

Abschlussbericht für meinen 1-jährigen Forschungsaufenthalt an der ShanghaiTech  
University in der Volksrepublik China 2017/18 – Pascal Basdorf

## Einleitung

Im Oktober 2016 bewarb ich mich bei der Roland-Ernst-Stiftung für Gesundheitswesen für die Finanzierung meines 1-jährigen Forschungsaufenthaltes an der ShanghaiTech University in der Volksrepublik China zur Anfertigung meiner Promotion. Ich habe bereits zu diesem Zeitpunkt zusammen mit meinem Betreuer Prof. Dr. Christopher Antos einen umfangreichen Plan meiner Experimente erarbeitet und begann dazu bereits am Insitut für Pharmakologie und Toxikologie meine Einarbeitung in das Projekt unter Jule Janßen. Dabei erfuhr ich zahlreiche Unterstützung auch durch die Imaging Facility des Biotec und die Zebrafish Facility des CRTD. Im Mai 2017 flog ich dann zur weiteren Forschung nach Shanghai. Shanghai als größte und wichtigste Industriestadt der Volksrepublik liegt zentral an der Ostküste und gehört mit über 23 Millionen Einwohnern zu den größten Städten der Welt. Die Universität wurde 2013 mit dem Ziel gegründet eine erstklassige Universität im internationalen Forschungsumfeld zu werden. Dabei liegt sie in Pudong im Zhangjiang High-Tech Park, eingebettet zwischen Life-Science Unternehmen und anderen Forschungseinrichtungen. Ich wohnte während meiner Zeit in den Internationalen Studentenwohnheimen auf dem Campus, zeitweise zusammen mit einem US-amerikanischen Studenten.

## Universitätsleben

Ich arbeitete in dieser Zeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Antos und erhielt zum ersten Orientieren viel Hilfe unserer Lab Assistentin Yan Xin, sowie die hilfreichen Bemühungen der phd-candidates. Ich besuchte bereits zwei chinesisch-Grundkurse in Deutschland und es bot sich zusätzlich die Möglichkeit des Besuchs eines Chinesisch-Sprachkurses für die internationalen Dozenten und Studenten wie mich. Im Rahmen des Summerschool Austausches mit der Yale University und University

of Chicago wurden kleinere Ausflüge in bspw. den Huangshan Nationalpark mit den anderen internationalen Studenten organisiert. Wöchentliche Lectures von renommierten Wissenschaftlern aus aller Welt waren sehr bereichernd um mein eigenes wissenschaftliches Verständnis zu erweitern. Die Kommunikation im Labor funktionierte im Englischen und regelmäßige Labmeetings, zur Vorstellung von eigenen Fortschritten der Arbeit und dem Erfahren von Inhalten der anderen Studenten war eine wichtige Erfahrung. Die Arbeit war sehr fordernd für mich, und bot viele Möglichkeiten um über sich selbst hinauszuwachsen und mit flexiblem Denken, Lösungen finden zu können.

Im Rahmen der FoGG2017 Konferenz wurde es mir zuteil meine Arbeit einem breiteren Publikum vorzustellen und wurde dafür mit einem Flash Talk Award ausgezeichnet.

Anbei fand ich Anschluss in dem Basketballteam der Universität um auch neben meiner Arbeit im Labor einen guten Ausgleich und Kontakte zu lokalen Studierenden zu finden.

### Forschungsprojekt

Mein Zahnmedizinstudium ermöglicht es, bereits während des Studiums eine wissenschaftliche Arbeit anfertigen zu können, auch wenn eine Freistellung für den Zeitraum fakultativ und nicht auf die Regelstudienzeit anrechenbar ist. Mein großes Interesse an der tieferen Auseinandersetzung mit einem spezifischen Thema im Bereich der regenerativen Medizin brachte mich dazu mich umzusehen. Eine Vorstellung bei Prof. Antos weckte mein reges Interesse zusätzlich in einer völlig neuen Arbeitsumgebung zu forschen. Deswegen beschloss ich mit Unterstützung der Roland-Ernst-Stiftung eine 1-jährige Beurlaubung an der TU Dresden für den Forschungsaufenthalt in Shanghai. Ich beschäftigte mich mit Segmentationsvorgängen in der Gliedmaßenregeneration des Zebrafisches sowie mit Verteilungsmustern von cAMP und cGMP in Kardiomyozyten sowie Methodenentwicklung des 3-dimensionalen Erfassens von Molekülbewegungen während verschiedener physiologischer und pathophysiologischer Vorgänge in

Herzmuskelzellen. Dazu nutzte ich Methoden der Fluoreszenzmikroskopie und Realtime-PCR. Dabei betreute ich zusätzlich eine Bachelorarbeit und eine Summerschool Studentin der UC um Methodenwissen, was ich bereits erworben hab, zu vermitteln.

#### Freizeit

Meine Freizeit nutzte ich um meine chinesisch Kenntnisse zu verbessern und bekam durch meine Arbeitskollegen und befreundete Labore schnell Zugang. Ich konnte dabei mein Verstehen der chinesischen Kultur, der herrschenden Ängste und Hoffnungen verbessern. In die tiefen Verzweigungen und Eigenarten eindringen und mich so sehr in diese Kultur begeben, dass ich sie erfahren konnte, wie es nur im Rahmen eines solchen intensiven Austausches möglich ist.

Darüber hinaus erhielt ich auch durch die Mitarbeit im Makerspace XinCheJian, dem ersten Makerspace in China überhaupt, viel Kontakt zu Menschen, die durch kreative Problemlösung neue Dinge erschaffen, die nachhaltig veränderend auf unsere Gesellschaft wirken. Solche reaktionären Gruppen in der Volksrepublik China bei ihrer Arbeit zu beobachten, weitete noch einmal meine eigenen Eindrücke über dieses faszinierende Land mit unglaublichen Potenzial.

#### Fazit

Ich habe mich in diesem Jahr persönlich sehr weiterentwickelt, bin an meine Grenzen gekommen, habe eine Kultur erlebt, die uns in Zukunft sehr viel beschäftigen wird, und wo es besonders in Hinblick auf wissenschaftlichen, aber auch regulären Austausch wichtig ist, sein Gegenüber zu verstehen und eingehen zu können. Dieses eine Jahr war eine gute Zeitspanne um tief in die Welt der wissenschaftlichen Arbeit einzutauchen und Daten zu erheben. Ohne die Unterstützung der Roland-Ernst-Stiftung wäre mir diese Chance, die mein berufliches und privates Leben sehr bereichert, nicht möglich gewesen. Dafür bin ich sehr dankbar.



# Which second messengers segment bone?

Pascal Basdorf<sup>1,2</sup>, Rene Bernitz, Satu Kujawski<sup>3</sup>, Christopher L. Antos<sup>1,2</sup>

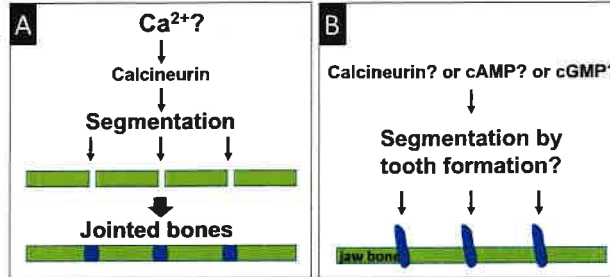
<sup>1</sup> Department of Pharmacology and Toxicology, Technical University of Dresden, Dresden, Germany  
<sup>2</sup> School of Lifesciences and Technology, ShanghaiTech University, Shanghai, China  
<sup>3</sup> Max-Planck Institute for Molecular Cell Biology and Genetics, Dresden, Germany



## Background

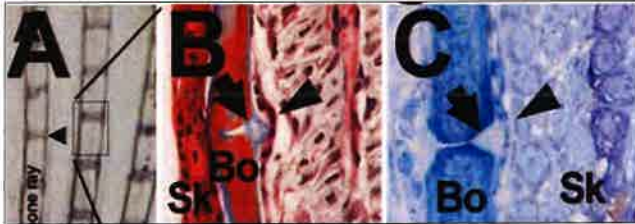
During embryonic development, tissue-tissue interactions and localized gene expression regulate the formation of tissue boundaries and tissue segmentation. These patterning processes are also involved in regeneration, but the mechanisms behind these processes are poorly understood. We discovered that calcineurin inhibition leads to the loss of joint formation in the zebrafish fin, indicating that calcineurin is required for this bone segmentation process.  $Ca^{2+}$  regulates calcineurin, so we hypothesize that changes in intracellular  $Ca^{2+}$  levels are responsible for segmentation of the bones. Similarly, we hypothesize that tooth formation is another segmentation process of the developing jaw.

## What determines segmentation?



**Figure 1: Calcineurin regulates bone segmentation. Does it regulate the segmentation process that established tooth placement?** A. We found out that Calcineurin inhibition leads to the lack of joint formation. Our next question is what is regulating Calcineurin during the segmentation process of zebrafish fin bones. B. Is tooth formation also regulated as the segmentation process by  $Ca^{2+}$ /Calcineurin or another signaling mechanism?

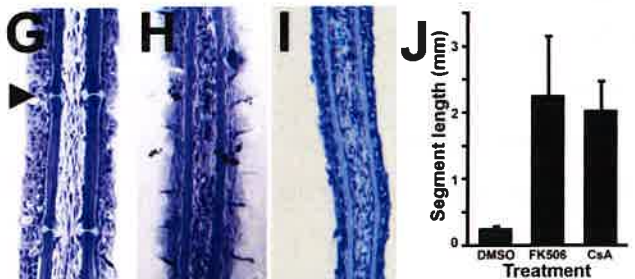
## Calcineurin is required for joint formation (bone segmentation in the fin)



**Figure 2: Control joint formation**  
 A. shows the fin bones segmented by synovial joints. B and C are magnifications of A showing the interarticular space and synovial joints. (Bo) bone, (Sk) Skin.

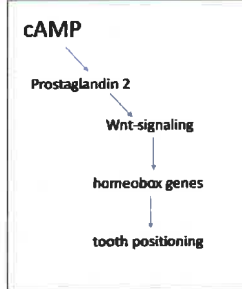


**Figure 3: Control joint formation.** D shows the normal segmentation process in the zebrafish ray (black bars). E and F indicate after inhibit calcineurin at the beginning of the black arrow, segmentation is lost.

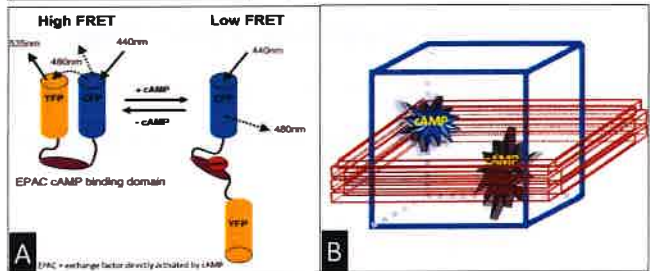


**Figure 4: joint formation loss in a magnification**  
 G. is showing a magnification of a segmented zebrafish fin-ray. H is showing the ray with calcineurin inhibition and the loss of joint formation. In the diagram we are showing how the segment length is changing under Calcineurin inhibition. DMSO as a control.

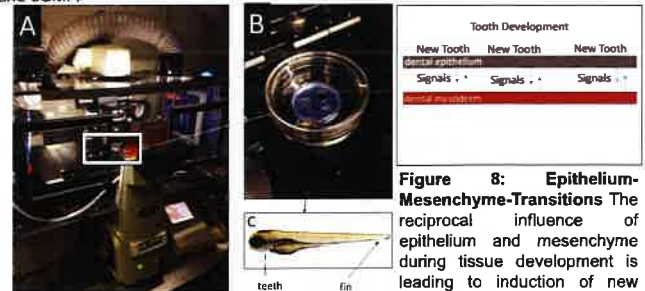
## Measuring cAMP/cGMP localization in epithelium and mesenchyme



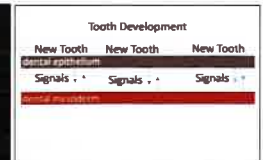
**Figure 5: Does cAMP influence teeth positioning**  
 Teeth formation is caused by epithelium-mesenchyme-transitions, and it is known that homeobox genes are involved in teeth patterning processes mainly controlled by Wnt signaling, but little known about what establishes the segmented pattern. In addition, the wnt signaling pathway is also regulated by the second messenger cAMP through prostaglandin E2 (PGE2). Defining the subcellular cAMP distribution will be important concerning the variety of different outcomes of cAMP-signaling has in the cell. We want to know how distribution pattern in the cells are changes during tooth initiation.



**Figure 6: Sensor function and Z-stack imaging to perform 3D imaging**  
 A. is showing the function of the Förster-Resonance-Energy-Transfer (FRET)-sensors that we are using to detect subcellular localization of cAMP and cGMP. B. We are imaging single planes of the teeth-tissue and reconstruct the data into a 3D model as demonstrated in B to detect subcellular distribution of the second messenger cAMP and cGMP.



**Figure 7: The mounting of the zebrafish embryo and imaging of the zebrafish fin and teeth.** A: The inverse laser scanning confocal microscope that we are using for the imaging. B: The dental mesenchyme with the sonic hedgehog a (*ssha*) promoter and the dental epithelium with the *prx1a* promoter. C: The dechlorinated zebrafish at 48 hour post fertilization (hpf).



**Figure 8: Epithelium-Mesenchyme-Transitions**  
 The reciprocal influence of epithelium and mesenchyme during tissue development is leading to induction of new formation like teeth. Therefore we are addressing cAMP sensors do the dental epithelium with the sonic hedgehog a (*ssha*) promoter and the dental mesenchyme with the *prx1a* promoter.



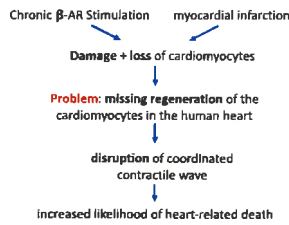
# In vivo changed second messenger signaling in ongoing regeneration and effects on proliferation

Pascal Basdorf<sup>1,2</sup>, Julia Janßen<sup>1</sup>, Christopher L. Antos<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Pharmacology and Toxicology, Technical University of Dresden, Dresden, Germany  
<sup>2</sup> School of Lifesciences and Technology, ShanghaiTech University, Shanghai, China



## Background Imaging and Mounting Technique for 3D-Imaging



**Solution:** Using the ability of the zebrafish to regenerate his heart tissue to understand more about the second messenger distribution mechanisms behind regeneration.

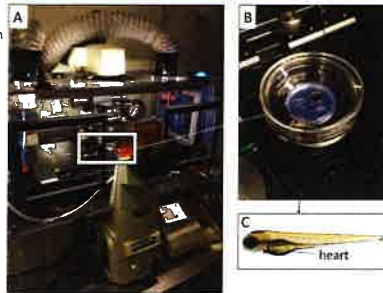


Figure 1: The mounting of the zebrafish embryo and imaging of the zebrafish heart. A: The inverse laser scanning confocal microscope that we are using for the imaging. B: Is showing the mold for mounting the zebrafish. I'm using a petri-dish made for live-cell imaging with glass coverslip and an agarose mold to fix the zebrafish larvae. C: The dechorionated zebrafish at 48 hour post fertilization (hpf).

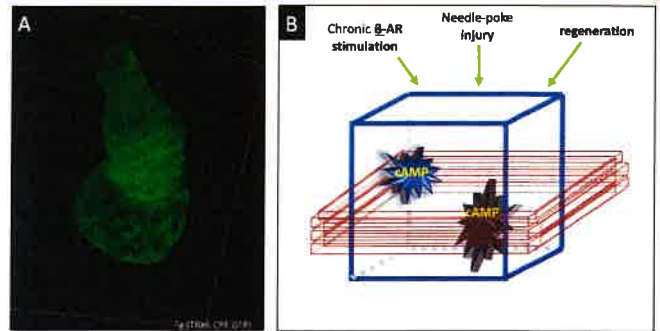


Figure 2: Z-stack imaging to perform 3D imaging. A: We are imaging single planes of the heart and reconstruct the data into a 3D model (shown in A) as demonstrated in B to detect subcellular distribution of the second messenger cAMP and cGMP. B: We will induce different physiological states as chronic beta-AR-signaling, injury and regeneration and detect changed patterning of cAMP and cGMP.

## cAMP/cGMP subcellular distribution in live zebrafish-cardiomyocytes in 2D

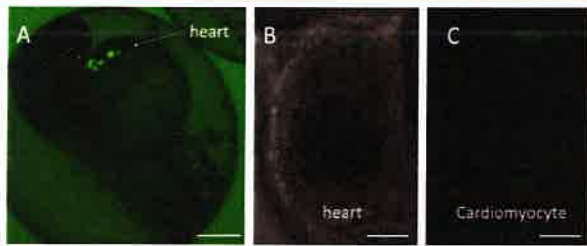


Figure 3: Expression of the cG500 cGMP sensor. A: a 48 hpf embryo before dechorionation with several clearly expressing cardiomyocytes. The same cardiomyocytes imaged with a confocal microscope (B+C) revealed only diffused expression. Scale bar: 100 um

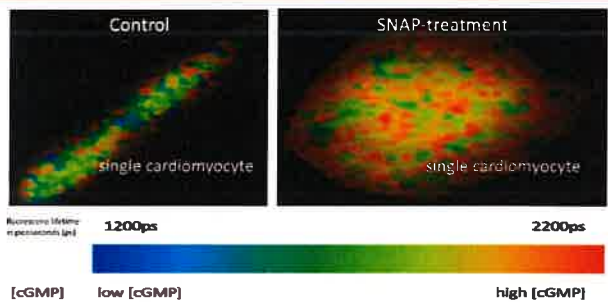


Figure 4: The influence of forskolin/SNAP on the fluorescent lifetime. TI Graphs show the lifetimes of individual cells expressing the EPAC1-camps/cG500 sensor under different conditions (control EPAC1-camps: n=7 from 4 fish, 750 μM forskolin EPAC1-camps: n=4 from 3 fish/control cG500 fish n=26 from 5 fish, 750 μM SNAP cG500 n=29 from 4 fish) Columns show the mean with SEM. Gaussian distribution was checked with the Shapiro-Wilk normality test. The one-way ANOVA, Newman-Keuls multiple comparisons test was used for evaluating the significance of the means of the samples. The significance is indicated in the following: \*\*\*: p < 0.001) Treatment with 750 μM forskolin/SNAP showed a significant increase in the lifetime.

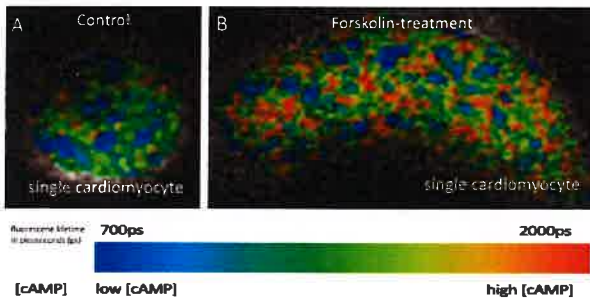


Figure 5: EPAC1-camps expressing cells in different conditions. A: control cardiomyocytes, blue: area of low cAMP, orange/red: area of high cAMP. B: cardiomyocytes of fish that had forskolin treatment. Every cell shows not equally distributed cAMP.

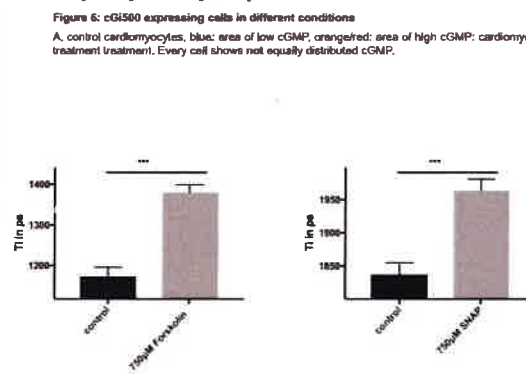


Figure 6: cG500 expressing cells in different conditions. A: control cardiomyocytes, blue: area of low cGMP, orange/red: area of high cGMP: cardiomyocytes of fish that had SNAP-treatment treatment. Every cell shows not equally distributed cGMP.

## Next steps

To get to know more about the distribution of the second messenger cAMP and cGMP we have to look at the distribution changes during different physiological states at specific compartments within the cell. Figure 7 shows the localization of the EPAC-FRET (cAMP detecting) sensor nucleus specific in HEK-293 cells and is ready to use in zebrafish heart.

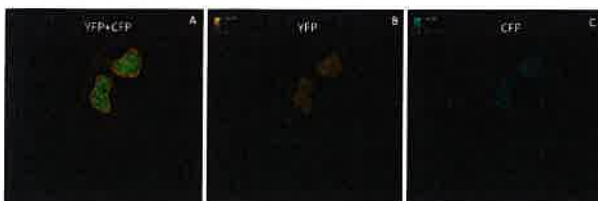


Figure 7: Expression of the EPAC-FRET sensor in the nucleus of HEK-293 cells. A: Two HEK-293 cells are clearly expressing the EPAC-FRET sensor located in the nucleus. The red line is highlighting the plasma membrane, the yellow line the nuclear membrane. The same HEK-293-cells in B. and C. reveal the possibility to distinguish between the fluorophores CFP and YFP to enable FRET. The expression of the sensor highlights the shape of the nucleus as one subcellular department of the cell.

## Outlook

- We already have evidence that zebrafish have mechanisms that compartmentalize cAMP/cGMP, and that compartmentalization is retained even under extreme cAMP or cGMP increasing drug treatment.
- To allow more accurate evidence of cAMP/cGMP compartmentalization we are validating our data by 3D imaging live cardiomyocytes *in vivo* to provide a new tool to answer the following open questions in the field:
  - Are there unknown mechanisms leading to cAMP and cGMP compartmentalization?
  - What changes in cAMP or cGMP compartmentalization lead to the pathological phenotypes of cardiac disease?
  - Can increased cAMP in cardiac disease be reduced by cGMP?
  - What roles do cAMP and cGMP concentrations and subcellular accumulations have in regeneration?
  - How do cAMP and cGMP interact in different subcellular locations?
- It is important to note that using the zebrafish as a model combined with FLIM techniques, *in vivo*, real-time investigations can be done. This method then allows the investigation of cAMP and cGMP changes in association with cardiac disease and heart failure. Furthermore, the zebrafish's ability to regenerate heart tissue opens new research capabilities in the roles of cAMP and cGMP and Ca<sup>2+</sup> in heart regeneration.

