



Doctoral Thesis

The zebrafish retina a genetic analysis and its evolutionary implications

Author(s):

Lesslauer, Annegret

Publication Date:

2007

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005564149> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS.ETH NO. 17468

**The Zebrafish Retina:
A Genetic Analysis and Its Evolutionary Implications**

A dissertation submitted to the
ETH Zurich

For the degree of
Doctor of Sciences

Presented by
Annegret LESSLAUER
Dipl. Natw. ETH
Born June 26, 1979
Citizen of Basel, Switzerland

Accepted on the recommendation of
Prof. M. E. Schwab, examiner
Prof. W. Berger, co-examiner
Prof. J. H. Brandstätter, co-examiner
Prof. S. C. F. Neuhauss, co-examiner

2007

Summary

This thesis presents studies of two gene families, the excitatory amino acid transporters and the claudins, and their function in the retina of zebrafish (*Danio rerio*), a small vertebrate whose retina may be considered a representative model for many aspects of human vision. In addition, the findings of an enhancer detection screen for developmentally regulated genes in zebrafish vision are reported.

The first chapters focus on glutamate homeostasis. Glutamate is the most prevalent excitatory neurotransmitter of the central nervous system. Yet it is as well a potent neurotoxin leading to excitotoxicity when present in too high concentration in the extracellular space. A family of transporter proteins, termed excitatory amino acid transporters (EAAT), mediates the re-uptake of glutamate into cells and thus maintains the glutamate homeostasis of the CNS. As a consequence, EAAT modulate the excitability of neurons in various ways.

I found in my studies that the EAAT gene family is much larger in zebrafish than in mammals. The expansion of this gene family in zebrafish may be explained at least in part by one further genome duplication as compared to mammals that presumably occurred about 350 million years ago in the evolution of ray-finned fish. Expression patterns, revealed by RNA *in situ* hybridization, showed that zebrafish EAAT genes are specific to the nervous system, but some of the genes appear to be expressed in different parts of the nervous system than their mammalian orthologs. Such shifts of the pattern of expression may be indicative for an evolutionary diversification of gene function.

EAAT5 is found exclusively in the retina and has been shown to influence and modulate the activity of different retinal synapses. I extended these studies to zebrafish and showed in immunocytological analyses that two EAAT5 orthologs, zfEAAT-5a and -5b, are expressed in the outer retina of zebrafish. A loss of function study indicated that deficiency of either of these proteins leads to a reduction of the retinal response to light.

The second part focuses on *claudins*, genes encoding tight junction proteins which are thought to play a central role in defining the selective permeability barrier of epithelia. Mutations of *claudin 19* in man lead to a severe dysfunction of the kidney, familial hypomagnesemia with

hypercalciuria and nephrocalcinosis, with associated visual impairment. I identified the single zebrafish ortholog of *claudin 19* on chromosome 11, isolated its cDNA and localized its expression in the eye to the retinal pigment epithelium, using immunohistochemistry. Knock-down of Claudin 19 led to a reduction of the physiological response of the retina to light, of visual performance as assessed in behavioural tests, as well as to ventral axis curvature in zebrafish larvae, a phenotype typically seen in zebrafish kidney disorders.

Finally, I participated in an enhancer detection screen in a collaborative study with the Sars Center Bergen, where I isolated and described 65 transgenic zebrafish lines expressing the fluorescent reporter up to day 4 of the larval development. The pattern of fluorescence in these fish represents the tissue-specificity of the trapped enhancers.

Résumé

Cette thèse présente des recherches sur deux groupes de gènes jouant un rôle dans la biologie rétinienne du poisson zèbre (*Danio rerio*). La rétine de ce petit vertébré peut être considérée comme un modèle représentatif de différents aspects du système visuel humain. Cette thèse contient, de plus, les résultats d'un crible *enhancer-trap* visant à identifier de nouveaux gènes impliqués dans le développement et le fonctionnement du système visuel du poisson zèbre.

La première partie de mon travail traite de l'homéostasie du glutamate. Les neurones libèrent du glutamate afin de transmettre des signaux chimiques à d'autres neurones. Le glutamate est le neurotransmetteur excitateur le plus courant du système nerveux central, mais il est également une neurotoxine puissante, et lorsqu'il est présent en trop grande concentration dans l'espace extracellulaire, provoque de l'excitotoxicité. Un groupe de protéines transporteuses, les transporteurs d'acides aminés excitateur (*excitatory amino acid transporters*, EAAT), gère la réabsorption du glutamate par les cellules et contrôle ainsi l'homéostasie du neurotransmetteur dans le système nerveux central. Ce faisant les EAAT modifient de différentes manières l'excitabilité des neurones.

J'ai pu montrer que le groupe des gènes EAAT est beaucoup plus grand chez le poisson zèbre que chez les mammifères. L'importance de ce groupe chez le poisson zèbre peut s'expliquer, au moins en partie, par une duplication du génome qui a vraisemblablement eu lieu il y a 350 millions d'années au cours de l'évolution des poissons à nageoires rayonnées (*Actinopterygii*) et qui est supplémentaire à celles des mammifères. L'étude du profil d'expression de ces gènes par hybridation *in situ*, révèle que les gènes EAAT du poisson zèbre sont exprimés spécifiquement dans le système nerveux. Cependant, l'expression de certains de ces gènes diffère de celles de leurs orthologues chez les mammifères. De tels changements dans le mode d'expression de ces gènes peuvent indiquer une diversification évolutive de leurs fonctions.

La protéine EAAT5 est exclusivement retrouvée dans la rétine et il a été démontré qu'elle influence de différentes manières l'activité de certaines synapses rétinienne. J'ai poursuivi ces recherches en étudiant deux des orthologues du gène EAAT5 chez le poisson zèbre. Par des analyses immunocytologiques, j'ai montré que les gènes zfEAAT-5a et zfEAAT-5b sont exprimés dans les couches extérieures de la rétine. De plus, j'ai pu montrer que l'inactivation

expérimentale de l'un ou l'autre de ces gènes réduit la réponse physiologique aux signaux lumineux.

La deuxième partie de ma thèse porte sur les claudins: des gènes codant des protéines de jonctions serrées qui, dans les épithéliums, jouent vraisemblablement un rôle important au niveau des barrières à perméabilité sélective. Chez l'homme, des mutations du gène *claudin 19* causent une grave dysfonction rénale, appelée hypomagnésémie familiale avec hypercalciurie et néphrocalcinose (*familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis*, FHHNC), une maladie associée à d'importants troubles oculaires. J'ai identifié l'orthologue du gène *claudin 19* chez le poisson zèbre, cloné son ADNc et localisé par immunohistochimie son expression oculaire dans la couche pigmentaire de la rétine. L'inactivation expérimentale de cet orthologue réduit la réponse physiologique de la rétine aux signaux lumineux et diminue la performance visuelle telle qu'évaluée par des tests comportementaux. Elle provoque également une courbure axiale des larves du poisson zèbre, un phénotype morphologique typiquement provoqué par des troubles rénaux.

Par ailleurs, ce travail présente une étude effectuée en collaboration scientifique avec le Sars Center Bergen, un crible basé sur la détection d'éléments régulateurs (*enhancer detection screen*). J'ai isolé et décrit 65 lignées de poissons transgéniques exprimant la protéine rapporteuse fluorescente jusqu'à l'âge de quatre jours après la fécondation. L'apparition de la fluorescence chez les poissons transgéniques permet d'identifier les tissus spécifiques auxquels sont liés ces éléments régulateurs.