

7. Zusammenfassung

Das zentrale Nervensystem (ZNS) der Fische wächst während ihres gesamten Lebens und ist in der Lage verletzte Axone zu regenerieren. Diese Eigenschaft unterscheidet es von dem der Säuger, die nicht in der Lage sind, verletzte Axone im ZNS zu regenerieren. Vielmehr ähnelt das ZNS der Fische dem peripheren Nervensystem (PNS) der Säuger, mit seiner Fähigkeit zur Regeneration. Während der Entwicklung des Nervensystems und auch während der Regeneration des adulten Nervensystems werden Moleküle exprimiert, die den Zell-Zell-Kontakt, oder auch den Kontakt einer Zelle mit der extrazellulären Matrix vermitteln. Zu diesen Molekülen gehören die neuronalen Zellerkennungsmoleküle Protein Zero (P0), Tenascin-R (TN-R) und Tenascin-C (TN-C). In dieser Arbeit wurde die Expression und Funktion der neuronalen Zellerkennungsmoleküls P0 und TN-R während der Entwicklung und Regeneration des Nervensystems des Zebrafisches untersucht. Weiterhin wurde die Funktion von TN-C während des Auswuchses von Motoraxonen im Rumpfbereich des Zebrafisches analysiert.

P0 gehört zur Immunglobulin-Superfamilie der neuronalen Zelladhäsionsmoleküle, und ist im PNS von Säugern an der Kompaktierung des Myelins beteiligt. Die Durchsuchung einer EST-(expressed sequence tag)-Datenbank führte zur Identifizierung des P0 Gens im Zebrafisch. Ein Vergleich der Proteinsequenz zeigte, daß das Zebrafisch P0 zu 45% identisch mit anderen P0 Homologen aus Wirbeltieren ist. Untersuchungen des zeitlichen und räumlichen Expressionsmusters mittels in-situ Hybridisierung während der frühen Entwicklung des Zebrafisches zeigten eine Expression von P0 mRNA im Nachhirn. Zu späteren Zeitpunkten konnte die Expression von P0 mRNA hauptsächlich in Gliazellen in myelinisierten Bereichen des ZNS und im PNS nachgewiesen werden. Dies läßt auf eine Rolle von P0 bei der Myelinisierung von Axonen schließen. Nach einer Läsion des optischen Nervs wird die mRNA für P0 im gesamten optischen Trakt von adulten Zebrafischen transient hochreguliert. Dabei ist die verstärkte Expression von P0 mRNA im optischen Trakt abhängig von der Anwesenheit regenerierender Axone. Nach einer Läsion des Rückenmarks konnte ebenfalls eine erhöhte Expression der P0 mRNA, die sich hauptsächlich auf die weiße Substanz beschränkte, beschrieben werden. Die Hochregulation von P0 mRNA in Gliazellen nach einer Läsion des ZNS läßt auf einen positiven Einfluß dieses Moleküles während der Regeneration und Remyelinisierung von Axonen im adulten Zebrafisch schließen.

TN-R, ein Molekül der extrazellulären Matrix, wurde im Gegensatz zu P0 als ein inhibitorisches Molekül für regenerierende Axone von Säugern beschrieben. Um den Einfluß von TN-R während der Regeneration im Zebrafisch zu untersuchen, wurde das Gen im Zebrafisch kloniert. Eine Analyse der abgeleiteten Proteinsequenz ergab eine hohe Identität

(60%) zu anderen TN-R Homologen in Wirbeltieren. Die Expression von TN-R wurde im sich entwickelnden und adulten optischen System sowie nach einer Läsion des adulten optischen Nerven mit Hilfe von in-situ Hybridisierung und Immunhistochemie untersucht. Diese Analysen zeigten, daß TN-R vor und nach einer Läsion des optischen Nerven mit Retinaganglienzellaxonen innerhalb der Retina assoziiert ist. Außerhalb der Retina begrenzt TN-R den Pfad der Retinaganglienzellaxone bis hin zu ihren Zielorten im Tektum. Um die Funktion von TN-R während des Wachstums von Retinaganglienzellaxonen zu untersuchen, wurden Retinaexplantate *in vitro* mit einem homogenen TN-R Substrat (Situation in der Retina) oder mit TN-R in einer Grenzsituation konfrontiert (Situation im Gehirn). Während sich das homogene TN-R Substrat als wachstumsfördernd erwies, wurden auswachsende Neuriten von einer TN-R Grenze aufgehalten. Diese Ergebnisse lassen auf eine duale Rolle von TN-R während des Wachstums von Retinaganglienzellaxonen schließen. In der Retina fördert TN-R den Auswuchs von neuen Axonen, im Gehirn hingegen fungiert TN-R als Wegfindungsmolekül, indem es dazu beiträgt, daß die Retinaganglienzellaxone zu ihren Zielorten im Tektum gelangen. Es ist vorstellbar, daß TN-R auch für regenerierende Axone ein Wegfindungsmolekül darstellt und so im Gegensatz zu Säugern, bei denen es inhibierend auf regenerierende Axone wirkt, zu einer erfolgreichen Regeneration von Axonen im ZNS von Zebrafischen beiträgt.

TN-C, ebenfalls ein Molekül der extrazellulären Matrix, wird während der frühen Entwicklung des Zebrafisches in Myotomzellen des Somiten, in Neuralleistenzellen und im Hypochord exprimiert. Das TN-C Gen welches zuvor nur in Teilen bekannt war, wurde vollständig kloniert. Eine Analyse der abgeleiteten Proteinsequenz zeigte eine 45% Identität zu anderen TN-C Homologen in Wirbeltieren. Die genaue Verteilung von TN-C im Rumpfbereich des sich entwickelnden Embryos wurde durch in situ Hybridisierung und immunhistochemische Färbungen untersucht. Dabei konnte das Protein in einer Region am horizontalen Myoseptum, die wichtig für die Wegfindung von Motoraxonen ist, nachgewiesen werden. Um den Einfluß von TN-C auf das Wachstum von Motoraxonen zu untersuchen, wurde die Funktion von TN-C *in vivo* perturbiert. Die Translation der TN-C mRNA wurde durch Injektion von *antisense* Oligonukleotiden (Morpholinos) inhibiert. In einem alternativen Experiment wurde die Menge an vorhandenem TN-C durch die Injektion von *in vitro* transkribierter mRNA oder Proteinfragmenten erhöht. Der Phänotyp der behandelten Embryonen wurde 24 und 33 Stunden nach der Befruchtung durch immunohistochemische Färbungen analysiert. Diese Experimente zeigten einen eindeutigen Einfluß von TN-C auf die embryonale Wegfindung von Motoraxonen im Rumpfbereich. Eine

Reduktion von TN-C führte dabei zu abnormalen Verzweigungen von Motoraxonen, während eine Erhöhung von TN-C zu einer Verkürzung dieser Axone führte. In der Zebrafisch *unplugged* Mutante, die ähnliche Phänotypen aufweist wie sie nach der Injektion von Morpholinos beobachtet wurden, ist TN-C in der Entscheidungsregion der Motoraxone am horizontalen Myoseptum nicht vorhanden. Weiterhin konnte die Expression von TN-C mRNA in adaxialen Zellen, die an der Entstehung des *unplugged* Phänotyps beteiligt sind, nachgewiesen werden. Zusammengefasst deuten diese Resultate auf eine wichtige Funktion von TN-C während der Wegfindung von Motoraxonen im Rumpfbereich des Zebrafisches hin.

In dieser Arbeit wurden drei Gene im Zebrafisch kloniert und ihre Expression charakterisiert. Weiterhin konnten neue Funktionen dieser Gene während des axonalen Wachstums und der Regeneration im Zebrafisch beschrieben werden.

7. Summary

The central nervous system (CNS) of fish is growing throughout its lifetime, it also retains the capacity to regrow severed axons after a lesion. In this capacity, the fish CNS differs from the adult mammalian CNS which generally does not support axon regeneration but resembles the adult mammalian peripheral nervous system (PNS) in which axon regeneration occurs. During development of the CNS and also during regeneration of the adult CNS, neural cell recognition molecules are expressed which mediate the contact between cells or the contact between cells and the extracellular matrix. Protein zero (P0), tenascin-R (TN-R) and tenascin-C (TN-C) belong to this family of neural cell recognition molecules. In this work, we analyzed the expression and function of P0 and TN-R during development and regeneration of the CNS. Furthermore, we analyzed a potential role of TN-C during the growth of motor axons in the trunk at early developmental stages in the zebrafish.

P0 belongs to the immunoglobulin superfamily of neural cell adhesion molecules and mediates the compaction of myelin in the PNS of mammals. Furthermore, P0 supports axon regeneration in the mammalian PNS. We identified a P0 homolog in zebrafish, which is 45% identical to other P0 homologs in vertebrates on the amino acid level. The expression of P0 mRNA was analyzed by *in situ* hybridisation. At early stages, the expression of P0 mRNA could be detected in the hindbrain of the zebrafish embryo. Later, the expression of P0 mRNA was detected in glial cells in the CNS and PNS in areas known to be myelinated. This is consistent with a role for P0 in myelination. After an optic nerve crush, a transient upregulation of P0 mRNA in the optic pathway was observed. Furthermore, it could be shown that the upregulation of P0 mRNA is dependent on the presence of regenerating axons. Spinal cord transection also leads to an increased expression of P0 mRNA in the white matter tracts of the spinal cord. The upregulation of P0 mRNA expression in glial cells after a lesion of the adult zebrafish CNS suggests a role for P0 in promoting axon regeneration and remyelination after injury.

In contrast to P0, which has been described to promote axon regeneration, TN-R, a molecule of the extracellular matrix, has been described to inhibit axon regeneration in mammals. To analyze the function of TN-R during regeneration of the CNS in fish, the gene was cloned in the zebrafish. Sequence analysis revealed a high degree of homology (60%) to other TN-R homologs in vertebrates. In the developing and adult optic pathway before and after optic nerve crush, TN-R co-localizes with optic fibers in the retina, but closely borders the pathway of optic axons on their way to the tectum, as determined by *in situ* hybridization and immunohistochemistry. We mimicked the distribution of TN-R in the optic pathway *in vitro*

by confronting zebrafish optic axons with a homogeneous TN-R substrate (retinal situation) or with a border of TN-R (brain situation). While the homogeneous substrate enhanced growth of optic axons, the substrate border repelled these axons. Thus, TN-R may play a dual role for optic axons by promoting growth of newly added axons in the retina and guiding these axons by a repellent mechanism in the brain. TN-R bordering the optic pathway in the brain is also available to potentially guide regenerating optic axons after injury and thus, in contrast to mammals, may contribute to successful regeneration of axons in the zebrafish.

TN-C, which is also a molecule of the extracellular matrix, is expressed in myotomal cells of the somites, in neural crest cells and in the hypochord during early development. The cloning of TN-C gene in the zebrafish, which was only partially known was . Analysis of the protein sequence revealed an identity of 45% of zebrafish TN-C to other TN-C homologs in vertebrates. The distribution of TN-C in the trunk of the developing zebrafish embryo was analyzed using immunohistochemistry and in situ hybridization. TN-C immunoreactivity was detected in the middle of the somites at the level of the horizontal myoseptum, which is an important choice point for growing motor axons. To analyze a potential role of TN-C during growth of motor axons in the trunk, the function of this molecule was perturbed. The translation of TN-C mRNA was inhibited by injection of antisense oligonucleotides (morpholinos). In another experiment, the amount of TN-C was increased by mRNA overexpression and protein injections. The phenotypes of the injected embryos were analyzed by immunohistochemistry at 24 and 33 hours post fertilization. These experiments revealed an explicit role of TN-C on motor axon guidance in the trunk of the developing embryo. A reduction of TN-C induces abnormal branches of motor axons, whereas increased amounts of TN-C led to truncations of these axons. In the zebrafish *unplugged* mutant, which displays a phenotype similar to what was observed after injection of the TN-C morpholino, TN-C immunoreactivity was found to be absent from the choice point of motor axons at the level of the horizontal myoseptum. Furthermore, the expression of TN-C mRNA was detected in adaxial cells, which have been described to play a role in the formation of the *unplugged* phenotype. These results indicate an important function of TN-C during motor axon pathfinding in the trunk of the developing zebrafish embryo.

In this work, three genes in the zebrafish have been cloned and the corresponding expression patterns were described. Furthermore, new functions of these genes during axon growth and regeneration could be elucidated.