

ZEBRAFISCH UND „APOSEC“

- „APOSEC“ ist eine aus weißen Blutkörperchen gewonnenen Substanz, die bei Forschergruppe von Prof. Jan Ankersmit entwickelt wurde
- Bereits in der präklinischen Entwicklung wurde nachgewiesen, dass der multifaktorielle Wirkstoff in den Indikationen Herzinfarkt, Schlaganfall, Rückenmarksverletzungen und Wundheilung einsetzbar ist
- Bei unserem Projekt, wollen wir durch eine Kooperation mit dem St. Anna Kinderspital den Einfluss von „APOSEC“ auf Zebrafische als ein Therapeutika zur Heilung von Patienten untersuchen



ZEBRAFISCH

- Familie Karpfenfische
- Süßwasserfische
- Maximale Körperlänge: 5-6 CM
- Stammungsort: Asien (Pakistan, Indien, Bangladesh und Nepal)
- Lebensort: Kleine Bächen, Kanäle, Graben oder Teiche mit langsam fließendem oder stehendem Wasser
- Haltungsform: Gruppehaltung min. 8 Tier, viel Schwimmraum im Becken zusammen mit schwacher Strömung und eine Radpflanzung erforderlich
- Optimale Wassertemperatur: 20-26 °C
- Nahrung: Allesfresser
- Maximale Lebensdauer: 5-6 Jahr



REVIEW

Use of zebrafish models to investigate rare human disease

Kathryn Isabel Adamson,¹ Eamonn Sheridan,² Andrew James Grierson^{1,3}

¹Sheffield Institute for Translational Neuroscience, University of Sheffield, Sheffield, UK

²School of Medicine, University of Leeds, Leeds, UK

³Department of Neuroscience, University of Sheffield, Sheffield, UK

Correspondence to

Dr Andrew James Grierson, Sheffield Institute for Translational Neuroscience, Sheffield, S10 2HQ, UK; a.j.grierson@sheffield.ac.uk

Received 27 February 2018

Revised 2 July 2018

Accepted 4 July 2018

Published Online First 31 July 2018

ABSTRACT

Rare diseases are collectively common and often extremely debilitating. Following the emergence of next-generation sequencing (NGS) technologies, the variants underpinning rare genetic disorders are being unearthed at an accelerating rate. However, many rare conditions lack effective treatments due to their poorly understood pathophysiology. There is therefore a growing demand for the development of novel experimental models of rare genetic diseases, so that potentially causative variants can be validated, pathogenic mechanisms can be investigated and therapeutic targets can be identified. Animal models of rare diseases need to be genetically and physiologically similar to humans, and well-suited to large-scale experimental manipulation, considering the vast number of novel variants that are being identified through NGS. The zebrafish has emerged as a popular model system for investigating these variants, combining conserved vertebrate characteristics with a capacity for large-scale phenotypic and therapeutic screening. In this review, we aim to highlight the unique advantages of the zebrafish over other *in vivo*

genetic diseases. This has triggered rapid progress in the identification of their causative mutations in recent years,⁵ and several collaborative large-scale initiatives, comprising national and international networks of clinicians and researchers, have now been established with the aim of accelerating rare disease gene discovery by NGS (table 1).

Despite these advances, treatments for most rare diseases remain scarce.⁶ For ‘ultrarare’ diseases, in which candidate variants have only been identified in a handful of individuals within a single pedigree, validation of pathogenicity can be challenging. Additionally, because translational research efforts have historically been more focused on common disorders,⁷ the underlying mechanisms contributing to rare diseases often remain poorly understood, even where the genetic aetiology has been confirmed.

Considering the growing number of candidate rare disease variants being identified through NGS, there is an increasing need for research into these

USE OF ZEBRAFISH MODELS TO INVESTIGATE RARE HUMAN DISEASE

- Bedeutung von Forschung über seltene Erbkrankheiten
- Modellierung seltener Erbkrankheiten
- Zebrafisch als ein neu entstehendes Modelltier bei seltenen Erbkrankheiten
- Untersuchung wichtiger Genen bei plazentalen Entwicklung von Säugetieren
- Untersuchung Entwicklungsprozess von seltenen Erkrankungen
- Zebrafisch und Krankheitsmodelle
- Identifizierung neues Wegs bei human Knochenbildung
- Schlussfolgerung

BEDEUTUNG VON FORSCHUNG ÜBER SELTENE ERBKRAKHEITEN

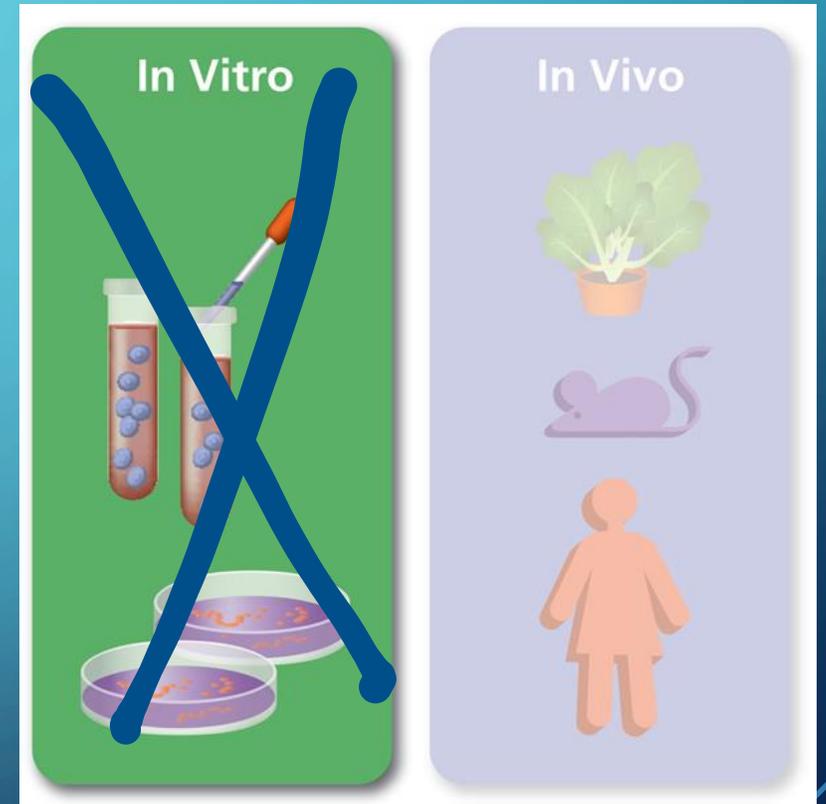
- Seltene Erbkrankheiten, chronische schwächende Krankheiten



- Prävalenz niedriger als 1:2000, mehr als 6000 eindeutige Beschwerden
- Fast 80% seltener Erkrankungen >>> genetische Ätiologie
- Großer Erfolg bei der Diagnose >>>> Next Generation Sequenzierung (NGS) Technologie
- Einschränkungen bei Behandlungsverfahren:
1) Seltsamkeit 2) mehr Forschung auf häufige Erkrankungen
- Erfolgreiche Zukunft bei NGS Technologie

MODELLIERUNG SELTENER ERBKANKHEITEN

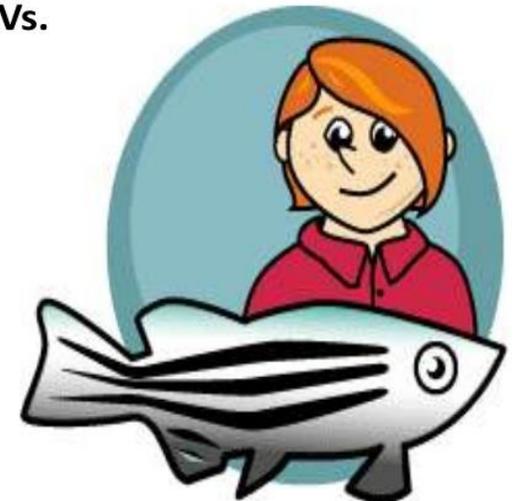
- Informationen über die Krankmachende Faktoren;
- 1. In-Vitro
 2. Zelluläre Methode
 3. Gewebeprobe von Patienten
- Nicht gut genug; neurologische Störungen
- In-Vivo Modellen erforderlich
 - 1) Mäusen hohe Haltungskosten, kleine Wurfgröße
 - 2) Wirbellose Tiere, Würmer (*Drosophila melanogaster*) evolutionären Abstand
 - 3) Zebrafisch Geeignet für translationale Forschungen, (genetische und physiologische Parameter) von Säugetieren Modellen und (hohe Durchsatzleistung und Versuchsmanipulierbarkeit) von Wirbellosen Modellen



ZEBRAFISCH ALS EIN NEU ENTSTEHENDES MODELLTIER BEI SELTENEN ERBKRANKHEITEN

- Zebrafisch Genom besitzt deutliche Homologie mit dem Humangenom, ca. 70% Orthologie
- Zebrafische sind genetisch sehr lenkbar
- Geeignet für die Untersuchungen über Erkrankungen von vielen Organsystemen und Strukturen, die zwischen Zebrafisch und Menschen gemeinsam sind; z. B. Viele Erbkrankheiten; human Kardiovaskuläre, Nerven-, Visuell-, Nieren- und Muskularsystemen
- Anatomisch und Physiologisch sind Zebrafisch im Vergleich zu Mäusen sehr entfernt von Menschen >>>>> Untersuchung über Körperorganen wie Lungen, anspruchsvoll

**Zebrafish Vs.
Humans**



ZEBRAFISCH ALS EIN NEU ENTSTEHENDES MODELLTIER BEI SELTENEN ERBKRANKHEITEN

HIRSCHSPRUNG KRANKHEIT (HSK)

- Angeborene Erkrankung des Dickdarms, fehlen in einem Abschnitt des Dickdarms Nervenzellen
- Untersuchungsvorgang:

1) Gesamt-Genom-Sequenzierung/Whole-Exome-Sequencing (WES) von Patienten und Eltern >>>> Entdeckung neuer LOF und missense Gene

2) Auswahl 12 Gene beim Zebrafisch
Morpholino Knockdown von 4 Genen

Ähnliche Phänotypen wie bei Human Patienten,
Abwesenheit von Darminnervierung im distalen Teil des Darms 5 Tage Nach der Befruchtung

DIAMOND-BLACKFAN-ANÄMIE (DBA)

- Schwere chronische Blutarmut, geringe Anzahl an roten Blutkörperchen, ersten Lebensjahr
- Ursache: Ribosomalen Protein S19 (RPS19) Mutation
- Erklärung des Krankheitsverlaufs:

Zebrafisch als Modelltier TALENs Methode

1. Knockdown rps19 Gen >>>> Schädigung bei globin Protein Erzeugung parallel damit geringfügige Auswirkungen auf die mRNA Ebene

2. Behandlung: L-Leucin als anregender Faktor bei Proteinsynthese >>> Aktivierung translationsprozess bei Erythroiden Zellen

Bessere und grundsätzliche Vorgangskennntnisse wurde sich bei Untersuchungen mit Zebrafisch ergeben

UNTERSUCHUNG WICHTIGER GENEN BEI PLAZENTALEN ENTWICKLUNG VON SÄUGETIEREN

- Von-Hippel-Lindau Erkrankung (VHL) seltene, erbliche Tumorerkrankung; Tumoren in der Niere, Nebenniere und der Bauchspeicheldrüse

1) Mäusen,

- Tumor-Suppressor-Gen (VHL-Gen) Mutation; plazentaler Fehler/embryonal Mortalität
- Teilweise Abschaltung des VHL Genes bedingte Null-Mutation oder Punkt-Mutation geborene Mäusen lebensfähig keine wichtige phänotypische Eigenschaften

- Zebrafisch Mutanten zeigten Erkrankung-assoziierte Phänotypen, welche vorher bei den Modellen mit Mäusen nicht beobachtet wurde
- Diese deutet auf Wichtigkeit von Zebrafischmodellen beim Zeichnen Phänotypen unter Funktionsverlust /Loss-of-function (LOF) von Genen bei Säugetieren hin

2) Zebrafisch,

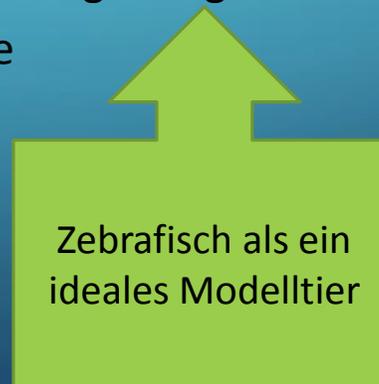
- Zebrafisch keine Plazenta, geeignet für die phänotypische Untersuchungen von Genen >>>> Embryonalentwicklung
- Rooijen et al. (2009) Zebrafisch als Modelltier und Null-Mutation Zebrafisch Mutanten lebensfähig bis zur Larvenphase Phänotyp „Chuvash-Polyzythämie“

UNTERSUCHUNG ENTWICKLUNGSPROZESS VON SELTENEN ERKRANKUNGEN

- Drei Viertel von seltenen Erkrankungen treten während Kindheit auf
- 30% von Patienten sterben vor dem fünften Geburtstag, Störung hervorrufende Prozesse in frühen Phasen zu erkennen
- Zebrafisch.....

- 1) Embryonalwachstum sehr schnell und außerhalb des Muttertierkörpers
- 2) Morphogenese von Hauptorganen innerhalb von 48 Stunden
- 3) Embryonen transparent

Diese Eigenschaften parallel mit Vorhandenen Bildgebungstechnologie für detaillierte Visualisierung von Entwicklungs- und Physiologische Prozesse



ZEBRAFISCH UND KRANKHEITSMODELLE

ZUFÄLLIGE MUTAGENESE/RANDOM MUTAGENESIS

ZIELGERICHTETE GENOM- EDITING/ TARGETED GENOM-EDITING

Zebrafisch genetische Manipulation:

- 1) N-ethyl-N-nitrosaure Methode
- 2) Retroviral Insertion Methode

- Vorteil: Anwendungen in großen Ausmaß, gute Mutanten Sammlung für zahlreiche Zebrafischgene
- Nachteil: Mutanten für jede Gene nicht vorhanden
speziell Modellierung für Mutanten nicht möglich

3 Werksysteme:

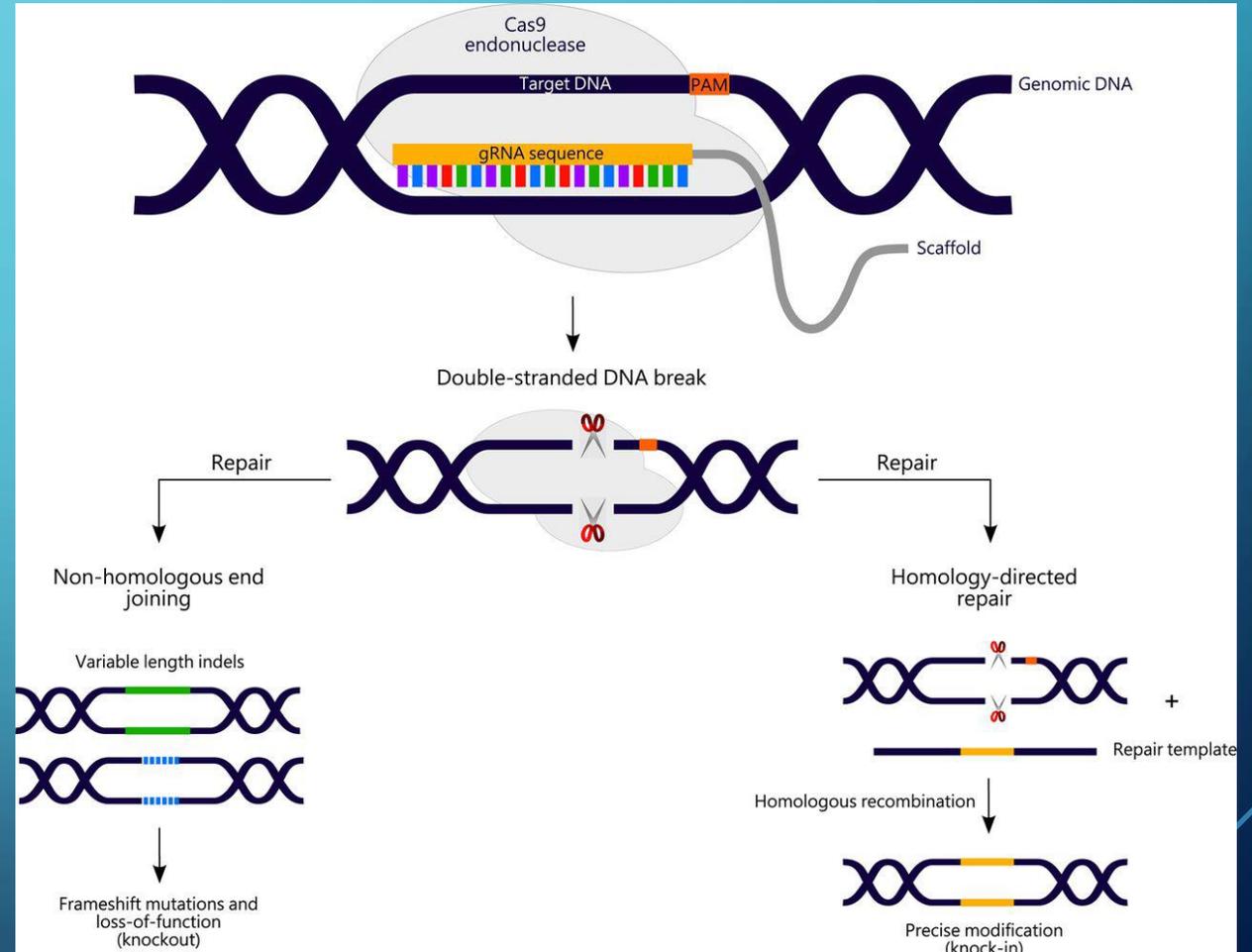
Grundlage alle 3 Systemen ist Veränderungen von Nukleasen

- 1) ZFN (Zink-Finger-Nukleasen)
- 2) TALENs (Transcription activator-like effector nuclease)
- 3) CRISPR / CRISPR-assoziiertes Protein 9 (Cas 9)

- ZFN und TALENs: Künstlich hergestellte Enzyme >>>> teuer, mühsam
- CRISPR Cas 9 System: Präziser, einfacher und deutlich kostengünstiger

CRISPR CAS 9

- Ein relevanter Verfahren zur Modellierung human Erbkrankheiten
- Verfahren:
Erkennung gezieltes Orts durch einen genauepassten Guide RNA (gRNA), einfache Bestimmung einzelnes Oligonukleotid für jeden Platz
- Durchführung mittels zwei Methode:
 1. NHEJ (non-homologous end-joining) in dem Fall total Abschalten des Genes
 2. HDR (homology-directed repair), vollständiger Funktionsverlust von Genom tödlich oder gain-of-function von Genom erwünscht

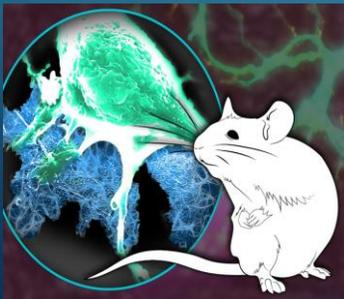


IDENTIFIZIERUNG NEUES WEGS BEI HUMAN KNOCHENBILDUNG

- Zebrafisch sehr bedeutsam bei der Überprüfung krankheitshervorrufende Mechanismen, zum Teil bei Erkennung neuer biologischen Wegen
- Familienkomponente von Vacuolar ATPase (V-ATPase) Protein verantwortlich für die Regulierung intrazellulären und extrazellulären pH-Wert, besonderes wichtig beim Osteoklasten Funktion, welche Knochenresorption sachgerecht reguliert

Studie bei Mäusen:

- Fehler V-ATPase Gen (ATP6i), beeinträchtigte extrazellulären Versauerungsvorgang >>>
- Störung Osteopetrose (erhöhte Knochendichte)



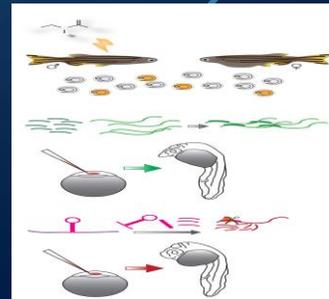
Studie bei Patienten:

- „National Institute of Health“ (NIH) >>> drei Generationen mit Einzelstammbaum
- Entdeckung heterozygote/mischerbige Mutation bei ATP6V1H Gen
- Osteoporose (reduzierte Knochendichte)



Studie bei Zebrafisch:

- CRISPR Methode und Null-Mutation ATP6V1H Gen
- Osteoporose in embryonaler Phase bei homozygoten Mutanten und heterozygoten Mutanten erst bei Erwachsenen
- Gleiches Ergebnis wie bei human Patienten



SCHLUSSFOLGERUNG

- Neueste Fortschritte bei DNA Sequenzierung Technologie und die Vorstellung Genentdeckung Programmen für seltene Erkrankungen hatte es ermöglicht, eine große Anzahl von krankmachende Faktoren schnell zu bestimmen
- Wegen seltenes Auftretens von diesen Erkrankungen und wenige Anzahl von betroffenen ist ein gutes Verständnis von Krankheitsmechanismen für eine erfolgreiche Behandlung von großer Bedeutung
- Bei dieser Review wurde Zebrafisch, aufgrund besitzen ein hoch konserviertes Genom und seine Fähigkeit bei Manipulation Prozesse in großem Ausmaß, als ein optimales in-Vivo Modell für den Hinweis auf diese große Anzahl von Genen bei seltenen Erkrankungen empfohlen
- Entwicklungen bei der Zebrafisch- Modellierung parallel mit den Fortschritten im Bereich CRISPR Cas 9 Genom- Editing Technologie, könnte sich in der Zukunft für die Bestimmung Krankheitsfaktoren von seltenen Erbkrankheiten entwickeln
- Zum Schluss, könnte Zebrafisch aufgrund einer umfangreichen und hohen Durchsatzleistung für die Sichtbarmachung Phänotypen assoziiert mit vielen konservierten Organ- und Struktursystemen von Wirbeltieren und für die Überprüfung therapeutischen Substanzen, welche oft bei anderen Wirbeltiermodellen unmöglich ist, verwendet werden

The image features a blue gradient background with white circuit-like lines in the corners. These lines consist of straight paths that branch out and terminate in small circles, resembling a stylized PCB or network diagram. The lines are positioned in the top-left, top-right, bottom-left, and bottom-right corners, framing the central text.

VIELEN DANK FÜR IHRE AUFMERKSAMKEIT