

# **Preseniliini 1:n ja preseniliini 2:n merkitys seeprakalan kehityksessä**

Juha Sartanen, LK

Helsinki 03.10.2016

Tutkielma

Vastuullinen ohjaaja: Professori Pertti Panula

Käytännön ohjaaja: FT Maria Sundvik

HELSINGIN YLIOPISTO

Lääketieteellinen tiedekunta

[juha.sartanen@helsinki.fi](mailto:juha.sartanen@helsinki.fi)

## HELSINGIN YLIOPISTO – HELSINGFORS UNIVERSITET

Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion – Faculty <b>Lääketieteellinen</b>		Laitos – Institution – Department <b>Biolääketieteen laitos, anatomia</b>	
Tekijä – Författare – Author <b>Juha Sartanen</b>			
Työn nimi – Arbetets titel – Title <b>Preseniliini 1:n ja preseniliini 2:n merkitys seeprakalan kehityksessä</b>			
Oppiaine – Läroämne – Subject <b>Biolääketiede/anatomia</b>			
Työn laji – Arbetets art – Level <b>Tutkielma</b>	Aika – Datum – Month and year <b>03.10.2016</b>	Sivumäärä - Sidoantal - Number of pages <b>20</b>	
Tiivistelmä – Referat – Abstract  <p>Tässä tutkimuksessa selvitettiin preseniliini 1 ja preseniliini 2 –geenien merkitystä seeprakala-alkioiden kehityksessä ensimmäisten kolmen kehityspäivän ajan. Geenien translaatio estettiin morfolino-oligonukleotidi-injektiolla, jonka jälkeen alkioiden somiittien määrää, sydämen sykettä ja aivojen kokoa seurattiin sekä tutkittiin <i>Notch1a</i> mRNA:n ilmentyminen kunakin päivänä <i>in situ</i> hybridisaatiolla.</p> <p>Tässä työssä ei huomattu eroja ryhmien välillä somiittien määrässä, aivojen koossa eikä sykkeessä varhaiskehityksen aikana. Sen sijaan saatiin viitteitä <i>Notch1a</i>:n ekspression kasvusta preseniliini 1 morfanteilla ja päinvastoin ekspression laskusta preseniliini 2 morfanteilla. Hiirimalleilla ja seeprakaloilla saadut erilaiset tulokset preseniliinien kehityksellisestä merkityksestä antavat viitteitä preseniliini 2:n suuremmasta osuudesta seeprakalojen kehityksessä.</p> <p>(90 sanaa)</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords <b>Zebrafish; Presenilin; <math>\gamma</math>-Secretase; Notch; AD</b>			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			

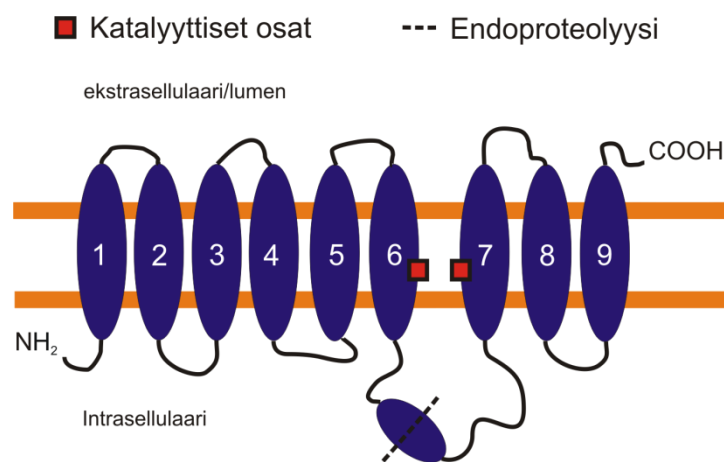
1. Johdanto.....	1
2. Tavoitteet .....	5
3. Materiaalit ja menetelmät .....	5
3.1 Seeprakalat.....	5
3.2 Somiitit, syke ja aivojen koko.....	7
3.3 <i>in situ</i> hybridisaatio.....	9
4. Tulokset .....	10
5. Pohdinta .....	12
6. Johtopäätökset .....	15
7. Liitteet.....	15
Lähdeluettelo .....	16

## 1. Johdanto

Alzheimerin taudin (AD) riskigeenien toimintaa ymmärretään nykyään vielä huonosti eikä taudin familiaalisen (familiaalinen Alzheimerin tauti FAD) ja sporadisen muodon etiologiaa täysin tunneta. Ainakin FAD:n riskigeeneihin kuuluvat toisiaan rakenteellisesti muistuttavat preseniliini 1 ja preseniliini 2 (*psen1* ja *psen2*), jotka toimivat tetrameerisen  $\gamma$ -sekretaasikompleksin katalyyttisiä osina (1) ja ne ovat homologisia ihmisen *PSEN1*- ja *PSEN2*-geenien kanssa (2,3).  $\gamma$ -Sekretaasi osallistuu yli 60 proteiinin pilkkomiseen, mikä viittaa siihen, että sen tehtävänä olisi joko signalointi ja transkription säätely proteiinien solunsisäisillä osilla tai kalvoproteiinien turnover (4).  $\gamma$ -Sekretaasin osia ovat preseniliinien lisäksi nicastrin (*NCT*), presenilin enhancer-2 (*Pen-2*) sekä anterior pharynx defective-1 (*APH-1*) (5).  $\gamma$ -Sekretaasi osallistuu mm. amyloidiproteiiniin (amyloid precursor protein 2 *APP*), Notch:n sekä E- ja N-kadheriinin proteolyysiin (1). Preseniliinit osallistuvat sekretaasi-aktiivisuuden lisäksi solun moniin eri toimintoihin, kuten  $\beta$ -kateniinin fosforylaatioon (6) ja siten myös Wnt-signalointiin sekä kalsiumin solunsisäiseen säätelyyn (7). Preseniliinit saattavat vaikuttaa myös erilaisten kalvoproteiinien, kuten reseptorien ja intergriinien kulkuun ja hajotukseen (1). *Psen1* ja *psen2* osallistuvat etenkin Notch -signaloinnin kautta alkion eri kudosten erilaistumiseen ja kehitykseen (8).

Preseniliini-proteiinit ovat noin 50 kDa:n kokoisia transmembraanisia kalvoproteiineja joiden topologiasta ei ole vielä konsensusta (5). Preseniliinit ovat rikastuneet lipidilautoissa (9) ja niitä ilmenee lähes kaikilla solun membraaneilla (5). Vielä ei ole selvää ovatko *psen1* ja *psen2* lokalisoituneet samoihin membraaneihin, vai onko kukin eri puolilla solua, mikä voisi vaikuttaa niiden substraattispesifisyyteen sekä erilaisiin tehtäviin  $\gamma$ -sekretaasin osana (1). Proteiinien yhden sytoplasmisen osan endoproteolyysi tuottaa N- ja C-terminaaliset fragmentit (NTF ja CTF), jotka yhdessä muodostavat heterodimeerin (5). NTF:n ja CTF:n kahdessa solukalvon läpäisevässä osassa on aspartaattitähdeet, jotka ovat välttämättömiä  $\gamma$ -sekretaasin katalyyttiselle aktiivisuudelle (5) (kuva 1). Seeprakaloissa *psen1* ilmenee maternaalisesti heti yksisoluvaiheesta lähtien ja sen määrää säädellään kehitysvaiheen mukaan, kun taas *psen2* ilmenee vasta gastrulaatiosta lähtien (10). Mutaatio kummassa tahansa preseniliinigeeneistä aiheuttaa FAD:n (1) kun taas yleisemmän sporadisen AD:n suurin riskitekijä on ApoE4-genotyyppi (11).

Preseniliinien säätelystä tiedetään vielä varsin vähän. NTF:ia ja CTF:ia tuotetaan ylimäärä ja niiden lopullinen määrä on tarkkaan säädelty ja riippuvainen muustakin kuin endoproteolyysistä, sillä ainakin glykogeenisyntaasikinaasi-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) fosforyloi *psen1* CTF:n, mikä säätelee sen hajotusta (12). Lisäksi preseniliinien transkriptioon vaikuttaa psen proteiinin määrä takaisinkytkentämekanismeilla (13). Immunofiliineihin kuuluvan FKBP14-proteiinin on esitetty stabiloivan preseniliinejä karkeassa endoplasmakalvostossa, sillä sen puuttuminen vähensin psen:n määrää sekä  $\gamma$ -sekretaasin aktiivisuutta banaanikärpäsellä (*Drosophila*) (14).



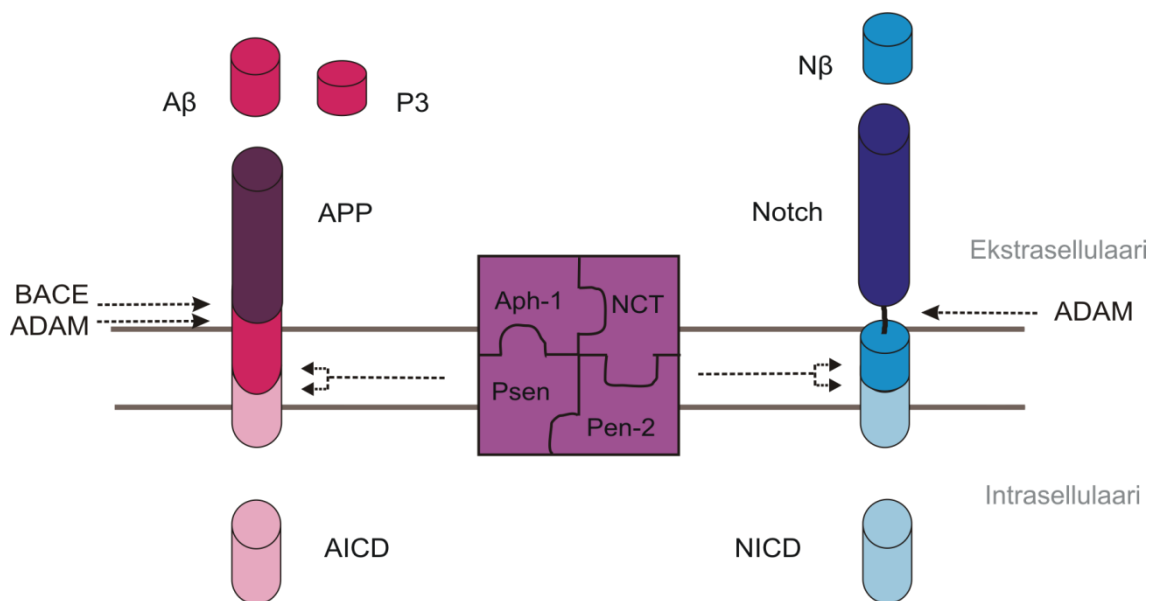
Kuva 1. Havainnekuva preseniliinien rakenteesta, jossa on oletettavasti 9 transmembraanista osaa (TMD). TMD6 ja TMD7 sisältävät katalyyttisen keskuksen muodostavat asparaattitähdeet. Kohta, josta proteiini jaetaan endoproteolyysillä NTF:ksi ja CTF:ksi on merkattu katkoviivalla.

Mutatoituneiden preseniliinien huomattiin aiheuttavan häiriöitä neuronien kalsium-tasapainossa, jonka jälkeen *psen*-poistogeenisellä hiirimallilla selvisi, että preseniliinit toimivat kalsiumin vuotokanavina ER:ssa (7). Samassa tutkimuksessa todettiin, että mutatoituneen *psen*:n aiheuttama toiminnallinen vaje kompensoitui ryanodiini-reseptoreilla, ja näiden inhibitiolla saatiin indusoitua AD:ia muistuttavia muutoksia, kuten neuroneiden atrofiaa ja amyloidikertymiä.

Preseniliinien on osoitettu vaikuttavan myös Wnt/ $\beta$ -kateniini-signalointiin.  $\beta$ -Kateniini toimii sytoplasmassa Wnt-signaloinnissa sekä toisaalta solukalvolla E-kadheriinin kanssa soluadheesiossa. Riippumattomina Wnt-aktivaatiosta preseniliinit toimivat telakkana PKA:lle ja GSK-3 $\beta$ :lle, jotka vastaavat  $\beta$ -kateniinin fosforylaatiosta, mikä johtaa sen

hajoamiseen ubikitinaatiomekanismilla (6). *Psen1*:n puutos siten lisäsi  $\beta$ -kateniinin määrää sytosolissa johtaen Wnt-signaloinnin yliaktivaatioon ja hyperproliferaatioon (6). Tällä on embryologian lisäksi merkitystä myös kasvainten muodostumisessa, sillä mutatoituneita Wnt-signaloinnin komponentteja, on löydetty ihon ja aivojen karsinoomista ja medulloblastoomista (6).

APP:n proteolyysi alkaa joko  $\alpha$ -sekretaasin (ADAM) tai amyloidogeenisen  $\beta$ -sekretaasin (BACE) pilkkoessa APP:ta vapauttaen sen solunulkoisen osan. Tämän jälkeen  $\gamma$ -sekretaasi katkaisee solukalvossa sijaitsevan  $A\beta$ -osan kahdesta kohdasta vapauttaen solunsisäinen osan (APP intracellular domain AICD) sekä P3- tai  $A\beta$ -fragmentin riippuen edeltävän sekretaasin toiminnasta (1) (kuva 2). Syntyvä AICD kulkeutuu tumaan, jossa se säätelee useiden geenien transkriptiota (15). Preseniliinin pilkkoessa APP:ia  $\beta$ -sekretaasin jälkeen syntyy enimmäkseen 40 aminohapon pituisia  $A\beta_{40}$ -peptidejä, mutta myös muita variaatioita esiintyy. Hydrofobinen  $A\beta_{42}$ -peptidi on taipuvaisempi aggregoitumaan ja sen muodostamat amyloidifibrillit sekä varsinkin liukoiset  $A\beta_{42}$ -oligomeerit ovat neurotoksisempia kuin kaksi aminohappoa lyhyempi monomeerinen variantti  $A\beta_{40}$  (16). AD-potilailla, joilla on mutaatio *psen*- tai *APP*-geneissa on havaittu lisääntynyt määrä  $A\beta_{42}$ -peptidejä (17).  $A\beta$ :n kaikkien eri muotojen neurotoksisuudesta ei kuitenkaan ole vielä täyttä selvyttä ja niillä on myös osoitettu olevan vaihtelevia vaikutuksia neurotransmissioon (1).



Kuva 2. APP:n ja Notch:n proteolyysi.  $\gamma$ -Sekretaasi katkaisee APP:n  $\gamma_{40}$ - ja  $\gamma_{49}$ - sekä Notchin S3- ja S4-kohdista (20).

Notch osallistuu nisäkkäillä mm. solujen erilaistumiseen, proliferaatioon, apoptoosiin, gliogeneesiin sekä muistiin ja oppimiseen (8). Notch:n kautta tapahtuvat lateraali-inhibitio sekä induktio säätelevät jakautuvien solujen määrää neurogenesissä sekä estävät kantasoluja erilaistumasta liian aikaisin (4). Notch-signaali perustuu ligandin indusoimaan proteolyysiin, joka vapauttaa solunsisäisen osan (NICD) välittämään signaalin tumaan. Notch katkaistaan translaation jälkeen trans-golgiin S1-kohdasta ja kuljetetaan kalvolle heterodimeerinä. Ligandien, kuten Delta ja Jagged sitouduttua Notch-reseptoriin solukalvolla tai mahdollisesti endosomissa, myös ADAM- perheeseen kuuluva proteaasi leikkaa Notch:n solunulkoisen osan irti S2-kohdasta, jonka jälkeen  $\gamma$ -sekretaasi leikkaa NICD:n S3:sta (4) (kuva 2). NICD edistää tumassa alkion kehitykseen vaikuttavien kohdegeenien kuten *hes1*, *hes5* ja *Hey*:n transkriptiota (8,18). Tämä intramembraanisen proteolyysin kautta tapahtuva signaali on palautumatonta ja ohjaa siten solujen kehitystä ja erilaistumista tietyille poluille (1). *Psen1*:n vaimentava mutaatio katalyyttisessä aspartaatissa nisäkkäsoluilla vähensi NICD:n pääsyä tumaan sekä NICD:n aktivoimaa transkriptiota (19). On myös mielenkiintoista, että Notch-reseptorin ligandit Delta ja Jagged voidaan pilkkoa ADAM:lla sekä  $\gamma$ -sekretaasilla, mikä vapauttaa niiden solunsisäiset osat sytoplasmaan mahdollisesti transkriptiotekijöiksi (4).

Notchin ja APP:n intramembraaninen proteolyysi on siis hyvin samankaltainen. Myös Notch katkaistaan kahdesta eri kohdasta APP:n tavoin TMD:n keskeltä.  $\gamma$ -Sekretaasi katkaisee Notch:n S3-kohdan lisäksi S4-kohdasta, jolloin syntyy  $A\beta$ :n kaltainen pieni peptidi, joka on nimetty N $\beta$ :ksi (20). Tämän osoittanut ryhmä edelleen näytti, että AD:ta aiheuttava *psen1*-mutaatio vaikuttaa myös näiden peptidien erilaisen pilkkomiseen synnyttäen hieman pidempiä N $\beta$ :a, mikä osoittaa, että nämä kaksi proteiinia katkaistaan samalla mekanismilla. On myös huomattu, että APP ja Notch voivat muodostaa yhdessä heterodimeerejä, sekä niiden intrasellulaarisilla osilla AICD:lla ja NICD:lla on vuoropuhelua keskenään ja ne voivat aktivoida toistensa kohdegeenejä (21).

Seeprakala (*Danio rerio*) on osoittautunut hyväksi malliorganismiksi AD:n riskigeenien tutkimisessa (22). Hiiriäkoilla *psen1*:n puutteen on osoitettu aiheuttavan neurodegeneraation ja somiittien kehityksen häiriötä (23), kun taas *psen2*:n aktiivisuuden estäminen tuottaa fenotyypiltään elinkelpoisia ja fertiilejä yksilöitä ilmentäen vain lieviä keuhkomuutoksia (24,25). Seeprakaloilla *Psen1*:n vaimentaminen morfolino-oligonukleotideilla on vaikuttanut somitogeneesiin ja pigmentaation (26,27) ja *psen1*<sup>-/-</sup>-mutaation on osoitettu aiheuttavan AD:ssakin muuttuneen keskushermoston

histamiinijärjestelmän kehityshäiriöitä (28,29), mutta poistogeenisen kannan varhaiskehitystä ei ole vielä tarkemmin tutkittu. *Psen2*:n toimintaa on liitetty lähinnä solujen apoptoosin säätelyyn, kun sen toiminnallisen muodon puutteen osoitettiin inhiboivan apoptoosia soluviljelmässä (30). Myöhemmin seeprakaloilla *psen2*-aktiivisuudella on osoitettu olevan muitakin tehtäviä, kuten melanosyyttien sekä selkäytimen dorsaalisten interneuroneiden (DoLA) määrän säätely (27). *Psen1<sup>+/-</sup>psen2<sup>-/-</sup>*-hiirillä on todettu immunologisia häiriöitä, jotka saattavat liittyä lymfosyyttien signalointiin solukalvolla (5). Vaikka preseniliinit ovat rakenteellisesti samankaltaisia ja ne toimivat samalla tavoin, niillä on selvästikin erilaisia ja osin jopa vastakkaisia tehtäviä solujen toiminnassa ja alkion kehityksessä, minkä vuoksi halusimme edelleen tutkia niiden toimintaa ja merkitystä seeprakalan kehityksessä.

## 2. Tavoitteet

Hypoteesimme mukaan preseniliinien aktiivisuuden menetys vähentäisi  $\gamma$ -sekretaasin aktiivisuutta, mikä vaikuttaa seeprakalojen kehitykseen ja näkyisi *Notch1a*:n ilmentymisessä. Työssä on tarkoitus havaita nämä muutokset estämällä *psen1* ja *psen2* geenien ilmentyminen seeprakala-alkioilla ja myös löytää eroja näiden kahden geenin toiminnan välillä. Tavoitteena on havaita poikkeavuuksia alkioiden sydämen sykkeen, somiittien muodostumisen sekä aivojen kasvun kehityksessä. Lisäksi tehdään *in situ* hybridisaatio *Notch1a*:n mRNA-ekspression selvittämiseksi. Kaikki kokeet tehdään kolme kertaa.

## 3. Materiaalit ja menetelmät

### 3.1 Seeprakalat

Seeprakalan varhaiskehitys voidaan jakaa seitsemään vaiheeseen (31). Hedelmöityksestä lähtien zygootti-, cleavage-, ja blastula-vaiheessa munasolu jakautuu blastomeereiksi (0-5 hpf, eng. hours post fertilization). Gastrulaatiossa muodostuu alkiolevy ja solut vaeltavat muodostamaan alkiokerrokset ja tapahtuu neurulaatio (5-10 hpf). Segmentaatio-vaiheessa somiitit muodostuvat, elinten aiheet kehittyvät ja alkio kasvaa ja kykenee jo



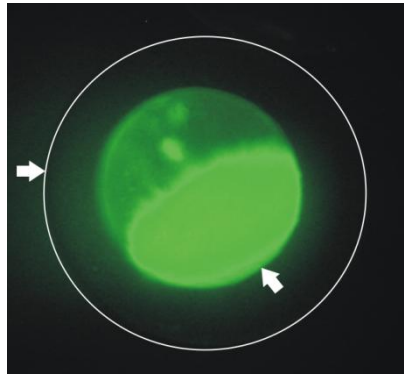
liikkeisiin (10–24 hpf). Seuraavan päivän ajan faryngula-vaiheessa alkion sydän alkaa sykkiä, alkio kasvaa pituutta sekä pigmentaatio kehittyy. Kuoriutumisvaiheessa (24–72 hpf) alkio jatkaa kasvua, sen elimet alkavat jo olla kehittyneitä valmiiksi ja se voi vapautua suonikalvon sisältä.

Tutkimukseen on haettu ja saatu Etelä-Suomen lääninhallitukselta eläinlääketieteellisen tutkimuskeskuksen lupa No ESAVI/3623/04.10.03/2012. Kokeessa käytetyt villityypin seeprakalat olivat Turku-kantaa ja *psen1*<sup>-/-</sup>-kalat (PS1 hu2547) oli tehty TILLING-menetelmällä (32) Hubrecht Instituutissa (Utrecht, Hollanti). *Psen1*<sup>-/-</sup>-kaloilla on pistemutaatio geenin eksoni 5:ssä, kun guaniini on muuttunut tyymiiniksi, mikä luo kohtaan ennenaikaisen pysäytyskodonin. Tällöin *psen1*:n normaali translaatio estyy, mikä vähentää  $\gamma$ -sekretaasin aktiivisuutta. *Psen2*:n aktiivisuus (sekä *psen1*:n kun poistogeeniset kalat eivät kuteneet) vaimennettiin injisoimalla alkioon morfolino-oligonukleotidia (MO). Kaloja kasvatettiin 28.5 °C:ssa E3-liuoksessa (5 mM NaCl, 0.17mM KCl, 0.33 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.33 mM MgSO<sub>4</sub>, Tris-puskuri, pH 7), valo/pimeäsyklillä 14h/10h. Osa näytteistä siirrettiin toisena päivänä liuokseen, jossa oli lisäksi 1-fenyyl-2-tioureaa (PTU) pigmentaation estämiseksi. Kalojen sukupuolten välisiä mahdollisia eroja ei huomioitu, sillä eroja ei aiemmin ole havaittu (33). Lisäksi seeprakalojen sukupuoli määräytyy vasta tutkittavan ajanjakson jälkeen eikä määräytymisen mekanismia vielä täysin tunneta (34).

MO:t ovat synteettisiä oligomeerejä, jotka sitoutuvat spesifisesti tietyn geenin mRNA:han sen nukleotidijärjestyksen perusteella, siten estäen ribosomiin kiinnittymisen ja translaation aminohappoketjuksi ja valmiiksi proteiiniksi (35,36). MO:t voivat myös estää mRNA:n silmukoitumisen estämällä tähän vaadittavien säätelyproteiinien tai snRNP:n kiinnittymisen mRNA:han. MO:lla voidaan siis vaimentaa halutun geenin toimintaa. Niiden rakenne heijastaa DNA:n ja RNA:n rakennetta emästen osalta, mikä mahdollistaa tavallisen emäspariutumisen ja spesifisyyden. MO:n emäkset ovat kiinni ribosomin sijaan morfoliinirenkaissa, johon kiinnittyy fosfaatin sijaan fosforodiamidaatti. (35) Morfoliino-oligonukleotidillä itsellään voi olla vaikutuksia alkion kehitykseen (35), mikä huomioitiin luomalla kontrolliryhmä standard control MO:lla, joka kohdentuu ihmisen  $\beta$ -globiiniin ja on seeprakaloilla teoriassa inaktiivinen eikä sillä pitäisi olla merkittäviä vaikutuksia.

Työssä käytettiin Gene Tools:n (LLC, Corvallis, OR, USA) fluoresoivia morfolino-oligonukleotideja (Psen1MO, Psen2MO ja standard control MO) (taulukko 1), joita laimennettiin steriilillä vedellä sekä fenolipunalla ja injisoitiin 1 ng/nl konsentraatiolla

(PV830 Pneumatic PicoPump, World Precision Instruments). Fluoresoiva MO injisoitiin alkoiden ruskuaispussiin 4 ng (8 ng psen1+psen2MO-ryhmällä) yksi- tai kaksisoluvaiheessa viimeistään tunnin ikäisinä (<1 hpf) ja alkiot, jotka eivät sisältäneet fluoresoivaa MO:ta poistettiin (kuva 3), jolloin tutkittavaksi saatiin vain alkioita joihin injektio oli onnistunut ja joiden preseniliinigeenit olivat vaimentuneina.



Kuva 3. 4 hpf alkiot ovat blastula-vaiheessa (31). Fluoresoiva MO on levinnyt alkioon tasaisesti ruskuaispussista injektion jälkeen. Suonikalvo on korostettu valkoisella viivalla ja nuolella. Toinen nuoli osoittaa jakautuvaan solumassaan, blastomeereihin.

Poistogeenisen *psen1*<sup>-/-</sup>-kannan epäsäännöllisen kutemisen seurauksena kokeet tehtiin villityypin kaloilla. Tällöin ryhmiksi muodostuivat villityyppi (WT), kontrolli (stdMO), psen1MO, psen2MO sekä kaksoisinjisoitu ryhmä (psen1+psen2MO).

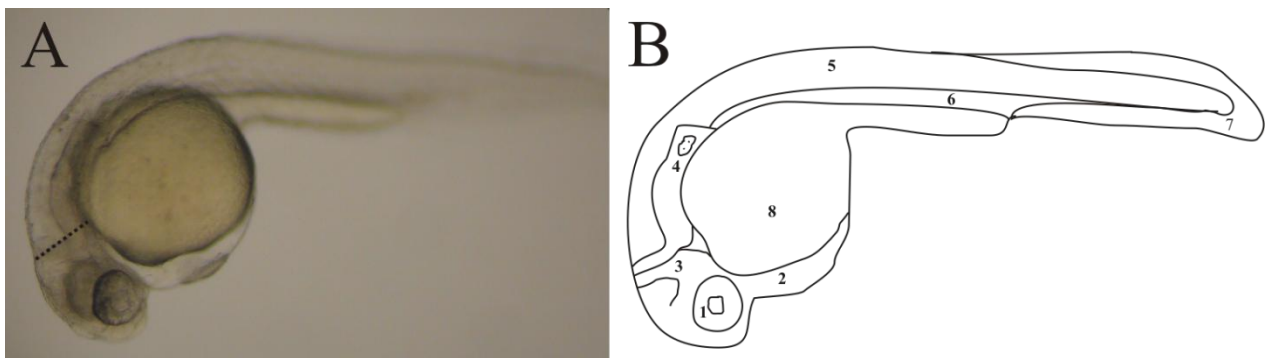
Morfoliino-oligonukleotidi	sekvenssi 5'-3'
standard control MO	CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA
psen1 MO	ACTAAATCAGCCATCGGAACTGTGA
psen2e3i3 MO	AAGGTAAAGCGGGTCATACAGCCGC

Taulukko 1: Morfoliino-oligonukleotidien sekvenssit. MO:n 3'-päässä fluoresoiva merkkiaine, jonka avulla voitiin havaita injektion onnistuminen fluoresenssimikroskoopilla (kuva 3).

### 3.2 Somiitit, syke ja aivojen koko

Yhden päivän ikäisinä alkoiden suonikalvo poistettiin manuaalisesti pinseteillä preparaattimikroskoopin alla. Somiittien kehitystä seurattiin laskemalla somiittien määrä (kuva 5) Leica MZ12 -valomikroskoopilla ja ottamalla kuvia NIKON E4500 -kameralla 1-3 päivää fertilisaation jälkeen (eng. days post fertilization, dpf). Samoin sydämen

kehitystä seurattiin laskemalla sydämen lyönnit minuutissa (bpm). Seeprakalan tässä kehitysvaiheessa kudosis on vielä läpinäkyvää jolloin sydämen sykäykset ovat hyvin havaittavissa (kuva 4). Aivojen kehitystä ja kokoa arvioitiin ottamalla keski- ja taka-aivojen rajalta dorsoventraalinen mitta (kuvat 4 ja 5). Kaikki kuvat otettiin samalla suurennoksella ja niitä verrattiin 1 mm:n mitta-asteikkoon, josta oli myös otettu kuva samoilla asetuksilla. Kuvia käsiteltiin CorelDraw-ohjelmistolla (CorelDRAW Graphics Suite 12). Kalat nukutettiin 4 %:lla tricainella (etyyli-3-aminobentsoaatti) kuvien ottamisen ja somiittien sekä sykkeen laskemisen ajaksi, jonka jälkeen ne fiksoitiin 2-4% PFA:lla ja säilöttiin metanolissa -20 °C:ssa. Kaikki tulokset analysoitiin GraphPad Prism -ohjelmalla (GraphPad Prism, GraphPad Software Ink, CA). Kahden ryhmän vertailut tehtiin Student's *t*-testillä ja useamman ryhmän 1 way ANOVA- sekä *post hoc*-testeillä.



Kuva 4. A: 1dpf, aivojen paksuus arvioitiin ottamalla keski- ja taka-aivojen rajalta dorsoventraalinen mitta; linja on merkitty kuvaan katkoviivalla. Sydämen sykkeen sai laskettua kun kudosis oli vielä läpinäkyvää sydämen kohdalla ja sykäykset helposti havaittavissa. Vasemmalla anteriori- ja ylhäällä dorsaalipuoli. B: havainnekuva anatomiasta; 1 silmä, 2 sydän, 3 keski-taka-aivoraja, 4 korva, 5 somiitit, 6 notochorda, 7 pyrstö, 8 ruskuaispussi

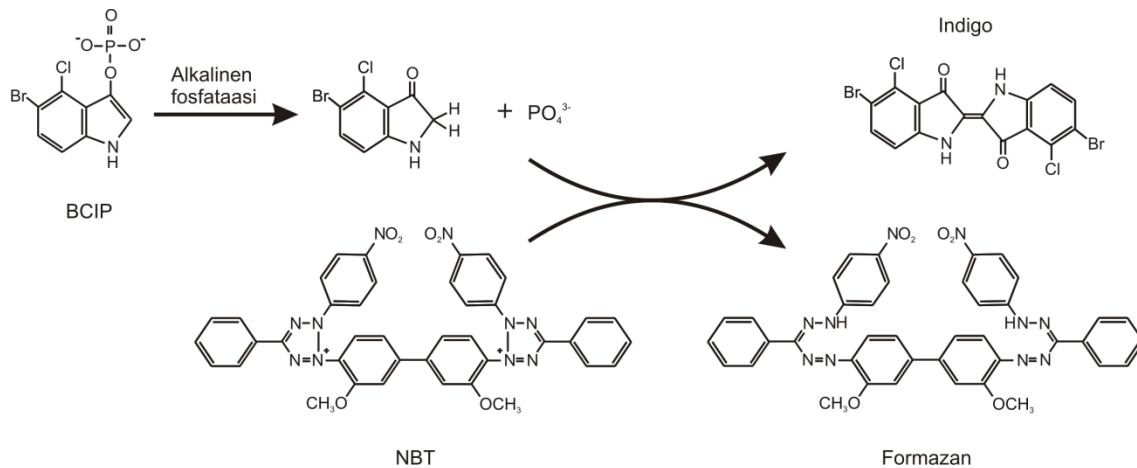


Kuva 5. 3dpf psen2MO. Kuvassa nuolella osoitettu ja dorsaalisesti V-mallisena rivinä hyvin erottuvat somiitit kehittyvät paraksiaalisesta mesodermista ensimmäisten päivien aikana. Nukutettuina kaloilta pystyi laskemaan somiittien määrän kunakin päivänä. Aivojen paksuus mitattiin 3dpf kaloilta silmän kaudaalipuolelta ventraalisen pigmenttijuosteen anteriorisesta sarvesta dorsaalisesti katkoviivan osoittamalla tavalla; pigmentaatio kuvailtu (31). Vasemmalla anteriori- ja ylhäällä dorsaalipuoli.

### 3.3 *in situ* hybridisaatio

*Notch1a*:n mRNA-ekspression selvittämiseksi tehtiin *in situ* hybridisaatio (ISH) Thissen ja Thissen protokollan mukaan (37) 1-4 dpf kokonaisille kaloille (eng. whole-mount method). ISH-tekniikka mahdollistaa tutkittavien geenien ilmentymisen laajuuden selvittämisen tarkasteltavassa kudoksessa, tässä tapauksessa seeprakala-alkoissa. ISH:ta varten syntetisoitiin *in vitro* transkriptiolla digoksigeniinilla leimattu koetin-RNA *Notch1a*:lle. Ensin DNA linearisoitiin ja pestiin MiniEluteReaction kit:llä (Quiagen), jonka jälkeen T7 RNA polymeraasilla syntetisoitiin digoksigeniinilla leimatuista nukleotideista RNA-koettimet. Koettimia pestiin ja pitoisuus tarkastettiin geelielektroforeesilla sekä spektrofotometrisesti.

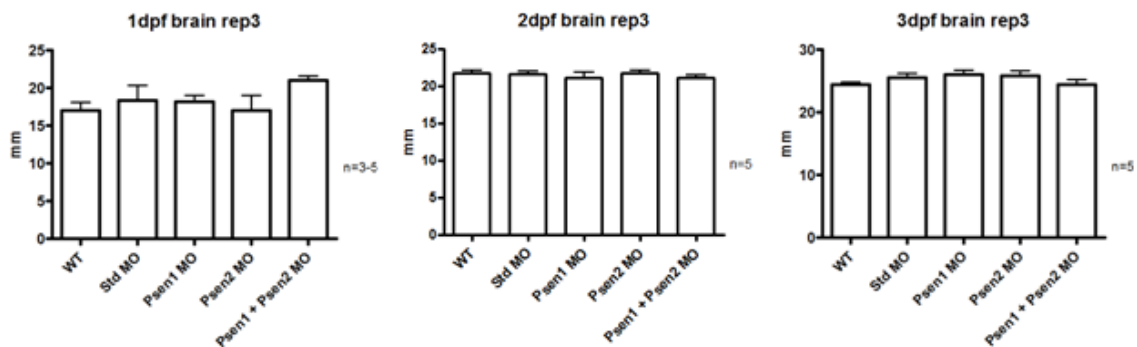
PFA:lla fiksoidut alkioit permeabilisoitiin proteiinikinaasi K:lla (Roche, lot 10821400), jonka jälkeen niihin lisättiin koetin, joka hybridisoitui komplementaarisen mRNA:n (*Notch1a*) kanssa alkion soluissa. Hybridisaation jälkeen koetin visualisoitiin immunohistokemiallisesti anti-digoksigeniinivasta-aineella (Fab fragments, lot 12486522, Sep 13), johon oli liitetty alkaalinen fosfataasi. Kun fosfataasille annettiin substraatiksi kromogeenista 5-bromo-4-kloori-3-indolifosfaattia (BCIP) ja tetratsoliumsiniä (NBT) niin reaktiossa syntyi indigo-väriainetta, joka voitiin havaita (kuva 6). Näytteet infiltroitiin glyseroliin kuvantamista varten. Näytteistä otettiin kuvia Leica DM IRB valomikroskoopilla ja Leica DFC490 -kameralla (Leica Application Suite, MultiFocus option, Leica Microsystems).



Kuva 6. Vasta-aineessa oleva alkalinen fosfataasi hydrolysoi BCIP:n, jonka jälkeen NBT hapettaa muodostuneen väliuutteen siniseksi väriaineeksi, joka mahdollistaa koettimen ja siten Notch1:a:n visualisoimisen.

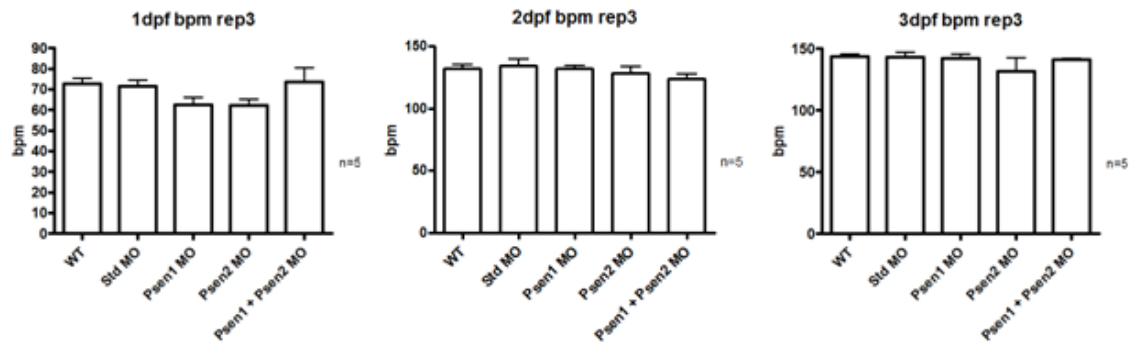
## 4. Tulokset

Työssä ei havaittu tilastollisesti merkittäviä eroja aivojen paksuuden suhteen keski- ja taka-aivojen rajalta mitattuna (kuva 7). Ensimmäisen päivän jälkeen seeprakalojen kasvu ryhmien välillä pysyi tasaisena ilman suuria vaihteluja.



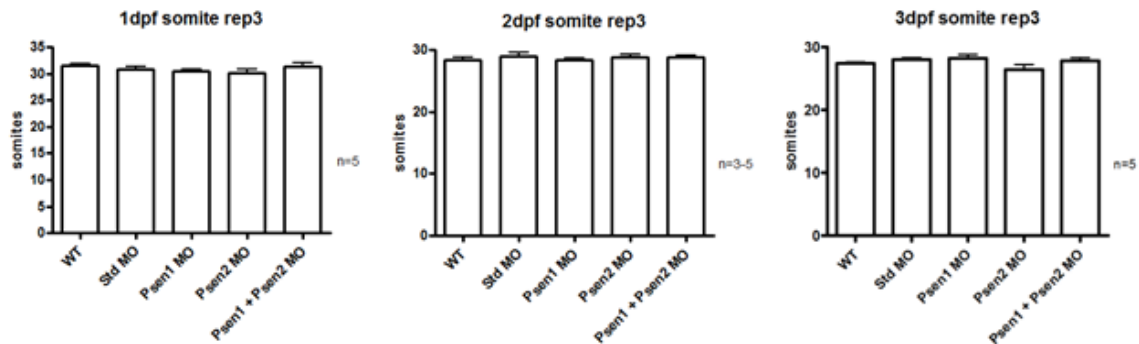
Kuva 7: Pylväsdiagrammit ryhmien aivojen kokoestimaatista 1-3 dpf. Ryhmien välillä ei tilastollisesti merkittäviä eroja ( $p > 0.05$ ).

Kalojen syke kiihtyi ensimmäisen päivän noin 70 bpm arvoista tasolle 140 bpm kolmanteen päivää mennessä, mutta ensimmäisen päivän vaihtelusta huolimatta tilastollisesti merkittäviä eroja ryhmien välille ei syntynyt (kuva 8).



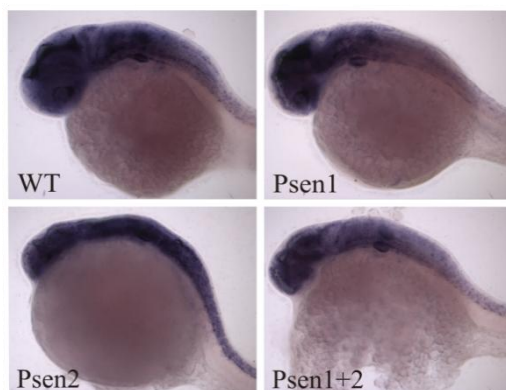
Kuva 8: Pylväsdiagrammit ryhmien sykkeestä 1-3 dpf. Ryhmien välillä ei tilastollisesti merkittäviä eroja ( $p > 0.05$ ).

Somiittien määrän suhteen ei syntynyt koeryhmien välille eroja (kuva 9). Ryhmien välillä ei ollut juurikaan eroja yhtenäkkään mittauspäivänä. Sen sijaan somiittien kehittyminen eteni ryhmien sisällä yksilöidenkin välillä erittäin tasaisesti.



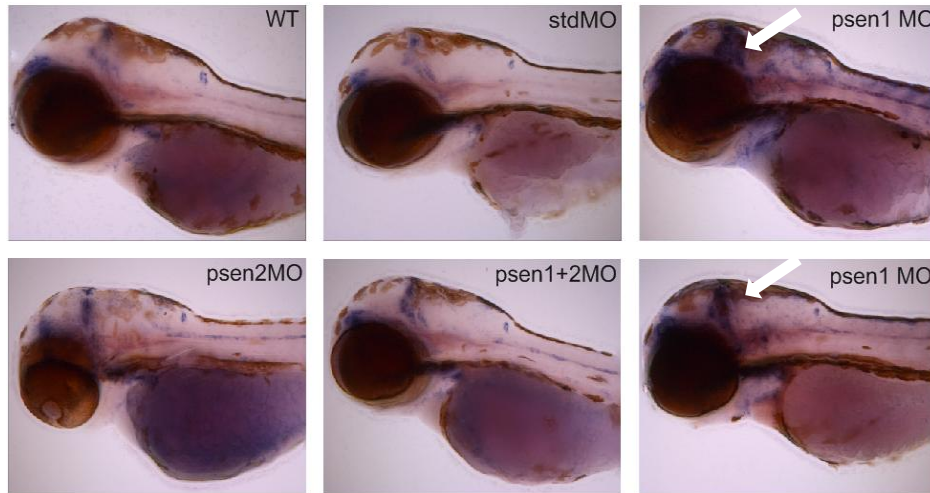
Kuva 9: Pylväsdiagrammit somiittien määristä ryhmissä 1-3 dpf. Ryhmien välille ei muodostunut tilastollisesti merkittäviä eroja ( $p > 0.05$ ).

*Notch1a*:n ilmentymisessä oli selvästi havaittavia eroja päivien, mutta myös ryhmien välillä. *Notch1a* ilmentyi kauttaaltaan voimakkaimmin alkion kehityksen ensimmäisinä päivinä (kuva 10) ja vaimenee neljänteen päivään mennessä vähäiseksi.



Kuva 10. 1dpf näytteiden *Notch1a*-ilmentymisessä ei ollut eroja. *Notch1a*:n ilmentyminen oli voimakkainta ensimmäisenä päivänä. Morfantit ovat ulkomuodoltaan erilaisia, mikä johtuu hybridisaatiokäsittelystä. Vasemmalla anteriori- ja ylhäällä dorsaalipuoli.

Toistettava ero ryhmien välisessä ilmentymisessä havaittiin 3dpf kaloissa, kun *psen1*-morfanteilla *Notch1a* ilmentyminen oli lisääntynyt diffuusisti taka-aivoissa verrattuna kontrolliryhmiin ja *psen1+2*-morfantteihin (kuva 11). Tulos oli sama kaikissa ISH-koesarjoissa. ISH on kuitenkin vain kvalitatiivinen tutkimus, eikä mahdollista ekspresion muutoksen tarkempaa kvantifiomista.



Kuva 11. 3dpf *Notch1a*:n ekspresio WT, stdMO, *psen1*MO, *psen2*MO, *psen1+psen2*MO-ryhmissä. *Psen1*MO-ryhmän ekspresio oli diffuusisti suurentunut taka-aivoissa (nuolet). Sekä *psen2*MO- että *Psen1+2*MO-ryhmän ekspresio vastasi kontrolliryhmiä. Vasemmalla anteriori- ja ylhäällä dorsaalipuoli.

## 5. Pohdinta

Hypoteesimme mukaan preseniliinien aktiivisuuden menetys olisi vaikuttanut seeprakalojen kehitykseen. Havaitimme siis *Notch1a*:n ilmentymisen lisääntyneen 3dpf *psen1*MO-ryhmässä verrattuna kontrolliryhmiin. Tämä voi tarkoittaa, että *psen1*:n puute tai sen aiheuttama *psen2*:n ylikompensaatio aiheuttaa ilmentymisen muutoksen. Aiemmissa tutkimuksissa (27) on esitetty *psen2*MO:n vähentävän *Notch*:n ilmentymistä. Tämä voisi selittää miksi *psen1+2*MO-ryhmä vastasi kontrolliryhmiä, jos ajatellaan *psen1*MO:n lisäävän ja *psen2*MO:n vähentävän ilmentymistä ja näin kumoten toistensa vaikutukset. Löydöksemme on kuitenkin vasta viitteellinen ja vaatii jatkossa lisäselvityksiä.

*Psen1*:llä ja *psen2*:lla on osoitettu olevan muitakin osin vastakkaisia vaikutuksia seeprakaloilla: *psen1*MO lisäsi *ngn-1* ekspressiota aivoissa ja selkäytimessä, mikä kertoo lisääntyneestä neurogeneesistä kun taas *psen1+2*MO vähensi ekspressiota (26). Toisena

esimerkkinä *psen2MO* yksinään lisäsi DoLA-neuroneiden määrää, mutta *psen1+2MO* yhdessä lievensi tätä kasvua (27).

Notch-signaaloinnin kohdegeenien, kuten *hes1*:n tai *neurog1*:n ekspression selvittäminen olisi antanut tarkentavaa lisätietoa preseniliinien vaikutuksesta Notch-signalointiin. Morfolino-oligonukleotidien aiheuttaman fenotyypin kontrollointi olisi voitu tehdä antamalla alkioille *psen* mRNA:ta, jolloin olisi saatu varmuus fenotyypin spesifisyydestä näille MO:lle. Myös preseniliinien ilmentymisen estyminen olisi voitu varmentaa PCR:llä. *Notch1a*:n ekspression muutoksen kvantifioiminen qPCR:llä tarkentaisi nyt havaittua viitteellistä löydöstä 3dpf kaloilla.

Hiirillä *psen1*:n puutos muistuttaa *Notch*-puutosta fenotyypiltään, joten *Notch* voisi olla *psen1*:n tärkein vaikutuskohde (27), lisäksi sporadisen AD:n potilailla *Notch* on upreguloitunut (21). Preseniliinit vaikuttavat Notch-signaaloinnin kautta mm. neurulaatioon (27): kun seeprakaloilla *psen1* tai *psen2* vaimennettiin MO:lla, niin erilaistumattomat monikykyiset solut muodostivat enemmän dorsaalisia sensorisia neuroneita ja vähemmän melanosyyttejä. Hiirillä *psen1* ja *psen2* inaktivaatio postnataalisissa neuroneissa aiheuttaa ikään liittyvää neurodegeneraatiota aivoissa, sisältäen muistin heikkenemistä, synapsien katoa, neuronien kuolemaa ja tau-hyperfosforylaatiota ilman A $\beta$ -muodostusta (50).

Tau-proteiini on fosforyloituneena altis muodostamaan fibrillejä ja se hajotetaan p62:n avustamana ubiquitinaation jälkeen proteasomissa tai vaihtoehtoisesti lysosomissa (51). *Psen1*:n osoitettiin säätelevän p62:n transkriptiota ja siten vaikuttavan tau-proteiinin hajotukseen, kun *psen1* FAD-mutaatio vähensi p62:sta sekä aiheutti tau-proteiinin kertymistä hiirillä ja seeprakaloilla tehdyissä tutkimuksissa (51). Preseniliinien puutos siis lisää molempien neurotoksisten peptidien, A $\beta$ 42:n ja tau:n kertymistä ja lisäksi AD-hiirimalleilla niiden on osoitettu toimivan yhdessä ja jopa lisäävän toistensa neurotoksisuutta (52).

Aiemmissä tutkimuksissa *psen1MO* ja *psen2MO* aiheuttavat molemmat hydrokefalusta (27,38) sekä *psen1MO* pienempää päätä (26). Hiirillä *psen1*<sup>-/-</sup> -genotyyppi aiheuttaa neuronikatoa aivoissa, mikä johtuu neuraalisten progenitorsolujen (NPC) liian aikaisesta erilaistumisesta Notch-signaaloinnin vaimentumisen myötä (42). Mielenkiintoista on myös se, että A $\beta$  on osoitettu olevan toksinen NPC:lle vaikuttaen niiden proliferaatioon,



erilaistumiseen ja selviytymiseen sekä edistäen niiden apoptoosia hippokampuksessa (43).

Preseniliinit liittyvät myös apoptoosin säätelyyn. Hiirillä *psen1*:n ilmentymisen esto aiheuttaa solukuolemaa (44), sekä hiirillä, joilla ei ole p53:a on myös alhaisempi *psen1*:n ilmentyminen (45). Lisäksi *psen2* aiheuttaa p53:n kautta apoptoosia ja *psen1*:n ilmentymisen laskua (46) kun taas molempien preseniliinien aktiivisuuden lasku ei lisää merkittävästi apoptoosia (26). *Psen1* näyttää siis suojaavan apoptoosilta kun taas *psen2* edistää sitä.

Aikuisilla jyrsoilla ja kädellisillä, ihmiset mukaan lukien, neurogeneesiä tapahtuu kahdessa paikassa; subventrikulaarinen alue lateraaliventrikkelin seinämässä ja subgranulaarinen alue hippokampuksen gyrus dentatuksessa molemmat sisältävät NPC:tä, muualla neurogeneesi on vähäistä tai tapahtuu vain tietyissä olosuhteissa (47). Aikuisilla seeprakaloilla ventrikulaaristen NPC:n jakautumista säätelee Notch-signaali lateraali-inhibition tavoin ja sen estäminen saa NPC:t jakautumaan ja erilaistumaan neuroneiksi (48).

Nämä preseniliinien mahdolliset suorat ja välilliset vaikutukset neurogeneesiin voisivat osaltaan selittää aiemmin havaittuja eroja aivojen koossa. Tässä tutkimuksessa aivojen koon mittaaminen osoittautui hankalaksi kun siihen ei ole vielä kehitetty vakiintunutta käytäntöä. Mittasimme aivojen paksuutta keski- ja taka-aivojen rajalta lateraalisesti katsottuna (kuvat 4 ja 5). Kalojen asentoa ei saatu aina vakioitua riittävän hyvin, jolloin osa alkioista saattoi olla toisia enemmän kyljellään, mikä vaikutti mittaukseen. Lisäksi alkioiden taipumus olla joko kyljellään tai selällään vaihtelee kehitysasteen mukaan (31). Tuloksista päätellen tämä menetelmä ei välttämättä ole tarpeeksi herkkä aivojen koon ja kehityksen mittaamiseen, kun ryhmien välille ei muodostunut mitattavia eroja.

Preseniliineilla ei ole raportoitu olevan vaikutuksia seeprakalojen sydämen kehitykseen tai toimintaan. Hiirillä tosin *psen1*:n puutteen osoitettiin häiritsevän angiogeneesiä (49), mikä ei ole yllättävää kun  $\gamma$ -sekretaasin substraatteja tiedetään olevan Notch:n lisäksi vascular endothelial growth factor reseptor-1 (VEGFR-1) sekä vascular endothelial cadherin (5). Seeprakala-alkioiden sydän ja verenkiertoelimistö alkaa kehittyä 24 hpf ja jatkavat kehittymistä 2 dpf saakka, jolloin sydäimestä erottuvat jo selvästi kammio ja eteinen sekä tasainen syke (31). Mahdolliset MO:n aiheuttamat muutokset sydämen kehityksessä siis todennäköisesti näkyisivät valittuina aikapisteinä. Tässä tutkimuksessa

eroja ei kuitenkaan havaittu kun sydämen kehitystä arvioitiin vain sykettä mittaamalla. Arvioimalla sydämen toimintaa laajemmin saataisiin mahdollisesti tarkempi arvio näiden geenien merkityksestä sydämen kehitykselle.

Psen1MO:n on osoitettu aiheuttavan häiriintynyttä somitogeneesiä etenkin pyrstön loppupäässä, sekä somiittien V-mallisen muodon puutetta, vaikka somiitit olisivatkin havaittavissa (10,26). Tässä tutkimuksessa ei kuitenkaan muodostunut eroja somiittien määrässä eri ryhmien välille. V-mallisista somiiteista kehittyvät myotomaaliset ventraaliset ja dorsaaliset lihakset, jotka alkavat supistella 17 hpf jälkeen (31). Psen1MO vaikutus lihasten kehitykseen voisi siis myös näkyä testaamalla kalojen lokomotoriikkaa. Lisäksi seeprakalan APP:n vastineen *appb*:n on osoitettu *in vivo* olevan välttämätön motoneuroneiden kehitykselle ja hermolihasliitosten muodostumiselle ja *appb*:n ekspression lasku aiheutti muutoksia seeprakalojen lokomotoriikkaan (39). Sekä psen1MO että psen2MO aiheuttivat sykliini G1 (*ccng1*) upregulaatiota, ja *ccng1* ilmentyy myotomeissa, joten se voi liittyä somitogeneesiin (40). Myös AD potilailla hippokampuksessa ja neokorteksissa ilmentyy lisääntynyt määrä *ccng1*:stä (41), joten jonkinlainen yhteys preseniliinien ja *ccng1*:n välillä näyttää olevan.

## 6. Johtopäätökset

Preseniliineillä on selvästi monia solunsisäisiä toimintoja  $\gamma$ -sekretaasiaktiivisuuden lisäksi, vaikkakaan niiden täydellisiä mekanismeja ja tarkoituksia ei vielä täysin tunneta. Tässä työssä saatiin viitteitä muuttuneesta Notch-signaloinnista seeprakaloilla, joiden preseniliinigeenien aktiivisuus oli vaimennettu morfoliino-oligonukleotideillä. Löydös vaatii kuitenkin vielä tarkempia tutkimuksia jatkossa. Preseniliinien osalta on tärkeää tutkimusta vielä tekemättä niiden merkityksen sekä neurodegeneratiivisten tautien mekanismien selvittämiseksi ja tulevaisuudessa mahdollisten hoitojen saavuttamiseksi.

## 7. Liitteet

### Reagenssit

anti-digoksigeniini-AP	Fab fragments	lot 12486522 Sep 13
Proteiinikinaasi K	Roche	lot 10821400
tRNA	Roche	lot 14042120

## Lähdeluettelo

- (1) De Strooper B, Annaert W. Novel research horizons for presenilins and -secretases in cell biology and disease. *Annual Review of Cell & Developmental Biology* 2010 Nov 10;26:235-260.
- (2) Groth C, Nornes S, McCarty R, Tamme R, Lardelli M. Identification of a second presenilin gene in zebrafish with similarity to the human Alzheimer's disease gene presenilin2. *Development Genes & Evolution* 2002 Nov;212(10):486-490.
- (3) Leimer U, Lun K, Romig H, Walter J, Grunberg J, Brand M, et al. Zebrafish (*Danio rerio*) presenilin promotes aberrant amyloid beta-peptide production and requires a critical aspartate residue for its function in amyloidogenesis. *Biochemistry (N Y)* 1999 Oct 12;38(41):13602-13609.
- (4) Selkoe D, Kopan R. Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annu Rev Neurosci* 2003;26:565-597.
- (5) McCarthy JV, Twomey C, Wujek P. Presenilin-dependent regulated intramembrane proteolysis and gamma-secretase activity. *Cellular & Molecular Life Sciences* 2009 May;66(9):1534-1555.
- (6) Kang DE, Soriano S, Xia X, Eberhart CG, De Strooper B, Zheng H, et al. Presenilin couples the paired phosphorylation of beta-catenin independent of axin: implications for beta-catenin activation in tumorigenesis. *Cell* 2002 Sep 20;110(6):751-762.
- (7) Zhang H, Sun S, Herreman A, De Strooper B, Bezprozvanny I. Role of presenilins in neuronal calcium homeostasis. *Journal of Neuroscience* 2010 Jun 23;30(25):8566-8580.
- (8) Lasky JL, Wu H. Notch Signaling, Brain Development, and Human Disease. *Pediatric Research. Review Issue* 2005 May;57(5 Part 2):104R-109R.
- (9) Vetrivel KS, Cheng H, Lin W, Sakurai T, Li T, Nukina N, et al. Association of gamma-secretase with lipid rafts in post-Golgi and endosome membranes. *J Biol Chem* 2004 Oct 22;279(43):44945-44954.
- (10) Nornes S, Groth C, Camp E, Ey P, Lardelli M. Developmental control of Presenilin1 expression, endoproteolysis, and interaction in zebrafish embryos. *Exp Cell Res* 2003 Sep 10;289(1):124-132.

- (11) Bu G. Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Nature Reviews Neuroscience* 2009 May;10(5):333-344.
- (12) Kirschenbaum F, Hsu S, Cordell B, McCarthy JV. Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$  Regulates Presenilin 1 C-terminal Fragment Levels. *Journal of Biological Chemistry* 2001 August 17;276(33):30701-30707.
- (13) Newman M, Nornes S, Martins RN, Lardelli MT. Robust homeostasis of Presenilin1 protein levels by transcript regulation. *Neurosci Lett* 2012 Jun 21;519(1):14-19.
- (14) van de Hoef DL, Bonner JM, Boulianne GL. FKBP14 is an essential gene that regulates Presenilin protein levels and Notch signaling in *Drosophila*. *Development* 2013 Feb;140(4):810-819.
- (15) Cao X, Sudhof TC. A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* 2001 Jul 6;293(5527):115-120.
- (16) Dahlgren KN, Manelli AM, Stine WB, Jr, Baker LK, Krafft GA, LaDu MJ. Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability. *J Biol Chem* 2002 Aug 30;277(35):32046-32053.
- (17) Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Citron M, Suzuki N, et al. Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med* 1996 - 1996 Aug;Aug;2(8):864-870.
- (18) Fischer A, Gessler M. Delta-Notch--and then? Protein interactions and proposed modes of repression by Hes and Hey bHLH factors. *Nucleic Acids Res* 2007;35(14):4583-4596.
- (19) Berezovska O, Jack C, McLean P, Aster JC, Hicks C, Xia W, et al. Aspartate mutations in presenilin and gamma-secretase inhibitors both impair notch1 proteolysis and nuclear translocation with relative preservation of notch1 signaling. *J Neurochem* 2000 Aug;75(2):583-593.
- (20) Okochi M, Steiner H, Fukumori A, Tanii H, Tomita T, Tanaka T, et al. Presenilins mediate a dual intramembranous gamma-secretase cleavage of Notch-1. *EMBO J* 2002 Oct 15;21(20):5408-5416.
- (21) Fischer DF, van Dijk R, Sluijs JA, Nair SM, Racchi M, Levelt CN, et al. Activation of the Notch pathway in Down syndrome: cross-talk of Notch and APP. *FASEB Journal* 2005 Sep;19(11):1451-1458.
- (22) Panula P, Chen YC, Priyadarshini M, Kudo H, Semenova S, Sundvik M, et al. The comparative neuroanatomy and neurochemistry of zebrafish CNS systems of relevance to human neuropsychiatric diseases. *Neurobiol Dis* 2010 Oct;40(1):46-57.

- (23) Shen J, Bronson RT, Chen DF, Xia W, Selkoe DJ, Tonegawa S. Skeletal and CNS defects in Presenilin-1-deficient mice. *Cell* 1997 May 16;89(4):629-639.
- (24) Herreman A, Hartmann D, Annaert W, Saftig P, Craessaerts K, Serneels L, et al. Presenilin 2 deficiency causes a mild pulmonary phenotype and no changes in amyloid precursor protein processing but enhances the embryonic lethal phenotype of presenilin 1 deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 Oct 12;96(21):11872-11877.
- (25) Donoviel DB, Hadjantonakis AK, Ikeda M, Zheng H, Hyslop PS, Bernstein A. Mice lacking both presenilin genes exhibit early embryonic patterning defects. *Genes Dev* 1999 Nov 1;13(21):2801-2810.
- (26) Campbell WA, Yang H, Zetterberg H, Baulac S, Sears JA, Liu T, et al. Zebrafish lacking Alzheimer presenilin enhancer 2 (Pen-2) demonstrate excessive p53-dependent apoptosis and neuronal loss. *J Neurochem* 2006 Mar;96(5):1423-1440.
- (27) Nornes S, Newman M, Wells S, Verdile G, Martins RN, Lardelli M. Independent and cooperative action of Psen2 with Psen1 in zebrafish embryos. *Exp Cell Res* 2009 Oct 1;315(16):2791-2801.
- (28) Sundvik M, Chen YC, Panula P. Presenilin1 regulates histamine neuron development and behavior in zebrafish, danio rerio. *Journal of Neuroscience* 2013 Jan 23;33(4):1589-1597.
- (29) Panula P, Rinne J, Kuokkanen K, Eriksson KS, Sallmen T, Kalimo H, et al. Neuronal histamine deficit in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 1998 Feb;82(4):993-997.
- (30) Vito P, Lacana E, D'Adamio L. Interfering with apoptosis: Ca(2+)-binding protein ALG-2 and Alzheimer's disease gene ALG-3. *Science* 1996 Jan 26;271(5248):521-525.
- (31) Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics* 1995 Jul;203(3):253-310.
- (32) Wienholds E, van Eeden F, Kosters M, Mudde J, Plasterk RH, Cuppen E. Efficient target-selected mutagenesis in zebrafish. *Genome Res* 2003 Dec;13(12):2700-2707.
- (33) Sundvik M, Panula P. Organization of the histaminergic system in adult zebrafish (*Danio rerio*) brain: neuron number, location, and cotransmitters. *J Comp Neurol* 2012 Dec 1;520(17):3827-3845.
- (34) Orban L, Sreenivasan R, Olsson P. Long and winding roads: Testis differentiation in zebrafish. *Mol Cell Endocrinol* 2009 11/27;312(1-2):35-41.
- (35) Eisen JS, Smith JC. Controlling morpholino experiments: don't stop making antisense. *Development* 2008 May;135(10):1735-1743.
- (36) Ekker SC, Larson JD. Morphant technology in model developmental systems. *Genesis: the Journal of Genetics & Development* 2001 Jul;30(3):89-93.

- (37) Thisse C, Thisse B. High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nature Protocols* 2008;3(1):59-69.
- (38) Nornes S, Newman M, Verdile G, Wells S, Stoick-Cooper CL, Tucker B, et al. Interference with splicing of Presenilin transcripts has potent dominant negative effects on Presenilin activity. *Hum Mol Genet* 2008 Feb 1;17(3):402-412.
- (39) Abramsson A, Kettunen P, Banote RK, Lott E, Li M, Arner A, et al. The zebrafish amyloid precursor protein-b is required for motor neuron guidance and synapse formation. *Dev Biol* (0).
- (40) Newman M, Tucker B, Nornes S, Ward A, Lardelli M. Altering presenilin gene activity in zebrafish embryos causes changes in expression of genes with potential involvement in Alzheimer's disease pathogenesis. *J Alzheimer's Dis* 2009;16(1):133-147.
- (41) Jordan-Sciutto K, Morgan K, Bowser R. Increased Cyclin G1 Immunoreactivity During Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 1999 - 1999 Dec;Dec;1(6):409-417.
- (42) Handler M, Yang X, Shen J. Presenilin-1 regulates neuronal differentiation during neurogenesis. *Development* 2000 Jun;127(12):2593-2606.
- (43) Haughey NJ, Nath A, Chan SL, Borchard AC, Rao MS, Mattson MP. Disruption of neurogenesis by amyloid beta-peptide, and perturbed neural progenitor cell homeostasis, in models of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 2002 Dec;83(6):1509-1524.
- (44) Roperch JP, Alvaro V, Prieur S, Tuynder M, Nemani M, Lethrosne F, et al. Inhibition of presenilin 1 expression is promoted by p53 and p21WAF-1 and results in apoptosis and tumor suppression. *Nat Med* 1998 Jul;4(7):835-838.
- (45) Amson R, Lassalle JM, Halley H, Prieur S, Lethrosne F, Roperch JP, et al. Behavioral alterations associated with apoptosis and down-regulation of presenilin 1 in the brains of p53-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 May 9;97(10):5346-5350.
- (46) Alves da Costa C, Paitel E, Mattson MP, Amson R, Telerman A, Ancolio K, et al. Wild-type and mutated presenilins 2 trigger p53-dependent apoptosis and down-regulate presenilin 1 expression in HEK293 human cells and in murine neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 Mar 19;99(6):4043-4048.
- (47) van Tijn P, Kamphuis W, Marlatt MW, Hol EM, Lucassen PJ. Presenilin mouse and zebrafish models for dementia: focus on neurogenesis. *Prog Neurobiol* 2011 Feb;93(2):149-164.
- (48) Chapouton P, Skupien P, Hesl B, Coolen M, Moore JC, Madelaine R, et al. Notch activity levels control the balance between quiescence and recruitment of adult neural stem cells. *Journal of Neuroscience* 2010 Jun 9;30(23):7961-7974.

- (49) Nakajima M, Yuasa S, Ueno M, Takakura N, Koseki H, Shirasawa T. Abnormal blood vessel development in mice lacking presenilin-1. *Mech Dev* 2003 Jun;120(6):657-667.
- (50) Saura CA, Choi SY, Beglopoulos V, Malkani S, Zhang D, Shankaranarayana Rao BS, et al. Loss of presenilin function causes impairments of memory and synaptic plasticity followed by age-dependent neurodegeneration. *Neuron* 2004 Apr 8;42(1):23-36.
- (51) Tung Y, Wang B, Hsu W, Hu M, Her G, Huang W, et al. Presenilin-1 Regulates the Expression of p62 to Govern p62-dependent Tau Degradation. *Mol Neurobiol* 2013 - 2013 Jun 23;Jun 23.
- (52) Ittner LM, Gotz J. Amyloid- and tau--a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience* 2011 Feb;12(2):65-72.