

Overexpressie van mutant superoxide dismutase 1 Veroorzaakt motor axonopathy bij de zebnavissen

Robin Lemmens^{1,2,*}, Annelies Van Hoecke^{1,{}, Nicole Hersmus¹, Veerle Geelen¹,
Isabel D'Hollander², Vincent Thijs², Ludo Van Den Bosch¹, Peter Carmeliet^{3,4}
en Wim Robberecht^{1,2}

¹Laboratorium van Neurobiology en ²Departement van Neurologie, Universitair ziekenhuis Gasthuisberg, K.U. Leuven, Herestraat 49, B-3000 Leuven, België, ³Departement voor transgene technology en gen therapie, VIB, 3000 Leuven, België en ⁴Centrum voor transgene technologie and gen therapie (CTG), K.U. Leuven, B-3000 Leuven, België

Ontvangen op 25 mei 2007; Herzien en aanvaard op 14 juli 2007

De ontwikkeling van kleine dierlijke modellen is van het grootste belang om de ziekteverwekking en de behandeling van neurodegeneratieve ziekten te ontraadselen, vooral omwille van hun potentieel op chemische en genetische screening op grote schaal. We hebben de zebnavissen onderzocht als model om amyotrofe lateraal sclerose (ALS) te bestuderen, een fatale neurodegeneratieve aandoening die gekenmerkt wordt door een selectief verlies van motor neuronen, veroorzaakt door mutaties in het superoxide dismutase 1 (SOD1) in een deelgroep van patiënten. Overexpressie van mutant menselijk SOD1 bij embryo's van zebnavissen gaf aanleiding tot motor axonopathy die specifiek, dosis-afhankelijk was en gevonden werd bij alle bestudeerde mutaties. Gebruik makend van dit nieuw opgestelde dierlijk model voor ALS, onderzochten we bovendien de rol van een gekende veranderingsfactor in de ziekte: vasculaire endotheliale groeifactor (VEGF). Verlaging van VEGF gaf aanleiding tot een ernstiger fenotype, terwijl het verhogen van VEGF de mutant SOD axonopathy redde. Dit nieuwe zebnavis model onderstreept het potentiële van VEGF voor de behandeling van ALS en maakt bovendien grootschalige genetische en chemische screening mogelijk om de identifikatie van nieuwe therapeutische doelen te vergemakkelijken in motor neuron ziektes.

INLEIDING

Neurodegeneratieve ziektes zijn een belangrijk en socio-economisch probleem in westerse landen. De ontwikkeling van therapeutische strategieën voor deze ziektes vereist de identifikatie van de betrokken genetische en pathogene factoren. Kleine dierlijke modellen, zoals vliegen en wormen, zijn nuttig gebleken om het mechanisme van neurodegeneratie te ontrafelen en werden ontwikkeld voor sommige zoals de ziekte van Huntington en andere polyglutamine erfelijke aandoeningen (1). Het potentiële van zebnavissen voor onderzoek bij neurodegeneratie is tot op heden slechts beperkt onderzocht. We hebben een zebnavis model onderzocht voor amyotrofe laterale sclerose (ALS). ALS is een neurodegeneratieve ziekte die gekenmerkt is door een selectief verlies van motor neuronen in het ruggenmerg, de hersenstam en de motor cortex wat aanleiding geeft tot spierzwakte en atrofie. De ziekte is steeds fataal, meestal na een meedogenloos progressief verloop van 3 tot 5 jaar. De meeste patiënten hebben de verspreide vorm van de ziekte (SALS), terwijl 10% de erfelijke meestal autosomale

dominante vorm heeft (FALS). Bij 1 van de 5 van dergelijke families ligt de mutatie in het superoxide dismutase 1 (SOD1) gen aan de basis van de ziekte (2). Bij SALS wordt gedacht dat ze het gevolg is van een interactie tussen genetische risico factoren, veroudering van het zenuwstelsel en mogelijk ook omgevingsfactoren. Genen die ziektes aanpassen, zijn ook betrokken in de pathogenese van de mutant SOD1, in verband gebracht met ALS, gezien de omvangrijke variabiliteit in de ziekte uitdrukking bij patiënten die dezelfde mutatie dragen (3).

Momenteel is er geen genezing voor ALS. Rasters van gecompliceerde collecties met mogelijk therapeutische werking en genetische rasters bedoeld om wijzigende routes te identificeren en nieuwe farmacologische doelen, worden verhinderd door een tekort aan kleine dier modellen. Dergelijke studies bij de beschikbare muis en rat modellen zijn tijdrovend en zeer duur en pogingen om model mutant SOD1 geassocieerde ALS bij *Caenorhabditis elegans* en *Drosophila* waren tot nu toe niet succesvol (4,5). Daarnaast zijn er veel rasters die zich concentreerden op de overleving van het motorneuron perikaryon, en niet zozeer op de integriteit van het axon, met het risico verbindingen te identificeren die de zenuwcel redden, maar niet het organisme.

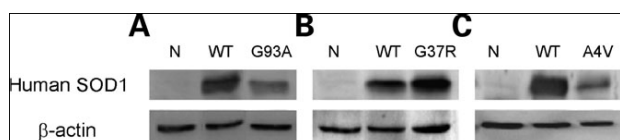
We hebben het potentiële van de zebrafish verkend als model voor een neurodegeneratieve ziekte. Dit organisme wordt een veelbelovend instrument voor het ontdekken van medicatie (7,8). Een zebrafish model werd tot hiertoe nog niet gerapporteerd als een dominante, winst-in-functie veroorzaakte neurodegeneratieve ziekte. Niettemin is een groot voordeel van het zebrafish model dat de spinale motorische neuronen gemakkelijk identificeerbaar zijn bij de zebrafish embryo en dat deze uitgebreid beschreven zijn in zowel normale en pathologische omstandigheden (9,10), wat het een aantrekkelijk model maakt om ziektes zoals ALS te bestuderen. Motor axonale dysfunctie is inderdaad de eerste uiting van ALS in zowel menselijke patiënten als mutant muizen met een teveel aan SOD1, een betrouwbaar knaagdier model voor ALS (11). Van motor axonale afwijkingen is bekend dat ze in de muismodellen optreden in de eerste post-natale week in SOD1^{G85R} muizen (12).

We beschrijven hier het modelleren van mutant SOD1 geassocieerde ALS bij de zebrafish embryo en het effect van de vasculair endotheliale groeifactor (VEGF) en het wild type SOD1 (SOD1^{WT}) op de geïdentificeerde motorische axonopathy.

RESULTATEN

Uitdrukking van SOD1 proteïne

We injecteerden mRNA geëncodeerd menselijk SOD1^{WT} en drie verschillende mutant SOD1 (SOD1^{MT}): SOD1^{G93A}, SOD1^{G37R} en SOD1^{A4V} in een concentratie van 1000 ng/μl. Het niveau van deze proteïnen bij 30 h post-fertilisatie (hpf) was bepaald met behulp van western blotting (Fig.1). SOD1^{WT} was iets meer duidelijk uitgedrukt dan SOD1^{G93A} en SOD1^{A4V} en bleek meer stabiel dan SOD1^{MT}, zoals reeds voerdiën gerapporteerd (13).

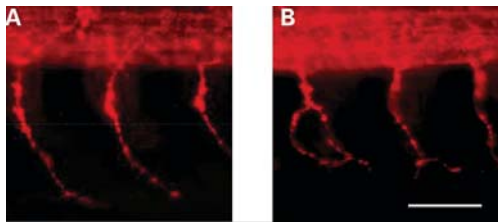


Figuur 1. Overexpressie van menselijk SOD1 na mRNA injectie. Uitdrukking van SOD1^{WT}, SOD1^{G93A}, SOD1^{G37R} en SOD1^{A4V} in zebrafish embryos 30 hpf. In elke eerste kolom, normale (oninjectioneerde) embryos (N) werden geladen, SOD1^{WT}-geinjectioneerde embryos worden getoond in elke tweede kolom (WT) en de derde kolom bevat proteïne extrakten van mutant SOD1-geinjectioneerde embryos. (A) SOD1^{G93A}; (B) SOD1^{G37R}

en (C) SOD1^{A4V}. b-Actin was gebruikt als een controle lade.

Mutant SOD1 geeft aanleiding tot een motor axonopathy

Na mRNA-injectie werden enkel embryos met normale morfologie en ontwikkeling gebruikt voor verdere analyse (meer dan 85% de geïnjecteerde embryos). Abnormale vertakking en de lengte van de motor neuron axons werden gemeten in zowel SOD1^{MT} en SOD1^{WT} overexpressie vis aan 30 hpf. Motor neuronen werden als abnormaal beoordeeld wanneer axons vertakten bij of boven de vertebrale rand van het notochord (afd. 2). Embryos werden beoordeeld als zijnde aangetast wanneer twee of meer axons per embryo afwijkende vertakkingen vertoonden. Overexpressie van SOD1^{WT} (1000 ng/μl) had geen effect op axonale uitgroei van motor neuronen wanneer ze vergeleken werden met buffer-geïnjecteerde controle embryos. In tegenstelling bracht overexpressie van SOD1^{A4V}, SOD1^{G93A} and SOD1^{G37R} (1000 ng/μl) duidelijke motor axonale afwijkingen teweeg. Expressie van SOD1^{G93A} of SOD1^{G37R} veroorzaakte dat 64.6 en 68.8% van de embryos aangetast werden respectievelijk met 12.4 en 12.5% van de axons die abnormale vertakking per embryo vertoonden gemiddeld, respectievelijk (Tabel 1). Het meest uitgesproken effect werd gezien wanneer embryos SOD1^{A4V} vertoonden met 73.1% van de embryos aangetast met een gemiddelde van 13.1% afwijkende axons per embryo. De gemiddelde axonale lengte van 10 ventrale motor axons per embryo was bepaald en was significant gedaald met 6.1% van de normale lengte na SOD1^{G93A} expressie en met 18.0% na SOD1^{A4V} expressie (Fig. 3A)



Figuur 2. Specifieke motor axonale defecten in embryos geïnjecteerd met mutant SOD1 mRNA. Injectie met SOD1^{A4V} 1500 ng/μl wekte vertakkingen op in primaire motor neuronen (B), vergeleken met SOD1^{wt} (A). Witte stippellijn definieert de ventrale rand in het notochord. Schaal bar: 50 μm.

Tabel 1. Mutant SOD1 wekt abnormale vertakkingen op

| | Betrokken embryos (%) | Odds ratio (CI) | P-waarde | Vertakkende axons per embryo (%) | P-waarde (Mann-Whitney-test) |
|--------------|-----------------------|-----------------|------------------------|----------------------------------|------------------------------|
| WT, n = 101 | 27.7 | | | 4.8 | |
| G93A, n = 48 | 64.6 | 4.8 (2.3–9.9) | 1.7 x 10 ⁻⁵ | 12.4 | 1.0 x 10 ⁻⁵ |
| G37R, n = 32 | 68.8 | 5.7 (2.4–13.6) | 3.0 x 10 ⁻⁵ | 12.5 | 2.1 x 10 ⁻⁶ |
| A4V, n = 52 | 73.1 | 7.1 (3.3–15.0) | 8.1 x 10 ⁻⁸ | 13.1 | 3.3 x 10 ⁻¹⁰ |

Na injectie met drie verschillende SOD1 mutanten (concentratie: 1000 ng/μl), namen we abnormale vertakkingen van caudaal primary motor neuronen waar wanneer vergeleken met SOD1^{wt} (concentratie: 1000 ng/μl). Dit effect was het meest uitgesproken bij gebruik van het A4V-mutant. SOD1^{wt} wekte geen afwijkende axonale uitgroei op.

Zoals SOD1^{A4V} resulteerde in het meest opvallende fenotype, werd een dosis-respons test uitgevoerd gebruik makend van deze mutatie. Zoals de statistische analyse identiek was indien de lengte van slechts vijf axons per embryo was geëvalueerd, beperkten we de metingen tot de vijf meest proximale axonen. Embryo's werden geïnjecteerd met 4 doses 250, 500, 1000 en 1500 ng/μl SOD1^{A4V} mRNA en axonale defecten werden vergeleken met embryos geïnjecteerd met 1500 ng/μl SOD1^{WT} mRNA. We vonden dat respectievelijk 16.1, 34.4, 68.4 en 80.6% van de embryos aangetast waren en dat dit effect dus dus op dosis reageert. Het percentage van abnormale axonen per embryo vertoonde evenzeer een dosis relatie met 16.9% van de axonen met afwijkingen bij de hoogst gebruikte dosis (Tabel 2). Een soortgelijke dosis-

responstest werd gevonden voor de axonlengte (Pearson's correlatie: -0.73 , $P < 0.001$), met een daling van 23% bij een dosis van $1500 \text{ ng}/\mu\text{l}$ SOD1^{A4V} mRNA (Fig. 3B).

Toen morfologisch normale embryos op 30 hpf gedurende 7 dagen na bevruchting gevolgd werden, konden we geen significante verschillen observeren in overleving tussen SOD1^{WT} en SOD1^{A4V} ($1500 \text{ ng}/\mu\text{l}$) geïnjecteerde embryos.

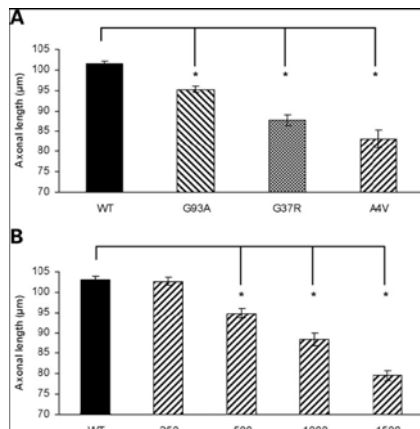
Tabel 2. Injectie met SOD1^{A4V} resultaten in dosis-afhankelijke abnormale vertakking

| | Betrokken embryos (%) | Odds ratio (CI) | P-waarde | Vertakkende axons per embryo (%) |
|--|-----------------------|------------------|----------------------|----------------------------------|
| WT $1500 \text{ ng}/\mu\text{l}$, n = 30 | 13.3 _a | | | 4.0 _b |
| A4V $250 \text{ ng}/\mu\text{l}$, n = 31 | 16.1 _a | 1.3 (0.3–5.2) | 0.76 | 3.1 _b |
| A4V $500 \text{ ng}/\mu\text{l}$, n = 32 | 34.4 _a | 3.4 (0.9–12.3) | 0.053 | 6.6 _b |
| A4V $1000 \text{ ng}/\mu\text{l}$, n = 38 | 68.4 _a | 14.1 (4.0–49.4) | 5.6×10^{-6} | 10.5 _b |
| A4V $1500 \text{ ng}/\mu\text{l}$, n = 31 | 80.6 _a | 27.1 (6.8–107.6) | 1.4×10^{-7} | 16.9 _b |

Na injectie met SOD1^{A4V} , vertoonden primaire motorneuronen abnormale vertakkingen in een dosis-afhankelijke manier in vergelijking met SOD1^{WT} overexpressing embryos, die geïnjecteerd werden met de hoogst gebruikte concentratie ($1500 \text{ ng}/\mu\text{l}$).

^aSpearman's correlatie: 0.55, P-waarde: 1.0×10^{-6} ; Kruskal-Wallis P-waarde: 3.8×10^{-13} .

^bSpearman's correlatie: 0.58, P-waarde: 1.0×10^{-6} ; Kruskal-Wallis P-waarde: 6.6×10^{-15} .



Figuur 3. Verschillende SOD1 mutanten wekken verkorting op van motorneuronaxons. Mutant SOD1 verwekt verkorting van primaire motorneuronen na injectie met drie verschillende mutanten G93A (n = 48), G37R (n = 32) en A4V (n = 52), vergeleken met SOD1^{WT} (n = 101) wanneer geïnjecteerd met dezelfde concentratie ($1000 \text{ ng}/\mu\text{l}$) (A). Dit effect werd aangetoond als zijnde dosis-afhankelijk wanneer SOD1^{A4V} is geïnjecteerd met verschillende concentraties en vergeleken met SOD1^{WT} geïnjecteerd met de hoogst gebruikte dosis ($1500 \text{ ng}/\mu\text{l}$) (B). WT $1500 \text{ ng}/\mu\text{l}$ n = 30, A4V $250 \text{ ng}/\mu\text{l}$ n = 31, A4V $500 \text{ ng}/\mu\text{l}$ n = 32, A4V $1000 \text{ ng}/\mu\text{l}$ n = 38, A4V $1500 \text{ ng}/\mu\text{l}$ n = 31. Y-foutbalken vertonen een standaardfout bij een gemiddelde. * $P < 0.001$.

Effect van mutant SOD1 is specifiek voor motoraxons

Hoewel we enkel embryos evalueerden met een normale morfologie, wilden we subtiele vertragingen in de groei uitsluiten door de meting van de totale lengte van de verschillende embryos. Deze parameter bleek niet verschillend te zijn tussen SOD1^{WT} en SOD1^{MT} mRNA-geïnjecteerde embryos.

Om te bepalen of de motoraxonafwijkingen specifiek waren, onderzochten we verschillende andere axonale systemen op 30 hpf. Eerst bestudeerden we de commissurale axon van het MAauthnerneuron in de achterste hersenen. Er werden geen verschillen waargenomen in de projectie van deze axons dwars door de middellijn en langs het ruggenmerg tussen overuitgedrukte SOD1^{WT} en SOD1^{MT} embryos (geen gegevens getoond). Op dezelfde wijze vertoonde de morfologie van de laterale zijde, een groep van sensorische neuronaxons die axons zenden over de gehele lengte van het zebrafish embryo, en Rohon-Beard sensorneuronen vertoonden geen grote afwijkingen na injectie met SOD1^{MT} (Bijkomend materiaal, Fig.

S1A-D), terwijl de uitdrukking van SOD1^{MT} in deze axons gelijk was als in de motor axons, zoals immunohistochemisch geschat. (Bijkomend materiaal, Fig. S2).

Bekrachtiging van het zebra vis model

Om te bewijzen dat een beschreven model gebruikt kan worden als een chemisch en/of een genetisch screening instrument, onderzochten we of de afwijkingen opgewekt door SOD1^{MT} konden beïnvloed worden door twee factoren die gekend zijn het fenotype van mutant SOD1 geassocieerde motor neuron degeneratie in knaagdier modellen te wijzigen (reductie of verergering) nl. VEGF en SOD1^{WT} (14–18).

Axonale defecten van motor neuron worden gered door VEGF. Verhoging van VEGF beschikbaarheid aan motor neuron is van voordeel bij knaagdieren met mutant SOD1-verwekte motor neuron degeneratie (14,17). Om het effect te onderzoeken van VEGF op de axonopathy verwekt door SOD1^{MT}, behandelden we embryos van zebrafissen met GS4012, waarvan is aangetoond dat ze de VEGF in zebrafis embryos verhoogden (8). We bevestigden de verhoging van VEGF door real-time polymerase ketting reactie (PCR) en vonden een verhoging van 18% na behandeling met 1 ng/μl GS4012 (gegevens niet getoond). Bij deze dosis was het effect op de axonale lengte in SOD1^{A4V} volledig gered. De daling van de axonale lengte verwekt door SOD1^{A4V} wanneer vergeleken met SOD1^{WT} geobserveerd in controles (n = 31), was 18.5% versus een 2.1% verhoging in VEGF-inductor behandelde embryos (n = 32, P < 0.001). De substantie verwekte geen verhoging in axonale lengte in SOD1^{WT}-geïnjecteerde embryos, met uitzondering van een algemeen neurotrofisch effect. GS4012 verhoogde het percentage van de getroffen embryos geïnjecteerd met SOD1^{WT} van 20.7 naar 34.5% wat de inherente kracht van de verbinding aantoonde. Na correctie voor deze relatieve verhoging redde GS4012 aanzienlijk de SOD1^{A4V}-verwekte abnormale vertakkingen: 35.6% van de getroffen embryos in de GS4012 behandelde groep versus 70.0% van de getroffen embryos in de drager behandelde groep (P=0.0068).

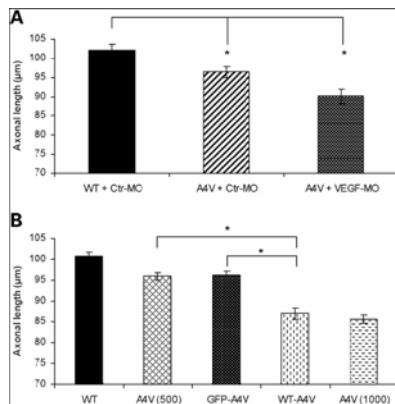
Verlaging van VEGF verwekt een ernstiger effect op axonale uitgroei. Lage VEGF expressie is een risico factor voor motor neuron degeneratie bij zowel dieren als mensen (15,16). Het effect van knockdown van VEGF met behulp van morpholinos (MO) werd onderzocht in vasculaire ontwikkeling van zebrafis embryos (19). MO knockdown is een antisense technologie die gebruikt wordt om sterical toegang te blokkeren van andere moleculen tot RNA; een ATG MO belemmert de vorming van de initiërende complexen gedurende de eerste stap van transcriptie. We mede-injecteerden de gepubliceerde VEGF-ATG-MO (3 ng) (19) met SOD1^{A4V} mRNA (500 ng/μl) in zebrafis embryos en vergeleken het effect op axonale afwijkingen met embryos mede-geïnjecteerd met een standaard controle MO (3 ng) en SOD1^{A4V} mRNA. Knockdown van VEGF werd bevestigd zoals we de ernstige gevolgen op de vorming van bloedvaten waarnamen door de VEGF-MO in deze embryos in overeenstemming met vorige rapporten (19,20). Verlaging van VEGF verhoogde het aantal embryos met afwijkende vertakkingen opgewekt door SOD1^{A4V} met 24.2%, evenals het aantal afwijkende vertakkingen per embryo (Tabel 3). Verlaging van VEGF niveaus verminderde de axonale lengte in SOD1^{A4V} overuitdrukkende embryos (Fig. 4A). Van hier werd de motor axonopathy, verwekt bij zebrafissen door mutant SOD1, verergerd door verlaging van de VEGF uitdrukking, in overeenstemming met bevindingen in dieren modellen voor ALS (15).

Tabel 3. Verlaging van VEGF verergerd het mutant SOD1 fenotype

| | Betroffen embryos (%) | Odds ratio (CI) | P-waarde | Vertakkende axons per embryo (%) |
|--------------------------------------|-----------------------|-----------------|----------|----------------------------------|
| WT 500 ng/μl þ 3 ng Ctr-MO, n = 32 | 9.4 | | | 3.3 |
| A4V 500 ng/μl þ 3 ng Ctr-MO, n = 35 | 28.6 | | | 5.7 |
| A4V 500 ng/μl þ 3 ng VEGF-MO, n = 36 | 52.8 | 2.8 (1.0–7.5) | 0.038 | 8.6a |

Co-injectie van VEGF-MO en SOD1^{A4V} wekte abnormale vertakkingen op in significant meer embryos in vergelijking met Ctr-MO en SOD1^{A4V}-geïnjecteerde embryos.

aSOD1^{A4V} + Ctr-MO versus SOD1^{A4V} + VEGF-MO, P = 0.027.



Figuur 4. Verlaging van VEGF en mede-uitdrukking van SOD1^{WT} verergeren het motor neuron fenotype. Verlaging van VEGF door gebruik van 3 ng VEGF-MO verergert het motor neuron fenotype verwerkt door SOD1^{A4V} 500 ng/µl (n = 36), vergeleken met 3 ng Ctr-MO co-geïnjecteerde embryos (n = 35). SOD1^{WT} werd geïnjecteerd met dezelfde concentratie: 500 ng/µl (n = 32) (A). Wanneer SOD1^{WT} en SOD1^{A4V} medeuitgedrukt zijn, beiden 500 ng/µl (n = 50), werd een ernstiger fenotype opgewekt vergeleken met SOD1^{A4V} 500 ng/µl (n = 110) of mede-uitdrukking van GFP en SOD1^{A4V}, beiden 500 ng/µl (n = 58), gelijk aan SOD1^{A4V} 1000 ng/µl (n = 90), terwijl SOD1^{WT} 1000 ng/µl (n = 51) gebruikt is als een negatieve controle (B). Y-fout balken vertonen een standaard fout bij een gemiddelde. *P < 0.001.

Mede-uitdrukking van WT verergert het mutant fenotype. Zoals voor SOD1^{WT} gemeld werd dat het SOD1^{MT}-opgewekte motor neuron degeneratie bij muizen niet beïnvloedde (21), hoewel recent aangetoond werd dat het mogelijk was een onaangestast fenotype te converteren naar een ALS fenotype bij de mutant SOD1^{A4V} transgene muizen (18), onderzochten we het effect van SOD1^{WT} bij het zebraavis model. SOD1^{WT} en SOD1^{A4V} mRNA werden mede geïnjecteerd bij gelijke dosis (500 ng/µl) en de axonale uitgroei werd vergeleken met deze die gezien werd na injectie van SOD1^{A4V} mRNA (500 ng/µl), terwijl SOD1^{WT} mRNA (1000 ng/ml) gebruikt werd als eerste controle (zelfde aantal van mRNA als bij de mede-injectie) en een mede-injectie met een groen fluoriserend proteïne (GFP) mRNA (500 ng/ml) met SOD1^{A4V} mRNA (500 ng/µl) werd gebruikt als tweede controle conditie. Overexpressie van SOD1^{WT} verhoogde het aantal getroffen embryos met 30.4% en verhoogde significant het percentage van abnormal vertakkende axons per embryo (Tabel 4). SOD1^{WT} overexpressie verhoogde gelijkaardig het effect van SOD1^{A4V} op de axonale lengte (Fig. 4B). In tegenstelling hiervan beïnvloedde co-expressie van GFP en SOD1^{A4V} het fenotype niet. Kwantitatief beïnvloedde de mede-injectie van 500 ng/µl of SOD1^{WT} mRNA en 500 ng/µl of SOD1^{A4V} mRNA de axonale uitgroei op dezelfde wijze als 1000 ng/µl SOD1^{A4V} mRNA deed (Tabel 4).

Tabel 4. Mede-uitdrukking van SOD1^{WT} met SOD1^{A4V} resulteert in een verslechtering van vertakkingen bij zebraavis embryos

| | Getroffen embryos (%) | Odds ratio (CI) | P-waarde | Vertakkende axons per embryo (%) |
|---------------------------------------|-----------------------|-----------------|----------|----------------------------------|
| WT 1000 ng/µl, n = 51 | 19.6 | | | 4.6 |
| A4V 500 ng/µl, n = 110 | 43.6 | | | 7.9 |
| A4V 500 ng/µl + GFP 500 ng/µl, n = 58 | 39.7 | | | 6.6 |
| A4V 500 ng/µl + WT 500 ng/µl, n = 50 | 74.0 | 3.7 (1.8–7.6) | 0.00036 | 12.9 ^{a,b} |
| A4V 1000 ng/µl, n = 90 | 71.1 | | | 11.9 |

Mede-injectie van SOD1^{WT} en SOD1^{A4V} wekte abnormale vertakkingen in significant meer embryos op in vergelijking met SOD1^{A4V}-geïnjecteerde embryos. ^aSOD1^{A4V} (500 ng/µl) versus SOD1^{WT} (500 ng/µl) + SOD1^{A4V} (500 ng/µl), P _¼ = 8.3 x 10⁻⁵.

^bGFP (500 ng/µl) + SOD1^{A4V} (500 ng/µl) versus SOD1^{WT} (500 ng/µl) ^b SOD1^{A4V} (500 ng/µl), P = 2.0 x 10⁻⁵.

BESPREKING

Onze bevindingen tonen aan dat overexpressie van SOD1^{MT} een zeer robuuste en gemakkelijk te controleren axonopathie opwekt bij zebraavis embryos. Het giftige effect van SOD1^{MT} op axonale uitgroei

was specifiek en dosis-afhankelijk. Geen effect van SOD1^{WT} werd gezien, wat wijst op de selectiviteit van het effect voor de mutant vormen van het proteïne. Deze SOD1^{MT} axonopathie verscheen motor-specifiek, omdat er geen toxisch effect van SOD1^{MT} op verschillende ander onderzochte axonale projecties geobserveerd werden. Bovendien was het ziekte fenotype onafhankelijk van het type mutatie en gemakkelijk kwantitatief te beoordelen en in voldoende cijfers om hoogwaardige statistieken toe te laten.

Het lijkt misschien paradoxaal om een mutant SOD1 opgewekte embryonische axonopathie te observeren, terwijl ALS een volwassen onset ziekte is. Niettemin, reeds heel vroeg in het leven is motor axonale disfunctie ook duidelijk in de SOD1^{MT} muis, bij welke de klinische afwijkingen pas op volwassen leeftijd duidelijk worden. Afwijkingen bij axonaal transport werden inderdaad beschreven bij motor neuronen gecultiveerd van SOD1^{G93A} muis embryos op dag 13.5 van de dracht (22). Bovendien werd gerapporteerd dat motor neuronen gecultiveerd van embryos met gelijke leeftijd versterkte oxyradicale productie, lipide peroxidatie, verhoogde calcium niveaus en verlaagde intramitochondriale calcium niveaus en mitochondriale disfunctie vertoonden (23). Verhoogde kwetsbaarheid voor excitotoxiciteit (24) en voor een Fas-afhankelijke traject (25) werd ook beschreven.

Het embryonale karakter van dit model voor een neurodegeneratieve ziekte heeft meerdere belangrijke voordelen. MO-gebaseerde screening kan pathogenische trajecten identificeren, die kunnen leiden tot therapeutische doelen voor farmacologische interventie. Behandeling van embryos met kleine gecompliceerde collecties zijn haalbaarder wanneer ze vergeleken worden met ALS knaagdier modellen en hebben mogelijk een groter potentieel dan in vitro modellen die momenteel gebruikt worden voor chemische screening (7). Testen van medicatie kan uitgevoerd worden binnen de twee dagen wat hoge throughput geeft om samenstellingen te screenen, een veelbelovende benadering om moleculen te identificeren met potentiële waarde.

Tijdens het afgelopen jaar werd de rol van VEGF betrokken bij motor neuron ziektes en ALS in het bijzonder (14-17). We onderzochten daarom of de expressie van VEGF de beschreven axonopathie kon beïnvloeden. Verlaging van VEGF door de MO knockdown techniek verergerde de axonale afwijkingen consequent met observaties in SOD1^{G93A} transgene muizen wanneer ze gekruist waren met muizen met gereduceerde niveaus van VEGF, vegfad/d muizen, die hun overleving verkortten (15). Bovendien kon het mutant SOD1 verwekte fenotype bijna volledig gered worden gebruik makend van GS4012, een samenstelling die VEGF opwaardeert. Deze bevindingen benadrukken het potentiële van VEGF bij behandeling van SOD1-opgewekte motor neuron degeneratie en hopelijk voor ALS in het algemeen.

Omdat we een motor neuron-specifiek fenotype identificeerden en twee factoren aantoonde die gekend zijn het fenotype van SOD1^{MT}-geassocieerde motor neuron degeneratie te wijzigen in knaagdier modellen, VEGF en SOD1^{WT} (14,15,17,18) en die de fenotype nabootsing observeringen in deze dieren kunnen beïnvloeden, raden we de zebravis aan om een geschikt model te zijn voor studies met doel ziekte wijzigende genen en trajecten te identificeren die bijdragen tot de pathogenese van ALS en om potentiële therapeutische samenstellingen te screenen. Dit model is ook het eerste dat dat zich concentreert op axonale afwijkingen en niet zozeer op de ziekte perikaryon.

Sinds kort werd aangetoond dat de axonopathy een belangrijk kenmerk in de pathogenese van ALS is (6,11) en daarom kan chemische en genetische screening in dit model van bijzonder belang zijn.

Bij ons beste weten, is dit het eerste model voor een neurodegeneratieve ziekte bij de zebravis bemiddeld door een giftige winst van functie van een gemuteerd proteïne, resulterend in een neurale fenotype. MO-gebaseerde knockdown van smn heeft interessante modellen opgeleverd voor de studie

van spinomusculaire atrofie, een ziekte afhankelijk van het verlies aan functie van het overleven van motor neuron (SMN) proteïne (10). Knockdown van spastin bij zebravissen werd beschreven als een model voor erfelijke spastische dwarslaesie, gebruikmakend van dezelfde techniek. Gereduceerde spastische functies veroorzaakten defecten in de motor axon uitgroei maar wekten ook ververspreide defecten in neurale connectiviteit en uitgebreide centrale zenuwstelsel-specifieke apoptose, die resulteerde in een abnormale lichaam morfologie (26). De ziekte van Hurlington werd gemodelleerd in het zebravis embryo gebruik makend van expressie van polyQ-proteïnen, hetgeen resulteerde in onoplosbare opnames.

De geobserveerde fenotypes echter hadden ontwikkelingsvertraging en grote afwijkingen in het lichaamsplan en differentiatie (27) en een verhoging in de frequentie van embryos met abnormale morfologie en het optreden van apoptosus(28), in plaats van een fenotype gebaseerd op het verlies van stratiale neuronen. Het hier gepresenteerde vertebrale model voor ALS is gebaseerd op een fenotype specifiek voor motor neuronen.

Grootschalige screenings die gebruik maken van zebravissen kunnen bijdragen tot het ophelderen van de pathogenese van de motor neuron degeneratie en bijdragen tot een ontdekking van een therapie voor deze vreselijke ziekte.

MATERIALEN EN METHODEN

Constructies, RNA productie, MO, chemische en kwantitatieve PCR

Menselijk cDNA van wild-type (WT), G93A, G37R en A4V in de pCLneo vector waren vriendelijke giften van R.H. Brown Jr (Harvard Medical School, Harvard, USA). SOD1 werd gekloond in de pBCM vector achter een T3 promotor. De constructie werd gealigneerd met Asp718. Door gebruik van de mMMESSAGE mMACHINEw T3 Kit (Ambion, Huntingdon, UK), was RNA overgebracht van DNA en gezuiverd gebruik makend van de MEGAclear TM Kit (Ambion). RNA concentratie was bepaald met behulp van Ribogreen (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). De VEGF-MO gepubliceerd door Nasevicius et al. (19) (VEGF-A-3: TAAGAAAGCGAAGCTGCTGGGTATG) was een vriendelijk gift van het Vlaams instituut voor Biotechnologie (VIB) en de De'sire' Collen Research Foundation (Leuven, België).

Als een controle MO (Ctr-MO) gebruikten we een standaard controle MO (CCTCTTACCTCAGTTACAATTATA) door Gene tools (Philomath, OR, USA). Voor het VEGF-inductor experiment, werden zebravis embryos op 6 hpf opgedeeld in twee groepen en geplaatst in GS4012 (Calbiochem, Darmstadt, Duitsland) opgelost in dimethyl sulfoxide (DMSO) 0.001% bij een concentratie van 1 ng/ml en DMSO 0.001% als een controle, respectievelijk.

Kwantitatieve PCR werd uitgevoerd, zoals eerder beschreven (8). Totaal RNA was gehaald uit acht groepen embryos (vier behandeld met GS4012 en vier behandeld met 0.001% DMSO), 60 embryos per groep, met behulp van de TRIPURE methode gevolgd door RNA kwantificatie en omgekeerd-getranscribeerd met behulp van een random hexamer en mMLV. Expressie werd gekwantificeerd op 30 hpf en VEGF niveaus werden genormaliseerd in relatie tot 18S expressie. cDNA werd gekwantificeerd met behulp van het Applied Biosystems Sequence Detection System 7300. Primer en sonde sequenties voor zebravis VEGF waren 50-TGCTCCTGCAAATTCACACAA-30, 50-ATCTTGGCTTTTCACATCTGCAA-30 en sonde 50-6FAM-TGCAATGCAAGTCCAGACA-MGBNFQ-3.

Zebravis onderhoud en injectie

Volwassen zebravissen (abB stam) en embryos werden bijgehouden en opgevoerd onder standaard laboratorium condities (29). Alle uitgevoerde experimenten werden goedgekeurd door de Ethische Commissie van de KU Leuven. Verschillende mRNA concentraties werden geïnjecteerd met behulp van FemtoJet (Eppendorf, Hamburg, Germany).

Elke injectie werd gedaan in de 2-4 cel stadium van de zebra vis embryo en afgeleverd 1.76 nl mRNA of mRNA/MO oplossing. Het volume van de druppel werd bepaald door meting van de diameter van de druppel met behulp van een micrometer, met een druppel minerale olie bovenop. De druk van de injectie die nooit 4.5 psi overschreed, werd gewijzigd tot de diameter van de druppel 150 μ m was.

Analyse van motor neuron uitgroei en immunohistochemie

Op 30 hpf werden enkel morfologisch normale zebra vis embryos gefixeerd in 4% paraformaldehyde in fosfaat gebufferde oplossing (PBS) en geïmmunostaind met behulp van muis anti-SV2 (1/200; Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, Iowa City, IO, USA) en secundair Alexa Fluor 555 anti-muis antilichaam (1/500; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) om zo de motor neuronen te visualiseren (30). Waarnemers waren geblindeerd voor injecties en behandelingscondities. We onderzochten axonale defecten in een totaal van 20 ventrale motorische zenuwen, 10 op elke site langs de dooier zak extentie op 30 hpf. Motor neuronen werden beoordeeld als zijnde aangetast wanneer axons vertakten bij of boven de ventrale rand van het notochord (Fig. 1A); We observeerden dat ventrale vertakkingen aan het notochord dikwijls voorkwamen in normale embryos en hielden dus hiermee geen rekening. Embryos werden als abnormaal beoordeeld wanneer twee of meer axons per embryo afwijkende vertakking vertoonden. Axonale lengte werd als een tweede parameter gebruikt om axonale defecten te bepalen. We maten de lengte op de eerste vijf (of 10 wanneer zo vermeld in de tekst) motor axons langs de dooier zak extentie van het uitgangspunt van de axon bij het ventrale deel van het ruggenmerg tot zijn distaal punt met behulp van Luica software (versie 4.60). Analyse andere neurale en niet-neurale weefsels werd uitgevoerd na immunohistochemische kleuring met behulp van Muis anti-acetylateerd tubuline (1/200; Sigma-Aldrich, CA, USA) en muis 3A10 (1/200; Developmental Studies Hybridoma Bank) en secundaire antilichamen, zoals eerder beschreven.

Western blot

Zebra vis embryos werden gedechorionoreerd en devolged op 30 hpf en gehomogeniseerd in Radio Lummuno Precipitation Assay (RIPA) buffer die 150 mM NaCl pH 7.5, 1% NP-40, 0.5% bevatte. Nadeoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfaat bevat 1 tablet Complete-EDTA (Roche, Mannheim, Germany). De proteïne concentratie werd bepaald met behulp van de micro-BCA proteïne assay reactie kit 207 (Pierce, Rockford, IL, USA). Zelfde hoeveelheden proteïne werden geladen op hetzelfde blot. Western blotting werd uitgevoerd, zoals eerder beschreven (31). Gebruikte primaire anti lichamen waren konijn polyclonal SOD1 antilichaam die beiden zowel het zebra vis en menselijk SOD1 proteïne herkennen (1/10,000; SOD-100 Stressgen, Victoria, Canada) en muis monoclonal b-actin antilichaam (1/5000; Sigma-Aldrich). De blots werden bebroed met ofwel secundair anti-konijn of anti-muis alkaline fosfatase-gekoppeld antilichaam (1/5000; Sigma-Aldrich). De proteïne banden werden gevisualiseerd door chemifluorescentie met behulp van verbeterde chemische fluorescentie (ECF) substraat (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) en gescanned op een STORM 840 scanner (Molecular Dynamics, CA, USA).

Statistische analyse

Statistieken werden uitgevoerd met behulp van SPSS 10. Experimenten werden geanalyseerd met de Mann-Whitney U-test of the Kruskal-Wallis test, of analyse van de variantie. In het geval van meerdere vergelijkingen, werd een Bonferroni correctie uitgevoerd. Bivariate correlaties en testen voor dosis trends werden geanalyseerd met behulp van de Spearman's rang test of de Pearson's correlatie coefficient, afhankelijk van de spreiding van de gegevens; χ^2 testen werden gebruikt voor de frequentie vergelijkingen. Alle gerapporteerde P-waarden zijn two-tailed en het significantie niveau was vastgesteld op 0.05.

SUPPLEMENTAIR MATERIAAL

Supplementair materiaal is beschikbaar bij HMG online.

DANKBETUIGINGEN

Dit werk is ondersteund door een schenking van het Packard Center voor ALS Research (Johns Hopkins University) van de Universiteit van Leuven, de Belgische regering (Interuniversity Attraction Poles, program P6/43 of the Belgian Federal Science Policy Office) en van Rotary Harelbeke. W.R. is ondersteund door de E. von Behring Chair for Neuromuscular and Neurodegenerative Disorders. Conflict of Interest statement. Niets verklaard.

REFERENTIES

1. Walker, F.O. (2007) Huntington's disease. *Lancet*, 369, 218–228.
2. Rosen, D.R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D.A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J.P., Deng, H.X. et al. (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 362, 59–62.
3. Regal, L., Vanopdenbosch, L., Tilkin, P., VanDen Bosch, L., Thijs, V., Sciot, R. and Robberecht, W. (2006) The G93C mutation in superoxide dismutase 1: clinicopathologic phenotype and prognosis. *Arch. Neurol.*, 63, 262–267.
4. Mockett, R.J., Radyuk, S.N., Benes, J.J., Orr, W.C. and Sohal, R.S. (2003) Phenotypic effects of familial amyotrophic lateral sclerosis mutant Sod alleles in transgenic *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 301–306.
5. Oeda, T., Shimohama, S., Kitagawa, N., Kohno, R., Imura, T., Shibasaki, H. and Ishii, N. (2001) Oxidative stress causes abnormal accumulation of familial amyotrophic lateral sclerosis-related mutant SOD1 in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Hum. Mol. Genet.*, 10, 2013–2023.
6. Gould, T.W., Buss, R.R., Vinsant, S., Prevette, D., Sun, W., Knudson, C.M., Milligan, C.E. and Oppenheim, R.W. (2006) Complete dissociation of motor neuron death from motor dysfunction by Bax deletion in a Mouse model of ALS. *J. Neurosci.*, 26, 8774–8786.
7. Zon, L.I. and Peterson, R.T. (2005) In vivo drug discovery in the zebrafish. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 4, 35–44.
8. Peterson, R.T., Shaw, S.Y., Peterson, T.A., Milan, D.J., Zhong, T.P., Schreiber, S.L., MacRae, C.A. and Fishman, M.C. (2004) Chemical suppression of a genetic mutation in a zebrafish model of aortic coarctation. *Nat. Biotechnol.*, 22, 595–599.
9. Beattie, C.E. (2000) Control of motor axon guidance in the zebrafish embryo. *Brain Res. Bull.*, 53, 489–500.
10. Carrel, T.L., McWhorter, M.L., Workman, E., Zhang, H., Wolstencroft, E.C., Lorson, C., Bassell, G.J., Burghes, A.H. and Beattie, C.E. (2006) Survival motor neuron function in motor axons is independent of functions required for small nuclear ribonucleoprotein biogenesis. *J. Neurosci.*, 26, 11014–11022.
11. Fischer, L.R., Culver, D.G., Tennant, P., Davis, A.A., Wang, M., Castellano-Sanchez, A., Khan, J., Polak, M.A. and Glass, J.D. (2004) Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Exp. Neurol.*, 185, 232–240.
12. Amendola, J., Verrier, B., Roubertoux, P. and Durand, J. (2004) Altered sensorimotor development in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur. J. Neurosci.*, 20, 2822–2826.
13. Lindberg, M.J., Bystrom, R., Boknas, N., Andersen, P.M. and Oliveberg, M. (2005) Systematically perturbed folding patterns of amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-associated SOD1 mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 9754–9759.
14. Azzouz, M., Ralph, G.S., Storkebaum, E., Walmsley, L.E., Mitrophanous, K.A., Kingsman, S.M., Carmeliet, P. and Mazarakis, N.D. (2004) VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model. *Nature*, 429, 413–417.
15. Lambrechts, D., Storkebaum, E., Morimoto, M., Del-Favero, J., Desmet, F., Marklund, S.L., Wyns, S., Thijs, V., Andersson, J., van Marion, I. et al. (2003) VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nat. Genet.*, 34, 383–394.
16. Oosthuysen, B., Moons, L., Storkebaum, E., Beck, H., Nuyens, D., Brusselmans, K., Van Dorpe, J., Hellings, P., Gorselink, M., Heymans, S. et al. (2001) Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat. Genet.*, 28, 131–138.
17. Storkebaum, E., Lambrechts, D., Dewerchin, M., Moreno-Murciano, M.P., Appelmanns, S., Oh, H., Van Damme, P., Rutten, B., Man, W.Y., De Mol, M. et al. (2005) Treatment of motoneuron degeneration by intracerebroventricular delivery of VEGF in a rat model of ALS. *Nat. Neurosci.*, 8, 85–92.

18. Deng, H.X., Shi, Y., Furukawa, Y., Zhai, H., Fu, R., Liu, E., Gorrie, G.H., Khan, M.S., Hung, W.Y., Bigio, E.H. et al. (2006) Conversion to the amyotrophic lateral sclerosis phenotype is associated with intermolecular linked insoluble aggregates of SOD1 in mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 7142–7147.
19. Nasevicius, A., Larson, J. and Ekker, S.C. (2000) Distinct requirements for zebrafish angiogenesis revealed by a VEGF-A morphant. *Yeast*, 17, 294–301.
20. Stalmans, I., Lambrechts, D., De Smet, F., Jansen, S., Wang, J., Maity, S., Kneer, P., von der Ohe, M., Swillen, A., Maes, C. et al. (2003) VEGF: a modifier of the del22q11 (DiGeorge) syndrome? *Nat. Med.*, 9, 173–182.
21. Bruijn, L.I., Houseweart, M.K., Kato, S., Anderson, K.L., Anderson, S.D., Ohama, E., Reaume, A.G., Scott, R.W. and Cleveland, D.W. (1998) Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science*, 281, 1851–1854.
22. Kieran, D., Hafezparast, M., Bohnert, S., Dick, J.R., Martin, J., Schiavo, G., Fisher, E.M. and Greensmith, L. (2005) A mutation in dynein rescues axonal transport defects and extends the life span of ALS mice. *J. Cell. Biol.*, 169, 561–567.
23. Kruman, I.I., Pedersen, W.A., Springer, J.E. and Mattson, M.P. (1999) ALS-linked Cu/Zn-SOD mutation increases vulnerability of motor neurons to excitotoxicity by a mechanism involving increased oxidative stress and perturbed calcium homeostasis. *Exp. Neurol.*, 160, 28–39.
24. Van Damme, P., Dewil, M., Robberecht, W. and Van Den Bosch, L. (2005) Excitotoxicity and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegener. Dis.*, 2, 147–159.
25. Raoul, C., Estevez, A.G., Nishimune, H., Cleveland, D.W., deLapeyriere, O., Henderson, C.E., Haase, G. and Pettmann, B. (2002) Motoneuron death triggered by a specific pathway downstream of Fas. potentiation by ALS-linked SOD1 mutations. *Neuron*, 35, 1067–1083.
26. Wood, J.D., Landers, J.A., Bingley, M., McDermott, C.J., Thomas-McArthur, V., Gleadall, L.J., Shaw, P.J. and Cunliffe, V.T. (2006) The microtubule-severing protein Spastin is essential for axon outgrowth in the zebrafish embryo. *Hum. Mol. Genet.*, 15, 2763–2771.
27. Miller, V.M., Nelson, R.F., Gouvion, C.M., Williams, A., Rodriguez-Lebron, E., Harper, S.Q., Davidson, B.L., Rebagliati, M.R. and Paulson, H.L. (2005) CHIP suppresses polyglutamine aggregation and toxicity in vitro and in vivo. *J. Neurosci.*, 25, 9152–9161.
28. Schiffer, N.W., Broadley, S.A., Hirschberger, T., Tavan, P., Kretzschmar, H.A., Giese, A., Haass, C., Hartl, F.U. and Schmid, B. (2007) Identification of anti-prion compounds as efficient inhibitors of polyglutamine protein aggregation in a zebrafish model. *J. Biol. Chem.*, 282, 9195–9203.
29. Westerfield, M. (2003) *The Zebrafish Book*. The University of Oregon Press, Eugene, Oregon.
30. Panzer, J.A., Gibbs, S.M., Dosch, R., Wagner, D., Mullins, M.C., Granato, M. and Balice-Gordon, R.J. (2005) Neuromuscular synaptogenesis in wild-type and mutant zebrafish. *Dev. Biol.*, 285, 340–357.
31. Krishnan, J., Lemmens, R., Robberecht, W. and Van Den Bosch, L. (2006) Role of heat shock response and Hsp27 in mutant SOD1-dependent cell death. *Exp. Neurol.*, 200, 301–310. *Human Molecular Genetics*, 2007, Vol. 16, No. 19 2365