Kraemer et al., 2006). Mit chemischen Screens können in großem Umfang Substanzen getestet und Wirkstoffe identifiziert werden, welche die Pathologie lindern oder unterdrücken können. Die Nachteile der Wirbellosen liegen in den genetischen und morphologischen

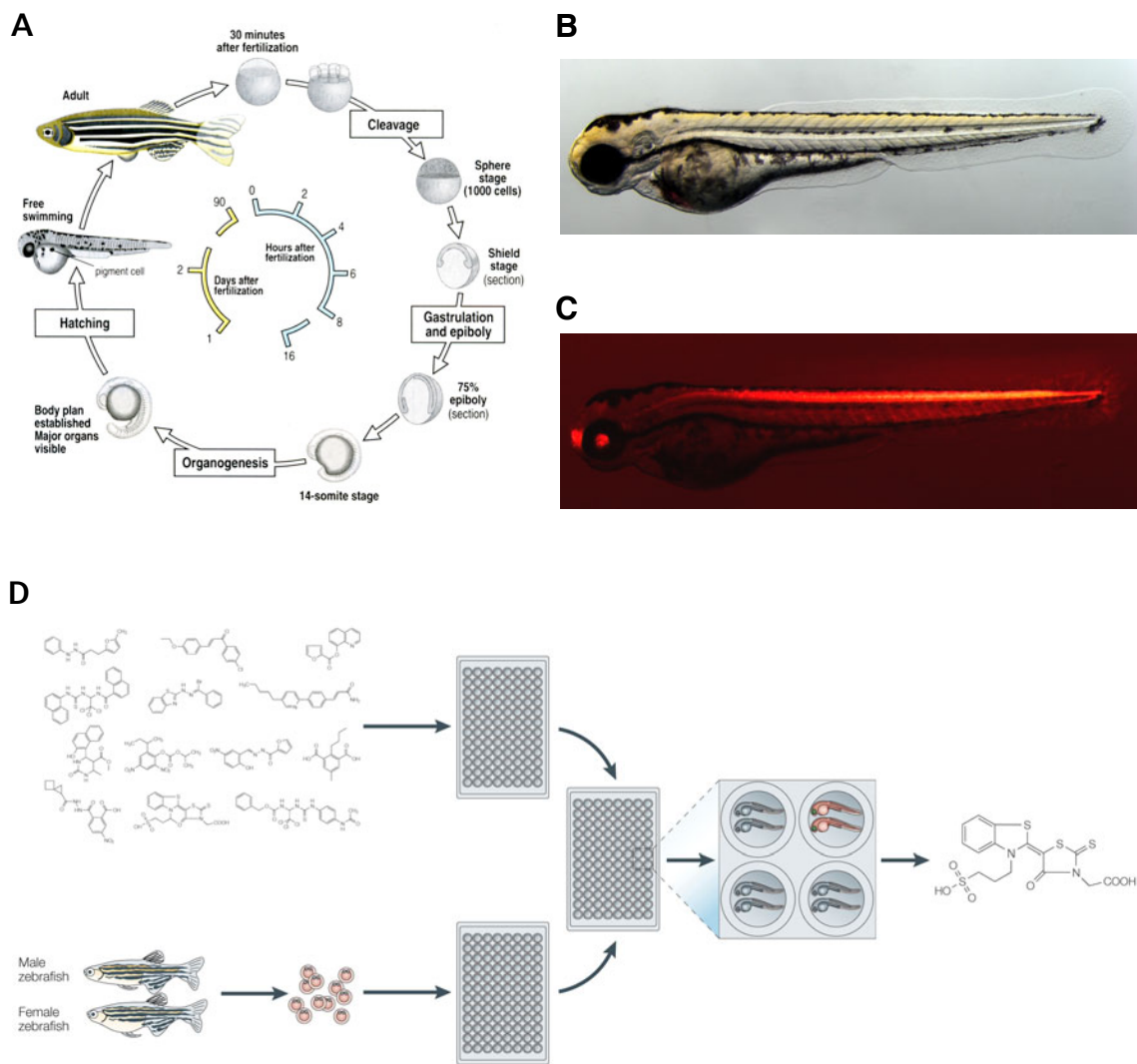
Unterschieden, die sie im Vergleich zum Menschen aufweisen. Viele Gene, die beim Menschen mit Demenzerkrankungen in Verbindung gebracht werden, sind in Invertebraten nicht oder nur in recht geringem Maße konserviert. Daher können in Invertebraten gewonnene Erkenntnisse über molekulare Funktionen dieser Gene oder der Stoffwechselwege, in denen sie eine Rolle spielen, nicht uneingeschränkt auf den Menschen übertragen werden. Auch die Entstehung des Nervensystems und der Neuronen ist trotz vergleichbarer Funktionen in Wirbellosen aus entwicklungsbiologischer Sicht anders als in Wirbeltieren (Wolpert et al., 1999).

### **1.5.3 Transgene Zebrafische**

Der Zebrafisch (*Danio rerio*) hat sich als immer beliebter werdendes Wirbeltiermodell in der Grundlagenforschung etabliert. Zebrafischembryonen und -larven sind aufgrund ihrer geringen Körpergröße, schnellen Entwicklung und insbesondere ihres vollständig durchsichtigen Körpers optimal für die Forschung am lebenden Tier geeignet (Abbildung 13A-C). Das Nervensystem wird innerhalb von nur 24 Stunden ausgebildet und schon nach wenigen Tagen kann es komplexe Verhaltensweisen wie Schwimmbewegungen, Flucht und Nahrungsaufnahme steuern. Zebrafische lassen sich mit relativ geringem Aufwand und Platzbedarf in großen Mengen halten und vermehren, ein Zebrafischpaar kann wöchentlich über 300 Nachkommen produzieren. Die Entwicklung und Morphologie wichtiger Organe wie des Nervensystems ist dem Menschen wesentlich ähnlicher als bei Invertebraten, die meisten krankheitsrelevanten Gene sind deutlich höher konserviert. Aufgrund dieser Vorteile wurden Zebrafische bereits von vielen Laboratorien erfolgreich für die Erforschung von Entwicklungsprozessen und Krankheiten verwendet (Dodd et al., 2000; Rubinstein, 2003; Beis and Stainier, 2006). Zur Aufklärung der molekularen Funktionen der beteiligten Genen wurden großangelegte genetische Screens durchgeführt (Driever et al., 1996; Haffter et al., 1996). Außerdem konnten mit Zebrafischlarven auch großangelegte chemische Screens durchgeführt werden, bei denen Substanzen identifiziert wurden, die

einen durch eine Genmutation induzierten Phänotyp unterdrücken konnten (Abbildung 13D) (Peterson et al., 2004; Zon and Peterson, 2005).

Die Entwicklung von transgenen Zebrafischen, die menschliche Gene überexprimieren und so als Krankheitsmodelle dienen könnten, ist bisher noch nicht sehr weit fortgeschritten. Um diese Modelle herzustellen, benötigt man gentechnische Methoden, mit denen transgene Tiere effizient hergestellt und identifiziert werden können, außerdem müssen in diesen Tieren ausreichende Mengen des krankheitsassoziierten Proteins exprimiert werden. Vor kurzem wurde ein System vorgestellt, mit dem die Integrationseffizienz eines genetischen Konstrukts in das Genom des Zebrafischs deutlich erhöht werden kann. Es basiert auf einem mobilen genetischen Element, einem Transposon, welches aus dem *Medaka*-Fisch stammt und aus einem Enzym, der Tol2-Transposase, und zwei DNS-Stücken, den Tol2-Sequenzen besteht. Die Tol2-Transposase erkennt die Tol2-Sequenzen und kann sie gemeinsam mit dem zwischen ihnen liegenden DNS-Stück in einen anderen DNS-Strang, also z.B. in ein Zebrafischchromosom einbauen. Tol2-Transposase oder Tol2-Sequenzen kommen Wildtyp-Zebrafischen nicht vor. Man kann daher ein Transgen in das Zebrafischgenom einbringen, indem man es mit Tol2-Sequenzen flankiert und gemeinsam mit der aktiven Tol2-Transposase in Fischeier injiziert. Dies führt etwa bei jedem dritten bis fünften injizierten Ei zum erfolgreichen Einbau der fremden DNS an einer oder mehreren zufälligen Stellen im Genom (Kawakami, 2005). Das Tol2-System wurde zusätzlich mit dem Gal4/UAS-System kombiniert, welches die Effizienz der Proteinexpression erhöht. Das System wird bereits seit vielen Jahren erfolgreich angewendet, um transgene *Drosophila*-Fliegen zu erzeugen (Duffy, 2002). Es wurde ursprünglich entwickelt, um in transgenen Fliegen fremde Gene von endogenen Promotoren gesteuert zu exprimieren. Hierfür wurde das Gal4-Gen, welches den aus Hefe isolierten transkriptionellen Aktivator Gal4 codiert, an vielen verschiedenen zufälligen Stellen ins Genom der Fliegen eingebaut. Dadurch wurde Gal4 in manchen Fällen unter der Kontrolle eines endogenen Promotors exprimiert (Brand and Perrimon, 1993).



**Abbildung 13: Zebrafische als Krankheitsmodelle und zur Entwicklung von Wirkstoffen**

(A) Generationszyklus des Zebrafisches: Nach 24-stündiger Entwicklung sind alle wesentliche Organe ausgebildet, nach wenigen Tagen können die Larven komplexe Verhaltensweisen ausführen, nach etwa drei Monaten sind sie geschlechtsreif und können selbst Nachkommen produzieren (Wolpert et al., 1999).

(B-C) Seitenansicht einer transgenen, 96 Stunden alten Zebrafischlarve, die das Fluoreszenzprotein DsRed im Nervensystem exprimiert, im Hellfeld (B) und unter Fluoreszenzbeleuchtung (C) (nach Paquet et al., 2009).

(D) Schema eines chemischen Screens: Adulte Zebrafische werden gekreuzt, um Embryonen zu gewinnen, die eine Krankheits-assoziierte Pathologie aufweisen. Diese können dann mit verschiedenen Substanzen inkubiert und auf eine Veränderung des Phänotyps untersucht werden. Auf diese Weise können potenzielle Wirkstoffe identifiziert werden, die in einem lebenden Organismus den Krankheits-assoziierten Phänotyp verändern können. Zebrafische eignen sich als einzige Wirbeltieren für die großangelegte Suche nach neuen Wirkstoffen, z.B. im gezeigten 96-well Format (nach Zon and Peterson, 2005).

Durch Fusion von Gal4 mit dem VP16-Transkriptionsaktivator des Herpes simplex Virus 1 (Sadowski et al., 1988) konnte die Aktivierung der Expression weiter verstärkt werden. Gal4-VP16 exprimierende Tiere konnten dann mit Tieren gekreuzt werden, die ein Transgen unter Kontrolle der Expressionsaktivatorsequenz UAS (*upstream activation sequence*) enthielten. Das Gal4-VP16 Fusionsprotein bindet selektiv an UAS und aktiviert die Expression von Genen, die neben der UAS-Sequenz liegen. Da mehrere Gal4-VP16-Aktivatoren an die UAS-Sequenz binden können, wird die Proteinexpression verstärkt. Durch die Trennung von Promotor und dem zu exprimierenden Gen auf unterschiedliche Transgene können durch einfache Kreuzungen der Tiere verschiedene Gal4- und UAS-Transgene miteinander kombiniert werden. Die hierdurch hergestellten transgenen Linien exprimieren dann ein oder mehrere gewünschte Proteine in großen Mengen in verschiedenen Geweben (Brand and Perrimon, 1993; Duffy, 2002). Man kann mit diesem System auch eine gezielte, Zelltyp-spezifische Genexpression erreichen, indem man die Expression von Gal4-VP16 durch einen bereits isolierten und charakterisierten Gewebe-spezifischen Promoter steuern lässt. Dieser Promoter muss dann vor Gal4-VP16 kloniert und als eigenes Transgen in Tiere eingeführt werden. Die Expression des neben der UAS-Sequenz liegenden Zielgens wird dann nur in Geweben eingeschaltet, in denen der Promoter aktiv ist.

Die Verwendung des Gal4/UAS-Systems wurde zum ersten Mal vor 10 Jahren in Zebrafischen beschrieben (Scheer and Campos-Ortega, 1999). Allerdings wurden seitdem kaum weitere Anwendungen publiziert, vermutlich aufgrund von Schwierigkeiten bei der effizienten Herstellung transgener Linien. Dies änderte sich erst vor kurzem, als die Gal4/UAS-Expressionstechnik mit der effizienten Herstellung transgener Linien durch das Tol2-Transposon kombiniert wurde (Scott et al., 2007; Asakawa et al., 2008). Allerdings wurde die Kombination aus Tol2 und Gal4/UAS bisher nur für die Herstellung von Reporterlinien genutzt, aber nicht für die gezielte Expression Krankheits-

assoziierter Gene über einen charakterisierten Promoter (Scott et al., 2007; Asakawa et al., 2008).

Tauopathien wurden in Zebrafischen bisher von zwei Gruppen studiert. Zunächst wurde das menschliche Tau-Protein mit der P301L-Mutation als Fusionsprotein mit GFP transient exprimiert, indem DNS injiziert und die Expression direkt in den injizierten Larven studiert wurde. Durch diesen Ansatz konnte Tau in einigen Nervenzellen der Zebrafischlarven untersucht werden, es wurde außerdem gezeigt, dass Tau-P301L am PHF1-Epitop phosphoryliert wird. Andere Epitope wurden nicht untersucht. Allerdings wurden durch diesen Ansatz keine stabil transgenen Fische hergestellt (Tomasiewicz et al., 2002). Die Erzeugung einer großen Zahl transgener Fische mit stabiler und vergleichbarer Tau-Expression ist aber eine wesentliche Voraussetzung für eine umfassende phänotypische Analyse der Pathologie und die Anwendung des Tiermodells für chemische oder genetische Screens. Außerdem verhindert die zeitlich begrenzte transiente Expression eine Analyse des Phänotyps in älteren Larven oder adulten Fischen. Um die Expression des Tau-Proteins in den Fischen zu visualisieren wurde dieses mit dem Fluoreszenzprotein GFP fusioniert. Obwohl diese Methode das Protein in lebenden Fischen unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar macht, beeinflusst die Fusionierung das Aggregationsverhalten. Da GFP ein Dimer bildet und bei Überexpression selbst zur Aggregation neigt (Tsien, 1998), können mit diesem Ansatz keine Rückschlüsse auf die natürliche Aggregation des Tau-Proteins gezogen werden.

In einer weiteren Veröffentlichung wurden transgene Fische präsentiert, welche das Tau-Protein in Nervenzellen des Zebrafischs unter Kontrolle des Zebrafisch-Enolase2-Promoters exprimieren. Mit diesem Ansatz konnte zwar die stabile Expression von Tau im Nervensystem erreicht werden, allerdings wurden keine Merkmale der Tau-Pathologie, wie z.B. Hyperphosphorylierung oder die Bildung von Aggregaten nachgewiesen (Bai et al., 2007). Außerdem konnte die Expressionsmenge und der Expressionsort des Tau-Transgens nur

in fixierten Fischen durch Färbung nachgewiesen werden, was Experimente am lebenden Tier erschwert. Diese Ergebnisse zeigen, dass weiterhin Bedarf für ein transgenes Zebrafischmodell besteht, in dem durch die Expression ausreichender Mengen des Tau-Proteins eine möglichst schnell sichtbare Pathologie auftritt. Dieses frühe Auftreten von Phänotypen erleichtert *in-vivo*-Experimente und die Durchführung chemischer und genetischer Screens, da nur dann die praktischen Vorteile der Zebrafischlarven, wie die kleine Körpergröße und die Transparenz der Gewebe ausgenutzt werden können.

### **1.6 Zielsetzung der Arbeit**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Etablierung Tau-transgener Zebrafische als neues Tiermodell zur Erforschung neurodegenerativer Erkrankungen am Beispiel der Tauopathien. Die transgenen Fische sollen das menschliche Tau-Protein mit der Demenz-assoziierten Mutation P301L in ihrem Nervensystem in hohen Mengen exprimieren, um die Pathogenese zu beschleunigen und bereits in Larvalstadien Tauopathie-artige Phänotypen hervorzurufen. Außerdem ist erwünscht, die Expression des Transgens mit Hilfe eines zusätzlich exprimierten fluoreszierenden Reporterproteins sichtbar zu machen.

Zu Beginn dieser Arbeit war kein Vektorsystem bekannt, mit dem humane Gene in effizienter Weise gemeinsam mit einem Fluoreszenzmarker in transgenen Zebrafischen exprimiert werden konnten. Der erste Schritt besteht daher darin, Vektoren zu entwickeln, zu klonieren und zu testen, welche die gemeinsame Expression von Tau-P301L und einem Fluoreszenzprotein ermöglichen. Dann sollen mit diesen Vektoren transgenen Fische hergestellt und charakterisiert werden. Dabei soll zunächst festgestellt werden, ob die Transgene stabil ins Genom der Fische integriert wurden und wie sie über mehrere Generationen exprimiert und weiter vererbt werden. Anschließend soll untersucht werden, ob und wann in den transgenen Fischen Tau-Pathologie auftritt. Diese Pathologie soll mit histologischen und biochemischen Methoden charakterisiert werden, insbesondere hinsichtlich



der Phosphorylierung, Fehlfaltung und Aggregation des Tau-Proteins. Außerdem sollen eventuell vorhandene Veränderungen der neuronalen Morphologie und des Verhaltens der Fische studiert werden.

Abschließend soll noch an Beispielen demonstriert werden, inwieweit sich die Vorteile des Zebrafisches für Experimente am lebenden Tier ausnutzen lassen. Hierbei soll zum einen die Eignung des neuen Tiermodells gezeigt werden, degenerative Prozesse am lebenden Tier zu beobachten. Zum anderen soll nachgewiesen werden, dass die Phänotypen der transgenen Fische durch Behandlung mit chemischen Substanzen verändert werden können, was die Grundlage für spätere chemische Screens darstellt.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zebrafischlinien

Die Wildtyp-Linie AB (George Streisinger, Institute of Neuroscience, University of Oregon, USA) wurde zur Herstellung transgener Linien und für Inhibitorexperimente verwendet. Die transgenen Fische wurden mit der Wildtyp-Linie TLF (C. Nüsslein-Volhard, MPI für Entwicklungsbiologie, Tübingen) ausgekreuzt, um Inzuchteffekte zu vermeiden.

#### 2.1.2 Vektoren und Plasmide

Vektor	Insert:	Herkunft (Referenz):
pBS_E1b_UAS_E1b_GFP_pA	E1b-UAS-E1b	Reinhard Köster, HelmholtzZentrum München (Koster and Fraser, 2001)
pBS_HuC_Gal4-VP16	HuC Promoter, Gal4-VP16	Reinhard Köster, HelmholtzZentrum München (Koster and Fraser, 2001)
pBS_I-SceI	-	Reinhard Köster, HelmholtzZentrum München
pBS_αTub_Gal4-VP16	αTub Promoter, Gal4-VP16	Reinhard Köster, HelmholtzZentrum München (Koster and Fraser, 2001)
pBS-DEST_attR1-2	attR1-2	P. Lemaire, IBDML, Marseille, France
pcDNA3.1neo_aSyn	Alpha-Synuclein	Philipp Kahle, LMU München
pcDNA3.1neo_hPS1-L166P	hPS1-L166P	Harald Steiner, LMU München (Moehlmann et al., 2002)
pCR8/TOPO/GW	-	Invitrogen, Karlsruhe
pCS-TP	Tol2 Transposase	K. Kawakami, National Institute of Genetics, Shizuoka, Japan (Urasaki et al., 2006)
pCS2+	-	R. Rupp, LMU München ( <a href="http://sitemaker.umich.edu/dlturner.vectors/">http://sitemaker.umich.edu/dlturner.vectors/</a> )
pCS2+_APPswe	APPswe	Matthias Teucke, LMU München (Citron et al., 1992)
pCS2+_dN-GSK3β	dN-GSK3β	R. Rupp, LMU München
pCS2+_DsRed.T4	DsRed.T4	Timm Schröder, HelmholtzZentrum München (Nagai et al., 2002)

pCS2+_GFP	GFP	Reinhard Köster, HelmholtzZentrum München
pCS2+_GSK3 $\beta$	GSK3 $\beta$	R. Rupp, LMU München
pNG2htau40/P301L	htau40/P301L	Eva-Maria Mandelkow, MPI Hamburg
pT2KXIGdeltaIN	Tol2 Sequenzen	K. Kawakami, National Institute of Genetics, Shizuoka, Japan (Urasaki et al., 2006)

### 2.1.3 PCR-Primer

Alle Primer wurden bei Thermo Scientific (Ulm) synthetisiert. Angegeben ist stets die Sequenz in 5'-3'-Richtung.

Actin-F	TGTTTTCCCCTCCATTGTTGG
Actin-R	TTCTCCTTGATGTCACGGAC
BS-1	AACAAAAGCTGGAGCTCCACCG
Gal4-R	GGTCTTCTCGAGGAAAAATCAG
hTAU ATG-F BamHI/NcoI	GGGATCCCATGGCTGAGCCCCGCCAGGA
hTAU TAG-R EcoRI	GGAATTCATGGTCACAAACCCTGCTTGGCTA
HuC 3'F	TGGCGAAGACTGTCCTTTTT
HuC-F XhoI/EcoRI	GCTCGAGGAATTCACTAATTTGAATTTAAATGC
HuC-R2 EcoRI/ClaI	GGAATTCATCGATTCTTGACGTACAAAGATGATATTGATCTAGG
M13-FP	TGTTAAACGACGGCCAGT
pCS2+ poly(A)-F SacII	AAAAAACCGCGGAGTCGTATTACGTAGATCCAGACATGA
pCS2+ poly(A)-R SacI	AAAGAGCTCCACACCTCCCCCTGAAC
TAU-IR	GTGGCGATCTTCGTTTTACCAT
TAU-OF	AGGAGTTCGAAGTGATGGAAGAT
TYR-1	AAGGCTCTTGATACGAGTACGCC
$\alpha$ Tub-R	GGCAGCTGTGAAGAAAAAG

### 2.1.4 Bakterienstämme

Stamm:	Herkunft:
DH5 $\alpha$ E.coli competent cells	Invitrogen
One Shot TOP10 E.coli cells	Invitrogen
One Shot ccdB Survival T1 Phage-Resistant cells	Invitrogen

### 2.1.5 Antikörper

Die folgenden Antikörper wurden für Immunfluoreszenz- (IF), immunhistochemische Färbungen (IHC) und Western Blots (WB) verwendet:

Antikörper:	Verdünnung:	Herkunft (Referenz):
Tau T46	IF: 1:200, WB: 1:1000	Invitrogen, Karlsruhe (Kosik et al., 1988)
Tau K9JA	IF: 1:500, WB: 1:5000	Dako Nr. A0024, Hamburg
Tau DA9	IHC: 1:250	P. Davies, Albert-Einstein-College, New York, USA
Tau AT8	IF: 1:200, IHC: 1:50, WB 1:1000	Pierce, Bonn (Biernat et al., 1992)
Tau pS422	IF: 1:200, WB: 1:1000	C. Czech, Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland (Hasegawa et al., 1996)
Tau AT180	IF: 1:200, WB: 1:1000	Pierce, Bonn (Goedert et al., 1994)
Tau AT270	IF: 1:200, WB: 1:1000	Pierce, Bonn (Goedert et al., 1994)
Tau 12E8	IF: 1:200, WB: 1:1000	P. Seubert, Elan Pharmaceuticals, San Francisco, USA (Seubert et al., 1995)
Tau MC1	IF: 1:50	P. Davies (Jicha et al., 1999)
Tau PHF1	IF: 1:100, WB 1:1000	P. Davies (Greenberg et al., 1992)
DsRed	IF: 1:200	Clontech, Heidelberg
Znp-1	IF: 1:100	DSHB, Iowa City, USA (Trevarrow et al., 1990)
$\alpha$ Syn 15G7	IF: 1:200, WB: 1:1000	E. Kremmer, HelmholtzZentrum München
Syn 303	IF: 1:200, WB: 1:1000	V. Lee, University of Pennsylvania, USA (Sampathu et al., 2003)
$\alpha$ Syn #64	IF: 1:200, WB: 1:1000	T. Iwatsubo, University of Tokio, Japan (Fujiwara et al., 2002)
Actin	WB: 1:1000	Sigma, Taufkirchen
APP 6E10	IF: 1:100	Signet Laboratories, Dedham, USA
PS1 3027	IF: 1:100	Harald Steiner, LMU München (Walter et al., 1997)
Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG	IF: 1:500	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa Fluor 546 goat anti-rabbit IgG	IF: 1:500	Invitrogen, Karlsruhe

### 2.1.6 Chemikalien

Nicht spezifisch aufgeführte Chemikalien wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) oder Sigma (Taufkirchen) mit dem Reinheitsgrad p.a. bezogen. Alle Lösungen wurden mit voll entsalztem H<sub>2</sub>O angesetzt, das mit einer Milli-Q Anlage zur bidest. Qualität aufgereinigt wurde (elektrischer Widerstand >18.2 MΩ cm bei 25°C).

#### 2.1.6.1 Molekularbiologie

Ampicillin	Boehringer Mannheim
Kanamycin	Boehringer Mannheim
Spectinomycin	Boehringer Mannheim
Chloramphenicol	Boehringer Mannheim
Bacto Agar	Difco Laboratories, Heidelberg
Hefeextrakt	Difco Laboratories, Heidelberg
Pepton	Difco Laboratories, Heidelberg
Trypton	Difco Laboratories, Heidelberg
Clonase II Enzyme Mix	Invitrogen, Karlsruhe
DNase I	Fermentas, St. Leon-Rot
Klenow Fragment	Fermentas, St. Leon-Rot
PEG 4000	Fermentas, St. Leon-Rot
Pfu-Polymerase	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Schwalbach
Shrimp-Alkaline-Phosphatase	Roche Diagnostics, Mannheim
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Schwalbach
Taq DNA Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim
Referenzproteine für SDS-Page: See Blue Plus2	Invitrogen, Karlsruhe
DNA-Längenstandards: Fast Ruler DNA-Leiter: High / Middle / Low DNA Ladder Mix	alle Fermentas, St. Leon-Rot

*2.1.6.2 Lösungen und Puffer*

Bei Prozentangaben handelt es sich bei der Lösung von Feststoffen in Flüssigkeiten um Gewichtsprozent, bei der Mischung von Flüssigkeiten um Volumenprozent, soweit nichts anderes angegeben ist.

1% Agarose	1x TBE 1% Agarose (für Molekularbiologie)
10x Laufpuffer	29 g Tris 144 g Glycin mit dH2O auf 1l auffüllen verdünnen auf 1x mit dH2O
10x PCR-Puffer	15 mM MgCl <sub>2</sub> 200 mM NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub> 750 mM Tris-HCl pH 9.0 0,1% Tween-20
10x TBE	900 mM Tris 900 mM Borsäure 20 mM EDTA in dH2O, pH 8,0 verdünnen auf 1x mit dH2O
10x TBS	60,6 g Tris 73,1 g NaCl mit dH2O auf 1l auffüllen, pH 7.6
1x TBST	10 % 10x TBS 0,1% Tween-20 in dH2O
4% PFA zum Fixieren	4% Paraformaldehyd 2-3 h auf Heizplatte in PBST einrühren und einfrieren
4x Laemmli-Puffer	4 ml 20 % SDS 4 ml Glycerin Prise Bromphenolblau 1 ml Mercaptoethanol 1,25 ml 1 M Tris pH 6.7 mit dH2O auf 1l auffüllen
50.000x Ethidiumbromid	10 mg/ml in dH2O
6x DNA-Ladepuffer	30 % Glycerin 0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylen Cyanol FF in dH2O
Acridine Orange Färbelösung	3 µl Acridine Orange Stocklösung in 1ml E3 Embryomedium 1 % Tricain

Acridine Orange Stocklösung	3 mg/ml Acridine Orange in dH <sub>2</sub> O
Acrylamid-Lösung	40 % Acrylamid-BIS-Acrylamid 37,5:1 in dH <sub>2</sub> O
Ammoniumpersulfat Lösung (APS)	10 % Ammoniumpersulfat in dH <sub>2</sub> O
DEPC-dH <sub>2</sub> O	2 µl Diethylpyrocarbonat 1 l dH <sub>2</sub> O bei 37°C ÜN inkubieren autoklavieren 20 min 120 °C, aliquotieren
NCST	10% NCS (newborn calf serum) 1% DMSO in 1x PBST lagern bei -20°C
PBS	140 mM NaCl 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,75 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in dH <sub>2</sub> O, pH 7.4 autoklavieren 20 min 120 °C
PBST	1x PBS 0,1 % Tween-20
PCR-Mix	200 µl 10x PCR-Puffer je 8µl 100 mM dATP, dGTP, dTTP, dCTP 1210 µl dH <sub>2</sub> O
Saccharosepuffer	30% Saccharose in PBST
Sammelgel-Puffer	0,5 M Tris pH 6,8 0,4 % SDS in dH <sub>2</sub> O
TBST/Milchpulver	1x TBS 3% Milchpulver
TE pH 8.0	10 mM Tris pH 8.0 1 mM EDTA pH 8.0 in dH <sub>2</sub> O
Transferpuffer	30,3 g Tris 144 g Glycin mit dH <sub>2</sub> O auf 1 l auffüllen, pH 8.3 verdünnen auf 1x mit dH <sub>2</sub> O
Trenngel-Puffer	1,5 M Tris pH 8,8 0,4 % SDS in dH <sub>2</sub> O



**2.1.6.3 Medien**

Alle Medien zur Anzucht von Bakterien wurden nach dem Ansetzen für 20 min bei 120°C in einem Tuttnauer 3850 EL Autoklav sterilisiert, um Wachstum von unerwünschten Mikroorganismen zu vermeiden. Antibiotika (Endkonzentrationen: Ampicillin 100 µg/ml, Chloramphenicol 34 µg/ml, Kanamycin 30 µg/ml, Spectinomycin 100 µg/ml) wurden steril filtriert und nach dem Autoklavieren zu den abgekühlten Medien gegeben.

E3-Embryomedium	5 mM NaCl 0,17 mM KCl 0,33 mM CaCl <sub>2</sub> 0,33 mM MgSO <sub>4</sub> 0,1% Methylenblau
LB-Agar	1,5 % Bacto Agar 1 % Bacto Trypton 0,5% Hefeextrakt 17,25 mM NaCl in dH <sub>2</sub> O
LB-Medium	1 % Bacto Trypton 0,5% Hefeextrakt 17,25 mM NaCl in dH <sub>2</sub> O
SOC-Medium	2 % Bacto Trypton 0,5% Hefeextrakt 8,6 mM NaCl 2,5 mM KCl in dH <sub>2</sub> O, 20 mM Glucose (Zugabe nach dem Autoklavieren)

**2.1.6.4 Kinaseinhibitoren**

Lithiumchlorid p.A.	Sigma, Saint Louis, USA
SB-216763	Sigma, Saint Louis, USA (Cross et al., 2001)
SB-415286	Sigma, Saint Louis, USA (Cross et al., 2001)
AR-164	Ratan Bhat, AstraZeneca, Södertälje, Sweden
AR-534	Ratan Bhat, AstraZeneca, Södertälje, Sweden

### 2.1.7 Kits

Geneclean Kit	Qbiogene/MP, Heidelberg
Lumigen PS-3 detection reagent	GE Healthcare, Chalfont, UK
mMessage Machine Kit	Ambion, Darmstadt
Nucleobond AX500	Macherey Nagel, Düren
NucleoSpin Extract II	Macherey Nagel, Düren
NucleoSpin Plasmid Mini/Midi	Macherey Nagel, Düren
pCR®8/GW/TOPO® TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Vectastain ABC Elite Kit	Vector Labs, Peterborough, England

### 2.1.8 Geräte und Verbrauchsmaterialien

#### 2.1.8.1 Allgemein

Agarosegeldokumentationseinheit	Intas Göttingen
Analysenwaage (Analytical+)	Ohaus, Frankfurt
Autoklav (Tuttnauer 3850 EL)	Systec, Wettenberg
Bunsenbrenner (Vulcan)	Heraeus, Hanau
Deckglas standard 21 x 26 cm	Menzel Gläser, Braunschweig
Einwegauslaufpipetten (25 ml, 10 ml, 5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Einwegküvetten (10 x 11x 45 mm)	Sarstedt, Nümbrecht
Elektrophoresekammer Protein Mini-PROTEAN 3	Bio-Rad, Hercules, USA
Elektrophoresekammern DNA	Peqlab, Erlangen
Feinwaage (Standard)	Ohaus, Frankfurt
Filmentwicklungsgerät (Curix 60)	Agfa, München
FluorChem 8900	Alpha Innotech, San Leandro, USA
Gefrierschrank -20°C	AEG, Nürnberg
Gefrierschrank 80°C (HFU 80)	Heraeus, Hanau
Gel Transfer Filterpapier	Schleicher&Schuell, Dassel
Immobilon-P (PVDF Transfer Membran)	Millipore, Billerica, USA
Kühlschrank 4°C	AEG, Nürnberg
Kühlzentrifuge (J2-21)	Beckman, Krefeld
Kühlzentrifuge (Megafuge 1.0R)	Heraeus, Hanau
Kühlzentrifuge für Reaktionsgefäße (Biofuge fresco)	Heraeus, Hanau
Laborflasche 50, 100, 500, 1000 ml	Schott, Mainz

Magnetrührer (IKAMAG RCT basic)	IKA Labortechnik, Staufen
Mikrotom Microm HM 560	Thermo Scientific, Walldorf
Mikrowelle	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe
Objekträger standard 76 x 26 cm	Menzel Gläser, Braunschweig
Objekträger Superfrost plus 76 x 26 cm	Menzel Gläser, Braunschweig
pH-Elektrode (Blueline 23 pH)	Schott, Mainz
pH-Meter (Inolab pH Level 1)	WTW, Weilheim
Photometer (Jasco V550)	Jasco, Groß-Umstadt
Pinzetten Dumont No. 5, 55	NeoLab, Heidelberg
Pipetten 1000, 200, 100, 10 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen (1 ml, 200 µl, 20 µl, 2 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettierhilfe (Accu-Jet)	Brand, Wertheim
Quarzküvetten (10 x 10 x 45 mm)	Hellma, Müllheim
Reaktionsgefäße (50 ml, 15 ml, 2 ml, 1,5 ml, 0,2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Röntgenfilme Fujifilm SuperRX	Fujifilm, Tokyo, Japan
Rotoren: TLA-55, TLA-110, Type JA10, Type JA 20	Beckman, Krefeld
Scanner Perfection 4990 Photo	Epson, Meerbusch
Schüttelinkubator (Certomat BS-1)	B. Braun Biotech, Melsungen
Schüttler (KM2)	Edmund Bühler, Hechingen
Sonifier (Cell Disruptor B 15)	Branson, Danbury, USA
Spannungsquelle (Power Pac 300)	Bio-Rad, Hercules, USA
Thermocycler DNA-Engine	Bio-Rad, Hercules, USA
Thermoschüttler (Thermomixer compact)	Eppendorf, Hamburg
Tischultrazentrifuge (Optima Ultracentrifuge)	Beckman, Krefeld
Transferkammer: Mini Trans-Blot	Bio-Rad, Hercules, USA
Ultrazentrifuge (L7-55)	Beckman, Krefeld
Vortex (Vortex Genie 2)	Scientific Industries, Bohemia, USA
Wärmeschrank 28,5°C	Binder, Tuttlingen
Wärmeschrank 37°C	Binder, Tuttlingen
Wasseraufbereitungsanlage (Milli-Q academic)	Millipore, Billerica, USA
Wasserbad mit Schüttelvorrichtung	GFL, Burgwedel
Zentrifuge für Reaktionsgefäße (Biofuge pico)	Heraeus, Hanau

## 2.1.8.2 Mikroskopie und Bildbearbeitung

Stereomikroskop Zeiss Stemi 2000-C	Carl Zeiss, Jena
Fluoreszenz-Stereomikroskop Leica MZ16FA	Leica, Bensheim
Mikroskop Zeiss Axioplan 2 imaging Objektiv Plan-Neofluar 2,5x/0,075 Objektiv Plan-Neofluar 5x/0,15 Objektiv Plan-Apochromat 10x/0,45 Objektiv Plan-Apochromat 20x/0,75 Objektiv Achroplan 63x/0,95 W Objektiv Plan-Neofluar 100x/1,30 Oil Emissionsfilter DAPI, EGFP, YFP, Rhod Farbkamera AxioCam HRc Software Axiovision 4.0	alle Carl Zeiss, Jena
Konfokales Laser-Scanning Mikroskop Zeiss Axiovert 200M LSM Meta Objektiv Plan-Neofluar 10x/0,3 Objektiv Plan-Apochromat 20x/0,75 Objektiv Plan-Neofluar 40x/1,3 Oil DIC Objektiv Plan-Neofluar 40x/0,85 Pol Objektiv Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIC Objektiv Plan-Apochromat 100x/1.4 Oil DIC Argonlaser: Excitationswellenlänge 488 nm Helium/Neonlaser: Excitationsw.: 543/633 nm Hauptfarbteiler HFT 488/543 Hauptfarbteiler HFT UV/488/543/633 NebenfARBteiler NFT 545 Emissionsfilter BP 505-530 nm (grüner Bereich) Emissionsfilter BP 560-615 nm (roter Bereich) Emissionsfilter LP 560 nm (roter & infraroter Be.) Emissionsfilter LP 650 nm (infraroter Bereich) Software LSM Meta 4.2	alle Carl Zeiss, Jena
iMac Computer ImageJ 1.41 Photoshop CS2 iMovie 7.14	Apple, Cupertino, USA NIH, Bethesda, USA Adobe, München Apple, Cupertino, USA

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Molekularbiologische Methoden**

#### *2.2.1.1 Transformation kompetenter Bakterien*

Die Transformation dient der Aufnahme und Amplifikation von DNS in Form von Vektoren durch *E.coli*. Kompetente Bakterien (50 µl / Reaktionsgefäß) wurden auf Eis aufgetaut und mit 10 µl Ligationsansatz bzw. 20 ng Plasmid-DNS vermischt. Nach Inkubation für 30 min auf Eis wurde die Suspension 2 min bei 42°C inkubiert (Hitzeschock) und anschließend 5 min auf Eis gestellt. Dann wurden 200 µl SOC-Medium ohne Zusatz von Antibiotika zugegeben. Die Kulturen wurden 30 min bei 37°C mit 200 rpm in einem Certomat BS-1 Schüttelinkubator waagrecht geschüttelt und dann auf Antibiotika-haltigen Agarplatten ausplattiert. Die Platten wurden 10-24 h lang bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert.

#### *2.2.1.2 Amplifikation und Präparation von DNS-Vektoren*

LB Flüssigmedium mit Antibiotika als Selektionsmarker wurde mit einzelnen Kolonien von einer Agarplatte inokuliert und über Nacht bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Die Präparation von Plasmid-DNS für analytische Zwecke erfolgte aus einem Kulturvolumen von 2 ml mit dem NucleoSpin Plasmid Mini Kit und für präparative Zwecke aus einem Volumen von 100 ml mit dem NucleoSpin Plasmid Midi Kit nach Anleitung des Herstellers. Isolierte Plasmide wurden zur Kontrolle analytisch verdaut (siehe 2.2.1.5). Die Lagerung erfolgte bei -20°C. Vektoren, die in Zebrafischeier injiziert werden sollten, wurden anschließend zusätzlich mit dem Qbiogene GeneClean Kit nach Herstelleranweisung aufgereinigt.

#### *2.2.1.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren*

Die Konzentration von DNS und RNS wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch (Jasco Photometer) bestimmt. Ein Absorptionswert von 1 bei 260 nm ( $A_{260}$ ) entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger

DNS bzw. 40 µg/ml RNS. Um die Verunreinigung mit Protein abzuschätzen, wurde zusätzlich  $A_{280}$  bestimmt. Der Quotient  $A_{260}/A_{280}$  sollte bei  $1,8 \pm 0,2$  liegen.

#### *2.2.1.4 DNS-Agarosegelelektrophorese*

DNS-Fragmente wurden mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese für analytische und präparative Zwecke entsprechend ihrer Größe im elektrischen Feld aufgetrennt. Die entsprechende Menge Agarose für ein- bis zweiprozentige Gele wurde in der Mikrowelle in TBE-Puffer gelöst, nach Abkühlung wurde Ethidiumbromid mit einer Endkonzentration von 0,2 µg/ml zur Agarosegellösung gegeben. Nach Mischung wurde die Gellösung in die Gelkammer gegossen und der gewünschte Probenastchenkamm wurde eingesetzt. Die DNS-Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/6 Volumen 6fach DNS-Ladepuffer versetzt. Als Laufpuffer diente ebenfalls TBE-Puffer. Die Fragmentgrößen wurden durch Größenvergleich mit Fermentas FastRuler DNS-Größenstandards bestimmt. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 100-180 V für 15-60 min. Die Gele wurden anschließend auf einem Intas Geldokumentationssystem ausgewertet. Für präparative Zwecke wurden DNS-Banden unter abgeschwächter UV-Beleuchtung mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und die DNS mit Hilfe des Macherey-Nagel Extract II-Kit nach Angaben des Herstellers extrahiert.

#### *2.2.1.5 Restriktionsverdau von DNS*

Bei einem Endvolumen von 20 µl enthielt ein analytischer Verdau 0,2-1 µg DNS und 1-5 U Restriktionsenzym, ein präparativer Ansatz enthielt bis zu 5 µg DNS und 10-20 U Restriktionsenzym. Puffer und Temperatur für die DNS-Hydrolyse mit einem, zwei oder drei Restriktionsenzymen wurden nach den Angaben des Enzymherstellers gewählt. Die Inkubationszeit betrug in Abhängigkeit von Enzym, Enzymkonzentration und eingesetzter DNS-Menge 1-12 h. Die DNS-Fragmente wurden im Anschluß mit Hilfe der

Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und falls erwünscht mit dem Macherey-Nagel Extract II-Kit aus dem Gel eluiert.

#### *2.2.1.6 Herstellung von Blunt Ends*

War es bei einer Klonierung nicht möglich, durch geeignete Restriktionsendonukleasen auf einer oder beiden Seiten komplementäre Enden für eine Ligationsreaktion zu erzeugen, konnten beliebige *Sticky Ends* nachträglich mit Hilfe des Klenow Fragments zu *Blunt Ends* modifiziert werden. Hierfür wurde nach Abschluss des Restriktionsverdau ohne Aufreinigung zum Ansatz 50 µM dNTPs und 1 Unit Klenow Fragment hinzugegeben und für 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch weitere 10-minütige Inkubation bei 70°C inaktiviert. Die DNS-Fragmente wurden wie oben beschrieben mittels Agarosegelelektrophorese separiert, extrahiert, aufgereinigt und für Ligationsreaktionen eingesetzt.

#### *2.2.1.7 Dephosphorylierung von DNS-Enden*

Durch Dephosphorylierung der 5'-Phosphatenden mit Hilfe einer alkalischen Phosphatase wurde bei Klonierungen die Religation eines linearisierten Vektors verhindert. Nach der Linearisierung eines Vektors wurde ein 20 µl Restriktionsansatz ohne vorherige Reinigung mit 1 U alkalischer Phosphatase (CIAP) für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch weitere 10-minütige Inkubation bei 70°C inaktiviert. Die DNS-Fragmente wurden mit dem Macherey-Nagel Extract II-Kit aus einem Agarosegel aufgereinigt und für Ligationsreaktionen eingesetzt.

#### *2.2.1.8 Ligation von DNS-Fragmenten*

Ein Ligationsansatz mit einem finalen Volumen von 20 µl enthielt 1-5 U T4 DNS-Ligase, 2 µl 10-fach T4 DNS-Ligase-Puffer, 100-200 ng des linearisierten Vektors, sowie das einzufügende DNS-Fragment in einem 3-molaren Überschuß zum Vektor. Bei Blunt-end Ligationen wurde auch noch 2 µl PEG4000 hinzugegeben. Der Ligationsansatz wurde für eine Stunde bei 20°C

inkubiert, dann wurde die Hälfte des Ansatzes unverdünnt transformiert. Falls am nächsten Tag keine Kolonien gewachsen waren, wurde die andere über Nacht bei 20°C inkubierte Hälfte transformiert.

#### 2.2.1.9 Konstruktion von DNS-Oligonukleotiden (Primern)

Die Sequenzen der verwendeten Primer wurden von GenBank-Einträgen ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank)) bzw. Vektorsequenzen abgeleitet. Sie hatten eine Länge zwischen 18 und 38 Basen und einen GC-Gehalt von 40-60%. Die Schmelztemperaturen ( $T_m$ ) lagen zwischen 50°C und 70°C und konnten näherungsweise durch die Formel  $T_m = 2^\circ\text{C}(\text{A}+\text{T})+4^\circ\text{C}(\text{C}+\text{G})$  berechnet werden. Die Primersequenzen mit optimierten Schmelztemperaturen sowie möglichst geringer Bildung von Dimeren und Haarnadelstrukturen wurden mit Hilfe der Internetseite Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>) bestimmt. Bei einigen Primer wurden am 5'-Ende Sequenzabschnitte für neue Restriktionsschnittstellen eingefügt. Nicht komplementäre Überhänge am 5'-Ende entsprachen maximal einem Drittel der Sequenz.

#### 2.2.1.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (Saiki et al., 1988) wurde zur in vitro Amplifikation doppelsträngiger DNS, zum Einfügen von neuen Restriktionsschnittstellen sowie im Falle der Kolonie-, Identifikations- und Excisions-PCR für analytische Zwecke verwendet. Ein Standard-PCR-Ansatz mit einem finalen Volumen von 20 µl enthielt 4 mM dNTPs (1 mM je dNTP), je 1 µmol/µl der beiden Primer, 100-300 ng Matrizen-DNS, 2,5 U Pfu (*Pyrococcus furiosus*)-DNS-Polymerase oder Taq (*Thermus aquaticus*)-DNS-Polymerase, und 18,5 µl PCR-Mix. Die Amplifikation erfolgte in einem Bio-Rad Thermocycler. Die verwendeten Temperaturzyklen wurden abhängig von der Länge des zu amplifizierenden DNS-Stücks und der Schmelztemperatur der Primer in den Thermocycler einprogrammiert. Nach zweiminütiger Denaturierungsphase bei 95°C wurde folgender, dreiteiliger Zyklus 30- bis 35-mal wiederholt:



- 1) Denaturierung: 30 Sekunden bei 95°C
- 2) Primer-Anlagerung: 30 Sekunden bei 50-70°C  
(je nach Schmelztemperatur des Primers)
- 3) Elongation: 1 Minute / Kilobasenpaar zu amplifizierender  
DNS bei 72°C

Abschließend wurde die Reaktion 5 Minuten bei 72°C inkubiert um alle noch nicht vollständig synthetisierten DNS-Kopien zu vollenden und bis zur weiteren Verarbeitung auf 4°C gekühlt.

Falls die Schmelztemperatur des Primers unbekannt war, oder die PCR-Bedingungen optimiert werden sollten, wurde eine Gradienten-PCR durchgeführt. Bei dieser PCR-Variante wird in horizontaler Reihenfolge in jeder Vertiefung des Thermocyclers die Temperatur des Primer-Anlagerungsschritts etwas erhöht. Auf diese Weise wird der gesamte mögliche Temperaturbereich zwischen 50°C und 70°C zur Primerbindung ausgenutzt und in jeder PCR-Reaktion variiert. Nach Ablauf der PCR kann dann anhand der Qualität der PCR-Produkte die optimale Temperatur bestimmt werden.

Eine weitere PCR-Variante, die Kolonie-PCR, wurde genutzt, um nach Ligation und Transformation diejenigen Bakterienkolonien zu bestimmen, die den gewünschten Vektor enthielten. Hiefür wurden die Kolonien einzeln in einer Platte mit 96 Vertiefungen und 20 µl LB-Medium mit Antibiotikum resuspendiert und 5 µl dieser Suspension in einer weiteren Platte als DNS-Matrize für die PCR eingesetzt. Bei dieser PCR bestimmen die Primer ein PCR-Produkt festgelegter Länge, welches ausschließlich vom gewünschten Vektor amplifiziert werden kann. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. Mit einer positiv getesteten Kolonie-Suspension wurde dann eine Flüssigkultur angeimpft.

Außerdem wurde eine Identifikations-PCR durchgeführt, um zu bestimmen, welche genetischen Konstrukte die transgenen Fische tragen. Hierfür wurden transgene Fische aus der F2-Generation mit Wildtyp TLF-Fischen ausgekreuzt. Die dabei erhaltenen Fischembryonen wurden nach 36 Stunden unter einem

Leica Fluoreszenzmikroskop auf DsRed-Fluoreszenz analysiert und anschließend für mindestens 1 h mit Methanol fixiert. Die DNS der fixierten Fische wurde durch Verdauung mit Proteinase K in TE-Puffer für mindestens 4 h freigesetzt. Anschließend wurde die Proteinase K für 10 min bei 70°C inaktiviert und der Überstand als PCR-Matrize für drei unabhängige PCRs verwendet. Mit diesen PCRs wurde überprüft, ob die DNS intakt und für als PCR-Matrize geeignet ist (Primer Actin-F und Actin-R) und ob das *Driver*-Konstrukt (Primer HuC 3'F und Gal4-R) und/oder das *Responder*-Konstrukt (Primer TAU-OF und TAU-IR) in den transgenen Fischen vorhanden ist (für Konstrukte siehe 2.2.1.12). Die PCR-Produkte der einzelnen Identifikations-PCRs wurden für jeden Embryo einzeln miteinander vermischt und über eine Agarosegelelektrophorese analysiert. Die vorhandenen Banden wurden gezählt und zur Gesamtmenge der Embryonen ins Verhältnis gesetzt.

Bei der Herstellung transgener Fische wurden einige injizierte Embryonen nach 6 bis 8 Stunden mit einer Excisions-PCR auf Aktivität der Tol2-Transposase überprüft. Hierbei wurde mit spezifischen Primern ein Stück aus dem *Driver*- bzw. *Responder*-Vektor amplifiziert, welches nur dann entsteht, wenn die Excision des Transgens durch die Tol2-Transposase funktioniert hat (Kawakami, 2005). Hierfür würden die Primer TYR-1 und BS-1 verwendet, ein PCR-Produkt von etwa 300 Basenpaaren weist dabei auf vorhandene Aktivität der Tol2-Transposase hin.

#### 2.2.1.11 Sequenzierungen

DNS-Sequenzierungen wurden nach der Sanger-Kettenabbruchmethode von der Firma GATC in Konstanz durchgeführt. Die Sequenzen wurden mit dem Programm Contig Express aus dem VectorNTI-Paket von Invitrogen analysiert.

#### 2.2.1.12 Klonierungen zur Erzeugung transgener Fische

Die Konstrukte für die Herstellung transgener Fische wurden zunächst im Vektor pBS\_I-SceI zusammengesetzt, da dieser Vektor aufgrund seiner geringen Anzahl von Schnittstellen im Vektor-Rückgrat besser für multiple

Klonierungen geeignet ist. Anschließend wurde die fertigen Sequenzen mit I-SceI-Verdau und Ligation in pT2KXIGdeltaIN überführt. Hierfür wurde pT2KXIGdeltaIN zunächst mit den Restriktionsenzymen BglIII und XhoI geschnitten um das DNS-Stück zwischen den *Tol2*-Sequenzen zu entfernen, stattdessen wurde eine Klonierkassette mit vielen Schnittstellen (*multiple cloning site*, MCS) eingeführt, die mit PvuII aus dem leeren pBS\_I-SceI geschnitten wurde. Diese MCS, die ursprünglich aus dem Standardvektor pBluescript stammt, ist auf beiden Seiten mit je einer zusätzlichen Schnittstelle für die Meganuklease I-SceI flankiert, welche eine besonders lange, nicht-palindromische Erkennungssequenz besitzt.

Um transgene Fische zu erzeugen, wurden für jeden Fisch zwei verschiedene Konstrukte kloniert. Das *Driver*-Konstrukt enthält hierbei den Neuronenspezifischen Zebrafischpromoter HuC (Park et al., 2000) und den transkriptionellen Aktivator Gal4-VP16 (Koster and Fraser, 2001; Duffy, 2002). Das *Responder*-Konstrukt enthält die Expressions-aktivierende UAS-Sequenz, die an beiden Seiten von E1b-Minimalpromotoren flankiert ist (Reinhard Köster, HelmholtzZentrum München, unpubliziert). Auf der einen Seite von UAS befindet sich zudem das Fluoreszenzprotein DsRed als Reporter für die Expression und auf der anderen Seite das humane Tau-Gen mit der Mutation P301L.

*Driver-Konstrukt:* Das SV40-late-polyA-Signal wurde mittels PCR mit den Primern pCS2+ poly(A)-F SacII und pCS2+ poly(A)-R SacI aus dem Vektor pCS2+ amplifiziert, mit SacI/SacII verdaut und in den ebenfalls mit diesen Enzymen geschnittenen Vektor pBS\_I-SceI ligiert. Dieser Vektor wurde pBS\_I-SceI\_pA genannt. Der neuronale HuC-Promoter wurde ebenfalls mittels PCR mit den Primern HuC-F XhoI/EcoRI und HuC-R2 EcoRI/Clal aus dem Vektor pBS\_HuC\_Gal4-VP16 amplifiziert, mit XhoI/Clal geschnitten und in den ebenso geschnittenen Vektor pBS\_I-SceI\_pA ligiert. Dieser Vektor wurde pBS\_I-SceI\_HuC\_pA genannt. Gal4-VP16 wurde mit BamHI/SnaBI aus dem Vektor pBS\_HuC\_Gal4-VP16 geschnitten, die Enden wurden aufgefüllt und es

wurde in den mit EcoRV/SnaBI geöffneten Vektor pBS\_I-SceI\_HuC\_pA ligiert. Dieser Vektor wurde pBS\_I-SceI\_HuC\_Gal4-VP16\_pA genannt. Das HuC-Gal4-VP16-pA-Fragment wurde mit I-SceI ausgeschnitten und in den Vektor pT2KXIGdeltaIN transferiert. Das fertige *Driver*-Konstrukt wurde pT2d\_HuC\_Gal4-VP16\_pA genannt (Abbildung 14).

*Responder-Konstrukte:* Es wurden zwei *Responder*-Konstrukte hergestellt, um zwei verschiedene transgene Fische zu erzeugen, die entweder Tau und DsRed exprimieren, oder nur DsRed. Letztere können dann zur Kontrolle der Experimente als Vergleichsfische verwendet werden. Für die nur DsRed exprimierenden Fische wurde ein Konstrukt verwendet, bei dem die Expression von Tau durch Insertion eines 200 Basenpaare langes DNS-Stückes (*Insert*, INS) zwischen E1b-Minimalpromoter und Tau-Gen blockiert wurde. DsRed.T4 wurde mit NcoI/SnaBI aus dem Vektor pCS2+\_DsRed.T4 geschnitten und in den ebenso verdauten Vektor pBS\_E1b\_UAS\_E1b\_GFP\_pA anstelle von GFP eingesetzt. Der Vektor wurde pBS\_E1b\_UAS\_E1b\_DsRed.T4\_pA genannt. Humanes Tau wurde zusammen mit dem die Expression blockierenden INS mit BglII/BamHI aus pNG2htau40/P301L ausgeschnitten und an der BamHI-Schnittstelle von pBS\_I-SceI\_pA inseriert. Dieser Vektor wurde pBS\_I-SceI\_INS\_hTAU-P301L\_pA genannt. E1b-UAS-E1b-DsRed-pA wurde mit HindIII/SmaI aus dem Vektor pBS\_E1b\_UAS\_E1b\_DsRed.T4\_pA herausgeschnitten. Dann wurden die Enden aufgefüllt und das Fragment wurde in pBS\_I-SceI\_INS\_hTAU-P301L\_pA inseriert, welches vorher mit einem EcoRV-Verdau geöffnet wurde. Dieser Vektor wurde pBS-I-SceI\_pA\_DsRed.T4\_E1b\_UAS\_E1b\_INS\_hTAU40-P301L\_pA genannt. Die gesamte Expressionskassette wurde mit I-SceI-Verdau und Ligation in den Vektor pT2KXIGdeltaIN übertragen (Abbildung 15). Das fertige *Responder*-Konstrukt pT2d\_pA\_DsRed.T4\_E1b\_UAS\_E1b\_INS\_hTAU40-P301L\_pA wurde zusammen mit dem *Driver*-Konstrukt pT2d\_HuC\_Gal4-VP16\_pA verwendet, um transgene Zebrafische Tg(HuC::Gal4/UAS-DsRed) herzustellen.

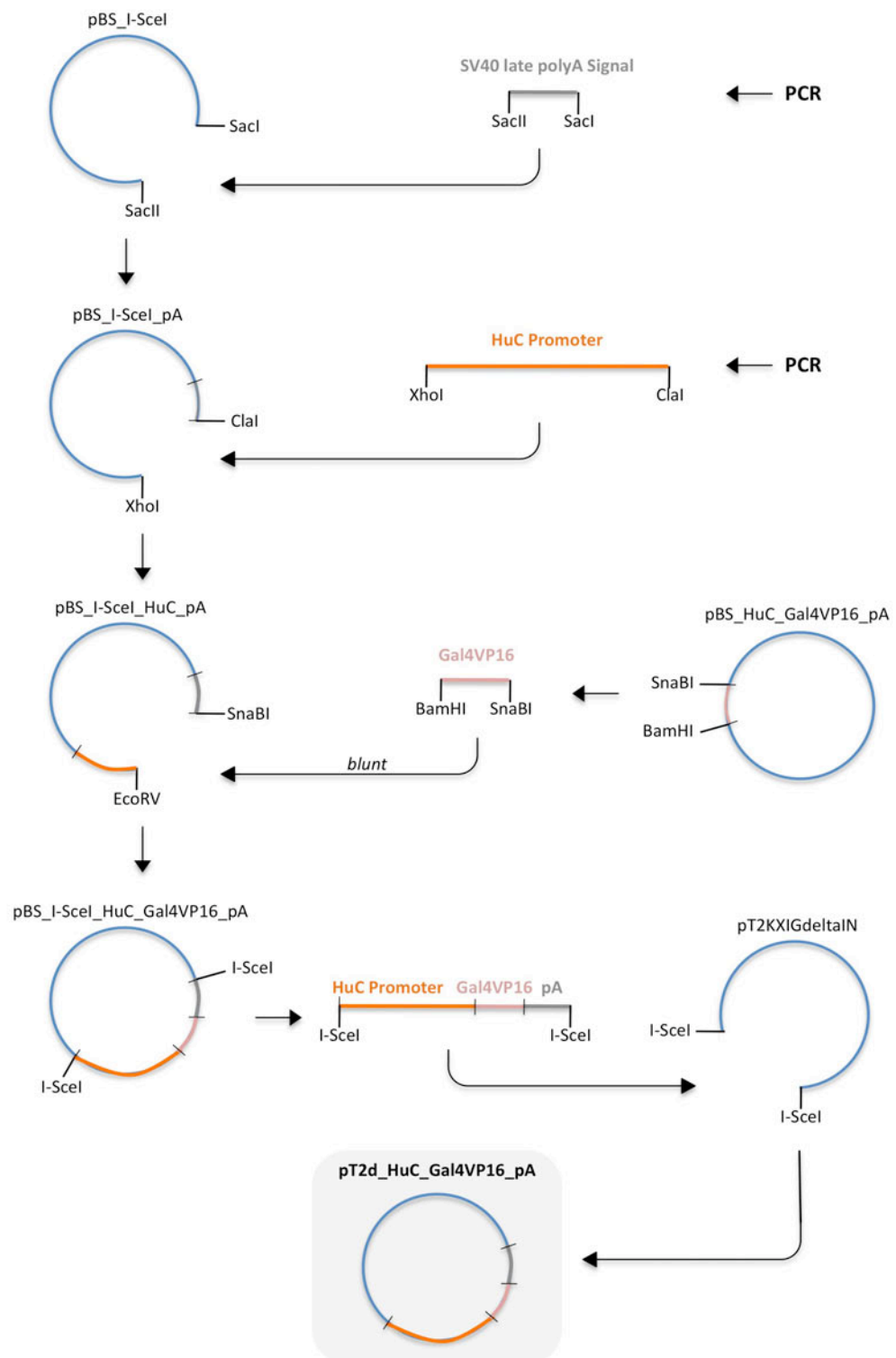
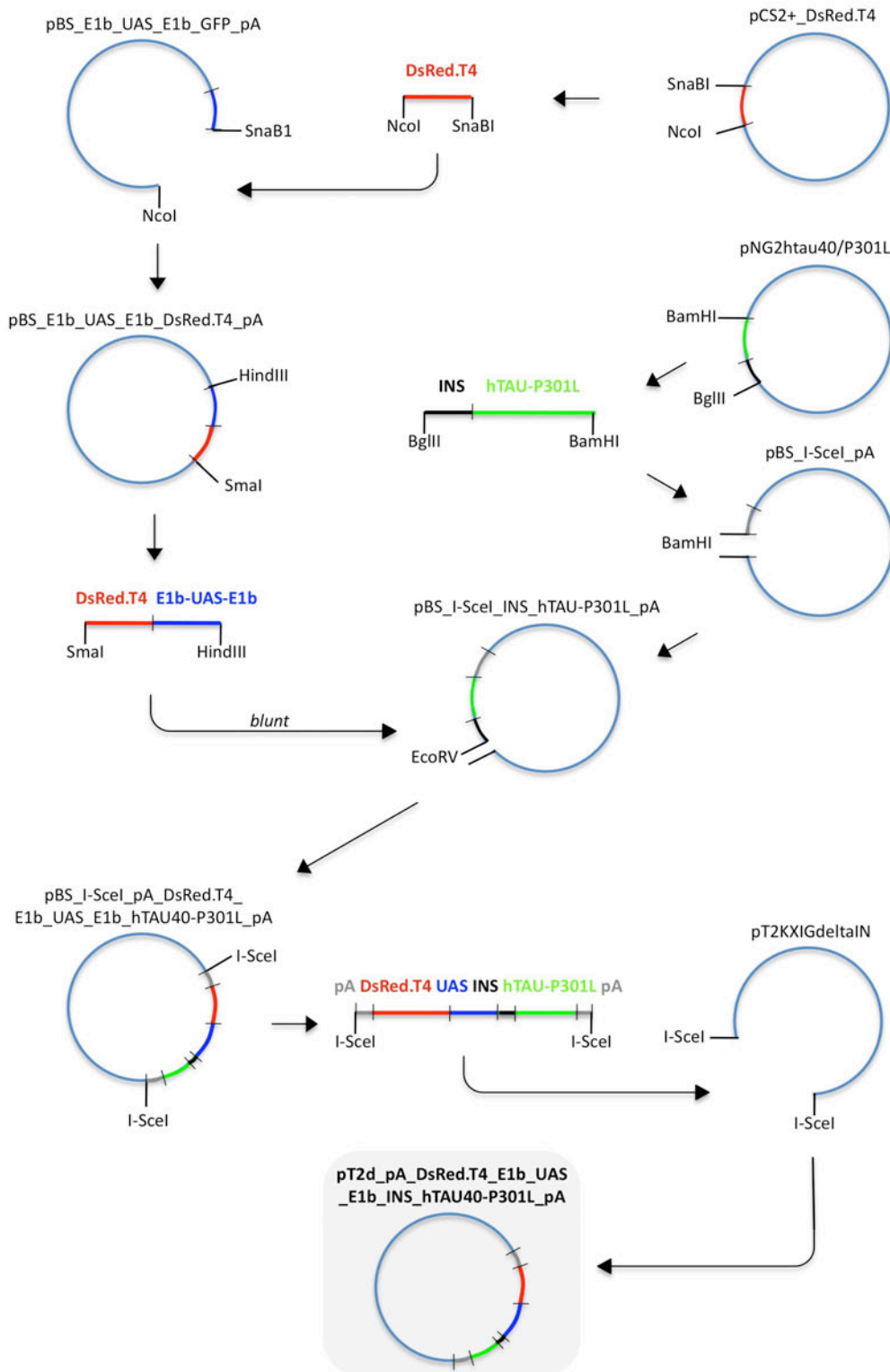
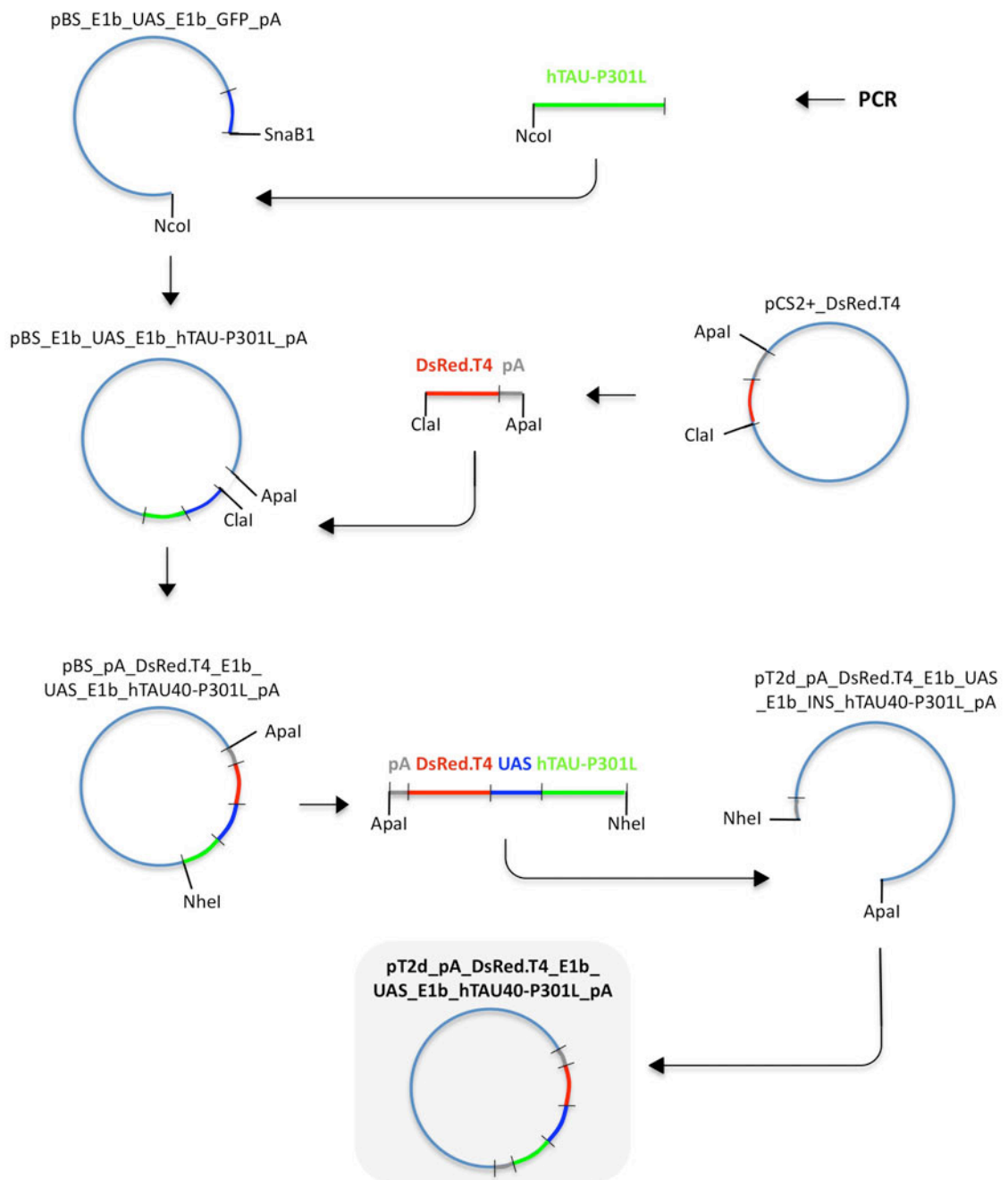


Abbildung 14: Klonierung des *Driver*-Konstrukts

A



**B**



**Abbildung 15: Klonierung der Responder-Konstrukte**

(A) pT2d\_pA\_DsRed.T4\_E1b\_UAS\_E1b\_INS\_hTAU40-P301L\_pA

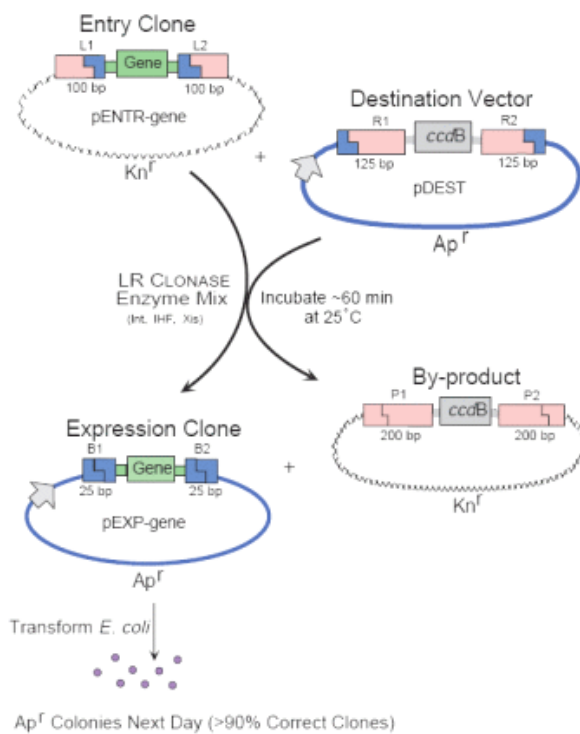
(B) pT2d\_pA\_DsRed.T4\_E1b\_UAS\_E1b\_hTAU40-P301L\_pA

Für die Tau- und DsRed-exprimierenden Fische wurde hTau-P301L mittels PCR mit den Primern hTAU ATG-F BamHI/NcoI und hTAU TAG-R EcoRI aus dem Vektor pNG2htau40/P301L amplifiziert und mit NcoI verdaut. Dieses Fragment wurde in pBS\_E1b\_UAS\_E1b\_GFP\_pA inseriert, welcher vorher mit NcoI/SnaBI geschnitten wurde, um GFP zu entfernen. Der Vektor wurde pBS\_E1b\_UAS\_E1b\_hTAU-P301L\_pA genannt. DsRed wurde zusammen mit dem SV40-late-polyA-Signal mit ClaI/ApaI aus pCS2+\_DsRed.T4 geschnitten und in pBS\_E1b\_UAS\_E1b\_hTAU-P301L\_pA eingefügt. Dieser Vektor wurde pBS\_pA\_DsRed.T4\_E1b\_UAS\_E1b\_hTAU-P301L\_pA genannt. Der oben beschriebene *Responder*-Vektor pT2KXIGdelta-hTAU-P301L-Ins-E1b-UAS-E1b-DsRed wurde mit ApaI/NheI verdaut, um das gesamte Insert zu entfernen. Dann wurde ein neues Insert aus pBS\_pA\_DsRed.T4\_E1b\_UAS\_E1b\_hTAU40-P301L\_pA, welcher mit den gleichen Enzymen verdaut wurde, eingefügt. Dieser Vektor wurde pT2d\_pA\_DsRed.T4\_E1b\_UAS\_E1b\_hTAU40-P301L\_pA genannt. Die Entfernung von Tau zum E1b-Minimalpromoter beträgt bei diesem Konstrukt nur 35 Basenpaare, wodurch Tau effizient zusammen mit DsRed exprimiert wird (Abbildung 15). Mit diesem fertigen *Responder*- und dem *Driver*-Konstrukt pT2d\_HuC\_Gal4-VP16\_pA wurden transgene Zebrafische Tg(HuC::Gal4/TAU-P301L-UAS-DsRed) hergestellt.

#### 2.2.1.13 Gateway-Klonierung von DNS-Konstrukten

Um den schnellen Austausch des Promoters oder des Tau-Gens zu ermöglichen, wurden *Driver*- und *Responder*-Konstrukte für *Gateway*-Klonierungen angepasst. *Gateway* ist ein kommerziell erhältliches Kloniersystem (Invitrogen, Karlsruhe), bei dem nicht über Restriktionsverdau und Ligation, sondern mittels Rekombination über bestimmte Rekombinationssequenzen kloniert wird. Diese *att*-Sequenzen, sind vom Integrationssystem des Bakteriophagen Lambda und seinem Wirtsbakterium *E.coli* abgeleitet (Walhout et al., 2000). Werden Vektoren mit *att*-Sequenzen ausgestattet, können die zwischen den *att*-Sequenzen liegenden DNS-Stücke durch Zugabe eines Enzyms, der Clonase, gerichtet ausgetauscht werden (Abbildung 16).



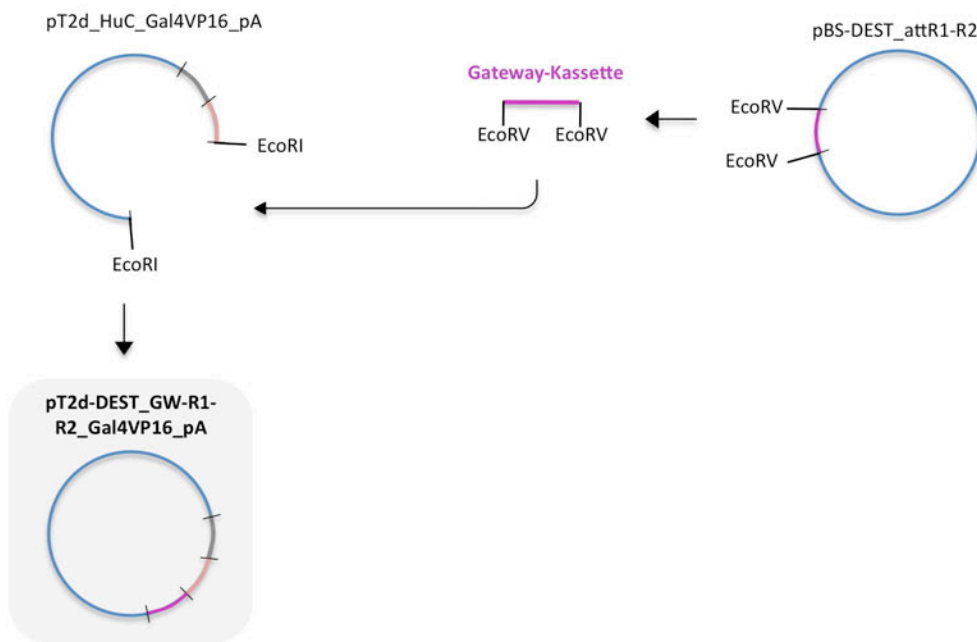


**Abbildung 16: Prinzip der Gateway-Klonierungen**

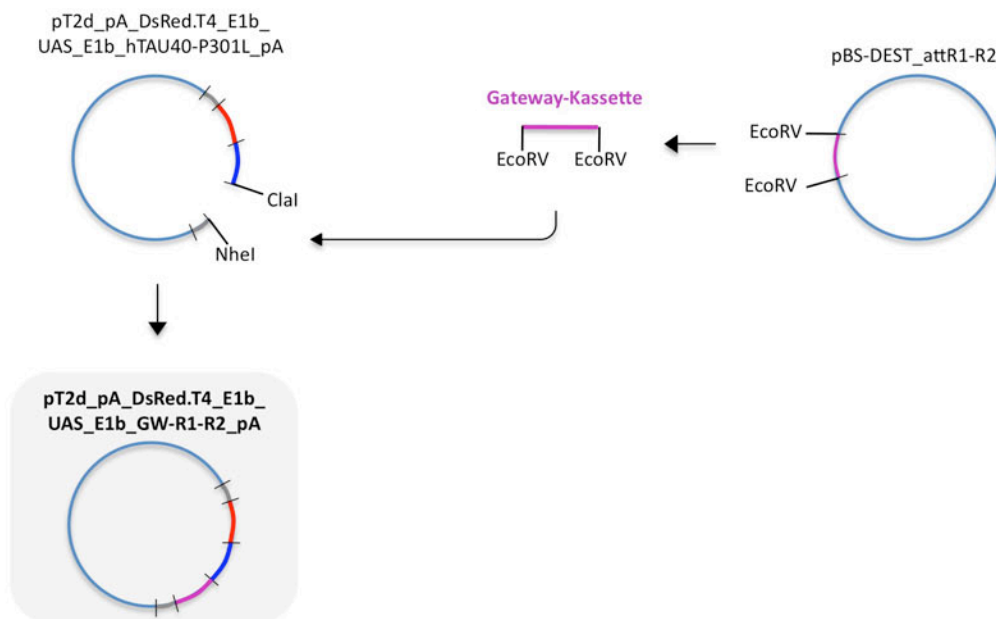
Beim Gateway-Klonieren können DNS-Sequenzen durch Rekombination zwischen *att*-Sequenzen ausgetauscht werden. Hierbei kann z.B. ein in einem *Entry*-Vektor befindliches Gen durch Zugabe der LR-Clonase über eine LR-Rekombination in einen *Destination*-Vektor überführt werden. Der neu entstehende Vektor wird dann als *Expression*-Vektor bezeichnet. Da die beteiligten Vektoren unterschiedliche positive und negative Selektionsmarker enthalten, kann nach der Rekombination der das Gen enthaltene Vektor in normalen *E. coli* Zellen unter Ampizillinselektion vermehrt werden. Bakterien, die die anderen beteiligten Vektoren enthalten, können aufgrund des fehlenden Resistenzgens oder des ihr Wachstum verhindernden *ccdB*-Gens nicht wachsen ([www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)).

Gateway-Konstrukte: Um die oben beschriebenen *Responder*-Konstrukte Gateway-kompatibel zu machen, wurde hTau-P301L durch eine *Gateway Destinations*-Kassette ersetzt, die das *ccdB*-Gen und ein Chloramphenicol-Resistenzgen enthält, und von *attR1* und *attR2* Sequenzen flankiert wird. Hierfür wurde INS\_Tau mit ClaI/NheI aus dem Vektor pT2d\_pA\_DsRed.T4\_E1b\_UAS\_E1b\_INS\_hTAU40-P301L\_pA entfernt und die Enden wurden aufgefüllt. Die *Gateway*-Kassette wurde mit EcoRV aus dem Vektor pBS-DEST\_attR1-2 geschnitten und in den geöffneten *Responder*-Vektor ligiert. Das entstehende Konstrukt wurde pT2d-DEST\_pA\_DsRed.T4\_E1b\_UAS\_E1b\_GW-R1-R2\_pA, bzw. *Destination-Responder-Vektor* genannt (Abbildung 17). Um das *Driver*-Konstrukt Gateway-kompatibel zu machen wurde der HuC-Promoter ebenfalls durch die oben beschriebene *Gateway Destinations*-Kassette ersetzt.

A



B



**Abbildung 17: Klonierung der Gateway-Konstrukte**

**(A)** Gateway-DESTINATION-Driver pT2d\_pA\_DsRed.T4\_E1b\_UAS\_E1b\_hTAU40-P301L\_pA

**(B)** Gateway-DESTINATION-Responder pT2d\_pA\_DsRed.T4\_E1b\_UAS\_E1b\_GW-R1-R2\_pA

Hierfür wurde der Promoter durch einen EcoRI-Verdau entfernt und die Enden wurden mit Klenow aufgefüllt. Dann wurde die oben beschriebene Gateway-Kassette einligiert. Das hierbei entstehende Konstrukt wurde pT2d-DEST\_GW-R1-R2\_Gal4-VP16\_pA bzw. *Destinations-Driver-Vektor* genannt. Um die Funktionalität der Gateway-kompatiblen Vektoren zu testen, wurden für den *Driver*-Vektor der HuC- und der alpha-Tubulin-Promoter mittels PCR amplifiziert. Hierfür wurden für HuC die Primer HuC-F XhoI/EcoRI und HuC-R2 EcoRI/ClaI und als PCR-Matrize pBS\_HuC\_Gal4-VP16, und für  $\alpha$ Tub die Primer M13-FP und  $\alpha$ Tub-R und als Matrize pBS\_ $\alpha$ Tub\_Gal4-VP16 verwendet. Für den *Responder*-Vektor wurde das humane Tau-Gen ebenfalls mittels PCR mit den Primern hTAU ATG-F BamHI/NcoI und hTAU TAG-R NcoI/EcoRI vom Plasmid pNG2htau40/P301L amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden mit dem pCR8/GW/TOPO TA Cloning Kit von Invitrogen (Karlsruhe) nach Anweisung des Herstellers in den Vektor pCR8/TOPO/GW kloniert und sequenziert. Die beiden Promotoren und Tau wurden anschließend mit der LR Clonase II von Invitrogen in den *Destinations-Driver*- bzw. *Destinations-Responder*-Vektor rekombiniert. Die Konstrukte wurden zur Kontrolle der erfolgreiche Expression von Tau und DsRed in den Neuronen anschließend in Zebrafischeier injiziert. Die Expression wurde dann in 32 Stunden alten Fischen überprüft.

#### 2.2.1.14 Konstrukte für andere Krankheitsmodelle

Multi-transgene Zebrafische: Um ein *Responder*-Konstrukt mit mehreren exprimierten Genen herzustellen, wurden zwei UAS-aktivierte Expressionskassetten in einem Konstrukt kombiniert. Hierfür wurde im Konstrukt pT2d\_pA\_DsRed.T4\_E1b\_UAS\_E1b\_INS\_hTAU40-P301L\_pA der Bereich DsRed.T4\_E1b\_UAS\_E1b über einen Verdau mit PspOMI/EcoRI durch das ebenso aus dem Vektor pcDNA3.1neo\_hPS1-L166P geschnittene hPS1-L166P ersetzt. Anschließend wurde INS\_TAU durch einen Verdau mit SmaI/SnaBI entfernt und durch das mit BamHI/SnaBI aus dem Vektor pCS2+APPswe geschnittene und mit Klenow behandelte APPswe ersetzt. Dann

wurde der Vektor mit EcoRI geöffnet und E1b\_UAS\_E1b wieder integriert. Das entstehende Konstrukt wurde pT2d\_pA\_PS1-L166P\_E1b\_UAS\_E1b\_APPswe\_pA genannt. Die Kasette pA\_PS1-L166P\_E1b\_UAS\_E1b\_APPswe\_pA wurde anschließend mit dem an beiden polyA-Signalen bindenden Primer pCS2+poly(A)-R SacI aus dem Vektor amplifiziert und mit dem pCR8/GW/TOPO TA Cloning Kit von Invitrogen (Karlsruhe) nach Anweisung des Herstellers in den Vektor pCR8/TOPO/GW kloniert und sequenziert. Dieser Vektor wurde pCR8/GW/TOPO\_pA\_PS1-L166P\_E1b\_UAS\_E1b\_APPswe\_pA genannt. Außerdem wurde der Vektor pT2d\_pA\_DsRed.T4\_E1b\_UAS\_E1b\_hTAU40-P301L\_pA durch Verdau mit PspOMI geöffnet und die überstehenden Enden mit dem Klenow Fragment aufgefüllt. An diese Stelle wurde dann die Gateway-Kasette, welche mit EcoRV aus dem Vektor pBS-DEST\_attR1-2 geschnitten wurde, eingesetzt. Abschließend wurde die Kasette pA\_PS1-L166P\_E1b\_UAS\_E1b\_APPswe\_pA aus dem Vektor pCR8/GW/TOPO\_pA\_PS1-L166P\_E1b\_UAS\_E1b\_APPswe\_pA über eine LR-Rekombination in diesen Vektor rekombiniert (siehe auch Abbildung 30A). Der entstehende Vektor wurde zusammen mit dem in 2.2.1.12 beschriebenen HuC-Driver-Konstrukt injiziert, um vierfach transgene Fische zu erzeugen.

Alpha-Synuclein-transgene Zebrafische: Für diese Fische wurde im Konstrukt pT2d\_pA\_DsRed.T4\_E1b\_UAS\_E1b\_INS\_hTAU40-P301L\_pA der Bereich INS\_Tau-P301L über einen Verdau mit ClaI/NheI durch das ebenso aus dem Vektor pcDNA3.1neo\_aSyn geschnittene Wildtyp  $\alpha$ Syn-Gen ersetzt. Der entstehende Vektor pT2d\_pA\_DsRed.T4\_E1b\_UAS\_E1b\_ $\alpha$ Syn\_pA wurde zusammen mit dem HuC-Driver-Konstrukt injiziert, um  $\alpha$ Syn-transgene Fische zu erzeugen.

#### 2.2.1.15 mRNS-Synthese

Die Vektoren pCS-TP, pCS2+-GFP, pCS2+-dN-GSK3 $\beta$  and pCS2+-GSK3 $\beta$  wurden mit 5 U/ $\mu$ g NotI über Nacht linearisiert, das Enzym wurde für 30 min bei 55°C mit 0,5 mg/ml Proteinase K und 0,5% SDS inaktiviert. Anschließend wurde die DNS über eine Phenol/Chloroform-Präzipitation aufgereinigt. Hierfür wurde die DNS zunächst mit DEPC-behandeltem dH<sub>2</sub>O auf ein Zehntel

verdünnt, mit der gleichen Menge Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) in Eppendorf *Phase Lock Gel Heavy Tubes* überführt und für mindesten 3 Minuten kräftig mit der Hand geschüttelt. Bei der anschließenden fünfminütigen Zentrifugation bei 12000g bildet sich in den *Phase Lock Gel Heavy Tubes* über der organischen Phenolphase eine Wachsschicht, die diese von der wässrigen Phase mit der DNS trennt. Zur oberen, wässrigen Phase wurde dann Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) gegeben und erneut für 1 min geschüttelt. Bei der anschließenden dreiminütigen Zentrifugation bei 12000g setzt sich das Chloroform zusammen mit dem Phenol in der unteren, organischen Phase unter der Wachsschicht ab, die gereinigte DNS in der oberen, wässrigen Phase kann entnommen werden. Die wässrige Phase wurden dann mit der gleichen Menge Isopropanol und einem Zehntel Nuclease-freiem Natriumacetatversetzt und vermischt, 30 min bei -20°C inkubiert und weitere 30 min bei 12000g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die pelletierte DNS mit Nuclease-freiem 70% Ethanol gewaschen. Anschließend wurde erneut kurz zentrifugiert, das Ethanol wurde entfernt, das DNS-Pellet wurde etwa 20 min getrocknet und anschließend in 20 µl Nuclease-freiem dH<sub>2</sub>O resuspendiert. Von den linearisierten und gereinigten Vektoren wurde dann mit dem Ambion mMessage Machine Kit nach Herstellerangaben mRNS synthetisiert und über eine LiCl-Fällung aufgereinigt. Die Konzentration der mRNS wurde photometrisch gemessen und die Qualität mittels Agarosegelelektrophorese mit einem frisch gegossenen Gel in frisch angesetztem Puffer analysiert. Die mRNS wurde aliquotiert und bei -80°C gelagert.

### **2.2.2 Haltung der Fische und Behandlung der Embryonen**

Wildtyp- und transgene Zebrafische wurden nach Standardmethoden gehalten, gepaart und gezüchtet (Mullins et al., 1994). Die Embryonen und Larven wurden für maximal sechs Tage bei 28,5°C in E3 Embryomedium gehalten, die Stadien wurden ebenfalls nach Standardmethoden bestimmt (Kimmel et al., 1995). Transgene Fische wurden im Alter von 48 h anhand ihrer DsRed-

Expression bestimmt und für die Zucht der Folgegeneration eingesetzt. Hierbei wurden nur mit TLF ausgekreuzte Fische mit starker DsRed-Expression verwendet.

### **2.2.3 Mikroinjektion von Zebrafischeiern**

Zebrafischeier wurden auf Agarplatten (1,6% Agarose in E3) mit Glaskapillaren nach Standardmethoden injiziert (Nüsslein-Volhard and Dahm, 2002). Zur Herstellung transgener Fische wurden kurz vor Injektionsbeginn *Driver*- und *Responder*-Konstrukte und Tol2-mRNS in einer Konzentration von je 25 ng/μl mit DEPC-behandeltem dH<sub>2</sub>O, welches bereits 20% DEPC-behandeltes Phenolrot und 0,2 M KCl enthielt, vermischt (Kawakami, 2005). GFP mRNS wurde in einer Konzentration von 100 ng/μl, GSK3β mRNS von 50 ng/μl verwendet. Alle RNS wurden ebenfalls in DEPC-behandeltem dH<sub>2</sub>O, welches bereits 20% DEPC-behandeltes Phenolrot und 0,2 M KCl enthielt, verdünnt. Zebrafischeier im Einzellstadium wurden abgesammelt, auf den Agarplatten orientiert und mit ca. 1 nl DNS bzw. RNS-Lösung injiziert. Dabei wurden Vektoren und Tol2-mRNS durch den Dotter direkt in die Zelle injiziert, die anderen RNS wurden in den Dotter injiziert.

### **2.2.4 Inhibitorbehandlungen**

Die Inhibitoren wurden als Stocklösungen in DMSO (SB-216763 and SB-415286, 20 mM), 50% DMSO/dH<sub>2</sub>O (AR-534, 5 mM) oder dH<sub>2</sub>O (AR-164, 10 mM and LiCl, 3 M) gelöst. Für die Behandlung der Fische wurden die Stocklösungen in E3 Embryomedium mit 1% DMSO zu Endkonzentrationen von 50 μM für SB-216763, 100 μM für SB-415286, 100 mM für LiCl, 25 μM für AR-534 und 100 μM für AR-164 verdünnt. Die möglicherweise für die Inhibitoren undurchlässigen Eihüllen der Embryonen wurden bei 4 Stunden alten Embryonen mit Pinzetten leicht geöffnet und bei 20 Stunden alten Embryonen entfernt. Die Fische wurden dann in 1 ml der Inhibitorlösung oder Kontrolllösung (E3 mit 1% DMSO) inkubiert, die Lösungen wurden täglich gewechselt. Die Fische wurden entweder zwischen 4 und 24 Stunden oder

zwischen 20 und 100 Stunden nach Befruchtung mit den Inhibitoren behandelt.

### **2.2.5 Analyse von Verhaltensphänotypen**

48 Stunde alte, lebende transgene Fischlarven aus mehreren Gelegen wurden zusammen gemischt und die Larven mit gut sichtbarer DsRed-Expression aussortiert. Diese Fische wurden mindestens drei Stunden vor dem Experiment mit Pinzetten von ihrer Eihülle befreit. Anschließend wurden die Larven an der dorsalen Schwanzspitze mit einer feinen Nadel mindestens zweimal leicht berührt, um die Fluchtreaktion der Fische zu überprüfen. Falls die berührten Larven sich nicht mindesten über eine Distanz ihrer dreifachen Körperlänge bewegten, wurde die Fluchtreaktion als reduziert angesehen. Für jeden Genotyp (Tau/DsRed-transgene, DsRed-transgene, nicht-transgene Fische) wurden mindestens drei Gruppen von je 50 Fischen analysiert, mindestens eine dieser Gruppen wurde dabei auf Video aufgezeichnet.

### **2.2.6 Immunfärbungen an Fischembryonen und -larven**

Immunfärbungen wurden nach Standardmethoden durchgeführt (Nüsslein-Volhard and Dahm, 2002). Die Fische wurden zunächst falls nötig mit Pinzetten dechorioniert und über Nacht bei 4°C in einer 4%-PFA-Lösung fixiert. Anschließend wurden sie schrittweise in Methanol überführt und so dehydriert. Fische in Methanol wurden für maximal ein Jahr bei -20°C gelagert. Für die Färbungen wurden sie schrittweise mit PBST rehydriert, 5 min in dH<sub>2</sub>O inkubiert und 7 min in -20°C-kaltem Aceton bei -20°C permeabilisiert. Anschließend wurden die Tiere je 5 min in dH<sub>2</sub>O und PBST gewaschen und für mindestens 1 h in NCST blockiert, wodurch eine unspezifischen Bindung des zur Färbung verwendeten Antikörpers an Fischproteine verhindert wird. Dann wurden die Antikörper für die Färbung des gewünschten Gewebes oder Epitops in NCST verdünnt, zugegeben und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Fische viermal für je 30 min in PBST gewaschen, erneut für 1 h mit NCST blockiert und mit dem in

NCST verdünnten Zweitantikörper für 4 h bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht inkubiert. Am dritten Tag wurde erneut viermal je 30 min in PBST gewaschen, dann wurden die Fische in drei Schritten in 75% Glycerin in dH<sub>2</sub>O überführt, auf Objektträgern oder Deckgläsern in 50 % Glycerin / 1 % Agarose in dH<sub>2</sub>O ausgerichtet und am Mikroskop untersucht und fotografiert.

### **2.2.7 Zelltofdärbung**

Um sterbende Zellen anzufärben wurden 6 Tage alte lebende Fischlarven für 30 min in Acridin Orange Färbelösung inkubiert und anschließend zweimal in E3 mit 1% Tricain gewaschen (Furutani-Seiki et al., 1996). Dann wurden die Larven auf einem Objektträger in 1,6% Low-Melting-Agarose (gelöst in E3-Medium) eingebettet. Die Fischlarven wurden mit einem Zeiss Axioskop Fluoreszenzmikroskop mit einer 10x-Linse untersucht und die grün angefärbten runden Zellkerne der absterbenden Neuronen im gesamten Rückenmark gezählt. Um das Absterben einzelner Zellen im Detail zu beobachten wurden lebende 3 Tage alte Fischlarven wie oben beschrieben gefärbt und auf einem Deckglas, welches unten an eine gelochte Petrischale geklebt war, in 1,6 % Agarose in E3 eingebettet. Die Larven wurden mit E3 überschichtet, das auf ein Zehntel verdünnte Acridin Orange Färbelösung und 1% Tricain enthielt. Die Fische wurden dann wie in 2.2.8 beschrieben mit einem Zeiss LSM Meta konfokalen Mikroskop fotografiert.

### **2.2.8 Mikroskopie und Bilderstellung**

Lebende und fixierte Zebrafischembryonen, -larven und 5 Wochen alte juvenile Fische wurden mit einem Zeiss Stereomikroskop, einem Leica Fluoreszenz-Stereomikroskop, einem Zeiss Axioplan Mikroskop oder einem Zeiss LSM Meta konfokalen Mikroskop untersucht. Um fixierte, angefärbte Fischembryonen und -larven von der Seite zu fotografieren, wurden zunächst mit Pinzetten die Köpfe entfernt. Dann wurden diese flach auf der Seite liegend auf Deckgläsern in 1 % Agarose / 50% Glycerin in dH<sub>2</sub>O eingebettet und fotografiert.



Für die Bestimmung der Motoneuronlänge wurden 32 Stunden alte Fische wie oben beschrieben eingebettet. Dann wurden mit einem Zeiss LSM Meta konfokalen Mikroskop Z-Stapel fotografiert, die das gesamte Axon des Motoneurons enthielten. Hierbei wurde darauf geachtet, dass immer die gleichen vier direkt vor dem Ende der Dottersackverlängerung liegenden Axone untersucht wurden. Die Axone durften dabei in maximal drei übereinander befindlichen optischen Schnitten liegen, da der Fisch ansonsten nicht gerade eingebettet war. Dann wurden Maximalprojektionen der Z-Stapel erstellt und die Länge der Motoneuronen mit der *Overlay*-Funktion der Zeiss LSM Software gemessen. Die Bilder von transgenen und Kontrollfischen wurden dabei immer gleichzeitig mit identischen Einstellungen aufgenommen. Um das Absterben einzelner Zellen im Detail in lebenden Fischlarven zu beobachten, wurden diese mit einem Zeiss LSM Meta konfokalen Mikroskop in einer Temperaturkammer mit 28,5°C alle drei Minuten für insgesamt 12 Stunden fotografiert. Hierbei wurde mit der 20x-Linse in einem Bereich im vorderen Rückenmark ein Z-Stapel aus 10 Einzelbildern mit einer Gesamtdicke von 10 bis 12 µm aufgenommen. Nach der Aufnahme wurde jeder Z-Stapel mit der Zeiss LSM Software über eine Maximalprojektion zu einem Einzelbild umgerechnet, welches dann alle Details aus dem 10 µm dicken aufgenommen Bereich enthielt. Die so entstandenen Bilder wurden mit der gleichen Software zu einem Zeitraffervideo zusammengesetzt, dass mit 8 Einzelbildern pro Sekunde abgespielt wurde. Eine Sekunde des fertigen Videos entspricht daher 24 Minuten Aufnahmezeit.

Die aufgenommenen Bilder wurden auf einem Apple iMac Computer mit Adobe Photoshop CS2, die Videos mit NIH ImageJ und Apple iMovie bearbeitet.

## 2.2.9 Proteinbiochemie

### 2.2.9.1 Lyse von Embryonen für Proteinbiochemie

Embryonen oder Larven wurden zunächst ohne Medium in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die gefrorenen Fischen wurden dann mit 10 bis 50 µl Laemmli Puffer pro Fisch versetzt und sofort durch Ultraschall mit einem Branson Cell Disruptor B 15 homogenisiert. Das Lysat wurde für 10 min bei 95°C und 750 rpm auf dem Thermoschüttler inkubiert und anschließend für 15 min bei 12000g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für Gelelektrophoresen verwendet.

### 2.2.9.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte durch eindimensionale, diskontinuierliche SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Je nach Größe des zu untersuchenden Proteins wurde eine Polyacrylamid-Konzentration von 7% bis 10% für das Trenngel und 4% für das Sammelgel verwendet. Nach Polymerisation des Trenn- und Sammelgels wurden die Taschen kurz gespült und die Proben geladen. Die Elektrophorese wurde bei 80-120 V in 1x Laufpuffer in einer Bio-Rad Mini-PROTEAN-3 Elektrophoresekammer durchgeführt. Zum Größenvergleich wurden 8-10 µl eines Invitrogen See Blue Plus 2 Proteingrößenmarkers in die erste Tasche des Gels geladen. Für die Herstellung der Gele wurden folgende Chemikalien zusammengemischt:

Gelart:	Trenngel [Volumen in µl]				Sammelgel [V in µl]
	7%	8%	9%	10%	
<b>Gelkonzentration:</b>	<b>7%</b>	<b>8%</b>	<b>9%</b>	<b>10%</b>	<b>4%</b>
Acrylamid-Lösung	5,88	6,72	7,56	8,4	0,75
1 M Tris, pH 6.8	-	-	-	-	0,75
1,5 M Tris, pH 8.8	12,5	12,5	12,5	12,5	-
10 % SDS	0,25	0,25	0,25	0,25	0,06
dH2O	6,12	5,28	4,44	3,6	4,35
TEMED	0,005	0,005	0,005	0,005	0,006
10 % APS	0,25	0,25	0,25	0,25	0,06

### *2.2.9.3 Proteintransfer auf PVDF-Membran (Western Blot)*

Die in einer SDS-PAGE nach Größe aufgetrennten Proteine wurden durch Elektrotransfer in einer Bio-Rad Mini-PROTEAN 3 Transferkammer aus dem Gel auf eine PVDF-Membran übertragen. Gel und Membran wurden dabei mit je zwei Filterpapieren und einem Schaumstoffschwamm oben und unten zwischen Kathode und Anode eingeklemmt. Der Transfer erfolgte gekühlt für 1 h bei einer festgelegten Stromstärke von 400 mA unter Verwendung von 1x Transferpuffer.

### *2.2.9.4 Detektion und Quantifizierung der Proteinbanden*

Die Membran mit den transferierten Proteinen wurde für 1 h bei RT in TBST/Milchpulver und anschließend über Nacht bei 4°C mit dem in TBST/Milchpulver verdünnten ersten Antikörper in einer Schale auf einem Kreisschüttler inkubiert. Unspezifisch gebundene und ungebundene Antikörper wurden im Anschluss durch viermaliges Waschen für je 15 bis 30 min mit TBST/Milchpulver entfernt. Zum Nachweis der gebundenen ersten Antikörper wurde die Membran für 1 h bei RT mit dem Peroxidase-markierten sekundären Antikörper in einer Schale auf einem Kippschüttler inkubiert. Dabei wurde ein spezifisch an den Erstantikörper bindender Sekundärantikörper verwendet. Unspezifisch gebundene und ungebundene Sekundärantikörper wurden durch sechsmaliges Waschen für 10 min mit TBST entfernt. Die Transfer-Membran wurde mit dem GE Healthcare Lumigen PS-3 Kit nach Anleitung des Herstellers für 5 Minuten behandelt, was zu einer Reaktion der Peroxidase mit dem Substrat und der Emission von Licht im Bereich des gebundenen Zweitantikörpers führt. Die leuchtenden Proteinbanden auf der behandelten Membran wurden durch Belichtung eines Fujifilm SuperRX Röntgenfilms dokumentiert. Der Film wurde mit einem Agfa Curix 60 Filmentwicklungsgerät entwickelt und mit einem Epson Perfection 4990 Photo Scanner mit Deckelbeleuchtung digitalisiert. Zur Quantifizierung der Proteinmenge wurde die Membran in einem Alpha Innotech FluorChem

8900 gescannt, die Banden wurden in der zugehörigen Software markiert und ausgewertet. Die Mengenwerte wurden nach Microsoft Excel exportiert.

### **2.2.10 Statistik**

Mittelwerte und Standardabweichungen wurden mit Microsoft Excel berechnet. Die statistische Analyse wurde ebenfalls in Excel durchgeführt, hierbei wurde der zweiseitige T-Test verwendet und ein p-Wert ermittelt, der angibt, wie hoch die Wahrscheinlichkeit ist, dass zwei Ereignisse nicht signifikant unterschiedlich sind. Die Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt, ein p-Wert von unter 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

### 3 Ergebnisse

#### ***3.1 Gal4/UAS-basierte Vektoren ermöglichen eine hohe Proteinexpression und effiziente Identifizierung transgener Zebrafische***

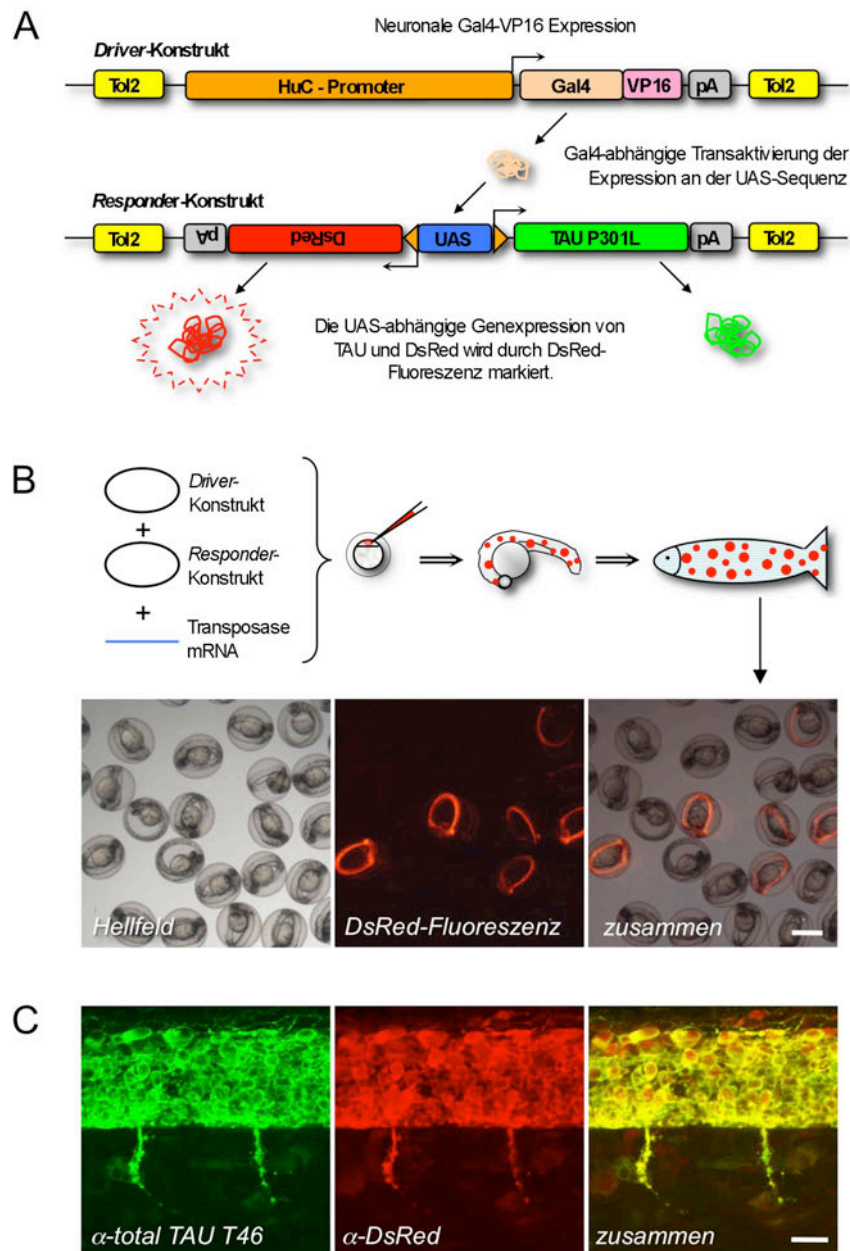
Das erste Ziel dieser Arbeit war die Herstellung eines Vektorsystems, mit dem das humane Tau-Protein mit der Mutation P301L, die mit Frontotemporaler Demenz assoziiert ist (Hutton et al., 1998), im Nervensystem der Fische exprimiert werden konnte. Wie schon in 1.5.3 beschrieben gab es bereits einige Ansätze, die Expression von Fremdgenen in transgenen Fischen zu optimieren und die Effizienz der Herstellung der Fische zu steigern. Dennoch gab es zu Beginn dieser Studie kein etabliertes System zur effizienten Expression ausreichender Mengen eines Krankheits-assoziierten Proteins in Zebrafischen. Daher wurden mehrere bereits bekannte genetische Werkzeuge kombiniert und neue Vektoren entwickelt und kloniert, die eine hohe Proteinexpression und effiziente Erzeugung und Identifizierung transgener Zebrafische ermöglichen (Abbildung 18A). Das Expressionssystem besteht aus zwei Komponenten, dem *Driver*- und dem *Responder*-Konstrukt. Beide Konstrukte verwenden als Rückgrat den Vektor pT2KXIGdeltaIN (Urasaki et al., 2006), der mit Tol2-Sequenzen flankiert ist. Diese Sequenzen werden von der Tol2-Transposase erkannt und mit dem dazwischen liegenden Abschnitt effizient ins Zebrafischgenom integriert (Kawakami, 2005). Das *Driver*-Konstrukt enthält den Zebrafisch-Promoter HuC (Park et al., 2000), welcher die Genexpression in allen terminal differenzierten Neuronen der Fische bewirkt. Auf dem *Driver*-Konstrukt aktiviert dieser Promoter die Expression des Hefe-Transkriptionsfaktors Gal4, der mit der Transkriptionsaktivator-Sequenz VP16 des Herpes Simplex Virus I fusioniert wurde (Koster and Fraser, 2001). Außerdem wurde hinter dem Gal4-VP16-Gen noch eine Polyadenylierungssequenz des SV40-Virus aus dem Vektor pCS2+ integriert,

welche die exprimierte mRNA stabilisiert. Das in den Nervenzellen exprimierte Gal4-VP16 Fusionsprotein bindet dann spezifisch an die Hefe-UAS-Sequenz, die zur Verstärkung der Genexpression in 14-facher Wiederholung in das *Responder*-Konstrukt eingebaut wurde, und aktiviert über die E1b Minimalpromotoren die Expression benachbarter Gene (Koster and Fraser, 2001). Durch die beidseitige Flankierung der UAS-Sequenz mit E1b-Minimalpromotoren wurde eine gleichzeitige Expression von zwei Genen erreicht<sup>1</sup>. Daher konnte in das *Responder*-Konstrukt auf der einen Seite das humane Tau-Gen mit der P301L-Mutation inseriert werden, auf der anderen Seite das Fluoreszenzprotein DsRed.T4 (Bevis and Glick, 2002). Die Koexpression eines Fluoreszenzproteins ermöglicht die direkte Erkennung der transgenen Fische mit einem Fluoreszenzmikroskop, was eine Identifizierung durch zeitaufwändige PCR-Methoden unnötig macht. Außerdem können in den transgenen Fischen auch die Tau-exprimierenden Neuronen anhand ihrer DsRed-Fluoreszenz im lebenden Tier erkannt und beobachtet werden. Eine Markierung des Tau-Proteins durch Fusionierung mit einem Fluoreszenzprotein, die möglicherweise das Aggregationsverhalten des Tau-Proteins beeinflussen würde, konnte durch diese bidirektionale Expression vermieden werden.

Die transgenen Fische wurden durch die gemeinsame Injektion von DNS der *Driver*- und *Responder*-Konstrukte, sowie Tol2-Transposase-mRNA in die erste Zelle der Zebrafischeier erzeugt. Durch die Zugabe der Transposase in Form von mRNA ist diese nur für einen kurzen Zeitraum aktiv, da in Fischeier injizierte mRNA nach kurzer Zeit abgebaut wird. Da Zebrafische keine endogenen Tol2-Transposase besitzen, wird hierdurch eine stabile Integration des Transgens erreicht. Da die Translation der mRNA zum aktiven Protein

---

<sup>1</sup> Die bidirektionale E1b-UAS-E1b-Kassette wurden von Reinhard W. Köster und Martin Distl (Helmholtz Zentrum München) kloniert und charakterisiert. Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um die erste publizierte Anwendung dieser Kassette zur Herstellung und Identifizierung transgener Fische.



**Abbildung 18: Das Gal4/UAS-Expressionssystem zur Herstellung Tau-transgener Fische**

(A) Durch den neuronalen Zebrafischpromoter HuC auf dem *Driver-Konstrukt* wird der Transkriptionsaktivator Gal4-VP16 in den Nervenzellen exprimiert. Dort aktiviert er die Expression von humanem Tau-P301L und DsRed auf dem *Responder-Konstrukt*. (B) Beide Konstrukte wurden gemeinsam mit Tol2-Transposase in Fischeier injiziert, die Transposase katalysiert dann die effiziente Integration der Abschnitte zwischen den Tol2-Sequenzen. Die injizierten Fische werden aufgezogen und ausgekreuzt. In der nächsten Generation können die transgenen Fische anhand der DsRed-Fluoreszenz identifiziert werden. Balkenlänge: 1 mm. (C) Die Neuronen der Fische koexprimieren Tau und DsRed, wie mit Immunfluoreszenzfärbungen mit spezifischen Antikörpern gezeigt werden konnte. Ausschnitt aus dem Rückenmark in Seitenansicht, Balkenlänge: 20  $\mu\text{m}$ .

einige Zeit dauert und bis dahin schon einige Teilungen der injizierten Zelle stattgefunden haben, bei denen die Konstrukte ungleichmäßig verteilt werden, findet die stabile Integration der DNS-Konstrukte nur in einigen Zellen statt. Die aus den injizierten Eiern heranwachsenden Larven exprimieren DsRed daher mosaik in einigen Nervenzellen. Diese DsRed-exprimierenden Fische wurden herausgesucht, bis zur Geschlechtsreife aufgezogen (P0-Generation) und mit Wildtyp-Fischen ausgekreuzt. In der nächsten Generation (F1-Generation) konnten diejenigen Fische, bei denen beide Transgene stabil ins Genom eingebaut und durch die Keimbahn weitergegeben wurden, durch ihre DsRed-Expression identifiziert, aussortiert und weitergezogen werden (Abbildung 18B). Die Expression von Tau überlappt hierbei vollständig mit der von DsRed, was durch Immunfluoreszenzfärbungen mit spezifischen Antikörpern gegen Tau (Antikörper T46 (Kosik et al., 1988)) und DsRed nachgewiesen wurde (Abbildung 18C).

### **3.2 Gateway-Klonieren ermöglicht den effizienten Einbau neuer Gene und Promotoren in das Vektorsystem**

Das oben beschriebene Vektorsystem eignet sich neben der Herstellung Tau-transgener Fische auch für die Erzeugung beliebiger anderer transgener Linien, die Krankheits-assoziierte Proteine in verschiedenen Geweben überexprimieren. Um solche transgenen Linien zu erzeugen, muss das zu exprimierende Gen gegen das Tau-Gen ausgetauscht und evtl. auch der Promoter gewechselt werden, falls das neue Transgen nur in einem bestimmten Subtyp von Nervenzellen oder in anderen Geweben exprimiert werden soll. Um den Wechsel von Genen oder Promotoren möglichst einfach durchführbar zu gestalten, wurde das Vektorsystem so weiterentwickelt, dass neue DNS-Sequenzen möglichst leicht integriert werden können. Hierfür wurde das Tau-Gen im *Responder*-Konstrukt und der HuC-Promoter im *Driver*-Konstrukt gegen eine Rekombinationskassette ausgetauscht, die vom kommerziell erhältlichen Gateway-Kloniersystem abgeleitet wurde. Wie bereits in 2.2.1.13 erläutert, basiert das Gateway-Klonieren auf dem Austausch von



DNS-Sequenzen durch Rekombination über bestimmte Rekombinationssequenzen. Diese Sequenzen, die *att*-Sequenzen, sind vom Integrationssystem des Bakteriophagen Lambda und seinem Wirtsbakterium *E.coli* abgeleitet (Walhout et al., 2000). Werden zwei Vektoren mit bestimmten *att*-Sequenzen ausgestattet, können die zwischen den *att*-Sequenzen liegenden DNS-Stücke durch Zugabe eines Enzyms, der Clonase, gerichtet ausgetauscht werden (Abbildung 16). In *Driver*- und *Responder*-Vektoren wurde daher eine *Gateway*-Kassette eingebaut, die von *attR1* und *attR2*-Sequenzen flankiert ist, und außerdem das *ccdB*-Gen und ein Chloramphenicolresistenzgen als Selektionsmarker enthält. Ein Vektor, welcher den *ccdB*-Marker enthält, kann nur in bestimmten resistenten Zellen vermehrt werden, weil das *ccdB*-Gen das Wachstum normaler *E.coli*-Bakterien verhindert (negative Selektion). Außerdem können die das Konstrukt tragenden Bakterien auf Chloramphenicol-haltigem Agar wachsen (positive Selektion). *Gateway*-kompatible Vektoren mit anderen *att*-Sequenzen enthalten andere Resistenzgene, wodurch man nach einer Rekombinationsreaktion nur diejenigen Bakterien, die das gewünschte Konstrukt enthalten, selektionieren kann.

Soll nun ein neues Gen oder ein anderer Promoter eingebaut werden, wird dessen DNS-Sequenz zunächst mittels PCR amplifiziert. Dann wird das PCR-Produkt über eine effiziente TOPO-Klonierung in einen *Gateway*-kompatiblen *Entry*-Vektor eingebaut. Hierbei integrieren an diesem Vektor hängende Topoisomerasen die DNS-Sequenz (siehe auch <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/brands/Product-Brand/TOPO-PCR-Cloning.html>). Dann kann das Gen oder der Promoter über eine LR-Rekombination in den *Destination-Driver*- oder *Responder*-Vektor überführt und die Bakterien-Klone auf den gewünschten Vektor selektioniert werden (Abbildung 19A). Die Funktionalität der *Gateway*-kompatiblen Vektoren bei der Rekombination wurde durch Insertion des HuC oder alpha-Tubulin-Promoters und des Tau-P301L Gens nachgewiesen. Außerdem wurde durch die Injektion der *Driver*- und *Responder*-Vektoren in Fischeier überprüft, ob Genexpression stattfindet.

Hierbei werden die Gene auf den Vektoren transient, also nur in einigen Zellen der Fische exprimiert. Durch Immunfluoreszenzfärbung des Rückenmarks 30 h alter Fischlarven zum Nachweis von Tau und DsRed mit spezifischen Antikörpern konnte die Expression des Tau-Proteins unter Kontrolle des Gateway klonierten HuC- (Abbildung 19B) bzw. alpha-Tubulin-Promoters (Abbildung 19C) in Neuronen nachgewiesen werden.

### **3.3 Driver- und Responder-Konstrukte werden stabil und unabhängig voneinander vererbt**

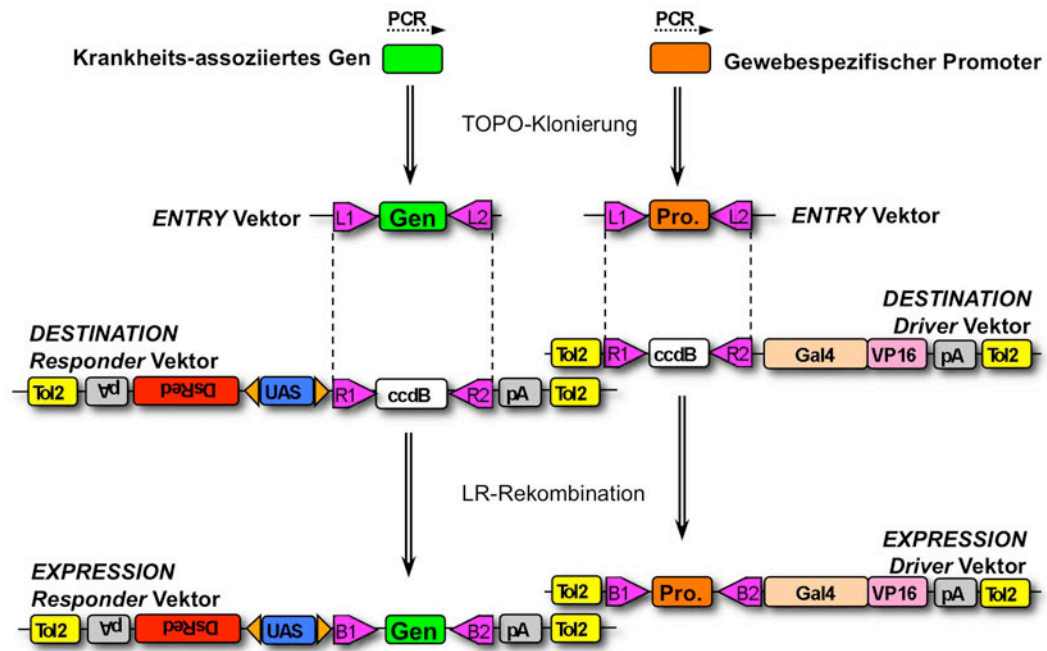
Die stabile und nachvollziehbare Vererbung der Transgene an die nächste Generation ist eine Voraussetzung für die Etablierung und dauerhafte Vermehrung transgener Linien. Konstrukte, die mit Hilfe der Tol2-Transposase ins Zebrafischgenom integriert wurden, können dort in einer oder mehreren Kopien vorkommen, die sich auf verschiedenen Genloci auf unterschiedlichen Chromosomen befinden können (Urasaki et al., 2006). Da das neue Gal4/UAS-basierte Vektorsystem aus zwei Konstrukten besteht, verdoppeln sich damit auch die Möglichkeiten der Transgenintegration. Da aber zur Expression des Tau-Gens beide Konstrukte vorhanden sein müssen, halbiert sich gleichzeitig auch die Wahrscheinlichkeit, transgene Linien zu erhalten, die das Protein

---

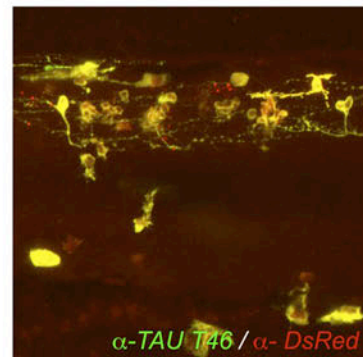
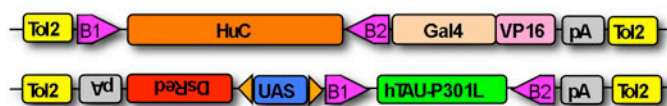
#### **Abbildung 19: Expression krankheits-assoziiierter Proteine mit dem Gateway-Gal4/UAS-Vektorsystem**

(A) Das Krankheits-assoziierte Gen und der gewebespezifische Promoter werden mittels PCR amplifiziert und über eine effiziente *TOPO*-Klonierung in den Gateway-kompatiblen *TOPO*-Vektor inseriert. Dieser integriert die PCR-Produkte über die Topoisomerasen an seinen beiden Enden und verfügt außerdem über flankierende attL1 und attL2-Rekombinations-Sequenzen. Anschließend werden das Gen und der Promoter über eine LR-Rekombination in die mit attR1/attR2 versehenen *Destination-Responder* bzw. *Destination-Driver*-Vektoren übertragen, die dann als *Expression-Driver*- bzw. *Responder*-Vektoren bezeichnet werden. Die Funktionalität der Vektoren wurde durch Insertion des HuC (B) bzw. alpha-Tubulin-Promoters (C) und des Tau-P301L Gens und transiente Expression in 24 h alten Zebrafischen demonstriert. Seitenansicht einer Immunfluoreszenzfärbung des Rückenmarks 30 h alter Fischlarven zum Nachweis von Tau (grün) und DsRed (rot) mit spezifischen Antikörpern.

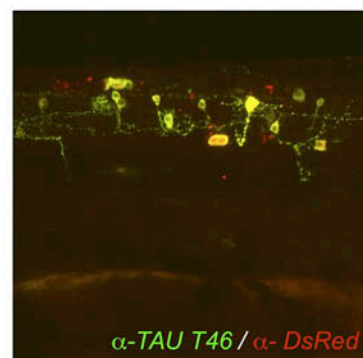
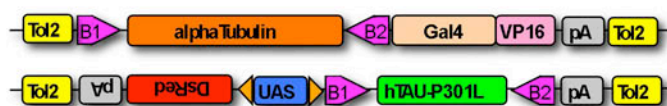
A



B



C



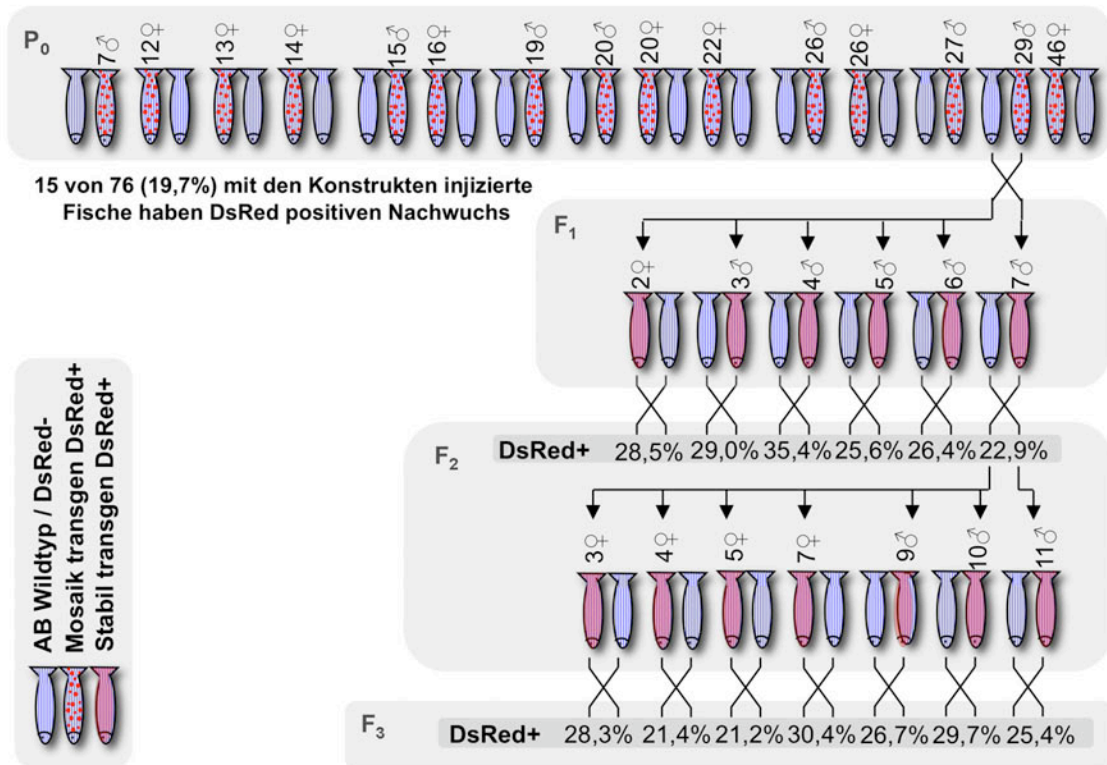
exprimieren. Um festzustellen, ob und auf welche Weise die Transgene stabil an die nächste Generation weitergegeben werden, wurde die Vererbung anhand der DsRed-Expression über drei Generationen verfolgt. Von den mit den Konstrukten injizierten, DsRed-positiven Larven wurden 76 bis zur Geschlechtsreife aufgezogen ( $P_0$ -Generation) und mit Wildtyp-Fischen ausgekreuzt. Von den 76  $P_0$ -Fischen hatten 15 DsRed-positiven Nachwuchs, was einer Transgenrate von 19,7% entspricht. Von den  $P_0$ -Fischen wurde derjenige für die Zucht ausgewählt, dessen Nachwuchs die stärkste neuronale DsRed-Expression bei gleichzeitig möglichst niedriger Expression in anderen Geweben aufwies. Es wurden 6 Nachkommen aufgezogen ( $F_1$ -Generation), erneut ausgekreuzt und wieder der  $F_1$ -Fisch mit den optimal DsRed-exprimierenden Nachkommen ausgewählt und weitergezogen. Außerdem wurden von allen 6  $F_1$ -Fischen die Gesamtmenge der Nachkommen und der Anteil der DsRed-positiven Fische in einem Gelege gezählt. Diese Quantifizierung wurde auch entsprechend mit der nächsten Generation ( $F_2$ ) durchgeführt. Bei allen ausgezählten Gelegen lag die Anzahl der DsRed-positiven Nachkommen bei  $26,9\% \pm 3,9\%$ , was einem Anteil von etwa einem Viertel entspricht (Abbildung 20A). Diesen Wert würde man bei der unabhängigen Vererbung von zwei einzeln inserierten Transgenen in diploiden Organismen erwarten. Dies weist daraufhin, dass in der analysierten Linie jeweils eine Kopie des *Driver*- und *Responder*-Konstrukts an voneinander unabhängigen Orten im Genom, also auf zwei verschiedenen Chromosomen

---

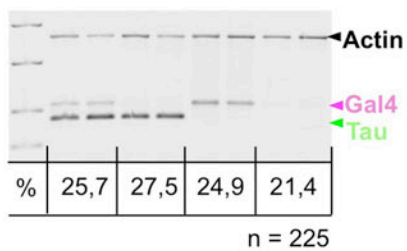
**Abbildung 20: Stabile und unabhängige Vererbung der Transgene**

(A) 15 von 76 (19,7%) der mit den beiden Konstrukten injizierten und aufgezogenen Fische ( $P_0$ -Generation) vererbten beide Transgene an ihre Nachkommen ( $F_1$ ). In den folgenden Generationen ( $F_2$  und  $F_3$ ) enthielten alle Gelege etwa ein Viertel DsRed-positive Embryonen. (B) Die PCR-Analyse der Vererbung in einem  $F_2$ -Gelege mit 225 Embryonen ergab einen Anteil von jeweils etwa einem Viertel Fische mit beiden, jeweils einem oder keinem integrierten Transgen. (C) Tau und DsRed werden über drei Generationen stabil in Neuronen des Rückenmarks der transgenen Fische exprimiert. Seitenansicht einer Immunfluoreszenzfärbung des Rückenmarks 30 h alter Fischlarven zum Nachweis von Tau (grün) und DsRed (rot) mit spezifischen Antikörpern.

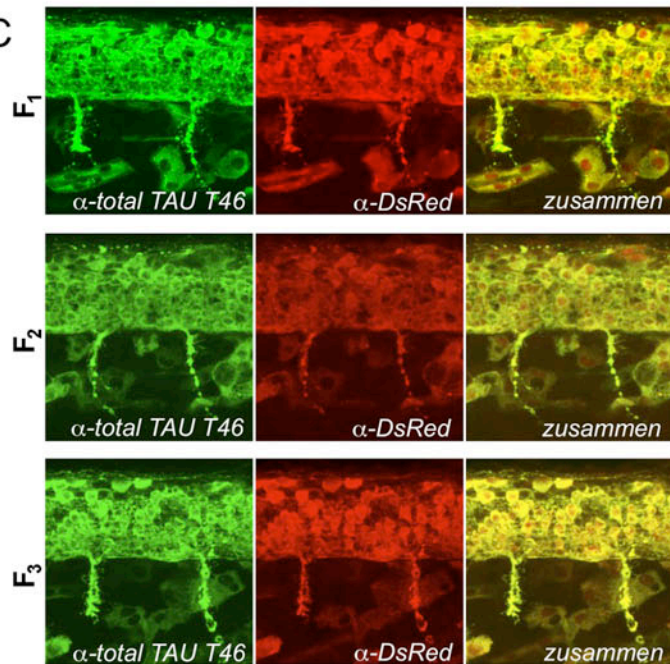
A



B



C



oder auf dem gleichen Chromosom relativ weit voneinander entfernt, inseriert wurden. Um diese Vererbung nachzuweisen, wurde in einem Gelege mit 225 Embryonen aus einer Auskreuzung eines Tau-transgenen F<sub>2</sub>- mit einem Wildtyp-Fisch mit einer Identifikations-PCR die jeweils in den Fischen integrierten Transgene direkt nachgewiesen. Die Qualität der DNS wurde dabei durch eine gleichzeitig durchgeführte Aktin-PCR kontrolliert. Von den 225 untersuchten Embryonen enthielt jeweils etwa ein Viertel beide Transgene, nur eines der beiden oder kein Transgen (Abbildung 20B). Dieses Ergebnis beweist die unabhängige Vererbung der beiden an jeweils einem Locus im Genom integrierten Transgene. Um zu untersuchen, ob Tau und DsRed auch über mehrere Generationen stabil koexprimiert werden, wurden von transgenen Embryonen der F<sub>1</sub>-, F<sub>2</sub>- und F<sub>3</sub>-Generation Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt und miteinander verglichen. Dabei konnten keine wesentlichen Änderungen in der Proteinexpression festgestellt werden, was auf eine stabile Vererbung und Expression der Transgene über mehrere Generationen schließen lässt (Abbildung 20C).

### ***3.4 Tau-transgene Fische entwickeln nach wenigen Stunden pathologische Veränderungen***

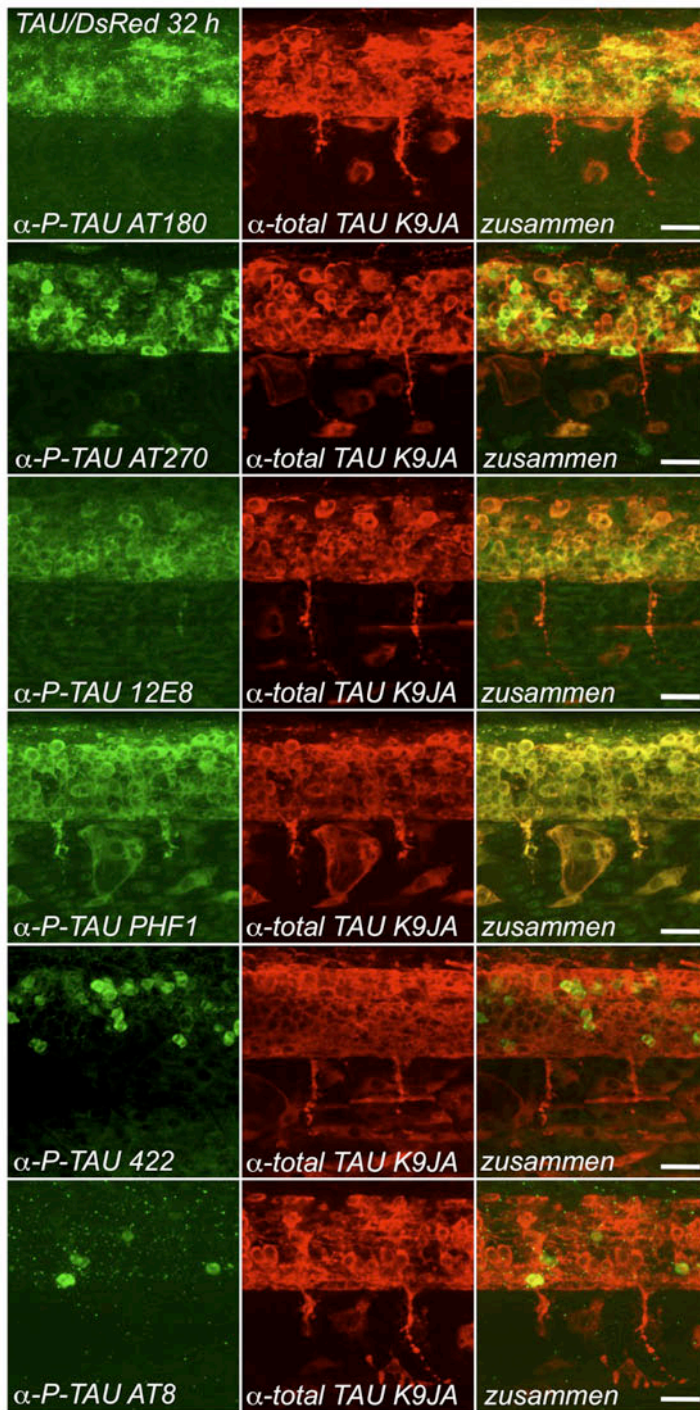
Die Phosphorylierung von Tau an bestimmten Serin- und Threonin-Resten des Proteins dient als eines der ersten Erkennungssignale für die pathologische Veränderung des Tau-Proteins bei AD, FTD und anderen Tauopathien (Grundke-Iqbal et al., 1986b; Mandelkow and Mandelkow, 1998; Buee et al., 2000). Es wurde daher untersucht, ob und wann das in den Nervenzellen der transgenen Fische exprimierte Tau-Protein an den pathologisch relevanten Aminosäuren phosphoryliert wird. Erstaunlicherweise konnte bereits in 32 Stunden alten Fischembryonen mit Immunfluoreszenzfärbungen eine Phosphorylierung von Tau an den Resten T231/S235 (Antikörper AT180, (Goedert et al., 1994)), T181 (AT270, (Goedert et al., 1994)), S262/S356 (12E8, (Seubert et al., 1995)), S396/S404 (PHF1, (Greenberg et al., 1992)), S422 (pS422, (Hasegawa et al., 1996)), und S202/T205 (AT8, (Biernat et al., 1992))

festgestellt werden (Abbildung 21A). Diese pathologische Veränderung konnte auch biochemisch mit Western-Blots von Gesamtproteinextrakten von 48 Stunden alten Fischlarven gezeigt werden. Das Tau-Protein wurde hierbei zunächst mit dem Gesamt-Tau-Antikörper K9JA nachgewiesen und zeigte eine relativ breite Bande mit dem erwarteten relativen Molekulargewicht von 64 kDa, die Tau-Proteinmoleküle in verschiedenen stark phosphorylierter Form enthält. Im gleichen Molekulargewichtsbereich konnte in Tau-transgenen Fischen auch mit den Phospho-spezifischen Antikörpern AT180, AT270, 12E8, PHF1 und pS422 das pathologisch phosphorylierte Protein nachgewiesen werden (Abbildung 21B). Bei den Antikörpern PHF1 und pS422 trat dabei eine in Tau-transgenen und Kontrollfischen vorkommende zusätzliche Bande auf, deren Molekulargewicht allerdings geringer war. Im Bereich um 64 kDa traten in Kontrollfischen keine kreuzreagierenden Banden auf. Die Bande bei 64 kDa zeigt daher spezifisch das in den transgenen Fischen exprimierte Tau-Protein.

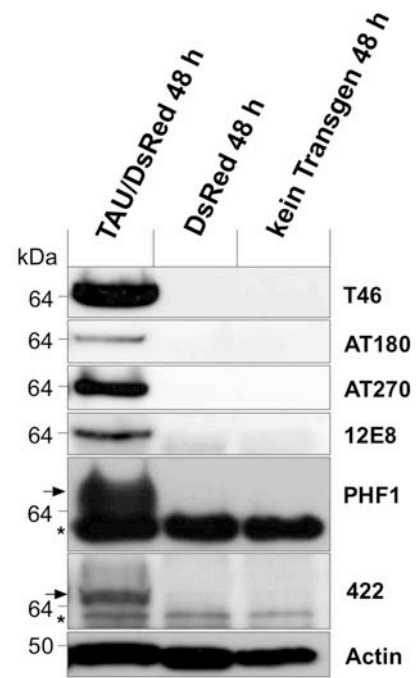
Zusätzlich zur pathologischen Phosphorylierung verändert das Tau-Protein während der Pathogenese von Tauopathien auch seine Konformation (Jicha et al., 1999), was vermutlich eine Vorstufe zur Aggregation in *Tangles* darstellt. Die frühen Konformationsänderungen des Tau-Proteins können ebenfalls in Immunfluoreszenzfärbungen mit dem Konformations-spezifischen Antikörper MC1 gezeigt werden (Jicha et al., 1999). Interessanterweise trat diese Konformationsänderung des Tau-Proteins ebenfalls bereits in 32 Stunden alten Fischen auf (Abbildung 21C). Es wurde außerdem untersucht, ob und wann die Konformationsänderungen des Tau-Proteins zur Bildung neurofibrillärer Bündel führen. Hierfür wurde eine Reihe von Fischstadien untersucht, die zwischen einer Woche und einem Jahr alt waren. Das Rückenmark der Fische wurde entnommen, in Paraffin eingebettet und geschnitten. Diese Schnitte wurden dann immunhistochemisch zum Nachweis der Tau-Expression und pathologischen Phosphorylierung angefärbt. Außerdem wurden Gallyas-Silberfärbungen durchgeführt, mit denen routinemäßig *Tangles* angefärbt werden, um z.B. in verstorbenen Demenzpatienten AD oder



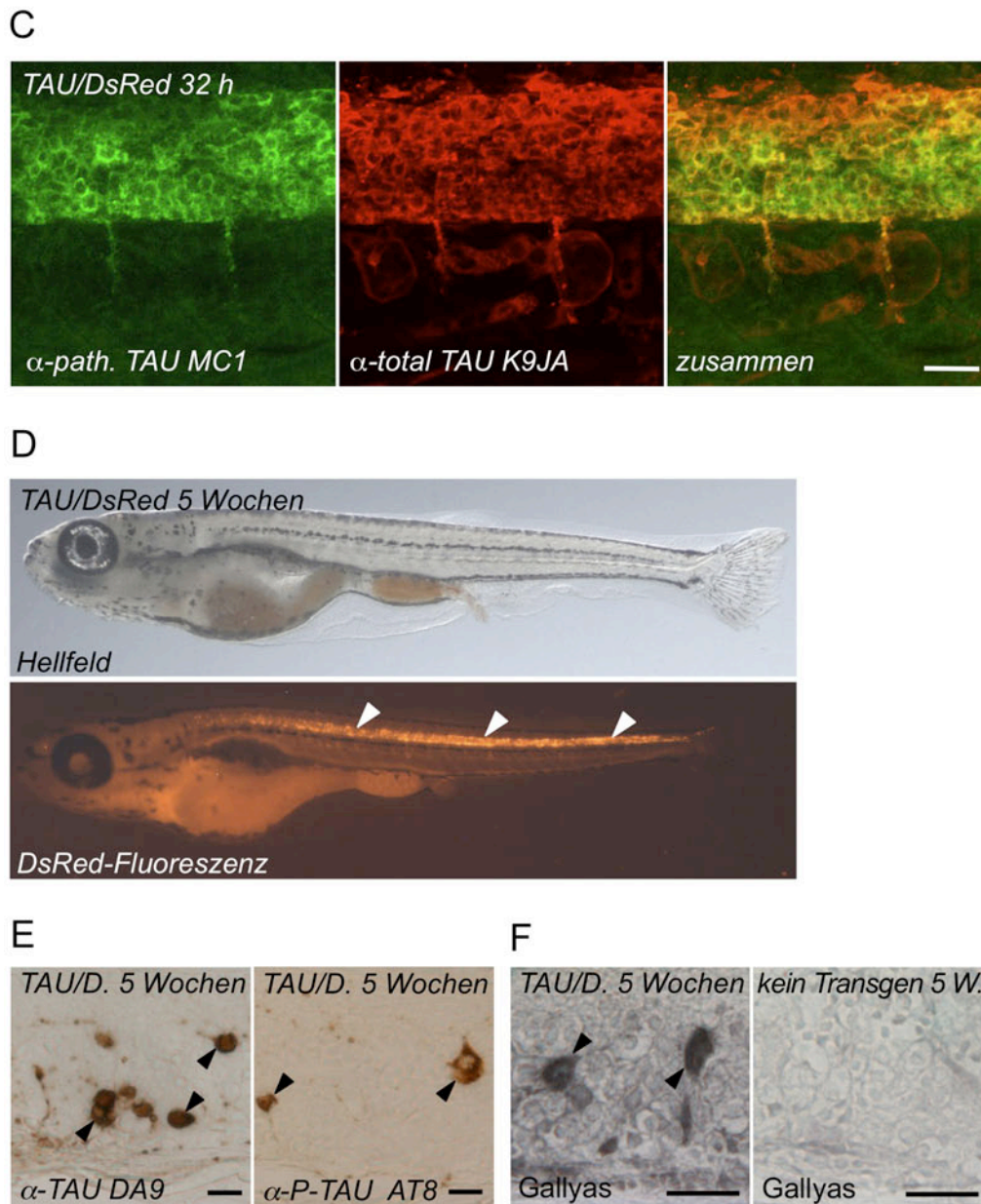
A



B







**Abbildung 21: Pathologische Veränderungen des Tau-Proteins in 32 Stunden bzw. 5 Wochen alten Tau-transgenen Fischen**

(A-B) Pathologische Phosphorylierung von Tau in 32 h alten Fischen an den Aminosäuren T231/S235 (Antikörper AT180), T181 (AT270), S262/S356 (12E8), S396/S404 (PHF1), S422 (pS422), und S202/T205 (AT8) in Immunfluoreszenzfärbungen (A) und Western-Blots (B). (C) Pathologische Konformationsänderung des Tau-Proteins in 32 h alten Fischen (Antikörper MC1). (D) DsRed-Fluoreszenz im Rückenmark (Pfeilspitzen) 5 Wochen alter Fische. (E) Tau Expression (Antikörper DA9) und path. Phosphorylierung (AT8) in Paraffinschnitten des Rückenmarks dieser Fische. (F) Gallyas-Silber-positive Tangles in Schnitten derselben Fische aber nicht in Schnitten des Rückenmarks von Kontrollfischen. Balkenlänge: 20  $\mu$ m.

FTD zu diagnostizieren. In den Rückenmarksschnitten 5 Wochen alter Fische, bei denen anhand der DsRed-Fluoreszenz die Expression der Transgene noch gut in lebenden Fischen zu verfolgen war (Abbildung 21D), konnte die Expression (Antikörper DA9) und pathologische Phosphorylierung (AT8) des Tau-Proteins nachgewiesen werden (Abbildung 21E). Außerdem konnten auf denselben Schnitten, aber nicht auf Schnitten von Kontrollfischen, Gallyas-Silber-positive *Tangles* nachgewiesen werden (Abbildung 21F)<sup>2</sup>. Die Bildung von *Tangles* beweist, dass in den Tau-transgenen Fischen pathologische Prozesse stattfinden, die denen in Tauopathie-Patienten stark ähneln.

### **3.5 Schnelles Fortschreiten der AD-/FTD-typischen AT8-Phosphorylierung**

Vergleicht man bei denen in Abbildung 21A gezeigten Immunfluoreszenz-Färbungen die Anzahl der Nervenzellen, in denen Tau an einem bestimmten Epitop phosphoryliert ist (grüner Kanal), mit der Anzahl der insgesamt Tau-exprimierenden Zellen (roter Kanal), fallen bemerkenswerte Unterschiede auf: während Epitope, die beim Krankheitsverlauf im Menschen oder transgenen Mäusen relativ früh auftreten, wie z.B. AT270, in den meisten Tau-exprimierenden Zellen nachgewiesen wurden, sind später auftretende Epitope, wie z.B. AT8, nur in einigen wenigen der Tau-exprimierenden Zellen zu finden. Bei den wenigen AT8-positiven Zellen könnte es sich um die ersten Neurone handeln, die diese späte Pathologie zeigen. Mit fortschreitendem Alter sollte man dann mehr AT8-positive Zellen erwarten. Um dies zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenz-Färbungen von Tau-transgenen Fischen im Alter von 24, 32 und 48 Stunden sowie 7 Tagen mit dem AT8- und zum Vergleich mit dem AT270-Antikörper angefertigt und untersucht. Während die meisten Tau-exprimierenden Neurone bereits in 24-Stunden

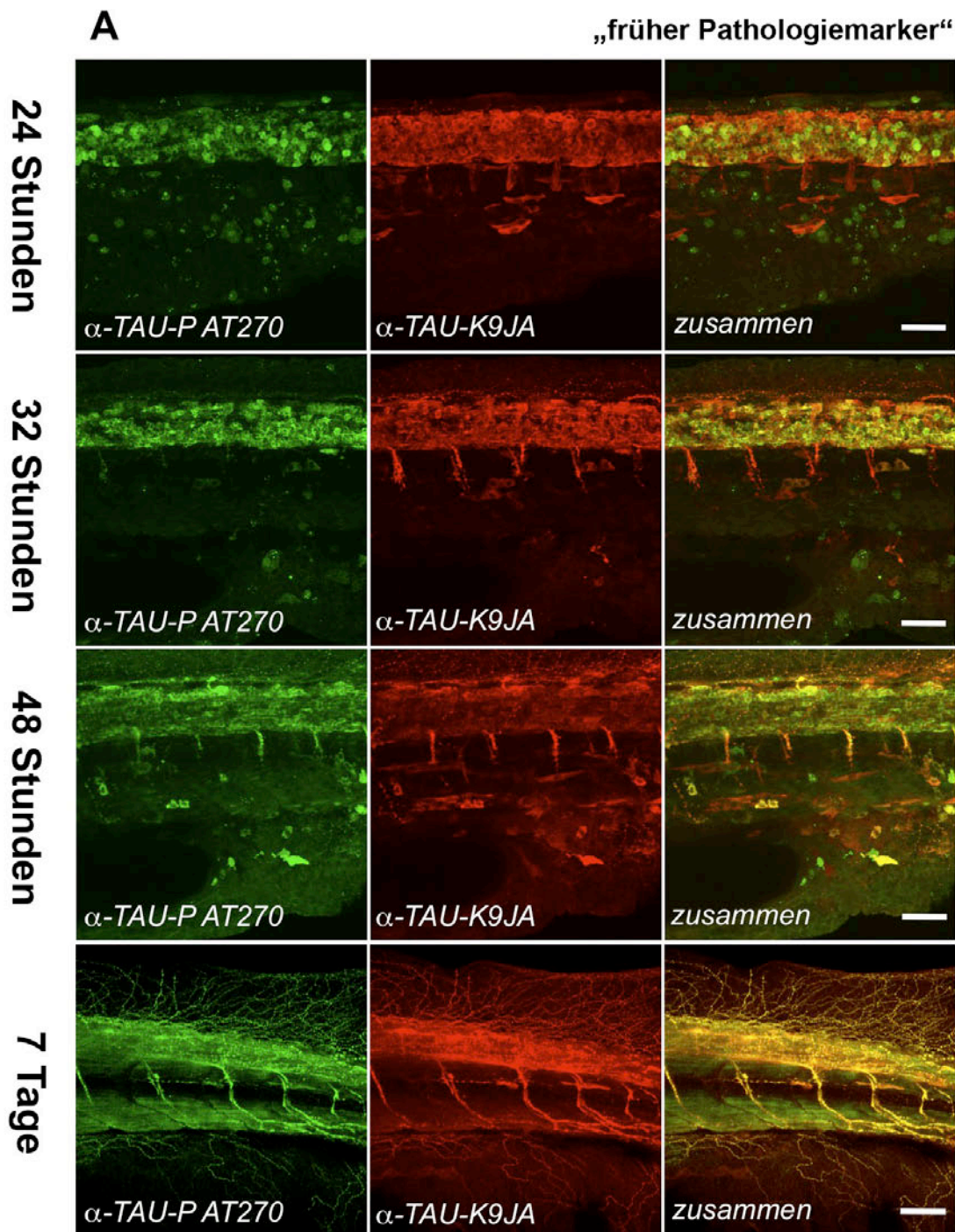
---

<sup>2</sup> Die Paraffinschnitte, immunhistochemischen Färbungen und Gallyas-Silber-Färbungen sowie die Dokumentation der Bilder dieser Färbungen wurden von Astrid Sydow, Dagmar Drexler und Olga Petrova im Labor von Eva-Maria Mandelkow, MPI für Strukturelle Molekularbiologie, Hamburg, durchgeführt.

alten Embryonen die AT270-Phosphorylierung aufwiesen, welche sich mit fortschreitendem Alter kaum veränderte (Abbildung 22A), war das AT8-Epitop nach 24 h nur in wenigen Neuronen phosphoryliert. Innerhalb von einer Woche konnte eine deutliche Zunahme der AT8-positiven Nervenzellen beobachtet werden. Dabei trat das phosphorylierte Tau sowohl in den Zellkörpern als auch in den Fortsätzen auf. In sieben Tage alten Fischlarven war Tau in allen Tau-exprimierenden Neuronen am AT8-Epitop phosphoryliert, was auf ein schnelles Fortschreiten der späten AD/FTD-artigen AT8-Pathologie schließen lässt (Abbildung 22B).

### ***3.6 Expression von humanem Tau verursacht eine Veränderung der Motoneuron-Morphologie und des Verhaltens***

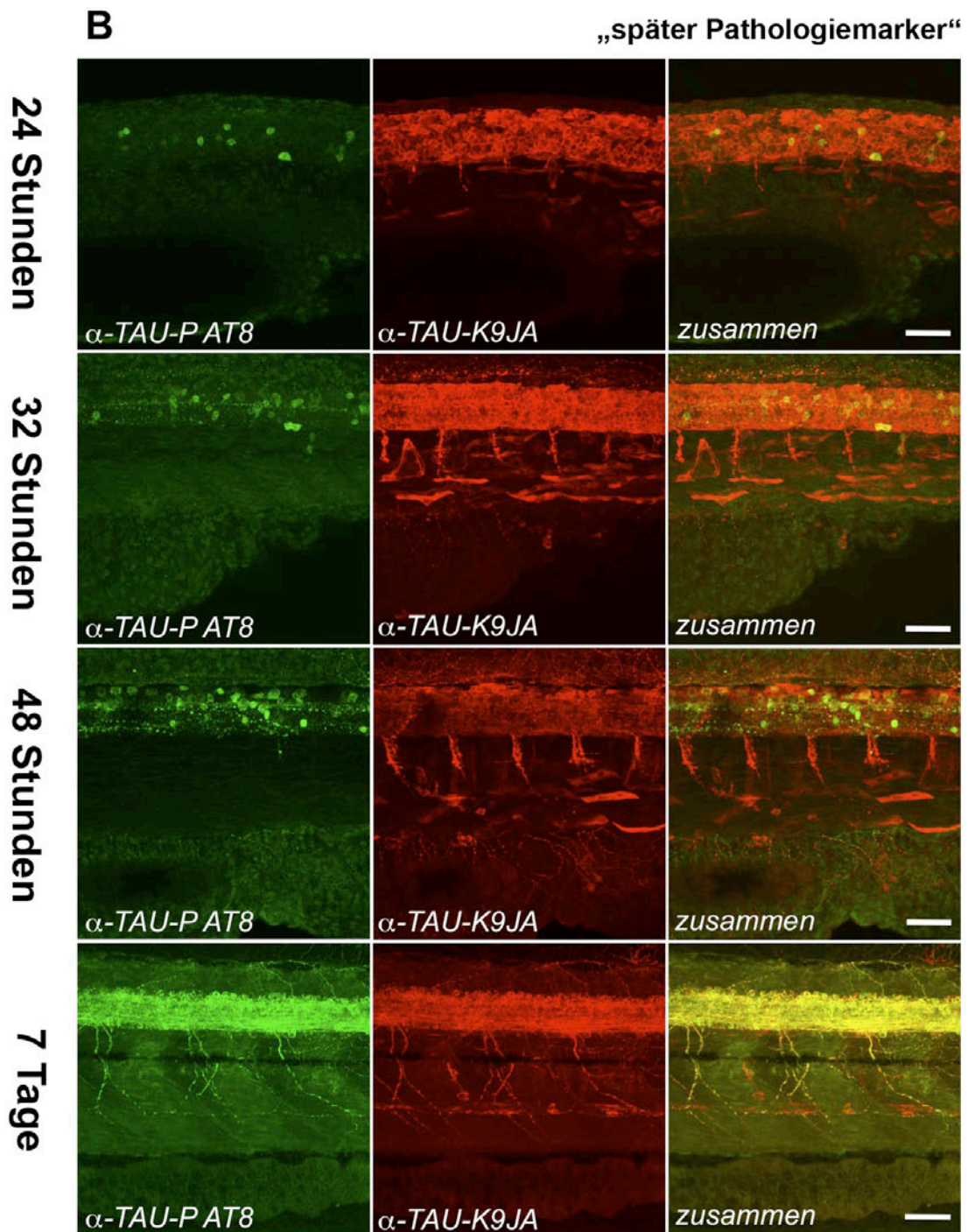
Es wurde bereits in Tau-transgenen Mäusen beobachtet, dass die Expression von Tau eine Inhibition des intrazellulären Transports verursacht, was besonders in langgestreckten Motoneuronen zu funktionellen Problemen führt (Terwel et al., 2005; Thies and Mandelkow, 2007). Diese Veränderungen treten dabei gemeinsam mit einer erhöhten Tau-Phosphorylierung auf. Um zu untersuchen, ob in den Tau-transgenen Zebrafischen ebenfalls Veränderungen in der neuronalen Morphologie auftreten, wurden Fische in unterschiedlichen Stadien mit dem Antikörper znp-1 angefärbt, der das Protein Synaptotagmin in den auswachsenden Fortsätzen der primären Motoneurone der Zebrafische erkennt (Trevarrow et al., 1990; Fox and Sanes, 2007). Dann wurde die Länge der ersten vier Fortsätze der CaP (*caudal primary*) Motoneurone, die sich direkt vor dem Ende des verlängerten Dottersacks befanden, gemessen. Diese Fortsätze verlassen ventral das Rückenmark und wachsen um den Muskel in stereotyper, zeitabhängiger Weise herum, wo sie dann an den Muskelfasern neuromuskuläre Synapsen bilden (Myers et al., 1986). Die sich entwickelnden, Synaptotagmin enthaltenden Fortsätze der CaP Motoneurone waren in 28 Stunden alten Tau-transgenen Embryonen signifikant kürzer als in den nur DsRed exprimierenden Kontrollen (Abbildung 23A, B, Quantifizierung in C). In



**Abbildung 22: Schnelles Fortschreiten der in AD / FTD spät auftretenden AT8-Phosphorylierung**

(A) Die AT270-Phosphorylierung (grün) ist bereits nach 24h in den meisten Tau-exprimierenden Neuronen (Antikörper K9JA, rot) sichtbar und bleibt innerhalb einer Woche relativ konstant phosphoryliert.





(B) Im Gegensatz zu AT270 ist Tau nach 24 h nur in wenigen Neuronen am AT8-Epitop phosphoryliert (grün), obwohl Tau in den meisten Neuronen im Rückenmark exprimiert ist (rot). Mit zunehmendem Alter der Fische entwickelt mehr Neuronen diese Phosphorylierung, nach einer Woche ist Tau in allen Nervenzellen AT8-positiv. Balkenlänge: 50  $\mu$ m

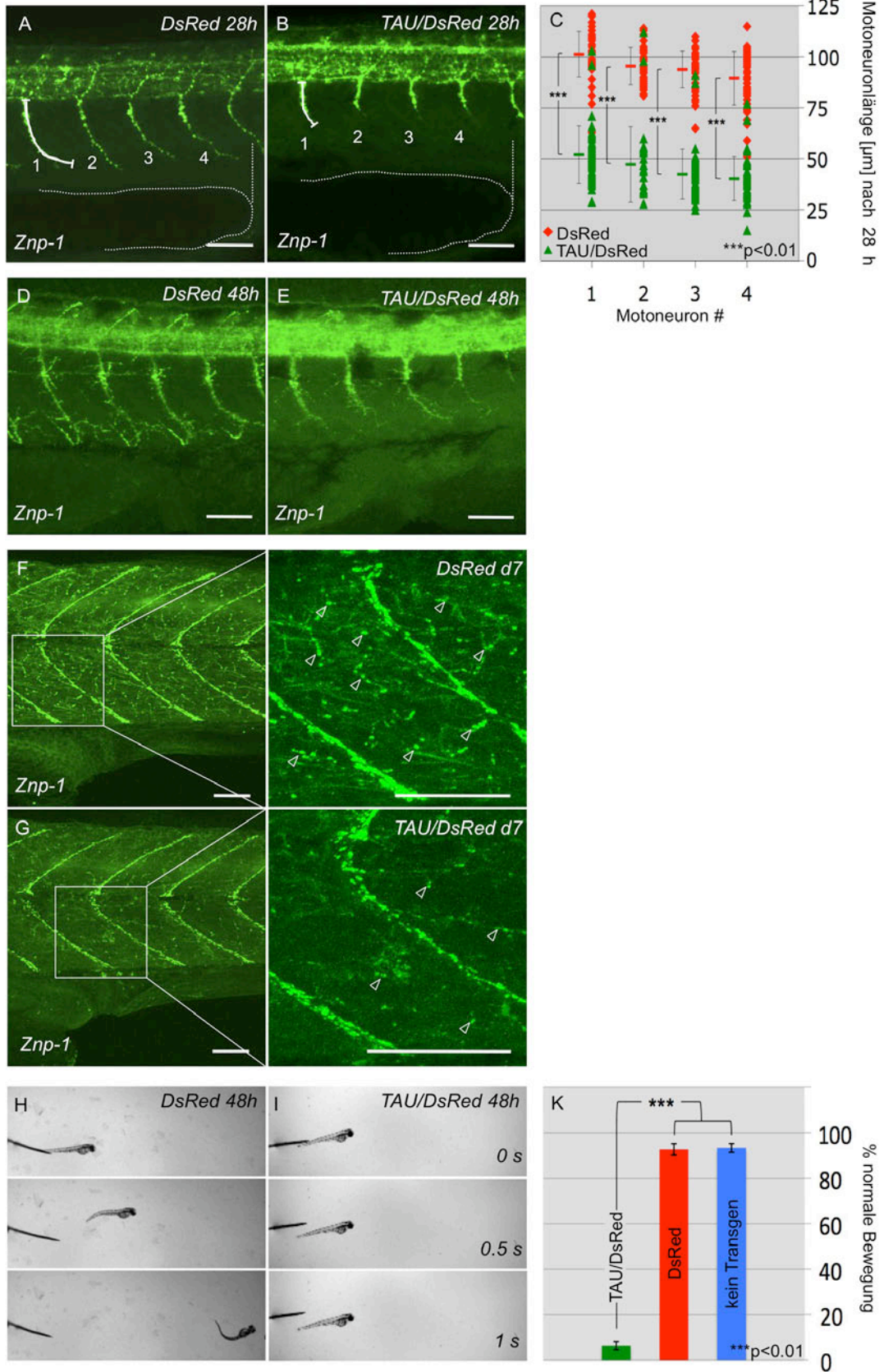
einem späteren, 48 Stunden alten Stadium konnte zwar beobachtet werden, dass die Fortsätze weiter wachsen, allerdings waren sie hier in Tau-transgenen Larven immer noch deutlich kürzer als in den Kontrollen (Abbildung 23D, E). In eine Woche alten Tau-transgenen Fischen, die bereits wie ihre nicht-transgenen Geschwister schwimmen und Futter suchen können, war die Morphologie der Motoneurone schon relativ stark angeglichen, allerdings waren die feinen synaptischen Verbindungen der Neurone mit den Muskelfasern immer noch sichtbar reduziert (Abbildung 23F, G).

Außerdem wurde bei 48 Stunden alten Larven eine Veränderung des Verhaltens festgestellt: Während in den Kontrollfischen durch einen kurzen Berührungsreiz am Schwanz der Larven eine stereotype Fluchtantwort ausgelöst werden konnte, reagierten die meisten Tau-transgenen Larven kaum oder gar nicht auf diesen Reiz. Um diesen Unterschied zu quantifizieren, wurden jeweils 50 zufällig ausgewählte Tau-transgene Larven bzw. Kontrollen in Gefäßen zusammengesetzt. Mit diesen wurde dann die Fluchtantwort untersucht. Während in den Kontrollgruppen über 90% der Larven eine normale Fluchtantwort zeigten, war diese in unter 10% der Tau-transgenen Larven sichtbar (Abbildung 23H, I, Quantifizierung in K). Es ist naheliegend, dass die verkürzten Motoneurone in den 48 h alten Larven den Muskel noch nicht genügend innervieren, um eine Fluchtreaktion zu ermöglichen.

---

**Abbildung 23: Die Expression von Tau verursacht eine Veränderung der Motoneuron-Morphologie und des Verhaltens**

(A-B) Die mit znp-1 gefärbten vier Fortsätze der CaP Motoneurone vor dem Ende des verlängerten Dottersacks (gepunktete Linie; durchgezogene Linie zeigt gemessene Länge) sind in 28 h alten Tau-transgenen Larven signifikant kürzer als in Kontrollen (Quantifizierung in C, Dreiecke und Rauten zeigen Längenwerte der einzelnen Motoneurone; farbige horizontale Linien stehen für den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; \*\*\*  $P < 0.01$ ). (D-E) In 48 h alten Larven besteht trotz weiteren Wachstums immer noch ein Längenunterschied. (F-G) Die Ansammlung von Synaptotagmin in den neuromuskulären Synapsen an den Fortsätzen der Motoneurone (Pfeilspitzen in Vergrößerung) ist in 7 Tage alten Tau-Fischen im Vergleich zu Kontrollfischen immer noch deutlich reduziert. Balkenlänge: 50  $\mu\text{m}$  (H-I) Die Expression von Tau verursacht eine starke Reduktion der Fluchtantwort der 48 h alten Fische (Quantifizierung in K, Die Balken stehen für Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung; \*\*\*  $P < 0.01$ ,  $n = 150$ ).



### ***3.7 Expression von humanem Tau führt zur Degeneration von Neuronen***

Das Absterben von Neuronen ist das finale pathologische Kennzeichen neurodegenerativer Erkrankungen und der wesentliche Grund für die fortschreitenden neurologischen Defekte der von der AD oder FTD betroffenen Patienten. Es war daher von besonderer Wichtigkeit, zu untersuchen, ob die Expression von Tau in den Tau-transgenen Zebrafischen zum Absterben von Neuronen führt, und diese damit auch diese phänotypische Ähnlichkeit zum humanen Krankheitsbild aufweisen. Das Absterben von Zellen kann in lebenden Zebrafischen durch die Inkubation im Farbstoff Acridin Orange nachgewiesen werden. Dieser Farbstoff färbt recht spezifisch Nukleinsäuren an, kann aber nicht die Plasmamembran lebender Zellen überwinden. Daher dringt er vorwiegend in absterbende Zellen ein, deren Zellmembran nicht mehr intakt ist, und färbt dort den Zellkern grün an (Furutani-Seiki et al., 1996). Um zu vergleichen, ob durch die Expression von Tau vermehrt Neuronen absterben, wurden Tau-transgene Fischlarven und zum Vergleich Larven, die nur DsRed oder kein Transgen exprimieren, mit Acridin Orange angefärbt, und die grün leuchtenden Zellkerne im Rückenmark der Fischlarven gezählt. Interessanterweise konnte in den Tau-transgenen Fischlarven ein signifikant erhöhtes Absterben von Nervenzellen beobachtet werden, während in den Kontrolltieren nur eine sehr geringe Zahl absterbender Neuronen vorlag (Abbildung 24A-D). Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass das Absterben der Nervenzellen nicht durch die Expression der Konstrukte an sich, sondern spezifisch durch die Gegenwart des mutierten Tau-Proteins in den Neuronen ausgelöst wurde. Um diesen Degenerationsprozess im Detail analysieren zu können, wurden die mit Acridin Orange gefärbten Fischlarven auch für Lebendbeobachtungen über einen längeren Zeitraum verwendet. Hierfür wurden DsRed-exprimierende rote Nervenzellen drei Tage alter Tau-transgener Fischlarven mit einem hochauflösenden konfokalen Mikroskop für einen Zeitraum von 10 bis 12 Stunden gefilmt. Da die absterbenden

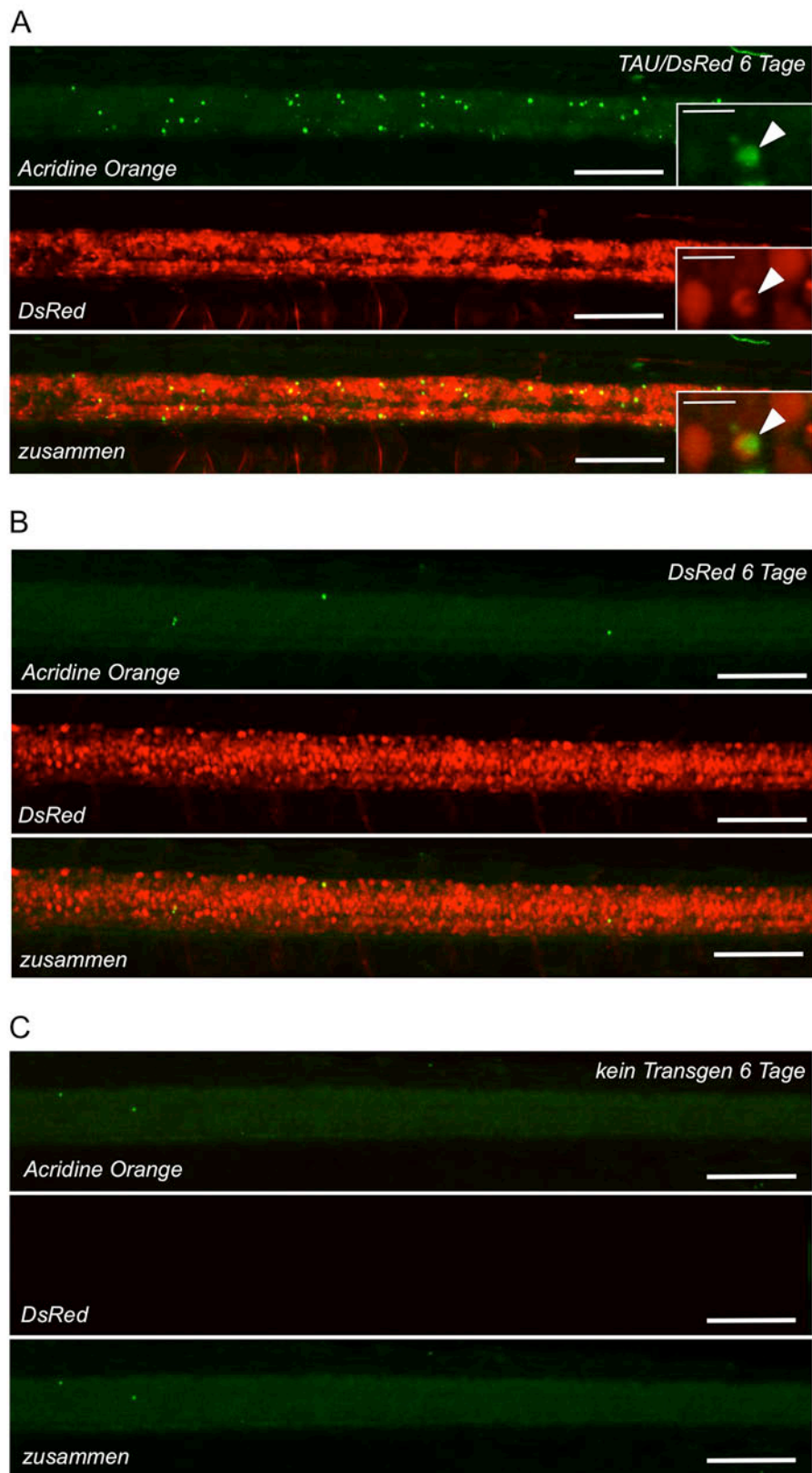


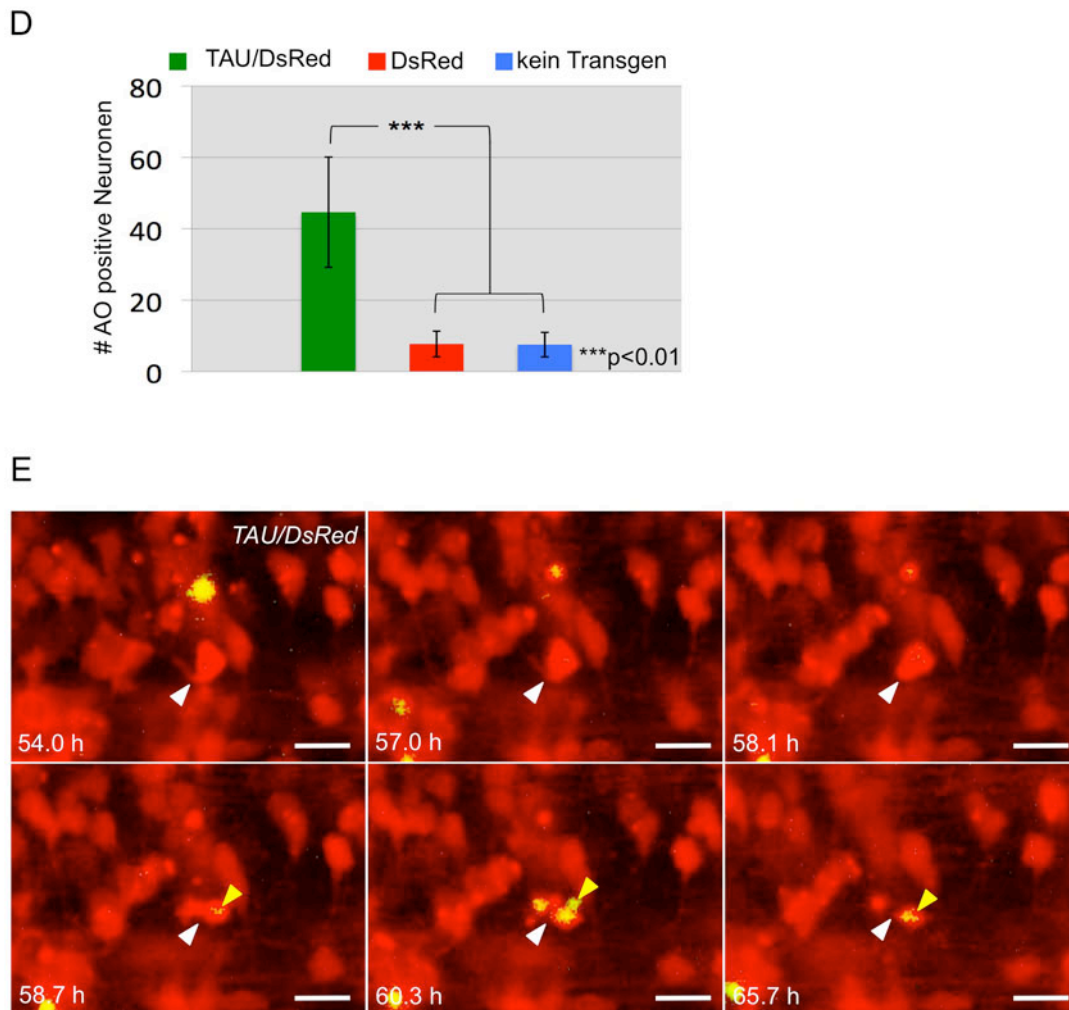
Nervenzellen durch Aufnahme von Acridin Orange in den Zellkern grünelb leuchteten, konnten sie am Ende des Videos identifiziert und der Prozess ihres Absterbens zurückverfolgt werden. Hierbei konnte ein Neuron beobachtet werden, welches zunächst seine Form änderte und sich abrundete (54,0 bis 58,1 Stunden nach Befruchtung), dann in mehrere Fragmente zerfiel, die Acridin Orange aufnahmen (58,1 bis 60,3 Stunden n. B.) und schließlich langsam verschwand (60,3 bis 65,7 Stunden n. B.) (Abbildung 24E). Es handelt sich bei diesem Beispiel um die erste dokumentierte Beobachtung von Neurodegeneration in einem lebenden Modelltier im Bereich der Demenzforschung.

### **3.8 Die Tau-Kinase GSK3 $\beta$ ist im Zebrafisch hochkonserviert**

Wie bereits in 1.4.4 dargelegt, ist die Phosphorylierung von Tau durch bestimmte Kinasen nicht nur ein wesentliches Merkmal der Pathologie der Tauopathien, sondern sie spielt wahrscheinlich auch eine ursächliche Rolle beim Fortschreiten der Krankheit. Es wird angenommen, dass Tau durch seine Phosphorylierung von den Mikrotubuli dissoziiert und dadurch verstärkt zur Aggregation neigt. Außerdem könnten lösliche phosphorylierte Tau-Spezies direkt an der Entstehung der bei Demenzerkrankungen auftretenden kognitiven Störungen beteiligt sein (Iqbal et al., 2009). Aus diesem Grund sind Tau-Kinasen wie GSK3 $\beta$  vielversprechende Ansatzpunkte für die Entwicklung von Wirkstoffen zur Therapie oder Prävention von Demenzerkrankungen (Mazanetz and Fischer, 2007). Da in den neuentwickelten Tau-transgenen Zebrafischen die pathologische Hyperphosphorylierung von Tau bereits nach nur 32 Stunden auftritt, sind sie besonders gut geeignet, um Wirkstoffe hinsichtlich ihrer *in-vivo*-Aktivität auf die Tau-Phosphorylierung zu testen.

Eine wichtige Voraussetzung für die Übertragbarkeit der in Zebrafischen gewonnenen Ergebnisse auf den Menschen ist der Grad der Konservierung der untersuchten Proteine. Wirkstoffe, die direkt die Funktion eines Enzyms, wie z.B. der Tau-Kinase GSK3 $\beta$  verändern, binden meist direkt im aktiven





**Abbildung 24: *In vivo* Beobachtung von durch Tau-Expression ausgelöstem neuronalem Zelltod**

(A-D) Tau-exprimierende, 6 Tage alte transgene Fische zeigen ein signifikant erhöhtes Absterben von Neuronen im Rückenmark (A), im Vergleich zu Fischen, die mit vergleichbaren Konstrukten nur DsRed exprimieren (B), oder nicht transgenen Fischen (C) (Quantifizierung in D, die Balken stehen für Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung; \*\*\*  $P < 0.01$ ,  $n = 44$ ). Seitenansicht des Rückenmarks, Färbung der absterbenden Zellen mit Acridine Orange (AO), Balkenlänge 100  $\mu\text{m}$ , in den Ausschnitten 10  $\mu\text{m}$ . (E) Standbilder verschiedener Zeitpunkte einer Zeitrafferaufnahme der DsRed-positiven Neurone im Rückenmark Tau-transgener Fische, die mit Acridin Orange gefärbt wurden. Eine intakte Nervenzelle mit einem Zellfortsatz (weiße Pfeilspitzen) rundet zunächst ihren Zellkörper ab (54.0 h bis 58,1 h), fragmentiert dann in mehrere Teile (58,1 h bis 60,3 h), die Acridin Orange aufnehmen (gelbe Pfeilspitzen), und löst sich dann langsam auf (60,3 h bis 65,7 h). Balkenlänge 10  $\mu\text{m}$ .

Zentrum des Enzyms oder verändern allosterisch dessen Struktur durch die Bindung an anderer Stelle (Bhat et al., 2004). Um die Wirksamkeit eines Inhibitors, der Zebrafisch-Gsk3 $\beta$  hemmt, im Menschen einschätzen zu können, sollte die Sequenz und damit die Struktur des Enzyms möglichst hoch konserviert sein. Daher wurde die Aminosäuresequenz von GSK3 $\beta$  in Zebrafischen und Menschen verglichen. Hierbei fiel ein besonders hoher Grad der Konservierung auf. Die Aminosäuren des Zebrafisch-Enzyms sind zu über 90% mit denen der humanen Kinase identisch. Im aktiven Zentrum, wo das Enzym ATP bindet und welches die Bindestelle vieler bereits bekannter Inhibitoren ist, ist es sogar zu 100% konserviert (Abbildung 25).



**Abbildung 25: Konservierung der Tau-Kinase GSK3 $\beta$  im Zebrafisch**

Vergleich der Proteinsequenz der humanen und Zebrafisch Kinase GSK3 $\beta$ . Über 90% der Aminosäuren sind zwischen beiden Orthologen konserviert (\*), die meisten übrigen sind sehr ähnlich (:) oder ähnlich(.). Im aktiven Zentrum des Enzyms (blau unterlegt) sind alle Aminosäuren identisch.

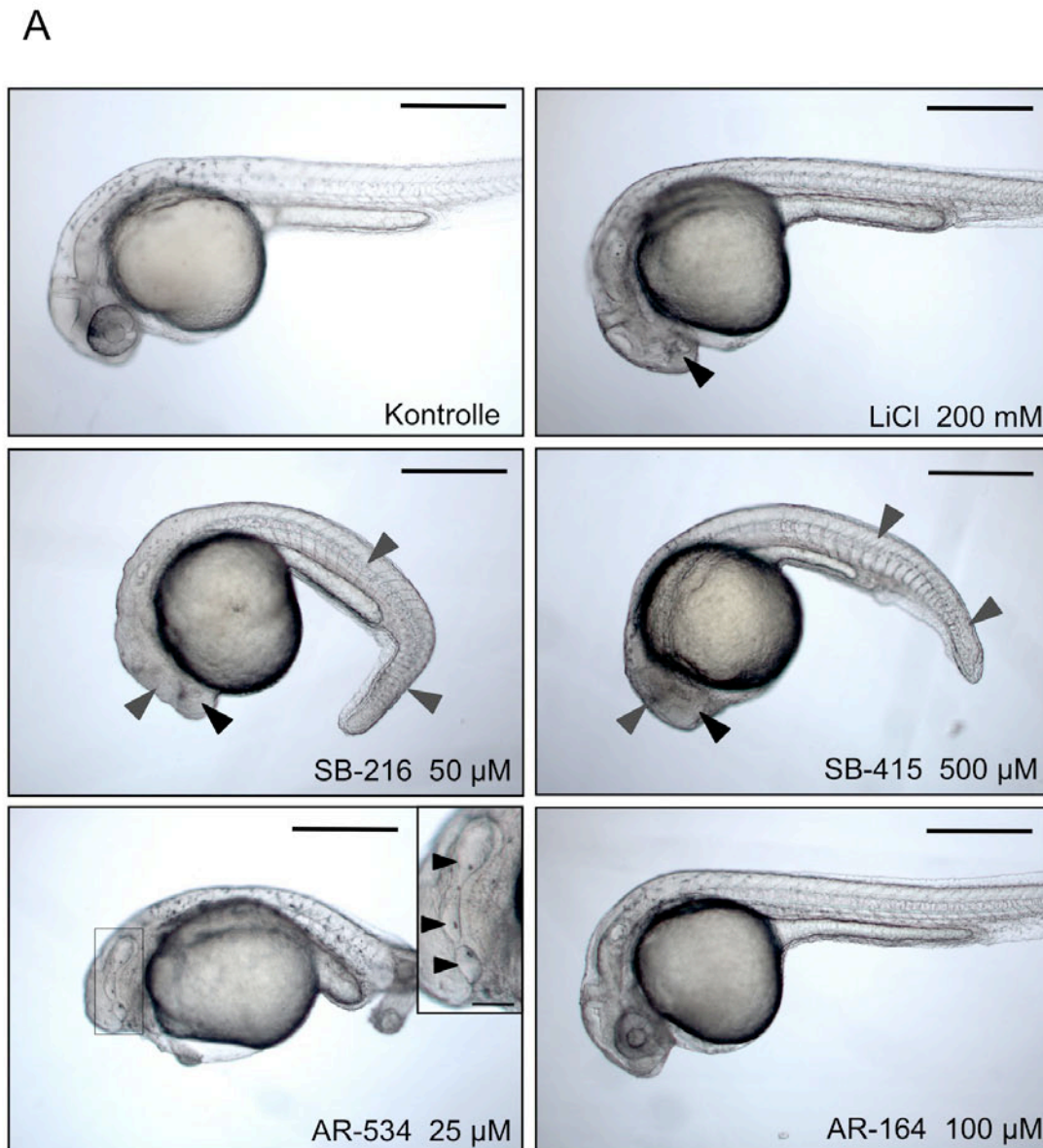
### **3.9 Verschiedene GSK3-Inhibitoren zeigen in Zebrafischen unterschiedliche in-vivo-Aktivitäten**

Die hohe Konservierung der von den Zebrafischen exprimierten endogenen Kinase Gsk3 $\beta$  legt nahe, dass ihre Aktivität mit GSK3-Inhibitoren gehemmt werden kann, die bereits in anderen Modellorganismen oder im Menschen erfolgreich angewendet wurden. Um die Eignung des Fischsystems für Inhibitorexperimente zu demonstrieren, wurden daher die Inhibitionseffekte mehrerer bereits bekannter Inhibitoren auf Zebrafisch Gsk3 $\beta$  getestet. Lithiumchlorid, welches relativ unspezifisch mehrere Kinasen hemmt, wurde in hoher Konzentration als Positivkontrolle verwendet, außerdem wurde der Effekt von zwei bereits publizierten spezifischen GSK3-Inhibitoren, SB-216763 und SB-415286 getestet (Smith et al., 2001) (siehe auch 1.4.5 und Abbildung 11). Anschließend wurde mit den Fischen die *in-vivo*-Aktivität zweier neuentwickelter GSK3-Inhibitoren, AR-534 und AR-164 überprüft. Für diese beiden Substanzen wurde bereits gezeigt, dass sie spezifisch in das aktive Zentrum der Kinase passen und die Phosphorylierung von Tau in Zellkulturzellen in Dosis-abhängiger Weise gleichermaßen effektiv unterdrücken können<sup>3</sup> (siehe 1.4.5 und Abbildung 11).

Zunächst sollte in einem ersten Schritt untersucht werden, ob die Inhibitoren die Aktivität der endogenen Zebrafisch-Kinase Gsk3 $\beta$  hemmen können. Daher wurden mit den Inhibitoren vier Stunden alte Wildtypembryonen für einen Zeitraum von 20 Stunden behandelt und der entstehende Phänotyp untersucht. GSK3 $\beta$  ist ein wichtiger Bestandteil des kanonischen Wnt-Signaltransduktionsweges in sich entwickelnden Wirbeltierembryonen

---

<sup>3</sup> Die GSK3-Inhibitoren AR-164 und AR-534 wurden von Ratan Bhat und Kollegen bei AstraZeneca in Södertälje, Schweden, basierend auf Computerstrukturmodellen der Kinase GSK3 $\beta$  entwickelt, synthetisiert und *in vitro* charakterisiert. Außerdem wurde ihre Aktivität auf die Tau-Phosphorylierung in Zellkulturzellen bestimmt und quantifiziert (siehe auch 1.4.5 und Abbildung 11). Die Daten und die Inhibitoren wurden von Ratan Bhat für diese Studie freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

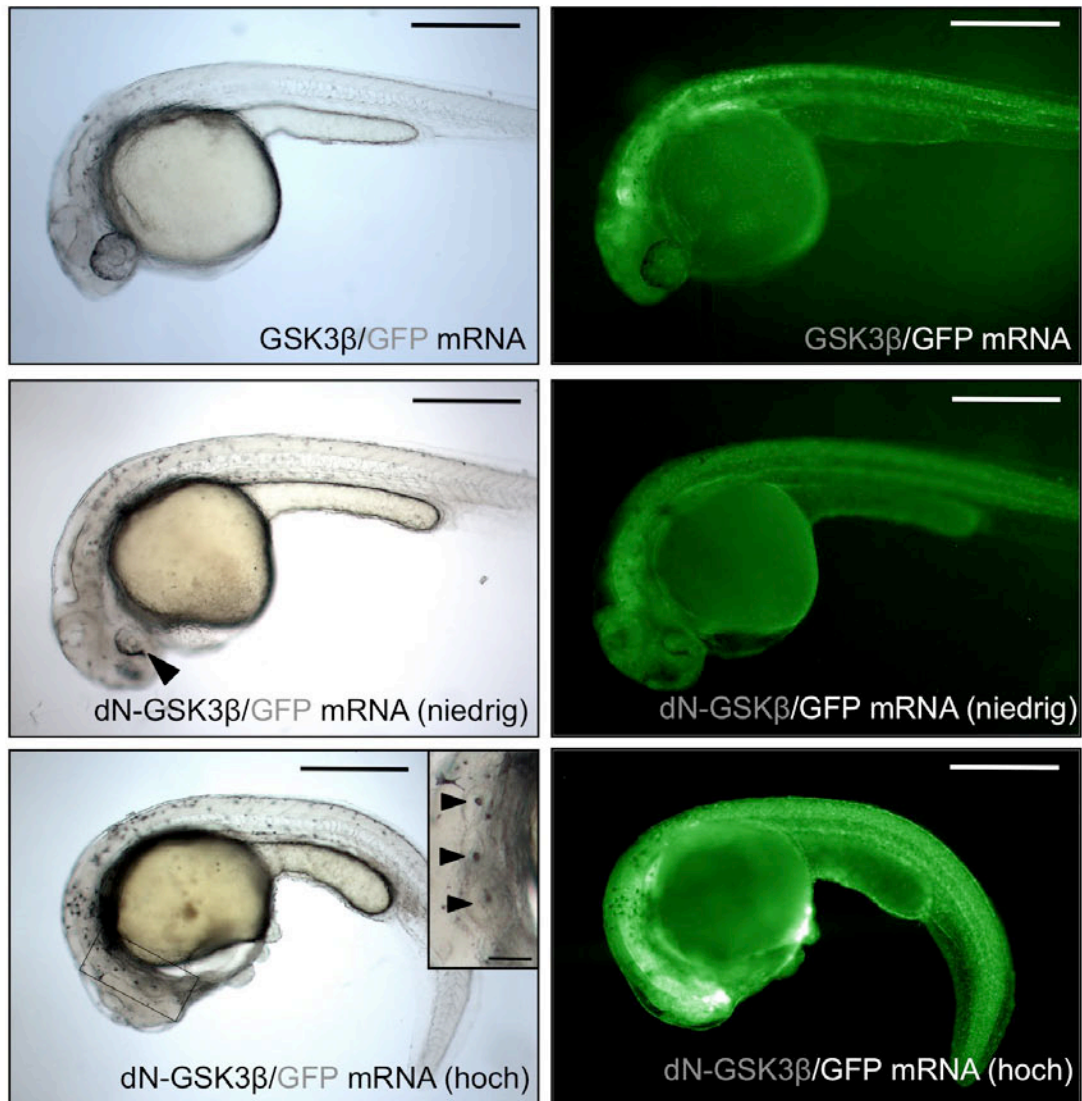


**Abbildung 26: Chemische und genetische Inhibition der GSK3 $\beta$ -Aktivität im Zebrafisch**

(A) Die Aktivität von Zebrafisch-Gsk3 $\beta$  wurde durch Inkubation der 4 h alten Embryonen für 20 Stunden in mehreren Inhibitoren gehemmt. Dies führt zur Ausbildung spezifischer Phänotypen, welche durch die fehlende Aktivität von Gsk3 $\beta$  im für die Embryogenese wichtigen Wnt-Signaltransduktionsweg zustande kommen. Die Inkubation in LiCl verursacht eine Reduktion der Augenbildung (Pfeilspitze), in SB-216763 und SB-415286 zusätzlich Probleme bei der Bildung von Gehirn, Somiten und Schwanz (Pfeilspitzen). Inhibition von Gsk3 $\beta$  mit AR-534 führt zusätzlich zur Bildung mehrerer Ohrplakoden (Pfeilspitzen in Vergrößerung). Im Gegensatz dazu zeigt AR-164 keine sichtbare *in-vivo*-Aktivität auf den Wnt-Weg und die Embryogenese.



B



(B) Die genetische Inhibition der Gsk3 $\beta$ -Aktivität durch Überexpression des dominant negativen Enzyms (*Xenopus* dN-GSK3 $\beta$ ) verursacht sehr ähnliche Phentypen wie die chemische Inhibition, während die Expression von normaler *Xenopus* GSK3 $\beta$  keine Effekte zeigt. Zur Beurteilung der Expressionslevel wurde GFP koexprimiert. Nur die starke Inaktivierung der Gsk3 $\beta$ -Aktivität durch hohe Expressionslevel von *Xenopus* dN-GSK3 $\beta$  führt zur Bildung mehrerer Ohrplakoden (Pfeilspitzen in Vergrößerung), wie sie durch Inkubation in AR-534 beobachtet wurde. Balkenlänge: 500  $\mu$ m, in Vergrößerungen 100  $\mu$ m.

(Doble and Woodgett, 2003) (siehe auch 1.4.4.1). Die Inhibition des Enzyms während der frühen Embryonalentwicklung führt zu einer Veränderung der Schicksale der sich entwickelnden Zellen hin zu mehr dorsal liegenden Geweben. Dies führt zur Ausbildung spezifischer Phänotypen, wie z.B. dem Verlust der Augen oder Störungen bei der Bildung des Gehirn- oder Muskelgewebes (Stachel et al., 1993).

Die Inkubation der Embryonen in 200 mM Lithiumchlorid führte zu dem erwarteten Verlust der Augenanlage. Die Behandlung von Fischembryonen mit den GSK3-spezifischen Inhibitoren SB-216763 (50  $\mu$ M) und SB-415286 (500  $\mu$ M) resultierte darüber hinaus auch noch in Fehlbildungen des Gehirns, der Muskeln und des Schwanzes. Allerdings musste von SB-415286 die zehnfach Menge eingesetzt werden, um den gleichen Phänotyp wie SB-216763 zu erreichen; die *in-vivo*-Aktivität von SB-216763 ist also trotz der recht ähnlichen chemischen Struktur (siehe Abbildung 11) und vergleichbarer Aktivität in Zellkultur (Smith et al., 2001) im Vergleich zu SB-415286 deutlich höher. Embryonen, die im neuentwickelten Inhibitor AR-534 (25  $\mu$ M) inkubiert wurden, entwickelten ebenfalls alle bislang beschriebenen Phänotypen, wiesen aber interessanterweise zusätzlich noch eine Vermehrung der Ohrplakoden auf. Im Gegensatz dazu hatte der Inhibitor AR-164 (100  $\mu$ M), welcher in Zellkulturexperimenten eine vergleichbare Aktivität aufwies, keinerlei *in-vivo*-Effekt auf die Embryonalentwicklung der Zebrafische, obwohl er ebenfalls in mehrfach höherer Konzentration AR-534 eingesetzt wurde (Abbildung 26A).

Um die Effizienz der Enzyminaktivierung und die Spezifität der Inhibitoren besser beurteilen zu können, wurden die Effekte der Inhibitoren mit einer genetischen Inaktivierung von Gsk3 $\beta$  verglichen. Hierfür wurde eine dominant-negative Form der Kinase und zum Vergleich das Wildtyp-Enzym aus dem Krallenfrosch *Xenopus laevis* in den Zebrafischembryonen überexprimiert. Die Kinase aus *Xenopus* ist mit dem Zebrafischenzym zu 93% identisch. Um Dosis-abhängige Effekte beurteilen zu können, wurde zusätzlich noch das Fluoreszenzprotein GFP überexprimiert. Aus den injizierten



Embryonen konnten dann anhand der Fluoreszenzintensität von GFP Individuen mit niedrigen oder hohen Mengen der exprimierten Proteine bzw. geringer und starker Inhibition der Enzymaktivität durch Expression der dominant-negativen Kinase herausgesucht werden. Eine hohe GFP-Fluoreszenz wurde dabei mit einer hohen Expression der dominant-negativen Kinase gleichgesetzt. Die Embryonen mit niedriger Enzym-Inaktivierung wiesen genau wie die mit den Inhibitoren LiCl, SB-216763 oder SB-415286 behandelten Fische den Verlust der Augen auf, jedoch nicht die Vermehrung der Ohrplakode. Dieser Phänotyp konnte nur in Embryonen beobachtet werden, die eine hohe Inaktivierung von Gsk3 $\beta$  durch eine hohe Expression des dominant-negativen Enzyms aufwiesen (Abbildung 26B). Der Vergleich zwischen chemischer und genetischer Inhibition der Enzymfunktion verdeutlicht, dass der neuentwickelte Inhibitor AR-534 von allen getesteten Substanzen die höchste *in-vivo*-Aktivität besitzt.

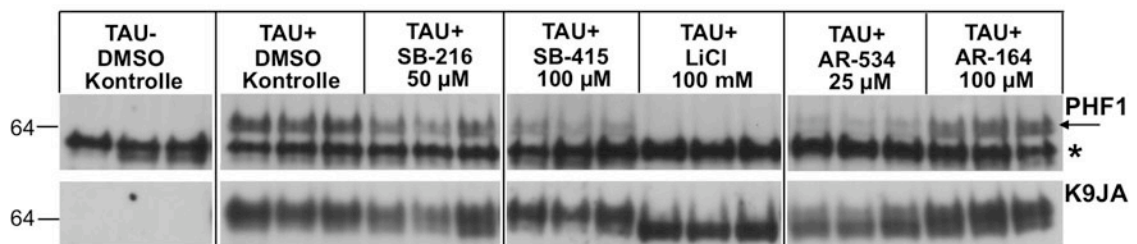
### **3.10 GSK3-Inhibitoren verringern die pathologische Tau-Phosphorylierung in transgenen Zebrafischen**

Die Beeinflussung der Embryonalentwicklung durch GSK3-Inhibitoren hat bereits gezeigt, dass Zebrafische als Versuchstiere geeignet sind, um den *in-vivo*-Effekt dieser Wirkstoffe auf die Aktivität von Gsk3 $\beta$  beurteilen zu können. Da die Kinase aber nicht nur bei der Embryonalentwicklung von Wirbeltieren eine Rolle spielt, sondern auch wesentlich an der pathologischen Phosphorylierung von Tau in gealterten Neuronen von Demenzpatienten beteiligt ist, wurde im nächsten Schritt überprüft, ob die Inhibitoren auch die in den Tau-transgenen Fischen auftretende pathologische Tau-Phosphorylierung blockieren können. Sollten die getesteten Inhibitoren hier einen Effekt zeigen, wäre das Fischmodell dazu geeignet, weitere Inhibitoren zu identifizieren und ihre *in-vivo*-Aktivität auf die Reduktion der Tau-Phosphorylierung zu validieren. 24 Stunden alte, Tau-transgene Fischembryonen wurden daher für drei Tage in GSK3-Inhibitoren, welche in Embryomedium gelöst wurden, inkubiert. Da die frühe Embryogenese zu

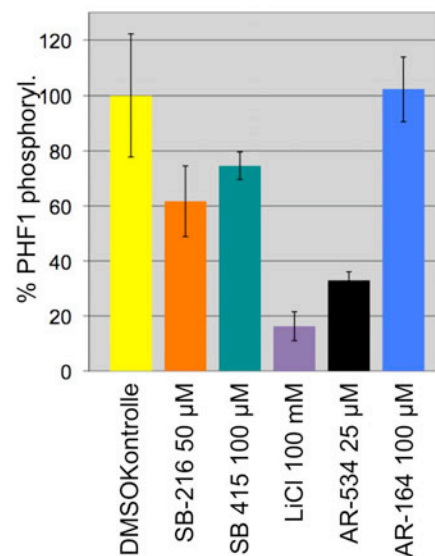
diesem Zeitpunkt bereits im Wesentlichen abgeschlossen ist, führte eine Behandlung der Fische in diesem Zeitraum nicht mehr zur Ausprägung eines signifikant veränderten morphologischen Phänotyps. Nach Abschluss der Behandlung wurden die Proteine aus den Fischlarven extrahiert und einer quantitativen Western-Blot Analyse unterzogen, um die Menge an pathologisch phosphoryliertem Tau zu quantifizieren. Hierfür wurde der Antikörper PHF1 verwendet, der pathologisch phosphoryliertes Tau erkennt und auch von Pathologen zur Diagnose von Tauopathien eingesetzt wird (Greenberg et al., 1992). Das PHF1-Epitop wird von GSK3 $\beta$  phosphoryliert (Billingsley and Kincaid, 1997).

Auf den Western-Blots konnte, wie bereits in 3.4 dargestellt, in den Tau-transgenen Fischen das am PHF1-Epitop phosphorylierte Tau-Protein in einer Bande mit einem relativen Molekulargewicht von 64 kDa nachgewiesen werden (Abbildung 27A). Die auf denselben Blots auftretende, etwas niedriger laufende Bande ist hingegen eine unspezifische Kreuzreaktion, die auch in nicht transgenen Fischen auftrat. In den Spuren, in denen die Proteinextrakte der Inhibitoren-behandelten Fische geladen wurden, konnte anhand der weniger starken Banden eine Reduktion der pathologischen Phosphorylierung festgestellt werden. Um diesen Unterschied zu quantifizieren, wurde die Menge an PHF1-positivem Tau zunächst mit der Gesamtmenge an Tau abgeglichen. Diese wurde auf derselben Western-Blot-Membran mit dem Antikörper K9JA nachgewiesen. Hierdurch konnten Unterschiede in der Expression oder beim Laden der Proteingele ausgeschlossen werden. Anschließend wurde die Menge an Phosphoryliertem Tau in Inhibitor-behandelten und nur mit DMSO behandelten Fischen verglichen (Abbildung 27B). Durch die Quantifizierung der Proteinmengen konnte nachgewiesen werden, dass die Behandlung der Fischlarven mit den bereits publizierten GSK3-Inhibitoren SB-216763 und SB-415286 zu einer 30-40% verminderten Phosphorylierung von Tau führt. Dieser Effekt ist allerdings im Vergleich zu Lithiumchlorid, welches in hoher Konzentration als Positivkontrolle verwendet

A



B



**Abbildung 27: GSK-3-Inhibitoren reduzieren die pathologische Tau-Phosphorylierung in transgenen Zebrafischen**

(A) Quantitativer Western-Blot mit dem für die pathologische Phosphorylierung von Tau spezifischen Antikörper PHF1 und dem total-Tau-Antikörper K9JA zum Vergleich der Proteinmengen. 24 h alte Tau-transgene und Kontrollfische wurden für 3 Tage in Triplikaten mit den Inhibitoren behandelt. Die extrahierten Proteine der Triplikate wurden nebeneinander auf vier identischen Proteingelen parallel analysiert, jedes Gel enthielt eine eigene DMSO-Kontrolle, mit der die anderen Proben auf diesem Gel verglichen wurden, in der Abbildung ist nur eine DMSO-Kontrolle gezeigt. Die pathologische Tau-Phosphorylierung (obere Bande, markiert mit Pfeil) wird in Tau-transgenen Fischen (TAU+) im Vergleich zur DMSO-Kontrolle von GSK3-Inhibitoren vermindert. SB-216763 und SB-415286 haben einen mittleren Effekt im Vergleich zur Positivkontrolle Lithiumchlorid, welche die Tau-Phosphorylierung vollständig blockiert. AR-534 hat trotz 4000-fach geringerer Konzentration einen mit LiCl vergleichbaren Effekt, wohingegen AR-164 *in vivo* vollständig inaktiv ist. Der Pfeil markiert die spezifische PHF1-Bande, der Stern eine unspezifische Hintergrundbande, die auch in nicht-transgenen Fischen (TAU-) zu finden ist (siehe auch Abbildung 21B).

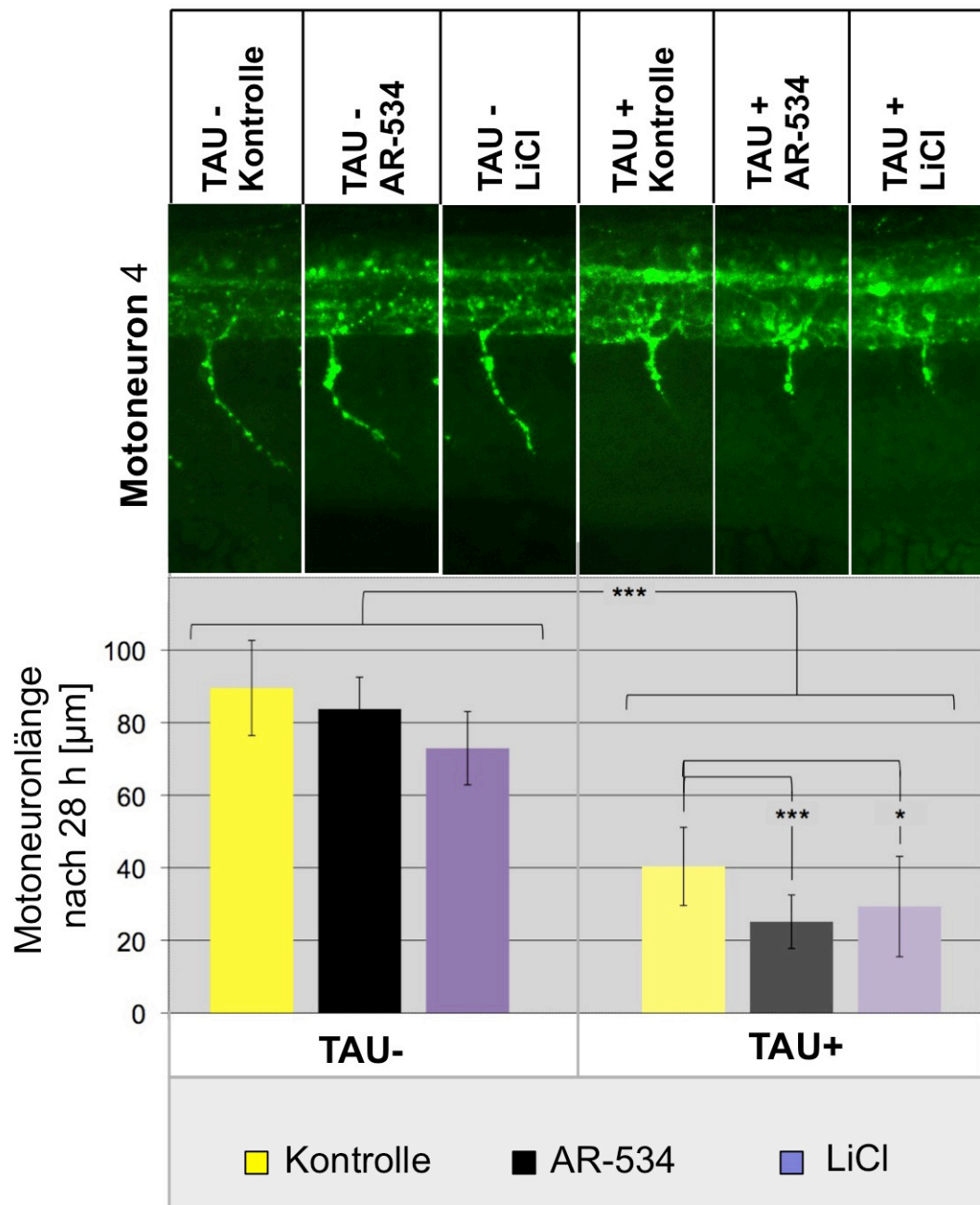
(B) Quantifizierung der spezifischen PHF1 Banden der Triplikate, normalisiert auf die total-Tau-K9JA Bande, die Balken stehen für Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

wurde und die Phosphorylierung um etwa 80% reduzierte, nicht sehr stark ausgeprägt. Interessanterweise reduziert der neuentwickelte Inhibitor AR-534 die Tau-Phosphorylierung wesentlich effektiver, er erreichte eine Reduktion von etwa 70%, und damit trotz einer wesentlich geringeren Konzentration fast den Effekt von Lithiumchlorid. Im Gegensatz dazu zeigt der andere neue Inhibitor AR-164 keinerlei Reduktion der pathologischen Tau-Phosphorylierung, was konsistent mit seiner fehlenden Aktivität auf die Embryonalentwicklung ist. Wie ebenfalls bereits in diesem Experiment beobachtet, besitzt AR-534 auch bei der Reduktion der Tau-Phosphorylierung die höchste *in-vivo*-Aktivität.

### **3.11 Die Inhibition der GSK3-Aktivität führt nicht zu einer Rettung anderer Tau-induzierter Phänotypen**

GSK3-Inhibitoren reduzieren, wie im vorigen Kapitel gezeigt, in Tau-transgenen Zebrafischen effizient die pathologische Tau-Phosphorylierung. Daher stellt sich die Frage, ob diese Substanzen auch weitere bei den Fischen auftretende Tau-abhängige Phänotypen unterdrücken können. Aus diesem Grund wurde der Effekt der Enzym-Inhibition auf das Auswachsen der Motoneurone, welches durch Expression von Tau behindert ist (siehe 3.6), untersucht. Hierfür wurden 4 Stunden alte Embryonen für 24 Stunden in Lithiumchlorid oder dem spezifischen GSK3-Inhibitor AR-534 inkubiert. Für diese Experimente wurden die gleichen Konzentrationen verwendet, die auch die Tau-Phosphorylierung effektiv hemmen konnten (siehe 3.10). Die behandelten Fische wurden anschließend fixiert und mit dem Motoneuronmarker Znp-1 gefärbt.

Interessanterweise kommt es durch Inkubation in GSK3-Inhibitoren nicht zu einer Rettung des Motoneuron-Phänotyps. Die Länge der auswachsenden Axone ist im Gegenteil noch stärker verkürzt als in mit DMSO behandelten Tau-transgenen Fischen. Wie schon bei der Inhibition der Tau-Phosphorylierung waren LiCl und AR-534 ähnlich effektiv (Abbildung 28).



**Abbildung 28: Die Behandlung mit GSK3-Inhibitoren führt zu einer weiteren Verkürzung der Motoneurone**

Die Inkubation von 4 h alten Tau-transgenen (TAU+) und nicht transgenen Embryonen (TAU-) für 24 h in LiCl oder AR-534 führte zu einer weiteren Verkürzung der Motoneurone im Vergleich zu mit DMSO behandelten Fischen (Kontrolle). Die Länge des ersten Motoneurons vor dem Ende der Dotterverlängerung (Motoneuron 4 in Abbildung 23) wurde quantifiziert. Seitenansicht 28 h alter mit dem Motoneuronmarker znp-1 gefärbter Fischembryonen, die Balken stehen für Mittelwerte ± Standardabweichung; \*\*\* P < 0.01, \* P < 0.5, n = 23.

Vorläufige Ergebnisse weisen außerdem darauf hin, dass die Behandlung mit LiCl oder AR-534 in Konzentrationen, welche die Tau-Phosphorylierung deutlich reduzieren, nicht zu einer Reduktion der in den Tau-transgenen Fischen beobachteten Neurodegeneration führt (Daten nicht gezeigt).

## 4 Diskussion

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Etablierung und Charakterisierung transgener Zebrafische als neues Tiermodell zur Erforschung neurodegenerativer Erkrankungen, insbesondere der Tauopathien. Das Tau-Protein spielt bei der Pathogenese der häufigsten Demenz, der Alzheimer-Erkrankung, und bei weiteren ähnlichen Erkrankungen, wie z.B. Frontotemporalen Demenzen eine wesentliche Rolle (Lee et al., 2001). Außerdem wurde gezeigt, dass autosomal-dominante Mutationen des Tau-Gens *MAPT* in Patienten zur Ausbildung einer frontotemporalen Demenzerkrankung mit Alzheimer-ähnlicher Tau-Pathologie führen (Hutton et al., 1998). Die Überexpression dieser Demenz-assoziierten, mutierten Formen des menschlichen Tau-Proteins führte in transgenen Tiermodellen, wie der Maus, der *Drosophila*-Fliege oder dem Fadenwurm *C. elegans* zur Ausbildung von neuropathologischen Phänotypen, die dem Krankheitsbild beim Menschen ähnlich sind (Gotz et al., 2007; Gotz and Ittner, 2008). In der vorliegenden Arbeit sollten Tau-transgene Zebrafische hergestellt werden, die eine Krankheits-ähnliche Pathologie aufweisen. Zebrafische sind aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften, die im folgenden noch detailliert diskutiert werden, sehr gut für die Untersuchung von Krankheiten des Nervensystems geeignet (Dodd et al., 2000; Rubinstein, 2003; Beis and Stainier, 2006). Daher könnten Tau-transgene Zebrafische, die wesentliche Merkmale von Demenzerkrankungen aufweisen, neue Erkenntnisse über die Entstehung, den Verlauf und mögliche Therapieansätze der Krankheit liefern. Der erste Schritt zur Herstellung eines solchen transgenen Tiermodells ist die Erzeugung und die stabile Integration eines geeigneten Konstrukts, mit dem ausreichende Mengen des Demenz-assoziierten Tau-Proteins im Nervensystem der Zebrafische exprimiert werden können, um eine frühzeitig auftretende Pathologie hervorzurufen. Daher wurde in dieser Arbeit zunächst ein neuartiges Expressionssystem für die Herstellung transgener Zebrafische entwickelt.

#### **4.1 Herstellung transgener Fische über ein neuentwickeltes Vektorsystem**

Um eine neurodegenerative Erkrankung in einem transgenen Tiermodell nachzubilden, kann ein Protein, dessen Genmutation die Krankheit beim Menschen auslöst, in diesem Tier überexprimiert werden (Gotz and Ittner, 2008). Da die Pathogenese in einem Tiermodell möglichst genau dargestellt werden soll, ist es wichtig, das Protein in den gleichen Geweben zu exprimieren, in denen beim Menschen Pathologie auftritt. Das Tau-Protein wird beim Menschen vorwiegend im Nervensystem exprimiert (Binder et al., 1985). Daher sollten im Nervensystem der transgenen Fische das Tau-Protein mit Hilfe eines Neuron-spezifischen Promoters exprimiert werden.

Obwohl die ersten transgenen Zebrafische bereits vor etwa 20 Jahren publiziert wurden (Stuart et al., 1988), dauerte es noch über 10 Jahre, bis die ersten Promotoren für die spezifische Expression fremder Gene im Nervensystem der Zebrafische beschrieben wurden (Park et al., 2000). Da der in dieser Publikation beschriebene HuC-Promoter einer der am besten beschriebenen Promotoren mit panneuronaler Expression ist, wurde er für die Herstellung der Tau-transgenen Zebrafische ausgewählt. Allerdings war der Promotor bislang nicht für die Expression von Krankheits-assoziierten Proteinen in transgenen Fischen verwendet worden.

Die meisten Tau-Linien, die in der vorliegenden Arbeit mit diesem Promotor hergestellt wurden, zeigten die gewünschte starke und relativ spezifische Expression der Transgene in Neuronen. Die Expression begann, wie für den Promoter beschrieben (Park et al., 2000), in terminal differenzierten Neuronen im Gehirn und Rückenmark der Fische einen Tag nach Befruchtung und blieb innerhalb der nächsten Tage stabil. Allerdings wurden keine Linien gefunden, welche das Transgen in allen Neuronen exprimierten. Vor allem im Gehirn war das Transgen in vielen Bereichen nicht oder nur schwach exprimiert. Starke Expression war vor allem im Vorderhirn und im Rückenmark zu finden. Außerdem trat in vielen Linien eine geringe Expression in nicht-neuronalen



Gewebe, wie z.B. Muskelfasern, Herz, Notochord und Haut auf, die jedoch die Untersuchung der Larven nicht weiter beeinträchtigte. Außerdem wurde beobachtet, dass die Anzahl der Zellen, welche das Transgen exprimieren, mit zunehmendem Alter der Fische abnahm. So fanden sich in den 5 Wochen alten Fischen zwar noch viele Transgen-exprimierende Zellen im Rückenmark, im Gehirn waren aber kaum noch welche sichtbar. In noch älteren Fischen waren sowohl im Gehirn als auch im Rückenmark nur noch vereinzelt Transgen-exprimierende Zellen auffindbar. Diese Beobachtungen stehen im Gegensatz zu der beschriebenen panneuronalen und dauerhaften Expression des Promotors (Park et al., 2000). Die bereits in frühen Stadien schwache Expression im Gehirn und ihre weitere Abnahme in älteren Fischen schränkt die Möglichkeiten ein, Effekte in adulten Fischen, z.B. auf Verhalten oder Erinnerungsvermögen, zu untersuchen. Allerdings lag der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Etablierung eines Phänotyps in frühen Stadien, da in diesen die Vorteile des Zebrafischsystems am besten genutzt werden können.

Es ist unwahrscheinlich, dass die Reduktion der Transgen-Expression auf einem selektiven, Tau-induzierten Absterben der Zellen beruht, da der gleiche Effekt auch in den nur DsRed exprimierenden Kontrollfischen auftrat. Die Diskrepanz zwischen den publizierten und beobachteten Expressionszeitpunkten und -orten könnte aber daher rühren, dass in der vorliegenden Arbeit ein 3 Kilobasenpaare langes Promoterfragment verwendet wurde. Dieses Fragment wurde bereits als in Zebrafischen funktionell beschrieben (Koster and Fraser, 2001) und wurde aufgrund seiner besseren Klonierbarkeit gewählt. Ihm könnten aber einige regulierende Sequenzen des mindestens 10 Kilobasenpaare langen genomischen Promotors fehlen, welche die Expression in Teilen des Gehirns steuern und gleichzeitig in nicht-neuronalen Geweben unterdrücken. Es ist daher geplant, weitere transgene Linien mit einem längeren HuC-Fragment und anderen neuronalen Promotoren herzustellen. Wie in 3.2 am Beispiel des  $\alpha$ Tubulin-Promotors gezeigt, können neue Promotoren schnell in die neuentwickelten Vektoren integriert werden.

In den transgenen Fischen wurde Tau und DsRed mit einer neuentwickelten Variante des Gal4/UAS-Expressionssystems koexprimiert, um eine möglichst starke Proteinexpression zu erreichen. Die Verwendung des Gal4/UAS-Systems wurde zum ersten Mal vor 10 Jahren in Zebrafischen beschrieben (Scheer and Campos-Ortega, 1999). Allerdings wurden seitdem kaum weitere Anwendungen publiziert, vermutlich aufgrund von Schwierigkeiten bei der effizienten Herstellung transgener Linien. Dies änderte sich erst vor kurzem, als die Gal4/UAS-Expressionstechnik mit der effizienten Herstellung transgener Linien durch das Tol2-Transposon kombiniert wurde (Scott et al., 2007; Asakawa et al., 2008). Dieses Transposon ermöglicht die effiziente Integration einer DNS-Sequenz in das Genom des Zebrafisches (Kawakami, 2005). Allerdings wurde die Kombination aus Tol2 und Gal4/UAS bisher nur für die Herstellung von Reporterlinien genutzt, die ein Fluoreszenzprotein in bestimmten Geweben exprimieren, aber nicht für die Expression Krankheits-assoziierte Gene (Scott et al., 2007; Asakawa et al., 2008). Durch die Kombination des HuC-Promoters mit dem bidirektionalen Gal4/UAS-Expressionssystem und der Tol2-Transposase konnten in dieser Arbeit transgene Zebrafische hergestellt werden, die große Mengen des Tau-Proteins zusammen mit dem roten Fluoreszenzprotein DsRed im Nervensystem exprimieren. Anhand von Immunfluoreszenzfärbungen wurde außerdem nachgewiesen, dass die Expression der beiden Proteine vollständig überlappt (siehe Kapitel 3.1).

Die Koexpression von DsRed bietet einige wesentliche Vorteile: Die transgenen Linien können direkt an der Fluoreszenz ihrer Neuronen erkannt werden, ohne dass sie durch andere Methoden, wie z.B. PCR, identifiziert werden müssen. Außerdem können sie anhand der Fluoreszenz direkt weiter charakterisiert werden. Es wurde nämlich festgestellt, dass die Menge und Fluoreszenzstärke des gebildeten DsRed Rückschlüsse auf die Menge des gebildeten Tau-Proteins zulässt. Der Expressionsort des Transgens und die exprimierten Proteinmengen können daher unmittelbar unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt werden. Die Verwendung von DsRed als roter

Fluoreszenzmarker ermöglicht Doppelfärbungen mit verschiedenen Lebendfarbstoffen im grünen Bereich, wie z.B. Acridin Orange für die Sichtbarmachung sterbender Zellen. So konnte in der vorliegenden Arbeit die Tau-induzierte Neurodegeneration live und im Detail verfolgt werden (siehe Kapitel 3.7). Außerdem erlaubt die Verwendung von DsRed die Kreuzung der transgenen Fische mit Reporterlinien, die GFP in bestimmten Geweben, wie z.B. Microgliazellen (Peri and Nüsslein-Volhard, 2008) oder subzellulären Kompartimenten wie z.B. Mitochondrien (Kim et al., 2008) oder neuromuskulären Synapsen (Ono et al., 2001) exprimieren. Sowohl Lebendfärbungen als auch Kreuzungen mit Reporterlinien ermöglichen detaillierte Untersuchungen der Pathologie *in vivo*. Abschließend konnte durch die Koexpression von DsRed eine Fusionierung des Tau-Proteins mit einem Fluoreszenzprotein, wie sie in anderen Studien verfolgt wurde (Tomasiewicz et al., 2002), vermieden werden. Auf diese Weise wird das natürliche Aggregationsverhalten des Tau-Proteins nicht durch die Kopplung an ein zur Multimerisierung neigendes Fluoreszenzprotein beeinflusst (Tsien, 1998).

Ein Nachteil der Koexpression von DsRed ist eine mögliche Toxizität des Fluoreszenzproteins, wenn es in großen Mengen exprimiert wird (Hadjantonakis et al., 2002; Tao et al., 2007). Um diesen Effekt zu minimieren, wurde die DsRed.T4-Variante verwendet, die sich nicht nur schneller faltet und eine hellere und stabilere Fluoreszenz zeigt (Bevis and Glick, 2002), sondern deren mögliche Toxizität im Vergleich zu anderen DsRed-Varianten reduziert ist (Strack et al., 2008). Um eine mögliche Toxizität von DsRed zu untersuchen wurden nicht nur Tau/DsRed-transgene Zebrafischlinien hergestellt, sondern auch Linien, die nur DsRed in hohen Mengen exprimierten. Diese wurden dann als Kontrolle verwendet, um mögliche negative Effekte der DsRed-Expression auszuschließen. Hierbei zeigte sich, dass die Anzahl der im Rückenmark absterbenden Neurone in nur DsRed-exprimierenden Fischen im Vergleich zum Wildtyp nicht erhöht ist (siehe Kapitel 3.7). Allerdings muss beachtet werden, dass die insgesamt exprimierte Proteinmenge in Tau/DsRed-transgenen Fischen durch das zusätzlich exprimierte Tau-Protein vermutlich

höher ist als in nur DsRed-transgenen Linien. Falls die hohe Überexpression von exogenen Proteinen für die Neuronen der Fische toxisch wäre, würde man aber auch schon in den DsRed-transgenen Fischen eine erhöhte Anzahl absterbenden Zellen erwarten, was nicht der Fall war. Man könnte die Kontrollfische aber noch weiter optimieren, indem man nicht nur DsRed, sondern ein weiteres Protein, z.B. GFP exprimiert, um gleiche Proteinmengen wie in Tau/DsRed-transgenen Fischen zu erreichen. Außerdem wäre die Verwendung einer kürzlich vorgestellten, nicht-toxischen DsRed-Variante in allen transgenen Linien sinnvoll (Strack et al., 2008).

In den Tau-transgenen Zebrafischen wurde außerdem die Vererbung und stabile Expression der Transgene in den Fischen über drei Generationen untersucht um sicherzustellen, dass die transgenen Linien dauerhaft verwendet werden können. Hierbei wurde festgestellt, dass etwa 20% der ursprünglich mit den Konstrukten injizierten Fische beide Transgene an ihre Nachkommen weitergeben. Die beobachtete Vererbung entspricht den publizierten Ergebnissen anderer Gruppen, wonach mit dem Tol2-System ein Anteil von stabil transgenen Fischen von etwa 40% erwartet werden kann (Urasaki et al., 2006). Da in dieser Arbeit zwei Transgene für die Proteinexpression verwendet wurden, ist die Rate entsprechend halb so groß. Die beiden Transgene segregierten unabhängig voneinander, was auf eine Integration an verschiedenen Genloci schließen lässt. Die analysierte Linie trug dabei die beiden Transgene an jeweils nur einem Genlocus, wodurch die Vererbung einfach nachvollziehbar stattfand und jeweils ein Viertel der Nachkommen beide Transgene exprimierte. Außerdem war die Expression von Tau und DsRed über drei Generation im gleichen Gewebe stabil, was darauf schließen lässt, dass die mit dem Vektorsystem erzeugten transgenen Linien über viele Generationen verwendet werden können (siehe Kapitel 3.3).

Das in dieser Arbeit entwickelte Expressionssystem bestand aus einem *Driver*-Konstrukt, welches den Promoter enthielt, und aus einem *Responder*-Konstrukt mit dem zu exprimierenden Tau-Gen. Die unabhängige Vererbung

dieser beiden Transgene in den Fischen zeigt weitere Vorteile des Gal4/UAS-Systems: Die beiden Transgene können unabhängig voneinander mit anderen Transgenen neu kombiniert werden, z.B. kann ein neuer Promoter zusätzlich oder auch anstatt des HuC-Promoters eingekreuzt werden, um das Tau-Transgen in zusätzlichen oder anderen Geweben zu exprimieren. Für diese Kreuzungen könnten z.B. viele der kürzlich publizierten Gal4-*enhancer-trap*-Linien verwendet werden, in denen Gal4 in einer Vielzahl von unterschiedlichen Geweben unter der Kontrolle endogener Zebrafischpromotoren exprimiert wird (Scott et al., 2007). Umgekehrt können zusätzliche oder andere Gene unter Kontrolle des HuC- oder eines anderen Promoters exprimiert werden. So könnte man z.B. normale oder dominant-negative Formen von Kinasen in den Tau-transgenen Fischen durch Kreuzung mit entsprechenden transgenen Linien zusätzlich exprimieren, und die Auswirkungen auf die Tau-Phosphorylierung untersuchen. Die Trennung von Promotor und Gen erlaubt auch die Herstellung stabil-transgener Linien, die Gene für toxische oder lethale Proteine tragen. Promotor- und Gen-tragende Linien können nämlich separat erzeugt und gehalten werden, ohne dass das toxische Protein exprimiert wird. Zur Gewinnung Transgen-exprimierender Fische werden die Linien dann zusammengekreuzt.

Das neuentwickelte Vektorsystem eignet sich nicht nur für die effiziente Herstellung Tau-transgener Fische, sondern kann auch verwendet werden, um andere Krankheits-assoziierte Proteine zu exprimieren. Auf diese Weise können weitere Zebrafisch-Krankheitsmodelle erzeugt werden. Um den Einbau anderer Gene und Promotoren in die Vektoren zu erleichtern, wurden diese daher mit Rekombinationsstellen für *Gateway*-Klonierungen versehen. Dieses kommerziell erhältliche Kloniersystem ermöglicht die schnelle und effiziente Übertragung von DNS-Sequenzen von einem Vektor in einen anderen (Walhout et al., 2000). Es wird bereits von vielen Gruppen erfolgreich zur Herstellung transgener Zebrafische eingesetzt (Kwan et al., 2007; Villefranc et al., 2007). Durch die Vereinfachung und Verminderung der notwendigen Klonierschritte kann ein Expressionskonstrukt für ein neues Krankheits-

assoziiertes Gen in weniger als einer Woche fertig gestellt und injiziert werden. Wenn die mit dem neuen Konstrukt injizierten Fische nach drei bis vier Monaten geschlechtsreif sind, können in der nächsten Generation bereits transgene Nachkommen untersucht werden. Da die *Gateway*-kompatiblen Vektoren ebenfalls Tol2-Transposase-Sequenzen enthalten, können so auf effiziente Weise in kürzester Zeit neue transgene Tiermodelle erzeugt werden (siehe Kapitel 3.2).

#### **4.2 Transgene Zebrafische als Krankheitsmodelle für die *in-vivo*-Erforschung von Tauopathien**

Die vorliegende Arbeit beschreibt das erste transgene Zebrafischmodell, welches wesentliche neuropathologische Merkmale von Tauopathien wie der Alzheimer-Demenz aufweist. Zwar wurden Zebrafische schon früher für die Forschung an Tauopathien verwendet, allerdings konnten in diesen Publikationen entweder keine stabil transgenen Fische mit definierter Neuropathologie gezeigt werden (Tomasiewicz et al., 2002), oder aber die Fische zeigten trotz stabiler Expression des Tau-Proteins keine Tauopathie-Merkmale (Bai et al., 2007). Die erfolgreiche Erzeugung eines transgenen Zebrafischmodells mit definierter Neuropathologie in dieser Arbeit beruht im Wesentlichen auf dem bereits in 4.1 diskutierten neuentwickelten Expressionssystem, da nur mit diesem die für die Ausprägung eines frühen Phänotyps notwendige hohe Proteinexpression erreicht wurden.

Tau-transgene Zebrafische weisen im Vergleich zu anderen Modelltieren zur Erforschung von Tauopathien wesentliche Vorteile auf. Zwar teilen Zebrafische einige dieser Vorteile mit *Drosophila* und *C. elegans*, allerdings ist die Entwicklung und Morphologie wesentlicher Organe wie des Nervensystems im Zebrafisch dem Menschen wesentlich ähnlicher als bei Invertebraten. Auch die meisten krankheitsrelevanten Gene sind deutlich höher konserviert (Dodd et al., 2000; Rubinstein, 2003; Beis and Stainier, 2006). Dies gilt insbesondere für mit der Alzheimer-Erkrankung assoziierte

Gene wie z.B. APP (Musa et al., 2001). Vom Tau-Protein ist bekannt, dass die sowohl für die physiologische Funktion als auch pathologische Aggregation wichtigen Repeats hoch konserviert sind (Gotz and Ittner, 2008). Der hohe Grad der Konservierung lässt den Schluss zu, dass auch die Krankheits-assoziierten Mechanismen, bei denen die Proteine eine Rolle spielen, konserviert sind.

Wie bereits in der Einleitung dargelegt, bilden Zebrafischembryonen ihr Nervensystem und die meisten weiteren Organe innerhalb von nur 24 Stunden aus, das Nervensystem ist bereits nach etwa vier weiteren Tagen voll funktionsfähig, d. h. es kann komplexe Verhaltensweisen wie Schwimmbewegungen, Flucht und Nahrungsaufnahme steuern. In den Tau-transgenen Zebrafischen folgt auf die schnelle Embryonalentwicklung eine rapide Ausbildung von Alzheimer-artigen Phänotypen:

So konnte die pathologische Hyperphosphorylierung von Tau bereits nach nur 32 Stunden in vielen Tau-exprimierenden Zellen beobachtet werden (siehe Kapitel 3.4). Interessanterweise konnte zusätzlich ein Unterschied in der Ausbildung von frühen und späten Pathologiemarkern beobachtet werden. Aus Studien an Alzheimerpatienten oder in transgenen Mäusen ist bekannt, dass die Phosphorylierung an manchen Epitopen, wie z.B. 12E8 oder AT270, relativ früh während der Pathogenese auftritt, wohingegen andere Marker, wie z.B. AT8 erst auftreten, wenn die Mäuse schon weitere pathologische Merkmale, wie Verhaltensstörungen, Zelltod oder die Bildung von NFTs zeigen (Augustinack et al., 2002; Eckermann et al., 2007). In den transgenen Fischen wurde daher das Auftreten der Phosphorylierung des frühen AT270-Epitops mit dem des spät auftretenden AT8-Epitop verglichen. Es konnte beobachtet werden, dass die frühe AT270-Phosphorylierung in den transgenen Fischen bereits nach nur 24 Stunden in den meisten Tau-exprimierenden Zellen vorhanden ist, während sich die späte pathologische AT8-Phosphorylierung über einen Zeitraum von nur einer Woche graduell im gesamten Nervensystem ausbildet (siehe Kapitel 3.5). Im Vergleich zu transgenen

Mäusen, bei denen diese Pathologie erst nach Monaten auftritt, ist das Fortschreiten der späten Tau-Pathologie in den Tau-transgenen Fischen also um ein Vielfaches schneller. Daher können mit diesem Modell transgene Wirbeltiere mit ausgebildeter Neuropathologie wesentlich schneller und in größerer Individuenzahl für die Tauopathie-Forschung produziert werden.

Es stellt sich allerdings die Frage, warum die pathologische Phosphorylierung in den Tau-transgenen Fischen so früh auftritt. Dies könnte damit zu tun haben, dass die meisten an der Tau-Phosphorylierung beteiligten Kinasen im sich entwickelnden Wirbeltierembryo stark exprimiert sind, da sie auch wichtige Funktionen bei der Embryogenese haben. Es wurde bereits gezeigt, dass das Tau-Protein in embryonalen Geweben stärker phosphoryliert ist, als in adulten (Goedert et al., 1994; Buee et al., 2000). Die Hyperphosphorylierung von Tau in den transgenen Fischen könnte daher einen anderen Ursprung haben als in Demenzpatienten. Auf der anderen Seite konnte durch die Untersuchung der verschiedenen Epitope in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der neuropathologischen Phänotyp, also die pathologische Tau-Phosphorylierung in den transgenen Fischen dem Menschen ähnlich ist. Die Komposition, Reihenfolge des Auftretens und Intensität der Phosphorylierung entsprach nämlich im Wesentlichen der bei AD- und FTD-Patienten vorkommenden Tau-Pathologie. Außerdem sind die beteiligten Kinasen die gleichen, welche auch bei Demenzen eine Rolle spielen (Billingsley and Kincaid, 1997), was auch in der vorliegenden Arbeit anhand der Inhibition der Zebrafischkinase Gsk3 $\beta$  demonstriert wurde. Die Tau-transgenen Fische eignen sich daher sehr gut für die Untersuchung und Modulation der an der Phosphorylierung beteiligten Enzyme und Stoffwechselwege.

In den transgenen Fischen trat nach 32 Stunden auch eine pathologische Fehlfaltung des Tau-Proteins auf. Diese strukturelle Änderung des Proteins ist eine Vorstufe der Tau-Aggregation (Jicha et al., 1999). Nach etwa 5 Wochen konnten dann auch neurofibrilläre Bündel und aggregiertes Tau nachgewiesen werden, ein weiteres wesentliches pathologisches Kennzeichen der Alzheimer-



Demenz und vieler Frontotemporaler Demenzen (siehe Kapitel 3.4). Die Tatsache, dass auch dieser Phänotyp der Fische eine hohe Ähnlichkeit mit der Neuropathologie von Demenzpatienten besitzt, untermauert die Eignung der Fische als Modelltiere für die Erforschung von Tauopathien. Bei der Bildung von *Tangles* zeigen sich auch Unterschiede zum *Drosophila* Tau-Modell, welches ebenfalls über ein Gal4/UAS-Expressionssystem erzeugt wurde (Wittmann et al., 2001). Bei den transgenen Fliegen traten zwar ebenfalls frühzeitig Phänotypen wie die pathologische Phosphorylierung und Fehlfaltung des Tau-Proteins auf, aber keine *Tangle*-Bildung. Diese Beobachtung könnte darauf hinweisen, dass die Pathogenese in *Drosophila* substantiell anders verläuft als in Wirbeltieren.

Die *Tangles* treten in den Tau-transgenen Fischen zu einem Zeitpunkt auf, an dem die juvenilen Fische immer noch recht durchsichtig sind. Die aktuellen methodischen Weiterentwicklungen bei den Mikroskopietechniken, beispielsweise in der 2-Photonenmikroskopie am lebenden Tier (Helmchen and Denk, 2005), und bei der Anfärbung von *Tangles*, z.B. mit spezifischen Farbstoffen wie X34 (Styren et al., 2000), lassen darauf hoffen, dass der Prozess der Bildung der Bildung von *Tangles* und seine Auswirkungen auf das Nervensystem in Zukunft direkt im lebenden Fisch beobachtet werden kann.

In den Tau-transgenen Fischen wurden außerdem noch weitere interessante Phänotypen gefunden, die in ähnlicher Weise auch in frühen Stadien neurodegenerativer Erkrankungen eine Rolle spielen könnten. So führte die Expression des humanen Tau-Proteins in den transgenen Zebrafischen zu morphologischen Veränderungen der Motoneurone. Gleichzeitig traten bei den Fischen Bewegungsstörungen auf, die wahrscheinlich mit der veränderten Neuronmorphologie in Verbindung stehen (siehe Kapitel 3.6). Motorische Störungen gehören bei den meisten Demenzpatienten zwar nicht zu den vorherrschenden Symptomen, da Bewegung steuernde Hirnbereiche bei der Erkrankung weniger betroffen sind. Allerdings zeigt das veränderte Wachstum der Motoneurone in den Fischen, dass Störungen im Tau-Stoffwechsel, also

z.B. eine Erhöhung der Tau-Menge, in Nervenzellen zu funktionellen Problemen führen können. In Tau-transgenen Mäusen wurde bereits beobachtet, dass die Expression von Tau zu einer Inhibition des intrazellulären Transports führt, was insbesondere in langgestreckten Motoneuronen problematisch ist (Terwel et al., 2005; Thies and Mandelkow, 2007). Es ist daher wahrscheinlich, dass verminderter axonaler Transport auch in den transgenen Fischen ein Grund für das Auftreten von Veränderungen der Neuronmorphologie und -funktion, sowie des Verhaltens der Fische ist. Der intrazelluläre Transport ist für die Funktion aller Neuronen im Gehirn unverzichtbar. Der in den Fischen auftretende Phänotyp könnte daher darauf hinweisen, dass Fehlfunktionen beim axonalen Transport - ausgelöst durch eine gestörte Funktion oder Regulation des Tau-Proteins - bei der Pathogenese von Demenzerkrankungen eine Rolle spielen.

Allerdings muss insbesondere bei den Auswirkungen auf den axonalen Transport beachtet werden, dass das Tau-Protein in den transgenen Fischen durch das Gal4/UAS-Expressionssystem in hohen Mengen überexprimiert wird. Die Probleme beim Wachstum der Motoneurone könnten ein Überexpressionsartefakt darstellen, welches dadurch zustande kommt, dass in der Zelle zu viel Tau vorhanden ist, und dieses die Mikrotubuli durch Bindung überstabilisiert. Überstabilisierte Mikrotubuli könnten dann im axonalen Transport und im Auswachsen behindert sein. Hier stellt sich die grundsätzliche Frage, ob es sinnvoll ist, Demenzerkrankungen durch starke Überexpression assoziierter Gene in Tiermodellen nachzustellen. Im Falle von Tau ist noch nicht abschließend geklärt, ob in Demenzpatienten mehr Tau in den Zellen vorliegt (Khatoon et al., 1994). Es wird jedoch angenommen, dass in gealterten Neuronen der Proteinabbau nur noch eingeschränkt funktioniert, was zu einer erhöhten Konzentration von zur Aggregation neigenden Proteinen in den Zellen führen könnte (Carrard et al., 2002). Außerdem wurde gezeigt, dass die Menge an phosphoryliertem Tau in Alzheimer-Patienten erhöht ist (Khatoon et al., 1994). Für andere bei neurodegenerativen Erkrankungen aggregierenden Proteinen ist eindeutig nachgewiesen, dass ihre

erhöhte Expression beim Menschen die Krankheit auslöst. So führt die Duplikation des Genlocus von APP zum Ausbruch der Alzheimer-Demenz (Rovelet-Lecrux et al., 2006). Die Triplikation des Genlocus für alpha-Synuclein führt zur Ausbildung der Parkinson-Erkrankung (Singleton et al., 2003). Die beschriebenen Beispiele verdeutlichen, dass eine Erhöhung der Mengen aggregierender Proteine eine Ursache für die Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen sein kann. Falls man ein Gen mit einer Krankheits-assoziierten Mutation ohne Überexpression in ein Tiermodell einbringen will, bleibt nur die *knock-in* Strategie, bei der das homologe Gen des Tieres am Genlocus durch das mutierte humane Gen ersetzt wird. Das Transgen wird dann unter Kontrolle des endogenen Promoters in ähnlichen Mengen wie das ursprüngliche Gen exprimiert. Dieser Ansatz ist bei Wirbeltieren bisher nur in Mäusen möglich. Allerdings entwickelten Tau-*knock-in* Mäuse über einen Zeitraum von zwei Jahren keine nennenswerte Pathologie (Terwel et al., 2005; Gotz et al., 2007). Da Tauopathien aber Krankheiten sind, die normalerweise erst in alternden Menschen auftreten, könnte die Lebensspanne dieser transgenen Mäuse einfach zu kurz sein, um Tau-Pathologie zu entwickeln. Die Überexpression eines Krankheits-assoziierten Proteins ist also auch ein Mittel, den Zeitraum, in dem sich eine Demenz-Pathologie entwickelt, auf ein für die Forschung notwendiges Maß zu reduzieren. Somit lässt sich zusammenfassen, dass die Überexpression des Tau-Proteins in den transgenen Fischen zwar nicht exakt die physiologischen Gegebenheiten bei Tauopathie-Patienten widerspiegelt, aber mangels alternativer Strategien die beste Möglichkeit ist, die Pathologie von Tauopathien in einem Tiermodell nachzubilden.

Ein weiterer Vorteil der Zebrafischembryonen und -larven ist ihr vollständig durchsichtiger Körper, wodurch sie optimal für die Forschung am lebenden Tier geeignet sind. Durch diese Eigenschaft können die Nervenzellen, welche ein Krankheits-assoziiertes Gen exprimieren, direkt im lebenden Tier beobachtet werden. Obwohl lebende Neuronen auch in transgenen Mäusen unter hohem technischen Aufwand bedingt in den obersten Schichten des

Gehirns untersucht werden können, erlaubt der Zebrafisch ihre Beobachtung im gesamten Nervensystem von außen in einem unveränderten Tier über einen längeren Zeitraum. In den Tau-transgenen Fischen konnte so *in vivo* untersucht werden, ob die Expression des humanen Tau-Gens zur Degeneration von Nervenzellen führt. Dieses Absterben von Neuronen ist das endgültige Kennzeichen neurodegenerativer Erkrankungen und der wesentliche Grund für die fortschreitenden neurologischen Defekte der von der AD oder FTD betroffenen Patienten. Die transgenen Fische wiesen bereits nach wenigen Tagen auch diese phänotypische Ähnlichkeit zum humanen Krankheitsbild auf. Im Vergleich zu einer anderen transgenen Linie, die zwar DsRed aber kein Tau-Protein exprimiert, zeigten die Tau und DsRed exprimierenden Fische eine deutlich erhöhte Anzahl absterbender Zellen. Durch die Transparenz der transgenen Fische konnte die durch Tau ausgelöste Degeneration von Nervenzellen in dieser Arbeit nun erstmals im Detail über einen längeren Zeitraum in einem lebenden Tier beobachtet werden (siehe Kapitel 3.7). Die mit dieser Technik gewonnenen Erkenntnisse über die Degeneration der Neurone können in Zukunft dazu beitragen, diesen Prozess besser zu verstehen und Ansatzpunkte zu finden, wie man das Absterben der Nervenzellen verhindern kann.

Bei dem beobachteten Absterben von Nervenzellen stellt sich auch die Frage, wie dieses typische Kennzeichen neurodegenerativer Erkrankungen mit der Bildung der *Tangles* in Verbindung steht, die typisch für die Pathogenese von Tauopathien sind. Während früher vermutet wurde, dass die *Tangles* direkt mit der Neurodegeneration in Verbindung stehen, konnte vor kurzem mit Experimenten an transgenen Mäusen gezeigt werden, dass beide Prozesse getrennt voneinander stattfinden. Auf die Herunterregulation der Tau-Expression folgte in den Mäusen eine Stabilisierung der Menge an Nervenzellen und eine verbesserte kognitive Leistungsfähigkeit, während die Zahl der *Tangles* konstant blieb (Santacruz et al., 2005). Auch in den Tau-transgenen Fischen scheint es keinen direkten Zusammenhang zu geben. Zum Zeitpunkt der Neurodegeneration konnte im Rückenmark der Fische keine

Aggregation von Tau in Tangles festgestellt werden. Diese Beobachtung könnte damit erklärt werden, dass Tau zu diesem Zeitpunkt in Oligomeren vorliegt. Von diesen wird angenommen, dass sie als kleine, lösliche Spezies direkt die Zellen schädigen, während die größeren Ablagerungen als Reservoir für die Oligomere dienen oder ein Versuch der Zelle sind, die toxischen Spezies durch Ablagerung aus dem Stoffwechsel zu entfernen (Haass and Selkoe, 2007). Um diese Vermutung zu beweisen, müssten diese Oligomere in den Fischen z.B. mit biochemischen Methoden nachgewiesen werden. Dabei sollten sie sich als höhermolekulare Spezies neben dem normalen Tau mit Western-Blot-Analyse darstellen lassen. Allerdings ist bisher nicht klar, inwieweit diese Oligomere unter denaturierenden Bedingungen stabil sind. Daher müssten vor der Western-Blot-Analyse statt der denaturierenden evtl. eine native Gelelektrophorese durchgeführt werden. Alternativ könnte auch eine Größenausschluss-Chromatographie versucht werden.

### ***4.3 Tau-transgene Zebrafische für die Wirkstoffentwicklung zur Therapie von Tauopathien***

In der vorliegenden Arbeit wurde auch erstmals untersucht, in wieweit sich Tau-transgene Zebrafische eignen, um Substanzen als Wirkstoffkandidaten für die Behandlung von Tauopathien zu testen und weiter zu entwickeln. In den Tau-transgenen Fischen treten innerhalb weniger Stunden mehrere wesentliche neuropathologische Merkmale von Demenzerkrankungen auf. Daher konnten diese verwendet werden, um die Aktivität möglicher Wirkstoffkandidaten im lebenden Tier zu testen. Hierbei wurde zunächst versucht, die pathologische Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins durch Inhibition einer beteiligten Kinase zu reduzieren.

Diese Hyperphosphorylierung von Tau ist nicht nur ein typisches Kennzeichen der neurofibrillären Läsionen in Demenzpatienten (Grundke-Iqbal et al., 1986a; Kosik et al., 1986; Wood et al., 1986), sondern die daran beteiligten Kinasen sind wahrscheinlich auch ursächlich an der Ausbildung der Tau-

Pathologie beteiligt (Stoothoff and Johnson, 2005). Tau-Kinasen sind daher wichtige Zielenzyme für die Entwicklung von Medikamenten zur Therapie von Demenzerkrankungen. Die Blockade der frühen pathologischen Vorgänge bei Tauopathien, wie der Hyperphosphorylierung, könnte dabei die späteren Auswirkungen, wie die Aggregation von Tau und seine Ablagerung in NFTs und die damit einhergehende Neurodegeneration verhindern (Mazanetz and Fischer, 2007). Den möglichen positiven Wirkungen der Kinase-Inhibitoren stehen aber auch einige Nachteile gegenüber. Die meisten aktiven Substanzen sind recht unpolare Strukturen mit einer relativ geringen Wasserlöslichkeit. Außerdem haben sie durch ihr breites Wirkspektrum auch auf andere Kinasen deutliche Nebenwirkungen. Die Bioverfügbarkeit der Substanzen, also die Konzentration, die in einem lebenden Organismus wirkt, wird ebenfalls noch als zu gering angenommen. Daher ist es notwendig, neue, spezifischere Substanzen zu entwickeln und die vorhandenen weiter zu verbessern (Mazanetz and Fischer, 2007). Es besteht ein großer Bedarf an Technologien und Tiermodellen mit Tau-Pathologie, mit denen schnell viele Substanzen mit optimierter Wirkung getestet und Nebenwirkungen und Bioverfügbarkeit beurteilt werden können. Transgene Mäuse eignen sich nur bedingt für solche Experimente, da ein solcher Test aufgrund der Größe der Tiere und der geringen Nachkommenzahl im großen Stil nicht durchführbar ist.

In dieser Arbeit wurde deshalb untersucht, ob Inhibitoren der Tau-Kinase GSK3 $\beta$  die pathologische Phosphorylierung in den Tau-transgenen Fischen reduzieren können. Zebrafische eignen sich sehr gut für die Untersuchung dieser Kinase, da sie, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, insbesondere im aktiven Zentrum sehr hoch konserviert ist. Inhibitoren, die auf Zebrafisch-Gsk3 $\beta$  wirken, sollten daher auch im Menschen eine entsprechend hohe Aktivität haben (siehe Kapitel 3.8). In Zebrafischen wurden zunächst die bereits publizierten GSK3-Inhibitoren Lithiumchlorid (Stambolic et al., 1996), SB-216763 und SB-415286 (Smith et al., 2001) getestet. Da bereits gezeigt worden war, dass Lithiumchlorid die pathologische Hyperphosphorylierung von Tau im lebenden Tier reduzieren konnte (Perez et

al., 2003; Noble et al., 2005), wurde es in den Experimenten in hoher Konzentration als Positivkontrolle verwendet. Hierdurch konnte zunächst untersucht werden, ob und in welcher Stärke die endogene Gsk3 $\beta$ -Kinase der Zebrafische in ihrer Aktivität gehemmt werden kann. Zusätzlich wurden dann noch zwei neuentwickelte Inhibitoren zum ersten Mal in einen lebenden Tier untersucht. Die beiden Substanzen AR-164 und AR-534 waren vorher von einer Arbeitsgruppe bei AstraZeneca R&D, basierend auf der Kristallstruktur der menschlichen GSK3 $\beta$ , am Computer entwickelt und aus einer Gruppe von mehreren tausend möglichen Wirkstoffkandidaten isoliert worden. In Zellkulturexperimenten zeigten beide Inhibitoren eine hohe inhibitorische Aktivität auf die Tau-Phosphorylierung (siehe Kapitel 1.4.5 und Abbildung 11).

Mit allen beschriebenen Inhibitoren wurde zunächst getestet, ob sie in Zebrafischen die Aktivität von Gsk3 $\beta$  im Wnt-Signaltransduktionsweg verändern können, der bei den Embryogenese von Wirbeltieren eine wichtige Rolle spielt (Doble and Woodgett, 2003). Da die Kinaseaktivität für diesen Signalweg essentiell ist, kann der Grad der Veränderung der sich entwickelnden Zebrafischembryonen als Indikator für die Aktivität dieser Inhibitoren verwendet werden. Interessant war in diesem Experiment insbesondere die Vermehrung der Ohrplakode durch Behandlung mit AR-534, ein bisher nicht publizierter Phänotyp, der auch mit der starken Inhibition der Kinase durch Koexpression einer dominant-negativen Form hervorgerufen werden konnte. AR-534 war der einzige Inhibitor, dessen *in-vivo*-Aktivität hoch genug war, um diesen Phänotyp hervorzurufen. Eigentlich hätte man diesen Phänotyp auch bei Behandlung mit LiCl erwarten können, welches bei der Inhibition der Tau-Phosphorylierung mindestens so effektiv war wie AR-534. Die Aktivität von LiCl beruht auf der unspezifischen Verdrängung von Magnesiumionen, welche für die Kinaseaktivität wichtig sind (Cohen and Goedert, 2004). Dieser Unterschied könnte möglicherweise dadurch erklärt werden, dass die in frühen Zebrafischembryonen erreichbare Konzentration an Lithium im Vergleich zu Magnesium nicht hoch genug ist, um die Kinase

ausreichend zu hemmen. Beim Test auf Reduktion der Tau-Phosphorylierung wurden ältere Embryonen verwendet. Diese könnten aufnahmefähiger für die Lithiumionen sein, so dass in diesen die Kinase dann effektiv gehemmt würde. Eine weitere Erhöhung der Lithiumkonzentration war bei der Behandlung in beiden Fällen nicht möglich, da dann die hohe Salzkonzentration durch osmotische Effekte zum Absterben der Embryonen führte. Eine weitere interessante Beobachtung in diesem Test war die im Gegensatz zur hohen Aktivität von AR-534 stehende, vollständige Inaktivität des anderen neuen Inhibitors AR-164 (siehe Kapitel 3.9).

Dieses Ergebnis bestätigte sich auch im anschließend durchgeführten Test auf Inhibition der Tau-Phosphorylierung in den Tau-transgenen Fischen. Die bereits publizierten GSK3-Inhibitoren SB-216763 und SB-415286 führten zu einer leicht reduzierten Phosphorylierung von Tau, die allerdings im Vergleich zu Lithiumchlorid nicht sehr effektiv war. Der neuentwickelte Inhibitor AR-534 hingegen reduzierte die Tau-Phosphorylierung trotz einer wesentlich geringeren Konzentration etwa genauso effektiv wie Lithiumchlorid. Im Gegensatz dazu zeigte der andere neue Inhibitor AR-164 keine reduzierte pathologische Tau-Phosphorylierung (siehe Kapitel 3.10). Es gibt grundsätzlich mehrere Möglichkeiten, warum der Inhibitor AR-164 *in vivo* nicht aktiv ist. Er könnte zum Beispiel nicht in die Nervenzellen der Zebrafische aufgenommen oder schnell aus ihnen heraustransportiert werden. Auch die sich in drei Tage alten Fischen entwickelnde Blut-Hirn-Schranke könnte hier einen Einfluss haben (Jeong et al., 2008). Außerdem könnte die Substanz in einem lebenden Tier schnell abgebaut, chemisch verändert, inaktiviert oder komplett ausgeschieden werden. Der Grund für die mangelnde Aktivität des Inhibitors wurde in dieser Arbeit nicht näher untersucht. Man könnte aber z.B. die Konzentration der Substanz in Lysaten der Fische mit Massenspektrometrie oder Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) nachmessen, um näher zu untersuchen, ob sich AR-164 überhaupt in ausreichenden Mengen von den Fischen aufgenommen wurde.



Mit den Inhibitorexperimenten wurde demonstriert, dass die Tau-transgenen Fische verwendet werden können, um die *in-vivo*-Aktivität von Inhibitoren auf die Tau-Phosphorylierung zu testen. Da eine ausreichende *in-vivo*-Aktivität Voraussetzung für die Anwendung von Wirkstoffen in Patienten ist, ist dieser Test ein wesentlicher Bestandteil des Entwicklungsprozesses von Wirkstoffkandidaten. Bisher musste ein in Zellkulturen aktiver Wirkstoff anschließend in einem sehr aufwendigen und teuren Verfahren direkt in Mäusen getestet werden. Der Test auf *in-vivo*-Aktivität in transgenen Zebrafischen als Zwischenschritt ist wesentlich einfacher durchführbar und könnte daher den Entwicklungsprozess von neuen Wirkstoffen signifikant verbessern. Da dieses Tiermodell auch noch andere für Demenzerkrankungen relevante Phänotypen ausbildet, kann es möglicherweise auch dazu verwendet werden, um Substanzen zu identifizieren, die bei diesen Phänotypen Veränderungen bewirken. Besonders interessant wäre es dabei, Stoffe zu identifizieren, welche die durch die Expression von humanem Tau ausgelöste Neurodegeneration reduzieren können.

Allerdings ist noch nicht geklärt, ob die Inhibition der Tau-Phosphorylierung in Patienten eine Verbesserung aller wesentlichen Symptome bewirken könnte. Zwar konnte in Mäusen gezeigt werden, dass die Gabe von Lithiumchlorid die Phosphorylierung und Aggregation von Tau reduzierte. Es wurde bisher allerdings nicht bestätigt, dass auch die zur Demenz führende Neurodegeneration reduziert werden konnte (Perez et al., 2003; Noble et al., 2005). Der Zusammenhang zwischen Tau-Phosphorylierung und anderen pathologischen Symptomen, wie Neurodegeneration oder Defiziten beim axonalen Transport der Neurone in Demenzpatienten ist bisher noch unklar. Es muss daher noch genauer analysiert werden, welche Auswirkungen die Inhibition der Tau-Phosphorylierung auf die Ursachen der Pathologie in Demenzpatienten haben könnte. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit auch untersucht, ob eine Inhibition der Tau-Phosphorylierung Veränderungen beim Wachstum der Motoneurone oder eine Reduktion der Neurodegeneration bewirkt. Interessanterweise führt die Inhibition von GSK3 $\beta$  nicht zu einem

normalisierten Auswachsen der Motoneurone, sie wurden im Gegenteil noch kürzer (siehe Kapitel 3.11). Allerdings muss bei der Interpretation dieses Ergebnisses beachtet werden, dass das humane Tau-Protein in den Neuronen überexprimiert wird, was eine Überstabilisierung der Mikrotubuli verursachen und den axonalen Transport und das Auswachsen der Zellfortsätze behindern könnte. Die Phosphorylierung des Tau-Proteins in den transgenen Fischen könnte eine Reaktion der Motoneurone sein, um das überschüssige Tau von den Mikrotubuli zu entfernen. Verhindert man nun diese Phosphorylierung durch Inhibitoren wie Lithiumchlorid oder AR-534, verbleibt mehr Tau an den Mikrotubuli, wodurch diese noch mehr stabilisiert werden. Dies vergrößert die Inhibition des axonalen Transports, wodurch das Wachstum der Zellfortsätze weiter verlangsamt wird. Diese Interpretation lässt zwei Schlussfolgerungen zu: Einerseits könnten die Ergebnisse darauf hinweisen, dass die in Neuronen von Demenzpatienten von den Mikrotubuli dissoziierten Tau-Proteine durch Inhibition von Tau-Kinasen wieder zurück an die Mikrotubuli gebracht werden könnten, um dort ihre Funktion auszuüben. Falls die Dissoziation von Tau von den Mikrotubuli bei Demenzerkrankungen z.B. durch Überaktivität der Kinasen oder mangelnde Aktivität von Phosphatasen erhöht ist, könnten Inhibitoren hier also eine positive Wirkung haben. Andererseits ist der mit dem Auswachsen der Neuriten zusammenhängende axonale Transport auch in den Nervenzellen älterer Menschen, bei denen Demenzerkrankungen vorwiegend auftreten, wichtig für die Funktionen des Gehirns. So werden z.B. beim Lernen im Gehirn vermehrt neue Verbindungen zwischen den Neuronen aufgebaut. Eine Inhibition von Tau-Kinasen könnte also nicht nur den positiven Effekt der Mikrotubuli-Stabilisierung haben, sondern bei den behandelten Patienten auch Nebenwirkungen auslösen, wie z.B. verminderte Lernfähigkeit. Allerdings könnte es hier, wie bei vielen anderen Therapeutika auch, ein therapeutisches Fenster geben, also eine Konzentration des Inhibitors, welche durch eine Reassoziaton der abgelagerten Tau-Proteine mit den Mikrotubuli, positiv wirkt, aber bei der noch keine negativen Nebenwirkungen, z.B. eine Überstabilisierung der Mikrotubuli durch zu viel assoziiertes Tau, auftreten.

Erste vorläufige Ergebnisse weisen auch darauf hin, dass durch Inhibition von GSK3 $\beta$  die in den Tau-transgenen Fischen auftretende Neurodegeneration nicht wesentlich reduziert wird. Es besteht die Möglichkeit, dass GSK3 $\beta$  nicht die für das Absterben der Nervenzellen verantwortliche Kinase ist, oder dass zusätzlich noch andere Kinasen, wie z.B. Stresskinasen aus der JNK-Familie eine wichtige Rolle spielen (Wetzel et al., 2008). Es sind daher noch weitere Studien nötig, um die genauen Zusammenhänge zwischen der Tau-Phosphorylierung, den beteiligten Kinasen, der neuronalen Funktion und der Neurodegeneration in Demenzpatienten besser zu verstehen.

#### **4.4 Ausblick**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Herstellung und initiale Charakterisierung Tau-transgener Zebrafische als Modelltiere für die Erforschung von Tauopathien. Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch schon erste Anwendungen dieses neuen Tiermodells dargestellt, wie z.B. die *in vivo* durchgeführte Zeitraffermikroskopie, oder die Anwendung der Zebrafische für die Entwicklung von Wirkstoffen. Zusätzlich bieten die transgenen Fische aber noch viele weitere Möglichkeiten der Anwendung und Charakterisierung:

##### **4.4.1 Detaillierte Charakterisierung der Tanglebildung**

Es wäre zum Beispiel wünschenswert, die Aggregation von Tau in *Tangles* noch genauer zu untersuchen. Hierbei müsste festgestellt werden, in welchem Zeitraum sich wie viele *Tangles* bilden und ob dieser Prozess, z.B. durch Hoch- oder Herunterregulation von Kinasen wie Gsk3 $\beta$  verändert wird. Außerdem könnte der Prozess der *Tangle*-Bildung in den Fischen direkt über Zeitraffermikroskopie im lebenden Tier beobachtet und evtl. sogar durch Wirkstoffe moduliert werde. Durch Kreuzungen der Tau-transgenen Fische mit Mutanten oder anderen transgenen Linien könnten Einflüsse genetischer Faktoren auf die *Tangle*-Bildung untersucht werden. Mit diesen Experimenten könnte nicht nur besser verstanden werden, wie die *Tangles* in Tauopathie-Patienten entstehen und welche Faktoren an Ihrer Bildung beteiligt sind,

sondern auch welche Auswirkung die Aggregate z.B. auf die Degeneration benachbarter Neuronen haben. Die Frage, ob Tangles oder entsprechende Amyloidablagerungen bei anderen Krankheiten Neurodegeneration auslösen, ist nämlich immer noch ungeklärt. Erste Studien weisen aber bereits daraufhin, dass nicht die Ablagerungen selbst, sondern Vorstufen der abgelagerten Proteinaggregate, die Oligomer, die toxische Proteinspezies sein könnten, welche das Absterben der Neurone bei Tauopathien und anderen neurodegenerativen Erkrankungen auslösen. Diese Argumentation wird bei der Alzheimer-Demenz beispielsweise durch die schwache Korrelation der auftretenden Plaques mit den klinischen Symptomen der Patienten gestützt (Haass and Selkoe, 2007). Langjährigen Studien, z.B. die Nonnenstudie der Universität von Kentucky (Snowdon and Study, 2003) haben außerdem gezeigt, dass neuropathologische Veränderungen wie Tau-Hyperphosphorylierung und *Tangle*-Bildung, die eigentlich als Merkmale von Tauopathien angesehen werden, auch in Menschen ohne Demenz auftreten können. Diese Beobachtung legt den Schluss nahe, dass die Aggregation von Tau in *Tangles* nicht unbedingt zur Ausbildung einer Demenzerkrankung führen muss. Die direkte Beobachtung der neuropathologischen Vorgänge in transgenen Zebrafischen könnte somit auch dazu beitragen, den Zusammenhang zwischen Protein-Oligomerisierung, -ablagerung und neuronalem Zelltod besser zu verstehen.

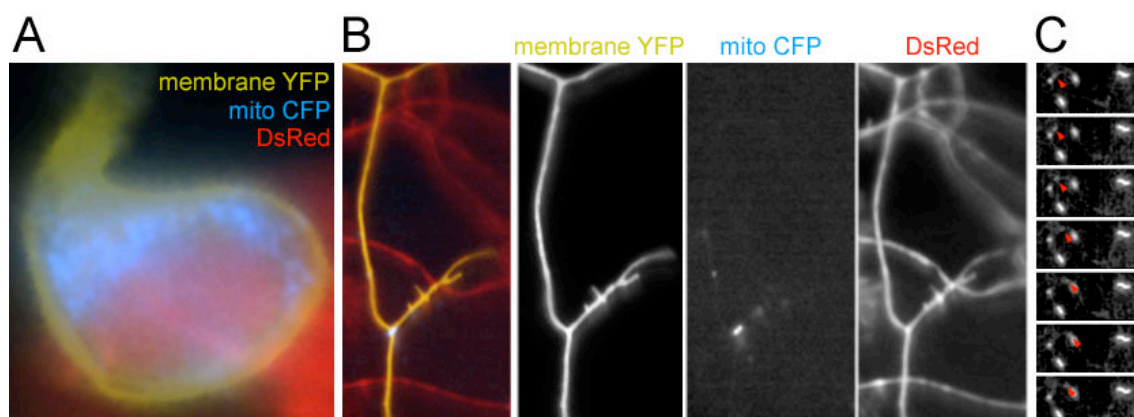
#### **4.4.2 Charakterisierung der Einflüsse des Tau-Proteins auf den axonalen Transport in vivo**

Mit *in-vivo*-Mikroskopie könnte untersucht werden, inwieweit der axonale Transport in den transgenen Zebrafischen behindert ist, z.B. durch Markierung von transportierten Zellorganellen, wie Mitochondrien, durch ein Fluoreszenzprotein. Die Geschwindigkeit des Mitochondrientransports könnte dann direkt in lebenden Fischen durch Beobachtung der fluoreszierenden Zellorganellen mit einem Fluoreszenzmikroskop gemessen werden. Die Messung des axonalen Transports mit fluoreszierenden Proteinen oder

Zellorganellen wurde in Zebrafischen und transgenen Mäusen bereits erfolgreich durchgeführt (Jontes et al., 2004; Misgeld et al., 2007).

In einem Vorversuch konnte bereits in den Tau-transgenen Fischen gezeigt werden, dass sich die Mitochondrien unter Nutzung des Gal4-Aktivators spezifisch in Tau-exprimierenden Neuronen der transgenen Fische markieren lassen. Mit dieser Technik könnten die Transportraten in Tau-transgenen und nur DsRed-transgenen Fischen direkt verglichen werden (Abbildung 29)<sup>4</sup>.

Auch ein Einfluss der Tau-Kinasen auf den axonalen Transport könnte durch Koexpression aktiver oder dominant-negativer Kinaseformen in den Neuronen oder durch Behandlungen mit Kinaseinhibitoren vor oder während der Messungen am lebenden Tier bestimmt werden.



**Abbildung 29: Markierung von Mitochondrien in Tau-transgenen Fischen zur Messung des axonalen Transports**

Tau-transgene Zebrafische wurden mit UAS-mitoCFP- und UAS-membraneYFP-Konstrukten injiziert, um in Tau-exprimierenden Nervenzellen die Mitochondrien blau und die Zellmembran gelb zu markieren. Das Cytoplasma im Zellkörper und den Fortsätzen der Tau-exprimierenden Neurone enthält DsRed und ist deshalb rot markiert. Im Bild ist ein sensorisches Rohon-Beard-Neuron in der Haut eines 5 Tage alten Tau-transgenen Zebrafisches gezeigt. Die Zellmembran und die Mitochondrien können sowohl im Zellkörper (A) als auch in den Fortsätzen (B, gemeinsame Aufnahmen dreifarbig, einzelne Farbkanäle in schwarz/weiss) der Neurone gut erkannt werden. In den Fortsätzen konnte auch die Bewegung der Mitochondrien beobachtet werden (C).

<sup>4</sup> Die Bilder der mit den Fluoreszenzmarkern injizierten Tau-transgenen Fische wurden von Thomas Misgeld (TU München) erstellt und bearbeitet.

So könnte besser verstanden werden, welche Rolle Probleme beim axonalen Transport bei der Pathogenese von Tauopathien spielen.

#### **4.4.3 Wechselwirkungen von Tau mit anderen bei neurodegenerativen Krankheiten aggregierenden Proteinen**

Durch Kreuzungsexperimente mit anderen transgenen Zebrafischmodellen könnte erforscht werden, wie sich eine Koexpression von weiteren bei neurodegenerativen Krankheiten aggregierenden Proteinen, wie z.B. A $\beta$  (Glennner and Wong, 1984), alpha-Synuclein (Baba et al., 1998), TDP-43 (Neumann et al., 2006) etc. auf den Tauopathie-Phänotyp auswirkt. Dies wäre sehr interessant, da es immer mehr Hinweise auf Gemeinsamkeiten oder gegenseitige Einflüsse dieser Proteine bei der Pathogenese der mit ihnen assoziierten neurodegenerativen Erkrankungen gibt. Einige dieser transgenen Zebrafischmodelle konnten bereits unter Verwendung des in dieser Arbeit vorgestellten Expressionssystem hergestellt werden, und werden gerade charakterisiert.

#### **4.4.4 Der Einfluss von weiteren Kinasen und ihrer Inhibition auf die Pathogenese von Tauopathien**

Wie bereits erwähnt spielen vermutlich auch weitere Kinasen, z.B. aus der Familie der JNK, eine wichtige Rolle bei der Tau-Pathologie. Die Tau-transgenen Fische könnten auch verwendet werden, um die Aktivität von spezifischen Inhibitoren dieser Kinasen auf Phosphorylierung und Neurodegeneration zu untersuchen. So könnte besser verstanden werden, welche Kinasen Einflüsse auf die verschiedenen Aspekte der Tau-Pathologie haben, beispielsweise bei der Degeneration von Neuronen. Außerdem könnten die *in-vivo*-Effekte aktiver Substanzen durch Tests an den transgenen Fischen optimiert werden.

Die Tau-transgenen Zebrafische könnten aber nicht nur für die *in-vivo*-Validierung von bereits entwickelten Kinaseinhibitoren verwendet werden, sondern auch für die großangelegte Suche nach neuen Wirkstoffen.

Zebrafische sind die einzigen Wirbeltiere, die für großangelegte Testreihen zur Beurteilung der Aktivität chemischer Substanzen geeignet sind. Dieser Vorteil wird vor allem durch die geringen Körpergröße der Fische erreicht, da sie im Larvenstadium problemlos in einer 96-well Platte gehalten werden können und die meisten Substanzen direkt aus dem Wasser aufnehmen (Zon and Peterson, 2005). Zu diesen Larven können dann in einem Hochdurchsatzverfahren verschiedene Substanzbibliotheken pipettiert werden, um neue Wirkstoffe effizient zu identifizieren. Auf diese Weise könnten weitere an der Pathogenese neurodegenerativer Demenzen beteiligte Faktoren erkannt und auch neue Ansatzpunkte für Therapien gefunden werden. Ein solches Verfahren setzt aber eine Anpassung der Testbedingungen an den größeren Maßstab und ein robustes Ausleseverfahren für die Testergebnisse voraus.

#### **4.4.5 Herstellung weiterer Zebrafisch-Krankheitsmodelle mit Gal4/UAS-basierten Vektoren**

Das Gal4/UAS-basierte Vektorsystem wurde bereits bei seiner Entwicklung so angelegt, dass auch andere mit Krankheiten assoziierte Gene schnell integriert und in transgenen Fischen exprimiert werden können (siehe auch 3.2 und Abbildung 19). So konnten parallel zu den Tau-transgenen Fischen in Kollaboration mit anderen Forschern weitere Zebrafisch-Krankheitsmodelle hergestellt und untersucht werden:

##### **4.4.5.1 Vierfach-transgene Alzheimer-Modelle**

Dreifach-transgene Mausmodelle, die mutiertes Tau, APP, und PS1 gemeinsam exprimieren, bilden die Pathologie der Alzheimer-Erkrankung mit Plaques und *Tangles* recht gut nach (Oddo et al., 2003). Durch die Expression dieser drei Gene in transgenen Fischen könnte daher möglicherweise auch eine Pathologie hervorgerufen werden, die im Gegensatz zu den Tau-transgenen Fischen nicht nur *Tangles*, sondern auch Plaques aufweist. Falls diese Phänotypen ähnlich schnell auftreten würden, wie bei den Tau-transgenen Fischen, könnten diese Fische ebenfalls der Erforschung der

Alzheimer-Demenz am lebenden Tier dienen. Die Vektoren für die Herstellung transgener Fische wurden daher bereits so angepasst, dass mit ihnen in transgenen Fischen mehr als zwei Gene exprimiert werden können<sup>5</sup> (Abbildung 30A). Da der vom *Driver*-Konstrukt exprimierte Aktivator Gal4-VP16 an mehreren UAS-Sequenzen Genexpression aktivieren kann, wurde mit *Gateway*-Klonierungen ein *Responder*-Konstrukt hergestellt, das zwei bidirektionale UAS-Expressionskassetten enthielt. Eine dieser Kassetten enthält das humane Tau-Gen mit der Demenz-assoziierten P301L-Mutation und das DsRed-Gen als Fluoreszenzmarker. Die andere enthält die Gene für APP<sup>swe</sup> (Citron et al., 1992) und PS1-L166P (Moehlmann et al., 2002). Die Expression aller vier Proteine konnte bereits durch Immunfluoreszenzfärbungen in transgenen Fischen nachgewiesen werden (Abbildung 30B). Es wird derzeit untersucht, ob in diesen Fischen neben der Tau-Pathologie auch die für Alzheimer typische Bildung von Plaques auftritt.

#### 4.4.5.2 Modelle zur Erforschung der Parkinson-Erkrankung

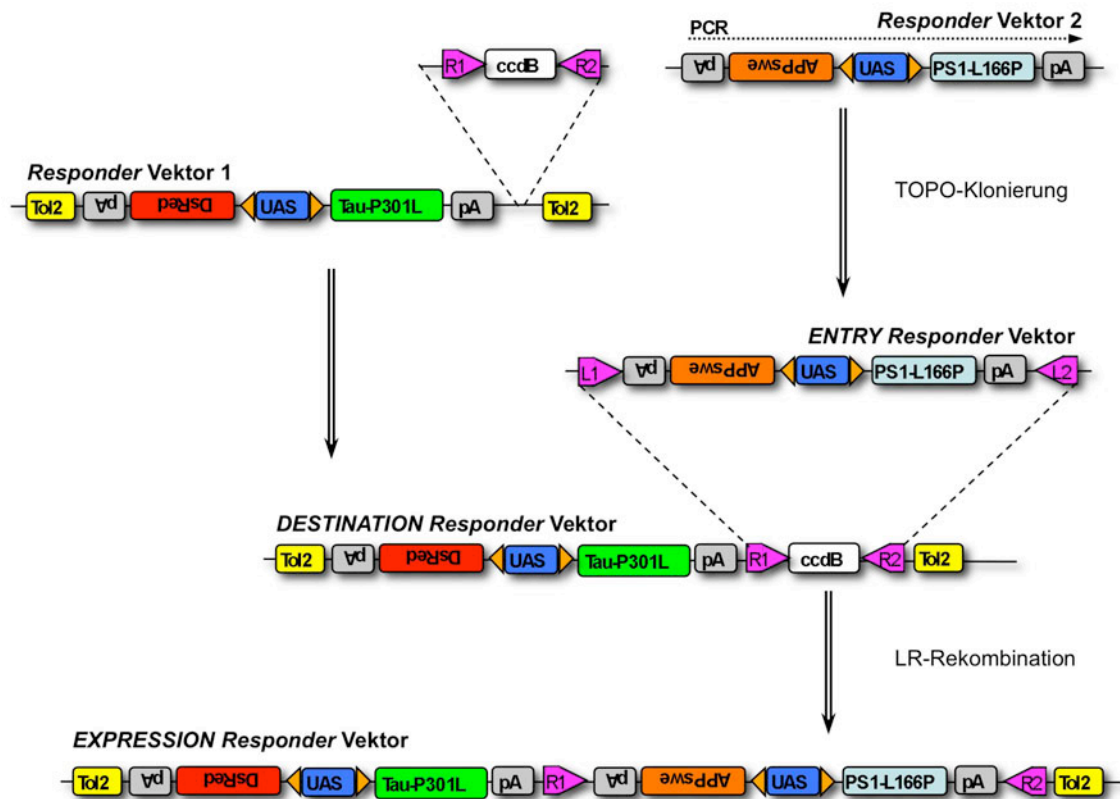
Die Parkinson-Erkrankung gehört wie die Alzheimer-Demenz zu den häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen. Sie ist durch eine Degeneration der dopaminergen Neurone in der *Substantia Nigra* und anderen Gehirnbereichen gekennzeichnet. Außerdem treten cytoplasmatische Aggregate, sog. Lewy-Körperchen und Lewy-Neuriten auf, die zum großen Teil aus dem Protein Alpha-Synuclein ( $\alpha$ Syn) bestehen (Baba et al., 1998; Winklhofer et al., 2008). In Patienten mit einer Gen-Triplikation führt verstärkte Expression von  $\alpha$ Syn zum Ausbruch der Parkinson-Erkrankung (Singleton et al., 2003). Wie bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen spielen Tiermodelle auch in der Parkinson-Forschung eine wichtige Rolle

---

<sup>5</sup> Die Konstrukte für die vierfach transgenen Fische wurden von Dominik Paquet hergestellt und injiziert. Die transgenen Fische wurden dann von Frauke van Bebber, LMU München, identifiziert und weiter bearbeitet. Die Bilder der Immunfluoreszenzfärbungen wurden von Thomas Misgeld, TU München, erstellt.



A



B

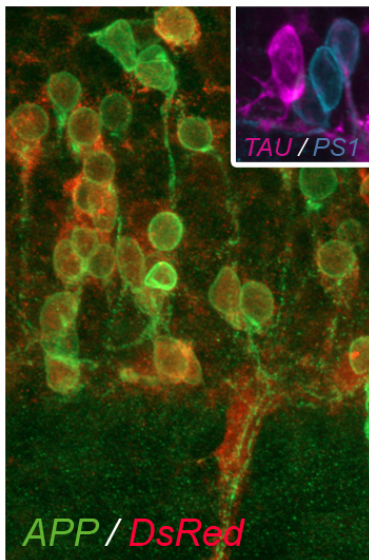


Abbildung 30: Herstellung vierfach-transgener Zebrafische

(A) Der *Responder Vektor 1* wurde durch die Insertion einer *Gateway-Kassette* (attR1-ccdB-attR2) innerhalb des von Tol2-Sequenzen flankierten Bereichs *Gateway-kompatibel* gemacht. Der *Responder Vektor 2*, welcher die beiden zusätzlich zu exprimierenden Gene APP<sup>swE</sup> und PS1-L166P enthält, wurde über PCR-Amplifikation und TOPO-Klonierung in einen *ENTRY Vektor* mit attL1/2 Rekombinationssequenzen umgesetzt. Die Expressionskassette mit den beiden neuen Genen konnte dann über eine LR-Rekombination vom *ENTRY Responder Vektor* in den *DESTINATION Responder Vektor* überführt werden.

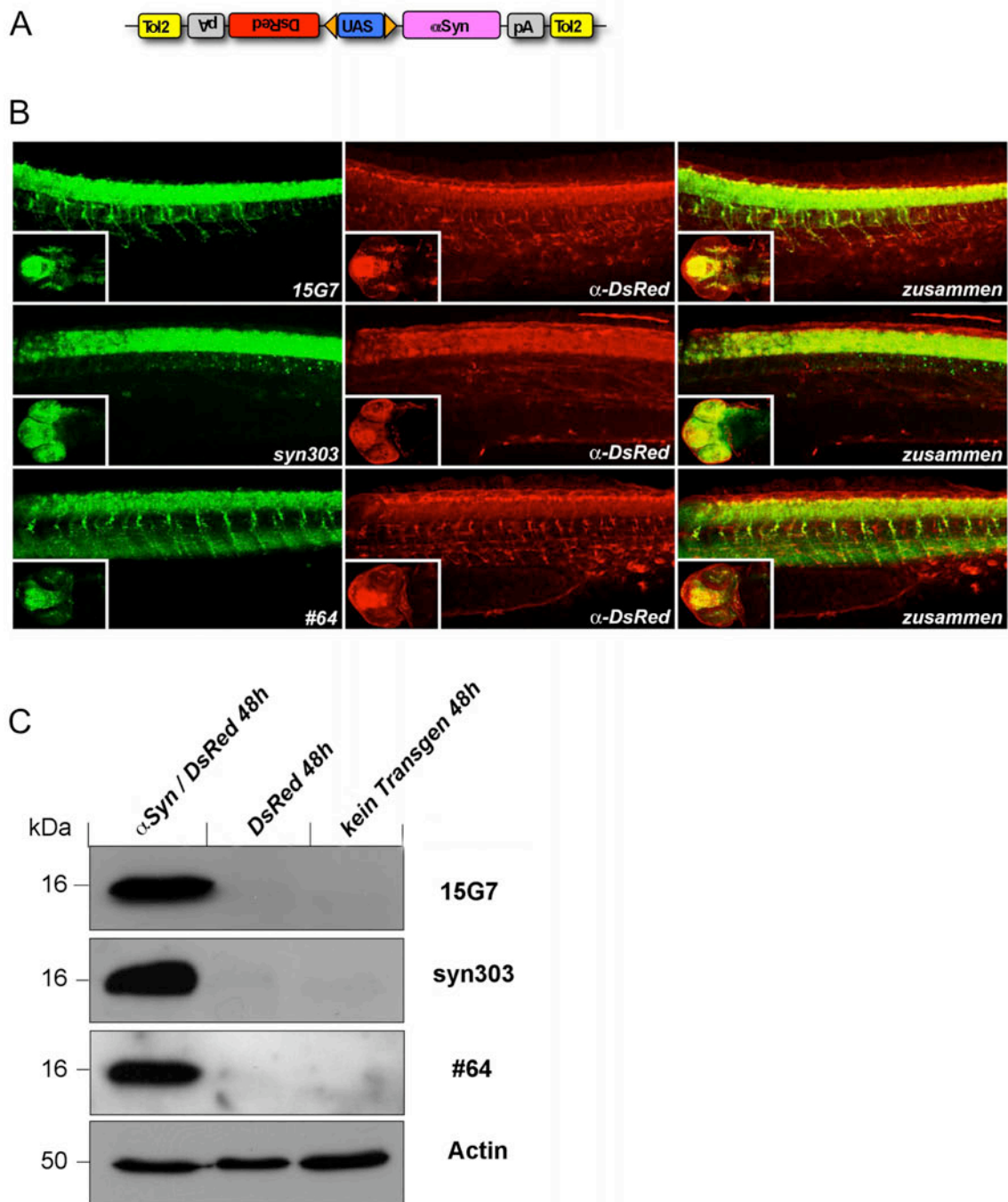
(B) Immunfluoreszenzfärbungen für die drei Krankheits-assoziierten Proteine zeigen Koexpression von APP (grün, Antikörper 6E10) und DsRed (rot,  $\alpha$ DsRed), bzw. Tau (violett, K9JA) und PS1 (blau, PS1 3027) im Rückenmark der DsRed-positiven transgenen Fische. Die Koexpression von Tau und DsRed wurde bereits in Abbildung 18 nachgewiesen.

(Beal, 2001).  $\alpha$ Syn-transgene Fische könnten daher ebenfalls als neues Modell dienen, um diese Krankheit am lebenden Tier zu erforschen. Bisher wurden allerdings noch keine  $\alpha$ Syn-transgenen Zebrafische publiziert. Um ein solches Zebrafischmodell für die Parkinson-Erkrankung herzustellen, wurde das humane  $\alpha$ Syn-Gen in transgenen Fischen exprimiert (Abbildung 31A)<sup>6</sup>. Die transgenen Fische zeigen eine starke Expression des  $\alpha$ Syn-Proteins im zentralen Nervensystem, welche mit Immunfluoreszenzfärbungen mit dem Antikörper 15G7 untersucht wurde. Außerdem konnten bereits in 30 Stunden alten Fischen frühe pathologische Veränderungen festgestellt werden, wie z.B. eine pathologische Konformationsänderung, welche durch eine Immunfluoreszenzfärbung mit dem Antikörper syn303 (Sampathu et al., 2003) nachgewiesen wurde, oder eine Phosphorylierung von  $\alpha$ Syn am Serin 129, die mit dem Antikörper #64 (Fujiwara et al., 2002) gezeigt wurde (Abbildung 31B). Die Expression und pathologische Veränderung von  $\alpha$ Syn konnte auch durch Western-Blot-Analyse bestätigt werden (Abbildung 31C). Die Pathologie der  $\alpha$ Syn-transgenen Fische wird derzeit detailliert charakterisiert.

Obwohl ein Großteil der im Ausblick beschriebenen Anwendungen erst noch im Detail entwickelt werden muss, verdeutlicht die Vielzahl der Möglichkeiten das große Potential der transgenen Fischmodelle für die Forschung an neurodegenerativen Erkrankungen.

---

<sup>6</sup> Die Herstellung der  $\alpha$ Syn-Konstrukte, ihre Injektion, die Identifizierung und Färbung der Fische und die Western-Blots wurden von Daniele Franc, LMU München, unter Anleitung von Dominik Paquet und Christian Brösamle, LMU München durchgeführt. Die Bilder der Immunfluoreszenzen wurden von Christian Brösamle aufgenommen und weiterverarbeitet.



**Abbildung 31: Alpha-Synuclein-transgene Fische als Parkinson-Modelle**

(A) Responder-Konstrukt zur Expression von alpha-Synuclein in transgenen Fischen.

(B) Alpha-Synuclein ist im Rückenmark und Gehirn (Ausschnitt) der 32 h alten transgenen Fische stark exprimiert (Antikörper 15G7) und weist pathologische Veränderungen, wie pathologische Konformation (Antikörper syn303) und Phosphorylierung an Serin 129 (Antikörper #64) auf. (C) Expression, pathologische Veränderung und Phosphorylierung konnten auch mit Western-Blot-Analyse von 48 h alten Fischen nachgewiesen werden.



## Literaturverzeichnis

- Aguzzi A, Haass C (2003) Games played by rogue proteins in prion disorders and Alzheimer's disease. *Science* 302:814-818.
- Ahlijanian MK, Barrezueta NX, Williams RD, Jakowski A, Kowsz KP, McCarthy S, Coskran T, Carlo A, Seymour PA, Burkhardt JE, Nelson RB, McNeish JD (2000) Hyperphosphorylated tau and neurofilament and cytoskeletal disruptions in mice overexpressing human p25, an activator of cdk5. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:2910-2915.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Walter P, Raff M, Roberts K (2002) *Molecular Biology of the Cell*. Taylor & Francis:1-1616.
- Alzheimer A (1907) Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg Z Psychiat Psych-Gerichtl Med* 64:146-148.
- Alzheimer A (1911) Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters. *Z Gesamte Neurol Psychiatr* 4:356-385.
- Andreadis A (2005) Tau gene alternative splicing: expression patterns, regulation and modulation of function in normal brain and neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta* 1739:91-103.
- Asakawa K, Suster ML, Mizusawa K, Nagayoshi S, Kotani T, Urasaki A, Kishimoto Y, Hibi M, Kawakami K (2008) Genetic dissection of neural circuits by Tol2 transposon-mediated Gal4 gene and enhancer trapping in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:1255-1260.
- Augustinack JC, Schneider A, Mandelkow EM, Hyman B (2002) Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica* 103:26-35.
- Baba M, Nakajo S, Tu PH, Tomita T, Nakaya K, Lee VM, Trojanowski JQ, Iwatsubo T (1998) Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Am J Pathol* 152:879-884.
- Bai Q, Garver JA, Hukriede NA, Burton EA (2007) Generation of a transgenic zebrafish model of Tauopathy using a novel promoter element derived from the zebrafish *eno2* gene. *Nucleic Acids Res* 35:6501-6516.
- Baudier J, Cole RD (1987) Phosphorylation of tau proteins to a state like that in Alzheimer's brain is catalyzed by a calcium/calmodulin-dependent kinase and modulated by phospholipids. *J Biol Chem* 262:17577-17583.

- Baumann K, Mandelkow EM, Biernat J, Piwnica-Worms H, Mandelkow E (1993) Abnormal Alzheimer-like phosphorylation of tau-protein by cyclin-dependent kinases cdk2 and cdk5. *FEBS Lett* 336:417-424.
- Beal MF (2001) Experimental models of Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 2:325-334.
- Beis D, Stainier DY (2006) In vivo cell biology: following the zebrafish trend. *Trends Cell Biol* 16:105-112.
- Bevis BJ, Glick BS (2002) Rapidly maturing variants of the Discosoma red fluorescent protein (DsRed). *Nat Biotechnol* 20:83-87.
- Bhat R, Xue Y, Berg S, Hellberg S, Ormo M, Nilsson Y, Radesater AC, Jerneing E, Markgren PO, Borgegard T, Nylof M, Gimenez-Cassina A, Hernandez F, Lucas JJ, Diaz-Nido J, Avila J (2003) Structural insights and biological effects of glycogen synthase kinase 3-specific inhibitor AR-A014418. *J Biol Chem* 278:45937-45945.
- Bhat RV, Budd Haeberlein SL, Avila J (2004) Glycogen synthase kinase 3: a drug target for CNS therapies. *J Neurochem* 89:1313-1317.
- Bickel H (2001) [Dementia in advanced age: estimating incidence and health care costs]. *Zeitschrift für Gerontologie und Geriatrie : Organ der Deutschen Gesellschaft für Gerontologie und Geriatrie* 34:108-115.
- Biernat J, Mandelkow EM, Schroter C, Lichtenberg-Kraag B, Steiner B, Berling B, Meyer H, Mercken M, Vandermeeren A, Goedert M, et al. (1992) The switch of tau protein to an Alzheimer-like state includes the phosphorylation of two serine-proline motifs upstream of the microtubule binding region. *Embo J* 11:1593-1597.
- Billingsley ML, Kincaid RL (1997) Regulated phosphorylation and dephosphorylation of tau protein: effects on microtubule interaction, intracellular trafficking and neurodegeneration. *Biochem J* 323 ( Pt 3):577-591.
- Binder LI, Frankfurter A, Rebhun LI (1985) The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *The Journal of Cell Biology* 101:1371-1378.
- Borchelt DR, Thinakaran G, Eckman CB, Lee MK, Davenport F, Ratovitsky T, Prada CM, Kim G, Seekins S, Yager D, Slunt HH, Wang R, Seeger M, Levey AI, Gandy SE, Copeland NG, Jenkins NA, Price DL, Younkin SG, Sisodia SS (1996) Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron* 17:1005-1013.
- Bornebroek M, Breteler M (2004) Epidemiology of non-AD dementias. *Clinical Neuroscience Research* 3:349-361.
- Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82:239-259.

- Braak H, Braak E, Yilmazer D, de Vos RA, Jansen EN, Bohl J (1996) Pattern of brain destruction in Parkinson's and Alzheimer's diseases. *J Neural Transm* 103:455-490.
- Brand AH, Perrimon N (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118:401-415.
- Brecht M, Fee MS, Garaschuk O, Helmchen F, Margrie TW, Svoboda K, Osten P (2004) Novel approaches to monitor and manipulate single neurons in vivo. *J Neurosci* 24:9223-9227.
- Brookmeyer R, Johnson E, Ziegler-Graham K, Arrighi HM (2007) Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia* 3:186-191.
- Buee L, Bussiere T, Buee-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR (2000) Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev* 33:95-130.
- Busciglio J, Gabuzda DH, Matsudaira P, Yankner BA (1993) Generation of beta-amyloid in the secretory pathway in neuronal and nonneuronal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:2092-2096.
- Carrard G, Bulteau AL, Petropoulos I, Friguet B (2002) Impairment of proteasome structure and function in aging. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 34:1461-1474.
- Churcher I (2006) Tau therapeutic strategies for the treatment of Alzheimer's disease. *Current topics in medicinal chemistry* 6:579-595.
- Citron M, Oltersdorf T, Haass C, McConlogue L, Hung AY, Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Lieberburg I, Selkoe DJ (1992) Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature* 360:672-674.
- Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW (1977a) Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J Mol Biol* 116:207-225.
- Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW (1977b) Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. *J Mol Biol* 116:227-247.
- Cohen P, Goedert M (2004) GSK3 inhibitors: development and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* 3:479-487.
- Cross DA, Culbert AA, Chalmers KA, Facci L, Skaper SD, Reith AD (2001) Selective small-molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 activity protect primary neurones from death. *J Neurochem* 77:94-102.

- Cruz JC, Tseng HC, Goldman JA, Shih H, Tsai LH (2003) Aberrant Cdk5 activation by p25 triggers pathological events leading to neurodegeneration and neurofibrillary tangles. *Neuron* 40:471-483.
- Dawson HN, Ferreira A, Eyster MV, Ghoshal N, Binder LI, Vitek MP (2001) Inhibition of neuronal maturation in primary hippocampal neurons from tau deficient mice. *J Cell Sci* 114:1179-1187.
- Dias-Santagata D, Fulga T, Duttaroy A, Feany M (2007) Oxidative stress mediates tau-induced neurodegeneration in *Drosophila*. *Journal of Clinical Investigation* 117:236-245.
- Doble BW, Woodgett JR (2003) GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci* 116:1175-1186.
- Dodd A, Curtis PM, Williams LC, Love DR (2000) Zebrafish: bridging the gap between development and disease. *Human Molecular Genetics* 9:2443-2449.
- Drechsel DN, Hyman AA, Cobb MH, Kirschner MW (1992) Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol Biol Cell* 3:1141-1154.
- Drewes G, Ebner A, Preuss U, Mandelkow EM, Mandelkow E (1997) MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell* 89:297-308.
- Drewes G, Lichtenberg-Kraag B, Döring F, Mandelkow EM, Biernat J, Goris J, Dorée M, Mandelkow E (1992) Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms tau protein into an Alzheimer-like state. *EMBO J* 11:2131-2138.
- Driever W, Solnica-Krezel L, Schier AF, Neuhauss SC, Malicki J, Stemple DL, Stainier DY, Zwartkuis F, Abdelilah S, Rangini Z, Belak J, Boggs C (1996) A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development* 123:37-46.
- Duff K, Eckman C, Zehr C, Yu X, Prada CM, Perez-tur J, Hutton M, Buee L, Harigaya Y, Yager D, Morgan D, Gordon MN, Holcomb L, Refolo L, Zenk B, Hardy J, Younkin S (1996) Increased amyloid-beta42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature* 383:710-713.
- Duffy J (2002) GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *genesis* 34:1-15.
- Eckermann K, Mocanu MM, Khlistunova I, Biernat J, Nissen A, Hofmann A, Schönig K, Bujard H, Haemisch A, Mandelkow E, Zhou L, Rune G, Mandelkow EM (2007) The beta-propensity of Tau determines aggregation and synaptic loss in inducible mouse models of tauopathy. *J Biol Chem* 282:31755-31765.
- Edbauer D, Winkler E, Regula JT, Pesold B, Steiner H, Haass C (2003) Reconstitution of gamma-secretase activity. *Nat Cell Biol* 5:486-488.



- Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes PR, Rimmer E, Scazufca M, International AsD (2005) Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 366:2112-2117.
- Fox MA, Sanes JR (2007) Synaptotagmin I and II are present in distinct subsets of central synapses. *J Comp Neurol* 503:280-296.
- Fujiwara H, Hasegawa M, Dohmae N, Kawashima A, Masliah E, Goldberg MS, Shen J, Takio K, Iwatsubo T (2002) alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol* 4:160-164.
- Furutani-Seiki M, Jiang YJ, Brand M, Heisenberg CP, Houart C, Beuchle D, van Eeden FJ, Granato M, Haffter P, Hammerschmidt M, Kane DA, Kelsh RN, Mullins MC, Odenthal J, Nusslein-Volhard C (1996) Neural degeneration mutants in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* 123:229-239.
- Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, Carr T, Clemens J, Donaldson T, Gillespie F (1995) Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature* 373:523-527.
- Glenner GG, Wong CW (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 120:885-890.
- Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349:704-706.
- Goedert M, Jakes R (2005) Mutations causing neurodegenerative tauopathies. *Biochim Biophys Acta* 1739:240-250.
- Goedert M, Spillantini MG (2006) A century of Alzheimer's disease. *Science* 314:777-781.
- Goedert M, Jakes R, Crowther RA, Cohen P, Vanmechelen E, Vandermeeren M, Cras P (1994) Epitope mapping of monoclonal antibodies to the paired helical filaments of Alzheimer's disease: identification of phosphorylation sites in tau protein. *Biochem J* 301 ( Pt 3):871-877.
- Golde TE, Estus S, Younkin LH, Selkoe DJ, Younkin SG (1992) Processing of the amyloid protein precursor to potentially amyloidogenic derivatives. *Science* 255:728-730.
- Goldstein LS (2003) Do disorders of movement cause movement disorders and dementia? *Neuron* 40:415-425.
- Gotz J, Ittner L (2008) Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Nat Rev Neurosci* 9:532-544.

- Gotz J, Chen F, van Dorpe J, Nitsch RM (2001) Formation of neurofibrillary tangles in P301l tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils. *Science* 293:1491-1495.
- Gotz J, Probst A, Spillantini MG, Schäfer T, Jakes R, Bürki K, Goedert M (1995) Somatodendritic localization and hyperphosphorylation of tau protein in transgenic mice expressing the longest human brain tau isoform. *EMBO J* 14:1304-1313.
- Gotz J, Deters N, Doldissen A, Bokhari L, Ke Y, Wiesner A, Schonrock N, Ittner L (2007) A decade of tau transgenic animal models and beyond. *Brain Pathol* 17:91-103.
- Gould TD, Manji HK (2005) Glycogen synthase kinase-3: a putative molecular target for lithium mimetic drugs. *Neuropsychopharmacology* 30:1223-1237.
- Greenberg SG, Davies P (1990) A preparation of Alzheimer paired helical filaments that displays distinct tau proteins by polyacrylamide gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:5827-5831.
- Greenberg SG, Davies P, Schein JD, Binder LI (1992) Hydrofluoric acid-treated tau PHF proteins display the same biochemical properties as normal tau. *J Biol Chem* 267:564-569.
- Greenwood JA, Scott CW, Spreen RC, Caputo CB, Johnson GV (1994) Casein kinase II preferentially phosphorylates human tau isoforms containing an amino-terminal insert. Identification of threonine 39 as the primary phosphate acceptor. *J Biol Chem* 269:4373-4380.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M, Tung YC, Zaidi MS, Wisniewski HM (1986a) Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem* 261:6084-6089.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI (1986b) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:4913-4917.
- Haass C, Steiner H (2002) Alzheimer disease gamma-secretase: a complex story of GxGD-type presenilin proteases. *Trends Cell Biol* 12:556-562.
- Haass C, Selkoe DJ (2007) Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:101-112.
- Haass C, Lemere CA, Capell A, Citron M, Seubert P, Schenk D, Lannfelt L, Selkoe DJ (1995) The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta-secretase cleavage within the secretory pathway. *Nat Med* 1:1291-1296.
- Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, Lieberburg I, Koo EH, Schenk D, Teplow DB (1992) Amyloid beta-

- peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 359:322-325.
- Hadjantonakis A, Macmaster S, Nagy A (2002) Embryonic stem cells and mice expressing different GFP variants for multiple non-invasive reporter usage within a single animal. *BMC Biotechnol* 2:11.
- Haffter P, Granato M, Brand M, Mullins MC, Hammerschmidt M, Kane DA, Odenthal J, van Eeden FJ, Jiang YJ, Heisenberg CP, Kelsh RN, Furutani-Seiki M, Vogelsang E, Beuchle D, Schach U, Fabian C, Nüsslein-Volhard C (1996) The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* 123:1-36.
- Hanger DP, Hughes K, Woodgett JR, Brion JP, Anderton BH (1992) Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase. *Neurosci Lett* 147:58-62.
- Hardy J (2006) A Hundred Years of Alzheimer's Disease Research. *Neuron* 52:3-13.
- Hasegawa M, Morishima-Kawashima M, Takio K, Suzuki M, Titani K, Ihara Y (1992) Protein sequence and mass spectrometric analyses of tau in the Alzheimer's disease brain. *J Biol Chem* 267:17047-17054.
- Hasegawa M, Jakes R, Crowther RA, Lee VM, Ihara Y, Goedert M (1996) Characterization of mAb AP422, a novel phosphorylation-dependent monoclonal antibody against tau protein. *FEBS Lett* 384:25-30.
- Helmchen F, Denk W (2005) Deep tissue two-photon microscopy. *Nat Meth* 2:932-940.
- Hendrie HC (1998) Epidemiology of dementia and Alzheimer's disease. *The American Journal of Geriatric Psychiatry* 6:S3-18.
- Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F, Cole G (1996) Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274:99-102.
- Hutton M et al. (1998) Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 393:702-705.
- Iqbal K, Liu F, Gong CX, Alonso AD, Grundke-Iqbal I (2009) Mechanisms of tau-induced neurodegeneration. *Acta Neuropathol*.
- Ishiguro K, Omori A, Takamatsu M, Sato K, Arioka M, Uchida T, Imahori K (1992) Phosphorylation sites on tau by tau protein kinase I, a bovine derived kinase generating an epitope of paired helical filaments. *Neurosci Lett* 148:202-206.
- Ishihara T, Hong M, Zhang B, Nakagawa Y, Lee MK, Trojanowski JQ, Lee VM (1999) Age-dependent emergence and progression of a tauopathy in

- transgenic mice overexpressing the shortest human tau isoform. *Neuron* 24:751-762.
- Jackson GR, Wiedau-Pazos M, Sang TK, Wagle N, Brown CA, Massachi S, Geschwind DH (2002) Human wild-type tau interacts with wingless pathway components and produces neurofibrillary pathology in *Drosophila*. *Neuron* 34:509-519.
- Jeong JY, Kwon HB, Ahn JC, Kang D, Kwon SH, Park JA, Kim KW (2008) Functional and developmental analysis of the blood-brain barrier in zebrafish. *Brain Res Bull* 75:619-628.
- Jicha GA, Berenfeld B, Davies P (1999) Sequence requirements for formation of conformational variants of tau similar to those found in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 55:713-723.
- Jontes JD, Emond MR, Smith SJ (2004) In vivo trafficking and targeting of N-cadherin to nascent presynaptic terminals. *J Neurosci* 24:9027-9034.
- Jorm AF (1991) Cross-national comparisons of the occurrence of Alzheimer's and vascular dementias. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience* 240:218-222.
- Karsten SL, Sang TK, Gehman LT, Chatterjee S, Liu J, Lawless GM, Sengupta S, Berry RW, Pomakian J, Oh HS, Schulz C, Hui KS, Wiedau-Pazos M, Vinters HV, Binder LI, Geschwind DH, Jackson GR (2006) A genomic screen for modifiers of tauopathy identifies puromycin-sensitive aminopeptidase as an inhibitor of tau-induced neurodegeneration. *Neuron* 51:549-560.
- Kawakami K (2005) Transposon tools and methods in zebrafish. *Dev Dyn* 234:244-254.
- Khatoun S, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1994) Levels of normal and abnormally phosphorylated tau in different cellular and regional compartments of Alzheimer disease and control brains. *FEBS Lett* 351:80-84.
- Kim MJ, Kang KH, Kim CH, Choi SY (2008) Real-time imaging of mitochondria in transgenic zebrafish expressing mitochondrially targeted GFP. *BioTechniques* 45:331-334.
- Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* 203:253-310.
- Kosik KS, Joachim CL, Selkoe DJ (1986) Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:4044-4048.
- Kosik KS, Orecchio LD, Binder L, Trojanowski JQ, Lee VM, Lee G (1988) Epitopes that span the tau molecule are shared with paired helical filaments. *Neuron* 1:817-825.

- Koster RW, Fraser SE (2001) Tracing transgene expression in living zebrafish embryos. *Dev Biol* 233:329-346.
- Kraemer BC, Burgess JK, Chen JH, Thomas JH, Schellenberg GD (2006) Molecular pathways that influence human tau-induced pathology in *Caenorhabditis elegans*. *Hum Mol Genet* 15:1483-1496.
- Kraemer BC, Zhang B, Leverenz JB, Thomas JH, Trojanowski JQ, Schellenberg GD (2003) Neurodegeneration and defective neurotransmission in a *Caenorhabditis elegans* model of tauopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:9980-9985.
- Kwan K, Fujimoto E, Grabher C, Mangum B, Hardy M, Campbell D, Parant J, Yost HJ, Kanki J, Chien C (2007) The Tol2kit: a multisite gateway-based construction kit for Tol2 transposon transgenesis constructs. *Dev Dyn* 236:3088-3099.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lau LF, Schachter JB, Seymour PA, Sanner MA (2002) Tau protein phosphorylation as a therapeutic target in Alzheimer's disease. *Current topics in medicinal chemistry* 2:395-415.
- Lee G, Cowan N, Kirschner M (1988) The primary structure and heterogeneity of tau protein from mouse brain. *Science* 239:285-288.
- Lee KY, Clark AW, Rosales JL, Chapman K, Fung T, Johnston RN (1999) Elevated neuronal Cdc2-like kinase activity in the Alzheimer disease brain. *Neurosci Res* 34:21-29.
- Lee MS, Kao SC, Lemere C, Xia W, Tseng HC, Zhou Y, Neve R, Ahljianian MK, Tsai LH (2003) APP processing is regulated by cytoplasmic phosphorylation. *The Journal of Cell Biology* 163:83-95.
- Lee VM, Goedert M, Trojanowski JQ (2001) Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci* 24:1121-1159.
- Lewis J, Dickson DW, Lin WL, Chisholm L, Corral A, Jones G, Yen SH, Sahara N, Skipper L, Yager D, Eckman C, Hardy J, Hutton M, McGowan E (2001) Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science* 293:1487-1491.
- Lewis J, McGowan E, Rockwood J, Melrose H, Nacharaju P, Van Slegtenhorst M, Gwinn-Hardy K, Paul Murphy M, Baker M, Yu X, Duff K, Hardy J, Corral A, Lin WL, Yen SH, Dickson DW, Davies P, Hutton M (2000) Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nat Genet* 25:402-405.
- Litersky JM, Johnson GV (1992) Phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase inhibits the degradation of tau by calpain. *J Biol Chem* 267:1563-1568.

- Lucas JJ, Hernández F, Gómez-Ramos P, Morán MA, Hen R, Avila J (2001) Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice. *EMBO J* 20:27-39.
- Mandelkow EM, Mandelkow E (1998) Tau in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol* 8:425-427.
- Mandelkow EM, Biernat J, Drewes G, Gustke N, Trinczek B, Mandelkow E (1995) Tau domains, phosphorylation, and interactions with microtubules. *Neurobiology of Aging* 16:355-362; discussion 362-353.
- Maurer K, Volk S, Gerbaldo H (1997) Auguste D and Alzheimer's disease. *Lancet* 349:1546-1549.
- Mazanetz M, Fischer P (2007) Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative diseases. *Nat Rev Drug Discov* 6:464-479.
- Meek PD, McKeithan K, Schumock GT (1998) Economic considerations in Alzheimer's disease. *Pharmacotherapy* 18:68-73; discussion 79-82.
- Misgeld T, Kerschensteiner M, Bareyre F, Burgess R, Lichtman J (2007) Imaging axonal transport of mitochondria in vivo. *Nat Meth* 4:559-561.
- Miyasaka T, Ding Z, Gengyo-Ando K, Oue M, Yamaguchi H, Mitani S, Ihara Y (2005) Progressive neurodegeneration in *C. elegans* model of tauopathy. *Neurobiology of Disease* 20:372-383.
- Moehlmann T, Winkler E, Xia X, Edbauer D, Murrell J, Capell A, Kaether C, Zheng H, Ghetti B, Haass C, Steiner H (2002) Presenilin-1 mutations of leucine 166 equally affect the generation of the Notch and APP intracellular domains independent of their effect on Abeta 42 production. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:8025-8030.
- Mullins MC, Hammerschmidt M, Haffter P, Nusslein-Volhard C (1994) Large-scale mutagenesis in the zebrafish: in search of genes controlling development in a vertebrate. *Curr Biol* 4:189-202.
- Musa A, Lehrach H, Russo VA (2001) Distinct expression patterns of two zebrafish homologues of the human APP gene during embryonic development. *Development Genes and Evolution* 211:563-567.
- Myers PZ, Eisen JS, Westerfield M (1986) Development and axonal outgrowth of identified motoneurons in the zebrafish. *J Neurosci* 6:2278-2289.
- Nacharaju P, Lewis J, Easson C, Yen S, Hackett J, Hutton M, Yen SH (1999) Accelerated filament formation from tau protein with specific FTDP-17 missense mutations. *FEBS Lett* 447:195-199.
- Nagai T, Ibata K, Park ES, Kubota M, Mikoshiba K, Miyawaki A (2002) A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol* 20:87-90.

- Neumann M, Kretzschmar HA (2008) [Molecular neuropathology of Non-Alzheimer dementia]. *Pathologie* 29:434-441.
- Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, Bruce J, Schuck T, Grossman M, Clark CM, McCluskey LF, Miller BL, Masliah E, Mackenzie I, Feldman H, Feiden W, Kretzschmar HA, Trojanowski JQ, Lee VM (2006) Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 314:130-133.
- Nicholl DJ, Greenstone MA, Clarke CE, Rizzu P, Crooks D, Crowe A, Trojanowski JQ, Lee VM, Heutink P (2003) An English kindred with a novel recessive tauopathy and respiratory failure. *Ann Neurol* 54:682-686.
- Nikoulina SE, Ciaraldi TP, Mudaliar S, Carter L, Johnson K, Henry RR (2002) Inhibition of glycogen synthase kinase 3 improves insulin action and glucose metabolism in human skeletal muscle. *Diabetes* 51:2190-2198.
- Noble W, Planel E, Zehr C, Olm V, Meyerson J, Suleman F, Gaynor K, Wang L, LaFrancois J, Feinstein B, Burns M, Krishnamurthy P, Wen Y, Bhat R, Lewis J, Dickson D, Duff K (2005) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:6990-6995.
- Noble W, Olm V, Takata K, Casey E, Mary O, Meyerson J, Gaynor K, LaFrancois J, Wang L, Kondo T, Davies P, Burns M, Veeranna, Nixon R, Dickson D, Matsuoka Y, Ahlijanian M, Lau LF, Duff K (2003) Cdk5 is a key factor in tau aggregation and tangle formation in vivo. *Neuron* 38:555-565.
- Nüsslein-Volhard C, Dahm R (2002) *Zebrafish: A Practical Approach*. Oxford University Press 1-303.
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM (2003) Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* 39:409-421.
- Ono F, Higashijima S, Shcherbatko A, Fetcho JR, Brehm P (2001) Paralytic zebrafish lacking acetylcholine receptors fail to localize rapsyn clusters to the synapse. *J Neurosci* 21:5439-5448.
- Paquet D, Bhat R, Sydow A, Mandelkow E, Berg S, Hellberg S, Fältling J, Distel M, Köster RW, Schmid B, Haass C (2009) A zebrafish model of tauopathy allows in vivo imaging of neuronal cell death and drug evaluation. *J Clin Invest*.
- Park HC, Kim CH, Bae YK, Yeo SY, Kim SH, Hong SK, Shin J, Yoo KW, Hibi M, Hirano T, Miki N, Chitnis AB, Huh TL (2000) Analysis of upstream elements in the HuC promoter leads to the establishment of transgenic zebrafish with fluorescent neurons. *Dev Biol* 227:279-293.

- Perez M, Hernandez F, Lim F, Diaz-Nido J, Avila J (2003) Chronic lithium treatment decreases mutant tau protein aggregation in a transgenic mouse model. *J Alzheimers Dis* 5:301-308.
- Peri F, Nüsslein-Volhard C (2008) Live imaging of neuronal degradation by microglia reveals a role for v0-ATPase a1 in phagosomal fusion in vivo. *Cell* 133:916-927.
- Perry G, Roder H, Nunomura A, Takeda A, Friedlich AL, Zhu X, Raina AK, Holbrook N, Siedlak SL, Harris PL, Smith MA (1999) Activation of neuronal extracellular receptor kinase (ERK) in Alzheimer disease links oxidative stress to abnormal phosphorylation. *Neuroreport* 10:2411-2415.
- Peterson R, Shaw S, Peterson T, Milan D, Zhong T, Schreiber S, Macrae C, Fishman M (2004) Chemical suppression of a genetic mutation in a zebrafish model of aortic coarctation. *Nat Biotechnol* 22:595-599.
- Pick A (1892) Über die Beziehungen der senilen Hirnatrophie zur Aphasie. *Prag Med Wochenschr* 17:165-167.
- Roberson ED, Scearce-Levie K, Palop JJ, Yan F, Cheng IH, Wu T, Gerstein H, Yu GQ, Mucke L (2007) Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science* 316:750-754.
- Roder HM, Ingram VM (1991) Two novel kinases phosphorylate tau and the KSP site of heavy neurofilament subunits in high stoichiometric ratios. *J Neurosci* 11:3325-3343.
- Roder HM, Eden PA, Ingram VM (1993) Brain protein kinase PK40erk converts TAU into a PHF-like form as found in Alzheimer's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 193:639-647.
- Rovelet-Lecrux A, Hannequin D, Raux G, Le Meur N, Laquerrière A, Vital A, Dumanchin C, Feuillette S, Brice A, Vercelletto M, Dubas F, Frebourg T, Campion D (2006) APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat Genet* 38:24-26.
- Rubinstein AL (2003) Zebrafish: from disease modeling to drug discovery. *Current opinion in drug discovery & development* 6:218-223.
- Sadowski I, Ma J, Triezenberg S, Ptashne M (1988) GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature* 335:563-564.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.
- Sampathu DM, Giasson BI, Pawlyk AC, Trojanowski JQ, Lee VM (2003) Ubiquitination of alpha-synuclein is not required for formation of



- pathological inclusions in alpha-synucleinopathies. *Am J Pathol* 163:91-100.
- Santacruz K, Lewis J, Spires T, Paulson J, Kotilinek L, Ingelsson M, Guimaraes A, DeTure M, Ramsden M, McGowan E, Forster C, Yue M, Orne J, Janus C, Mariash A, Kuskowski M, Hyman B, Hutton M, Ashe KH (2005) Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science* 309:476-481.
- Sawamura N, Gong JS, Garver WS, Heidenreich RA, Ninomiya H, Ohno K, Yanagisawa K, Michikawa M (2001) Site-specific phosphorylation of tau accompanied by activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) in brains of Niemann-Pick type C mice. *J Biol Chem* 276:10314-10319.
- Scheer N, Campos-Ortega JA (1999) Use of the Gal4-UAS technique for targeted gene expression in the zebrafish. *Mechanisms of Development* 80:153-158.
- Scott E, Mason L, Arrenberg A, Ziv L, Gosse N, Xiao T, Chi N, Asakawa K, Kawakami K, Baier H (2007) Targeting neural circuitry in zebrafish using GAL4 enhancer trapping. *Nat Meth* 4:323-326.
- Seidensticker MJ, Behrens J (2000) Biochemical interactions in the wnt pathway. *Biochim Biophys Acta* 1495:168-182.
- Selkoe DJ (1991) The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* 6:487-498.
- Selkoe DJ (1999) Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature* 399:A23-31.
- Selkoe DJ (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81:741-766.
- Seubert P, Mawal-Dewan M, Barbour R, Jakes R, Goedert M, Johnson GV, Litsky JM, Schenk D, Lieberburg I, Trojanowski JQ, et al. (1995) Detection of phosphorylated Ser262 in fetal tau, adult tau, and paired helical filament tau. *J Biol Chem* 270:18917-18922.
- Shaw LM, Korecka M, Clark CM, Lee VM, Trojanowski JQ (2007) Biomarkers of neurodegeneration for diagnosis and monitoring therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 6:295-303.
- Singleton AB et al. (2003) alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 302:841.
- Smith DG, Buffet M, Fenwick AE, Haigh D, Ife RJ, Saunders M, Slingsby BP, Stacey R, Ward RW (2001) 3-Anilino-4-arylmaleimides: potent and selective inhibitors of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3). *Bioorg Med Chem Lett* 11:635-639.
- Snowdon DA, Study N (2003) Healthy aging and dementia: findings from the Nun Study. *Ann Intern Med* 139:450-454.

- Spillantini MG, Murrell JR, Goedert M, Farlow MR, Klug A, Ghetti B (1998) Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:7737-7741.
- Stachel SE, Grunwald DJ, Myers PZ (1993) Lithium perturbation and goosecoid expression identify a dorsal specification pathway in the pregastrula zebrafish. *Development* 117:1261-1274.
- Stambolic V, Ruel L, Woodgett JR (1996) Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells. *Curr Biol* 6:1664-1668.
- Steiner H, Haass C (2000) Intramembrane proteolysis by presenilins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:217-224.
- Steiner H, Fluhrer R, Haass C (2008) Intramembrane proteolysis by gamma-secretase. *J Biol Chem* 283:29627-29631.
- Stoothoff WH, Johnson GV (2005) Tau phosphorylation: physiological and pathological consequences. *Biochim Biophys Acta* 1739:280-297.
- Strack RL, Strongin DE, Bhattacharyya D, Tao W, Berman A, Broxmeyer HE, Keenan RJ, Glick BS (2008) A noncytotoxic DsRed variant for whole-cell labeling. *Nat Meth* 5:955-957.
- Stuart GW, McMurray JV, Westerfield M (1988) Replication, integration and stable germ-line transmission of foreign sequences injected into early zebrafish embryos. *Development* 103:403-412.
- Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, Wiederhold KH, Mistl C, Rothacher S, Ledermann B, Bürki K, Frey P, Paganetti PA, Waridel C, Calhoun ME, Jucker M, Probst A, Staufenbiel M, Sommer B (1997) Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:13287-13292.
- Styren SD, Hamilton RL, Styren GC, Klunk WE (2000) X-34, a fluorescent derivative of Congo red: a novel histochemical stain for Alzheimer's disease pathology. *J Histochem Cytochem* 48:1223-1232.
- Sun X, Sato S, Murayama O, Murayama M, Park JM, Yamaguchi H, Takashima A (2002) Lithium inhibits amyloid secretion in COS7 cells transfected with amyloid precursor protein C100. *Neurosci Lett* 321:61-64.
- Takahashi M, Tomizawa K, Ishiguro K, Takamatsu M, Fujita SC, Imahori K (1995) Involvement of tau protein kinase I in paired helical filament-like phosphorylation of the juvenile tau in rat brain. *J Neurochem* 64:1759-1768.
- Tao W, Evans BG, Yao J, Cooper S, Cornetta K, Ballas CB, Hangoc G, Broxmeyer HE (2007) Enhanced green fluorescent protein is a nearly ideal long-term expression tracer for hematopoietic stem cells, whereas DsRed-express fluorescent protein is not. *Stem Cells* 25:670-678.

- Terwel D, Lasrado R, Snauwaert J, Vandeweert E, Van Haesendonck C, Borghgraef P, Van Leuven F (2005) Changed conformation of mutant Tau-P301L underlies the moribund tauopathy, absent in progressive, nonlethal axonopathy of Tau-4R/2N transgenic mice. *J Biol Chem* 280:3963-3973.
- Thies E, Mandelkow EM (2007) Missorting of tau in neurons causes degeneration of synapses that can be rescued by the kinase MARK2/Par-1. *J Neurosci* 27:2896-2907.
- Tomasiewicz HG, Flaherty DB, Soria JP, Wood JG (2002) Transgenic zebrafish model of neurodegeneration. *J Neurosci Res* 70:734-745.
- Trevarrow B, Marks DL, Kimmel CB (1990) Organization of hindbrain segments in the zebrafish embryo. *Neuron* 4:669-679.
- Tsien RY (1998) The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 67:509-544.
- Urasaki A, Morvan G, Kawakami K (2006) Functional dissection of the Tol2 transposable element identified the minimal cis-sequence and a highly repetitive sequence in the subterminal region essential for transposition. *Genetics* 174:639-649.
- Vale RD (2003) The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* 112:467-480.
- Van Der Zee J, Gijssels I, Pirici D, Kumar-Singh S, Cruts M, Van Broeckhoven C (2007) Frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-positive inclusions: a molecular genetic update. *Neurodegenerative diseases* 4:227-235.
- Villefranc J, Amigo J, Lawson N (2007) Gateway compatible vectors for analysis of gene function in the zebrafish. *Dev Dyn* 236:3077-3087.
- Walhout AJ, Temple GF, Brasch MA, Hartley JL, Lorson MA, van den Heuvel S, Vidal M (2000) GATEWAY recombinational cloning: application to the cloning of large numbers of open reading frames or ORFeomes. *Methods Enzymol* 328:575-592.
- Walter J, Kaether C, Steiner H, Haass C (2001) The cell biology of Alzheimer's disease: uncovering the secrets of secretases. *Curr Opin Neurobiol* 11:585-590.
- Walter J, Grünberg J, Capell A, Pesold B, Schindzielorz A, Citron M, Mendla K, George-Hyslop PS, Multhaup G, Selkoe DJ, Haass C (1997) Proteolytic processing of the Alzheimer disease-associated presenilin-1 generates an in vivo substrate for protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:5349-5354.
- Weder ND, Aziz R, Wilkins K, Tampi RR (2007) Frontotemporal dementias: a review. *Annals of general psychiatry* 6:15.

- Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW (1975) A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* 72:1858-1862.
- Wetzel MK, Naska S, Laliberté CL, Rymar VV, Fujitani M, Biernaskie JA, Cole CJ, Lerch JP, Spring S, Wang SH, Frankland PW, Henkelman RM, Josselyn SA, Sadikot AF, Miller FD, Kaplan DR (2008) p73 regulates neurodegeneration and phospho-tau accumulation during aging and Alzheimer's disease. *Neuron* 59:708-721.
- Winklhofer KF, Tatzelt J, Haass C (2008) The two faces of protein misfolding: gain- and loss-of-function in neurodegenerative diseases. *EMBO J* 27:336-349.
- Wittmann CW, Wszolek MF, Shulman JM, Salvaterra PM, Lewis J, Hutton M, Feany MB (2001) Tauopathy in *Drosophila*: neurodegeneration without neurofibrillary tangles. *Science* 293:711-714.
- Wolfe MS (2009) Tau mutations in neurodegenerative diseases. *J Biol Chem* 284:6021-6025.
- Wolpert L, Beddington R, Brockes J, Jessell T (1999) *Entwicklungsbiologie*. Spektrum, Akad Verl:1-590.
- Wood JG, Mirra SS, Pollock NJ, Binder LI (1986) Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau (tau). *Proc Natl Acad Sci USA* 83:4040-4043.
- Zhang J, Johnson GV (2000) Tau protein is hyperphosphorylated in a site-specific manner in apoptotic neuronal PC12 cells. *J Neurochem* 75:2346-2357.
- Zon LI, Peterson RT (2005) In vivo drug discovery in the zebrafish. *Nat Rev Drug Discov* 4:35-44.

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Christian Haass, der dieses Projekt möglich gemacht und intensiv betreut hat. Er hat mich durch seinen inspirierenden Enthusiasmus und seine wissenschaftlichen Ratschläge sehr unterstützt. Auch die vielen Möglichkeiten, Kurse und Kongresse zu besuchen, haben mich wissenschaftlich und persönlich sehr weitergebracht.

Auch bei Dr. Bettina Schmid möchte ich mich herzlich für die direkte wissenschaftliche Betreuung meiner Doktorarbeit und die erfolgreiche Zusammenarbeit bedanken. Ihre Anregungen für den Fortgang des Projektes, ihre stete Diskussionsbereitschaft und nicht zuletzt die von Ihr aufgebaute Fischanlage waren für den Erfolg des Projektes essentiell.

Außerdem danke ich PD Dr. Konstanze Winklhofer, die diese Arbeit begutachtet und vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten hat. Prof. Dr. Martin Biel, Prof. Dr. Klaus Förstemann, Prof. Dr. Dietmar Martin und Prof. Dr. Christian Wahl-Schott danke ich für die Begutachtung und Prüfung meiner Dissertation.

Dr. Ratan Bhat, Dr. Eva-Maria Mandelkow, Astrid Sydow, Dr. Reinhard Köster und ihren Mitarbeitern danke ich für erfolgreiche Kooperationen.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich der DFG, dem EU Memosad Programm, der Universität Bayern e.V. und dem Elitenetzwerk Bayern.

Bei meinen Kollegen im Fischlabor, Alex Hruscha, Frauke vanBebber, Mathias Teucke, Simone Schätzle und Sunita Shankaran bedanke ich mich herzlich für eine angenehme und interessante Zeit, die tolle technische Unterstützung, und auch für wichtige Hilfestellungen und Diskussionen in wissenschaftlichen Fragen. Bettina, Frauke und Peer-Hendrik Kuhn danke ich außerdem für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Allen Mitarbeitern des Haass-Labors danke ich für die Unterstützung und Beantwortung meiner Fragen, die Beisteuerung guter Ideen und die angenehme, produktive Arbeitsatmosphäre.

Den Mitgliedern des Internationalen Doktorandenprogramms „Protein Dynamics in Health and Disease“ danke ich für interessante wissenschaftliche Diskussionen, aber auch tolle Freizeitaktivitäten und eine lustige Zeit.

Ich bin auch meinem ehemaligen Biologie- und Chemielehrer Horst Kohlert sehr dankbar, dass er mein Interesse für die Naturwissenschaften gefördert hat.

Abschließend möchte ich mich in besonderem Maße bei meinen Eltern und meinen Großeltern für ihr Verständnis, ihre langjährige finanzielle und moralische Unterstützung und ihr großes Interesse an meiner Arbeit bedanken.

Mein größter Dank gilt Daniela.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name:	Dominik Paquet
Geburtstag:	30. Juni 1980
Geburtsort:	Bonn
Staatsangehörigkeit:	deutsch

### Fachliche Ausbildung:

2005 bis 2009	Dissertation im Labor von Prof. Dr. Christian Haass am Adolf-Butenandt-Institut, Abteilung Stoffwechselbiochemie der Ludwig-Maximilians-Universität München
2004 bis 2005	Diplomarbeit im Labor von Dr. Henry Roehl am <i>Centre for Developmental Genetics</i> der <i>University of Sheffield, UK</i> Thema: Die Rolle des FGF abhängigen Transkriptionsfaktors <i>pea3</i> während der Embryonalentwicklung des Zebrafisch <i>Danio rerio</i> .
2001 bis 2004	Hauptstudium im Diplomstudiengang Biologie Eberhard-Karls-Universität Tübingen Schwerpunkte Genetik (Hauptfach), Mikrobiologie, Virologie und Immunologie (freiwilliges Zusatzfach)
1999 bis 2001	Grundstudium im Diplomstudiengang Biologie Eberhard-Karls-Universität Tübingen
1994 bis 1999	Jack-Steinberger-Gymnasium Bad Kissingen Teilnahme und Auszeichnung beim Wettbewerb ‚Jugend forscht‘
1990 bis 1994	Johann-Philipp-von-Schönborn-Gymnasium Münnernstadt
1986 bis 1990	Henneberg-Volksschule Bad Kissingen

## **Publikationen**

Die Ergebnisse dieser Dissertation wurden bereits teilweise in folgender Publikation veröffentlicht:

**Paquet D, Bhat R, Sydow A, Mandelkow E, Berg S, Hellberg S, Fälting J, Distel M, Köster RW, Schmid B, Haass C (2009) A zebrafish model of tauopathy allows in vivo imaging of neuronal cell death and drug evaluation. J Clin Invest 119: 1382-1395.**

Die Publikation befindet sich im Anhang.



# A zebrafish model of tauopathy allows in vivo imaging of neuronal cell death and drug evaluation

Dominik Paquet,<sup>1,2</sup> Ratan Bhat,<sup>3</sup> Astrid Sydow,<sup>4</sup> Eva-Maria Mandelkow,<sup>4</sup> Stefan Berg,<sup>3</sup> Sven Hellberg,<sup>3</sup> Johanna Fälting,<sup>3</sup> Martin Distel,<sup>5</sup> Reinhard W. Köster,<sup>5</sup> Bettina Schmid,<sup>1,2</sup> and Christian Haass<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen (DZNE) and <sup>2</sup>Adolf-Butenandt-Institute, Biochemistry, Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany.

<sup>3</sup>AstraZeneca Research & Development, Södertälje, Sweden. <sup>4</sup>Max-Planck Unit for Structural Molecular Biology at DESY, Hamburg, Germany.

<sup>5</sup>Helmholtz Zentrum München, Institute of Developmental Genetics, Neuherberg, Germany.

**Our aging society is confronted with a dramatic increase of patients suffering from tauopathies, which include Alzheimer disease and certain frontotemporal dementias. These disorders are characterized by typical neuropathological lesions including hyperphosphorylation and subsequent aggregation of TAU protein and neuronal cell death. Currently, no mechanism-based cures are available. We generated fluorescently labeled TAU transgenic zebrafish, which rapidly recapitulated key pathological features of tauopathies, including phosphorylation and conformational changes of human TAU protein, tangle formation, neuronal and behavioral disturbances, and cell death. Due to their optical transparency and small size, zebrafish larvae are well suited for both in vivo imaging and drug development. TAU-induced neuronal cell death was imaged by time-lapse microscopy in vivo. Furthermore, we used this zebrafish model to identify compounds targeting the TAU kinase glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ). We identified a newly developed highly active GSK3 $\beta$  inhibitor, AR-534, by rational drug design. AR-534 reduced TAU phosphorylation in TAU transgenic zebrafish. This transgenic zebrafish model may become a valuable tool for further studies of the neuropathology of dementia.**

## Introduction

Neurodegenerative diseases are the most frequent cause of dementia in our aging society. For these disorders, which include Alzheimer disease (AD) and frontotemporal dementia (FTD), disease-modifying treatments represent a highly unmet medical need. AD and FTD are characterized by posttranslationally modified amyloidogenic proteins, which form neurotoxic oligomers and are finally deposited as insoluble aggregates (1). Examples of the proteinaceous building blocks of these deposits are amyloid  $\beta$  peptide in AD and TAU in AD and FTD (2, 3). The TAU protein is an important target for research and drug development, since its pathological alterations strongly correlate with disease progression in AD and FTD and other neurodegenerative diseases (4) and TAU suppression improves memory function (5). Furthermore, mutations in the TAU-encoding gene microtubule-associated protein TAU (*MAPT*) have been found in patients with FTD with Parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17) (6). One of the first characteristic modifications of TAU is its pathologic phosphorylation at multiple residues, which are dis-

tributed over the whole protein (3, 7). The initial steps, which lead to TAU phosphorylation and subsequent aggregation, were mainly studied in cell culture but are still poorly understood in vivo. These early stages are difficult to investigate in transgenic mice, since it is not feasible to image cells accurately over longer periods during early disease stages (8). Furthermore, vertebrate in vivo models for rapid high-throughput screening for inhibitors of TAU pathology are not available.

Here, we propose the zebrafish as a small vertebrate model of tauopathies and other neurodegenerative diseases. It offers genetic tractability in combination with a translucent embryo allowing imaging of disease progression at cellular and subcellular levels in the living animal. Furthermore, the potential of using small zebrafish embryos for large-scale drug screening has already been demonstrated (9). Large amounts of small fish, which can be analyzed in a 96-well format, can be rapidly produced. Fish are kept in water, which facilitates uptake of substances from the aqueous medium, allowing for automated compound application. In addition, simple readouts of characteristics such as altered mobility and fluorescence or changes in biochemical composition of proteins can be analyzed on a large scale. Moreover, the endothelial blood-brain barrier (BBB) begins to become functional 3 days after fertilization in zebrafish and has a structure similar to that in higher vertebrates, allowing one to test for bioavailability of drugs in the nervous system (10).

We have optimized the transgenic expression of the human protein TAU-P301L (a mutation genetically linked to FTD; ref. 6) in zebrafish neurons by a newly designed Gal4-upstream activating sequence-based (Gal4/UAS-based) vector system, which also great-

**Conflict of interest:** D. Paquet, A. Sydow, E.-M. Mandelkow, M. Distel, R.W. Köster, and B. Schmid declare no conflict of interest. R. Bhat, S. Berg, S. Hellberg, and J. Fälting are employees of AstraZeneca R&D. C. Haass is a consultant for Elan Pharmaceuticals and receives research support from Boehringer Ingelheim KG.

**Nonstandard abbreviations used:** AD, Alzheimer disease; BBB, blood-brain barrier; CDK2, cyclin-dependent kinase 2; dN-GSK3 $\beta$ , dominant-negative *Xenopus* GSK3 $\beta$ -K85R; FTD, frontotemporal dementia; GSK3 $\beta$ , glycogen synthase kinase 3 $\beta$ ; hpf, hours post fertilization; IF, immunofluorescence; IHC, immunohistochemistry; Ins, insert; MCS, multiple cloning site; UAS, upstream activating sequence; WB, Western blot.

**Citation for this article:** *J. Clin. Invest.* 119:1382–1395 (2009). doi:10.1172/JCI37537.





ly facilitates identification of the transgenic fish by a simultaneously expressed fluorescent reporter. We have further advanced the system to allow introduction of various other genes and promoters to facilitate the generation of different zebrafish disease models. In contrast to previous studies (11, 12), we were able to monitor early pathology, including disease-specific hyperphosphorylation and conformational changes of TAU, neuronal and behavioral abnormalities as well as increased neuronal cell death within the first days of embryonic development in stable transgenic zebrafish. The rapid appearance of a pathologic phenotype allows one not only to use the embryos to study disease progression in a transparent vertebrate but also to validate and even screen on a relatively large scale for compounds that modify early phenotypes, such as TAU hyperphosphorylation, *in vivo*.

Hyperphosphorylation of TAU is believed to be a key initiator of detachment of normal TAU from microtubules and subsequent oligomerization and aggregation. Several kinases, including glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), cyclin-dependent kinase 5 (CDK5), ERK2, and microtubule affinity-regulating kinase (MARK), directly phosphorylate TAU and are therefore considered as key therapeutic targets (13). Inhibitors that selectively block these enzymes could therefore be used to slow the progression of disease pathology. Over the last years, selective inhibitors for kinases involved in TAU phosphorylation have been identified, and some of these compounds have even been tested in TAU transgenic mice, where they showed some effects on TAU phosphorylation. The activity of these inhibitors, however, has been hampered by poor water solubility and bioavailability and substantial side effects (13). In addition, large quantities of the compounds are needed, since long-term administration is usually required to observe potential efficacy. Therefore, there is a significant need for technologies that can rapidly and efficiently identify more active and specific compounds with optimized bioavailability in *in vivo* models that represent disease pathology. We have shown previously that novel substances can be developed by structure-based design, which uses crystal structures of proteins, to model small molecules into the active site of the targeted enzyme (14). This approach can deliver inhibitors with excellent potency and specificity. However, it requires validating the bioavailability and selective inhibition of the target molecule in an *in vivo* setting. We have now developed several highly specific inhibitors by structure-based design, which bind to the active site of GSK3 $\beta$  and block the enzyme function with high potency *in vitro*. Two of the best inhibitors were then investigated for their potential efficacy in zebrafish. We demonstrate here for the first time, to our knowledge, that we could reduce the pathologic phosphorylation of the human disease-associated protein TAU *in vivo* in a transgenic zebrafish model by several published GSK3 $\beta$  inhibitors. Furthermore, we tested 2 newly developed highly selective GSK3 $\beta$  inhibitors with potent *in vitro* activity and could show with our model that one of them is also very potent in a whole organism *in vivo*.

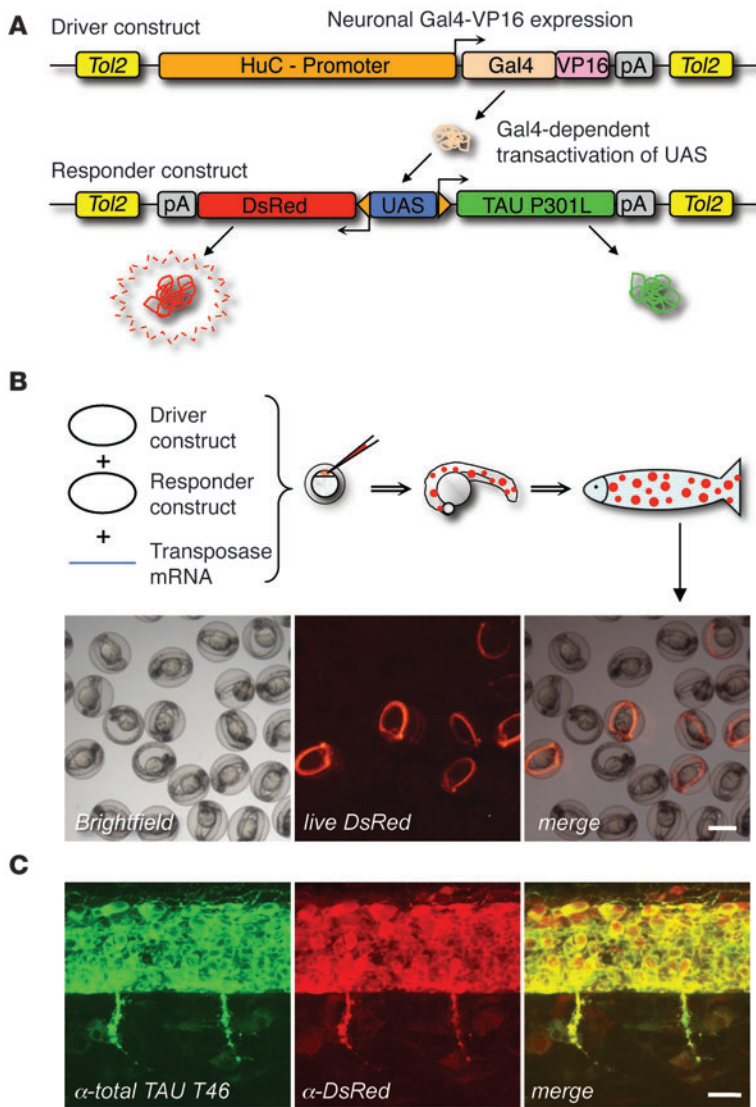
Our study not only provides a small vertebrate model of tauopathies and other neurodegenerative diseases, which can be used to monitor progression of pathology *in vivo*, but also a powerful combination of *in silico* prediction of compounds with *in vivo* validation of their bioavailability in a small transgenic vertebrate disease model. Finally, our newly developed zebrafish transgenesis vectors will allow modeling of numerous human disorders that are based on protein misfolding and overexpression, 2 phenomena often connected to each other (15).

## Results

**A Gal4/UAS-based bidirectional expression system in zebrafish.** The first goal of this study was to generate transgenic zebrafish stably expressing the FTD-associated human protein TAU-P301L (6). Inefficient transgenesis and low protein expression levels have in the past hampered the efficient generation of zebrafish disease models expressing human genes. To overcome these limitations, we have generated vectors that combine several features to increase transgenesis rates and protein levels, facilitate the expression of disease proteins of interest, and allow efficient identification of transgenic lines as well as simultaneous *in vivo* monitoring of pathology and phenotypes. We cloned 2 constructs, Driver and Responder, based on the medaka *Tol2* transposable element (16), which greatly increases the rate of transgenesis (see Methods for details), and integrated the Gal4/UAS expression system (17) into the 2 vectors (Figure 1A). Furthermore, we introduced Gateway recombination sites, which allow rapid introduction of other genes and promoters (18) (see Supplemental Figure 1 for details; supplemental material available online with this article; doi:10.1172/JCI37537DS1). The Driver construct contains the neuronal promoter HuC (19), controlling the expression of a Gal4-VP16 fusion protein, which in turn efficiently transactivates and amplifies protein expression from a UAS on the Responder construct. To achieve transgene expression in 2 orientations, we flanked the UAS sequence with 2 short minimal promoters. In our constructs, this cassette drives the expression of human TAU-P301L in one direction and the expression of the fluorescent reporter DsRed in the other (Figure 1A). This bidirectional expression allows the identification of TAU-expressing cells in live embryos by concomitant DsRed fluorescence.

Transgenic fish were generated by injecting circular Driver and Responder constructs together with *Tol2* transposase mRNA, which is translated into active transposase (a protein not encoded by the zebrafish genome) in embryonic cells to catalyze integration of both constructs into the zebrafish genome for a short period of time (16). Both constructs integrate randomly into a subset of embryonic cells leading to mosaic TAU- and DsRed-expressing embryos. DsRed-positive embryos are raised and outcrossed to wild-type fish. The offspring of founder fish with germ-line transmission can be easily identified, as the embryos express DsRed in mature neurons, making PCR screenings dispensable (Figure 1B). The expression of TAU and DsRed in the transgenic zebrafish fully overlaps, as shown by immunofluorescence (IF) staining using the pan-TAU antibody T46 (20) and DsRed antibodies (Figure 1C).

We raised 76 injected founder fish to sexual maturity and identified 15 (19.7%) with DsRed-positive offspring. We analyzed 3 generations descending from 1 of the founder fish for genetic inheritance by counting DsRed-negative and -positive embryos and always found about one-fourth of the offspring to be DsRed positive, implying that these embryos carry Driver and Responder constructs (Supplemental Figure 2A). This ratio indicates independent inheritance of both constructs, with single or multiple insertions at 2 different genomic loci. We verified this by analyzing 225 embryos of an F2 outcross by PCR for Driver and Responder genotypes (Supplemental Figure 2B). In addition, the embryos showed stable protein levels and expression domains over 3 generations (Supplemental Figure 2C), indicating stable inheritance and activity of the Gal4/UAS transgene. Finally, we did not observe any morphological alterations in the transgenic fish (data not shown) and also excluded alterations in the function of the zebrafish BBB (for details see Supplemental Figure 3).



**Figure 1**

A Gal4/UAS-based bidirectional expression system in zebrafish. **(A)** The Driver construct contains the neuronal zebrafish promoter HuC driving the expression of Gal4-VP16, which binds to the UAS on the Responder construct. Here, it activates the bidirectional expression of hTAU-P301L and DsRed via the minimal promoters. UAS-dependent gene expression of TAU and DsRed is indicated in living fish by DsRed fluorescence. Driver and Responder constructs are flanked by *Tol2* transposon sites. **(B)** To generate transgenic fish, the Driver and Responder constructs were mixed and injected together with *Tol2* mRNA. The mRNA is translated to active transposase, which detects the flanking *Tol2* elements and catalyzes random integration into the zebrafish genome in a subset of embryonic cells for a short time period, generating mosaic founder embryos. Mosaic DsRed-positive larvae were raised and outcrossed with wild-type fish. A subset of the offspring will be transgenic and can be easily identified and sorted by DsRed-positive neurons. Scale bar: 1 mm. **(C)** Double immunostainings for total TAU (T46 antibody) and DsRed of 32-hpf transgenic zebrafish embryos expressing hTAU-P301L and DsRed. Transgenic embryos express both hTAU-P301L and DsRed in spinal cord neurons, showing effective bidirectional expression from the Responder construct. Lateral views of the trunk above the end of the yolk extension, anterior to the left. Scale bar: 20  $\mu$ m.

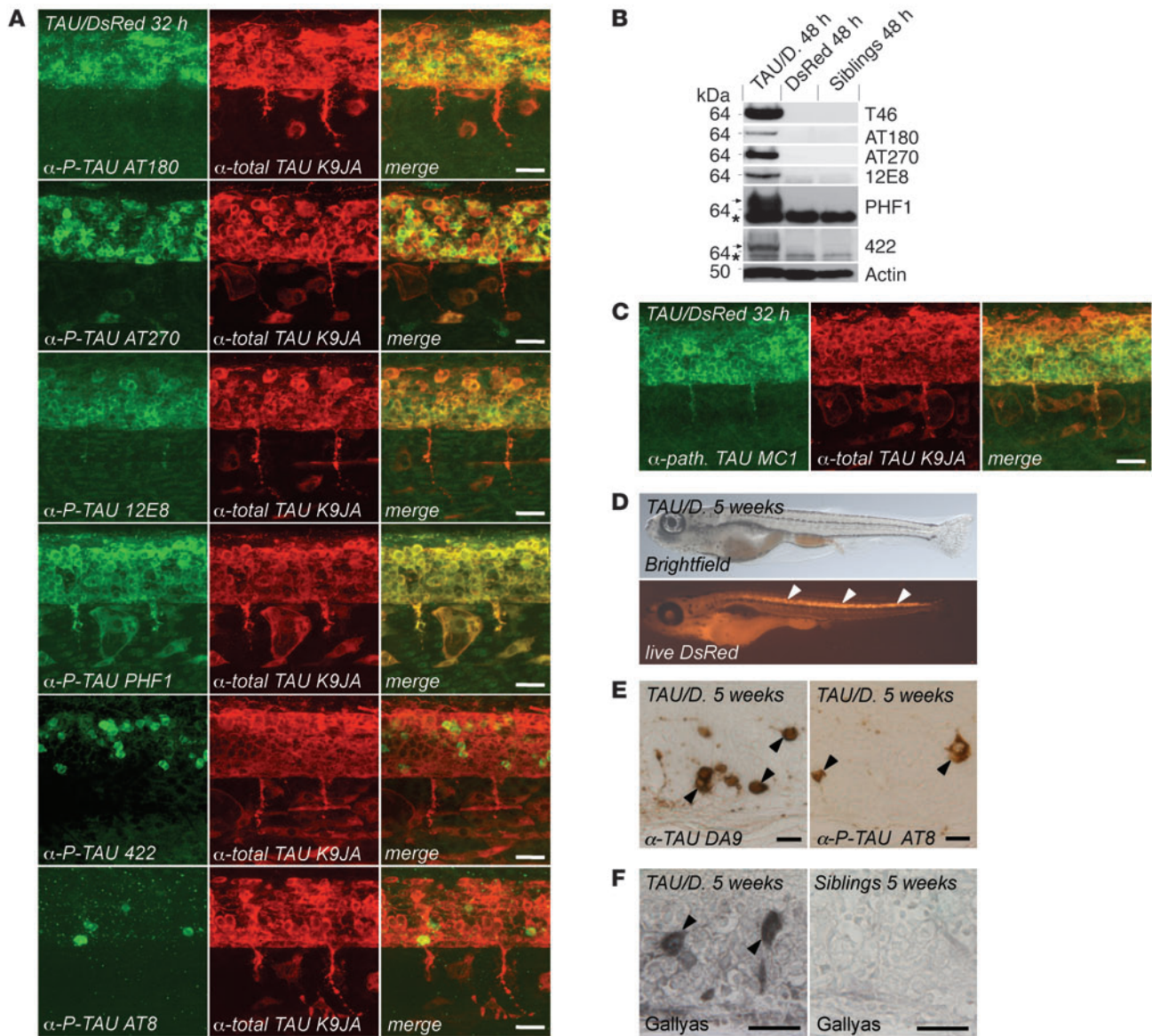
*The transgenic zebrafish rapidly develop disease-specific alterations.* Phosphorylation of TAU at certain serine and threonine residues serves as a biochemical marker for pathologic alterations in AD and FTD (3, 7). We therefore determined whether and when the TAU transgenic fish recapitulate this hallmark of disease progression. Strikingly, in embryos that were only 32 hours old, we could already detect positive immunoreactivity in spinal cord neurons with the antibodies AT180 (21), AT270 (21), 12E8 (22), PHF1 (23), 422 (24), and AT8 (25), which specifically detect abnormally phosphorylated residues T231/S235, T181, S262/S356, S396/S404, S422, and S202/T205, respectively (Figure 2A). These findings were corroborated by immunoblots of lysates from 48-hour-old transgenic and nontransgenic fish. The pan-TAU antibody T46 reveals a broad band around 64 kDa, which corresponds to the largest CNS TAU isoform in a mixed state of phosphorylation. Human TAU was also recognized by antibodies against phosphorylated epitopes that are typically elevated in AD (AT180, AT270, 12E8, PHF1, and 422) (Figure 2B).

In addition to pathologic hyperphosphorylation, TAU also changes its conformation during disease progression (26), which finally culminates in aggregation and formation of tangles. The early con-

formational changes can be monitored by immunostaining using antibody MC1, which is specific for a pathologic conformation of TAU (26). Strikingly, we already found MC1-positive TAU in neurons of 32-hour-old embryos, again demonstrating rapid occurrence of AD- and FTD-like pathology in our transgenic zebrafish model (Figure 2C). We also determined whether and when these changes to pathologic conformation led to the formation of tangles and therefore analyzed later stages. In 5-week-old fish, which are still quite transparent, we could not only observe the expression of the DsRed transgene in living fish (Figure 2D) but also depict TAU-expressing cells with the pathologic AT8 epitope in immunohistochemical stainings (Figure 2E) and Gallyas silver-positive tangles (Figure 2F) in paraffin sections of spinal cord tissue. To demonstrate specificity of the stainings, we also stained control transgenic lines, which express DsRed only, and nontransgenic siblings. No cross-reactivity in neurons was observed (Figure 2F and Supplemental Figure 4).

*Rapid progression of AD/FTD-like late-stage pathology in TAU transgenic fish.* We have observed remarkable differences in the amount of TAU-expressing cells, which are stained by early pathology-marking antibodies, such as AT180, AT270 and 12E8, versus late markers, such as



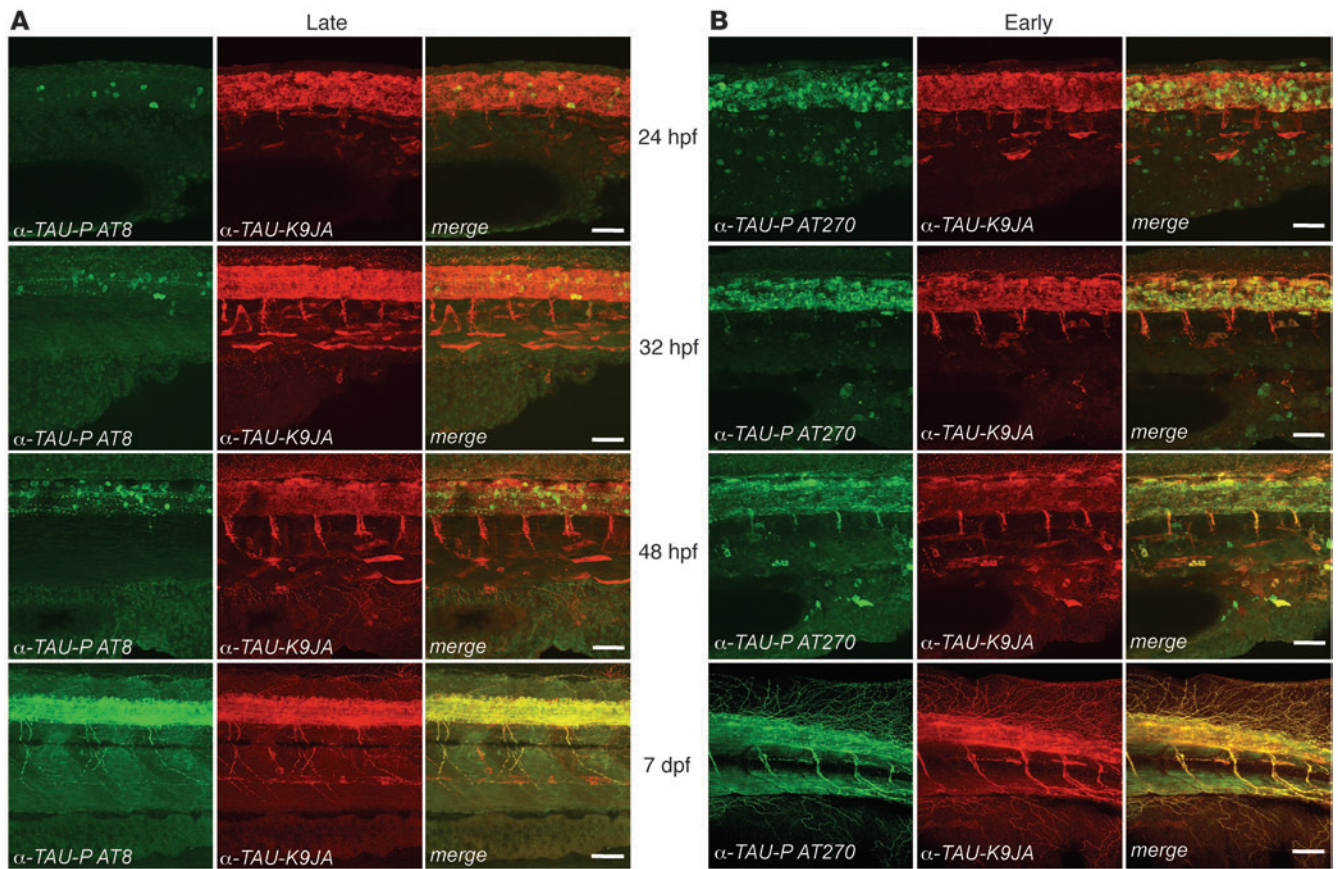


**Figure 2**

Expression of hTAU-P301L induces rapid pathological hyperphosphorylation, conformational changes, and aggregation of TAU in transgenic zebrafish. **(A)** Double whole-mount immunostainings for phosphorylated and total TAU of 32-hour-old transgenic zebrafish embryos expressing hTAU-P301L and DsRed. TAU is phosphorylated in spinal cord neurons at residues Thr231/Ser235 (AT180), Thr181 (AT270), Ser262/Ser356 (12E8), Ser396/Ser404 (PHF1), Ser422 (422), and Ser202/Thr205 (AT8). **(B)** WBs of total and phosphorylated TAU of 48-hour-old transgenic zebrafish embryos expressing hTAU-P301L and DsRed or DsRed alone or nontransgenic siblings. Phosphorylated TAU is only detected in TAU/DsRed transgenic embryos. No cross-reacting bands are detectable in controls at the same molecular weight. In addition to the specific band above 64 kDa (arrow) in TAU-positive embryos, antibodies PHF1 and 422 detect a nonspecific band at lower molecular weight in all embryos (asterisk). **(C)** TAU changes its conformation to a pathologic state, as shown in whole-mount immunostainings, by using the conformation-specific antibody MC1, in most neurons of 32-hour-old embryos expressing the TAU transgene. **(D)** Side views of 5-week-old living zebrafish in bright field and DsRed illumination. The fish are still rather translucent, and the transgene-expressing cells can be detected by their red fluorescence (arrowheads). **(E)** Immunohistochemical stainings of spinal cord paraffin sections of the same 5-week-old TAU transgenic zebrafish for total TAU (antibody DA9) and pathologically phosphorylated TAU (AT8) (arrowheads). **(F)** In addition, tangles are observed by Gallyas silver staining in sections of the same 5-week-old TAU transgenic zebrafish (arrowheads). Scale bars: 20  $\mu$ m.

422 and AT8, in 32-hour-old transgenic zebrafish. While the epitopes that are detected by early marker antibodies are present in most TAU-expressing cells, the signals of the late markers can only be found in a small subset of neuronal cells (Figure 2A). This observation raises the question of whether there is a progression to advanced pathology

that these immunopositive neurons have already reached in contrast to the surrounding neurons and whether other neurons will follow later. To monitor progression of the pathological AT8 immunoreactivity, we compared the number of positive neurons in 24-hour-old, 32-hour-old, 48-hour-old, and 7-day-old embryos from a single trans-



**Figure 3**

Rapid progression of AT8-positive late-stage FTD/AD-like pathology in transgenic embryos. **(A)** Double whole-mount immunostainings for TAU phosphorylated at the AT8 epitope (a late marker of pathology) and the AT270 epitope (an early marker) together with staining by antibody K9JA, which shows expression of total TAU in 24-, 32-, and 48-hpf and 7-day-old transgenic zebrafish embryos. There are very few AT8-positive neurons in the spinal cord of 24-hour-old embryos, while this number increased significantly in 32-hour-old embryos and rose even further in 48-hour-old embryos. Finally, all TAU-expressing neurons contained the AT8 epitope in 7-day-old larvae. **(B)** In contrast, immunoreactivity of the early marker AT270 was already strong in many TAU-expressing cells at 24 hpf and became only slightly stronger at older stages. The level of total TAU detected in the same embryos by double staining with the K9JA antibody was similar between 24 hpf and 32 hpf. After 48 hours, a substantial part of TAU was transferred to the neuronal projections. In contrast, AT8-positive TAU remained mainly in the cell bodies. The AT8-positive somata combined with a lack of strongly AT8-positive neuronal projections is consistent with the pathological accumulation of modified TAU in neuronal cell bodies of patients. Lateral views of the trunk above the end of the yolk extension, anterior to the left. Scale bars: 50  $\mu$ m.

genic line, with comparable levels of transgene expression. We could indeed observe a rapid and robust increase in AT8-positive neurons over this short period of time (Figure 3A). This was not the case for AT270-positive cells (Figure 3B).

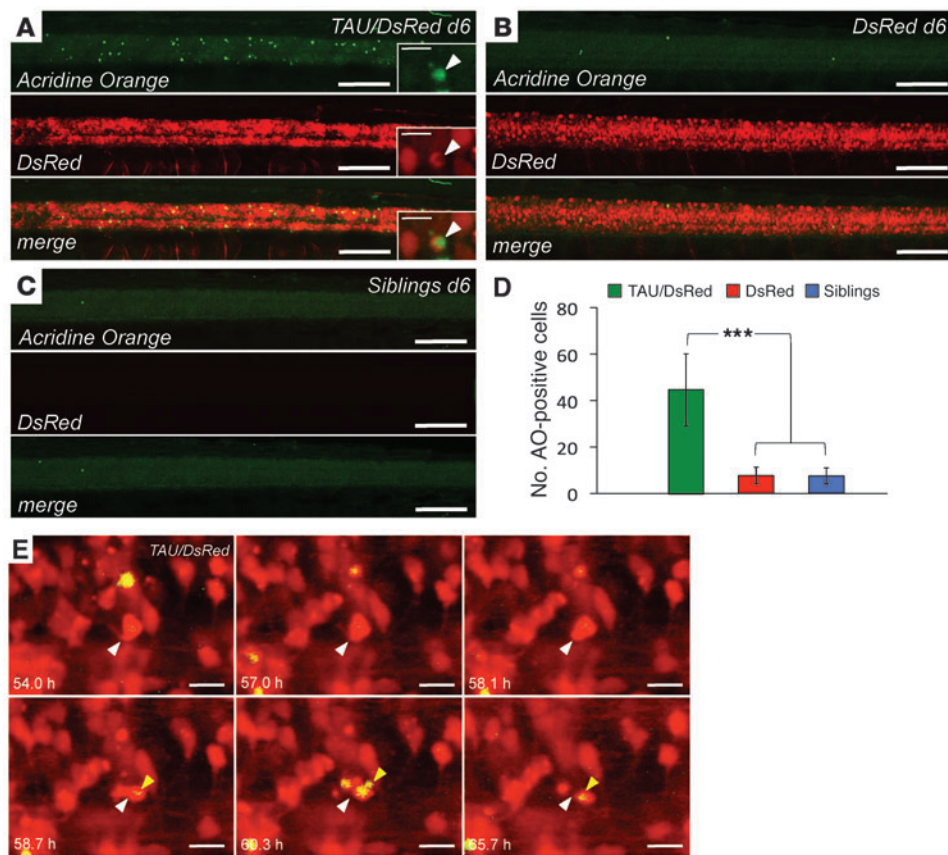
*Increased cell death in hTAU-expressing zebrafish neurons.* Neuronal cell death is the ultimate reason for the neurological deficits of AD and FTD patients. We have therefore engaged in analysis to determine whether neurons indeed degenerate when TAU is expressed in transgenic zebrafish. Cell death can be monitored in living fish by incubation in acridine orange (27), a dye that stains nucleic acids in dying cells. We have compared 6-day-old fish expressing TAU/DsRed to DsRed only-expressing fish and nonexpressing siblings. Strikingly, we could detect a significant increase of cell death in the whole spinal cord of TAU-expressing fish, as compared with both controls (Figure 4, A–D).

To analyze neurodegeneration in more detail and to demonstrate the suitability of zebrafish larvae to study cellular processes in a whole living animal *in vivo*, we monitored the neurodegeneration in TAU

transgenic fish by confocal time-lapse imaging. We recorded neurons in the spinal cord that express DsRed over a period of 12 hours (typical examples of still images are shown in Figure 4E; see also Supplemental Video 1) and searched for dying cells by monitoring uptake of acridine orange. An intact neuron in the field of view first altered its shape and started to round up (54.0 to 58.1 hours post fertilization [hpf]). Subsequently, this cell fragmented and took up acridine orange, indicating a breakdown of the cellular membranes (58.1 to 60.3 hpf), and eventually began to disappear (60.3 to 65.7 hpf). To our knowledge, this is the first demonstration of *in vivo* cell death imaging in the field of neurodegeneration.

*Expression of hTAU-P301L causes neuronal and behavioral abnormalities.* It has been previously demonstrated that elevation of TAU leads to inhibition of intracellular transport with toxic consequences, which are particularly pronounced in long-projecting motoneurons (28, 29). This is accompanied by elevated pathologic phosphorylation. To investigate abnormalities in neuronal morphology, we stained TAU transgenic fish and control fish with antibody znp1, which labels



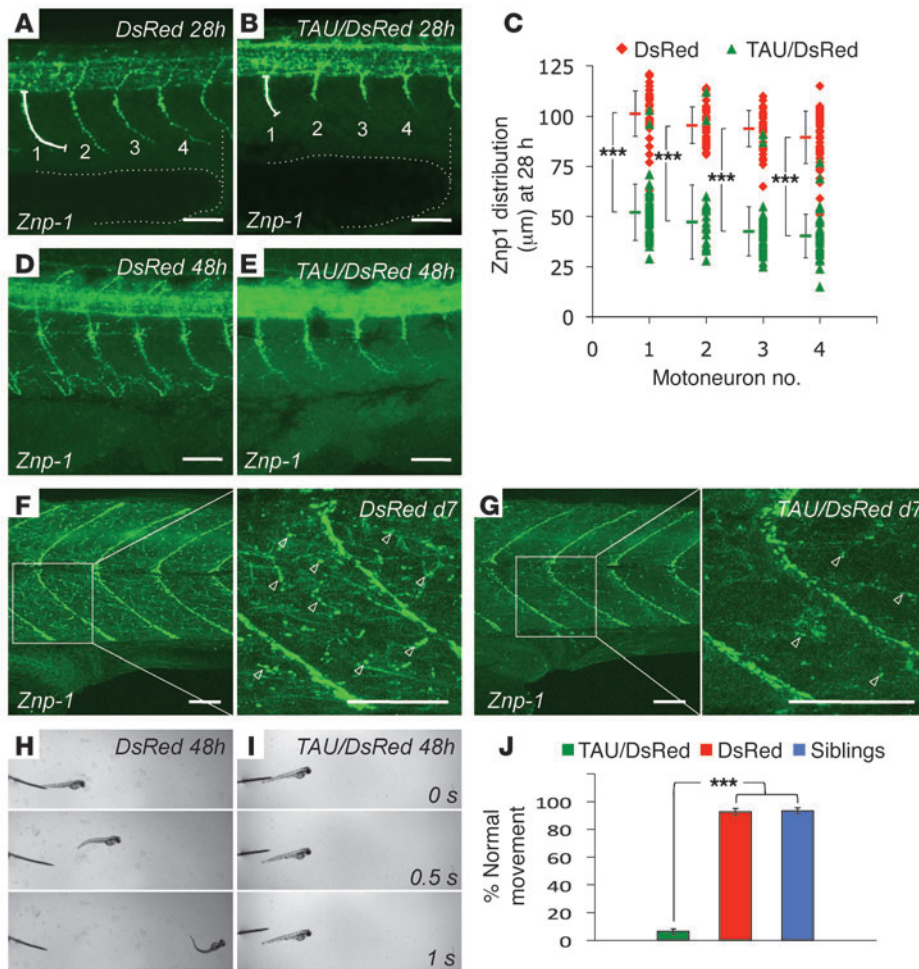


**Figure 4**  
 In vivo imaging of neuronal cell death in TAU-expressing zebrafish. (A–D) Side views of 6-day-old living zebrafish larvae expressing TAU/DsRed (A, see single acridine orange–positive neuron in inset, depicted by arrowhead), only DsRed (B), or no transgene (siblings, C) stained with acridine orange. TAU-expressing fish show substantial cell death while DsRed-expressing and nontransgenic fish show only a low, basal amount of dying cells (quantified in D). AO, acridine orange. Data represent mean ± SD. \*\*\**P* < 0.01. Scale bars: 100 μm; 10 μm (insets). (E) Still images of several time points of a time-lapse video, showing a close-up of TAU-expressing neurons in the spinal cord of transgenic zebrafish, which were stained with acridine orange. An intact neuron (white arrowhead) with an axon first changes its shape and rounds up. Subsequently, fragmentation and uptake of acridine orange is observed (yellow arrowhead; see also Supplemental Video 1). Scale bars: 10 μm.

the synaptic protein synaptotagmin in extending axons of all primary motoneurons (30, 31). We measured the length of the first 4 outgrowing caudal primary (CaP) motoneurons anterior to the end of the yolk extension, which leave the spinal cord ventrally and grow around the muscle in a stereotypic, time-dependent manner as judged by synaptotagmin (*znp1*) staining (32). The length of the developing motoneurons, in which synaptotagmin is present, is substantially shorter at 28 hpf in TAU transgenic fish (Figure 5, A–C). In a later stage at 48 hpf, distribution of synaptotagmin is still altered (Figure 5, D and E), although the projections have grown further. Seven-day-old larvae are able to swim and catch food (data not shown). On the cellular level, the motoneurons in both control and TAU fish have grown around the muscle to the midline (Figure 5, F and G); however, the fine projections to the muscle are still reduced in the TAU transgenic fish in comparison with controls.

Consistent with the altered motoneuron morphology, we observed behavioral deficits, such as slow or absent movement in most of the larvae at 48 hpf, an age at which a stereotypic escape response behavior can be evoked by applying a touch stimulus to the animals. We have collected pools of transgenic fish expressing high levels of TAU/DsRed and quantified the escape response of 50 randomly picked individual larvae at 48 hpf. While most transgenic DsRed only–expressing fish with comparable expression levels or nontransgenic fish responded to a touch stimulus at the dorsal tip of the tail with a stereotypic escape response, most TAU-expressing fish show a significantly reduced or even absent response (Figure 5, H, I, and J; see also Supplemental Video 2). We hypothesize that the motoneuron defect is the reason for the observed movement deficits at this age.

*Generation of potent GSK3β inhibitors by structure-based design.* Our transgenic zebrafish rapidly recapitulated key disease markers for tauopathies, including hyperphosphorylation. We therefore determined whether our fish would be a useful tool for developing compounds that could delay or stop the pathology of tauopathies. To identify inhibitors of TAU kinases by structure-based design, we refined a previously described approach (14) and found approximately 2000 actives in a high-throughput screening campaign against the human GSK3β enzyme. The actives were confirmed for dose response and encompassed hits from multiple chemical series. Several compounds from the pyrazine chemical series were cocrystallized with the GSK3β protein. Data from x-ray analysis of the binding of the inhibitors within the ATP pocket of the GSK3β protein led to the optimization of potency and selectivity of the pyrazines. Since CDK2 is the closest homolog to GSK3β, we optimized for CDK2 selectivity aided by structure-based design. By optimizing against CDK2, pan-kinase selectivity (27 kinases) was also obtained. This understanding of structural activity relationships subsequently led to the design of potent and selective GSK3β inhibitors AR-164 and AR-534 (Figure 6, A–C). AR-164 and AR-534 inhibit recombinant human GSK3β with Ki values (the concentration of inhibitor that reduces the formation speed of the metabolite by 50% at low substrate concentration) of 8.9 nM and 2 nM respectively. In contrast, AR-164 and AR-534 do not significantly inhibit CDK2/cyclin E (Kis of 1440 nM and 100 nM, respectively), demonstrating at least a 50-fold selectivity versus CDK2. Both inhibitors were cell permeable. The permeability coefficients, which were determined in Caco2 cells and in an in vitro BBB assay, were 11 × 10<sup>−6</sup> cm/s and 3.9 × 10<sup>−3</sup> cm/min, respectively, for AR-164 and 20 × 10<sup>−6</sup> cm/s and



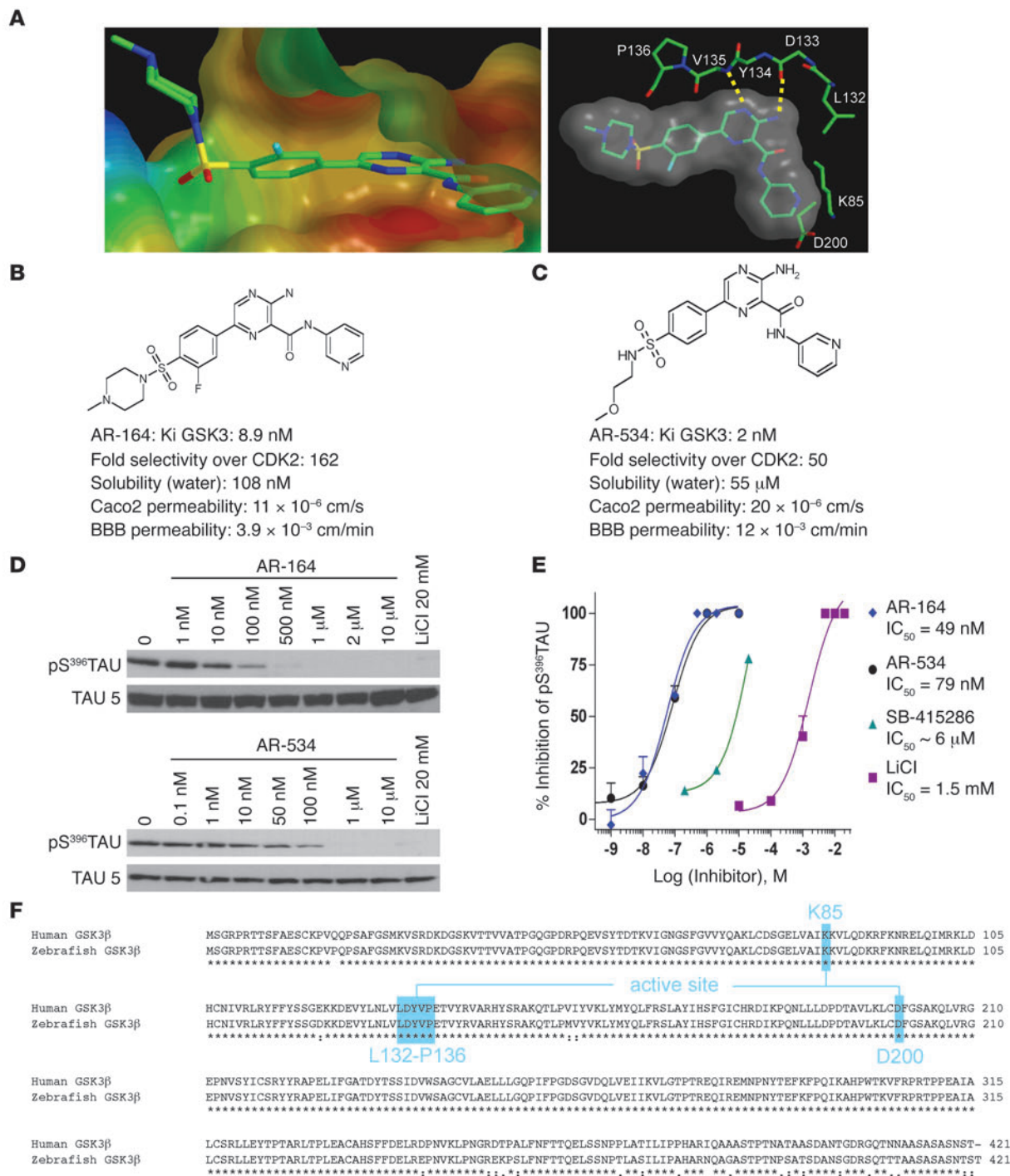
**Figure 5**

Expression of hTAU-P301L causes abnormalities in neuronal morphology and behavior. (A–G) Whole-mount immunostainings for *znp1*, which labels synaptotagmin in the extending axons of primary motoneurons. Expression of TAU causes a dramatically reduced extension of *znp1*-positive motoneurons already at 28 hpf (A and B). The difference in motoneuron length is quantified (C) by measuring the length of the first 4 *znp1*-stained motoneuron projections (marked 1, 2, 3, 4 in A and B) before the end of the yolk extension (marked by dotted line). Triangles and diamonds represent values from individual motoneurons; colored horizontal lines represent mean ± SD. \*\*\**P* < 0.01. In 48-hour-old embryos, the motoneurons have grown further in both TAU fish and controls, but the motoneuron extensions are still reduced (D and E). 5 days later, the motoneurons have grown around the muscle in both TAU fish and controls (F and G). The fine projections of motoneurons (see enlarged insets, arrowheads), are still highly reduced in TAU transgenic fish. Lateral views of the trunk above the end of the yolk extension, anterior to the left. Scale bars: 50 μm. (H–J) The stereotypic escape response, which is normal in DsRed-expressing (H) and nontransgenic larvae at 48 hpf (data not shown), is highly reduced or absent in TAU-expressing larvae (I; see also Supplemental Video 2). The phenotype was quantified in groups of 50 TAU/DsRed versus DsRed transgenic larvae, which were pooled from several clutches and selected for strong and comparable DsRed expression (J). Error bars represent mean ± SD; \*\*\**P* < 0.01.

12 × 10<sup>-3</sup> cm/min respectively for AR-534 (Figure 6, B and C). These data suggest that the bioavailability of AR-534 in the brain is most likely higher than that of AR-164. Both AR-164 and AR-534 inhibit the phosphorylation of TAU at Ser396 in a dose-dependent fashion in 3T3 fibroblasts engineered to stably express 4-repeat TAU protein, exhibiting IC<sub>50</sub> values of 49 nM and 79 nM, respectively (Figure 6, D and E). Effects were compared with those of the previously published GSK3 inhibitors SB-415286 (33) and lithium chloride, which exhibited IC<sub>50</sub> values of 6 μM and 1.5 mM, respectively, in our assay. Although AR-164 and AR-534 potently block phosphorylation of human TAU expressed in cell culture and display a sufficiently good BBB permeability in our in vitro test, this does not necessarily predict that the compounds are also active in a whole organism. Vali-

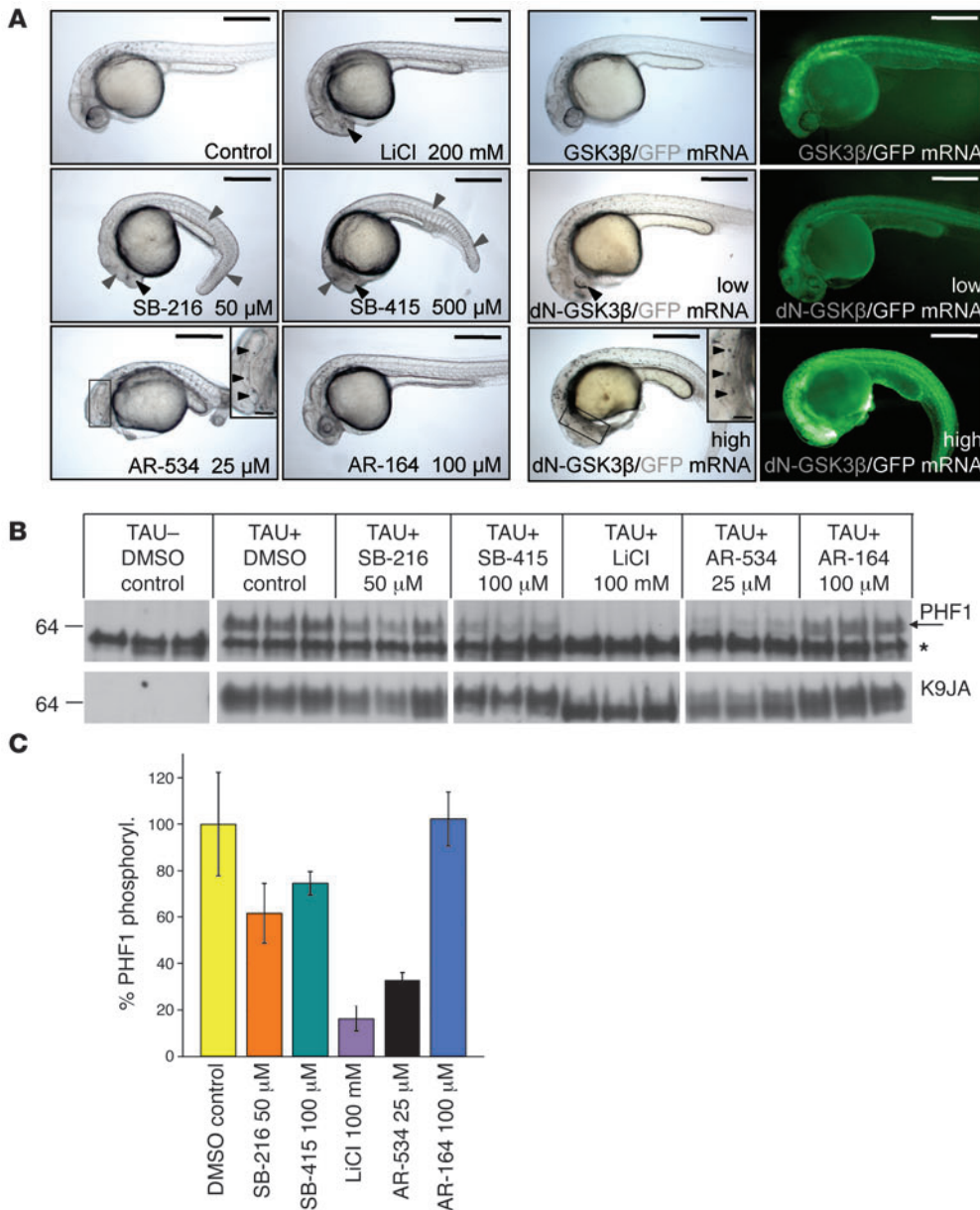
dating the in vivo activity of the inhibitors in TAU transgenic mice, which were the only available vertebrate models of tauopathies so far, is an expensive and time-consuming process and not amenable to high-throughput screening for optimizing compounds for determining structural activity relationships. We have therefore studied the conservation of the targeted enzyme in zebrafish, in which drug screening would be more feasible, and found that GSK3β is highly conserved, with over 90% identity at the amino acid level (Figure 6F). Furthermore, the residues of the active site, which interact with our inhibitors, are completely identical. This high conservation to the human GSK3β kinase allows using the zebrafish as a model to validate the in vivo activity of GSK3β inhibitors and helps to further develop this lead structure.





**Figure 6**

Chemical structure, design, and characteristics of GSK3 inhibitors AR-164 and AR-534. **(A)** Left panel shows surface representation of the x-ray structure of GSK3 $\beta$  with inhibitor AR-164 in the active site. Polar areas are colored blue and lipophilic areas red. The methylpiperazine sulfone amide extends out toward the solvent area. Right panel shows top view of the active site of GSK3 $\beta$ . Dotted yellow lines represent hydrogen bonds between the protein backbone and AR-164. The 6-membered aromatic pyrazine moiety binds together with its anilino function to the backbone of the kinase. The pyridine ring binds to the conserved salt bridge formed by Lys85 and Asp200 (x-ray resolution: 2.47 Å). AR-534 binds in a similar way (not shown). **(B and C)** Chemical structure of AR-164 and AR-534 and compound characterization values including Ki (mean from 3 independent experiments performed in duplicate), selectivity over CDK2, solubility and permeability coefficient Pe (cm/min) over cell membranes (Caco2 cells), and BBB. **(D)** AR-164 and AR-534 inhibit pSer396 TAU phosphorylation in 3T3 fibroblasts harvested at 4 hours after treatment in comparison with total TAU, as analyzed by quantitative WB. **(E)** Graphical representation with IC<sub>50</sub> values of AR-164 and AR-534 effects on inhibition of TAU phosphorylation compared with SB-415286 and LiCl. **(F)** Alignment of protein sequences of human and zebrafish GSK3 $\beta$ . Over 90% of the amino acids are identical; the residues in the active site of the enzyme, which interact with the inhibitors, are completely conserved.



**Figure 7**

GSK3 inhibitors phenocopy a genetic loss of GSK3β and reduce pathologic hyperphosphorylation of TAU in vivo. **(A)** GSK3 inhibitors have specific effects on early wild-type zebrafish development when treatment occurs between 4 and 24 hpf. LiCl treatment caused strongly reduced eye formation (black arrowheads), while SB-216763 and SB-415286 also perturbed formation of brain, somites, and tail (gray arrowheads). In addition to these phenotypes, AR-534 also caused multiple ear formation (arrowheads in enlargement). In contrast, AR-164, which has in vitro activity comparable to that of AR-534, did not cause any detectable change in phenotype even at 4-fold concentration. Embryos injected with dN-GSK3β mRNA to suppress the function of endogenous GSK3β phenocopied alterations of compound-treated fish; however, only AR-534 was potent enough to phenocopy the ear multiplication seen in embryos expressing high levels of dN-GSK3β (arrowheads in enlargement). Embryos injected with wild-type GSK3β did not display a phenotype at comparable mRNA concentrations. Scale bars: 500 μm; 100 μm (insets). **(B)** GSK3 inhibitors reduce pathologic TAU phosphorylation in vivo when applied to TAU transgenic fish between 20 and 100 hpf. Phosphorylated TAU was detected by WB using antibody PHF1 and normalized to total TAU (K9JA). The band intensities were compared with a DMSO control on the same gel. The upper specific PHF1-band (arrow) was quantified. As already shown in Figure 2, the lower PHF1 band was unspecific (asterisk). **(C)** Quantification of WB band intensities of phospho-specific TAU as a percentage of the total amount of TAU detected by K9JA shown in **B**.

*Potent in vivo effects of a newly developed GSK3β inhibitor.* After demonstrating that the TAU transgenic zebrafish display a number of pathological symptoms that are diagnostic for tauopathies, we used the fish to investigate in vivo 2 known GSK3 inhibitors, SB-216763

and SB-415286 (33), as well as our 2 newly developed compounds, AR-534 and AR-164, which have a strong and selective inhibitory activity on GSK3β in vitro (see Figure 6). In addition, we treated transgenic fish with LiCl as described (34), as a positive control.





To evaluate whether the compounds affect zebrafish Gsk3 $\beta$  activity, we first treated wild-type zebrafish embryos between 4 and 24 hpf and examined their developmental phenotype. GSK3 $\beta$  is a component of the canonical Wnt pathway that is required for many early patterning events in the developing vertebrate embryo. Disturbances of this pathway therefore lead to characteristic developmental defects (35). LiCl treatment caused strongly reduced eye formation, as previously described (36), while SB-216763 and SB-415286 also perturbed the normal formation of brain, somites, and tail in addition to the eye phenotype (Figure 7A). The inhibitor AR-534 had an even more drastic effect on the fish, causing multiple ear formation in addition to the described phenotypes. In contrast, AR-164, which has a comparable *in vitro* activity to AR-534, did not cause any detectable phenotype even at 4-fold higher concentration (Figure 7A). To compare the efficiency of the inhibitors and the specificity of the evoked phenotypes with a genetic loss of the endogenous enzyme function, we injected mRNA encoding dominant-negative *Xenopus* GSK3 $\beta$ -K85R (dN-GSK3 $\beta$ ), which is over 92% identical to zebrafish Gsk3 $\beta$ , into zebrafish eggs. To monitor dose-dependent effects, we coinjected dN-GSK3 $\beta$  mRNA and GFP mRNA and used GFP fluorescence to select embryos with lower or higher protein expression. Strikingly, embryos expressing lower amounts of dN-GSK3 $\beta$  phenocopied the eye loss, which was also observed in embryos treated with SB-216763 and SB-415286 and LiCl, whereas only the embryos expressing higher amounts also phenocopied the multiple ear formation monitored in AR-534-treated embryos (Figure 7A). This result indicates that AR-534 has the highest specific *in vivo* efficacy of all compounds used in this study. Similar to  $\gamma$ -secretase inhibitors, which cause very profound defects in Notch signaling during early development of zebrafish (37), such inhibitors may only be used during late adulthood when FTD and AD develop, thus excluding their negative effects on embryonic development. To confirm that treatment of larvae at later stages does not cause deleterious developmental problems but reduces pathologic TAU phosphorylation *in vivo*, we now treated TAU transgenic fish for 3 days starting at 20 hpf, after early development was completed. Treatment starting at this time point did not cause any major morphological phenotype to the larvae (data not shown). After the treatment period, embryos were lysed and subjected to quantitative Western blot (WB) analysis, in which the levels of phosphorylated TAU were normalized to total TAU to exclude differences in expression levels or gel loading. SB-216763 and SB-415286 reduced phosphorylation of TAU at the disease-specific PHF1 epitope by 30% to 40%, a low activity in comparison with the nonspecific inhibitor LiCl, which reduces phosphorylation by nearly 90% when used at high concentration (Figure 7, B and C). AR-534 was more potent than the existing specific inhibitors SB-216763 and SB-415286 and reduced TAU phosphorylation by 70% (Figure 7, B and C). In contrast to the other inhibitors, AR-164 did not show any inhibitory activity on TAU phosphorylation *in vivo* (Figure 7B), which is consistent with both its lack of activity on early development and the lower penetrability in the *in vitro* BBB screen, as shown in Figure 6. We conclude that, consistent with its activity on early zebrafish development, AR-534 is also the most potent specific inhibitor of GSK3 $\beta$ -mediated TAU phosphorylation.

## Discussion

We provide a newly developed technology approach for the fast and efficient generation of transgenic zebrafish to study human diseases resulting from protein misfolding and/or overexpression

and to optimize promising drug candidates *in vivo*. The generation of transgenic zebrafish overexpressing high levels of human proteins has so far been rather difficult. We have overcome these limitations with the efficient *Tol2* transposon and Gal4/UAS-based expression of human TAU-P301L in transgenic zebrafish. In contrast to previous studies (11, 12), we could monitor early pathology, including disease-specific hyperphosphorylation and conformational changes of TAU as well as neuronal and behavioral abnormalities within the first 2 days of embryonic development in stable transgenic zebrafish. Furthermore, the larvae developed substantial neurodegeneration after a few days. These phenotypes appear much more rapidly in our fish model than in the existing mouse models, although zebrafish kept under laboratory conditions live as long as 3 to 5 years (38), which is comparable to laboratory mice (39). Importantly, this early pathology is crucial to fully exploit all advantages of the zebrafish system, such as optical clarity and ease of manipulation. The similarity of the evoked phenotypes to human disease is completed by the appearance of neurofibrillary tangles after 5 weeks, validating our fish as a well-suited model for tauopathies *in vivo*.

We expect the transgenic zebrafish to become a valuable model system for gaining further insights into the pathology of dementias by exploiting the unmatched potential for the analysis of cellular processes in the living organism, which the zebrafish offers in contrast with other vertebrate models. Although living cells can also be monitored in transgenic mice, experiments in the zebrafish can be performed in a noninvasive way in much higher spatial and temporal resolution. Whole-cell imaging of neurons comprising somata and projections can be done in embryos and larvae over several days without removing the specimen from the microscope (40). Since FTD-like pathology can be detected already after 1 to 2 days for early and late disease markers and this pathology progresses rapidly, we can monitor disease progression in a compressed timescale in young zebrafish embryos and larvae, which are perfectly suited for *in vivo* imaging of neurons due to their optical transparency. In fact, confocal imaging even allowed us to follow neuronal cell death *in vivo*. To our knowledge, this is the first demonstration of *in vivo* cell death imaging in the field of neurodegeneration. Moreover, neurons can be imaged in their natural environment together with neighboring cell types such as astroglia, oligodendrocytes, and microglia, which have been shown to participate in the pathology of several neurodegenerative diseases (1). These important environmental influences are not faithfully recapitulated in tissue explants or primary cell culture. The early phenotypes allow testing for possible genetic modifiers of pathology *in vivo* through transient overexpression of wild-type or dominant-negative forms of proteins by DNA or RNA injection or downregulation mediated by injection of antisense oligonucleotides.

The rapid appearance of pathologic phenotypes allows use of the transgenic zebrafish larvae not only to image and understand disease processes in a living animal but also to validate and even screen on a relatively large scale for compounds that modify the pathology *in vivo*. The hyperphosphorylation of TAU, which our fish model develops within 32 hours after fertilization, is believed to be a key initiator of detachment of normal TAU from microtubules and subsequent oligomerization and aggregation. Preventing this phosphorylation by blocking the involved kinases could potentially slow further progression of pathology and thus be an efficient treatment option for AD and FTD (13). We have developed compounds that bind to the active site of GSK3 $\beta$  and effectively block enzyme activity. The identifica-



tion of potent cell-permeable kinase inhibitors with *in vivo* efficacy is a key component of the drug discovery process. With the use of rational drug design, optimization of the pyrazine chemical series led to the identification of several GSK3 inhibitors. We demonstrated by *in vitro* studies that 2 of these compounds have high selectivity for the target enzyme, good bioavailability, and high potency to block TAU phosphorylation in cell culture. However, it is frequently observed that such inhibitors may not be active *in vivo*, since they, for example, do not enter the cells, are transported out, or are rapidly metabolized when tested in whole organisms (13). This emphasizes the necessity of rapid, high volume *in vivo* drug testing in disease models, which is not feasible in transgenic mice on a large scale. Transgenic zebrafish offer advantages of both *in vitro* and *in vivo* systems and allow rapid screening for pathology-modifying drugs on a large scale, since embryos can be tested for rescue of the pathologic phenotypes after compound treatment in a 96-well-plate scale (9).

We show that GSK3 $\beta$  inhibitors cause specific phenotypes when applied during early embryonic development and that the evoked phenotypes already indicate the *in vivo* potency of the inhibitor. Moreover, the GSK3 $\beta$  inhibitors can effectively reduce the rapid disease-specific hyperphosphorylation of TAU in our transgenic zebrafish. Using our model, we have evaluated the activity of 2 newly developed GSK3 $\beta$  inhibitors with comparable *in vitro* activity. One of the inhibitors, AR-534, was also very active *in vivo*, with a much higher effect than the previously described GSK3-specific inhibitors SB-216763 and SB-415286, which we used for comparison. In contrast, the inhibitor AR-164, which is equally potent in cell culture, was inactive *in vivo*. These data were consistent with the over 3-fold lower performance of AR-164 in our BBB test. As this is an *in vitro* test, which can only serve as a model of the *in vivo* situation, the bioavailability of AR-164 could be even lower in our transgenic zebrafish, explaining the lack of activity. It has been shown recently that zebrafish form a functional BBB that is similar to that of higher vertebrates. The BBB in zebrafish consists of endothelial cells, which can be characterized by the expression of the marker proteins claudin-5 and ZO1 and starts to become functional at 3 days after fertilization (10). The developing BBB might be less permeable to AR-164 versus AR-534 and could therefore be one reason for the absent *in vivo* activity of AR-164. Alternatively, degradation or metabolism of AR-164 could also account for the activity differences we observed. Taken together, the different activities of AR-534 and AR-164 in the *in vitro* versus the *in vivo* situation clearly illustrate the need for effective *in vivo*-screening tools, as this can help to identify promising compounds more quickly and directly, while at the same time allowing one to eliminate substances without reasonable *in vivo* activity early in the screening process. Taken together, our transgenic zebrafish model could be a promising tool for streamlining pharmacological screening for many neurodegenerative diseases. In fact, we have already successfully used this technology to generate transgenic zebrafish lines overexpressing a number of other amyloidogenic proteins, such as amyloid  $\beta$  peptide, TDP-43, and  $\alpha$ -synuclein (data not shown).

## Methods

### Animal husbandry

All experiments were performed in accordance with animal protection standards and were approved by the government of Upper Bavaria (Regierung von Oberbayern, Munich, Germany). The zebrafish wild-type AB line was maintained, mated, and raised as described (41). Embryos were kept in E3 medium at 28.5°C and staged as described (42).

### Constructs

Our transgenesis constructs are based on the pT2KXIGdeltaIN plasmid (a gift from K. Kawakami, National Institute of Genetics, Shizuoka, Japan), which is derived from the medaka *Tol2* transposable element (16). pT2KXIGdeltaIN was cleaved by BglII and XhoI to remove the insert between the *Tol2* sites, and a multiple cloning site (MCS) was introduced. The MCS was cut out by PvuII from pBS\_I-SceI, which contains the pBluescript MCS flanked on both sides by I-SceI restriction sites. To assemble the final transgenesis constructs, fragments were first combined in pBS\_I-SceI, as this vector contained more suitable restriction sites, and later transferred to pT2KXIGdeltaIN.

**Driver construct.** The SV40 late polyA signal was PCR amplified from pCS2<sup>+</sup> using the primers pCS2<sup>+</sup> poly(A)-F SacII (5'-AAAAAACCGCG-GAGTCGTATTACGTAGATCCAGACATGA-3') and pCS2<sup>+</sup> poly(A)-R SacI (5'-AAAGAGCTCCACACCTCCCCCTGAAC-3'), cleaved by SacI/SacII, and ligated into pBS\_I-SceI. The neuronal HuC promoter (19) was PCR amplified using the primers HuC-F XhoI/EcoRI (5'-GCTCGAGGAATTCATA-ATTGGAATTTAAATGC-3') and HuC-R2 EcoRI/ClaI (5'-GGAATTCATC-GATTCTTGACGTACAAAGATGATATTGATCTAGG-3'), cut by XhoI/ClaI, and ligated into pBS\_I-SceI\_pA. Gal4-VP16 (17) was cleaved by BamHI/SnaBI from pBS\_HuC\_Gal4-VP16, blunted, and ligated into pBS\_I-SceI\_HuC\_pA cut by EcoRV/SnaBI. The HuC-Gal4-VP16-pA fragment was transferred to pT2KXIGdeltaIN by I-SceI digest and ligation.

**Responder constructs.** We generated transgenic control fish expressing DsRed but not TAU using a construct that contained E1b-UAS-E1b flanked by DsRed and TAU, but TAU was isolated from the minimal E1b promoter by an insert of 200 bp (Ins), which inhibits expression of TAU. DsRed.T4 (43) was cleaved from pCS2<sup>+</sup>\_DsRed.T4 by NcoI/SnaBI digest to replace GFP in the vector pBS\_E1b\_UAS\_E1b\_GFP\_pA. This vector contains UAS flanked by E1b minimal promoters (17) on both sides. Ins-hTAU-P301L was cleaved by BglII/BamHI from pNG2htau40/P301L and ligated at the BamHI site of pBS\_I-SceI\_pA. E1b-UAS-E1b-DsRed-pA was cleaved by HindIII/SmaI from pBS\_E1b\_UAS\_E1b\_DsRed.T4\_pA, blunted and ligated into EcoRV-cleaved pBS\_I-SceI\_Ins\_hTAU-P301L\_pA. The full expression cassette was transferred to pT2KXIGdeltaIN by I-SceI digest and subsequent ligation. The final Responder construct was used together with the Driver construct to generate transgenic fish Tg(HuC:Gal4/UAS-DsRed).

To generate transgenic fish expressing DsRed and TAU, hTAU-P301L was amplified from pNG2htau40/P301L by PCR using primers hTAU ATG-F BamHI/NcoI (5'-GGGATCCCATGGCTGAGCCCCGCCAGGA-3') and hTAU TAG-R NcoI/EcoRI (5'-GGAATTCATGGTCACAAACCCT-GCTTGGCTA-3'), cleaved by NcoI and inserted into pBS\_E1b\_UAS\_E1b\_GFP\_pA cleaved by NcoI/SnaBI to remove GFP. DsRed together with the SV40 late polyA signal were cleaved by ClaI/ApaI from pCS2<sup>+</sup>\_DsRed.T4 and introduced into pBS\_E1b\_UAS\_E1b\_hTAU-P301L\_pA. The insert in pT2KXIGdelta-hTAU-P301L-Ins-E1b-UAS-E1b-DsRed was removed by ApaI/NheI digest and replaced by the new cassette cleaved from pBS\_pA\_DsRed\_E1b\_UAS\_E1b\_hTAU40-P301L\_pA. The distance of TAU from E1b is only 35 bp in this construct; therefore, TAU is efficiently expressed together with DsRed. The final Responder construct was used together with the Driver construct to generate transgenic fish Tg(HuC:Gal4/TAU-P301L-UAS-DsRed).

**Gateway constructs.** Gateway recombinations were performed according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). Details about Gateway cloning can be found at [www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Cloning/Gateway-Cloning.html](http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Cloning/Gateway-Cloning.html).

To adapt our responder construct to Gateway cloning, hTAU-P301L was replaced by a Gateway destination site flanked by attR1/2, which was cleaved from pBS-DEST\_attR1-2 (a gift from P. Lemaire, IBDMML, Marseille, France) by EcoRV. The resulting construct was termed Destination Responder vector.



To adapt our Driver construct to Gateway cloning, the HuC promoter was also replaced by a Gateway destination site flanked by attR1/2. The resulting construct was termed Destination Driver vector. To test the functionality of the vectors, the HuC and  $\alpha$ Tub promoter and hTAU-P301L were amplified by PCR using the following primers: HuC-F XhoI/EcoRI (5'-GCTCGAGGAATTCACAAATTTGAATTTAAATGC-3') and HuC-R2 EcoRI/ClaI (5'-GGAATTCATCGATTCTTGACGTACAAAGATGATATTGATCTAGG-3') for HuC; M13-FP (5'-TGTAACACGACGCCAGT-3') and  $\alpha$ Tub-R (5'-GGCAGCTGTGAAGAAAAAG-3') for  $\alpha$ Tub; and hTAU ATG-F BamHI/NcoI (5'-GGGATCCCATGGCTGAGCCCCGCCAGGA-3') and hTAU TAG-R NcoI/EcoRI (5'-GGAATTCATGGTCAAAACCTGCTTGGCTA-3') for hTAU-P301L. PCR products were TOPO-cloned into entry vectors using the pCR8/TOPO/GW Kit from Invitrogen and sequenced. Promoters and TAU were then LR recombined into Destination Driver and Responder vectors, using LR Clonase II from Invitrogen according to the manufacturer's instructions.

#### **Plasmid preparation, mRNA synthesis, and embryo injection**

Plasmids were prepared by extraction with a MACHEREY-NAGEL Maxi Kit and further cleaned up by using the Qbiogene GENECLEAN Kit according to the manufacturer's instructions. The vectors pCS-TP (a gift from K. Kawakami, National Institute of Genetics, Shizuoka, Japan), pCS2<sup>+</sup>-GFP, pCS2<sup>+</sup>-dN-GSK3 $\beta$ , and pCS2<sup>+</sup>-GSK3 $\beta$  (both gifts from R. Rupp, Ludwig-Maximilians-University) were linearized by NotI and cleaned up by phenol/chloroform precipitation. mRNAs were synthesized from the linearized vectors with the Ambion mMESSAGE mMACHINE kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions and stored in small aliquots at -80°C. Shortly before injection, circular Driver and Responder plasmids were mixed with *Tol2* transposase mRNA, all at a final concentration of 25 ng/ $\mu$ l, in dH<sub>2</sub>O containing diethylenepyrocabonate-treated (DEPC-treated) 0.2 M KCl and 20% phenol red (44). GFP mRNA was used at a concentration of 100 ng/ $\mu$ l and GSK3 $\beta$  mRNAs were used at a concentration of 50 ng/ $\mu$ l, all diluted in DEPC-treated dH<sub>2</sub>O containing 20% phenol red.

One-cell-stage embryos were collected, oriented on agar plates, and injected with approximately 1 nl of the injection solution. Plasmid DNA and transposase mRNA were injected through the yolk into the cytoplasm of the first cell before the first cell division. GFP and GSK3 $\beta$  mRNAs were mixed before use and injected into the yolk. At around 6 to 8 hpf, 2 random fertilized embryos from each dish were tested for transposition by PCR as described (44). At 30 hpf, embryos were selected for DsRed expression under a Leica fluorescent stereomicroscope and raised at 28.5°C to adulthood. Adult founder fish were identified by outcrossing them to AB wild-type fish and screening the F1 generation for DsRed-expressing embryos. These embryos were raised to establish transgenic lines.

#### **Identification of transgenes by PCR**

The offspring of 225 embryos of an F2 outcross were analyzed by PCR. Three independent PCRs were performed to show Gal4 on the Driver construct, TAU on the responder construct, and actin as a loading control. The following primers were used: Gal4: HuC 3'F 5'-TGGCGAAGACTGTCCTTTTT-3', Gal4-R 5'-GGTCTTCTCGAGGAAAAATCAG-3'; hTAU: TAU-OF 5'-AGGAGTTCGAAGTGATGGAAGAT-3', TAU-IR 5'-GTGGC-GATCTTCGTTTTACCAT-3'; and actin: actin-F 5'-TGTTTTCCCTC-CATTGTTGG-3', actin-R 5'-TTCTCCTTGATGTCACGGAC-3'. For the PCRs, the 4- to 24-hour-old eggs were fixed in methanol; then the DNA was extracted by digestion with proteinase K for 4 hours at 55°C followed by inactivation of the enzyme for 10 minutes at 95°C. The extracted DNA was used as a template for PCR. To analyze the results, the products of the 3 PCRs for each possible genotype from 2 different embryos were mixed together, loaded on a gel, counted, and imaged.

#### **IF, immunohistochemical stainings, Gallyas silver stainings, and WBs**

Whole-mount IF stainings were performed according to standard methods (45). For immunohistochemical and Gallyas silver stainings on paraffin sections, the 5-week-old fish were deeply anesthetized and killed in water with ice. Then the whole fish were fixed overnight in 4% PFA and transferred to PBS and the sections and stainings were performed as described for mouse tissue (46).

WBs were performed according to standard methods. Embryos or larvae were frozen in liquid nitrogen and 10 to 50  $\mu$ l of chilled Laemmli buffer were added per fish. Fish were homogenized by sonication and incubated at 95°C for 10 minutes. Embryo lysates were subjected to centrifugation at 13,000 g for 1 minute, and 10 to 20  $\mu$ l of the supernatant was loaded on an 8% or 10% polyacrylamide gel. The following antibodies were used for IF, immunohistochemistry (IHC), and WB: (a) TAU. T46 (20) (IF: 1:200, WB: 1:1000; Invitrogen), K9JA (IF: 1:500, WB: 1:5000; no. A0024; Dako), DA9 (IHC: 1:250; a gift from P. Davies, Albert Einstein College of Medicine, New York, New York, USA), AT8 (25) (IF: 1:200, IHC: 1:50, WB 1:1000; Pierce, Thermo Scientific), 422 (24) (IF: 1:200, WB 1:1000; a gift from C. Czech, Hoffmann La Roche, Basel, Switzerland), AT180 (21) (IF: 1:200, WB: 1:1000; Pierce, Thermo Scientific), AT270 (21) (IF: 1:200, WB: 1:1000; Pierce, Thermo Scientific), 12E8 (22) (IF: 1:200, WB: 1:1000; a gift from P. Seubert, Elan Pharmaceuticals, San Francisco, California, USA), MC1 (26) (IF: 1:50; a gift from P. Davies, Albert Einstein College of Medicine, New York, New York, USA), PHF1 (23) (IF: 1:100, WB 1:1000; a gift from P. Davies, Albert Einstein College of Medicine, New York, New York, USA); (b) Other. DsRed (IF: 1:200; Clontech), actin (WB: 1:1000; Sigma-Aldrich), znp1 (30) (IF: 1:100; Developmental Studies Hybridoma Bank), Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (1:500; Invitrogen), Alexa Fluor 546 goat anti-rabbit IgG (1:500; Invitrogen), Alexa Fluor 488 goat anti-rat IgG (1:500; Invitrogen).

#### **Acridine orange stainings and time-lapse imaging**

Living zebrafish larvae were anesthetized with Tricaine (Sigma-Aldrich), incubated in a solution of 3  $\mu$ g/ml acridine orange (Sigma-Aldrich) in E3 medium with Tricaine for 30 minutes (27), and washed twice in E3 with Tricaine. For imaging, fish were embedded in 1.6% low melting agarose in E3 and overlaid with E3/Tricaine. The green nuclei of the neurons were counted in the whole spinal cord of 44 fish for each genotype using a Zeiss compound microscope with a Zeiss Plan-Apochromat 10 $\times$ /0.45 lens. For time-lapse imaging, a z-stack of a chosen region of the spinal cord of the transgenic fish with a thickness of 10  $\mu$ m was imaged every 3 minutes for 10 to 16 hours on a Zeiss LSM 510 META inverted confocal microscope (Zeiss, provided by the Hans and Ilse Breuer Foundation, Frankfurt am Main, Germany) in a heated chamber. The images of the z-stack were combined in a maximum projection, and the time series of image projections was exported to a time-lapse video with 8 frames per second using Zeiss LSM 510 Confocal software, version 4.2 SP1. The videos and still images taken from the videos were processed with ImageJ 1.41 (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) and iMovie 7 on Mac OSX 10.5.

#### **Behavioral assays**

48-hour-old living zebrafish larvae of several clutches were pooled together and sorted for visible DsRed expression. The selected fish were dechorionated manually at least 3 hours before the experiment. To evaluate the escape response, fish were touched with the tip of a fine needle for at least 2 times at the dorsal tip of the tail. An escape response in which the fish did not move a distance of at least 3 times its own body length was considered as reduced. A minimum of 3 groups of 50 fish were quantified for each genotype. At least one experiment was recorded and processed as a video.





### Microscopy

Living zebrafish embryos, larvae, and 5-week-old juveniles were examined and imaged on a fluorescent stereomicroscope (Leica). For imaging fixed stainings, heads of zebrafish embryos were removed, and the tails were flat mounted in 1% low melting agarose in 50% glycerol/dH<sub>2</sub>O on coverslips and visualized with an LSM 510 META inverted confocal microscope. Motoneuron length measurements of confocal pictures were done using the overlay function of the Zeiss LSM software with maximum projections of z-stacks with constant stack height containing the whole neuronal projection. Images comparing 2 groups of fish were always done at the same time using identical settings. Paraffin sections were imaged on a Zeiss compound microscope. Images were assembled in Adobe Photoshop 8.0.

### Analysis of compound characteristics

The GSK3 $\beta$  Kis were determined using a scintillation proximity assay with a biotinylated peptide sequence from eIF2B and [ $\gamma$ -<sup>33</sup>P]ATP as substrates. The CDK2 Kis were determined using a scintillation proximity assay with a biotinylated peptide sequence from GST retinoblastoma and [ $\gamma$ -<sup>33</sup>P]ATP as substrates. Scintillation proximity assays and kinetic analyses were performed as described earlier (14). IC<sub>50</sub> inhibition curves were analyzed by nonlinear regression using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software).

BBB permeability *in vitro* was analyzed using an *in vitro* cell culture model for permeability across the BBB as described earlier (47).

### Analysis of GSK3 $\beta$ inhibition in TAU transfected cells

3T3 fibroblasts were engineered to stably express 4-repeat TAU protein. The cells were treated with vehicle or with increasing concentrations of inhibitors and harvested at 4 hours after treatment. Cultures were then washed twice with 5 mM MgCl<sub>2</sub> PBS. Extracts for WB analysis were prepared by homogenizing cells in ice-cold extraction buffer consisting of 20 mM HEPES, pH 7.4, 100 mM NaCl, 10 mM NaF, 1% Triton X-100, 1 mM sodium orthovanadate, 10 mM EDTA, and protease inhibitors (2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10  $\mu$ g/ml aprotinin, 10  $\mu$ g/ml leupeptin, and 10  $\mu$ g/ml pepstatin). The samples were homogenized at 4°C, and protein content was determined by the Bradford method. Total protein (25  $\mu$ g) was electrophoresed on 10% SDS-PAGE gel and transferred to a nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell Bioscience Inc.). The experiments were performed using the following primary antibodies: pS396, 1:1000, and Tau5, 1:1000. The filters were incubated with the antibody at 4°C overnight in 5% nonfat dried milk. A secondary horseradish peroxidase-linked sheep anti-mouse (1:1000; Amersham Biosciences) or horseradish peroxidase-linked donkey anti-rabbit (1:5000; Amersham Biosciences) followed by ECL detection reagents (Amersham Biosciences) was used for immunodetection. Quantitation of immunoreactivity was performed by densitometric scanning.

### Compound treatments

Stock solutions were prepared by dissolving compounds in DMSO (SB-216763 and SB-415286, 20 mM), 50% DMSO/dH<sub>2</sub>O (AR-534, 5 mM), or dH<sub>2</sub>O (AR-164, 10 mM, and LiCl, 3 M). Stock solutions were diluted with embryo medium E3 containing 1% DMSO to final dilutions of 50  $\mu$ M for SB-216763, 100  $\mu$ M for SB-415286, 100 mM for LiCl, 25  $\mu$ M for AR-534, and 100  $\mu$ M for AR-164. The unpermeable chorions of fragile 4-hour-old embryos were only slightly opened to allow access to the compounds, while rather robust 24 hpf embryos were completely dechorionated. Embryos were incubated in 1 ml compound dilutions or control medium (E3 containing 1% DMSO) in 12-well plates; the solutions were changed daily. Embryos were either treated from 4 to 24 hpf or from 24 to 100 hpf.

### Statistics

Mean values and SD were calculated with Microsoft Excel, version 12.1.3. Statistical analysis was performed using 2-tailed Student's *t* test in Microsoft Excel. Data are presented as mean  $\pm$  SD. *P* < 0.05 was considered significant.

### Acknowledgments

This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 596 to B. Schmid and C. Haass; the Center for Integrated Protein Science to C. Haass and B. Schmid; and the Leibniz Award to C. Haass); Elitenetzwerk Bayern and Universität Bayern (to D. Paquet); the Federal Ministry for Education and Research (BMBF, BioFuture-Award 0311889 to R.W. Köster); the Studienstiftung des deutschen Volkes (to M. Distel); and the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement no. 200611 (MEMOSAD to C. Haass, B. Schmid, E.-M. Mandelkow, and D. Paquet). C. Haass is supported by a research professorship at Ludwig-Maximilians-University. We thank A. Hruscha, M. Teucke, S. Schätzle, H. Kaiser, D. Drexler, O. Petrova, Y. Xu, E. Jerning, J. Neelissen, and Y. Nilsson for technical help; K. Kawakami, R. Rupp, and P. Lemaire for providing constructs; and P. Seubert, P. Davies, and C. Czech for providing antibodies. We thank the Hans and Ilse Breuer Foundation for the confocal microscope and K. Winklhofer for critically reading this manuscript.

Received for publication September 23, 2008, and accepted in revised form February 25, 2009.

Address correspondence to: Christian Haass, Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen (DZNE) and Adolf-Butenandt-Institut, Biochemistry, Ludwig-Maximilians-University, Schillerstr. 44, 80336 Munich, Germany. Phone: 49-89-2180-75472; Fax: 49-89-2180-75415; E-mail: chaass@med.uni-muenchen.de.

- Haass, C., and Selkoe, D.J. 2007. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**:101–112.
- Kosik, K.S., Joachim, C.L., and Selkoe, D.J. 1986. Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**:4044–4048.
- Grundke-Iqbal, I., et al. 1986. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**:4913–4917.
- Braak, H., and Braak, E. 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* **82**:239–259.
- Santacruz, K., et al. 2005. Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science.* **309**:476–481.
- Hutton, M., et al. 1998. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature.* **393**:702–705.
- Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. 1998. Tau in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol.* **8**:425–427.
- Gotz, J., and Ittner, L.M. 2008. Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Nat. Rev. Neurosci.* **9**:532–544.
- Zon, L.I., and Peterson, R.T. 2005. In vivo drug discovery in the zebrafish. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**:35–44.
- Jeong, J.Y., et al. 2008. Functional and developmental analysis of the blood-brain barrier in zebrafish. *Brain Res. Bull.* **75**:619–628.
- Tomasiewicz, H.G., Flaherty, D.B., Soria, J.P., and Wood, J.G. 2002. Transgenic zebrafish model of neurodegeneration. *J. Neurosci. Res.* **70**:734–745.
- Bai, Q., Garver, J.A., Hukriede, N.A., and Burton, E.A. 2007. Generation of a transgenic zebrafish model of tauopathy using a novel promoter element derived from the zebrafish *eno2* gene. *Nucleic Acids Res.* **35**:6501–6516.
- Mazanetz, M.P., and Fischer, P.M. 2007. Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**:464–479.
- Bhat, R., et al. 2003. Structural insights and biological effects of glycogen synthase kinase 3-specific inhibitor AR-A014418. *J. Biol. Chem.* **278**:45937–45945.
- Winklhofer, K.F., Tatzelt, J., and Haass, C. 2008. The two faces of protein misfolding: gain- and loss-of-function in neurodegenerative diseases. *EMBO J.* **27**:336–349.
- Urasaki, A., Morvan, G., and Kawakami, K. 2006.



- Functional dissection of the Tol2 transposable element identified the minimal cis-sequence and a highly repetitive sequence in the subterminal region essential for transposition. *Genetics*. **174**:639–649.
17. Koster, R.W., and Fraser, S.E. 2001. Tracing transgene expression in living zebrafish embryos. *Dev. Biol.* **233**:329–346.
18. Walhout, A.J., et al. 2000. GATEWAY recombinational cloning: application to the cloning of large numbers of open reading frames or ORFeomes. *Methods Enzymol.* **328**:575–592.
19. Park, H.C., et al. 2000. Analysis of upstream elements in the HuC promoter leads to the establishment of transgenic zebrafish with fluorescent neurons. *Dev. Biol.* **227**:279–293.
20. Kosik, K.S., et al. 1988. Epitopes that span the tau molecule are shared with paired helical filaments. *Neuron*. **1**:817–825.
21. Goedert, M., et al. 1994. Epitope mapping of monoclonal antibodies to the paired helical filaments of Alzheimer's disease: identification of phosphorylation sites in tau protein. *Biochem. J.* **301**:871–877.
22. Seubert, P., et al. 1995. Detection of phosphorylated Ser262 in fetal tau, adult tau, and paired helical filament tau. *J. Biol. Chem.* **270**:18917–18922.
23. Greenberg, S.G., Davies, P., Schein, J.D., and Binder, L.I. 1992. Hydrofluoric acid-treated tau PHF proteins display the same biochemical properties as normal tau. *J. Biol. Chem.* **267**:564–569.
24. Hasegawa, M., et al. 1996. Characterization of mAb AP422, a novel phosphorylation-dependent monoclonal antibody against tau protein. *FEBS Lett.* **384**:25–30.
25. Biernat, J., et al. 1992. The switch of tau protein to an Alzheimer-like state includes the phosphorylation of two serine-proline motifs upstream of the microtubule binding region. *EMBO J.* **11**:1593–1597.
26. Jicha, G.A., Berenfeld, B., and Davies, P. 1999. Sequence requirements for formation of conformational variants of tau similar to those found in Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.* **55**:713–723.
27. Furutani-Seiki, M., et al. 1996. Neural degeneration mutants in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development*. **123**:229–239.
28. Thies, E., and Mandelkow, E.M. 2007. Missorting of tau in neurons causes degeneration of synapses that can be rescued by the kinase MARK2/Par-1. *J. Neurosci.* **27**:2896–2907.
29. Terwel, D., et al. 2005. Changed conformation of mutant Tau-P301L underlies the moribund tauopathy, absent in progressive, nonlethal axonopathy of Tau-4R/2N transgenic mice. *J. Biol. Chem.* **280**:3963–3973.
30. Trevarrow, B., Marks, D.L., and Kimmel, C.B. 1990. Organization of hindbrain segments in the zebrafish embryo. *Neuron*. **4**:669–679.
31. Fox, M.A., and Sanes, J.R. 2007. Synaptotagmin I and II are present in distinct subsets of central synapses. *J. Comp. Neurol.* **503**:280–296.
32. Myers, P.Z., Eisen, J.S., and Westerfield, M. 1986. Development and axonal outgrowth of identified motoneurons in the zebrafish. *J. Neurosci.* **6**:2278–2289.
33. Smith, D.G., et al. 2001. 3-Anilino-4-arylmaleimides: potent and selective inhibitors of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **11**:635–639.
34. Hong, M., Chen, D.C., Klein, P.S., and Lee, V.M. 1997. Lithium reduces tau phosphorylation by inhibition of glycogen synthase kinase-3. *J. Biol. Chem.* **272**:25326–25332.
35. Doble, B.W., and Woodgett, J.R. 2003. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J. Cell Sci.* **116**:1175–1186.
36. Stachel, S.E., Grunwald, D.J., and Myers, P.Z. 1993. Lithium perturbation and goosecoid expression identify a dorsal specification pathway in the pre-gastrula zebrafish. *Development*. **117**:1261–1274.
37. Geling, A., Steiner, H., Willem, M., Bally-Cuif, L., and Haass, C. 2002. A gamma-secretase inhibitor blocks Notch signaling in vivo and causes a severe neurogenic phenotype in zebrafish. *EMBO Rep.* **3**:688–694.
38. Gerhard, G.S., et al. 2002. Life spans and senescent phenotypes in two strains of Zebrafish (*Danio rerio*). *Exp. Gerontol.* **37**:1055–1068.
39. Roberts, R.C. 1961. The lifetime growth and reproduction of selected strains of mice. *Heredity*. **16**:369–381.
40. Koster, R.W., and Fraser, S.E. 2001. Direct imaging of in vivo neuronal migration in the developing cerebellum. *Curr. Biol.* **11**:1858–1863.
41. Mullins, M.C., Hammerschmidt, M., Haffter, P., and Nusslein-Volhard, C. 1994. Large-scale mutagenesis in the zebrafish: in search of genes controlling development in a vertebrate. *Curr. Biol.* **4**:189–202.
42. Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., and Schilling, T.F. 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* **203**:253–310.
43. Bevis, B.J., and Glick, B.S. 2002. Rapidly maturing variants of the Discosoma red fluorescent protein (DsRed). *Nat. Biotechnol.* **20**:83–87.
44. Kawakami, K. 2005. Transposon tools and methods in zebrafish. *Dev. Dyn.* **234**:244–254.
45. Nüsslein-Volhard, C., and Dahm, R. 2002. *Zebrafish: a practical approach*. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom. 303 pp.
46. Mocanu, M.M., et al. 2008. The potential for beta-structure in the repeat domain of tau protein determines aggregation, synaptic decay, neuronal loss, and coassembly with endogenous Tau in inducible mouse models of tauopathy. *J. Neurosci.* **28**:737–748.
47. Cecchelli, R., et al. 1999. In vitro model for evaluating drug transport across the blood-brain barrier. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **36**:165–178.