

Aus der Klinik für Neurologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. H.-P. Hartung

**Molekulare Mechanismen axonaler Regeneration
retinaler Ganglienzellen im Zebrafisch**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Karl Pascal Kalbhen

2018

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. Dietmar Fischer

Zweitgutachterin: Univ.-Prof. Dr. Olga Sergeeva

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Diekmann H, **Kalbhen P** and Fischer D (2015) Active mechanistic target of rapamycin plays an ancillary rather than essential role in zebrafish CNS axon regeneration. *Front. Cell. Neurosci.* 9:251. doi: 10.3389/fncel.2015.00251

Diekmann H, **Kalbhen P** and Fischer D (2015) Characterization of optic nerve regeneration using transgenic zebrafish. *Front. Cell. Neurosci.* 9:118. doi: 10.3389/fncel.2015.00118

Zusammenfassung

Die regenerativen Fähigkeiten des zentralen Nervensystems (ZNS) von Säugetieren nehmen nach der Geburt drastisch ab, sodass axonale Schädigungen zu einem dauerhaften Funktionsverlust der betroffenen Systeme führen. Fische hingegen sind in der Lage, Verletzungen des ZNS funktionell vollständig zu regenerieren. Dies macht sie zu einem interessanten Modell zur Erforschung der diesen Regenerationsprozessen zugrunde liegenden molekularen Mechanismen und zur Entwicklung neuer Therapieoptionen für Säugetiere. In Nagetieren konnten bereits verschiedene mit axonaler Regeneration assoziierte, zelluläre Signalkaskaden wie JAK/STAT3, PI3K/AKT/mTOR und MAPK/ERK identifiziert werden. Da diese Proteine zwischen Fischen und Säugetieren stark konserviert sind, wurden die entsprechenden Signalwege im Hinblick auf ihre Bedeutung für die Regeneration retinaler Ganglienzellen (RGZ) von Zebrafischen untersucht. Während der MAPK/ERK-Signalweg im Zebrafisch nach einer Sehnervverletzung nur eine untergeordnete Bedeutung zu haben scheint, kam es zur Induktion des PI3K/AKT-Signalwegs und in Folge zur Aktivierung des *mechanistic target of rapamycin* (mTOR). Dabei zeigte sich, dass sich die Regulation der mTOR-Aktivität in Fischen und Säugetieren deutlich unterscheidet. Während in unverletzten Nagetieren eine Grundaktivität von mTOR vorhanden ist, war dies in naiven Fisch-RGZ nicht nachweisbar. Nach einer Verletzung des Sehnervs in der Maus wird die mTOR-Aktivität herunterreguliert und eine experimentelle Aufrechterhaltung, z. B. durch Blockade des *phosphate and tensin homolog* (PTEN), kann einige Axone zur Regeneration stimulieren. Eine Nervenschädigung im Zebrafisch führte hingegen zu einem deutlichen Aktivitätsanstieg von mTOR sowohl *in vivo* als auch in dissoziierten Zellkulturen. Dieser war jedoch transient und fiel bereits 3 Tage später wieder auf das Ausgangsniveau zurück. Eine Hemmung des vorgeschalteten Signalwegs mittels des PI3-Kinase-Inhibitors LY294002 oder auch direkt von mTOR durch Rapamycin konnte das basale Neuritenwachstum jedoch nicht beeinträchtigen. Dementsprechend war die Aktivität von mTOR für die axonale Regeneration nach einer Sehnervverletzung im Zebrafisch nicht essenziell. Es konnte dennoch gezeigt werden, dass die Aktivität von mTOR an der Vermittlung von Zytokin- und durch PTEN-Inhibition induziertem Neuritenwachstum beteiligt war und demnach, ähnlich wie bei Säugetieren, regenerationsfördernd wirkte.

Abstract

The regenerative capacity of the mammalian central nervous system (CNS) is dramatically reduced after birth, leading to terminal functional loss after axonal injuries. Fish, on the other hand, are capable of regenerating CNS lesions and regain full functionality of the impaired system. Therefore, they are an attractive model organism for studying molecular mechanisms underlying axon regeneration upon injury and developing possible therapeutic strategies. In mammals, several intrinsic signaling pathways such as JAK/STAT3, PI3K/AKT/mTOR and MAPK/ERK have been associated with axon regeneration. Since those proteins are highly conserved between fish and mammals, the current thesis analyzed the significance of those pathways for the regeneration of retinal ganglion cells (RGC) in zebrafish. MAPK/ERK signaling appeared to play no important role after an optic nerve crush in zebrafish. The PI3K/AKT pathway, on the other hand, was induced after injury resulting in increased activity of the mechanistic target of rapamycin (mTOR). The regulation of mTOR activity differs greatly between fish and mammals. While healthy rodents show a constitutive mTOR activity, there was no activity at all observed in naïve zebrafish RGC. After injury mTOR is reduced in mice and an artificial upregulation allows for some axons to regenerate, for example by inhibiting the phosphate and tensin homolog (PTEN). Axon injury in zebrafish resulted in a massive increase of mTOR activity *in vivo* as well as in dissociated cell cultures. However, this induction was only transient and was normalized after 3 days. Inhibition of the signaling pathway using the PI3K-Inhibitor LY294002 or Rapamycin, a direct inhibitor of mTOR, did not compromise basal neurite growth. Thus, mTOR activity was not essential for axon regeneration after optic nerve injury in zebrafish. Nevertheless, mTOR activity correlated with axon growth induced by cytokines and PTEN-inhibition, and, therefore, is involved in CNS axon regeneration in zebrafish similar to mammals.

Abkürzungsverzeichnis

4E-BP1	<i>4E-binding protein 1</i>
Abb.	Abbildung
AF	<i>axiogenesis factor</i>
AKT	Proteinkinase B
bpV	<i>bisperoxovanadium</i>
BSA	Rinderserumalbumin
CaCl₂	Calciumchlorid
CHAT	<i>choline acetyltransferase</i>
CNTF	<i>ciliary neurotrophic factor</i>
CSPG	<i>chondroitin sulfate proteoglycan</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpi	<i>days post injury</i>
DS	<i>donkey serum</i>
DTT	Dithiothreitol
ERK	<i>extracellular signal regulated kinase</i>
FBS	fetales Kälberserum
FS	Faserschicht
GAP43	<i>growth-associated protein 43</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GZS	Ganglienzellschicht
HCl	Chlorwasserstoff
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HWG	Hinterwurzelganglion
INS	innere nukleäre Schicht
IPS	innere plexiforme Schicht
JAK	Januskinase
KCl	Kaliumchlorid
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>
ly	LY294002
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
mM	Millimolar
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MS222	<i>Tricaine methanesulfonate</i>
mTOR	<i>mechanistic target of rapamycin</i>
NaF	Natriumfluorid
Na₃VO₄	Natriummetavanadat
nM	Nanomolar
ONL	<i>outer nuclear layer</i> (äußere nukleäre Schicht)
OPL	<i>outer plexiform layer</i> (äußere plexiforme Schicht)

PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBS-T	Phosphatgepufferte Salzlösung + Tween 20
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDK 1/2	Phosphatidylinositol-abhängige Kinasen 1 und 2
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP₂	<i>phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate</i>
PIP₃	<i>phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphate</i>
PLD	Phospholipase D
pS6	phosphoryliertes ribosomales Protein S6
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
Rap	Rapamycin
RGZ	retinale Ganglienzelle
Rictor	<i>Rapamycin-insensitive companion of mTOR</i>
RNA	Ribonukleinsäure
S6	ribosomales Protein S6
S6K1	S6 Kinase 1
SDS	Natriumlaurylsulfat
SHP-2	<i>src-homology 2 domain</i>
SOCS3	<i>suppressor of cytokine signaling 3</i>
STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSC1	<i>tuberous sclerosis complex 1</i>
WB	Western Blot
μM	Mikromolar
ZNS	Zentralnervensystem

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Axonale Regeneration im Säugetier nach einer Sehnervverletzung.....	1
1.1.1 Regenerationsfördernde Effekte von Zytokinen.....	2
1.1.2 Signalwege Zytokin-vermittelter axonaler Regenerationsprozesse.....	2
1.1.3 Pharmakologische Manipulation regenerationsassoziiierter Signalwege....	5
1.2 Regeneration im Fisch nach einer Sehnervschädigung.....	6
1.2.1 Regenerationskompetente Fischmodelle	6
1.2.2 Transgene GAP43:GFP-Zebrafische	8
1.2.3 Intrinsische Signalwege axonaler Regeneration im Fisch	8
2. Ziele der Arbeit	10
3. Material und Methoden.....	11
3.1 Materialien	11
3.1.1 Chemikalien	11
3.1.2 Puffer und Lösungen.....	11
3.1.3 Geräte.....	11
3.1.4 Programme.....	12
3.2 Zebrafisch.....	12
3.3 Neuritenauswachsassay.....	13
3.3.1 Dissoziierte Zebrafischretinakulturen.....	13
3.3.2 Immunzytochemische Färbung.....	14
3.3.3 Auswertung	14
3.4 Sehnervverletzung.....	15
3.5 <i>In-vivo</i> -Rapamycinbehandlung	15
3.6 Histologie von Zebrafischretinae	15
3.6.1 Herstellung der Retinapräparate	15
3.6.2 Immunhistochemische Färbung.....	15
3.6.3 Auswertung.....	16
3.7 RNA-Isolation und quantitative <i>real-time</i> Polymerase-Kettenreaktion.....	16
3.8 Western Blot.....	17
4. Ergebnisse.....	19
4.1 Identifizierung von Markern für RGZ des Zebrafisches.....	19

4.2	CNTF verstärkt Neuritenwachstum von Zebrafisch-RGZ.....	22
4.3	Keine MAPK-Induktion nach Sehnervverletzung in der Zebrafischretina.....	25
4.4	Induktion von AKT in der Zebrafischretina nach Sehnervschädigung.....	27
4.5	Verletzung des Sehnervs induziert mTOR-Aktivität in der Zebrafischretina..	29
4.6	<i>In-vitro</i> -mTOR-Aktivität in Zebrafisch-RGZ-Kulturen	31
4.7	mTOR-Aktivität beeinflusst das Neuritenwachstum von RGZ	34
4.8	<i>In-vivo</i> -Applikation von Rapamycin unterdrückt mTOR-Aktivität.....	35
5.	Diskussion	37
5.1	Etablierung von Neuritenauswachsassays von Zebrafisch-RGZ	37
5.2	Einfluss von CNTF auf die axonale Regeneration im Zebrafisch	39
5.3	Bedeutung von MAPK/ERK und AKT für die Regeneration im Zebrafisch ..	39
5.4	mTOR-Aktivität im Zebrafisch im Vergleich zum Säugetier.....	41
5.5	Stimulation und Inhibition von mTOR-Aktivität.....	43
5.6	Beteiligung weiterer Signalwege wahrscheinlich	45
5.7	Schlussfolgerungen	45
6.	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	47

1. Einleitung

Verletzungen im zentralen Nervensystem (ZNS) von Säugetieren können unter physiologischen Bedingungen nicht regeneriert werden und führen zum Tod der Nervenzellen sowie zum irreversiblen Funktionsverlust. Traumatische Verletzungen und ischämische oder inflammatorische Prozesse resultieren somit in einer terminalen Schädigung. Zurzeit gibt es keine therapeutischen Interventionsmöglichkeiten, um diesen Prozessen entgegenzuwirken, sodass die Notwendigkeit zu weiterer Forschung auf diesem Gebiet besteht.

1.1 Axonale Regeneration im Säugetier nach einer Sehnervverletzung

Die Retina und der optische Nerv sind Teil des ZNS und aufgrund der guten operativen Zugänglichkeit ein geeignetes Modellsystem zur experimentellen Erforschung axonaler Regenerationsprozesse (Fischer and Leibinger, 2012). In Nagern konnten in den letzten Jahren bereits verschiedene Ursachen für die fehlende Regenerationsfähigkeit von Säugern identifiziert werden. Zum einen ist die intrinsische regenerative Kapazität ihrer ZNS-Neuronen ungenügend, um nach einer Verletzung ein erneutes Wachstum ihrer Axone zu induzieren (Schwab and Bartholdi, 1996; Goldberg et al., 2002; Fischer and Leibinger, 2012). Zudem werden Reparaturprozesse durch inhibitorische Signale des den optischen Nerven umgebenden Myelins sowie durch eine sich an der Verletzungsstelle bildenden Glianarbe blockiert (Tom et al., 2004; Fischer, 2012). So kommt es nach einer traumatischen Verletzung schlussendlich zum apoptotischen Zelltod der Nervenzelle (Berkelaar et al., 1994; Fischer et al., 2004).

Da das Überleben der Nervenzellen Voraussetzung für eine erfolgreiche Axonregeneration ist, kann der Sehnerv nur regenerieren, wenn der Untergang der Neuronen verhindert werden kann. Dabei spielen verschiedene Faktoren eine wichtige Rolle, die neuroprotektive Effekte vermitteln (Fischer and Leibinger, 2012).

1.1.1 Regenerationsfördernde Effekte von Zytokinen

Untersuchungen haben gezeigt, dass Nervenzellen durch eine sogenannte inflammatorische Stimulation in einen regenerativen Zustand transferiert werden können. Diese kann z. B. durch eine Verletzung der Linse im Auge, durch intravitreale Applikation von β/γ -Kristallinen, Zymosan oder Agonisten des *toll-like receptor 2* ausgelöst werden und in gewissem Maße die axonale Regeneration fördern (Fischer et al., 2000; Leon et al., 2000; Leibinger et al., 2009, 2013). Die inflammatorische Stimulation induziert unter anderem die Expression der neuroprotektiven und wachstumsfördernden Zytokine *ciliary neurotrophic factor* (CNTF) und *leukemia inhibitory factor* (LIF), durch die zelluläre Signalkaskaden aktiviert werden (Fischer et al., 2000; Leibinger et al., 2009, 2013; Hauk et al., 2010). Im Rahmen von *In-vitro*-Studien konnte gezeigt werden, dass CNTF und LIF konzentrationsabhängig das Neuritenwachstum retinaler Ganglienzellen (RGZ) deutlich steigern (Yin et al., 2003; Müller et al., 2007, 2009; Ahmed et al., 2009; Leibinger et al., 2009; Sengottuvel et al., 2011). Dementsprechend kann auch eine direkte intravitreale Applikation von CNTF (Lingor et al., 2008; Müller et al., 2009) sowie eine virusvermittelte Zytokinexpression in retinalen Zellen axonale Regenerationsprozesse fördern (Leaver et al., 2006; Pernet et al., 2013a). Eine intravitreale Applikation von neutralisierenden Antikörpern gegen CNTF sowie der genetische *knockout* von CNTF oder LIF reduzieren dagegen den Effekt der inflammatorischen Stimulation erheblich. Dadurch wird ihre signifikante Rolle bei der Vermittlung von regenerationsfördernden Effekten unterstrichen (Leibinger et al., 2009; Fischer and Leibinger, 2012).

1.1.2 Signalwege Zytokin-vermittelter axonaler Regenerationsprozesse

Zytokine der Interleukin-6-Familie wie CNTF aktivieren in RGZ mehrere Signalwege, welche die Regeneration positiv beeinflussen. Dabei bindet CNTF zunächst an eine spezifische CNTF α -Rezeptoruntereinheit, die dann die Signalrezeptoruntereinheit gp130 sowie die LIF-Rezeptoruntereinheit rekrutiert. Dieser Rezeptorkomplex aktiviert über die Januskinase (JAK) zum einen den Transkriptionsaktivator *signal transducers and activators of transcription 3* (STAT3), welcher dimerisiert und die Expression von regenerationsassoziierten Genen fördert (Stahl et al., 1994; Hemmann et al., 1996; Fischer and Leibinger, 2012) (vgl. Abb. 1). So konnte gezeigt werden, dass eine

konstitutive Aktivierung von STAT3 in RGZ sich positiv auf die axonale Regeneration auswirkt (Pernet et al., 2013b). Weiterhin kann durch genetische Deletion des *suppressor of cytokine signaling 3* (SOCS3), einem Rückkopplungs-Inhibitor des JAK/STAT-Signalwegs, welcher eine Ursache für die fehlende Regenerationsfähigkeit des Säugetier-ZNS sein könnte, das Axonwachstum ebenfalls gesteigert werden (Smith et al., 2009).

Zum anderen wird die Tyrosinphosphatase *src-homology 2 domain* (SHP-2) phosphoryliert, wodurch dann die *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) und *extracellular signal regulated kinase* (ERK) sowie die *phosphatidyl inositol-3-phosphatekinase* (PI3K) aktiviert werden. Die PI3K konvertiert *phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate* (PIP₂) zu *phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphate* (PIP₃), das über die Phosphatidylinositol-abhängigen Kinasen 1 und 2 (PKD1/2) die Proteinkinase B (AKT) phosphoryliert. Das *phosphatase and tensin homolog* (PTEN) ist ein negativer Regulator des PI3K/AKT-Signalweges und wirkt der Aktivierung von AKT entgegen, indem es die Rückumwandlung von PIP₃ zu PIP₂ katalysiert (vgl. Abb. 1). Ein nachgeschaltetes Ziel von AKT ist unter anderem das *mechanistic target of rapamycin* (mTOR), das die ribosomale *S6 kinase 1* (S6K1) sowie den eukaryotischen Initiationsfaktor *4E-binding protein 1* (4E-BP1) phosphoryliert und damit die Proteintranslation und die Lipidsynthese beeinflusst (Laplante and Sabatini, 2009; Fischer and Leibinger, 2012) (vgl. Abb. 1).

Insgesamt führt eine Behandlung von RGZ mit CNTF oder eine inflammatorische Stimulation zu einer Aktivierung der Signalwege JAK/STAT3, PI3K/AKT/mTOR und MAPK/ERK, deren pharmakologische Manipulation einen interessanten Ansatz zum besseren Verständnis regenerationsfördernder Prozesse bietet (Park et al., 2004; Müller et al., 2009).

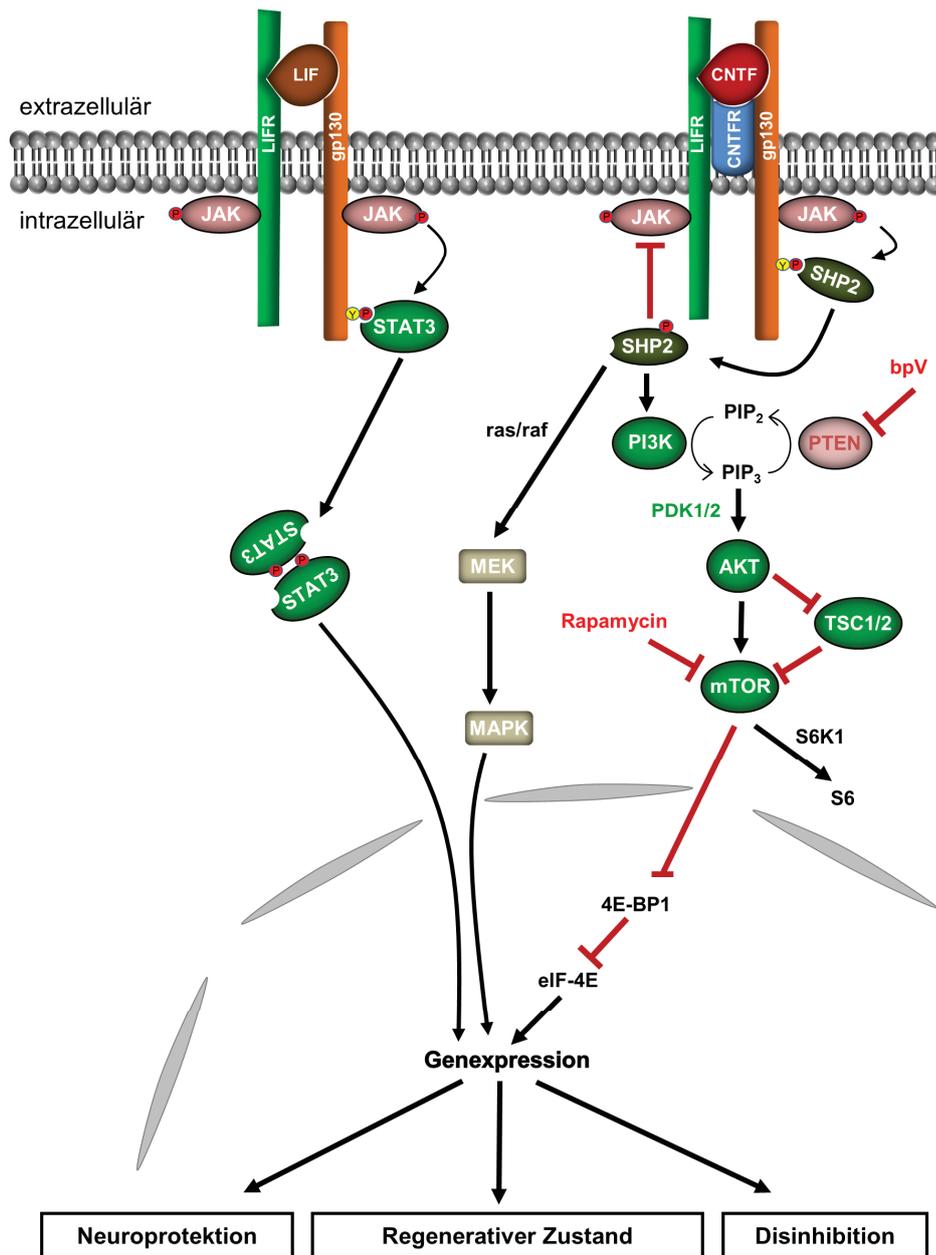


Abb. 1: Schematische Übersicht von mit axonaler Regeneration assoziierter zellulärer Signalwege im zentralen Nervensystem von Säugetieren. Modifiziert nach Diekmann und Fischer, 2013.

Die Zytokine *ciliary neurotrophic factor* (CNTF) und *leukemia inhibitory factor* (LIF) binden an membranständige Rezeptoren bestehend aus einer gp130- und einer LIF-Rezeptoruntereinheit. Der CNTF-Rezeptor setzt sich zusätzlich aus einer CNTF-Rezeptoruntereinheit zusammen. Die Rezeptorkomplexe aktivieren über die Januskinase (JAK) zum einen den Transkriptionsaktivator *signal transducers and activators of transcription 3* (STAT3), der dimerisiert und die Expression regenerationsassoziierter Gene fördert. Über den *suppressor of cytokine signaling 3* (SOCS3) kommt es zu einer Rückkopplungshemmung des Signalwegs. Weitere Signalwege werden durch Phosphorylierung der Tyrosinphosphatase *src-homology 2 domain* (SHP-2) aktiviert, welche die *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)/*extracellular signal regulated kinase* (ERK) sowie die *phosphatidyl-inositol-3-phosphatase* (PI3K) aktiviert. Die PI3K konvertiert *phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate* (PIP₂) zu *phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphate* (PIP₃), das über die Phosphatidylinositol-abhängigen Kinasen 1 und 2 (PKD1/2) die Proteinkinase B (AKT) phosphoryliert. Das *phosphatase and tensin homolog* (PTEN) ist ein negativer Regulator des PI3K/AKT-Signalweges, das pharmakologisch durch *bisperoxovanadium* (bpV) gehemmt werden kann. AKT aktiviert das *mechanistic target of rapamycin* (mTOR), das die ribosomale *S6 kinase 1* (S6K1) und den eukaryotischen Initiationsfaktor *4E-binding protein 1* (4E-BP1) phosphoryliert und darüber die Genexpression beeinflusst. Rapamycin ist ein Inhibitor von mTOR.

1.1.3 Pharmakologische Manipulation regenerationsassoziierter Signalwege

Durch eine Manipulation der beschriebenen Signalwege können positive regenerative Effekte erreicht werden. So fördert die inflammatorische Stimulation, aber auch der genetische *knockout* von PTEN das axonale Wachstum in Mäusen (Park et al., 2008; Christie et al., 2010; Liu et al., 2010; Ning et al., 2010; Sun et al., 2011). Auch eine Deletion des *tuberous sclerosis complex 1* (TSC1), ein negativer Regulator von mTOR, führt zur Stimulation axonaler Regeneration über eine konstitutive Aktivierung von mTOR (Park et al., 2008). Daraus lässt sich schließen, dass die wachstumsfördernden und neuroprotektiven Effekte der PTEN-Inhibition zumindest zum Teil durch die daraus resultierende verstärkte mTOR-Aktivität entstehen. Als wirkungsvoller pharmakologischer PTEN-Inhibitor wurde *bisperoxovanadium* (bpV) beschrieben, der sich für experimentelle *In-vitro*-Untersuchungen eignet (Posner et al., 1994; Schmid et al., 2004).

Rapamycin kann die Aktivität von mTOR spezifisch inhibieren und damit einige positive Effekte der PTEN-Deletion oder der inflammatorischen Stimulation auf die axonale Regeneration unterdrücken (Park et al., 2008; Abe et al., 2010; Leibinger et al., 2012). Daraus lässt sich folgern, dass eine Aktivierung von mTOR für das nach PTEN-Deletion beobachtete Neuritenwachstum notwendig ist und mTOR damit eine zentrale Rolle bei neuroprotektiven und axonalen Regenerationsprozessen in Säugetieren spielt (Park et al., 2010).

Die Zytokin-vermittelte Aktivierung der JAK/STAT3-Signalkaskade kann pharmakologisch u. a. durch den JAK2-Inhibitor AG490 blockiert werden. So reduziert AG490 CNTF-induziertes Neuritenwachstum *in vitro* und den regenerationsfördernden Effekt der inflammatorischen Stimulation *in vivo*. Dies legt nahe, dass die JAK2-abhängige Aktivierung von STAT3 für den Regenerationsprozess im Säugetier wichtig ist (Müller et al., 2007, 2009).

Zum jetzigen Zeitpunkt wurde jedoch noch keine geeignete Methode identifiziert, mit der ZNS-Verletzungen in Säugetieren vollständig und dauerhaft behoben werden können. Deshalb sind neue Forschungsansätze notwendig, um die dem Regenerationsprozess zugrunde liegenden Mechanismen besser verstehen und neue therapeutische Ansätze entwickeln zu können.

1.2 Regeneration im Fisch nach einer Sehnervschädigung

Anders als Säugetiere sind Knochenfische (*Teleostei*) in der Lage, axonale Bahnen im ZNS nach Verletzungen erfolgreich zu regenerieren (Stuermer et al., 1992; Bernhardt et al., 1996; Becker and Becker, 2007). Obwohl sich die regenerativen Fähigkeiten von Fischen und Säugetieren demnach deutlich unterscheiden, sind viele physiologische Prozesse und Signalwege zwischen Fisch- und Säugetierzellen konserviert. Ebenfalls weist auch die Morphologie der Retina große Ähnlichkeiten auf. Damit stellen Fische ein attraktives Modell dar, um die den axonalen Regenerationsprozessen zugrunde liegenden molekularen Mechanismen weiter zu erforschen. Daraus gewonnene Erkenntnisse könnten dann perspektivisch in Therapieoptionen für Säugetiere weiterentwickelt werden (Zon and Peterson, 2005; Goessling and North, 2014; Patten et al., 2014; Rennekamp and Peterson, 2015).

1.2.1 Regenerationskompetente Fischmodelle

Frühe Studien zur axonalen Regeneration wurden vor allem im Goldfisch durchgeführt. In diesem Modell sind RGZ in der Lage, ihre Axone und die zugehörigen funktionellen Verbindungen innerhalb von 1-2 Monaten nach einer Sehnervverletzung vollständig zu regenerieren (Sperry, 1963; Jacobson and Gaze, 1965; Murray, 1976). Dabei kommt es zur nukleären und zellulären Hypertrophie der RGZ sowie zur Aktivierung molekularer Prozesse (Murray and Forman, 1971; Giulian et al., 1980), die unter anderem eine gesteigerte Expression von wachstumsassoziierten Proteinen wie dem *growth-associated protein 43* (GAP43) zur Folge haben (Benowitz et al., 1981, 1983; Heacock and Agranoff, 1982; Perry et al., 1987).

In den letzten Jahren wurde alternativ der Zebrafisch für die ZNS-Regenerationsforschung etabliert (Stuermer et al., 1992; Cameron, 2000; Li et al., 2014). Im Vergleich zum Goldfisch steht für diese Tiere eine Vielzahl an genetischen Werkzeugen zur Verfügung, die die Identifizierung molekularer Prozesse vereinfachen kann. So bietet das Zebrafischmodell transgene Tierlinien (Udvardia, 2008), ein vollständig sequenziertes Genom sowie eine Vielzahl genetischer Manipulationsmöglichkeiten wie Mutationen, *knockdown* durch Morpholinos (Summerton, 1999), *knockout*-Tiere und Mikroarrays (Cameron et al., 2005;

Doyon et al., 2008; Meng et al., 2008). Zebrafische zeichnen sich ebenfalls durch eine hohe intrinsische Regenerationsfähigkeit aus, die zu einer schnellen anatomischen und funktionellen Wiederherstellung führt. Nach einer Verletzung des optischen Nervs überleben die RGZ des Zebrafisches und ihre Axone wachsen innerhalb von ca. 20 Tagen durch die Läsionsstelle topographisch korrekt zurück in ihr funktionelles Zielgebiet im Tectum (Stuermer et al., 1992; Bernhardt, 1999; McDowell et al., 2004).

Eine wichtige Ursache für die vorhandene Regenerationsfähigkeit von Fischen nach einer Sehnervschädigung ist die wachstumsfördernde Umgebung im Fisch-ZNS, welche durch die Abwesenheit inhibitorischer Umgebungseffekte sowie durch pro-regenerative Umgebungssubstanzen zustande kommt (Rasmussen and Sagasti, 2016). So werden regenerierende Axone im Säugetier durch umgebendes Myelin im optischen Nerv gehemmt, welches auch die Regeneration von Fischneuronen inhibiert, wenn sie den Säugetierproteinen ausgesetzt werden (Fawcett et al., 1989; Bandtlow et al., 1990; Bastmeyer et al., 1991). In Anwesenheit von Oligodendrozyten aus Fischen können hingegen sowohl Fisch- als auch Säugetiernervenzellen erfolgreich Axone ausbilden (Bastmeyer et al., 1991, 1993; Schwalb et al., 1995; Wanner et al., 1995). Moleküle, die bei Säugetieren das Axonwachstum hemmen, wie das Myelinprotein *nogo-A*, werden auch als Homologe in Zebrafischen gefunden. Während das Säugetierprotein auch im Zebrafisch das Axonwachstum inhibieren kann, hindert die Zebrafischversion weder Fisch- noch Säugetieraxone am Wachstum (Abdeselem et al., 2009; Shypitsyna et al., 2011). Interessanterweise scheinen einige Myelinproteine im Fisch sogar für eine erfolgreiche Axonregeneration notwendig zu sein, da ihr Fehlen zu einer beeinträchtigten Regeneration führt (Pinzón-Olejua et al., 2014; Welte et al., 2015). Während sich bei Säugetieren zudem eine inhibitorische Glianarbe durch reaktive Astrozyten an der Verletzungsstelle bildet, die wachstumshemmende Moleküle wie *chondroitin sulfate proteoglycans* (CSPGs) sezerniert (Kato-Semba et al., 1995; McKeon et al., 1999; Tang et al., 2003), bleibt die Konzentration der CSPGs in adulten Zebrafischen nach einer Verletzung unverändert (Becker und Becker, 2002).

Die Unterschiede der regenerativen Fähigkeiten von Fisch und Säugetier sind jedoch nicht ausschließlich auf abweichende Umgebungseffekte zurückzuführen, sondern werden ebenfalls durch intrinsische Signalkaskaden positiv beeinflusst (Liu et al., 2011). Nach einer Verletzung kommt es im Fisch weiterhin zur Expression von Molekülen, die

Neurone direkt positiv beeinflussen. Zwei identifizierte Faktoren sind der *axiogenesis factor 1* (AF-1) und AF-2, welche das Axonwachstum von Fisch-RGZ in der Zellkultur fördern und die Expression von verschiedenen wachstumsassoziierten Proteinen (*growth-associated proteins* (GAPs)) induzieren (Schwalb et al., 1995; Petrusch et al., 2000).

1.2.2 Transgene GAP43:GFP-Zebrafische

Wie im Goldfisch exprimieren die regenerierenden Zebrafisch-RGZ nach einer Axotomie eine Vielzahl an regenerationsassoziierten Genen (Bernhardt et al., 1996). Vor allem GAP43 ist ein bekannter und gut untersuchter Marker für wachsende Axone und seine Expression wird in regenerierenden Neuronen stark induziert (Skene, 1989; Benowitz and Routtenberg, 1997; Bormann et al., 1998; Kaneda et al., 2008). Zur Charakterisierung des Neuritenwachstums in lebenden Tieren wurden transgene Zebrafischlinien gezüchtet, die das *green fluorescent protein* (GFP) unter der Kontrolle eines GAP43-Promotors exprimieren (Udvardia, 2008). Diese transgenen Fische exprimieren fluoreszierendes GFP temporär in wachsenden Axonen während der Embryonalentwicklung, ähnlich zur nativen GAP43-Expression (Udvardia, 2008). Bisher wurde jedoch noch nicht untersucht, ob es in den transgenen GAP43:GFP-Fischen nach einer Sehnervverletzung zu einer GFP-Expression spezifisch in den verletzten Neuronen und ihren regenerierenden Axonen kommt. Die Möglichkeit, regenerierende Nervenzellen spezifisch zu visualisieren, wäre ein wichtiges Werkzeug für Axonregenerationsstudien *in vivo* sowie *in vitro*. Mit einem solchen Modell könnte die Funktion weiterer Signalwege auf ihre Bedeutung für den Regenerationsprozess untersucht werden.

1.2.3 Intrinsische Signalwege axonaler Regeneration im Fisch

Neben den wachstumsanregenden Umgebungsfaktoren spielen intrazelluläre Signalkaskaden für den axonalen Regenerationsprozess eine wichtige Rolle. Da Signalwege zwischen Fischen und Säugetieren stark konserviert sind, liegt die Ursache der unterschiedlichen Regenerationsfähigkeit wahrscheinlich primär in abweichenden Aktivierungsmustern dieser Signalkaskaden und weniger in grundlegenden molekularen Unterschieden (Rasmussen and Sagasti, 2016). Während im Säugetier bereits

verschiedene mit neuronalen Regenerationsprozessen assoziierte Signalwege identifiziert und intensiv untersucht wurden, sind diese im Fisch noch wenig erforscht. In Nagetieren bekannte negative Regulatoren für axonale Regeneration wie die zuvor beschriebenen Moleküle PTEN und SOCS3 sind auch in Zebrafischen konserviert und beeinflussen die Regeneration. So steigerte der *knockdown* von PTEN die Regeneration von Zebrafisch Rückenmarksneuronen (Liu et al., 2014). Ebenso konnte gezeigt werden, dass SOCS3 wie auch bei Säugetieren die axonale Regeneration im Zebrafisch durch Inhibition des JAK/STAT3-Signalwegs hemmt (Elsaeidi et al., 2014).

Die starke Konservierung von Regulatoren wie PTEN und SOCS3 zeigt, dass die dem Regenerationsprozess zugrunde liegenden intrinsischen Signalwege trotz der deutlich unterschiedlichen regenerativen Fähigkeiten von Fischen und Säugetieren sehr ähnlich sind. Daher müssen bisher noch unbekannte Unterschiede in der Aktivierung dieser molekularen Mechanismen für die stark abweichenden Regenerationspotenziale verantwortlich sein (Rasmussen and Sagasti, 2016).

2. Ziele der Arbeit

Im Gegensatz zu Säugetieren besitzt der adulte Zebrafisch die Fähigkeit, verletzte Axone erfolgreich funktionell zu regenerieren. Allerdings sind die molekularen Prozesse und Signalwege, die diese Nervenregeneration vermitteln und begünstigen, noch wenig erforscht.

Ziel dieser Arbeit war es daher, intrazelluläre Signalkaskaden, die an Regenerationsprozessen im Zebrafisch beteiligt sein könnten, zu identifizieren und näher zu beschreiben. Die Ausgangsbasis bildeten dabei bekannte Signalwege wie PI3K/AKT/mTOR oder MAPK/ERK, die bereits bei Nagetieren mit regenerativen Prozessen assoziiert wurden. Dazu war zunächst eine Charakterisierung der Expression ausgewählter Signalproteine wie AKT, pS6 oder MAPK mittels *real-time* PCR, Western Blot und immunhistochemischen Färbungen zu verschiedenen Zeitpunkten nach einer Sehnervquetschung notwendig. In einem weiteren Schritt wurden das Zytokin CNTF und pharmakologische Inhibitoren wie der mTOR-Inhibitor Rapamycin, der PTEN-Inhibitor bpV oder der PI3K/AKT-Inhibitor LY294002 in Zellkulturen von dissoziierten RGZ eingesetzt. Auf diese Weise sollte die Bedeutung der entsprechenden Signalwege für das axonale Wachstum von Zebrafischneuronen analysiert werden. Dazu mussten zunächst Neuritenauswachsassays mit Zebrafisch-RGZ etabliert werden, inklusive der Identifizierung geeigneter Neuritenmarker. Außerdem erfolgten Untersuchungen, ob RGZ transgener GAP43:GFP-Zebrafische vorteilhaft für die Quantifizierung von axonalem Wachstum in diesen dissoziierten Zellkulturen eingesetzt werden können.

Das übergeordnete Ziel der Arbeit bestand demnach darin, die zugrunde liegenden Aktivierungsmuster intrazellulärer Signalwege im Zebrafisch-ZNS nach einer axonalen Verletzung besser zu verstehen. Diese Erkenntnisse könnten für das Verständnis der Mechanismen, die für die Regenerationsinsuffizienz bei Säugetieren ursächlich sind, hilfreich sein.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma Aldrich (Deisenhofen, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland) und Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

3.1.2 Puffer und Lösungen

Blockierlösung	2 % BSA (Sigma Aldrich) und 5 % DS (AbD Serotec, Deutschland) in PBS (Gibco/ThermoFisher, Waltham, USA)
Laufpuffer	250 mM Tris, 1920 mM Glycin, 1,0 % SDS
Nährmedium	2 % fetales Kälberserum (FBS), 0,2 mg/ml Penicillin /Streptomycin, 12,5 % Salzlösung in Leibovitz L15-Nährmedium (Invitrogen, Kalifornien, USA)
Probenpuffer	200 mM Tris/HCl, 6 % SDS, 20 % Glycerin, 0,1 % Bromphenolblau, 4 % 2-Mercaptoethanol, pH 8,8
Protein-Lysis-Puffer	20 mM Tris/HCl pH 7,5, 10 mM KCl, 250 mM Sucrose, 10 mM NaF, 1 mM DTT, 0,1 mM Na ₃ VO ₄ , 1 % Triton X-100, 0,1 % SDS
Salzlösung	10 mM D-Glukose, 1,26 mM CaCl ₂ , 32 mM HEPES, pH 7,5
Verdaulösung	Papain (10 U/ml, Worthington, Lakewood, USA), L-Cystein (0,3 µg/ml, Sigma Aldrich), 12,5 % Salzlösung in L15
WB-Blockierlösung	5 % Milchpulver, 2 % BSA in PBS-T (PBS + 0,05 % Tween 20)

3.1.3 Geräte

Brutschrank	HERA Cell 150, Heraeus, Hanau, Deutschland
Chemilumineszenz	Fluor Chem E, ProteinSimple, San Jose, USA
Kamera	AxioCam MRm, Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Kammersystem	Mini-PROTEAN Tetra, Bio-Rad, Kalifornien, USA
Kryostat	Leica CM 3050S, Wetzlar, Deutschland
<i>Microplate Reader</i>	Tecan Reader Genius Pro, Tecan, Crailsheim, Deutschland

Mikroskop	AxioObserver.D1, Zeiss, Oberkochen, Deutschland
PCR-System	7500 real-time PCR-System, Applied Biosystems, Foster City, USA
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Sterilbank	MSC-Advantage, ThermoScientific, Waltham, USA
Thermomixer	Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Transfer-System	Trans-Blot Turbo System, Bio-Rad, Kalifornien, USA
Waage	M-Prove, Sartorius, Göttingen, Deutschland
Zellzähler	TC10 Automated Cell Counter, Bio-Rad, Kalifornien, USA
Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

3.1.4 Programme

AlphaView	Version 2.0, ProteinSimple, San Jose, USA
AxioVision	Version 4.8.2.0, Carl Zeiss Microimaging, Oberkochen, Deutschland
Excel	Version 2010/2013, Microsoft, Redmond, USA
ImageJ	Version 1.44, National Institute of Health, Bethesda, USA
PowerPoint	Version 2010/2013, Microsoft, Redmond, USA

3.2 Zebrafisch

Für die Experimente wurden ausgewachsene wild-typische oder homozygot-transgene GAP43:GFP-Zebrafische (*Danio rerio*) im Alter von 4 bis 8 Monaten verwendet. Diese wurden in einem 14-Stunden-Hell/10-Stunden-Dunkel-Zyklus unter Standardbedingungen in der zentralen Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gezüchtet und gehalten. Eine Tierversuchsgenehmigung durch das Landesamt für Natur-, Umwelt- und Verbraucherschutz (Nr. 84-02.04.2013.A202) sowie die entsprechenden Fachkundenachweise aller an den Experimenten beteiligten Personen lagen vor.

3.3 Neuritenauswachsassay

3.3.1 Dissoziierte Zebrafischretinakulturen

Zunächst erfolgte eine Beschichtung von 24-Loch-Platten bzw. 96-Loch-Platten (Nunclon Delta Surface, Nunc/ThermoScientific, Wiesbaden, Deutschland) mit steril filtriertem poly-D-Lysin (100 µg/ml, Sigma Aldrich) bei Raumtemperatur, die nach einer Stunde dreifach mit destilliertem Wasser gewaschen und im Anschluss luftgetrocknet wurden. Die Zebrafische wurden mit MS222 (0.4mg/l, Sigma Aldrich) betäubt und durch Dekapitation getötet. Dann wurde die Retina zügig aus den Augen freipräpariert und in eine Verdauungslösung überführt. Nach 40 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Verdauungslösung abgenommen, die Retina mit L15/Salzlösung dreifach gewaschen und in 0,8 ml Nährmedium titriert. Danach wurden die dissoziierten Zellen noch durch ein Zellsieb (Falcon 40 µm, ThermoFisher, Waltham, USA) gegeben und gezählt. Circa 80 µl der Zelllösung mit 3×10^5 Zellen/ml wurden dann in die Vertiefungen der Platten gegeben, mit 300 µl Nährlösung versetzt und bei 27,5 °C inkubiert. Experimentabhängig wurden Zytokine und Inhibitoren dem Nährmedium, sofern nicht anders angegeben, wie folgt zugesetzt (Tabelle 1):

Zytokin/Inhibitor	Hersteller	Konzentration
<i>bisperoxovanadium</i> (bpV)	Calbiochem	10 nM
LY294002 (ly)	Sigma Aldrich	10 µM
Maus <i>ciliary neurotrophic factor</i> (CNTF)	PeptoTech	1 ng/ml
Rapamycin (Rap)	LC Laboratories	10 nM

Tabelle 1: Übersicht der zur Behandlung der Zellkulturen verwendeten Zytokine und Inhibitoren unter Angabe von Hersteller und verwendeter Konzentration

Die Fixierung der Zellkulturen mit 4 % Paraformaldehyd (PFA, Sigma Aldrich) für 30 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte nach 4 Tagen zur Bestimmung des Neuritenwachstums bzw. zu verschiedenen Zeitpunkten bei der Quantifizierung von Zellen.

3.3.2 Immunzytochemische Färbung

Im Anschluss an die Fixierung wurden die Zellen mit Methanol (Sigma Aldrich) für 10 Minuten permeabilisiert und anschließend für mindestens eine Stunde mit Blockierlösung blockiert. Danach erfolgte über Nacht die Inkubation der Zellkulturen mit einem Erstantikörper (siehe Tabelle 2) verdünnt in Blockierlösung bei 4 °C. Nach zweifachem Waschen in 10-Minuten-Abständen mit PBS wurde ein passender Zweitantikörper (1:2000, AlexaFluor 488/594, Kalifornien, Life Technologies, USA) verdünnt in Blockierlösung für 1 Stunde hinzugegeben. Vor Beginn der Auswertung fand erneut ein zweifacher Waschvorgang statt.

3.3.3 Auswertung

Zur quantitativen Auswertung des Neuritenwachstums wurden RGZ und ihre Neuriten je nach Experiment entweder mittels GAP43 oder azetyliertem α Tubulin bzw. durch GFP-Expression visualisiert und an einem AxioObserver.D1 Mikroskop mit einer AxioCam MRm Kamera fotografiert. Die Auswertung des Bildmaterials erfolgte mit der Software ImageJ. Dabei wurde die Länge der Neuriten ausgewachsener RGZ gemessen und die Summe der Neuritenlängen eines *wells* durch die Anzahl der RGZ mit regenerierten Neuriten geteilt. Die Mittelwerte \pm Standardfehler wurden, sofern nicht anders angegeben, aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit je drei Wiederholungen berechnet. Zur Datenverarbeitung kam Microsoft Excel zum Einsatz.

Antikörper gegen	Hersteller	Verdünnung	Spezies
Azetyliertes α Tubulin	Sigma, clone 6-11B-1	1:1000	Maus
Detyronisiertes α Tubulin	Millipore #AB3201	1:1000	Ratte
GAP43	Sigma G9264, Clone GAP-7B10	1:1000	Maus
pS6	Cell Signaling #4857S	1:300	Ratte

Tabelle 2: Übersicht der für immunzytochemische Färbungen der Zellkulturen verwendeten Antikörper unter Angabe von Hersteller, Produktnummer, Spezies und eingesetzter Verdünnung

3.4 Sehnervverletzung

Alle operativen ein- oder beidseitigen Sehnervverletzungen führte Dr. Heike Diekmann durch. Nach einer Betäubung der Tiere in einem Gefäß mit MS222 wurden die Augen leicht aus der Orbita gezogen, um den Sehnerv freizulegen. Dann erfolgte die Quetschung des Nervs intraorbital hinter dem Auge für einen Zeitraum von 5 Sekunden. Im Anschluss wurden die Fische zum Aufwachen in frisches Wasser überführt.

3.5 *In-vivo*-Rapamycinbehandlung

Unmittelbar nach erfolgter Sehnervschädigung wurden die Zebrafische in ein Aquarium mit 0,2 µM Rapamycin gegeben (*rapamycin stock solution*, 1 mg/ml, LC Laboratories, Massachusetts, USA, 1:5000 im Wasser verdünnt). Für die Kontrollen wurde eine 0,2 % DMSO-Lösung (Sigma Aldrich) verwendet. Eine Erneuerung der Lösung erfolgte täglich.

3.6 Histologie von Zebrafischretinae

3.6.1 Herstellung der Retinapräparate

Die Zebrafische wurden mit MS222 betäubt und durch Dekapitation getötet. Danach erfolgte die operative Entfernung der Augen und eine Fixierung über Nacht in einer 4 % PFA/PBS Lösung bei 4 °C. Im Anschluss wurden die Augen für mindestens 4 Stunden in 30 % Sucroslösung inkubiert und dann in Tissue-Tek (Sakura, Staufen, Deutschland) eingebettet. Zur Anfertigung von Schnittpräparaten der Augen kam ein Kryostat zum Einsatz. Diese wurden anschließend auf Glasobjektträgern (Superfrost plus, ThermoFisher, Waltham, USA) getrocknet und bis zur weiteren Verwendung gefroren bei -20 °C aufbewahrt.

3.6.2 Immunhistochemische Färbung

Die Schnitte wurden zunächst aufgetaut und in PBS für mindestens 10 Minuten gewaschen. Danach erfolgte eine Permeabilisierung mit Methanol für 10 Minuten und eine

Blockierung mit Blockierlösung für mindestens 6 Stunden. Im Anschluss wurden die Schnitte über Nacht mit einem Erstantikörper (siehe Tabelle 3) verdünnt in Blockierlösung bei 4 °C inkubiert. Nach dreifachem Waschen in Abständen von 15 Minuten mit PBS wurde ein passender Zweitantikörper (1:2000 AlexaFluor 488 oder 594, Life Technologies, Kalifornien, USA) verdünnt in Blockierlösung für 1 Stunde hinzugegeben. Danach erfolgte erneut ein dreifacher Waschvorgang in 15-minütigen Schritten vor Beginn der Auswertung.

3.6.3 Auswertung

Die gefärbten Retinapräparate wurden an einem AxioObserver.D1 Mikroskop mit einer AxioCam MRm Kamera ausgewertet und dokumentiert. Eine Anpassung von Intensität und Kontrast der Bilder erfolgte mit gleichen Einstellungen pro Versuch mit der Software ImageJ und Microsoft PowerPoint.

Antikörper gegen	Hersteller	Verdünnung	Spezies
Azetyliertes α Tubulin	Sigma, clone 6-11B-1	1:1000	Maus
CHAT	Millipore #AB144P	1:100	Ziege
Detyronisiertes α Tubulin	Millipore #AB3201	1:1000	Ratte
GAP43	Sigma G9264, Clone GAP-7B10	1:1000	Maus
Glutamin-Synthetase	Santa Cruz sc-6640	1:100	Ziege
pAKT	Cell Signaling #4060	1:500	Ratte
pMAPK	Cell Signaling #9101S	1:500	Ratte
pS6	Cell Signaling #4857S	1:500	Ratte

Tabelle 3: Übersicht der zur immunhistochemischen Färbung der Zebrafischretinae verwendeten Antikörper unter Angabe von Hersteller, Produktnummer, Spezies und eingesetzter Verdünnung

3.7 RNA-Isolation und quantitative *real-time* Polymerase-Kettenreaktion

Die Fische wurden mit MS222 betäubt und durch Dekapitation getötet. Dann wurde die Retina zügig aus den Augen präpariert und in Ambion RNA later (Life Technologies,

Kalifornien, USA) überführt. Zur RNA-Isolierung fand das RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) mit Standardprotokoll bei einem Elutionsvolumen von 35 µl Verwendung. Zum Umschreiben der RNA in cDNA durch reverse Transkription kam das Reaktionskit SuperScript II (Life Technologies, Kalifornien, USA) mit Standardprotokoll zum Einsatz. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung gefroren bei -80 °C gelagert. Pro Reaktionsansatz für die *real-time* PCR-Analyse wurden 10 µl SYBR Green PCR Mastermix (Applied Biosystems, Foster City, USA), 4 µl cDNA, 1 µl Primer in *sense*-Richtung, 1 µl Primer in *antisense*-Richtung (siehe Tabelle 4) und 4 µl H₂O verwendet. Die Auswertung erfolgte mit einem 7500 real-time PCR-System unter Einsatz eines dreistufigen Programms mit einer initialen 15-minütigen Phase bei 95 °C. Im Folgenden wurden 40 Zyklen zur DNA-Amplifizierung durchgeführt (95 °C für 15 Sekunden, 55 °C für 20 Sekunden, 72 °C für 35 Sekunden). Die Messung der DNA-Amplifikation erfolgte jeweils in der 72 °C-Phase. Zum Abschluss erfolgte die Ausführung einer Dissoziationsphase, um die Spezifität der verwendeten Primer zu überprüfen. Zur Auswertung der erhobenen Daten wurde Microsoft Excel genutzt.

Primer	Sequenz
gap43-sense	5'-TGCTGCATCAGAAGAAGACTAA-3'
gap43-antisense	5'-CCTCCGGTTTGATTCCATC-3'
gapdh-sense	5'-CCTCCGGTTTGATTCCATC-3'
gapdh-antisense	5'-GGCGGTGTAGGCATGAAC-3'

Tabelle 4: Übersicht über die für die *real-time* PCR verwendeten Primer

3.8 Western Blot

Zur Herstellung von Retinalysaten wurden Zebrafische in MS222 betäubt und durch Dekapitation getötet. Im Anschluss wurde die Retina schnell aus dem Auge präpariert und in einen Protein-Lysis-Puffer mit einem Protease-Inhibitor (1:100, Calbiochem, Kalifornien, USA) überführt. Die Retinae wurden durch Sonifikation mit 3 bis 5 Pulsen bei 50 % Energie homogenisiert und im Anschluss bei 5000 Umdrehungen pro Minute für 10 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden zur Analyse verwendet und bei -80 °C gefroren gelagert. Die Proteinkonzentration der erstellten Retinalysate wurde

unter Einsatz eines Uptima BC Assay Protein Quantitation Kit (Interchim, Mannheim, Deutschland) unter Verwendung des Standardprotokolls mit einem Tecan Reader Genius Pro bestimmt. Die Proben wurden auf eine gleiche Proteinkonzentration bei einem Volumen von 15 µl angeglichen, im Verhältnis 5:1 mit Probenpuffer versetzt und für 5 Minuten bei 95 °C aufgeköcht. Zur Proteinauftrennung wurde ein Mini-PROTEAN Tetra Kammersystem mit zugehörigen Mini-PROTEAN TGX Gelen (10 well, 10 % oder any kD, Bio-Rad, Kalifornien, USA) sowie einem Laufpuffer verwendet. Im Anschluss wurden die Proteine mit einem Trans-Blot Turbo System unter Einsatz des Standardprotokolls für *high molecular weight* über einen Zeitraum von 8 Minuten auf Nitrozellulosemembranen (Bio-Rad, Kalifornien, USA) übertragen. Eine Färbung mit 0,1 % Ponceau S-Lösung (Sigma Aldrich) erfolgte zur Visualisierung und Kontrolle der Proteinverteilung sowie zum Zuschneiden der Membranen. Danach wurden die Nitrozellulosemembranen mit einer WB-Blockierlösung für 1 Stunde blockiert. Im Folgenden wurden die Blots mit einem in 2 % BSA/PBS-T verdünnten Erstantikörper (siehe Tabelle 5) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dreifachem Waschen der Membran in 15-minütigen Abständen mit PBS-T wurden die gebundenen Antikörper mit einem in einer 5 % Milchpulverlösung verdünnten Zweitantikörper gegen Maus bzw. Ratten Immunglobulin G, gebunden an *horseradish peroxidase* (1:20000, Sigma Aldrich, St. Louis, USA), detektiert. Die Visualisierung der Antigen-Antikörper-Komplexe erfolgte mittels Chemilumineszenz unter Verwendung von Clarity ECL Substrat (Bio-Rad, Kalifornien, USA) mit einem Fluor Chem E-Gerät. Zur Messung der Intensität der Banden kam die Software des Herstellers (AlphaView) zum Einsatz. Die Standardisierung der Ergebnisse erfolgte mittels β -Aktin. Die dargestellten Daten wurden aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit je zwei Wiederholungen, relativiert jeweils pro Experiment, zusammengefasst.

Antikörper gegen	Hersteller	Verdünnung	Spezies
β -Aktin	Sigma A5441, Clone AC-15	1:5000	Maus
pAKT	Cell Signaling #4060	1:500	Ratte
pMAPK	Cell Signaling #9101S	1:500	Ratte

Tabelle 5: Übersicht der für den Western Blot verwendeten Antikörper unter Angabe von Hersteller, Produktnummer, Spezies und eingesetzter Verdünnung

4. Ergebnisse

4.1 Identifizierung von Markern für RGZ des Zebrafisches

Für die Analyse molekularer Signalwege, die den neuronalen Regenerationsprozessen zugrunde liegen, sind spezifische Marker zur Identifizierung von RGZ in histologischen Retinaquerschnitten oder Zellkulturen notwendig. Allerdings waren bisher keine geeigneten Antikörper zur Detektion von Zebrafisch-RGZ in der Literatur beschrieben.

Deshalb wurden typische Marker, die in der Literatur zur Identifizierung von RGZ in Mäusen und Ratten eingesetzt werden, im Zebrafisch getestet. Der gebräuchliche Tuj-1-Antikörper gegen β III-Tubulin zeigte keine spezifische Färbung auf Querschnitten der Zebrafischretina oder in Zellkulturen von dissoziierten Retinae (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurden Antikörper gegen modifiziertes α Tubulin, nämlich azetyliertes bzw. detyronisiertes α Tubulin, verwendet. Beide Antikörper zeigten positive Färbungen von Zellkörpern in der Ganglienzellschicht (GZS) sowie eine axonale Färbung der angrenzenden Faserschicht (Abb. 2 A, A'). Die immunzytochemische Färbung von retinalen Zellkulturen mit beiden Markern färbte ebenfalls sowohl Zellkörper als auch Axone deutlich (Abb. 2 A, A'). Sie waren jedoch unspezifisch für RGZ, sodass sich teilweise auch positiv gefärbte Zellen in anderen Retinaschichten wie der inneren nukleären Schicht (INS) fanden. Auch in Zellkultur detektierten die getesteten α Tubulin-Antikörper morphologisch von RGZ unterscheidbare Zellen. Während es sich bei Ganglienzellen typischerweise um größere ovale Zellen, oftmals mit Neuritenfortsätzen, handelte, waren die zusätzlich erkannten Zellen kleiner, rundlich, ohne Zellfortsatz und teilweise schwächer gefärbt (Abb. 2 A, A').

Da das *growth-associated protein 43* (GAP43) bekannterweise mit regenerativen Prozessen in Axonen und RGZ assoziiert ist (Skene, 1989; Benowitz and Routtenberg, 1997; Bormann et al., 1998; Kaneda et al., 2008), kam es als alternativer Marker für diese Zellen infrage. Für *real-time* PCR-Analysen (Abb. 2 B) wurde zunächst RNA aus Zebrafischretinae zu verschiedenen Zeitpunkten nach einer Sehnervverletzung isoliert. Diese Untersuchungen zeigten eine schnelle Induktion von Gap43, dessen Maximum bereits 2 Tage nach einer Sehnervverletzung erreicht wurde. Die mRNA-Expression wurde in den folgenden Tagen aufrechterhalten und begann nach 8 Tagen wieder abzufallen (vgl. Diekmann et al., 2015a). Die schnelle Expression machte GAP43 zu

einem potenziell geeigneten Marker für regenerierende RGZ. Immunhistochemische Untersuchungen von Retinaquerschnitten mit dem GAP43-Antikörper zeigten eine deutliche Färbung in Zellkörpern in der GZS. Zusätzlich fanden sich jedoch auch stark Antikörper-positive Zellen in der INS, sodass dieser ebenfalls nicht spezifisch für RGZ war (Abb. 2 C). Auch in immunzytochemischen Experimenten mit Zellkulturen aus dissoziierten Retinae mit dem zuvor verwendeten GAP43-Antikörper zeigte sich eine deutliche Färbung von Zellkörpern und Axonen. Jedoch wurden wie auch bei den α Tubulin-Antikörpern Zellen erkannt, die sich morphologisch von RGZ unterschieden, sodass auch in Kulturen keine Spezifität vorlag (Abb. 2 C).

Da der verwendete GAP43-Antikörper für Ganglienzellen unspezifisch war, wurden transgene GAP43:GFP-Zebrafische in weiteren Untersuchungen charakterisiert. Diese exprimieren GFP unter der Kontrolle eines GAP43-Promoters. In histologischen Retinaquerschnitten kam es nach einer Sehnervverletzung ausschließlich in der GZS zu einer deutlichen Fluoreszenz in den Zellkörpern. Auch in dissoziierten Retinakulturen, die aus dieser transgenen Tierlinie gewonnen wurden, fluoreszierten ausschließlich Zellkörper und deren Axone, die den morphologischen Kriterien von RGZ entsprachen (Abb. 2 D).

Immunhistochemische Untersuchungen von Retinaquerschnitten dieser Fische mit dem zuvor eingesetzten Antikörper gegen azetyliertes α Tubulin zeigten teilweise kolokalisierte Zellkörperfärbungen in der GZS sowie von Axonen in der Faserschicht mit der GFP-Expression der transgenen Zebrafische (Abb. 2 E). Dies ließ darauf schließen, dass es sich bei den azetylierten α Tubulin-positiven Zellen in der GZS ebenfalls um RGZ handelte und der Antikörper damit zur Quantifizierung von Zellen in der GZS nutzbar ist. Ko-Färbungen mit einem Antikörper gegen *choline acetyltransferase* (CHAT), welche spezifisch in cholinergen amakrinen Zellen vorkommt, ergaben hingegen keine Kolokalisation. Dieses Ergebnis belegte, dass ausschließlich RGZ GFP exprimierten (Abb. 2 E) (vgl. Diekmann et al., 2015a).

Der Einsatz von transgenen GAP43:GFP-Fischen ermöglichte eine spezifische Darstellung von RGZ und ihrer regenerierenden Axonen nach einer Sehnervschädigung und stellte damit ein optimales System zur Analyse von molekularen Signalwegen im Zebrafisch dar.

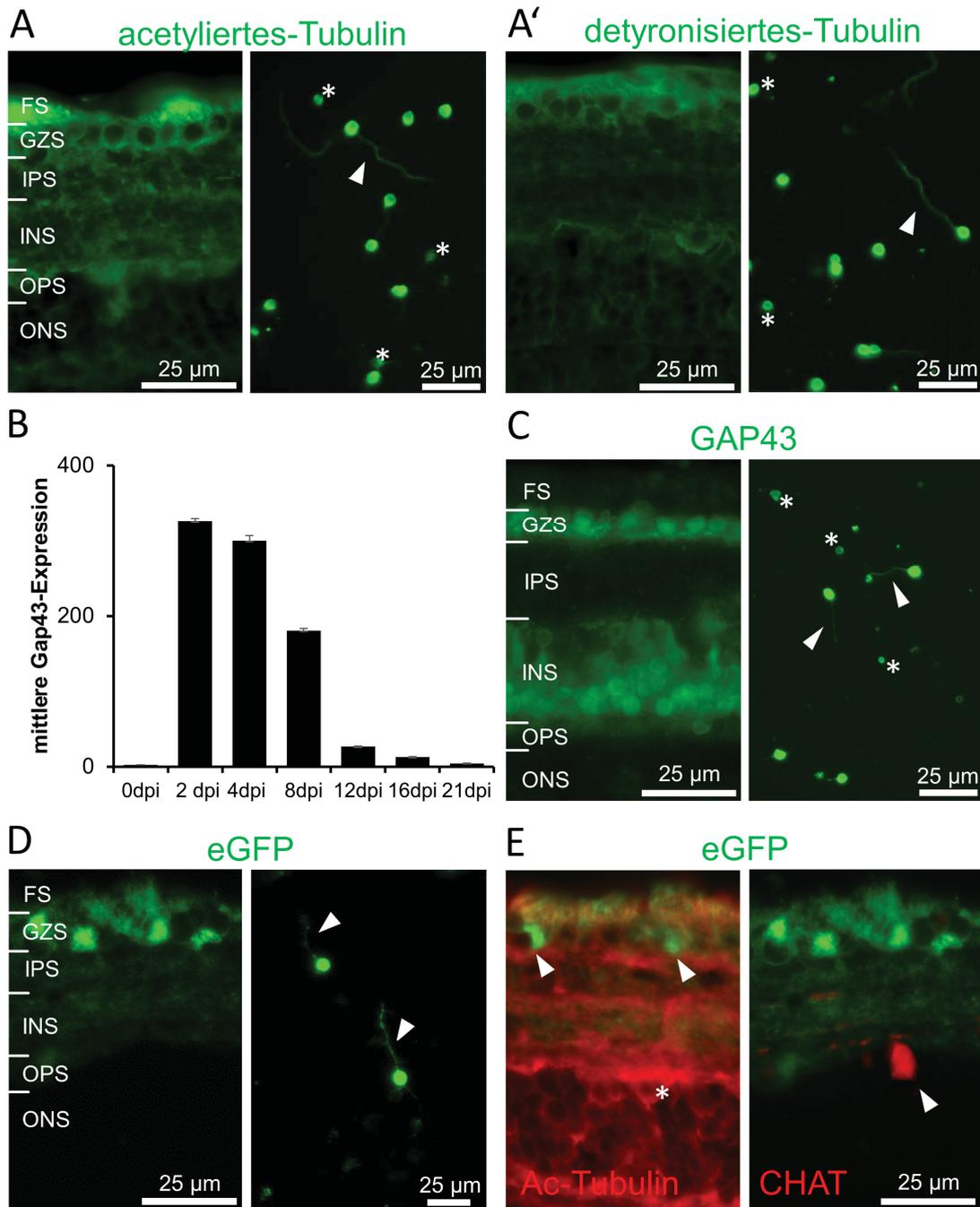


Abb. 2: Identifizierung von Markern für RGZ des Zebrafisches

(A, A') Immunhistochemische Färbung einer unbehandelten Zebrafischretina (links, 40x) sowie immunzytochemische Färbung dissoziierter retinaler Zellen nach 4 Tagen in Kultur (rechts, 20x) mit einem Antikörper gegen azetyliertes α Tubulin (1:1000) (A) bzw. detyronisiertes α Tubulin (1:1000) (A'). Die Pfeile markieren Axone retinaler Ganglienzellen (RGZ). Der Antikörper war nicht spezifisch für RGZ. Es wurden Zellen erkannt, die nicht die morphologischen Kriterien von RGZ erfüllen (Sterne). FS = Faserschicht; GZS = Ganglienzellschicht; IPS = innere plexiforme Schicht; INS = innere nukleäre Schicht; OPS = äußere plexiforme Schicht; ONS=äußere nukleäre Schicht. (B) Quantitative *real-time* PCR zur Analyse der Gap43-Expression in der Zebrafischretina zu verschiedenen Zeitpunkten nach einer Sehnervverletzung (dpi = *days post injury*). Die dargestellten Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler, die aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit je vier Retinae, jeweils pro Experiment zu GAPDH relativiert, ermittelt wurden. (C) Wiederholung von A und A' mit einem Antikörper gegen GAP43 (1:1000). (D) Unbehandelter Retinaquerschnitt eines transgenen GAP43:GFP-Zebrafisches 4 Tage nach einer Sehnervverletzung (40x) sowie nach 4 Tagen in Zellkultur (20x). Die Pfeile markieren regenerierende Axone. (E) Färbung von Retinaquerschnitten transgener GAP43:GFP-Zebrafische mit Antikörpern gegen azetyliertes α Tubulin (1:1000) bzw. CHAT (1:100). Die Pfeile markieren positive Zellen. Vergrößerung: 40x.

4.2 CNTF verstärkt Neuritenwachstum von Zebrafisch-RGZ

Nachdem eine zuverlässige Möglichkeit zur Identifizierung von RGZ in Zellkulturen gefunden wurde, sollte ein *In-vitro*-Kulturmodell etabliert werden, um das Neuritenwachstum von Fisch-RGZ verlässlich quantifizieren zu können. Bisher war jedoch noch keine geeignete Methode zur Durchführung einer derartigen Untersuchung in der Literatur beschrieben. Dazu wurden Fisch-Retinae, angelehnt an ein Protokoll aus einem Ratten-Modell (Grozdanov et al., 2010), dissoziiert und in Kultur genommen. Hierbei fand ein Kulturmedium Anwendung, das bereits zuvor für die Kultivierung von Goldfisch-RGZ beschrieben wurde (Chen et al., 2013). Unter diesen Bedingungen bildeten die RGZ schnell Neuriten aus, die mit anhaltender Kulturzeit kontinuierlich auswuchsen. Nach 4 Tagen schien eine Quantifizierung der Neuritenlänge der ausgewachsenen RGZ optimal, da zu diesem Zeitpunkt nahezu alle RGZ Axonfortsätze ausgebildet hatten, diese jedoch noch gut voneinander zu differenzieren waren. In einem nächsten Schritt wurden RGZ mit einer immunhistochemischen GAP43-Färbung (vgl. Abb. 2 C) in Kombination mit morphologischen Kriterien (große, ovale Zellen; Zellfortsätze; stark positive Färbung der Zellkörper) identifiziert und die durchschnittliche Länge ihrer Neuriten gemessen (Abb. 3 A).

CNTF fördert die axonale Regeneration von RGZ in Säugetieren. Deshalb sollte zunächst überprüft werden, ob dieser Effekt auch das Neuritenwachstum von Fisch-RGZ *in vitro* steigern kann. Dazu wurde zunächst CNTF in verschiedenen Konzentrationen zu Kulturen unverletzter RGZ hinzugegeben. CNTF steigerte dabei die axonale Regeneration signifikant im Vergleich zur Kontrolle und die mittlere Neuritenlänge nahm mit steigenden Konzentrationen (0,1; 0,5; 1 ng/ml) zu. Ein maximaler Effekt des Zytokins wurde bei einer Konzentration von 1 ng/ml erreicht (Abb. 3 B). Der ermittelte Anstieg war hochsignifikant und reproduzierbar. Weitere Konzentrationserhöhungen über 1 ng/ml hinaus führten hingegen zu keiner weiteren Steigerung des Axonwachstums (Abb. 3 B).

Laut Literatur versetzt eine Sehnervschädigung vor der Dissoziation und Kultivierung der Neurone diese bereits in einen regenerativen Zustand (*priming*) und steigert dadurch die Regenerationsfähigkeit (vgl. Hoffman, 2010). Um die Bedeutung dieses Effekts für regenerierende Zebrafisch-RGZ zu untersuchen, wurden Retinae, die erst 8 Tage nach einer Verletzung dissoziiert und kultiviert wurden, mit unverletzten Kontrollen

verglichen. Interessanterweise zeigte sich, dass im unbehandelten Zustand in Abwesenheit von CNTF kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen bestand (0 dpi: 66,7 μm ; 8 dpi: 68,6 μm ; Abb. 3 B). Auch nach Zugabe von CNTF kam es bei einem vorhergegangenen *priming* der RGZ zu keinem signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (0 dpi: 84,1 μm ; 8 dpi: 87,9 μm ; Abb. 3 B). Dieses Ergebnis ließ darauf schließen, dass ein vorheriges *priming* nicht zu verstärktem Axonwachstum in Zellkultur führt. Aus diesem Grund fanden in nachfolgenden Experimenten ausschließlich Retinae unbehandelter Tiere Verwendung.

Da der eingesetzte GAP43-Antikörper nicht spezifisch RGZ erkannte, wurden die Experimente nach der Etablierung des zuvor nicht zur Verfügung stehenden, transgenen GAP43:GFP-Zebrafischmodells mit diesem wiederholt. Damit konnte die Verlässlichkeit der in den vorangegangenen Experimenten verwendeten morphologischen Identifikationskriterien überprüft werden. Nach 4 Tagen in Zellkultur fand sich eine helle, deutliche Fluoreszenz in den RGZ einschließlich deren ausgewachsenen Neuriten, ohne dass eine zusätzliche immunhistochemische Färbung notwendig war (Abb. 3 C). Es konnte ebenfalls ein signifikanter, ähnlich starker Effekt von CNTF im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden, was die vorhergehenden Experimente mit GAP43 als Marker bestätigte (con: 78,5 μm ; CNTF: 92 μm ; Abb. 3 D) (vgl. Diekmann et al., 2015a).

Zusammenfassend zeigte sich, dass *In-vitro*-Zellkulturstudien mit Zebrafisch-RGZ ein schnelles und verlässliches Verfahren zur Quantifizierung von Neuritenwachstum sind. Eine Stimulation von Zebrafisch-RGZ mit CNTF ergab einen vergleichbaren Wachstumseffekt wie bei Nagetieren, jedoch mit einem geringeren Längenzuwachs der Neurite. Dies warf die Frage auf, inwiefern ähnliche zelluläre Signalkaskaden im Zebrafisch für die axonale Regeneration wichtig sind. Das etablierte Kulturmodell ermöglichte pharmakologische Axonregenerationsstudien, um die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen von Reparaturprozessen nach einer Verletzung zu untersuchen.

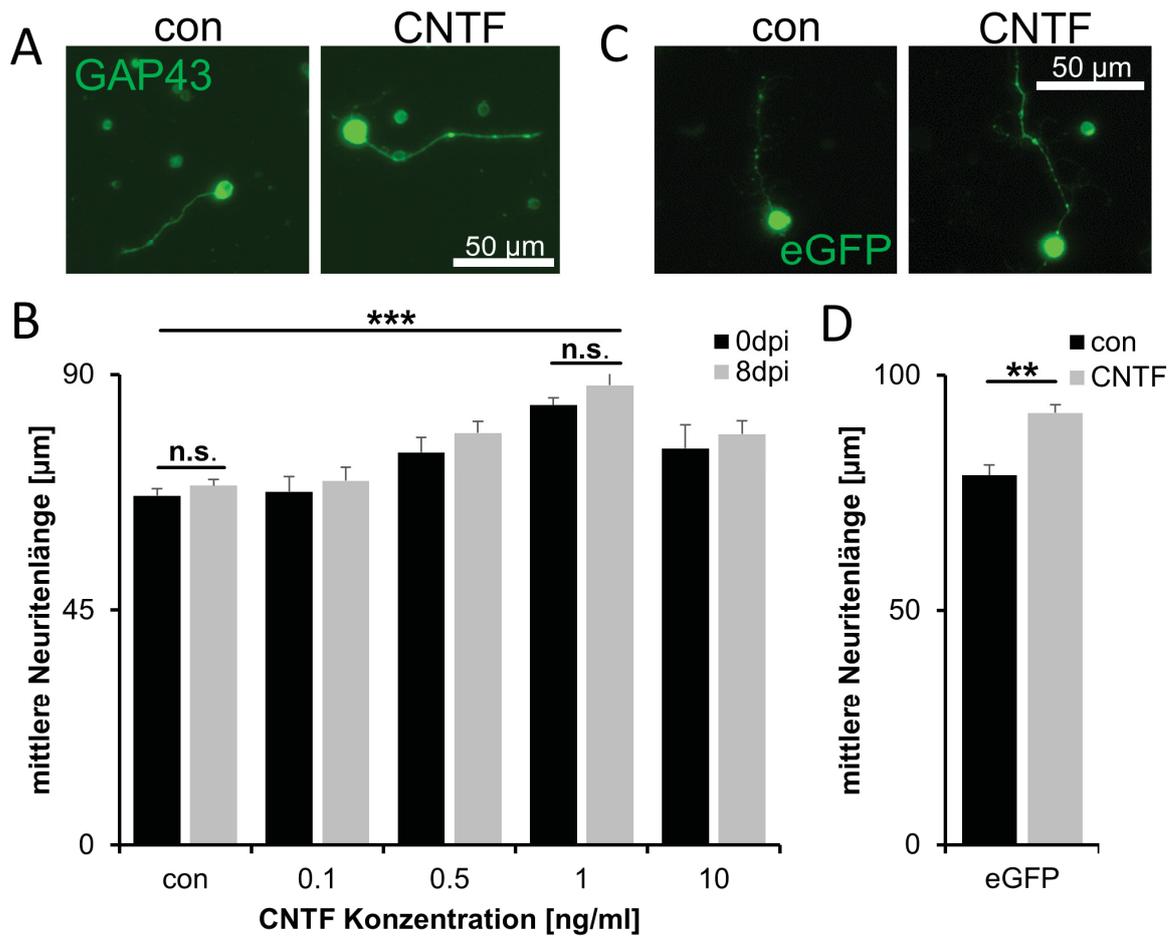


Abb. 3: CNTF verstärkt Neuritenwachstum von Zebrafisch-RGZ

(A) Repräsentative Bilder von retinalen Ganglienzellen (RGZ) nach 4 Tagen in Zellkultur gefärbt mit einem Antikörper gegen *growth-associated protein 43* (GAP43, 1:1000) unbehandelt und mit 1 ng/ml *ciliary neurotrophic factor* (CNTF). Vergrößerung 40x. (B) Quantifizierung der mittleren Neuritenlänge (µm) kultivierter RGZ (0 dpi; 8 dpi; dpi = *days post injury*) nach 4 Tagen in Kultur, die mit verschiedenen Konzentrationen von CNTF behandelt wurden. Es zeigte sich ein maximaler CNTF-Effekt bei einer Konzentration von 1 ng/ml. Mittelwerte ± Standardfehler von mindestens 2 unabhängigen Experimenten mit jeweils 3 Replika-Wells. *** $p < 0,001$; n.s. = nicht signifikant. (C) Repräsentative Bilder von RGZ nach 4 Tagen in Kultur von transgenen GAP43:GFP-Zebrafischen unbehandelt und mit 1 ng/ml CNTF. Vergrößerung 40x. (D) Quantifizierung der mittleren Neuritenlänge (µm) ausgewachsener, dissoziierter RGZ von GAP43:GFP-Zebrafischen nach 4 Tagen in Kultur unbehandelt und mit 1 ng/ml CNTF. Mittelwerte ± Standardfehler von 2 unabhängigen Experimenten, jeweils mit 4 Replika-Wells. ** $p < 0,01$.

4.3 Keine MAPK-Induktion nach Sehnervverletzung in der Zebrafischretina

Der MAPK/ERK-Signalweg wurde im Säugetier mit axonalen Regenerationsprozessen assoziiert (vgl. Park et al., 2004; Müller et al., 2009). Um die Bedeutung dieser Signalkaskade für regenerative Prozesse im Zebrafisch zu untersuchen, erfolgte zunächst ein Western Blot mit Retinalysaten von verschiedenen Zeitpunkten nach einer Sehnervverletzung unter Verwendung eines Antikörpers gegen die phosphorylierte MAPK (pMAPK) (Abb. 4 A). Dabei konnten jedoch keine signifikanten Veränderungen des pMAPK-Niveaus nach einer Schädigung des Sehnervs beobachtet werden (Abb. 4 B).

Diese Ergebnisse wurden zusätzlich durch immunhistochemische Färbungen von Retinaquerschnitten bestätigt. Ein Nachweis von pMAPK war in den Zellkörpern unverletzter Tiere in der INS der Retina sowie in deren Zellfortsätzen, die in der Faserschicht oberhalb der GZS enden, möglich. Diese Färbung änderte sich nicht zu den verschiedenen untersuchten Zeitpunkten nach einer Sehnervverletzung. In der GZS fanden sich dabei zu keiner Zeit pMAPK-positive Zellen (Abb. 4 B). Eine Ko-Färbung mit einem Antikörper gegen Glutamin-Synthetase identifizierte die pMAPK-positiven Zellen der INS als Müller-Gliazellen (Abb. 4 C).

Da es zu keiner Veränderung im Aktivitätsniveau der pMAPK nach einer Sehnervschädigung kam und keine pMAPK-positiven RGZ nachgewiesen wurden, schien der MAPK/ERK-Signalweg keine besondere Bedeutung für die Regenerationsvorgänge in der Zebrafischretina zu haben, sodass andere intrinsische Signalkaskaden im Vordergrund dieser Prozesse stehen müssen.

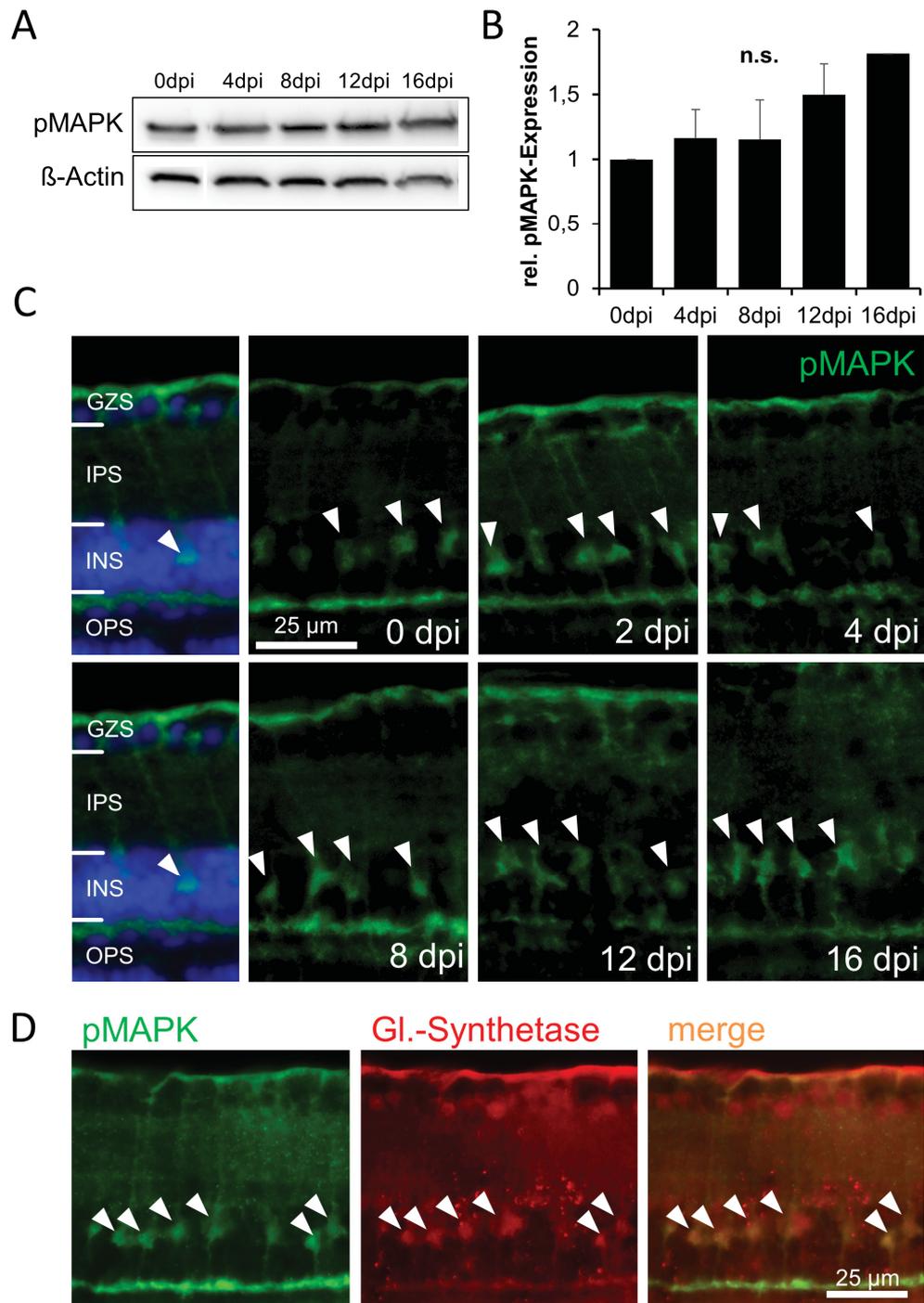


Abb. 4: Keine MAPK-Induktion nach einer Sehnervverletzung in der Zebrafischretina

(A) Western Blot mit einem Antikörper gegen phosphorylierte *mitogen-activated protein kinase* (pMAPK; 1:500) in Zebrafischretinalysaten zu verschiedenen Zeitpunkten nach einer Sehnervverletzung (dpi = *days post injury*) mit β -Actin (1:5000) als Ladungskontrolle. (B) Quantifizierung von A. Es zeigte sich eine konstante Expression von pMAPK. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit je zwei Wiederholungen, die jeweils pro Experiment relativiert wurden. n.s.: nicht signifikant. (C) Immunhistochemische Färbung von Zebrafischretinaquerschnitten mit dem zuvor im Western Blot verwendeten Antikörper gegen pMAPK (1:500) zu verschiedenen Zeitpunkten nach einer Sehnervverletzung. Zur Visualisierung der Zellkerne ist eine Doppelfärbung mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (Dapi; blau) gezeigt. Die Pfeile markieren Zellkörper. GZS = Ganglienzellschicht; IPS = innere plexiforme Schicht; INS = innere nukleäre Schicht; OPS = äußere plexiforme Schicht. Vergrößerung: 40x. (D) Immunhistochemische Doppelfärbung einer unbehandelten Zebrafischretina mit Antikörpern gegen pMAPK (1:500) und Glutamin-Synthetase (1:100), die spezifisch für Müller-Gliazellen ist. Die Pfeile zeigen eine Kolokalisationen der Färbungen. Vergrößerung: 40x.

4.4 Induktion von AKT in der Zebrafischretina nach Sehnervschädigung

Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg ist eine weitere wichtige Signalkaskade, die in Zusammenhang mit Regenerationsprozessen bereits im Säugetier untersucht wurde (vgl. Park et al., 2004; Müller et al., 2009). Deshalb wurde in einem nächsten Schritt analysiert, ob eine Sehnervverletzung zu einer Aktivierung der Proteinkinase B (AKT) und damit zu einer Induktion des Signalwegs führt. Zunächst wurde ein Western Blot mit Retinalysaten von verschiedenen Zeitpunkten nach einer Sehnervschädigung durchgeführt. Der für diese Analyse verwendete Antikörper bindet dabei an der Phosphorylierungsstelle *Ser473* von AKT (pAKT). Es kam zu einem signifikanten Anstieg von pAKT, der nach 2 Tagen begann und sein Maximum nach 8 Tagen erreichte. Danach fiel die pAKT-Expression bis 21 Tage nach der Verletzung wieder ab (Abb. 5 A, B). In immunhistochemischen Färbungen von Retinaquerschnitten mit dem pAKT-Antikörper fanden sich in unbehandelten Kontrollen bereits einzelne pAKT-positive Zellen in der INS (Abb. 5 C). Im zeitlichen Verlauf zeigte sich eine deutliche Färbung von Zellkörpern in der GZS insbesondere 4 und 8 Tage nach einer Sehnervquetschung. Zu früheren sowie späteren Zeitpunkten war hingegen kaum eine Färbung in der GZS detektierbar (Abb. 5 C).

Insgesamt ergab sich in der Immunhistochemie ein ähnliches Aktivitätsmuster von AKT wie im Western Blot. Es kam zu einer Induktion von AKT in Zebrafish-RGZ nach einer Sehnervverletzung, die ihr Maximum nach etwa 8 Tagen erreichte und danach wieder rückläufig war. Daraus resultierend stellte sich die Frage, ob die Aktivität von AKT ebenfalls zu einer Aktivierung weiterer stromabwärts liegender Komponenten der Signalkaskade führt und welche Bedeutung der Signalweg für die Regeneration im Zebrafisch hat.

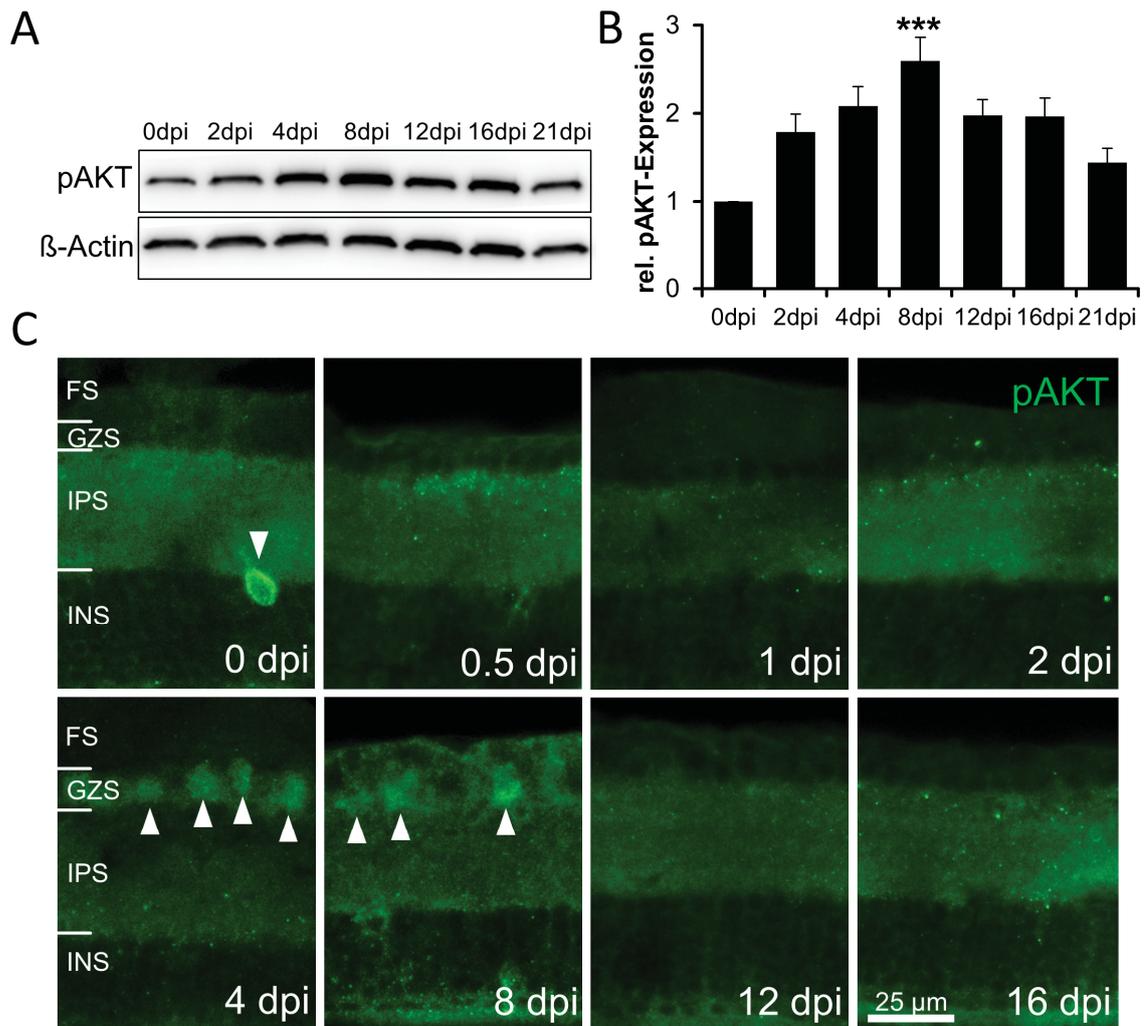


Abb. 5: Induktion von AKT in der Zebrafischretina nach einer Sehnervschädigung

(A) Western Blot mit einem Antikörper gegen phosphorylierte Proteinkinase B (Phosphorylierungsstelle: Ser473; pAKT; 1:500) in Zebrafischretinalysaten zu verschiedenen Zeitpunkten nach einer Sehnervverletzung (dpi = *days post injury*) mit β -Actin (1:5000) als Ladungskontrolle. (B) Quantifizierung von A. Es kam zu einer Zunahme der pAKT-Expression nach einer Sehnervschädigung mit einem Maximum nach 8 Tagen. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit je drei Wiederholungen, die jeweils pro Experiment relativiert wurden. *** $p < 0.001$. (C) Immunhistochemische Färbung von Zebrafischretinaquerschnitten mit dem zuvor im Western Blot verwendeten Antikörper gegen pAKT (1:500) zu verschiedenen Zeitpunkten nach einer Sehnervverletzung. Nach 4 und 8 Tagen kam es zu einem Anstieg pAKT-positiver Zellen in der GZS (Pfeile). Zudem fanden sich in unbehandelten Kontrollen vereinzelt positive Zellen in der INS. FS = Faserschicht; GZS = Ganglienzellschicht; IPS = innere plexiforme Schicht; INS = innere nukleäre Schicht. Vergrößerung: 40x.

4.5 Verletzung des Sehnervs induziert mTOR-Aktivität in der Zebrafischretina

Die Proteinkinase B (AKT) aktiviert stromabwärts mTOR, das in Säugetieren die axonale Regeneration fördert (vgl. Park et al., 2008). Um das entsprechende Aktivitätsniveau im Zebrafisch zu verschiedenen Zeitpunkten nach einer Sehnervverletzung zu untersuchen, wurden histologische Retinaquerschnitte mit einem Antikörper gegen das phosphorylierte ribosomale Protein S6 (pS6) gefärbt (vgl. hier und im Folgenden: Diekmann et al., 2015b). Phospho-S6 wird durch die Aktivierung der *ribosomal protein S6 kinase beta-1* (S6K1) von mTOR phosphoryliert und eignet sich damit als Marker für dessen Aktivität. In unverletzten Kontrollretinae waren nur einige wenige schwach pS6-positive Zellen in der INS erkennbar, während in der GZS keine positive Färbung detektiert wurde (Abb. 6 A). Nach einer Sehnervschädigung wurde hingegen eine starke, pS6-Färbung in Zellkörpern der GZS sichtbar. Ko-Färbungen mit einem Antikörper gegen azetyliertes α Tubulin zeigten eine Kolokalisation und identifizierten diese Zellen als RGZ (Abb. 6 B). Im zeitlichen Verlauf kam es zu einem schnellen, transienten Konzentrationsanstieg von pS6 in der GZS. Das Maximum wurde 2 Tage nach der Verletzung erreicht und lag bei etwa 80 % pS6-positiver Zellen in der GZS (Abb. 6 C). Danach sank der Anteil pS6-positiver RGZ wieder schnell auf das Ausgangsniveau ab, sodass nach 4 Tagen nahezu keine positiven Zellen mehr in der GZS zu finden waren (Abb. 6 A, C). Zur gleichen Zeit nahm jedoch die Anzahl pS6-positiver Zellen in der INS kontinuierlich zu, die durch Ko-Färbung mit einem Antikörper gegen CHAT als cholinerge amakrine Zellen identifiziert wurden (Abb. 6 B). Der Anteil pS6-positiver amakriner Zellen erreichte sein Maximum 8 Tage nach der Schädigung des Sehnervs und die Zellen behielten ein hohes Aktivitätsniveau über einen langen Zeitraum (Abb. 6 C).

Insgesamt zeigte sich ein zeitlich deutlich unterschiedliches Aktivitätsmuster von mTOR in Zebrafisch-RGZ und amakrinen Zellen im Vergleich zum Säugetier. Zudem kam es zu einer deutlich früheren Induktion von mTOR nach einer Sehnervverletzung als vom weiter stromaufwärts der Signalkaskade gelegenen AKT. AKT wurde erst nach 4 Tagen sichtbar induziert (vgl. Abb. 5), nachdem die mTOR-Aktivität der RGZ bereits wieder ihr Ausgangsniveau erreicht hatte. Dies warf die Frage auf, inwiefern es zur Aktivierung von mTOR durch andere Signalmoleküle kommt und welche Bedeutung die mTOR-Aktivität für die Regeneration im Zebrafisch hat.

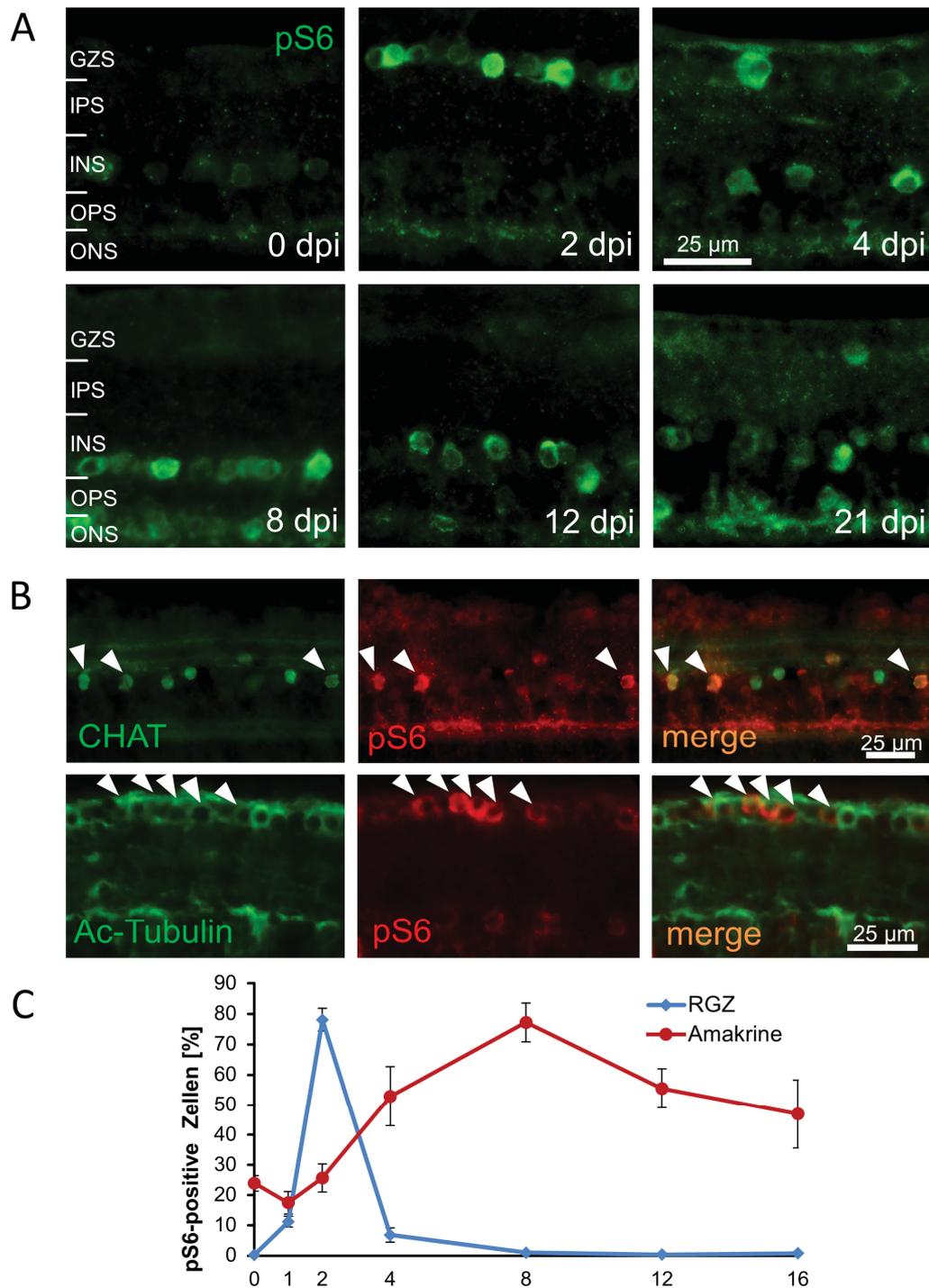


Abb. 6: Verletzung des Sehnervs induziert mTOR-Aktivität in der Zebrafischretina

(A) Immunhistochemische Färbung von Retinaquerschnitten mit einem Antikörper gegen phosphoryliertes ribosomales Protein S6 (pS6, 1:500) zu verschiedenen Zeitpunkten nach einer Sehnervverletzung (dpi = *days post injury*). Es kam zu einem transienten Anstieg pS6-positiver Zellen in der GZS mit einem Maximum nach 2 dpi. Ab 4 dpi nahm die Zahl der pS6-positiven in der INS zu. GZS = Ganglienzellschicht; IPS = innere plexiforme Schicht; INS = innere nukleäre Schicht; OPS = äußere plexiforme Schicht; ONS = äußere nukleäre Schicht. 40x. (B) Ko-Färbungen von pS6 mit einem Antikörper gegen die *choline acetyltransferase* (CHAT, 1:100) zum Nachweis pS6-positiver amakriner Zellen in der INS sowie mit einem Antikörper gegen azetyliertes α Tubulin (Ac-Tubulin) zum Nachweis pS6-positiver retinaler Ganglienzellen (RGZ, siehe Pfeile, 40x). (C) Quantifizierung pS6-positiver RGZ in der GZS sowie von amakrinen Zellen (Amakrine) in der INS zu verschiedenen Zeitpunkten nach einer Sehnervschädigung. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit je sechs untersuchten Retinae.

4.6 *In-vitro*-mTOR-Aktivität in Zebrafisch-RGZ-Kulturen

Im Folgenden wurde die Bedeutung der mTOR-Aktivität im Zebrafisch durch *In-vitro*-Zellkulturexperimente mit RGZ aus dissoziierten Retinae genauer untersucht (vgl. hier und im Folgenden: Diekmann et al., 2015b). Zu verschiedenen Zeitpunkten erfolgte eine Ko-Färbung mit den zuvor verwendeten Antikörpern gegen pS6 sowie azetyliertem α Tubulin als Marker zur Identifizierung von RGZ. Während nach 2 Stunden in Kultur bereits 37 % der RGZ pS6-positiv waren, stieg die Anzahl weiter auf etwa 50 % nach 6 Stunden an. Nach 1 und 2 Tagen in Kultur blieb der Anteil positiver Zellen konstant und nahm nach 4 Tagen wieder deutlich ab (Abb. 7 A). Insgesamt konnte *in vitro* ein ähnliches Muster der mTOR-Aktivität wie *in vivo* beobachtet werden. Der Anstieg pS6-positiver RGZ in Zellkultur erfolgte deutlich schneller als *in vivo*, dabei blieb das Maximum positiver Zellen an der Gesamtzahl jedoch niedriger (50 % zu 80 %; vgl. Abb. 6 C und Abb. 7 A). Dies ist vermutlich auf unterschiedliche Bedingungen *in vivo* und in Zellkultur zurückzuführen.

Da wie zuvor gezeigt (vgl. Abb. 3) eine Zugabe von CNTF das Neuritenwachstum von RGZ in Zellkultur stimulieren konnte, wurde das Experiment in Anwesenheit von CNTF wiederholt, um zu überprüfen, ob dieses teilweise über die Aktivierung von mTOR wirkt. Es zeigte sich, dass CNTF den Anteil pS6-positiver RGZ nach 2 sowie 6 Stunden in Kultur signifikant gegenüber den Kontrollen erhöhte (Abb. 7 A). Zu späteren Zeitpunkten hingegen konnte es die Anzahl der pS6-positiven Zellen im Vergleich zur Kontrolle nicht steigern. Dies legt nahe, dass CNTF zu späteren Zeitpunkten keinen stimulierenden Effekt mehr auf die mTOR-Aktivierung hatte, sondern lediglich in frühen Phasen des Regenerationsprozesses eine Wirkung zeigte (Abb. 7 A). Diese Vermutung wurde durch Experimente bestätigt, bei denen CNTF den Zellkulturen erst nach 1 Tag in Kultur zugegeben wurde. In diesem Fall konnte das Zytokin die Zahl pS6-positiver Zellen nicht mehr erhöhen, was darauf schließen lässt, dass keine Sensitivität für CNTF zu späteren Zeitpunkten mehr besteht (Daten nicht gezeigt).

In einem weiteren Schritt wurde die Wirkung verschiedener pharmakologischer Inhibitoren auf die mTOR-Aktivierung näher untersucht. Diese Experimente bestätigten zunächst, dass die beobachtete S6-Phosphorylierung tatsächlich von der mTOR-Aktivierung abhängt und damit ein verlässlicher Parameter zur Bestimmung der mTOR-Aktivität ist. Unter Zugabe des mTOR-Inhibitors Rapamycin konnte die

Phosphorylierung von S6 sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von CNTF vollständig unterdrückt werden (Abb. 7 B, C). Im Gegensatz dazu wurde durch Einsatz des PTEN-Inhibitors bpV, der über die PI3-Kinase die mTOR-Aktivität steigert, der Anteil pS6-positiver Zellen sowohl mit als auch ohne CNTF signifikant gegenüber dem Kontrollniveau erhöht (bpV: 66 % und bpV+CNTF: 72 % gegenüber Kontrolle: 52 % und CNTF: 65 %; Abb. 7 C). Die Kombination von bpV mit Rapamycin unterdrückte weiterhin die Phosphorylierung von S6 vollständig, was zeigt, dass bpV über die Aktivierung von mTOR den Anteil pS6-positiver Zellen erhöhte. Die Zugabe von LY294002 (ly), einem Inhibitor unter anderem von AKT, reduzierte in einer Konzentration von 10 μ M den Anteil pS6-positiver RGZ mit und ohne Zugabe von CNTF bereits deutlich und in einer Konzentration von 20 μ M vollständig (Abb. 7 C). Da auch die gleichzeitige Zugabe von bpV den inhibierenden Effekt von LY294002 nicht kompensieren konnte, scheinen beide Substanzen die mTOR-Aktivität über den gleichen Signalweg zu beeinflussen (Abb. 7 C). Insgesamt zeigte sich, dass die Phosphorylierung von S6 mit der mTOR-Aktivität im Zebrafisch korreliert.

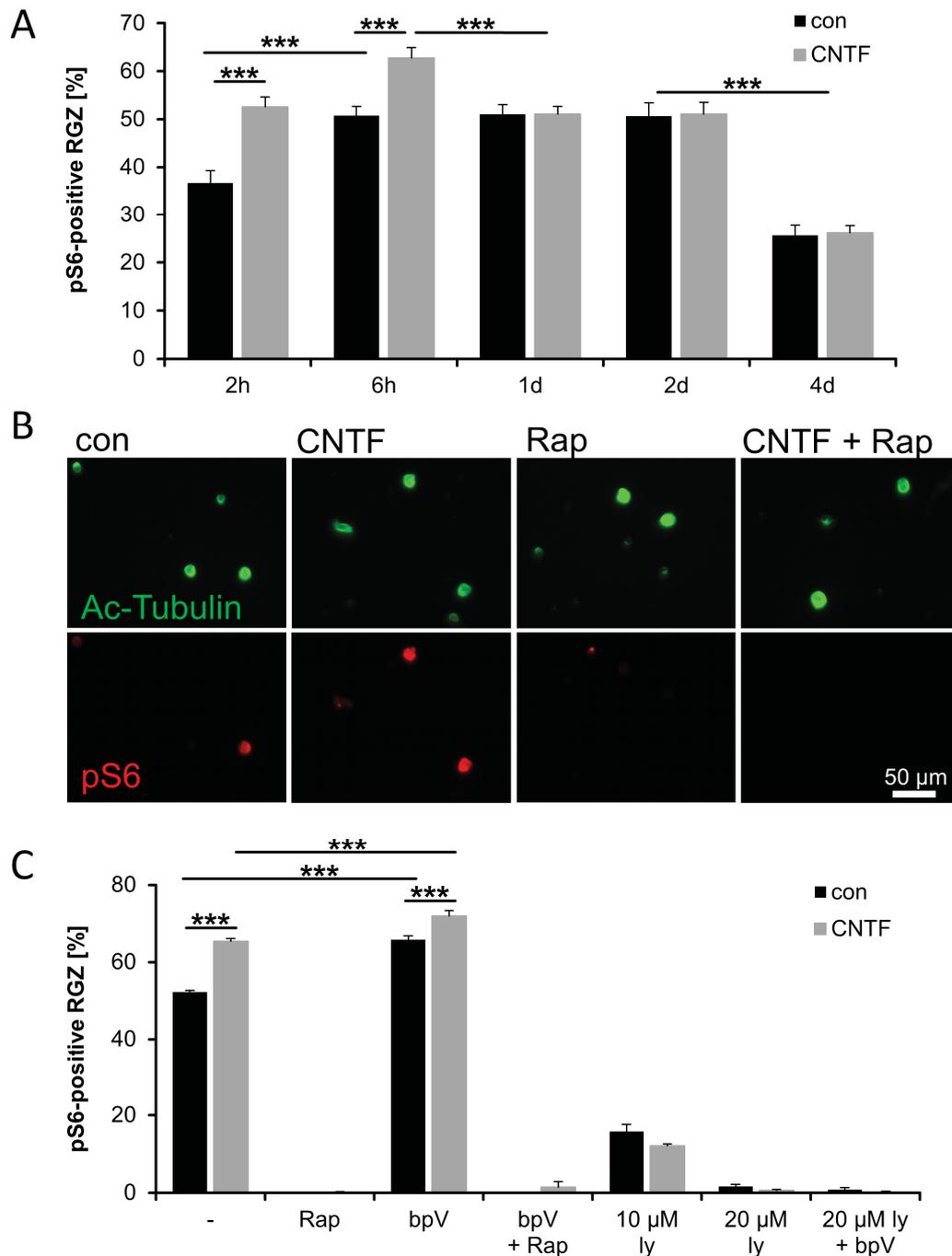


Abb. 7: In-vitro-mTOR-Aktivität in Zebrafisch-RGZ-Kulturen

(A) Quantifizierung der Anzahl pS6-positiver RGZ in dissoziierten Kulturen zu verschiedenen Zeitpunkten mit und ohne Zugabe von *ciliary neurotrophic factor* (CNTF, 1 ng/ml). Diese erreichte nach 6 Stunden (h) ihr Maximum und fiel nach 4 Tagen (d) wieder ab. Durch Zugabe von CNTF war der Anteil pS6-positiver Zellen zu frühen Zeitpunkten steigerbar. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten mit je drei Wiederholungen. *** $p < 0,001$. (B) Repräsentative Bilder von RGZ nach 2 Stunden in Zellkultur gefärbt mit Antikörpern gegen azetyliertes α Tubulin (Ac-Tubulin, 1:1000) und phosphoryliertes S6 (pS6, 1:500). Einigen Kulturen wurde CNTF (1 ng/ml) oder Rapamycin (Rap, 10 nM) zugegeben. 20x. (C) Quantifizierung pS6-positiver RGZ nach 6 Stunden in Kultur mit und ohne Zugabe von CNTF (1 ng/ml) in Anwesenheit verschiedener Inhibitoren: Rapamycin (Rap, 10 nM), dem PTEN-Inhibitor *bisphosphovanadium* (bpV, 10nM), LY294002 (ly, 10; 20 μ M) oder der Kombination aus bpV + Rap bzw. ly + bpV. Rap und ly unterdrückten die S6-Phosphorylierung mit und ohne CNTF vollständig. Die Zugabe von bpV konnte die Zahl der pS6-positiven Zellen weiter steigern und erhöhte diese zusätzlich zum beobachteten CNTF-Effekt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit je drei Wiederholungen. *** $p < 0,001$.

4.7 mTOR-Aktivität beeinflusst das Neuritenwachstum von RGZ

In einem nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Aktivität von mTOR das Axonwachstum von Zebrafisch-RGZ beeinflusst (vgl. hier und im Folgenden: Diekmann et al., 2015b). Dazu wurden Zellkulturen sowohl mit Rapamycin als auch mit bpV behandelt und die mittlere Neuritenlänge ausgewachsener RGZ nach 4 Tagen Inkubation quantifiziert. Dabei beeinträchtigte Rapamycin grundsätzlich das basale Neuritenwachstum der RGZ nicht (vgl. Kontrolle: 68 μm und Rap: 72 μm ; Abb. 8), obwohl es die Phosphorylierung von S6 bereits nach kurzer Zeit in Zellkultur vollständig unterdrückte (vgl. Abb. 7 C). Eine Zugabe von bpV konnte das Neuritenwachstum hingegen ähnlich stark fördern wie die Zugabe von CNTF (bpV: 85 μm ; CNTF: 82 μm ; Abb. 3 B, D, Abb. 8). Weiterhin ergab eine Kombination aus CNTF und bpV die stärkste Steigerung des Neuritenwachstums (bpV+CNTF: 98 μm ; Abb. 8). Die beobachteten Wachstumseffekte durch CNTF bzw. bpV reduzierten sich jedoch in Anwesenheit von Rapamycin wieder auf das Kontrollniveau (CNTF+Rap: 69 μm ; bpV+Rap: 71 μm ; CNTF+bpV+Rap: 71 μm ; Abb. 8), was einen Zusammenhang zwischen der erhöhten mTOR-Aktivität und dem gemessenen Neuritenwachstum vermuten lässt. Auch die Zugabe des Inhibitors LY294002, der ebenfalls die S6-Phosphorylierung unterdrücken konnte (vgl. Abb. 7 C), senkte das Neuritenwachstum nicht unter den Kontrollwert (ly: 70 μm ; Kontrolle: 68 μm ; Abb. 8). Genau wie Rapamycin neutralisierte auch LY294002 die wachstumssteigernden Effekte von CNTF und verminderte die mittlere Neuritenlänge wieder auf das Kontrollniveau (ly+CNTF: 72 μm und CNTF: 82 μm ; Abb. 8).

In den durchgeführten Experimenten steigerten CNTF und bpV, die deutlich die mTOR-Aktivität erhöhten, auch das Neuritenwachstum dissoziierter RGZ signifikant. Die beobachtete Wachstumsförderung konnte jedoch durch die Inhibitoren Rapamycin und LY294002 unterdrückt werden, was eine Korrelation zwischen erhöhter mTOR-Aktivität und durch PI3K/AKT-stimuliertes Neuritenwachstum vermuten lässt. Insgesamt zeigten die Ergebnisse, dass eine mTOR-Aktivität zwar nicht für das basale Axonwachstum notwendig war, eine erhöhte mTOR-Aktivität jedoch das Neuritenwachstum von Zebrafisch-RGZ förderte.

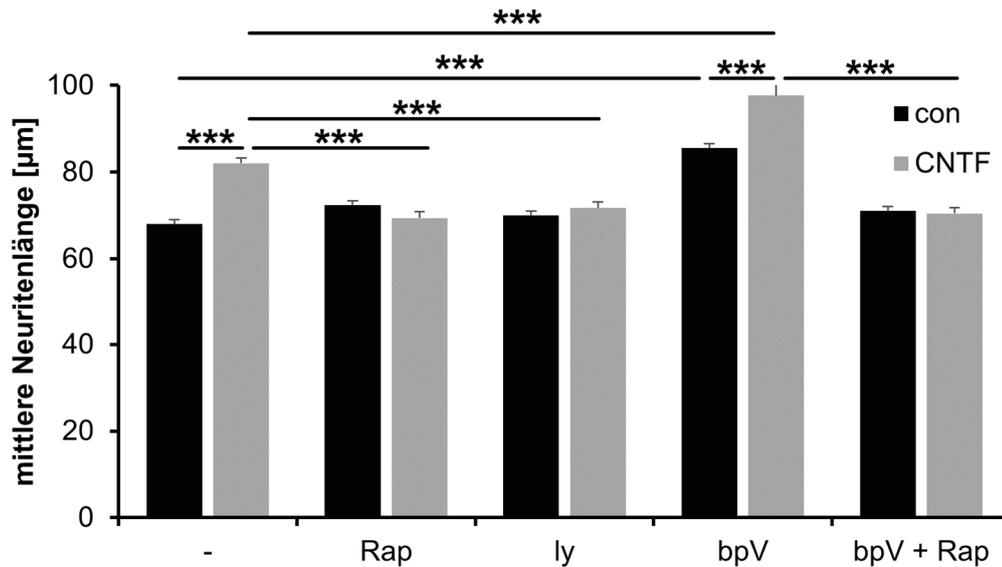


Abb. 8: mTOR-Aktivität beeinflusst das Neuritenwachstum von RGZ

Quantifizierung der mittleren Neuritenlänge (μm) ausgewachsener retinaler Ganglienzellen (RGZ) nach 4 Tagen in Kultur, die mit *ciliary neurotrophic factor* (CNTF, 1 ng/ml) sowie verschiedenen Inhibitoren behandelt wurden: Rapamycin (Rap, 10 nM), LY294002 (ly, 10 μM), dem PTEN-Inhibitor *bisperoxovanadium* (bpV, 10 nM) und der Kombination aus bpV+Rap. Dabei hatten Rap und ly keinen Einfluss auf das basale Neuritenwachstum. Die Zugabe von bpV sowie CNTF konnte das Neuritenwachstum signifikant steigern. Bei der Kombination von bpV und CNTF kam es zu den stärksten Wachstumseffekten. Rap oder ly konnten diese Effekte jedoch wieder auf das Kontrollniveau reduzieren. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit je drei Wiederholungen. *** $p < 0,001$.

4.8 *In-vivo*-Applikation von Rapamycin unterdrückt mTOR-Aktivität

Um die Bedeutung der mTOR-Aktivität für axonale Regenerationsprozesse *in vivo* zu untersuchen, wurde analysiert, ob Rapamycin *in vivo* die mTOR-Aktivität im gleichen Maß unterdrückt wie *in vitro*. Dazu wurden verschiedene Applikationsmethoden für eine effektive Rapamycinbehandlung der Tiere getestet (vgl. hier und im Folgenden: Diekmann et al., 2015b). Während eine intravitreale sowie intraperitoneale Injektion von Rapamycin keine Reduktion der S6-Phosphorylierung in der Zebrafischretina zur Folge hatte, stellte sich eine Zugabe des Rapamycins in das Wasser der Fische unmittelbar nach der Sehnervverletzung als sehr wirkungsvoll heraus. Die in immunhistochemischen Untersuchungen 2 Tage nach einer Sehnervschädigung beobachtete starke Induktion von pS6 in RGZ (vgl. Abb. 6 A) konnte durch eine Rapamycinbehandlung der Tiere vollständig unterdrückt werden. In Ko-Färbungen mit einem Antikörper gegen azetyliertes $\alpha\text{Tubulin}$ fanden sich keine pS6-positiven RGZ mehr in der GZS (Abb. 9 A, C). Ebenso wurde die nach 6 Tagen normalerweise stattfindende pS6-Induktion in den cholinergen amakrinen Zellen der INS durch Zugabe von Rapamycin

vollständig verhindert. Ko-Färbungen mit einem Antikörper gegen CHAT zeigten auch bei diesen Untersuchungen keine übereinstimmende Färbung (Abb. 9 B, D).

Aus den Experimenten lässt sich schließen, dass die beobachtete Induktion von pS6 nach einer Sehnervverletzung auch *in vivo* auf eine erhöhte mTOR-Aktivität zurückzuführen ist. Diese konnte vollständig und langfristig durch den Zusatz von Rapamycin in das Wasser der Zebrafische unterdrückt werden. Daraus ergeben sich perspektivisch interessante Möglichkeiten für funktionelle *In-vivo*-Studien, um die funktionellen Auswirkungen einer mTOR-Inhibition auf die Axonregeneration nach einer Nervenläsion in Zebrafischen zu untersuchen.

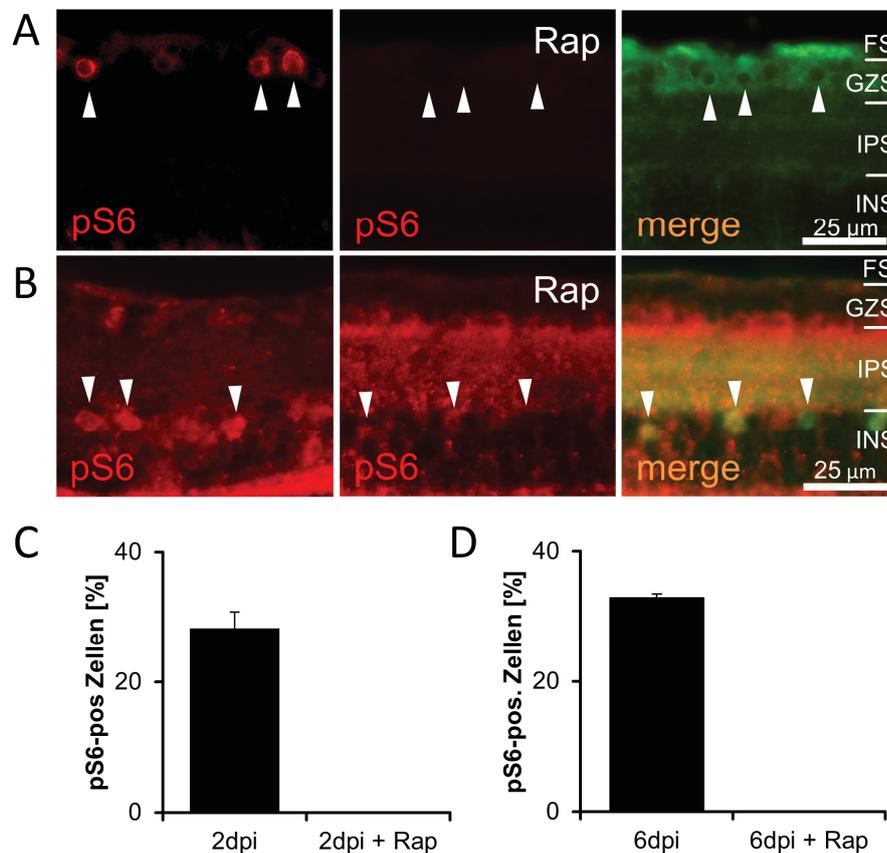


Abb. 9: *In-vivo*-Applikation von Rapamycin unterdrückt mTOR-Aktivität

(A) Immunhistochemische Färbung von Zebrafischretinaquerschnitten mit Antikörpern gegen phosphoryliertes S6 (pS6; 1:500) und azetyliertes α Tubulin (1:1000) 2 Tage nach einer Sehnervverletzung (dpi = *days post injury*). Die Tiere wurden entweder in DMSO oder 0.2 μ M Rapamycin-haltigem Wasser (Rap) gehalten. Die Pfeile markieren pS6- und azetyliertes α Tubulin-positive retinale Ganglienzellen (RGZ). Rapamycin unterdrückte pS6 vollständig in der GZS. *Merge* = pS6+azetyliertes α Tubulin. FS = Faserschicht; GZS = Ganglienzellschicht; IPS = innere plexiforme Schicht; INS = innere nukleäre Schicht. 40x. (B) Immunhistochemische Ko-Färbung wie in A beschrieben mit Antikörpern gegen pS6 und *choline acetyltransferase* (CHAT, 1:100). Es kam ebenfalls zu einer vollständigen Unterdrückung von pS6 in der INS durch Rapamycin. *Merge* = pS6+CHAT. 40x. (C) Quantifizierung pS6-positiver RGZ in der GZS nach 2 dpi mit und ohne Rapamycinbehandlung. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit je drei Wiederholungen. (D) Quantifizierung pS6-positiver amakriner Zellen in der INS mit und ohne Rapamycinbehandlung nach 6 dpi wie in C.

5. Diskussion

Die vorliegende Arbeit untersucht mit regenerativen Prozessen assoziierte molekulare Signalwege auf ihre Bedeutung im Zebrafisch-ZNS, da dieses anders als bei Säugetieren die Fähigkeit zur vollständigen Regeneration nach Verletzungen besitzt. Dazu mussten zunächst spezifische Marker zur sicheren Identifizierung von Zebrafisch-RGZ etabliert und ein Protokoll zur Isolation und Kultivierung der Zellen entwickelt werden. Daraus ergab sich die Möglichkeit, pharmakologische *In-vitro*-Studien mit verschiedenen Aktivatoren und Inhibitoren von regenerationsfördernden Signalkaskaden in Zellkultur durchzuführen. Während der MAPK/ERK-Signalweg keine besondere Bedeutung für die axonale Regeneration im Zebrafisch zu haben scheint, zeigte sich ein zum Säugetiermodell fundamental unterschiedliches Aktivierungsmuster des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs. Bei fehlender mTOR-Grundaktivität kam es unmittelbar nach einer Sehnervverletzung zu einer starken, wenn auch lediglich temporären, Induktion von mTOR *in vivo* sowie *in vitro*. Interessanterweise wurde das Maximum der immunhistochemisch detektierbaren mTOR-Aktivität in der Zebrafischretina bereits nach 2 Tagen erreicht. Ein Konzentrationsanstieg der in der Signalkaskade weiter stromaufwärts gelegenen AKT konnte hingegen erst nach 4 bis 8 Tagen beobachtet werden. Somit ist eine Beteiligung zusätzlicher Mechanismen an der Aktivierung von mTOR wahrscheinlich. Eine Stimulation der RGZ durch CNTF und bpV erhöhte die axonale Regeneration in Zellkultur signifikant. Die Inhibition des Signalwegs durch Rapamycin (Rap) oder LY294002 (ly) unterdrückte zwar diese Wachstumssteigerung, nicht aber das basale Neuritenwachstum. Der Signalweg scheint deshalb für den Regenerationsprozess nicht essenziell zu sein. Jedoch korrelierte die mTOR-Aktivität mit durch Zytokine sowie PTEN-Inhibition induziertem Neuritenwachstum und trug damit zur axonalen Regeneration bei.

5.1 Etablierung von Neuritenauswachsassays von Zebrafisch-RGZ

Bisher waren weder immunhistochemisch oder immunzytochemisch Antikörper zur Identifizierung von Zebrafisch-RGZ beschrieben, noch Protokolle zur Durchführung von *In-vitro*-Auswachsassays etabliert. *Real-time* PCR-Analysen der Gap43-Expression im Zebrafisch zeigten eine starke Induktion in den ersten 2 Tagen nach einer

Sehnervverletzung (vgl. Diekmann et al., 2015a), was ähnliche vorherige Western Blot-Analysen bestätigte (Kaneda et al., 2008). Jedoch ergab eine weitere Charakterisierung des Antikörpers keine RGZ-spezifische Färbung, sodass im Verlauf transgene GAP43:GFP-Zebrafische zum Einsatz kamen. Diese exprimieren GFP unter der Kontrolle eines GAP43-Promoters (Udvardia, 2008). Der zeitliche Verlauf der GFP-Expression korreliert dabei stark mit der Expression von GAP43 (Udvardia, 2008). Es konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass es in den transgenen GAP43:GFP-Fischen nach einer Sehnervschädigung zu einer starken GFP-Expression spezifisch in den verletzten Neuronen und ihren regenerierenden Axonen kam (vgl. Diekmann et al., 2015a). Ein Anstieg der GFP-Konzentration in anderen retinalen Zellen wie amakrinen Zellen fand hingegen nicht statt. Diese Experimente zeigten, dass die transgenen GAP43:GFP-Zebrafische ermöglichen, RGZ und ihre Axone in Zellkultur spezifisch zu erkennen und das Neuritenwachstum nach einer Sehnervverletzung im Rahmen von Auswachsassays zu quantifizieren (Diekmann et al., 2015a).

Im Rahmen der Zellkulturexperimente wurden einige Proben durch ein vorheriges *priming*, ein bekanntes Phänomen, in einen regenerativen Zustand versetzt (Hoffman, 2010; Rasmussen and Sagasti, 2016). Nach einer Verletzung des Sehnervs der Tiere erfolgte dabei erst 8 Tage nach der Schädigung die Entnahme und Dissoziation der Retinae. Es konnte nachgewiesen werden, dass ein vorheriges *priming* in Säugetieren (Gutmann, 1942; Neumann and Woolf, 1999) sowie in Goldfischen die axonale Regeneration beschleunigen und steigern kann (Lanners and Grafstein, 1980; Edwards et al., 1981; McQuarrie and Grafstein, 1981). Interessanterweise zeigten sich jedoch in den Zebrafisch-RGZ-Kulturen keine Unterschiede zwischen den Versuchsansätzen mit einem vorhergegangenen *priming* und den unbehandelten Kontrollen. Auch wurde der CNTF-vermittelte Wachstumseffekt durch ein vorheriges *priming* nicht beeinflusst. In Untersuchungen des peripheren Nervensystems von adulten Zebrafischen konnte hingegen ebenfalls ein *priming*-Effekt beobachtet werden (Graciarena et al., 2014), sodass scheinbar lediglich im Zebrafisch-ZNS ein vorheriges *priming* keinen regenerationsfördernden Effekt hat.

5.2 Einfluss von CNTF auf die axonale Regeneration im Zebrafisch

Die Zugabe von CNTF konnte in Zellkulturen dissoziierter Fisch-RGZ das Neuritenwachstum gegenüber der Kontrolle signifikant steigern (vgl. hier und im Folgenden: Diekmann et al., 2015a). Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen ähnlicher Untersuchungen im Zebrafisch an Retinaexplantaten (Elsaeidi et al., 2014) sowie früheren Untersuchungen an Goldfischen (Petrausch et al., 2000). Im Säugetiermodell wurden CNTF und LIF als wichtige Mediatoren für neuroprotektive und regenerationsfördernde Effekte identifiziert, die eine vergleichbare Förderung der axonalen Regeneration zeigten (Müller et al., 2007, 2009; Leibinger et al., 2009). Unterschiede ergaben sich hingegen bei den CNTF-Konzentrationen, die zur Wachstumsförderung notwendig waren. Bei Untersuchungen im Zebrafischmodell war bereits eine Konzentration von 1 ng/ml ausreichend, um eine maximale Effektstärke zu erreichen. Höhere Konzentrationen führten hingegen zu keiner weiteren Steigerung des Neuritenwachstums. Untersuchungen im Goldfisch zeigten im Vergleich dazu bei einer Konzentration von 1 ng/ml kaum eine Wirkung, das Effektmaximum wurde dort bei 10 ng/ml erreicht (Petrausch et al., 2000). Höhere Dosen resultierten wiederum in einem reduzierten Axonwachstum (Petrausch et al., 2000). Im Säugetiermodell wurden bei Ratten hingegen deutlich höhere Konzentrationen von 200 ng/ml verwendet, um die größtmögliche Wirkung von CNTF zu erreichen (Müller et al., 2007, 2009; Leibinger et al., 2009). Möglicherweise reagieren Zebrafisch-RGZ unter anderem aufgrund ihrer Regenerationskompetenz deutlich sensitiver auf eine Zytokinstimulation als Säugetier-RGZ, sodass deutlich geringere Konzentrationen notwendig sind.

5.3 Bedeutung von MAPK/ERK und AKT für die Regeneration im Zebrafisch

Im Säugetier wurde durch eine Zytokinbehandlung oder inflammatorische Stimulation der MAPK/ERK-Signalweg aktiviert (Park et al., 2004; Müller et al., 2009; Fischer and Leibinger, 2012). Dabei führte eine Inhibition des Signalwegs jedoch nicht zu einer Einschränkung des CNTF-vermittelten Regenerationseffekts (Park et al., 2004; Müller et al., 2009). CNTF aktivierte die MAPK/ERK-Signalkaskade primär in Müller-

Gliazellen. Dies war essenziell für die endogene CNTF-Expression dieser Zellen, die wiederum auf indirekte Weise wachstumsfördernde Effekte vermittelt (Müller et al., 2009). Im Zebrafisch konnte ebenfalls keine MAPK-Aktivität in RGZ nachgewiesen werden, sondern ausschließlich in Müller-Gliazellen. Nach einer Sehnervverletzung kam es zu keiner Steigerung der MAPK-Aktivität in der Zebrafischretina, sodass eine Aktivierung des MAPK/ERK-Signalwegs für den Regenerationsprozess im Zebrafisch scheinbar nicht notwendig ist.

Nach einer Schädigung des Sehnervs wurde zudem die Phosphorylierung des Signalproteins AKT induziert. Im Western Blot zeigte sich ein Konzentrationsanstieg 2 Tage nach einer Optikusläsion mit einem Maximum nach 8 Tagen. Erhöhte pAKT-Level wurden bis 21 Tage nach einer Verletzung aufrechterhalten. In immunhistochemischen Färbungen fand sich eine starke pAKT-Induktion 4 bis 8 Tage nach einer Nervenverletzung. Ein ähnliches Aktivitätsmuster von AKT konnte auch im Goldfisch beobachtet werden, bei dem ein pAKT-Anstieg im Western Blot 3 Tage nach einer Axonschädigung detektiert wurde, der sein Maximum nach 10 Tagen erreichte. Diese Induktion wurde lange Zeit aufrechterhalten und fiel erst nach 30 Tagen wieder ab (Koriyama et al., 2007). In Retinaquerschnitten von Goldfischen zeigte sich eine Induktion von pAKT nach 3 bis 5 Tagen und trat damit zu einem ähnlichen Zeitpunkt wie im Zebrafisch auf (Koriyama et al., 2007).

Eine Phosphorylierung von AKT führt zu einer Aktivierung des stromabwärts liegenden mTOR (Park et al., 2010; Fischer und Leibinger, 2012). Interessanterweise wurde in der Zebrafischretina eine Induktion des mTOR-abhängigen pS6 bereits nach 1-2 Tagen und damit deutlich früher beobachtet. Dieser Konzentrationsanstieg war aber 4 Tage nach einer Sehnervverletzung kaum noch detektierbar, während zu diesem Zeitpunkt pAKT erst in immunhistochemischen Färbungen sichtbar wurde. Dies legt nahe, dass mTOR zu diesem frühen Zeitpunkt möglicherweise über andere Signalproteine und damit AKT unabhängig aktiviert wurde. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass bereits geringe Konzentrationen von pAKT zur Aktivierung des stromabwärts liegenden mTOR ausreichen. Diese waren dann jedoch für einen immunhistochemischen Nachweis zu gering. Durch eine zunehmende Akkumulation von pAKT im Verlauf des Regenerationsprozesses kam es dann nach 4 Tagen zu einer positiven Färbung in den RGZ. Diese Vermutung konnte durch *In-vitro*-Zellkulturexperimente erhärtet werden, bei

denen eine Zugabe des PI3K-Inhibitors LY294002 die Phosphorylierung von S6 in unbehandelten Kontrollen sowie in Versuchsansätzen mit CNTF vollständig unterdrückte. Ebenso konnte der Inhibitor den Effekt von bpV, das durch PTEN-Hemmung die mTOR-Aktivität erhöht, vollständig verhindern. Daraus lässt sich schließen, dass bpV über den PI3K/AKT-Signalweg die mTOR-Aktivität positiv beeinflusst. In Neuritenauswachsassays konnte LY294002 ebenfalls die Zytokinvermittelten Wachstumseffekte genau wie bei der Zugabe von Rapamycin annullieren. Da das Neuritenwachstum jedoch lediglich auf das Kontrollniveau reduziert wurde, ist eine Korrelation zwischen der erhöhten mTOR-Aktivität und dem durch den PI3K/AKT-Signalweg stimulierten Neuritenwachstum in Kultur zu vermuten. Dies stimmt mit Untersuchungen im Säugetiermodell überein, bei denen CNTF und LIF ebenfalls den PI3K/AKT-Signalweg stimulierten und das axonale Wachstum steigerten, während eine Inhibition mit LY294002 den Wachstumseffekt dementsprechend unterdrückte (Park et al., 2004; Müller et al., 2009).

5.4 mTOR-Aktivität im Zebrafisch im Vergleich zum Säugetier

Wie bereits zuvor in der Literatur beschrieben (Park et al., 2008; Leibinger et al., 2012), wurde die Induktion von mTOR in der Zebrafischretina nach einer Sehnervverletzung durch das Ausmaß der Phosphorylierung des ribosomalen Proteins S6 durch S6K1 gemessen. Durch die Zugabe des mTOR-Inhibitors Rapamycin konnte die S6-Phosphorylierung sowohl *in vivo* als auch *in vitro* vollständig unterdrückt werden. Durch eine Stimulation der mTOR-Aktivität über den PI3K/AKT-Signalweg mittels CNTF oder bpV konnte die pS6-Konzentration in Zellkultur signifikant erhöht werden. Phospho-S6 erwies sich folglich als ein verlässlicher Parameter, um die mTOR-Aktivität im Zebrafisch zu untersuchen (vgl. hier und im Folgenden: Diekmann et al., 2015b).

Die mTOR-Aktivität in Zebrafisch-RGZ unterscheidet sich fundamental vom Aktivierungsmuster in Nagetieren. In unbehandelten Mäusen findet sich eine geringe Anzahl an RGZ mit hohen pS6-Konzentrationen, was auf eine konstitutive mTOR-Aktivität hinweist. Diese Zellen zeigen die beste Regenerationsfähigkeit (Duan et al., 2015). Nach einer Sehnervverletzung reduziert sich die Anzahl dieser positiven Zellen in Nagetieren, was zu einer verminderten Regenerationsfähigkeit führt

(Park et al., 2008; Leibinger et al., 2012). Im Gegensatz dazu waren keine pS6-positiven RGZ in naiven Zebrafischen zu finden. In Folge einer Schädigung des Sehnervs kam es dann zu einer starken Induktion von pS6 *in vivo* sowie *in vitro*. Dabei erfolgte der Anstieg in Zellkultur schneller als *in vivo*, das Maximum blieb jedoch geringer. Die Ursachen dafür könnten in abweichenden Umgebungsfaktoren *in vivo* sowie in Zellkultur liegen, durch die die Neurone in unterschiedlichem Maße beeinflusst wurden. Die beobachtete mTOR-Induktion war jedoch nur transient und erreichte bereits 4 Tage nach der Verletzung wieder das Ausgangsaktivitätsniveau. Mit einer Verzögerung von 4 Tagen kam es zudem zu einer lang anhaltenden mTOR-Induktion in cholinergen amakrinen Zellen in der INS der Retina.

Es ist bekannt, dass mTOR durch verschiedene Signalwege wie PI3K/AKT, MAPK/ERK, CDK42/PLD oder den Wnt-Signalweg aktiviert werden kann (Fang et al., 2001; Ma et al., 2005; Huang und Manning, 2009; Hirose et al., 2014). LIF, das den PI3K/AKT/mTOR Signalweg in Nagetieren aktiviert (Li et al., 2014), wird ebenfalls in Zebrafisch-RGZ kurz nach einer Sehnervverletzung stark hochreguliert und könnte zur mTOR-Induktion beigetragen haben (Ogai et al., 2014). Die LIF-Induktion korreliert exakt mit der Regulation der beobachteten mTOR-Aktivität nach einer Sehnervschädigung. Weiterhin wurde beschrieben, dass mTOR selbst inhibitorisch auf den PI3K/AKT-Signalweg in Form einer negativen Rückkopplungs-Hemmung wirkt (Harrington et al., 2005; Manning und Cantley, 2007). Ebenso haben Untersuchungen gezeigt, dass die Phosphorylierung von *Rictor* durch S6K1 die Signalmoleküle mTORC2 sowie AKT inhibiert (Julien und Roux, 2010). Diese Autoregulationsmechanismen könnten ebenfalls am schnellen Abfall der mTOR-Aktivität nach der starken initialen Induktion beteiligt sein. Eine Zugabe von CNTF oder bpV zu späteren Zeitpunkten nach einer Sehnervläsion konnte in dissoziierten Zellkulturen die mTOR-Aktivität nicht mehr steigern. Vor diesem Hintergrund ist es möglich, dass die beteiligten Signalwege im Verlauf des Regenerationsprozesses deaktiviert werden.

Das Aktivierungsmuster von mTOR zeigte im Zebrafisch einen ähnlichen Verlauf wie bei anderen regenerationsfähigen Säugetiermodellen. In Untersuchungen des Ischiasnervs von Nagetieren kam es zu einer Verdopplung der pS6-Konzentration in den Hinterwurzelganglien (HWG) 1 Tag nach einer Sehnervverletzung, die nach 4 Tagen wieder auf das Ausgangsniveau sank (Abe et al., 2010). Ebenso wurde eine vergleichbare

transiente S6K-Phosphorylierung in regenerierenden mesenchymalen Zellen 6 Stunden bis 3 Tage nach einer Flossenamputation in Zebrafischen nachgewiesen (Hirose et al., 2014). Diese Beobachtungen sprechen für eine vorübergehende Induktion von mTOR in regenerierenden Geweben, während es im regenerationsinkompetenten Säugetier-ZNS zu einem Abfall der mTOR-Aktivität kommt (Park et al., 2008; Leibinger et al., 2012).

Die Experimente belegen, dass sich die Regulation der mTOR-Aktivität nach Verletzungen im Zebrafisch-ZNS grundlegend von Säugetieren unterscheidet. Vor diesem Hintergrund wäre es interessant zu untersuchen, ob eine schnelle, transiente mTOR-Induktion in allen RGZ, wie im Zebrafisch beobachtet, auch einen positiven Effekt auf die Regeneration von RGZ in Säugetieren hätte.

5.5 Stimulation und Inhibition von mTOR-Aktivität

Durch Zugabe des mTOR-Inhibitors Rapamycin konnte die Phosphorylierung von S6 in Zellkultur vollständig unterdrückt werden (vgl. hier und im Folgenden: Diekmann et al., 2015b). Dies spricht für eine spezifische Hemmung der mTOR-Aktivität. Ähnlich wie bei RGZ von Mäusen beeinträchtigte eine Rapamycinbehandlung das basale Neuritenwachstum jedoch nicht (Leibinger et al., 2012). Vergleichbar mit vorhergegangenen Untersuchungen (Elsaeidi et al., 2014; Diekmann et al., 2015a) konnte durch Zugabe von CNTF oder bpV hingegen die S6-Phosphorylierung sowie das Neuritenwachstum in Zellkultur gefördert werden. Eine Kombination von CNTF und bpV zeigte dabei den stärksten positiven Effekt auf das Axonwachstum. Diese wachstumsfördernden Effekte konnten durch gleichzeitige Gabe von Rapamycin jedoch vollständig auf das Kontrollniveau reduziert werden. Im Gegensatz dazu führte eine Rapamycinbehandlung von Mäuse-RGZ lediglich zu einer Unterdrückung des pro-regenerativen CNTF-Effekts bei Myelin-Substrat, nicht jedoch bei der Verwendung eines wachstumsfördernden Substrats wie Laminin (Leibinger et al., 2012). Ursache für diese Unterschiede könnte die natürliche Beschaffenheit des Zebrafischnervs sein, welcher kein inhibitorisches Umfeld für regenerierende Axone darstellt (Bastmeyer et al., 1991, 1993; Schwalb et al., 1995; Wanner et al., 1995). Da die mTOR-Aktivität nach einer kurzen, starken Induktion schnell wieder auf das Ausgangsniveau herunterreguliert wird, stellt

sich die Frage, ob eine längerfristige Aktivierung zu stärkerem Axonwachstum führen würde oder ob gerade die beobachtete transiente Aktivität für den Regenerationsprozess notwendig ist.

Ähnlich wie in Zellkultur konnte eine Behandlung der Zebrafische mit Rapamycin pS6 auch *in vivo* in der Zebrafischretina vollständig unterdrücken. Damit zeigte sich, dass die Phosphorylierung von S6 auch *in vivo* auf eine erhöhte mTOR-Aktivität zurückzuführen war. Weiterhin ergab sich daraus die perspektivische Möglichkeit für funktionelle *In-vivo*-Studien, um den Einfluss von Rapamycin auf den funktionellen Regenerationsprozess zu untersuchen. In Säugetier-RGZ führt die Aufrechterhaltung der natürlichen mTOR-Aktivität von vor der Sehnervverletzung, beispielsweise durch einen genetischen PTEN-*knockout*, zu einer deutlichen Steigerung der axonalen Regeneration *in vivo* (Park et al., 2008; Smith et al., 2009). Ebenso resultierte eine genetische Deletion des TSC1-Proteins in einer konstitutiven mTOR-Aktivierung und damit in einer verstärkten axonalen Regeneration von RGZ und HWG (Park et al., 2008; Abe et al., 2010). Auf der anderen Seite konnte eine Behandlung von Maus-RGZ mit Rapamycin nach inflammatorischer Stimulation lediglich das Auswachsen langer Axone unterdrücken, während kurze Axone nicht betroffen waren (Leibinger et al., 2012). Deshalb scheint mTOR nicht essenziell zu sein, um verletzte Neurone von Säugetieren in einen regenerativen Zustand zu versetzen. Vermutlich spielt die mTOR-Aktivität jedoch eine Rolle bei der Aufrechterhaltung des regenerativen Zustands, beispielsweise durch eine verstärkte Protein- und Lipidbiosynthese (Kroczynska et al., 2009; Leibinger et al., 2012). Eine Inhibition von mTOR durch Rapamycin *in vivo* im Zebrafisch führte zu einer verminderten Axonregeneration und einer beeinträchtigten funktionellen Regeneration nach einer Sehnervschädigung (Diekmann et al., 2015b). Rapamycin konnte die funktionelle Regeneration jedoch lediglich verzögern, nicht aber unterdrücken, sodass eine eher unterstützende Rolle von mTOR für die axonale Regeneration im Zebrafisch anzunehmen ist (Diekmann et al., 2015b).

Da zur Inhibition von mTOR eine systemische Rapamycinbehandlung über das Wasser der Zebrafische erfolgte, wäre es zudem möglich, dass auch die mTOR-Aktivität anderer Zelltypen als von RGZ beeinflusst wurde. Diese könnten dadurch ebenfalls Auswirkungen auf den Regenerationsprozess gehabt haben. So wurde beispielsweise gezeigt, dass mTOR Differenzierungsprozesse von Oligodendrozyten und ZNS-

Myelinisierung reguliert (Narayanan et al., 2009; Tyler et al., 2009). *In-vivo*-Untersuchungen legen jedoch einen für RGZ-spezifischen Effekt nahe. So war die Axonregeneration lediglich bei einer Rapamycinbehandlung zu frühen Zeitpunkten (0–3 dpi) beeinträchtigt, während ein Rapamycinzusatz im späteren Verlauf (4–18 dpi) keinen Einfluss mehr auf die Regeneration hatte (Diekmann et al., 2015b). Daraus lässt sich schließen, dass die beobachtete Induktion von mTOR in cholinergen amakrinen Zellen ab Tag 4 nach einer Sehnervverletzung keinen Einfluss auf den Regenerationsprozess hat.

5.6 Beteiligung weiterer Signalwege wahrscheinlich

Insgesamt zeigte sich, dass die durch PTEN-Inhibition und Zytokinstimulation induzierten axonalen Wachstumseffekte im Zebrafisch über den PI3K/AKT/mTOR-Signalweg vermittelt wurden. Eine Aktivierung des Signalwegs ist für den Regenerationsprozess jedoch nicht essenziell, sodass andere Signalkaskaden im Zebrafisch eine größere Bedeutung für die hohe Regenerationsfähigkeit der Tiere haben müssen. In der Literatur wurde beschrieben, dass durch CNTF ebenfalls der JAK/STAT3-Signalweg im Zebrafisch aktiviert und das axonale Wachstum stimuliert wird. Die Induktion von SOCS3, ein Inhibitor dieses Signalwegs, blockierte diesen Effekt (Elsaedi et al., 2014; Rasmussen and Sagasti, 2016). Bei eigenen Untersuchungen des Signalwegs konnte jedoch immunhistochemisch keine Induktion von STAT3 in der Zebrafischretina detektiert werden. So sind zukünftig weitere Forschungsarbeiten notwendig, um die genauen molekularen Mechanismen, die dem Regenerationsprozess im Zebrafisch zugrunde liegen, zu entschlüsseln.

5.7 Schlussfolgerungen

Während im ZNS von Säugetieren Nervenläsionen irreparable Schäden zur Folge haben, besitzen RGZ von Zebrafischen die Fähigkeit, geschädigte Axone anatomisch und funktionell innerhalb von 2 bis 4 Wochen erfolgreich zu regenerieren. Die genauen Grundlagen der diesem erfolgreichen Regenerationsprozess zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind noch weitestgehend unbekannt.

Mit dem etablierten Zellkulturmodell und geeigneten Markern zur sicheren Identifizierung von Zebrafisch-RGZ sowie den beschriebenen transgenen GAP43:GFP-Zebrafischen konnten intrinsische Signalwege näher charakterisiert werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass es fundamentale Unterschiede in der mTOR-Aktivierung nach einer Sehnervverletzung zwischen regenerationsinkompetenten Säugetier-RGZ und denen des Zebrafisches gibt. Im Zebrafisch kommt es nach einer Schädigung des Sehnervs zu einer starken, jedoch temporären Induktion von mTOR *in vivo* sowie *in vitro* durch eine Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs. Die Aktivität von mTOR scheint jedoch nicht für den axonalen Regenerationsprozess essenziell zu sein, da eine Hemmung der Signalkaskade durch den mTOR-Inhibitor Rapamycin oder den PI3K-Inhibitor LY294002 das basale Neuritenwachstum nicht beeinträchtigen konnte. Eine mTOR-Induktion durch Aktivierung des Signalwegs durch CNTF oder durch PTEN-Inhibition steigerte hingegen das axonale Wachstum signifikant. Der ebenfalls mit Regenerationsprozessen assoziierte MAPK/ERK-Signalweg spielt im Zebrafisch für die axonale Regeneration vermutlich keine besondere Rolle, da es nach einer Optikusschädigung zu keiner Induktion der Signalproteine kam.

Insgesamt konnten die beschriebenen Untersuchungen weitere Aspekte der molekularen Mechanismen axonaler Regeneration im Zebrafisch-ZNS aufdecken und damit das Verständnis regenerativer Prozesse in dieser Spezies verbessern. Die Ergebnisse deuten auf eine höhere Bedeutung anderer Signalwege als der PI3K/AKT/mTOR-Signalkaskade für den Regenerationsprozess von Zebrafischen nach einer ZNS-Verletzung hin. Jedoch konnte gezeigt werden, dass die beobachtete transiente mTOR-Aktivität mit durch Zytokine sowie PTEN-Inhibition induziertem Neuritenwachstum korrelierte und damit pro-regenerative Effekte vermittelte.

6. Literatur- und Quellenverzeichnis

- Abdeselem H, Shypitsyna A, Solis GP, Bodrikov V, Stuermer CAO (2009) No Nogo66- and NgR-mediated inhibition of regenerating axons in the zebrafish optic nerve. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 29:15489–15498.
- Abe N, Borson SH, Gambello MJ, Wang F, Cavalli V (2010) Mammalian target of rapamycin (mTOR) activation increases axonal growth capacity of injured peripheral nerves. *J Biol Chem* 285:28034–28043.
- Ahmed Z, Berry M, Logan A (2009) ROCK inhibition promotes adult retinal ganglion cell neurite outgrowth only in the presence of growth promoting factors. *Mol Cell Neurosci* 42:128–133.
- Bandtlow C, Zachleder T, Schwab ME (1990) Oligodendrocytes arrest neurite growth by contact inhibition. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 10:3837–3848.
- Bastmeyer M, Bähr M, Stuermer CA (1993) Fish optic nerve oligodendrocytes support axonal regeneration of fish and mammalian retinal ganglion cells. *Glia* 8:1–11.
- Bastmeyer M, Beckmann M, Schwab ME, Stuermer CA (1991) Growth of regenerating goldfish axons is inhibited by rat oligodendrocytes and CNS myelin but not by goldfish optic nerve tract oligodendrocyte-like cells and fish CNS myelin. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 11:626–640.
- Becker CG, Becker T (2002) Repellent guidance of regenerating optic axons by chondroitin sulfate glycosaminoglycans in zebrafish. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 22:842–853.
- Becker CG, Becker T (2007) Growth and pathfinding of regenerating axons in the optic projection of adult fish. *J Neurosci Res* 85:2793–2799.
- Benowitz LI, Routtenberg A (1997) GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends Neurosci* 20:84–91.
- Benowitz LI, Shashoua VE, Yoon MG (1981) Specific changes in rapidly transported proteins during regeneration of the goldfish optic nerve. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 1:300–307.
- Benowitz LI, Yoon MG, Lewis ER (1983) Transported proteins in the regenerating optic nerve: regulation by interactions with the optic tectum. *Science* 222:185–188.
- Berkelaar M, Clarke DB, Wang YC, Bray GM, Aguayo AJ (1994) Axotomy results in delayed death and apoptosis of retinal ganglion cells in adult rats. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 14:4368–4374.
- Bernhardt RR (1999) Cellular and molecular bases of axonal regeneration in the fish central nervous system. *Exp Neurol* 157:223–240.

- Bernhardt RR, Tongiorgi E, Anzini P, Schachner M (1996) Increased expression of specific recognition molecules by retinal ganglion cells and by optic pathway glia accompanies the successful regeneration of retinal axons in adult zebrafish. *J Comp Neurol* 376:253–264.
- Bormann P, Zumsteg VM, Roth LW, Reinhard E (1998) Target contact regulates GAP-43 and alpha-tubulin mRNA levels in regenerating retinal ganglion cells. *J Neurosci Res* 52:405–419.
- Cameron DA (2000) Cellular proliferation and neurogenesis in the injured retina of adult zebrafish. *Vis Neurosci* 17:789–797.
- Cameron DA, Gentile KL, Middleton FA, Yurco P (2005) Gene expression profiles of intact and regenerating zebrafish retina. *Mol Vis* 11:775–791.
- Chen Z, Lee H, Henle SJ, Cheever TR, Ekker SC, Henley JR (2013) Primary neuron culture for nerve growth and axon guidance studies in zebrafish (*Danio rerio*). *PloS One* 8:e57539.
- Christie KJ, Webber CA, Martinez JA, Singh B, Zochodne DW (2010) PTEN inhibition to facilitate intrinsic regenerative outgrowth of adult peripheral axons. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 30:9306–9315.
- Diekmann H, Fischer D (2013) Glaucoma and optic nerve repair. *Cell Tissue Res* 353:327–337.
- Diekmann H, Kalbhen P, Fischer D (2015a) Characterization of optic nerve regeneration using transgenic zebrafish. *Front Cell Neurosci* 9:118.
- Diekmann H, Kalbhen P, Fischer D (2015b) Active mechanistic target of rapamycin plays an ancillary rather than essential role in zebrafish CNS axon regeneration. *Front Cell Neurosci* 9:251.
- Doyon Y, McCammon JM, Miller JC, Faraji F, Ngo C, Katibah GE, Amora R, Hocking TD, Zhang L, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD, Amacher SL (2008) Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol* 26:702–708.
- Duan X, Qiao M, Bei F, Kim I-J, He Z, Sanes JR (2015) Subtype-specific regeneration of retinal ganglion cells following axotomy: effects of osteopontin and mTOR signaling. *Neuron* 85:1244–1256.
- Edwards DL, Alpert RM, Grafstein B (1981) Recovery of vision in regeneration of goldfish optic axons: enhancement of axonal outgrowth by a conditioning lesion. *Exp Neurol* 72:672–686.
- Elsaedi F, Bembem MA, Zhao X-F, Goldman D (2014) Jak/Stat signaling stimulates zebrafish optic nerve regeneration and overcomes the inhibitory actions of Socs3 and Sfpq. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 34:2632–2644.

- Fang Y, Vilella-Bach M, Bachmann R, Flanigan A, Chen J (2001) Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling. *Science* 294:1942–1945.
- Fawcett JW, Rokos J, Bakst I (1989) Oligodendrocytes repel axons and cause axonal growth cone collapse. *J Cell Sci* 92 (Pt 1):93–100.
- Fischer D (2012) Stimulating axonal regeneration of mature retinal ganglion cells and overcoming inhibitory signaling. *Cell Tissue Res* 349:79–85.
- Fischer D, Leibinger M (2012) Promoting optic nerve regeneration. *Prog Retin Eye Res* 31:688–701.
- Fischer D, Pavlidis M, Thanos S (2000) Cataractogenic lens injury prevents traumatic ganglion cell death and promotes axonal regeneration both in vivo and in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:3943–3954.
- Fischer D, Petkova V, Thanos S, Benowitz LI (2004) Switching mature retinal ganglion cells to a robust growth state in vivo: gene expression and synergy with RhoA inactivation. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 24:8726–8740.
- Giulian D, Des Ruisseux H, Cowburn D (1980) Biosynthesis and intra-axonal transport of proteins during neuronal regeneration. *J Biol Chem* 255:6494–6501.
- Goessling W, North TE (2014) Repairing quite swimmingly: advances in regenerative medicine using zebrafish. *Dis Model Mech* 7:769–776.
- Goldberg JL, Klassen MP, Hua Y, Barres BA (2002) Amacrine-signaled loss of intrinsic axon growth ability by retinal ganglion cells. *Science* 296:1860–1864.
- Graciarena M, Dambly-Chaudière C, Ghysen A (2014) Dynamics of axonal regeneration in adult and aging zebrafish reveal the promoting effect of a first lesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:1610–1615.
- Grozdánov V, Müller A, Sengottuvel V, Leibinger M, Fischer D (2010) A method for preparing primary retinal cell cultures for evaluating the neuroprotective and neurotogenic effect of factors on axotomized mature CNS neurons. *Curr Protoc Neurosci Chapter 3:Unit3.22*.
- Gutmann E (1942) FACTORS AFFECTING RECOVERY OF MOTOR FUNCTION AFTER NERVE LESIONS. *J Neurol Psychiatry* 5:81–95.
- Harrington LS, Findlay GM, Lamb RF (2005) Restraining PI3K: mTOR signalling goes back to the membrane. *Trends Biochem Sci* 30:35–42.
- Hauk TG, Leibinger M, Müller A, Andreadaki A, Knippschild U, Fischer D (2010) Stimulation of axon regeneration in the mature optic nerve by intravitreal application of the toll-like receptor 2 agonist Pam3Cys. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:459–464.
- Heacock AM, Agranoff BW (1982) Protein synthesis and transport in the regenerating goldfish visual system. *Neurochem Res* 7:771–788.

- Hemmann U, Gerhartz C, Heesel B, Sasse J, Kurapkat G, Grötzinger J, Wollmer A, Zhong Z, Darnell JE, Graeve L, Heinrich PC, Horn F (1996) Differential activation of acute phase response factor/Stat3 and Stat1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. II. Src homology SH2 domains define the specificity of stat factor activation. *J Biol Chem* 271:12999–13007.
- Hirose K, Shiomi T, Hozumi S, Kikuchi Y (2014) Mechanistic target of rapamycin complex 1 signaling regulates cell proliferation, cell survival, and differentiation in regenerating zebrafish fins. *BMC Dev Biol* 14:42.
- Hoffman PN (2010) A conditioning lesion induces changes in gene expression and axonal transport that enhance regeneration by increasing the intrinsic growth state of axons. *Exp Neurol* 223:11–18.
- Huang J, Manning BD (2009) A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. *Biochem Soc Trans* 37:217–222.
- Jacobson M, Gaze RM (1965) Selection of appropriate tectal connections by regenerating optic nerve fibers in adult goldfish. *Exp Neurol* 13:418–430.
- Julien L-A, Roux PP (2010) [mTOR, the mammalian target of rapamycin]. *Médecine Sci MS* 26:1056–1060.
- Kaneda M, Nagashima M, Nunome T, Muramatsu T, Yamada Y, Kubo M, Muramoto K, Matsukawa T, Koriyama Y, Sugitani K, Vachkov IH, Mawatari K, Kato S (2008) Changes of phospho-growth-associated protein 43 (phospho-GAP43) in the zebrafish retina after optic nerve injury: a long-term observation. *Neurosci Res* 61:281–288.
- Katoh-Semba R, Matsuda M, Kato K, Oohira A (1995) Chondroitin sulphate proteoglycans in the rat brain: candidates for axon barriers of sensory neurons and the possible modification by laminin of their actions. *Eur J Neurosci* 7:613–621.
- Koriyama Y, Homma K, Sugitani K, Higuchi Y, Matsukawa T, Murayama D, Kato S (2007) Upregulation of IGF-I in the goldfish retinal ganglion cells during the early stage of optic nerve regeneration. *Neurochem Int* 50:749–756.
- Kroczyńska B, Kaur S, Plataniás LC (2009) Growth suppressive cytokines and the AKT/mTOR pathway. *Cytokine* 48:138–143.
- Lanners HN, Grafstein B (1980) Effect of a conditioning lesion on regeneration of goldfish optic axons: ultrastructural evidence of enhanced outgrowth and pinocytosis. *Brain Res* 196:547–553.
- Laplante M, Sabatini DM (2009) An emerging role of mTOR in lipid biosynthesis. *Curr Biol CB* 19:R1046-1052.
- Leaver SG, Cui Q, Bernard O, Harvey AR (2006) Cooperative effects of bcl-2 and AAV-mediated expression of CNTF on retinal ganglion cell survival and axonal regeneration in adult transgenic mice. *Eur J Neurosci* 24:3323–3332.

- Leibinger M, Andreadaki A, Fischer D (2012) Role of mTOR in neuroprotection and axon regeneration after inflammatory stimulation. *Neurobiol Dis* 46:314–324.
- Leibinger M, Müller A, Andreadaki A, Hauk TG, Kirsch M, Fischer D (2009) Neuroprotective and axon growth-promoting effects following inflammatory stimulation on mature retinal ganglion cells in mice depend on ciliary neurotrophic factor and leukemia inhibitory factor. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 29:14334–14341.
- Leibinger M, Müller A, Gobrecht P, Diekmann H, Andreadaki A, Fischer D (2013) Interleukin-6 contributes to CNS axon regeneration upon inflammatory stimulation. *Cell Death Dis* 4:e609.
- Leon S, Yin Y, Nguyen J, Irwin N, Benowitz LI (2000) Lens injury stimulates axon regeneration in the mature rat optic nerve. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 20:4615–4626.
- Li X, Yang Q, Yu H, Wu L, Zhao Y, Zhang C, Yue X, Liu Z, Wu H, Haffty BG, Feng Z, Hu W (2014) LIF promotes tumorigenesis and metastasis of breast cancer through the AKT-mTOR pathway. *Oncotarget* 5:788–801.
- Lingor P, Tönges L, Pieper N, Bermel C, Barski E, Planchamp V, Bähr M (2008) ROCK inhibition and CNTF interact on intrinsic signalling pathways and differentially regulate survival and regeneration in retinal ganglion cells. *Brain J Neurol* 131:250–263.
- Liu D, Yu Y, Schachner M (2014) Ptena, but not Ptenb, reduces regeneration after spinal cord injury in adult zebrafish. *Exp Neurol* 261:196–205.
- Liu K, Lu Y, Lee JK, Samara R, Willenberg R, Sears-Kraxberger I, Tedeschi A, Park KK, Jin D, Cai B, Xu B, Connolly L, Steward O, Zheng B, He Z (2010) PTEN deletion enhances the regenerative ability of adult corticospinal neurons. *Nat Neurosci* 13:1075–1081.
- Liu K, Tedeschi A, Park KK, He Z (2011) Neuronal intrinsic mechanisms of axon regeneration. *Annu Rev Neurosci* 34:131–152.
- Ma L, Chen Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Pandolfi PP (2005) Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell* 121:179–193.
- Manning BD, Cantley LC (2007) AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129:1261–1274.
- McDowell AL, Dixon LJ, Houchins JD, Bilotta J (2004) Visual processing of the zebrafish optic tectum before and after optic nerve damage. *Vis Neurosci* 21:97–106.
- McKeon RJ, Jurynek MJ, Buck CR (1999) The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan and phosphacan are expressed by reactive astrocytes in the chronic CNS glial scar. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 19:10778–10788.

- McQuarrie IG, Grafstein B (1981) Effect of a conditioning lesion on optic nerve regeneration in goldfish. *Brain Res* 216:253–264.
- Meng S, Ryu S, Zhao B, Zhang D-Q, Driever W, McMahon DG (2008) Targeting retinal dopaminergic neurons in tyrosine hydroxylase-driven green fluorescent protein transgenic zebrafish. *Mol Vis* 14:2475–2483.
- Müller A, Hauk TG, Fischer D (2007) Astrocyte-derived CNTF switches mature RGCs to a regenerative state following inflammatory stimulation. *Brain J Neurol* 130:3308–3320.
- Müller A, Hauk TG, Leibinger M, Marienfeld R, Fischer D (2009) Exogenous CNTF stimulates axon regeneration of retinal ganglion cells partially via endogenous CNTF. *Mol Cell Neurosci* 41:233–246.
- Murray M (1976) Regeneration of retinal axons into the goldfish optic tectum. *J Comp Neurol* 168:175–195.
- Murray M, Forman DS (1971) Fine structural changes in goldfish retinal ganglion cells during axonal regeneration. *Brain Res* 32:287–298.
- Narayanan SP, Flores AI, Wang F, Macklin WB (2009) Akt signals through the mammalian target of rapamycin pathway to regulate CNS myelination. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 29:6860–6870.
- Neumann S, Woolf CJ (1999) Regeneration of dorsal column fibers into and beyond the lesion site following adult spinal cord injury. *Neuron* 23:83–91.
- Ning K, Drepper C, Valori CF, Ahsan M, Wyles M, Higginbottom A, Herrmann T, Shaw P, Azzouz M, Sendtner M (2010) PTEN depletion rescues axonal growth defect and improves survival in SMN-deficient motor neurons. *Hum Mol Genet* 19:3159–3168.
- Ogai K, Kuwana A, Hisano S, Nagashima M, Koriyama Y, Sugitani K, Mawatari K, Nakashima H, Kato S (2014) Upregulation of leukemia inhibitory factor (LIF) during the early stage of optic nerve regeneration in zebrafish. *PloS One* 9:e106010.
- Park K, Luo J-M, Hisheh S, Harvey AR, Cui Q (2004) Cellular mechanisms associated with spontaneous and ciliary neurotrophic factor-cAMP-induced survival and axonal regeneration of adult retinal ganglion cells. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 24:10806–10815.
- Park KK, Liu K, Hu Y, Kanter JL, He Z (2010) PTEN/mTOR and axon regeneration. *Exp Neurol* 223:45–50.
- Park KK, Liu K, Hu Y, Smith PD, Wang C, Cai B, Xu B, Connolly L, Kramvis I, Sahin M, He Z (2008) Promoting axon regeneration in the adult CNS by modulation of the PTEN/mTOR pathway. *Science* 322:963–966.

- Patten SA, Armstrong GAB, Lissouba A, Kabashi E, Parker JA, Drapeau P (2014) Fishing for causes and cures of motor neuron disorders. *Dis Model Mech* 7:799–809.
- Pernet V, Joly S, Dalkara D, Jordi N, Schwarz O, Christ F, Schaffer DV, Flannery JG, Schwab ME (2013a) Long-distance axonal regeneration induced by CNTF gene transfer is impaired by axonal misguidance in the injured adult optic nerve. *Neurobiol Dis* 51:202–213.
- Pernet V, Joly S, Jordi N, Dalkara D, Guzik-Kornacka A, Flannery JG, Schwab ME (2013b) Misguidance and modulation of axonal regeneration by Stat3 and Rho/ROCK signaling in the transparent optic nerve. *Cell Death Dis* 4:e734.
- Perry GW, Burmeister DW, Grafstein B (1987) Fast axonally transported proteins in regenerating goldfish optic axons. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 7:792–806.
- Petrausch B, Tabibiazar R, Roser T, Jing Y, Goldman D, Stuermer CA, Irwin N, Benowitz LI (2000) A purine-sensitive pathway regulates multiple genes involved in axon regeneration in goldfish retinal ganglion cells. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 20:8031–8041.
- Pinzón-Olejua A, Welte C, Abdesselem H, Málaga-Trillo E, Stuermer CA (2014) Essential roles of zebrafish *rtn4/Nogo* paralogues in embryonic development. *Neural Develop* 9:8.
- Posner BI, Faure R, Burgess JW, Bevan AP, Lachance D, Zhang-Sun G, Fantus IG, Ng JB, Hall DA, Lum BS (1994) Peroxovanadium compounds. A new class of potent phosphotyrosine phosphatase inhibitors which are insulin mimetics. *J Biol Chem* 269:4596–4604.
- Rasmussen JP, Sagasti A (2016) Learning to swim, again: Axon regeneration in fish. *Exp Neurol*.
- Rennekamp AJ, Peterson RT (2015) 15 years of zebrafish chemical screening. *Curr Opin Chem Biol* 24:58–70.
- Schmid AC, Byrne RD, Vilar R, Woscholski R (2004) Bisperoxovanadium compounds are potent PTEN inhibitors. *FEBS Lett* 566:35–38.
- Schwab ME, Bartholdi D (1996) Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Physiol Rev* 76:319–370.
- Schwalb JM, Boulis NM, Gu MF, Winickoff J, Jackson PS, Irwin N, Benowitz LI (1995) Two factors secreted by the goldfish optic nerve induce retinal ganglion cells to regenerate axons in culture. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 15:5514–5525.
- Sengottuvel V, Leibinger M, Pfreimer M, Andreadaki A, Fischer D (2011) Taxol facilitates axon regeneration in the mature CNS. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 31:2688–2699.

- Shypitsyna A, Málaga-Trillo E, Reuter A, Stuermer CAO (2011) Origin of Nogo-A by domain shuffling in an early jawed vertebrate. *Mol Biol Evol* 28:1363–1370.
- Skene JH (1989) Axonal growth-associated proteins. *Annu Rev Neurosci* 12:127–156.
- Smith PD, Sun F, Park KK, Cai B, Wang C, Kuwako K, Martinez-Carrasco I, Connolly L, He Z (2009) SOCS3 deletion promotes optic nerve regeneration in vivo. *Neuron* 64:617–623.
- Sperry RW (1963) CHEMOAFFINITY IN THE ORDERLY GROWTH OF NERVE FIBER PATTERNS AND CONNECTIONS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 50:703–710.
- Stahl N, Boulton TG, Farruggella T, Ip NY, Davis S, Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, Barbieri G, Pellegrini S (1994) Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components. *Science* 263:92–95.
- Stuermer CA, Bastmeyer M, Bähr M, Strobel G, Paschke K (1992) Trying to understand axonal regeneration in the CNS of fish. *J Neurobiol* 23:537–550.
- Summerton J (1999) Morpholino antisense oligomers: the case for an RNase H-independent structural type. *Biochim Biophys Acta* 1489:141–158.
- Sun F, Park KK, Belin S, Wang D, Lu T, Chen G, Zhang K, Yeung C, Feng G, Yankner BA, He Z (2011) Sustained axon regeneration induced by co-deletion of PTEN and SOCS3. *Nature* 480:372–375.
- Tang X, Davies JE, Davies SJA (2003) Changes in distribution, cell associations, and protein expression levels of NG2, neurocan, phosphacan, brevican, versican V2, and tenascin-C during acute to chronic maturation of spinal cord scar tissue. *J Neurosci Res* 71:427–444.
- Tom VJ, Steinmetz MP, Miller JH, Doller CM, Silver J (2004) Studies on the development and behavior of the dystrophic growth cone, the hallmark of regeneration failure, in an in vitro model of the glial scar and after spinal cord injury. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 24:6531–6539.
- Tyler WA, Gangoli N, Gokina P, Kim HA, Covey M, Levison SW, Wood TL (2009) Activation of the mammalian target of rapamycin (mTOR) is essential for oligodendrocyte differentiation. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 29:6367–6378.
- Udvadia AJ (2008) 3.6 kb genomic sequence from Takifugu capable of promoting axon growth-associated gene expression in developing and regenerating zebrafish neurons. *Gene Expr Patterns GEP* 8:382–388.
- Wanner M, Lang DM, Bandtlow CE, Schwab ME, Bastmeyer M, Stuermer CA (1995) Reevaluation of the growth-permissive substrate properties of goldfish optic nerve myelin and myelin proteins. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 15:7500–7508.

- Welte C, Engel S, Stuermer CAO (2015) Upregulation of the zebrafish Nogo-A homologue, Rtn4b, in retinal ganglion cells is functionally involved in axon regeneration. *Neural Develop* 10:6.
- Yin Y, Cui Q, Li Y, Irwin N, Fischer D, Harvey AR, Benowitz LI (2003) Macrophage-derived factors stimulate optic nerve regeneration. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 23:2284–2293.
- Zon LI, Peterson RT (2005) In vivo drug discovery in the zebrafish. *Nat Rev Drug Discov* 4:35–44.

Danksagung

Ich danke Univ.-Prof. Dr. Dietmar Fischer für die Bereitstellung des spannenden Themas meiner Doktorarbeit, seine unermüdliche Geduld und die vielen konstruktiven Gespräche und Diskussionen. Seine wertvollen Ratschläge haben maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen. Ich bin ihm äußerst dankbar für die Zeit und die Ressourcen, die er in meine wissenschaftliche Ausbildung investiert hat und von denen ich auch für meine zukünftigen wissenschaftlichen Tätigkeiten profitieren werde.

Mein besonderer Dank gilt ebenfalls Dr. Heike Diekmann für die intensive Betreuung während der gesamten experimentellen Arbeiten. Sie hat mich an das wissenschaftliche Arbeiten Schritt für Schritt herangeführt und mich an ihrem großen Erfahrungsschatz teilhaben lassen. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht in dieser Form möglich gewesen.

Danken möchte ich außerdem den technischen Assistenten der Arbeitsgruppe, Anastasia Andreadaki und Marcel Kohlhas, für die große Unterstützung bei der technischen Umsetzung der Experimente und die vielen praktischen Tipps und Hinweise zur Laborarbeit. Weiterhin gilt allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe mein Dank für die angenehme kollegiale Atmosphäre und Unterstützung über den gesamten Zeitraum der Erstellung dieser Dissertation.

Abschließend gilt meine Dankbarkeit allen, die mich auf verschiedenste Weise bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.