

**Untersuchungen zur Funktion der
CP β Untereinheit im Zebrabärbling (*Danio rerio*)**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Marco Bitzer

aus Köln

Köln 2014

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Matthias Hammerschmidt
(Gutachter) Prof. Dr. med. Gabriele Pfitzer

Tag der mündlichen Prüfung: 09. Oktober 2014

für Sophie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	II
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung	2
1.1 Stand der Forschung des Zebrafisch Modells	2
1.2 Die axiale Skelettmuskelentwicklung im Zebrafisch Modellsystem	4
1.2.1 Myofibrillogenese im Zebrafisch	5
1.3 Morpholino Technologie	7
1.4 Capping Protein (CP)	10
1.5 Zielsetzung	13
2 Material und Methoden	14
2.1 Zebrafisch Methoden	14
2.1.1 Beschreibung und Herkunft des Zebrafisch	14
2.1.2 Haltung des Zebrafisch	14
2.1.3 Gewinnung von Zebrafisch Embryonen	15
2.1.4 Injektionen von mRNA und Morpholinos	15
2.1.4.1 Herstellung der Kapillaren	15
2.1.4.2 Vorbereitung der Injektionslösungen	15
2.1.4.3 Injektionen in Zebrafisch Embryonen	16
2.1.5 Mechanische Dechorionisierung der Embryonen	16
2.1.6 Analyse von makroskopischen morphologischen Effekten	16
2.2 Molekularbiologische Methoden	17
2.2.1 RNA Isolation	17
2.2.2 cDNA-Synthese	17
2.2.3 Phenol/Chloroform-Extraktion	18
2.2.4 Fällung von DNA	19

2.2.5	Fällung von RNS	19
2.2.6	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	20
2.2.7	Reaktionsprofile für PCR	21
2.2.8	Agarosegelelektrophorese.....	21
2.2.9	Aufreinigung von PCR-Produkten aus Agarosegelen	22
2.2.10	Blunt-End Klonierung.....	22
2.2.11	Transformation von chemisch kompetenten Zellen.....	23
2.2.12	Aufreinigung von Plasmid-DNS	23
2.2.13	Spezielle RNS Methode	24
2.2.13.1	Herstellung von m-RNS durch in vitro Transkription	24
2.3	Proteinbiochemische Methoden.....	25
2.3.1	Probenaufarbeitung für SDS-Page	25
2.3.2	Mikro – Bradford zur Proteinmengenbestimmung	26
2.3.3	Gießen der Sammel- und Trenngele	26
2.3.4	Eindimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	27
2.3.5	Western Blot und Immunodetektion durch Chemoluminiszenz	28
2.3.6	Western Blot und Immunodetektion multipler Antigene mittels Odyssey System	29
2.3.7	Färbung von Proteinen in PA-Gelen	29
2.4	Histologische Methoden	30
2.4.1	<i>Whole mount</i> Immunfluoreszenzfärbungen	30
2.4.2	Konfokale Mikroskopie	30
2.4.3	Vorbereitung von Zebrafisch Embryonen für die Transmissionselektronenmikroskopie 31	
2.5	Biomechanische Methode	32
2.5.1	Isometrische Kraftmessung an intakten Zebrafisch Embryonen	32
2.6	Erklärung zu verwendeten Chemikalien und Enzymen	33
2.7	Stammlösungen	33
2.8	Molekulargewichtsmarker.....	35
2.9	Vektoren.....	35

2.10	Antikörper.....	35
2.11	Oligonukleotide.....	36
2.12	Kits	36
2.13	Geräte	37
2.14	Plastikwaren	39
2.15	Glaswaren	40
2.16	Transformation	40
2.17	Bakterienstamm	40
2.18	Zebrabärblingstamm.....	40
2.19	Software und Internetbasierende Dienste.....	40
2.20	Externe Unternehmen	41
3	Ergebnisse	42
3.1	Funktionelle Analyse von CP β im Zebrabärbling	42
3.1.1	Bioinformatische Analyse und Klonierung der CP β Spleißvarianten im Zebrabärbling....	42
3.1.2	Expression der CP β Isoformen im Zebrabärbling	46
3.1.3	Morphologische Analyse des CP β <i>knockdown</i> im Zebrabärbling.....	50
3.1.4	Koinjektion von p53-MO und E3I3-MO als CP β -Morphanten Phänotypen Spezifitätstest	56
3.1.5	RT-PCR Analyse des Start-MO und E3I3-MO CP β 1 <i>knockdown</i> im Zebrabärbling	57
3.1.6	Western-Blot Analyse des CP β <i>knockdown</i> im Zebrabärbling	60
3.1.7	Immunfluoreszenzaufnahmen der Rumpf und Schwanzregion von E3I3-MO und Start-MO Morphanten und Kontrollen	62
3.1.8	Transmissionselektronenmikroskopie der Rumpf und Schwanzregion von CP β Morphanten und WT-Zebrabärblingen	70
3.1.9	Rettungsexperiment des CP β <i>knockdown</i> durch CP β 2-mRNS Injektion.....	76
3.1.10	Kraftmessung an intakten CP β Morphanten und Kontrollen	80
4	Diskussion	84
4.1	Der CP β <i>knockdown</i> im Zebrabärbling ist spezifisch	84
4.2	Zebrabärbling CP β zeigt viele Ähnlichkeiten zu CP β in anderen Vertebraten	87
4.2.1	Räumlich-zeitliche Expression von CP β 1 im Zebrabärbling.....	89

4.3	CP β <i>knockdown</i> im Zebraabärbling führt zu Entwicklungsverzögerung und verzögerter Myofibrillogenese	94
4.3.1	Makroskopische Morphologie der CP β Morphanten	94
4.3.2	Körperachsenwachstum und Myofibrillogenese in CP β Morphanten	95
4.3.3	Ultrastrukturelle Untersuchungen der Start-MO Morphanten und Kontrollen	98
4.4	Z-Scheiben assoziierte Proteine sind in CP β Morphanten in ihrer Expression verändert	99
5	Zusammenfassung	104
6	Abstract	105
7	Literaturverzeichnis	106
8	Erklärung zur Mitwirkung von Kollaboratoren	116
9	Danksagung	117
10	Erklärung	118
	Anhang	119

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Codesonne	XI
Abbildung 2: Prä-Myofibrillen Modell der Myofibrillogenese	6
Abbildung 3: Morpholino – modifizierte – Oligonukleotide und Mechanismen des Gen <i>knockdowns</i>	9
Abbildung 4: Struktur vom Hühner $\alpha 1/\beta 1$ Heterodimer CP und Aktinbindedomänen von CP	11
Abbildung 5: Schematische Darstellung der elektrophoretischen Übertragung im Tank-Blot.	28
Abbildung 6: Schemazeichnung des Strahlengangs in einem Laser Scanning konfokalen Mikroskop.	31
Abbildung 7: Aminosäuresequenzvergleich von Zebrafärbling (<i>Danio rerio</i>), Huhn (<i>Gallus gallus</i>) und Maus (<i>Mus musculus</i>) CP $\beta 1$ und CP $\beta 2$	43
Abbildung 8: Primerstrategie, RT-PCR Ergebnis und CP $\beta 1$ und CP $\beta 2$ Zebrafärbling Nukleotidsequenz	46
Abbildung 9: <i>Whole mount</i> Immunhistochemische Analyse der räumlichen Expression von α -Actinin und CP $\beta 1$ in 24 SnB WT Zebrafärbling Myofibrillen	47
Abbildung 10: <i>Whole mount</i> Immunhistochemische Analyse der räumlichen Expression von CP $\beta 1$ in 48 SnB WT Zebrafärbling Embryonen	47
Abbildung 11: <i>Whole mount</i> Immunhistochemische Analyse der räumlichen Expression von CP $\beta 1$ in 72 SnB WT Zebrafärbling Embryonen	48
Abbildung 12: Western Blot Analyse der CP β Expression in 48 SnB und 72 SnB WT Zebrafärblingen	49
Abbildung 13: Relative Überlebensrate der CP β Morphanten und Kontrollen innerhalb 72 SnB	50
Abbildung 14: Analyse der Morphologie des <i>knockdown</i> Phänotypen von CP β Morphanten und Kontrollen	53
Abbildung 15: Gesamt- und Somitenlänge von WT Zebrafärblingen, Kontroll-Morphanten und CP β Morphanten	54
Abbildung 16: Relative Phänotypenverteilung 72 SnB bei vier verschiedenen Morphanten	56
Abbildung 17: Relative Überlebensrate von E3I3-MO+p53-MO, E3I3-MO, Kontroll-MO+p53-MO innerhalb 72 SnB und relative Phänotypenverteilung 72 SnB	57
Abbildung 18: Primerstrategie und RT-PCR Ergebnis von CP β Morphanten und Kontrollen	58
Abbildung 19: E3I3-MO Morphanten CP β RNS Übersicht und abgeleitete Aminosäuresequenz des E3I3-MO Morphanten CP β und WT CP β im Vergleich.....	59
Abbildung 20: Start-MO Morphanten CP β RNS Übersicht und abgeleitete Aminosäuresequenz des Start-MO Morphanten CP $\beta 1$ und WT CP $\beta 1$ im Vergleich.....	60
Abbildung 21: Western Blot Analyse des CP β <i>knockdowns</i> in drei Morphanten Ansätzen.....	61

Abbildung 22: Indirekte Immunfluoreszenz von Rumpf und Schwanzregionen von E313-MO Morphanten und Kontroll-Morphanten	63
Abbildung 23: Indirekte Immunfluoreszenz der E313-MO Morphanten und Kontroll-Morphanten Schwanzregion	65
Abbildung 24: Immunfluoreszenzaufnahmen von Schwanzregionen des Start-MO Morphanten und Kontroll-Morphanten	67
Abbildung 25: Immunfluoreszenzaufnahmen von Schwanzregionen des Start-MO Morphanten und Kontroll-Morphanten	70
Abbildung 26: TEM Charakterisierung der subzellulären CP β <i>knockdown</i> Phänotypen im Start-MO Morphanten und unbehandelten WT Kontrollen.....	71
Abbildung 27: TEM Charakterisierung des subzellulären prä-Myofibrillen Phänotyps in CP β Morphanten und unbehandelten WT Kontrollen.....	72
Abbildung 28: TEM Charakterisierung der subzellulären CP β knockdown Phänotypen im Start-MO Morphanten und unbehandelten WT Kontrollen.....	73
Abbildung 29: TEM Charakterisierung des subzellulären Sarkomer- Phänotypen in Start-MO Morphanten und unbehandelten WT Kontrollen.....	74
Abbildung 30: Myofibrillendurchmesser des Start-MO Morphanten und WT Kontrollen.	75
Abbildung 31: Relative Phänotypenverteilung 72 SnB und relative Überlebensrate innerhalb 72SnB von 5'UTR-MO Morphanten, 5'UTR-MO CP β 2mRNS Morphanten und Kontrollen.	77
Abbildung 32: Western Blot Analyse des CP β 2 Rettungsexperimentes	78
Abbildung 33: Immunfluoreszenzaufnahmen kaudaler Myotome des 5'UTR-MO CP β 2-mRNS Morphanten und des 5'UTR-MO Morphanten.....	79
Abbildung 34: Krafttransientendarstellung und Maximalkräfte von intakten CP β Morphanten und Kontrollen.	81
Abbildung 35: Vergleich der absoluten (A) und normierten Kräfte (B) in CP β Morphanten und Kontrollen (A)	82
Abbildung 36 Verlauf der MTJ Entwicklung zu drei Zeitpunkten im Zebrafisch	92
Abbildung 37: Schematische Darstellung der hoch- und herunterregulierten Gene im CP β Morphanten und Ihre Lokalisation im Sarkomer.....	100
Abbildung 38: Morpholinbindestellen in Zebrafisch CP β	119

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Pipettierschema für Injektionslösungen.....	15
Tabelle 2: Pipettierschema DNS Eliminierungsreaktion	18
Tabelle 3: Pipettierschema Reverse Transkription.....	18
Tabelle 4: Reaktionsbedingungen für Phusion® High-Fidelity Polymerase.....	20
Tabelle 5: Reaktionsbedingungen für GoTaq® Polymerase	20
Tabelle 6: PCR Profil für Promega GoTaq® Green Master Mix.....	21
Tabelle 7: PCR Profil für Phusion® High-Fidelity DNS Polymerase	21
Tabelle 8: Ligationsansatz für Blunt-End Klonierung.....	23
Tabelle 9: Pipettierschema der Transkriptionsreaktion.....	24
Tabelle 10: Pipettierschema Poly(A) Schwanz Generierung	25
Tabelle 12: Pipettierschema Trenngele.....	27
Tabelle 13: Pipettierschema Sammelgel.....	27
Tabelle 14: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper für Western Blot (WB) und Immunfluoreszenz (IF).....	35
Tabelle 15: Verwendete Oligonukleotide zur Generierung von PCR-Produkten zur Klonierung und Sequenzierung	36
Tabelle 16: Verwendete Morpholino-modifizierte Oligonukleotide (MO) und ihre Sequenz.	36
Tabelle 17: Gesamt- und Somitenlängenübersicht von CPβ Morphanten und Kontrollen	54
Tabelle 18: Übersicht über Myofibrillendurchmesser bei 72 SnB Start-MO Morphanten und 48 SnB WT Kontrollen	75
Tabelle 19: Längenbestimmung von Sarkomeren, dünnen und dicken Filamenten bei Start-MO Morphanten und 48 SnB WT Kontrollen.....	76
Tabelle 20: Absolutkräfte von intakten CPβ Morphanten und Kontrollen.....	82
Tabelle 21: Normierte Kräfte von intakten CPβ Morphanten und Kontrollen	83

Abkürzungsverzeichnis

Gängige Abkürzungen werden im Text dieser Arbeit bei der ersten Erwähnung erklärt und dann als solche verwendet. Im Abkürzungsverzeichnis werden lediglich die für das Verständnis dieser Arbeit zentralen Abkürzungen aufgeführt. Daher werden auch Abkürzungen von Chemikalien, Medienzusätzen etc. nur im Einzelfall aufgegriffen. Ebenso werden die neben den SI-Einheiten verwendeten Standardgrößen der Molekularbiologie (z.B. μl), sowie gängige Textabkürzungen (z.B. d.h., usw., ggf. und andere) im Abkürzungsverzeichnis nicht erläutert.

Abb	Abbildung
BLAST	engl. „ <u>B</u> asic <u>l</u> ocal <u>a</u> lignment <u>s</u> earch <u>t</u> ool“
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNS	komplementäre DNS
CP β	engl. „Capping protein“ Untereinheit β
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ECL	engl. „enhanced chemoluminescence“
ENU	Ethylnitrosoharnstoff
EZM	extrazelluläre Matrix
EST	engl. „expressed sequence tag“
F-Aktin	filamentöses Aktin
H ₂ O	Wasser
H ₂ O _{dd}	zweifach destilliertes Wasser
K _d	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
kb	Kilobasen
MO	Morpholino-modifiziertes Oligonukleotid
MTJ	engl. „myotendinous junction“
mRNS	engl. „messenger-RNA“
n	Anzahl der Experimente
ns	nicht signifikant
NC	Nitrocellulose

PA	Polyacrylamid
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PBST	phosphatgepufferte Salzlösung mit 0,1% (v/v) Tween 20
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasen-Kettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
SnB	Stunden nach Befruchtung
siRNS	engl. „small interfering RNA“
Tab	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
UTR	engl. „untranslated region“
v/v	Volumen pro Volumen (Volumenprozent)
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen (Gewichtsprozent)

Drei- und Ein-Buchstaben-Code der Aminosäuren

Alanin	Ala	A	Leucin	Leu	L
Arginin	Arg	R	Lysin	Lys	K
Asparagin	Asn	N	Methionin	Met	M
Asparaginsäure	Asp	D	Phenylalanin	Phe	F
Cystein	Cys	C	Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q	Serin	Ser	S
Glutaminsäure	Glu	E	Threonin	Thr	T
Glycin	Gly	G	Tryptophan	Trp	W
Histidin	His	H	Tyrosin	Tyr	Y
Isoleucin	Ile	I	Valin	Val	V

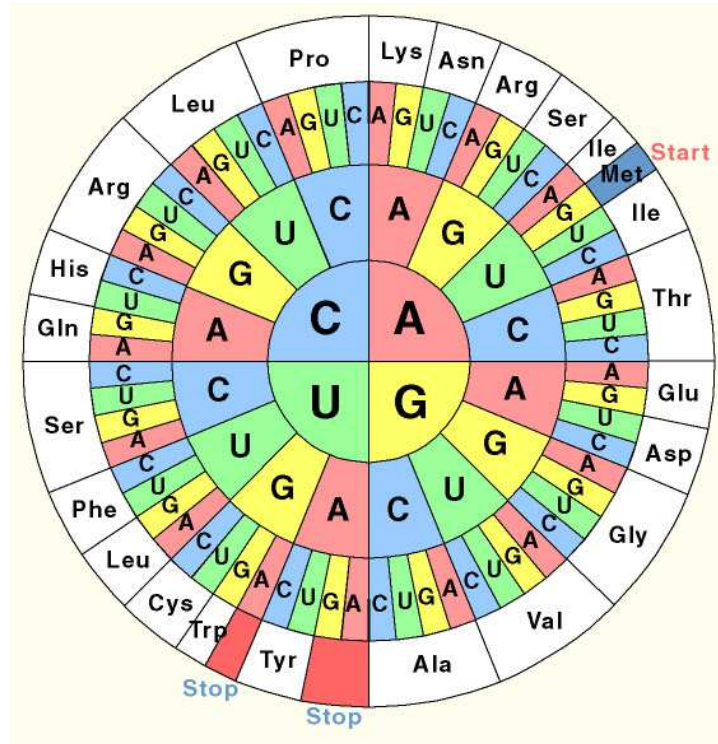


Abbildung 1: Codesonne (entnommen aus www.chemgapedia.de)

Schematische Darstellung des genetischen Codes, um Basentriplets in Aminosäuren zu übersetzen. Nukleotide innerhalb der Codesonne und in der gesamten Arbeit sind durch den Anfangsbuchstaben der Base bezeichnet (A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin, U: Uracil)

1 Einleitung

1.1 Stand der Forschung des Zebraabärbling Modells

Der Zebraabärbling (*Danio rerio* früher *Brachydanio rerio*) kam erst vor kurzem als neuer Modellorganismus für das Studium molekularer Mechanismen und der Vertebraten Biologie *in vivo* auf (Beis und Stainier, 2006; Grunwald und Eisen, 2002; Dooley und Zon, 2000). Die großen Vorteile des Zebraabärbling als Modellsystem für entwicklungsbiologische Studien sind seine optische Transparenz, die Entwicklung *ex utero*, seine kurze Generationszeit und seine hohe Fruchtbarkeit. Sämtliche Entwicklungsstadien können jederzeit mit einem einfachen Stereomikroskop bei Durchlicht beobachtet werden (Kimmel et al., 1995). Die Embryonen stehen damit für jedwede Manipulation jederzeit zur Verfügung. Die Haltung nimmt wenig Platz in Anspruch und ist äußerst kostengünstig. Die Fische sind in 12 Wochen geschlechtsreif und jedes Weibchen laicht unter idealen Bedingungen wöchentlich 200 - 400 Eier ab (Metscher et al., 1999). Der Experimentator gewinnt durch die hohe Nachkommenzahl schnell eine ausreichende Stichprobenzahl für statistische Auswertungen. Die Organogenese ist gut sichtbar und kann an einem sich entwickelnden Organismus verfolgt werden. Bereits 36 Stunden nach Fertilisation sind Vorläufer für alle Organe gebildet (Kimmel et al., 1995).

Der Körperaufbau ähnelt grundlegend dem des Menschen und enthält ein Äquivalent zu nahezu jedem menschlichen Organ, Zellen und molekularen Signalwegen, was die Untersuchung von Genfunktionen mit der Absicht auf die menschliche Entwicklung und Erkrankungen anwendbare Daten zu generieren, erlaubt. Die Anatomie und die nahe Verwandtschaft der Maus zum Menschen lässt den Säuger auf den ersten Blick wertvoller erscheinen im Rahmen von Untersuchungen von Krankheiten den Menschen betreffend. Wesentliche Unterschiede von Zebraabärbling und Säugermodell bestehen im (1) Aufbau des Herzens, welches im Fisch nur zwei Kammern und ein einfaches Zirkulationssystem aufweist; (2) in der Atmung, welche in Kiemen und nicht in der Lunge stattfindet; (3) schnelle und langsame Muskelfasern die nicht durchmischt sind, sondern räumlich voneinander getrennt sind. Diese Unterschiede scheinen einen Nachteil des Zebraabärbling gegenüber der Maus darzustellen. Schließlich kann man eine Interpretation eines Krankheitsbildes in einem Mausmodell - mit dem Menschen ähnlicher Physiologie und Anatomie - leichter vornehmen. Nichtsdestotrotz gibt es einige Faktoren die den Nutzen der Maus als Krankheitsmodell limitieren. Kongenitale Erkrankungen, die bereits im Mutterleib auftreten und durch Sekundärdefekte zu einer frühen Sterblichkeit führen können in der Maus nicht untersucht werden. Die embryologischen und genetischen Manipulationen sind verglichen mit Vertebraten Modellsystemen, wie dem der Maus, weit weniger kompliziert und zudem kostengünstiger.

Der Zebraabärbling Embryo kann zudem aufgrund seiner geringen Größe ohne ein funktionierendes kardiovaskuläres System auskommen (zusammengefasst in Stainier, 2001). Die *silent heart (sih)* Mutante überlebt etwa sieben Tage ohne Herzschlag ab Fertilisation ohne die störenden Nebeneffekte

eines sterbenden Embryos aufzuweisen (Sehnert et al., 2002). Die Tiere nehmen über Ihre Haut per Diffusion Sauerstoff aus dem sie umgebenden Medium auf. Eine weitere Stärke des Zebrafisch ist die evolutionsbiologische Nähe zum Menschen verglichen mit Invertebraten Modell Spezies wie der Taufliege (*Drosophila melanogaster*) (Barbazuk et al., 2000).

Zebrafische sind zugänglich sowohl für Vorwärts-Genetik als auch für Reverse-Genetik. In den 1990er Jahren gab es große Mutagenese Bemusterungen (Amsterdam et al., 1999; Driever et al., 1996; Haffter et al. 1996; Granato et al. 1996) im Zebrafisch bei dem tausende neue Mutantenlinien geschaffen wurden, eine wichtige Quelle um Mutationen zu identifizieren die frühe embryonale Entwicklungsstörungen und Krankheiten auslösen. Diese Mutationen wurden durch Ethylnitrososoharnstoff-Mutagenese (ENU-Mutagenese) rein zufällig in das Genom inseriert und führten zur Entdeckung von diversen Genfunktionen. Eine wesentlich schnellere und präzisere Möglichkeit bestimmte Genfunktionen zu untersuchen stellt die Morpholino-Technologie dar. Die Morpholino-Technologie bietet die Möglichkeit Modelle für entwicklungsbiologische oder medizinische Fragestellungen zu generieren (zusammengefasst in Amsterdam und Hopkins, 2006) ohne das Genom des Zebrafisches manipulieren zu müssen. Die transiente Natur und der Zeitpunkt der Zielgeninhibition durch Morpholino-modifizierte Oligonukleotide (Morpholino, kurz:MO) ist dabei ein großer Nachteil dieser Technologie. Genfunktionen die erst spät in der Embryonalentwicklung relevant sind werden durch die Morpholino-Technologie nicht erkannt. Nichtdestoweniger steht der Zebrafisch gerade am Anfang eines neuen Zeitalters der Genommanipulation.

Vor kurzem wurden Genom verändernde Nukleasen identifiziert, welche dabei helfen können spezifische Krankheitsmodelle im Zebrafisch zu etablieren. Es gibt zwei Strategien zur Genomveränderung, TALENs und CRISPR. TALENs (transcription activator-like effector nucleases) bewies bereits seine Effektivität bei der Generierung von *knockouts* (Huang et al., 2011; Sander et al., 2011) und bei *in vivo* homologer Rekombination im Zebrafisch (Bedell et al., 2012; Zu et al., 2013). CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) ist ebenso effektiv bei der Generierung von *knockouts* (Hwang et al., 2013a), homologer Rekombination (Chang et al., 2013; Hwang et al., 2013b) und chromosomaler Deletionen und Inversionen im Zebrafisch (Xiao et al., 2013). Nicht zuletzt wegen dieser neuen Werkzeuge ist der Zebrafisch in zunehmendem Maße interessant für die biomedizinische Forschung. Schnell, effizient und kostengünstig können Manipulationen am Zebrafisch Genom vorgenommen und Modelle menschlicher Krankheiten untersucht werden.

Zum Abschluss dieser Übersicht sei noch das „Zebrafish Mutation Project“ (ZMP, http://www.sanger.ac.uk/Projects/D_reio/zmp) genannt, welches es sich zur Aufgabe gemacht hat für jedes proteinkodierende Gen im Zebrafisch Genom ein *knockout* Allel zu generieren. Dieses Projekt soll innerhalb der nächsten fünf Jahre abgeschlossen sein. Die phänotypischen Charakterisierungen werden auf der „Zebrafish Model Organism Database“ (ZFIN, <http://zfin.org>) veröffentlicht. Die Mutan-

tenlinien werden über das „Zebrafish International Resource Center“ (ZIRC, <http://zebrafish.org/zirc>) verfügbar gemacht.

1.2 Die axiale Skelettmuskelentwicklung im Zebrafisch Modellsystem

In über 20.000 bekannten Fischarten ist die Struktur der lateralen Körpermuskulatur hoch ähnlich. Die segmentierte Struktur der lateralen Körpermuskulatur in adulten Fischen besteht aus Myotomen und Myosepten, die ein W-förmiges Muster bilden, wenn man es von der Seite betrachtet. Die kontrahierenden Muskelfasern sind an zwei - dass Myotom umgebende - Myosepten befestigt.

Der Zebrafisch ist ein exzellentes *in vivo* Modellsystem um die dynamischen Prozesse der Myogenese zu studieren. Als ein Vertebrat besitzt er hochkonservierte sarkomerische und zytoskelettale Proteine, welche mit höheren Vertebraten, wie dem Menschen, vergleichbar sind. Des Weiteren ist der Ablauf der Myofibrillogenese hoch ähnlich zu denen in Säugern (Sanger et al., 2009). Die Skelettmuskulatur des Zebrafisch entwickelt sich in sogenannten Myotomen, welche sich aus den mesenchymalen Zellen der sich entwickelnden Somiten formen. (zusammengefasst in Holley und Nusse, 2000). Die ersten Somiten entstehen 10 Stunden nach Befruchtung und entwickeln sich in einer Reihenfolge von anterior nach posterior bei einer Bildungsrate von einer Somite alle 20-30 Minuten bis 30-34 Somitenpaare sich gebildet haben. Die reiferen und damit auch älteren Somiten befinden sich anterior im Rumpf und die jüngeren Somiten posterior im Schwanzbereich. Bevor die Myoblastendifferenzierung einsetzt, haben sich bereits Somitengrenzen anterior und posterior einer Somite gebildet. Diese Somitengrenzen durchlaufen eine Morphogenese und reichern Extrazellulärmatrix (EZM) und Adhäsions-Komplex Komponenten an (Bassett et al., 2003, Crawford et al., 2003, Dubois et al., 2002, Henry et al., 2001, Kudo et al., 2004 und Parsons et al., 2002). Die Somitengrenzen sind nach Abschluss der Morphogenese als Myotomgrenzen (vertikale Myosepten) zu bezeichnen.

Die langsamen Skelettmuskelmyoblasten dehnen sich entlang der antero-posterioren Achse des Zebrafisch Embryos zwischen einer anterioren und einer posterioren Somitengrenze aus. Dabei beginnt die Differenzierung der Muskelzellen in anterioren Somiten und setzt sich nach posterior fort. Der räumliche Ablauf der Muskelzellendifferenzierung spiegelt den Ablauf der Somitogenese wider. Nach der Streckung beginnen die Muskelmyoblasten Myofibrillen aufzubauen. Zu diesem Zeitpunkt in der Entwicklung des Zebrafisch bildet sich das horizontale Myoseptum aus. Horizontale Myosepten kommen in allen Kiefermäuler (*Gnathostomata*) Fischen vor und unterteilen das sich differenzierende Myotom in dorsal und ventral. Sie sind strukturell ähnlich aufgebaut wie vertikale Myosepten, welche die benachbarten Myotome in allen Vertebraten voneinander trennen. Vertikale Myosepten bestehen aus Bindegewebe und bilden die Verbindung zwischen zwei aneinander angrenzenden Muskelzellen. Sie stellen das Äquivalent der Sehne im Säugersystem dar. Die den Myosepten aufgelagerten sogenannten „myotendinous junctions“ (MTJ) sind ein transmembranes Verbindungssystem bestehend aus EZM, welche

die Basalmembran umgibt. Die MTJ Struktur stellt die bindegewebige Schicht zwischen Muskel und Sehne im Säugersystem dar. MTJ transportieren die Muskelkraft auf axiale Strukturen während des Schwimmens (Gemballa und Vogel, 2002). Strukturell betrachtet besteht diese Bindegewebesicht der Myosepten aus Aktinmikrofilamenten die aus der letzten Z-Scheibe einer Myofibrille entspringen, Aktin-Bindeproteinen die die Aktinfilamente zusammen bündeln, Proteine die die Aktinfilamentbündel mit dem Sarkolemma verbinden, transmembran Proteinkomplexen welche die Zytoskelettelemente mit Komponenten der Basallamina verbinden und Proteinen die eine Verbindung der Basallamina mit der fibrillenreichen Kollagenmatrix herstellen. Ein Atlas der Entwicklung der MTJ im Zebrafisch wurde vor kurzem veröffentlicht (Charvet et al., 2011).

Die adaxial gelegenen langsamen Skelettmuskelzellen wandern nach Ihrer Streckung von Ihrer Ausgangsposition direkt benachbart zum Notochord zur Peripherie der Somite. Bei Ihrer lateralen Durchquerung des undifferenzierten mesenchymalen Gewebes stimulieren Sie die Differenzierung von mesenchymalen Gewebe zu schnellen Skelettmuskelzellen, welche sich strecken, fusionieren und vielkernige schnelle Muskelzellen bilden die den Großteil des gesamten Myotoms ausmachen (Henry und Amacher, 2004). Die differenzierten Muskelzellen werden nach dem Typ der exprimierten Isoform der schweren Kette von Myosin in langsame und schnelle Muskelzellen unterteilt.

1.2.1 Myofibrillogenese im Zebrafisch

Myofibrillen der quergestreiften Skelettmuskulatur werden durch kontraktile Einheiten, sogenannte Sarkomere aufgebaut. Dabei besteht eine Myofibrille aus vielen in Reihe geschalteten Sarkomeren. Obwohl Sarkomere der quergestreiften Skelettmuskulatur in Länge und Proteinzusammensetzung von Spezies zu Spezies variieren haben alle eine ähnliche Untereinheitenverteilung. Wir unterscheiden drei Untereinheiten des Sarkomers: dünne Filamente, dicke Filamente und Z-Scheiben. Die Myofibrille ist eine Makrostruktur in der Proteine zur Krafterzeugung und Weiterleitung interagieren. Myofibrillen sind verbunden mit Intermediärfilamenten, transversalen Tubuli, Mikrotubuli und Sarkoplasmatischem Retikulum (Goldstein und Cartwright, 1982; Gundersen et. al., 1989; Clark et al., 2002; Sanger et al., 2004). In der Zellperipherie bilden die Z-Scheiben über Proteinkomplexe, sogenannte Costamere, eine Verbindung zum Zytoskelett unterhalb des Sarkolemma aus (Danowski et. al., 1992; zusammengefasst in Ervasti, 2003). Die Z-Scheibe fungiert als Ankerpunkt für die dünnen- und Titinfilamente der benachbarten Sarkomere. Die multifunktionale Natur der Z-Scheibe spiegelt sich in der Vielzahl der Proteine wider, die sich in dieser Struktur finden lassen. Signal-Moleküle, Enzyme, zytoskelettale Filamentkomplexe und für die Kontraktion essentielle sarkomerische Filamente (zusammengefasst in Frank et. al., 2006).

Es gibt viele Studien zur Myofibrillogenese in sich entwickelnden Vertebratenmuskelzellen (Rhee et al., 1994; Briggs et al., 1995; Dabiri et al., 1997; Sanger et al., 2002; Golson et al., 2004; Siebrands et al.,

2004; zusammengefasst in Sanger, 2005). Die Myofibrillogenese vollzieht sich sehr wahrscheinlich schrittweise und die ersten Entwicklungsschritte finden in enger Assoziation mit der Zelloberfläche bzw. dem Sarkolemma statt. Der genaue Ablauf der Bildung einer reifen Myofibrille hingegen muss noch aufgedeckt werden. Bisher wurden schon viele Entdeckungen gemacht, die zu diversen Modellen der Myofibrillogenese führten. Das prä-Myofibrillen Modell wird dabei von den meisten Beobachtungen der Myofibrillogenese in Herz- und Skelettmuskelzellen *in situ* und in Myozyten in Zellkultur unterstützt. Das prä-Myofibrillen Modell ist in Abb.2. abgebildet.

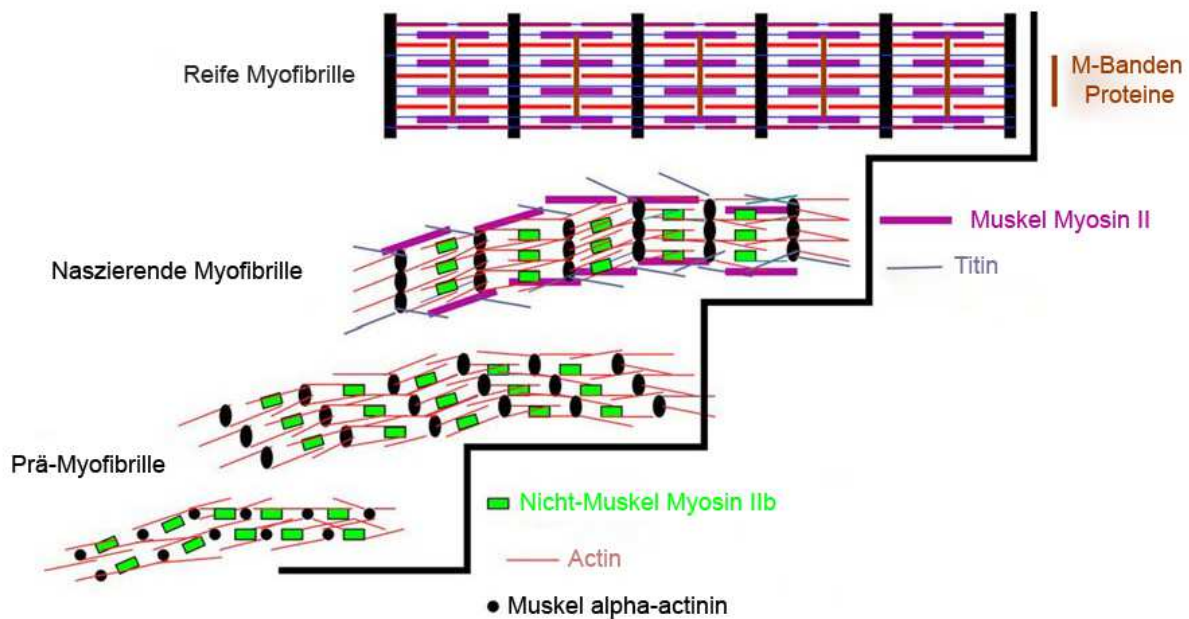


Abbildung 2: Prä-Myofibrillen Modell der Myofibrillogenese

Der Aufbau der prä-Myofibrillen beginnt an der Peripherie der Muskelzellen. Die prä-Myofibrillen bestehen aus Minisarkomeren bestehend aus Muskel Aktin, Aktin bindenden Proteinen und der Nicht-Muskel Isoform von Myosin II. Muskel Myosin und Titin kommen hinzu und „z-bodies“ bilden gepunktete Z-Scheiben in den sog. naszierenden Myofibrillen. Wenn sich reife Myofibrillen bilden, so werden die gepunkteten Z-Scheiben linear, Nicht-Muskel Myosin verschwindet und Myosin bindende Proteine (C-Protein und Myomesin) werden in die alinierten A-Banden eingebaut. Abb. modifiziert nach Sanger et al., 2004

Der erste Schritt zur Bildung einer reifen Myofibrille besteht in der Anhäufung von prä-Myofibrillen entlang der Zellmembran einer Muskelzelle. Prä-Myofibrillen bestehen aus Minisarkomeren mit alternierenden Konzentrationen von Nicht-Muskel Myosin IIb und muskelspezifischem α -Actinin in perlschnurförmiger Anordnung entlang der muskelspezifischen Aktinfilamente und deren assoziierter Proteine wie Tropomyosin und Troponin (Wang et. al., 2007). Der Übergang von prä-Myofibrillen zu naszierenden Myofibrillen tritt dann ein, wenn diese frühe Form der Z-Scheibe (Singular: „z-body“, Plural: „z-bodies“) sich parallel zueinander ausrichten und sich gepunktete Z-Scheiben bilden. Titin und Muskel Myosin II werden erst in den naszierenden Myofibrillen gefunden. Zu diesem Zeitpunkt sind die Muskel Myosin II Filamente nicht in A-Banden organisiert, sondern überlappen und bilden ein lückenloses Muster (Rhee et. al., 1994; Du et.al., 2003). Nicht-Muskel Myosin IIb zeigt sich in periodischen Abständen. Im letzten Schritt der Myofibrillogenese werden die gepunkteten Z-Scheiben allmählich zu linearen

Strukturen ohne Unterbrechungen. Nicht-Muskel Myosin IIb ist nicht länger in der Myofibrille zu finden und Muskel-Myosin II Filamente sind in klar abgegrenzten A-Banden organisiert (Rhee et. al., 1994; Du et. al., 2003).

In einer Arbeit der Gruppe von Jean M. Sanger (2009) wurde das prä-Myofibrillen Modell der Myofibrillogenese auf seine Anwendbarkeit im Zebrafisch untersucht. Der große Vorteil des Zebrafischs ist dabei die zeitliche Entwicklungsabfolge der Somitogenese und der damit einhergehenden Möglichkeit verschiedene Entwicklungsstadien der Myofibrillogenese in einem einzigen Tier untersuchen zu können. In den frühesten Stadien der Myofibrillogenese finden sich lineare perlenschnurförmige Anordnungen von kleinen α -Actinin reichen punktförmigen Strukturen. Diese sollen die bereits in Hühnerherz- und Skelettmuskelzellen gesehenen „z-bodies“ repräsentieren (Rhee et. al., 1994; Dabiri et. al. 1997; Golson et. al., 2004; Siebrands et. al., 2004). Diese Strukturen wurden ebenso in adulten Rattenkardomyozyten in Zellkultur entdeckt (LoRusso et. al., 1997). In älteren Somiten fand man nach α -Actinin Immunfluoreszenzfärbung Z-Scheiben mit gepunktetem Muster und einheitlich gefärbte ununterbrochene Z-Scheiben. In den jüngsten Somiten eines 24 Stunden nach Befruchtung (SnB) Zebrafisch Wildtyp (WT) Embryos fand die Gruppe von Sanger nach Antikörperfärbung von muskelspezifischem Myosin II kleine Aggregate gefolgt von Bündeln ohne Bandenmuster ähnlich den, als naszierende Myofibrille benannten Strukturen in Vogelmyozyten in Zellkultur (Rhee et. al., 1994) und in *in situ* fixiertem Herzgewebe (Du et. al., 2008). In älteren Somiten traten Mischpopulationen von Fibrillen mit und ohne Bandenmuster vor Myofibrillen mit gut organisierten A-Banden auf. Manche der Myosin und Aktinfilamenten nahe der älteren Somitengrenzen zeigten sich ohne sarkomerisches Bandenmuster wie in jüngeren Zellen in frühen Stadien der Myofibrillogenese. Diese Beobachtung und das Auftreten von „z-bodies“ am Ende von Myofibrillen mit reifen Z-Scheiben mag ein Hinweis darauf sein, dass das Myofibrillenwachstum nahe der Somitengrenzen stattfindet. Das Myofibrillenwachstum mag mitursächlich sein für das Längenwachstum einer Somite selber.

1.3 Morpholino Technologie

Zur Untersuchung einer bestimmten Genfunktion in einem lebenden Organismus bedient man sich seit der späten 1970er Jahre der Antisense Technologie. Seit 1978 verwendet man Oligonukleotide, welche die Translation von Proteinen hemmen (Zamecnik und Stephenson, 1978). Im Gegensatz zu Morpholino Oligomeren verwendet die „small interfering RNA“ (siRNA) Methode Ribonukleinsäure (RNS) welche sich an einen komplementären RNS Einzelstrang anlagert und durch den sogenannten „RNA-induced silencing complex“ (RISC) abgebaut wird. Morpholinos hingegen inhibieren die Interaktion von Makromolekülen, wie z.B. den ribosomalen Untereinheiten, mit einer Ziel m-RNS und verhindern somit die Translation durch sterische Hinderung.

Der Vorteil der Morpholino Technologie besteht in der Beschaffenheit der Oligomere selbst. Während siRNS Experimente mit dem Abbau der applizierten Einzelstrang RNS zu kämpfen haben, verbleiben die Morpholino – RNS Hybride in der Zelle. Morpholino modifizierte Oligonukleotide unterscheiden sich im Aufbau ihres Rückgrates von natürlich vorkommenden Nukleotiden (Desoxyribonukleinsäure, DNS und RNS). Morpholinos sind ungeladen und gehen deswegen kaum Interaktionen mit Proteinen ein (Hudziak et al., 1996). Anstelle des natürlich vorkommenden Zuckers und Phosphates befinden sich im Morpholino Rückgrat ein Morpholin-Ring und ein Phosphorodiamidat (Summerton und Weller, 1997). Morpholinos wurden in einer Reihe von Experimenten verschiedenen Nukleasen ausgesetzt. Die Degradation der Morpholinos blieb jedoch aus (Hudziak et al., 1996).

Da Morpholinos keine Wechselwirkung mit Signalmolekülen oder Enzymen eingehen, lösen Sie auch keine angeborene Immunreaktion über die „toll-like“ Rezeptoren aus. Allerdings zeigen 15-20% der Morpholinos Effekte, welche nicht ausschließlich auf die Inhibition der Ziel m-RNS zurückzuführen sind (Ekker und Larson, 2001). Um diese unspezifischen Nebeneffekte als solche erkennen zu können sollten entsprechende Kontrollen durchgeführt werden. Ein häufiger Nebeneffekt ist die durch p53 induzierte Apoptose. Die Koinjektion mit einem p53 Morpholino vermindert den programmierten Zelltod und rettet damit den echten Phänotypen (Robu et al., 2007). Hierbei sei erwähnt, dass der p53 Morpholino keinen eigenen Phänotypen hervorbringt. Die Firma GeneTools, LLC (Philomath, USA) bietet neben dem p53 Morpholino auch Kontroll-Morpholinos - wie den in dieser Arbeit verwendeten Kontroll Morpholino (Kontroll-MO)- an, welcher keine Sequenz im Zebrafisch Genom erkennt und dementsprechend auch keinen Phänotypen generiert.

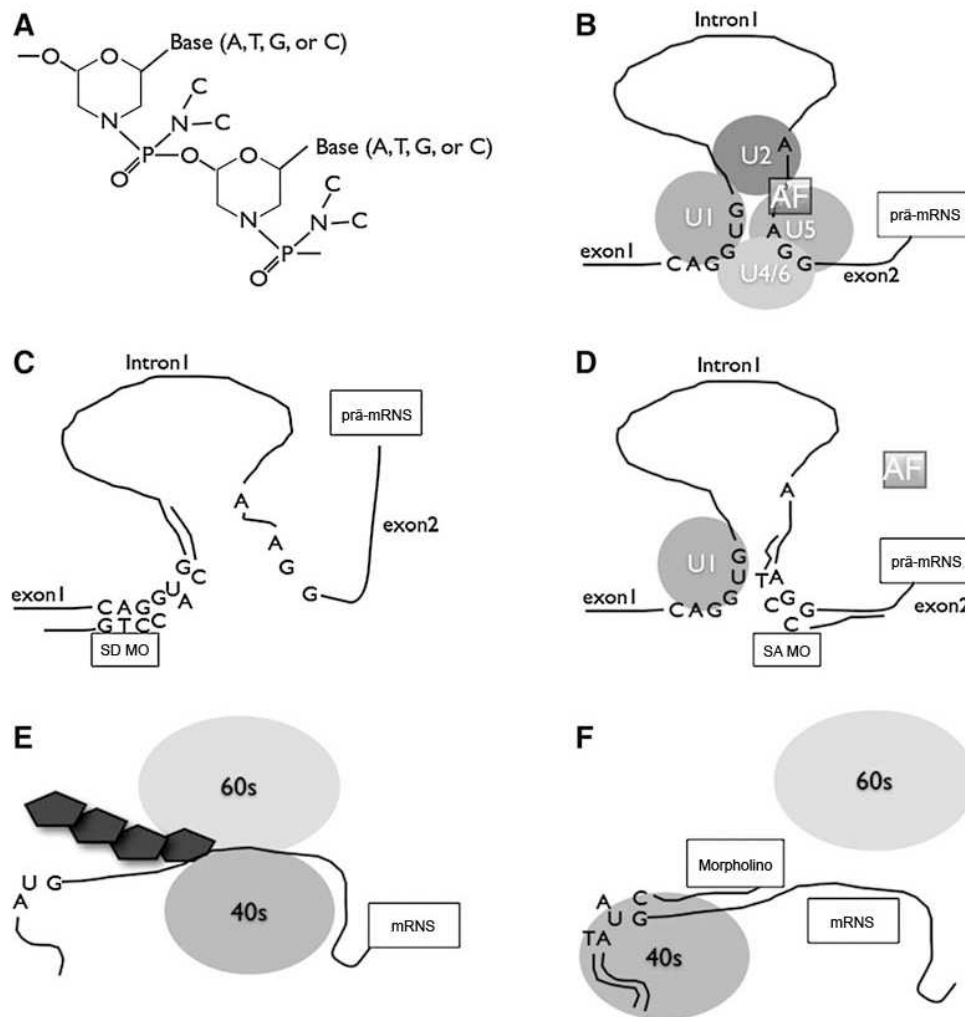


Abbildung 3: Morpholino – modifizierte – Oligonukleotide und Mechanismen des Gen *knockdowns*

Morpholinos bestehen aus einem Phosphorodiamidat Rückgrat mit einem Morpholin-Ring und denselben Basen wie in DNS (A). Die Morpholino-Technologie wird genutzt, um den normalen endogenen Spleißprozess (B) oder die Translation (E) eines Gens durch sterische Hinderung zu erreichen. Morpholinos die an die „Splice donor site“ (SD) binden, inhibieren die Bindung vom U1 Komplex und verhindern so die „Lariat“ Formation des Introns, was zu einer Inkorporation des Introns in die m-RNS führt (C). Morpholinos die an die „Splice acceptor site“ binden verhindern die Bindung des AF Proteins, welches für die Bindung des U2 Komplexes benötigt wird und verhindern so die „Lariat“ Formation des Introns (D). Die Translation blockierende Morpholinos binden im Bereich des AUG oder etwas stromaufwärts davon gelegen in der 5'UTR und verhindern eine erfolgreiche Suche der 40S ribosomalen Untereinheit nach dem Startcodon. Dadurch wird die Translationsinitiation und Elongation durch den vollständigen ribosomalen Komplex (60S und 40S zusammen gelagert) verhindert (F) Abb. modifiziert nach Bill et al., 2009

Neben diesen Kontrollen sollten verschiedene nicht überlappende Morpholinosequenzen entworfen und zur Blockierung des Spleißapparates und des Initiationskomplexes zur Anwendung kommen. Generieren die verschiedenen Morpholinos einen ähnlichen Phänotypen, so kann man etwas sicherer sein, die Genfunktion zu untersuchen und nicht an einem Artefakt zu forschen. Um die beobachteten Effekte des Gen *knockdowns* zu verifizieren besteht die Option einer Morpholino Koinjektion (Maves et al., 2002). Beide Morpholinos werden gemeinsam injiziert, um nach Synergieeffekten zu suchen. Jeder Morpholino wird in einer Konzentration injiziert bei der er alleine keinen Phänotypen produzieren würde. Um diese Konzentration zu kennen ist es nötig eine Dosis - Wirkungskurve für jeden der beiden Mor-

pholinos zu erstellen, denn die Penetranz der einzelnen Morpholinos kann erheblich voneinander abweichen. Entsteht hierbei der bereits in den Einzelinjektionen beobachtete Phänotyp, so ist eine Spezifität der Morpholinos wahrscheinlich. Es ist ausgesprochen wichtig bei allen Injektionen das Injektionsvolumen zu kontrollieren. Alleine eine Abweichung um den Faktor zwei kann zu stark unterschiedlichen Ergebnissen führen. Als abschließende und sicherste Methode, um Artefakte auszuschließen gilt die Koinjektion von reifer m-RNS des Zielgenes und eines die Translation blockierenden Morpholino. Dieses Verfahren sollte zur Rettung des Phänotypes führen, sofern die Binderegion des Morpholinos in der 5' „untranslated region“ (UTR) der koinjizierten m-RNS mutiert oder deletiert wurde. Hierbei ist wichtig zu beachten, dass die Menge von Morpholino und m-RNS austitriert wird. Dieses Rettungsexperiment ist schnell und einfach abgeschlossen, wenn das Gen ubiquitär und nicht räumlich-zeitlich begrenzt exprimiert wird. Im Falle eines starken Überexpressionsphänotypen ist diese Art von Kontrolle schwierig bis unmöglich umzusetzen (Piepenburg et al., 2004).

1.4 Capping Protein (CP)

Capping Protein (CP) auch bekannt als CapZ in Muskulatur (Casella et al., 1987; Caldwell et al., 1989; Maruyama et al., 1990) ist ein Heterodimer bestehend aus einer α (36 Kilodalton (kDa)) und einer β (32 kDa) Untereinheit. CP bindet mit einer hohen Affinität (Dissoziationskonstante (K_d) ~ 1 nM) an das (+)-Ende von filamentösen-Aktin (F-Aktin) in einer 1:1 Stöchiometrie und verhindert damit die Anlagerung und die Abwanderung von Aktin-Monomeren (Caldwell et al., 1989; Schafer et al., 1993). Das Aktin-Filament ist polar aufgebaut, es besteht aus einem schnell wachsenden Ende (+ Ende) und einem langsam wachsenden Ende (- Ende). Somit unterscheiden sich beide Enden in ihrer Struktur und ihren kinetischen Eigenschaften voneinander. Interessanterweise kann CP auch die F-Aktin Bildung *in vitro* fördern (Caldwell et al., 1989). Basierend auf der Kristallstruktur von CP (Yamashita et al., 2003, Eckert et al., 2012) (Abb.4) wurde ein Tentakel Bindemechanismus vorgeschlagen bei dem die C-terminale Region beider Untereinheiten (α und β) ausgefahren werden um eine Aktin-CP Bindung zu ermöglichen.

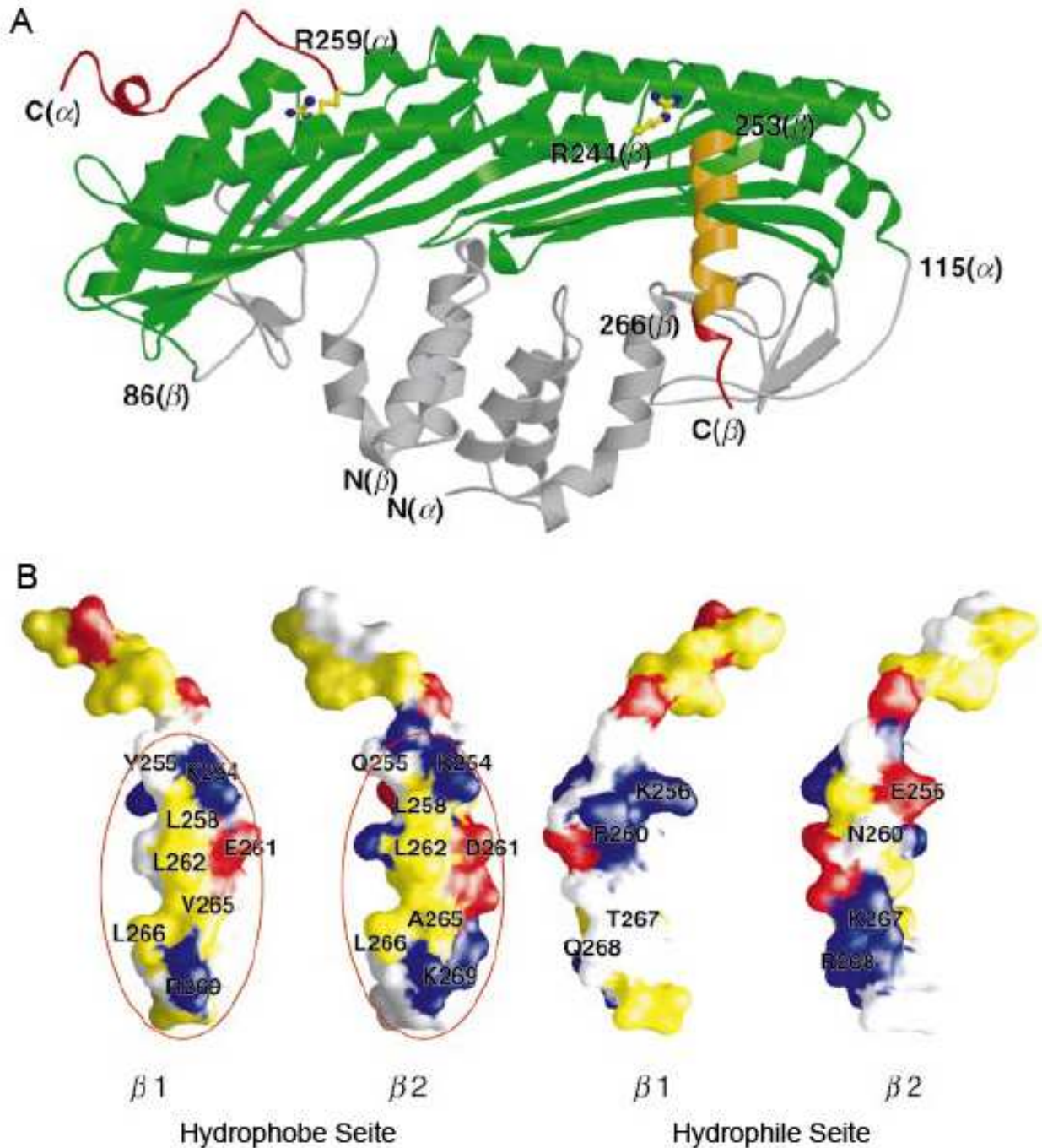


Abbildung 4: Struktur vom Hühner α 1/ β 1 Heterodimer CP und Aktinbindedomänen von CP

(A) Die entscheidenden Regionen für die Aktinbindung (rot markiert) [Aminosäurerest 259 – C-Terminus (α) und Aminosäurerest 266 – C-Terminus (β)], die Stellen mit Aktinbindungsfähigkeit (orange markiert) [Aminosäurerest 253-C-Terminus (β)] und Regionen, die für eine Aktinbindung nicht benötigt werden (grau markiert) [Aminosäurereste 115-N-Terminus (α) und Aminosäurerest 86-N-Terminus (β)] wurden entsprechend der Deletionsexperimente (Hug et al., 1992; Casella und Torres, 1994; Sizonenko et al., 1996) farblich markiert. (B) Oberflächenrepräsentationen der C-terminalen α -Helix (Aminosäurereste 246-271, die einzige variable Region zwischen den Isoformen) der beiden Isoformen β 1 und β 2. Die beiden linken Abb. zeigen die hydrophoben Seiten der C-terminalen α -Helix und die beiden rechten Abb. zeigen die hydrophilen Seiten der C-terminalen α -Helix. Hydrophobe, saure und basische Aminosäurereste sind in gelb, rot und blau dargestellt. Potentielle Aktinbinderegionen sind durch rote Kreise hervorgehoben. Abb. modifiziert nach Yamashita et al., 2003.

CP ist weit verbreitet im Tierreich. Es wurde bereits aus einer Amöbenart (*Acanthamoeba castellanii*) (Isenberg et al., 1980; Cooper et al., 1984), aus dem Schleimpilz (*Dictyostelium discoideum*) (Schleicher et al., 1984), Rinderhirn (Kiliman und Isenberg, 1982) und Hühner Skelettmuskeln (Casella et al., 1986) isoliert. Organismen wie die Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*), Fadenwurm (*Caenorhabditis elegans*) und Taufliege (*Drosophila melanogaster*) besitzen ein Gen und eine Isoform für jede CP α und β Untereinheit (Amatruda et al., 1990; Waddle et al., 1993; Hopmann et al., 1996). Im Gegensatz dazu besitzen Vertebraten drei α Untereinheiten, die von drei verschiedenen Genen kodiert werden und drei β Untereinheiten die durch alternatives Spleißen von einem Gen stammen. Die α_3 und β_3 Isoformen werden in männlichen Keimzellen exprimiert. Die β_3 Isoform ist größtenteils identisch zur β_2 Isoform und unterscheidet sich nur am N-Terminus durch zusätzliche 29 Aminosäuren (von Bulow et al., 1997). Die β_1 und β_2 Isoformen sind innerhalb der ersten 246 Aminosäuren identisch. Der C-Terminus unterscheidet sich in der Länge (β_1 : 31 Aminosäuren; β_2 : 26 Aminosäuren) und den Aminosäureseitenketten (Hug et al., 1992; Schafer et al., 1994).

Viele Evidenzen unterstützen die Hypothese, dass die β_1 und β_2 Isoform bestimmte biochemische und zelluläre Funktionen besitzen und diese im Phylum der Vertebraten konserviert sind. Zum einen sind die C-terminalen Sequenzen die den Unterschied zwischen β_1 und β_2 ausmachen konserviert, zum anderen zeigen die β Untereinheiten Gewebe spezifische Expression. Die β_1 Isoform wird hauptsächlich im Muskelgewebe exprimiert und die β_2 Isoform hauptsächlich in Nicht-Muskelgewebe (Schafer et al., 1994; Hart et al., 1997). Weiterhin werden die β Isoformen an unterschiedlichen subzellulären Stellen gefunden. In quergestreifter Muskulatur findet man die β_1 Isoform in den Z-Scheiben der Sarkomere (Casella et al., 1987; Schafer et al., 1994), dort geht es vermutlich eine Interaktion mit α -Actinin ein (Papa et al., 1999), und die β_2 Isoform an Kontaktstellen von Aktin mit der Zellmembran (Amatruda und Cooper, 1992; Schafer et al., 1992; Schafer et al., 1994). Dass die β_1 Isoform wahrscheinlich mit weiteren Proteinen in der Z-Scheibe interagiert wurde bereits in Zellkulturuntersuchungen, bei denen ein anti CP β_1 Antikörper die Bindungsstelle von CP für Aktin blockiert und dennoch eine Lokalisation des CPs an der Z-Scheibe gesehen wurde (Schafer et al., 1995), bestätigt. Die C-terminale Region in der sich die beiden Isoformen unterscheiden ist essentiell für die Bindung an F-Aktin. CP β_1 und CP β_2 binden in vitro mit der gleichen Affinität und Kinetik an F-Aktin (Schafer et al., 1996). Transgene Mäuse die CP β_1 oder CP β_2 im Ventrikel des Mäuseherzens überexprimieren wurden als Modell zur Untersuchung der myokardialen CP Defizienz verwendet. Die CP β_2 Funktion kann nicht durch CP β_1 ersetzt werden und umgekehrt kann CP β_1 nicht die Funktion von CP β_2 übernehmen (Hart und Cooper, 1999). Weiterhin zeigte diese Studie das CP β_1 auch ohne eine Aktinbindung an der Z-Scheibe vorkommt. Die potentiellen Aktionspartner in der Z-Scheibe für CP β_1 sind Titin (Soteriou et al., 1993; Pierobon et al., 1989), α -Actinin (Papa et al., 1999) und Nebulin (zusammengefasst in Keller, 1995). Ein Verlust der CP β_1 Isoform im Ventrikel des Mäuseherzens führt zu hypotropher Kardiomyopathie, was myofibrilläre Unordnung und eine Erhöhung der Masse des linken Ventrikels mit sich bringt. Der Verlust der CP β_2 Isoform

im Ventrikel des Mäuseherzens zeigt falsch ausgerichtete und zum Teil zerrissene interkalierende Scheiben (Hart und Cooper, 1999).

In diversen Studien wurde ein weiteres transgenes Mausmodell auf die Auswirkungen einer um 7% reduzierten CP β 1 Expression im Herzen untersucht. Die Studien zeigten unter anderem das eine vergleichbar geringe CP β 1 Reduktion zu einer erhöhten Ca²⁺ Sensitivität der kardialen Myofilamente, einer Erhöhung der maximal erzeugten isometrischen Kraft von Myofilamentbündeln, einer Inhibition der PKC vermittelten Myofilament Aktivierung und einer Reduktion des Myofilament assoziierten PKC- β Proteins führt (Pyle et al., 2002,2006; Yang und Pyle, 2011, 2012; Gaikis et al., 2013).

In *Drosophila melanogaster* CP defizienten Tieren wurden abnorme F-Aktin Ansammlungen in den Zellen der Imaginalscheibe des Auges, in den Zellen der Imaginalscheibe des Flügels, der inneren Membran der Nährzellen während der Oogenese und einer Erhöhung der Aktinfilamentanzahl an Zellmembranen von Borstenzellen gefunden (Delalle et al., 2005; Fernández et al., 2011; Frank et al., 2006; Ogienko et al., 2013).

Abschließend sei noch auf weitere mögliche Interaktionspartner des CP hingewiesen, die möglicherweise im Zusammenspiel mit dem CP die Aktinfilamente in die für den Organismus benötigte Position bringen. CP interagiert mit Nebulin (Pappas et al., 2008), Twinfillin (Palmgren et al., 2001) und mit dem CARMIL Protein, welches seinerseits mit dem Arp2/3 Komplex und Myosin I interagiert (Jung et al., 2001). Arp2/3 und Myosin I sind sehr wichtige Proteine für die Aktin basierte Zellmotilität. CP bindet außerdem an das Arp1 Minifilament im Dynactin Komplex (Schafer et al., 1994), ein Aktivator des Mikrotubuli Motors Dynein.

1.5 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit hatte zur Aufgabe die Funktion der CP β Untereinheit in der Frühentwicklung und während der Myofibrillogenese der axialen Skelettmuskulatur des Zebrafisches zu untersuchen. Da bisher keine Studien zu CP β Defizienz während der Embryogenese in Vertebraten vorliegt und der Zebrafisch aufgrund der *ex utero* ablaufenden Entwicklung einen Vorteil gegenüber der Maus hat, wurden an diesem Modellorganismus die Untersuchungen durchgeführt. Zuerst sollte die räumlich-zeitliche Verteilung von CP β im Zebrafisch mittels immunhistochemischer Färbungen untersucht werden. Anschließend sollte die Expression von CP β durch Morpholinoinjektionen unterdrückt und die daraus resultierenden *knockdown* Phänotypen analysiert werden. Weitere molekularbiologische und proteinbiochemische Experimente sollten dabei helfen die Effektivität und Spezifität des *knockdowns* zu überprüfen. Die gewonnenen Ergebnisse sollen zum ersten Mal Erkenntnisse über die Funktion der CP β Untereinheit in der Frühentwicklung und der Myofibrillogenese im Skelettmuskel eines Vertebraten Systems liefern.

2 Material und Methoden

2.1 Zebrabärbling Methoden

2.1.1 Beschreibung und Herkunft des Zebrabärblings

Zebrabärblinge (*Danio rerio*, früher *Brachydanio rerio*) sind Süßwasserfische aus Nord- und Zentral-Indien, die in den Nebenflüssen des Ganges beheimatet sind und dort in langsam fließendem oder stehendem Gewässer leben. Sie gehören zur Familie der Karpfenfische (*Cyprinidae*). Im Laufe ihres zwei bis dreijährigen Lebens erreichen die Tiere eine durchschnittliche Körpergröße von vier bis fünf Zentimetern. Seit seiner Erstbeschreibung erfreut sich der Zebrabärbling einer großen Beliebtheit als Aquarienzierfisch. Die Gründerfische für alle weiteren Nachzuchten, die im Rahmen dieser Arbeit benötigt wurden, konnten freundlicherweise von der AG Wagener (Zentrum für Biochemie, Joseph-Stelzmann-Straße 52, 50931 Köln) zur Verfügung gestellt werden. Diese Tiere stammen ursprünglich aus dem Reugels / Campos-Ortega Labor der Universität zu Köln und stellen den so genannten Köln – Stamm (COL) dar.

2.1.2 Haltung des Zebrabärbling

Ab dem fünften bis siebten Lebensstag wurden die Embryonen in mehreren Zebrabärbling Aquarienanlagen (Aqua Schwarz GmbH, Göttingen, Deutschland) bestehend aus mehreren seriellen 12L Tank-Einheiten und Mausboxen, bei einer Wassertemperatur zwischen 26 °C und 28 °C gehalten (Mullins et al., 1994). Das Wasser in den einzelnen Einheiten wurde automatisch mit einer 1:1 Mischung aus deionisiertem Wasser und Leitungswasser aus einem Mischtank ausgetauscht (1/10 des Gesamtvolumens pro Tag). Innerhalb der Aquarienanlage wurde das Wasser durch Pumpensysteme in Zirkulation gehalten. Die in den Aquarienanlagen enthaltenen Filtereinheiten siebten Schwebeteilchen heraus und verhinderten durch eine bakterielle Animpfung die Ansammlung des Fischgiftes Nitrit. Die Wasserwerte wurden wöchentlich für jede Anlage gemessen. Dabei wurden die Konzentrationen von Phosphat-, Ammonium-, Nitrit-, Nitrat- und Kupferionen bestimmt. Des Weiteren wurde der pH-Wert, die Gesamthärte und der Leitwert ermittelt. Jede Woche wurde die gesamte Anlage von Algen und Futterresten befreit. Die Hälfte der biologischen Filter wurde alle drei Monate in alternierendem Rhythmus gereinigt. Die Fische wurden jeden Tag viermal abwechselnd mit Flockenfutter, Hummer Eiern, Salinenkrebssen und Rinderherz gefüttert, um eine ausgewogene Ernährung zu gewährleisten. Die Tiere wurden in einem 13 Stunden Licht zu 11 Stunden Dunkelheit Zyklus gehalten.

2.1.3 Gewinnung von Zebrabärbling Embryonen

Um Embryonen zu erhalten wurden am Tag vor der Eiablage zwei Männchen mit einem Weibchen in einer separaten Verpaarungsbox der Firma Aquatic Habitats, Inc. (Apopka, USA) überführt und mittels einer Plasticscheibe voneinander getrennt. Die Trennscheiben der Verpaarungsboxen wurden zu Beginn der Lichtphase sequentiell gezogen. Zwanzig bis dreißig Minuten nach Entfernung der Trennscheibe wurden die Embryonen abgesammelt. Ein feines Gitter am Boden der Box verhinderte, dass die Elterntiere ihre eigenen Embryonen fressen (Zebrabärblinge sind Laichräuber). Die Eier fielen durch die schmalen Öffnungen im Gitter und waren dadurch vor den Elterntieren geschützt. Die Eier wurden in Petrischalen mit Aquarienwasser überführt und entweder direkt für Injektionen verwandt oder bis zum gewünschten Entwicklungsstadium bei 28 °C im Inkubator gehalten. Bei Bedarf an neuen Zuchttieren wurden die Larven ab Tag fünf bis sieben nach der Befruchtung in die Fischzucht überführt. Wurde Gewebe aus erwachsenen Fischen oder Zebrabärbling Embryonen benötigt, so wurden die Tiere nach einer Betäubung mit Tricaine (40 µg/ml) durch Dekapitation getötet.

2.1.4 Injektionen von mRNS und Morpholinos

2.1.4.1 Herstellung der Kapillaren

Die Glaskapillaren mit Filament (Länge= 100mm, Außendurchmesser= 0,1mm, Wandstärke= 0,21mm) Firma Hilgenberg (Malsfeld, Deutschland) wurden mit Hilfe eines P1000 Micropipette Puller (Sutter Instrument, Novato, USA) frisch vor jeder Injektion gezogen (Bedingungen: Erhitzen= 566, Ziehen= 110, Geschwindigkeit= 100, Zeit= 90, Druck= 200).

2.1.4.2 Vorbereitung der Injektionslösungen

Die zu injizierenden Lösungen wurden auf die gewünschte Konzentration mit Phenolrot, Kaliumchlorid (KCl) und zweifach destilliertem Wasser (H_2O_{dd}) verdünnt. Die Stamm- und Injektionslösungen wurden im Kühlschrank bei ca. 6 °C in 10 µl Aliquots gelagert. Eine Übersicht über das Pipettierschema kann Tab.1 entnommen werden.

Tabelle 1: Pipettierschema für Injektionslösungen

Komponente	Stammlösung	Endkonzentration
Morpholino	3 mM	0,15 mM – 1 mM
Phenolrot	(2 % in H_2O_{dd})	0,2 %
KCl	1 M	0,1 M

2.1.4.3 Injektionen in Zebrabärbling Embryonen

Die Injektionen wurden mit der Injektionsanlage Femtojet® (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) in Embryonen des Ein- bis Vier-Zellstadiums durchgeführt. Die Injektionslösung wurde direkt in den Dotter unterhalb der Zelle(n) abgesetzt. Dazu wurden die Embryonen in eine Petrischale ohne Aquarienwasser und durch Aktiv-Kohle geschwärtzten Agarboden überführt. Durch Wasserentzug waren die Eier immobilisiert und konnten nach Bedarf in eine angenehme Position für die Injektionen gebracht werden. Die Injektionskapillare musste vor Beginn der Injektionsreihe an der Spitze mit einer Uhrmacherpinzette aufgebrochen werden, da diese nach dem Ziehen der Nadeln noch nicht geöffnet war. Mit der am Femtojet® XYZ-Arm befestigten Nadel wurde halbautomatisch die Injektionslösung quantitativ verabreicht. Um das zu bewerkstelligen wurde das Chorion durch eine schnelle Drehbewegung des Joysticks am InjectMan® NI2 (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) mit der Nadel durchstoßen und durch Druck auf ein Pedal wurde die Injektionslösung appliziert. Dabei ist auf die Menge des durch Phenolrot sichtbar gemachten Injektionsmittels zu achten. Die applizierte Menge wird durch den Injektionsdruck am Femtojet® reguliert. Der benötigte Injektionsdruck ist je nach Öffnungsdurchmesser der Nadel unterschiedlich einzustellen und wurde jedes Mal erneut empirisch bestimmt. Die Kalibrierung wurde für jede neue Injektionsnadel einzeln vorgenommen, indem der Injektionsdruck angepasst wurde, bis das Zielvolumen von 5 nl Injektionslösung pro Injektion erreicht wurde. Da das Injektionsvolumen immer konstant war, wurde die Morpholinokonzentration nach Bedarf variiert. Unmittelbar im Anschluss an die Injektion wurden die Embryonen wieder in eine Petrischale mit Aquarienwasser überführt und entwickelten sich bei 28 °C bis zum erwünschten Entwicklungsstadium. Ebenso wurden nicht-injizierte - und Kontroll- MO injizierte -Embryonen als Kontrollansatz dem Wasserentzug ausgesetzt und bei gleichen Entwicklungsbedingungen gehalten. Nach drei bis vier Stunden wurden die Tiere in Augenschein genommen und jene Tiere, welche den Farbstoff aufgenommen hatten wurden zur weiteren Entwicklung zurück in den Inkubator gestellt. Alle übrigen wurden verworfen. Bei einer Sterberate von mehr als 60% der nicht-injizierten Tiere wurde das Experiment abgebrochen. Das Experiment wurde nur ab einer Gelegegröße von 100 und mehr Eiern begonnen.

2.1.5 Mechanische Dechorionisierung der Embryonen

Das Chorion wurde mit Uhrmacherpinzetten entfernt, damit der Embryo eine gestreckte Haltung einnehmen konnte. Dies erwies sich für Durchlicht-Fotos, Immunfluoreszenzaufnahmen und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) als ausgesprochen nützlich, da man auf diese Weise sämtliche Strukturen klar unterscheiden und erkennen konnte.

2.1.6 Analyse von makroskopischen morphologischen Effekten

Lebende Embryonen wurden vom Aquarienwasser in 4%ige Methylcellulose (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) auf einen Objektträger mit Hohlschliff überführt. Dabei sollte das Tier in einer Plastikpasteurpipette (3 ml) auf-

genommen und mit so wenig Medium wie möglich auf die Methylcellulose gegeben werden. Die Tiere konnten durch eine Art Stift an dessen Spitze ein feiner Draht befestigt war je nach Bedarf in der Methylcellulose ausgerichtet und mit einer Digital Sight DS-2MV Kamera von Nikon fotografiert werden. Die Tiere wurden der Methylcellulose nicht länger als nötig ausgesetzt, da nach ca. 10 bis 15 Minuten die Tiere aufquollen. Idealerweise wurden die Tiere aus der Methylcellulose entfernt indem man den ganzen Hohlschliff – Objektträger für wenige Minuten in eine Petrischale mit Aquarienwasser gab und wartete bis die Methylcellulose weich geworden war. Der Embryo konnte dann problemlos mit einer Plastikpasteurpipette entfernt werden.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 RNS Isolation

Die Gesamt-RNS aus Zebrafisch Embryonengewebe wurde mit Hilfe des AS2000 Maxwell® 16 Gerätes isoliert. Dazu wurden Embryonen nach Entfernen des Systemwassers in 200 µl vorgekühlter 1-Thioglycerol Homogenisationslösung überführt. Eine mechanische Homogenisation vergrößerte die Ausbeute an RNS. Dazu wurde mit einem Pistill das Material solange mechanisch zerrieben bis keine Gewebefragmente mehr sichtbar waren. Unmittelbar vor der Überführung der Probe in die Kartusche wurden 200 µl Lysispuffer dazugegeben und die Probe für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Die Kartusche wurde dann in das Probengestell (Maxwell® 16 LEV Cartridge Rack) gesteckt und die Schutzfolie abgezogen. Dann wurde der komplette Probenansatz nach kurzem Vortexen in die erste Kammer der Kartusche überführt. Elutionsgefäße wurden im Probengestell an die entsprechende Position gestellt und mit 50 µl Nuklease freiem Wasser befüllt. Die Stößel wurden an die korrekte Position in der Kartusche gesetzt und 5 µl blaue DNase I Lösung wurde in Kammer vier - welche mit gelbem Reagenz befüllt war – gegeben. Das Reagenz in Kammer vier wurde daraufhin grün. Das Probengestell wurde zusammen mit den Kartuschen auf die Geräteplattform gesetzt und arretiert. Dabei ist zu beachten, dass sich die Seite mit den Elutionsgefäßen nahe der Tür des Gerätes befindet, da das Probengestell nur in dieser Orientierung in das AS2000 Maxwell® 16 Gerät passt. Im Menü des Gerätes wurden dann das Programm „simply RNA“ ausgewählt und die Tür geschlossen. Der Lauf wurde gestartet und die verbleibende Restzeit wurde auf dem Bildschirm angezeigt. Nachdem die Gesamt-RNS eluiert wurde, wurde diese je nach Protokoll entweder sofort weiter verwendet oder bei -80 °C eingefroren. Die Kartuschen mitsamt Stößel wurden abschließend entsorgt und das Probengestell aus dem AS2000 Maxwell®16 entnommen.

2.2.2 cDNS-Synthese

Die sogenannte komplementäre DNS (cDNS) wurde mithilfe des QuantiTect® Reverse Transcription Kit der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) hergestellt. Das Protokoll wurde entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet und wird im Folgenden mit den für diese Arbeit relevanten Arbeitsschritten kurz zusammengefasst.

mengefasst:

Gesamt-RNS, gDNA Wipeout Buffer, Quantiscript® Reverse Transcriptase, Quantiscript RT Buffer, RT Primer Mix und RNase freies Wasser wurden bei RT aufgetaut und kurz zentrifugiert, um Rückstände an Deckelunterseiten und Gefäßwänden zu sammeln. Danach wurden diese Komponente auf Eis gelagert. Die genomische DNS Eliminierungsreaktion wurde nach Tab.2 vorbereitet und auf Eis inkubiert.

Tabelle 2: Pipettierschema DNS Eliminierungsreaktion

Komponente	Volumen/Reaktion
gDNA Wipeout Buffer	2 µl
RNS, bis zu 1µg	Variabel
Rnase freies Wasser	Variabel
Gesamt Reaktionsvolumen	14 µl

Die genomische DNS Eliminierungsreaktion wurde für zwei Minuten bei 42 °C im Wasserbad inkubiert, danach sofort auf Eis gestellt. Der reverse Transkriptionsansatz wurde gemäß Tab.3 angesetzt, gut durchmischt und auf Eis gestellt. Der reverse Transkriptionsansatz enthielt alle Komponenten, die für eine Erst-Strang cDNS Synthese benötigt wurden.

Tabelle 3: Pipettierschema Reverse Transkription

Komponente	Volumen/Reaktion
Quantiscript® Reverse Transcriptase	1 µl
Quantiscript RT Buffer, 5x	4 µl
RT Primer Mix	1 µl
RNS (gesamte genomische DNS Eliminierungsgr.)	14 µl
Gesamt Reaktionsvolumen	20 µl

Die Mischung wurde für 15 Minuten bei 42 °C im Wasserbad inkubiert. Die Quantiscript® Reverse Transcriptase wurde für drei Minuten bei 95 °C im Thermoschüttler Hitze inaktiviert. Die cDNS wurde auf Eis gestellt und entweder weiter prozessiert (z.B. PCR) oder bei -20 °C eingelagert.

2.2.3 Phenol/Chloroform-Extraktion

Bei der Phenolextraktion handelt es sich um die Standardmethode, um Proteine aus Nukleinsäurelösungen zu entfernen. Phenol ist ein sehr guter Wasserstoffbrückenbildner und kann gleichzeitig hydrophobe Wechselwirkungen mit Aminosäureseitenketten ausbilden. Aufgrund dieser Eigenschaften dis-

soziiert Phenol den Protein-Nukleinsäurekomplex in die freien Komponenten. Es kommt zur Denaturierung und Anreicherung der Proteine in der phenolischen Phase. Die Verwendung von Chloroform führt ebenfalls zu einer Denaturierung der Proteine, der Zusatz von Isoamylalkohol verhindert ein Schäumen und das Ausbilden einer ausgeprägten Interphase während der Extraktion (Bertram und Gassen, 1991). Vor der Phenol/Chloroform-Extraktion wurden die Proben auf ein Mindestvolumen von 200 μl mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ aufgefüllt. Die Extraktion erfolgte nach folgendem Schema:

Es wurden 200 μl Phenol-Chloroform Amylalkohol zu der Probe gegeben und 30 Sekunden gevortext. Es entstand eine milchige Suspension, welche eine Minute auf Eis gestellt und anschließend eine Minute bei 12000 x g in einer Eppendorf Tischzentrifuge zentrifugiert wurde. Die obere wässrige Phase (enthält DNS) wurde abgenommen und in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Die untere organische Phase wurde verworfen. Der Überstand wurde mit 200 μl Chloroform versetzt und 30 Sekunden gevortext. Es entstand eine weniger milchige Suspension, was auf eine Reduktion des Proteinanteiles der Probe hinwies. Die Probe wurde für eine Minute auf Eis inkubiert, bei 12000 x g zentrifugiert und der wässrige Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Abschließend wurde der Chloroform Schritt wiederholt.

2.2.4 Fällung von DNS

In Gegenwart relativ hoher Konzentrationen monovalenter Kationen kommt es nach Zugabe von Alkohol zur Aggregation und nachfolgender Präzipitation der Nukleinsäuren, während niedermolekulare Oligonukleotide, Nukleotide und Salze in Lösung verbleiben. Um cDNS zu konzentrieren und Verunreinigungen zu entfernen wurde eine Salz-Ethanol fällung durchgeführt. Der Lösung wurde 1/10 Volumen 3M Natriumacetat und das 2 fache Volumen Ethanol (100%) hinzugefügt. Die DNS wurde für ≥ 10 Stunden bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$, oder für wenigstens eine Stunde bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gefällt. Nach der Fällung wurde die Lösung bei 13000 x g für 30 Minuten zentrifugiert, mit 1 ml 70 %igem Ethanol gewaschen und noch einmal 10 Minuten bei 13000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde 5 Minuten auf Eis getrocknet und dann in der gewünschten Menge $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ resuspendiert.

2.2.5 Fällung von RNS

Analog zur Fällung von DNS wurde RNS durch Aussalzen konzentriert und aufgereinigt. Der Lösung wurde das 2 fache Volumen Ethanol (100%) und 1/10 Volumen 4M LiCl zugegeben. Die Lösung wurde für mindestens eine Stunde bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Die gefällte RNS wurde 15 Minuten bei 13.000 x g bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert und anschließend wurde mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen und erneut für 15 Minuten bei 13.000 x g und $4\text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert. Das Pellet wurde 15 Minuten auf Eis getrocknet und im gewünschten Volumen in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ aufgenommen.

2.2.6 Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (Mullis et al., 1986) ist ein Verfahren um spezifische DNS Abschnitte *in vitro* zu amplifizieren. Die PCR erlaubt die Produktion von mehr als 10 Millionen Kopien einer Ziel DNS Sequenz aus nur wenigen Molekülen. Durch Verwendung von thermostabiler DNS-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) ist es möglich, den gesamten Ablauf der PCR zu automatisieren. Früher wurde das Klenow-Fragment der DNS-Polymerase I aus *Escherichia coli* eingesetzt, welches hitzeempfindlich war und nach jedem Denaturierungsschritt neu zum Ansatz dazugegeben werden musste. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene PCR Protokolle verwendet. Zum einen ein Protokoll der Firma Promega (Mannheim, Deutschland) und zum anderen ein Protokoll der Firma New England Biolabs (Schwalbach, Deutschland). Da die Taq-Polymerase (Promega, Mannheim) keine 3'-5' Exonukleaseaktivität besitzt wurde bei Sequenz kritischen Arbeiten die Phusion® High-Fidelity DNS-Polymerase (New England Biolabs, Schwalbach) benutzt. Diese Polymerase macht aufgrund Ihrer Korrekturaktivität um den Faktor 10 weniger Fehler als die Taq-Polymerase. Zur Durchführung der PCR wurden ein Thermocycler der Firma Biometra (Göttingen, Deutschland) und ein Thermocycler der Firma Eppendorf (Hamburg, Deutschland) verwendet. Die Zusammensetzung der in dieser Arbeit verwendeten PCR Mastermixe können den Tab.4 und Tab.5 entnommen werden.

Tabelle 4: Reaktionsbedingungen für Phusion® High-Fidelity Polymerase

Komponente	Konzentration	Volumen
cDNS	<250 ng	2 µl
dNTP-Gemisch	200 µM	5 µl
Oligonukleotide	je 0,5 µM	je 2,5 µl
5 X HF-Puffer	1 X	10 µl
Polymerase	1 U	0,5 µl
H ₂ O _{dd}	---	auf 50 µl

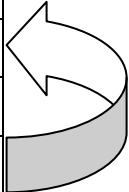
Tabelle 5: Reaktionsbedingungen für GoTaq® Polymerase

Komponente	Konzentration	Volumen
cDNS	<250 ng	2 µl
GoTaq® Green MM, 2 X	1 X	25 µl
Oligonukleotide	je 0,5 µM	je 2,5 µl
H ₂ O _{dd}	---	auf 50 µl

2.2.7 Reaktionsprofile für PCR

Tabelle 6: PCR Profil für Promega GoTaq® Green Master Mix

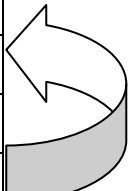
Schritt	Temperatur	Zeit
DNS Denaturierung	95 °C	2 min
Denaturierung Oligos	95 °C	30 s
Anlagerung Oligos	60 °C-65 °C	30 s-1 min
Amplifikation der DNS	72 °C	variabel
Elongation	72 °C	5 min
Programm Ende	16 °C	bis Proben entnommen



30 mal

Tabelle 7: PCR Profil für Phusion® High-Fidelity DNS Polymerase

Schritt	Temperatur	Zeit
DNS Denaturierung	98 °C	30 s
Denaturierung Oligos	98 °C	10 s
Anlagerung Oligos	70 °C-72 °C	15 s
Amplifikation der DNS	72 °C	variabel
Elongation	72 °C	10 min
Programm Ende	4 °C	bis Proben entnommen



30 mal

2.2.8 Agarosegelelektrophorese

Die Nukleinsäuren liegen aufgrund der negativen Ladung Ihrer Phosphatgruppen unter elektrophoretischen Bedingungen als Polyanionen vor und wandern im elektrophoretischen Feld zur Anode. Durch native Agarosegelelektrophorese ist es möglich, Nukleinsäuren ihrer Größe nach zu trennen. Hierzu wurden Gele mit einer Konzentration von 0,8 % bis 2 % Agarose in 1xTRIS-Acetat-EDTA Elektrophoresepuffer (TAE-Puffer) verwendet. Die Gele wurden als horizontale Flachgele gegossen. Die Proben wurden mit 1/10 10 fach Ladepuffer versetzt (verwendeter Ladepuffer nach Sambrook et al., 1989) und in einer mit 1xTAE-Puffer gefüllten Flachbettgelkammer (Sub-cell GT AgaroseGEL *electrophoresis System*) der Firma Bio-Rad (München, Deutschland) aufgetrennt. Die Auftrennung wurde über das Anlegen einer konstanten Spannung von 5 Volt (V)/cm erreicht. Um die Nukleinsäurebanden nachweisen zu können, wurden die Gele mit dem Luminophor Ethidiumbromid versetzt (2 µl Ethidiumbromidlösung 10 µg/ml), so dass sie auf einem UV-Transilluminator (Gel Jet Imager 2000 von Intas oder GelVue GVM20 von Syngene) bei 312 nm Wellenlänge sichtbar gemacht und fotografiert werden konnten. Als Längen-

standard wurde entsprechend der zu erwartenden Fragmentgröße eine 50 bp-, 100 bp- oder eine 1 kilobasen (kb)-Leiter (Gene Ruler™ 50 bp, 100 bp bzw. 1 kb DNA-Leiter, Thermo Scientific) verwendet.

2.2.9 Aufreinigung von PCR-Produkten aus Agarosegelen

Für die Aufreinigung musste zuerst die Bande der gewünschten Größe aus dem Agarosegel mit einer sterilen Rasierklinge ausgeschnitten oder mit einem Plastikstößel ausgestanzt werden. Anschließend wurde das Gelstück in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Aufreinigung erfolgte über das Qiaquick® Gel Extraction Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) und wurde nach Angaben des Herstellers verwendet. Im Folgenden ist das Protokoll mit den für diese Arbeit relevanten Arbeitsschritten zusammengefasst:

Das ausgeschnittene Gelstück wurde in einem durchsichtigen 2 ml Reaktionsgefäß gewogen und das dreifache an QG Puffer wurde zu einem Volumen Gel (100mg zu 100 µl) hinzugefügt. Es wurde bei 50 °C für zehn Minuten inkubiert (oder solange bis sich das Gelstück komplett aufgelöst hatte). Alle zwei bis drei Minuten wurde das Reaktionsgefäß gevortext, um das Auflösen des Gelstückes zu beschleunigen. Isopropanol wurde entsprechend des gelösten Gelvolumens hinzugefügt und das Gefäß wurde mehrmals invertiert. Eine QIAquick Säule wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß gesetzt. Zur DNS Bindung wurde die Probe auf die QIAquick Säule pipettiert und für eine Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und die QIAquick Säule zurück in dasselbe Reaktionsgefäß gesetzt. Für Proben mit einem Volumen von >800 µl wurde die Säule mehrfach hintereinander beladen und zentrifugiert. Falls die DNS für Sequenzierungen, in vitro Transkriptionen oder Mikroinjektionen benötigt wurde, wurden 0,5 ml QG Puffer auf die Säule pipettiert und für eine Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die QIAquick Säule zurück in dasselbe Reaktionsgefäß gesetzt. Zum Waschen der Säule wurden 0,75 ml PE Puffer auf die Säule pipettiert, für eine Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und die QIAquick Säule zurück in dasselbe Reaktionsgefäß gesetzt. Sollte die DNS für Salz-sensitive Anwendungen (wie z.B. „blunt-ended“ – Ligationen) verwendet werden wurde die Säule zwei bis fünf Minuten nach der Zugabe von PE Puffer inkubiert. Die QIAquick Säule wurde dann noch einmal für eine Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert, um restlichen Waschpuffer gründlich zu entfernen. Die QIAquick Säule wurde in einem sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäß platziert. Durch die Zugabe von 50 µl 10mM Tris Cl, pH 8,5 auf das Zentrum der Säule und einem finalen Zentrifugationsschritt von einer Minute bei 13.000 rpm wurde die DNS eluiert.

2.2.10 Blunt-End Klonierung

Die Ligation von PCR-Produkten wurde nach Angabe des Herstellers mit dem CloneJet™ PCR Cloning Kit der Firma Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland) durchgeführt. Blunt-End PCR Produkte wie sie von der Phusion® High-Fidelity DNS-Polymerase hergestellt werden konnten innerhalb von fünf Minuten mit dem pJET1.2/blunt Klonierungsvektor ligiert werden. Bei Religation des Vektors wurde ein letales Restriktionsenzym exprimiert, welches nach der Transformation diesen Klon absterben ließ. Demzufol-

ge erschienen nur Klone auf den Kulturplatten, die das Insert aufgenommen hatten. Die Ligationsreaktion wurde auf Eis angesetzt und enthielt folgende Komponenten (vgl. Tab. 8):

Tabelle 8: Ligationsansatz für Blunt-End Klonierung

Komponente	Volumen
2 X Reaktionspuffer	10 µl
gereinigtes PCR Produkt	1 µl
pJET1.2/blunt Klonierungsvektor (50ng/ µl)	1 µl
Nuklease freies Wasser	auf 19 µl
T4 DNS Ligase	1 µl
Gesamtreaktionsvolumen	20 µl

Der Ligationsansatz wurde kurz gevortext und für drei Sekunden zentrifugiert, um das ganze Volumen am Gefäßboden zu versammeln. Es wurde ein molares Verhältnis von Insert zu Vektor von 3:1 eingestellt, wobei 25 - 50 ng des pJET1.2/blunt Klonierungsvektors zum Einsatz kam. Die Ligation wurde bei RT für fünf Minuten inkubiert.

2.2.11 Transformation von chemisch kompetenten Zellen

Für einen Transformationsansatz wurden 100 µl des *Escherichia coli* (E.coli) Bakterienstammes DH5α™ auf Eis aufgetaut. Der unter 2.2.10 beschriebene Ligationsansatz wurde zugegeben, kurz gevortext und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein einminütiger Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad. Daraufhin wurden die Bakterien für zwei Minuten auf Eis gestellt und 0,8 ml LB-Medium zugegeben. Im Anschluss wurde für eine Stunde bei 37 °C und 800 rpm auf dem Thermoschüttler inkubiert. Danach wurde der Transformationsansatz bei 6000 rpm für drei Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in restlichem Medium resuspendiert und auf vorgewärmten Ampicillin-LB-Platten fraktioniert ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden Klone mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und über Nacht in 5 ml LB-Medium mit Ampicillin bei 225 rpm und 37 °C geschüttelt. Die Aufreinigung der Plasmid DNS wurde nur bei Klonen mit einem positiven Ergebnis bei der Kolonien-PCR ausgeführt.

2.2.12 Aufreinigung von Plasmid-DNS

Die Aufreinigung von Plasmid-DNS aus transformierten Bakterienkulturen wurde nach Angaben des Herstellers mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) durchgeführt.

Das Protokoll wird im Folgenden mit allen für diese Arbeit relevanten Arbeitsschritten zusammengefasst:

5ml der bakteriellen Übernachtskultur wurden bei 8000 rpm für drei Minuten bei RT zentrifugiert. Das Pellet wurde in 250 µl Puffer P1 resuspendiert und in ein Mikrozentrifugengefäß überführt. Es wurden 250 µl des Puffers P2 zugeben und gründlich durchmischt bis die Lösung klar wurde. Danach wurden 350 µl des Puffers N3 zugeben, sofort gut gemischt und für zehn Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine QIAprep Säule pipettiert, es wurde eine Minute zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Die QIAprep Säule wurde mit 750 µl Puffer PE gewaschen, für eine Minute zentrifugiert, der Durchlauf verworfen und erneut für eine Minute zentrifugiert, um restlichen Waschpuffer zu entfernen. Abschließend wurde die QIAprep Säule in ein 1,5ml Reaktionsgefäß platziert und die DNS durch Zugabe von 50 µl 10mM Tris Cl, pH 8,5 auf das Zentrum der Säule nach einem ein minütigem Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm eluiert.

2.2.13 Spezielle RNS Methode

2.2.13.1 Herstellung von m-RNS durch in vitro Transkription

Funktionale mRNS für ein Morpholino-Rettungsexperiment wurden nach Angaben des Herstellers mit dem mMESSAGE mACHINE[®] T7 Ultra Kit (Life Technologies, Waltham, USA) hergestellt. Im Folgenden ist das Protokoll mit allen für diese Arbeit relevanten Arbeitsschritten zusammengefasst:

Die Linearisierung der Plasmid DNS erfolgte durch ein Restriktionsenzym direkt hinter dem zu transkribierenden PCR Produkt des Zielgens. Zur Überprüfung des Erfolges des Restriktionsverdau wurde dieser auf einem Agarosegel überprüft. Nachdem die Kontrolle des Verdau positiv ausfiel wurde der Restriktionsverdau durch Zugabe von 1/20 Volumen 0,5M EDTA, 1/10 Volumen 3 M NaOAc und 2 Volumen Ethanol (100%) gestoppt. Die Probe wurde über Nacht bei -20 °C eingefroren. Am nächsten Tag wurde die Transkriptionsreaktion bei RT angesetzt (vgl. Tab. 9).

Tabelle 9: Pipettierschema der Transkriptionsreaktion

Komponente	Volumen
Nuklease freies Wasser	auf 20 µl
T7 2 X NTP/ARCA	10 µl
10 X T7Reaktionspuffer	2 µl
linearisiertes DNS-Plasmid	~ 1 µg
T 7 Enzym Mix	2 µl

Das Eppendorfgefäß wurde kurz mit dem Finger angeschnippt und zentrifugiert, um die Reaktionsmischung am Boden des Gefäßes zu versammeln. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C für zwei bis drei Stunden. Danach wurde 1 µl Turbo DNase hinzupipettiert, gut durchmischt und 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Der Poly(A) Schwanz wurde durch Zugabe der Reagenzien in Tabelle 10 zur 20 µl Transkriptionsreaktion generiert.

Tabelle 10: Pipettierschema Poly(A) Schwanz Generierung

Komponente	Volumen
Transkriptionsreaktion	20 µl
Nuklease freies Wasser	36 µl
5 X <i>E</i> -PAP Puffer	20 µl
25 mM MnCl ₂	10 µl
ATP Lösung	10 µl

Es wurden 2,5 µl der Reaktionsmischung abgenommen bevor das *E*-PAP Enzym hinzugegeben wurde. Diese Minus-Enzym Kontrolle wurde am Ende des Experimentes neben der mit einem POLY(A) Schwanz versehenen RNS aufgetragen und verglichen. Es wurden dann 4 µl *E*-PAP hinzu pipettiert, gut durchmischt und für 30 – 45 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Reaktion auf Eis gestellt und einer Lithium Chlorid Präzipitation für mindestens 30 Minuten bei -20 °C unterzogen. Im Anschluss wurde bei 4 °C für 15 Minuten bei 13000 x g zentrifugiert, das Pellet einmal mit 70%igem Ethanol gewaschen und erneut für 15 Minuten bei 13000 x g zentrifugiert. Abschließend wurde das Pellet für 15 Minuten auf Eis getrocknet und im gewünschten Volumen in H₂O_{dd} aufgenommen. Die genaue mRNS Konzentration wurde UV-spektrometrisch (Nanodrop) ermittelt.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Probenaufarbeitung für SDS-Page

Zebrabärbling Embryonen wurden vom Chorion und Dotter mittels einer sterilen Kanüle (BD Microlance 3 0,5 x 25) und Spritze befreit. Dazu wurden die Tiere in einer Petrischale, die mit gekühltem Dissektionspuffer gefüllt war durch die Kanüle aufgesaugt und wieder ausgestoßen. Durch das Einwirken der Scherkräfte auf die Embryonen wurden dabei Kopf und Dotter entfernt. Die Schwänze wurden mit einer Pinzette in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß, befüllt mit Probenpuffer, überführt. Dabei wurde das Puffervolumen auf 150 -200 µl eingestellt. Für 50 bis 100 der drei Tage alten Zebrabärbling Embryonen stellte dieses Volumen für die Homogenisation im Eppendorfgefäß ein ideales Verhältnis von Puffer zu Material dar. Die Schwänze wurden so lange mechanisch homogenisiert bis das Homogenisat uniform

in seiner Konsistenz und nicht mehr zäh und stark viskos erschien. Gegebenenfalls wurde in 50 μl Schritten Probenpuffer zugegeben, um diesen Zustand zu erreichen.

Im Anschluss an die mechanische Homogenisation wurde das Homogenisat zehn Minuten bei 100 °C gekocht und danach fünf Minuten bei 6000 rpm zentrifugiert. Die Homogenisation galt als abgeschlossen, sobald das Homogenisat sich klar und ohne erkennbare Schwebeteilchen zeigte. Der Überstand wurde abgenommen und in 20 μl Aliquots abgefüllt. Das Pellet wurde bei -80 °C eingefroren. Es wurde eine quantitative Proteinbestimmung nach Bradford (Mikro- Bradford) durchgeführt.

2.3.2 Mikro – Bradford zur Proteinmengenbestimmung

Die Proteinprobe wurde 1:100 mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ verdünnt und es wurden jeweils 10 μl und 20 μl der Probe in Duplikaten in eine 96 Well-Platte pipettiert. Die Probenmenge wurde mit Wasser auf 160 μl Gesamtvolumen aufgefüllt. Danach wurde jeweils 40 μl pures Bradford Reagenz in jede Probenkavität hinzugegeben. Diese Mischung wurde mit einer Pipette durchmischt, wobei darauf zu achten war, dass keine Luftblasen entstanden. Wenn sich kein Farbumschlag zu türkis, sondern die typische Blaufärbung einstellte, war die Verdünnung ausreichend und es wurde am Photometer bei 595 nm nach fünf Minuten Wartezeit die Absorption gemessen. Parallel zur Probenverteilung auf der 96 Well-Platte wurde eine Rinderserumalbumin (BSA) Eichreihe mit einer finalen Protein Konzentration von 0, 2, 4, 6, 8 und 10 $\mu\text{g/ml}$ aufgetragen. Der Farbstoff- Protein- Komplex war für eine Stunde stabil.

2.3.3 Gießen der Sammel- und Trenngele

Es wurden separat Sammel- und Trenngele gegossen. Eine Glas- und eine Teflonplatte wurden durch sogenannte Abstandhalter voneinander getrennt, sodass ein 1 mm breiter Abstand zwischen den beiden Platten entstand. Durch Klammern wurden die Platten aneinander fixiert, um dann in einem Gelgießstand auf einem Gummiboden vertikal arretiert zu werden.

Am Vortag des Experimentes wurde das Trenngel, je nach gewünschter Prozentigkeit und damit Porengröße, nach der Rezeptur (siehe Tab.11) für Natriumdodecylsulfat (SDS) Gele angesetzt. Bei der Einfüllung des noch flüssigen Trenngels in die Kammer zwischen Glasplatte und Teflonplatte musste vorsichtig pipettiert werden, um keine Luftblasen entstehen zu lassen. Zur Lagerung über Nacht auf der Arbeitsfläche bei RT wurde das Gel mit 400 μl 0,1 % SDS-Lösung überschichtet, mit einem wasserge tränkten Tuch und Klarsichtfolie abgedeckt. Das Sammelgel wurde unmittelbar vor dem Auftragen der Proben angesetzt (siehe Tab.12). Zur Bildung von Proben-Taschen im Sammelgel wurde ein zehner oder zwölfzahniger Kamm verwendet, der den benötigten Platz für die später aufgetragenen Proben im Sammelgel frei hielt. Das Gel wurde nach Zugabe von Ammoniumperoxodisulfat (APS) und Tetramethylethyldiamin (TEMED) zügig zwischen Glasplatte und Teflonplatte auf das Trenngel pipettiert. Die Polymerisation des Sammelgels dauerte 30 Minuten. Alle verwendeten Komponenten wurden vor Benutzung mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ und 70 %igem Alkohol gereinigt.

Tabelle 11: Pipettierschema Trenngel

Komponenten für Trenngel	Mengen für 10,0% Gel	Mengen für 12,5% Gel
Acrylamid (30/0,8) (v/v)	9,75 ml	12,18 ml
4x Trenngelpuffer, pH 8,8	7,5 ml	7,5 ml
Glycerin/Bidest (1:1)	1,5 ml	1,5 ml
H ₂ O _{dd}	11,09 ml	8,65 ml
10% APS	150 µl	150 µl
TEMED	15 µl	15 µl

Tabelle 12: Pipettierschema Sammelgel

Komponenten für Sammelgel	Mengen für 3,3% Gel
Acrylamid (30/0,8) (v/v)	275 µl
8x Sammelgelpuffer, pH 6,8	312,5 µl
H ₂ O _{dd}	1885 µl
10% APS	25 µl
TEMED	7,5 µl

2.3.4 Eindimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

In dieser Arbeit wurde die eindimensionale Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) im diskontinuierlichen Gel- und Puffer-System nach Lämmli (Laemmli, 1970) verwendet. Die Diskontinuität bezieht sich auf die Gelstruktur, den pH-Wert und die Art und Konzentration der Ionen in den verschiedenen Puffern. Ein großporiges Polyacrylamid (PA)-Sammelgel (3,3 %) wird einem engporigen PA-Trenngel (10 % oder 12,5 %) aufgelagert. Das durch radikalische Polymerisierung von Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid entstehende PA, diente dabei als molekulares Sieb, bei dem die Porengröße durch den prozentualen Gehalt an Acrylamid angegeben wurde. Der Elektrodenpuffer enthielt Tris-Glycin (pH 8,8), der Proben- und Sammelgelpuffer Tris-HCl (pH 6,8). Der Trenngelpuffer enthielt Tris-HCl mit einem pH-Wert von 8,8. Nach Anlegen der Spannung wanderten die negativ geladenen Chlorid Ionen in Richtung Anode (sog. Leitonen) und die Glycinmoleküle bewegten sich relativ zu den Chlorid Ionen langsamer in Richtung Anode (sog. Folgeionen). Das Feld, welches sich zwischen diesen Gegenionen bildete, war eine Zone geringer Ionendichte in der sich die SDS-Proteinkomplexe verdichteten und schließlich in das Trenngel übergingen. Die Proteine wurden durch Zugabe von SDS denaturiert und erhielten eine negative Ladung. Im Trenngel bewirkte der Anstieg des pH-Wertes, dass das Glycin negativ geladen wurde und dieses die Proteine überholte. Die Proteine wurden in dem engporigen Trenngel durch unterschiedlich starke Wechselwirkungen mit der Gelmatrix

retardiert und damit nach dem Molekularsiebeffekt aufgetrennt. Solange sich die Proteine im Sammelgel befanden waren 100 V eingestellt. Ab dem Übergang in das Trenngel -sichtbar an den erscheinenden farbigen Banden des Markers- wurde die Voltzahl auf 150 V eingestellt. Je nach Prozentigkeit/Größe des Gels und der angelegten Spannung lief die Elektrophorese für zwei bis drei Stunden. Das Gel wurde abschließend einer Coomassie Brilliantblau Färbung und/oder einem Western Blot unterzogen.

2.3.5 Western Blot und Immunodetektion durch Chemoluminiszenz

In der vorliegenden Arbeit wurde das Verfahren des Tank-Blots (Wet-Blot) angewandt. Es wurde das Mini Trans-Blot System der Firma Biorad (München, Deutschland) verwendet. Hierbei wurden Proteine aus einer PA-Gelmatrix auf eine Nitrozellulosemembran (Trägermembran, NC) transferiert. Dieser Prozess vollzog sich in einem vertikalen Puffertank, welcher mit Transfer-Puffer befüllt war. Die Übertragung der Proteine auf die Membran erfolgte durch Elektrophorese. Dazu wurde die Gelmatrix und die NC-Membran zwischen Blottingpapier und Blotschwämmen eingepackt und zwischen zwei Elektroden gesteckt, die seitlich im Tank angebracht waren. Dem Tank wurde für 75 Minuten ein elektrisches Feld von 0,35 milli Ampere (mA) angelegt. Ein Kühlakku in der Blotting-Kammer erzeugte eine beständige konvektive Umwälzkühlung, um den Aufbau eines Ionen-Gradienten zu verhindern. Außerdem stellte der Kühlakku eine homogene Temperatur innerhalb der Kammer her. Nach dem Transfer wurde die Membran mit PonceauS gefärbt, um den Erfolg der Übertragung der Proteine aus dem Gel auf die Membran zu überprüfen.

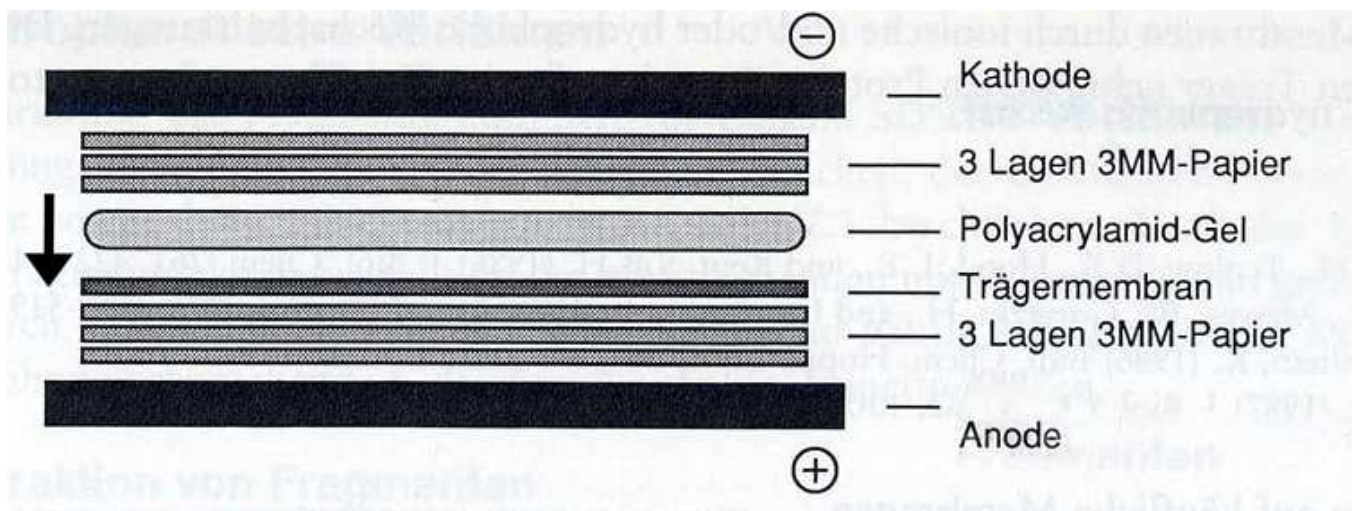


Abbildung 5: Schematische Darstellung der elektrophoretischen Übertragung im Tank-Blot.

Die Proteine in dem PA-Gel werden beim Anlegen einer Spannung zwischen Anode und Kathode auf die Trägermembran übertragen (schwarzer Pfeil). Abb. modifiziert nach Bertram und Gassen, 1991.

Zur Dokumentation wurde die rot eingefärbte Membran auf einem Scanner fotografiert. Um unspezifische Wechselwirkungen der Primär-Antikörper mit der Membran zu verhindern wurde diese über Nacht in Milchpulver 5% / BSA 1 % (w/v) in 0,1 % (v/v) Tween-20 gelöst in phosphatgepufferter Salzlösung

(PBS) bei 4 °C blockiert. Im Anschluss wurde die Immunreaktion auf der abgesättigten Membran durchgeführt. Dazu wurde die Membran mit dementsprechend verdünnten Primärantikörper für ein bis zwei Stunden bei RT inkubiert. Der Primärantikörper wurde mit 5 % (w/v) Milchpulver, gelöst in phosphatgepufferter Salzlösung mit 0,1 % (v/v) Tween-20 (PBST), verdünnt. Nach der Primärantikörper Inkubation wurde die Blotmembran mit PBST in drei Waschschritten á zehn Minuten gewaschen. Die Primärantikörperlösung wurde nach der Verwendung bei -80 °C gelagert und bis zu dreimal wieder verwendet. Die Membran wurde daraufhin mit dem entsprechenden Meerrettichperoxidase gekoppelten Sekundärantikörper mit 5 % (w/v) Milchpulver, gelöst in PBST, für eine Stunde bei RT inkubiert und danach wie weiter oben beschrieben sechsmal gewaschen. Der Immunkomplex wurde unter Verwendung von Pierce® Enhanced Chemoluminescence (ECL) Western Blotting Substrate der Firma Thermo Scientific (Hennigsdorf, Deutschland) durch Belichtung auf einem Röntgenfilm im Fotolabor sichtbar gemacht.

2.3.6 Western Blot und Immunodetektion multipler Antigene mittels Odyssey System

Das verwendete Odyssey System (Li-cor, Odyssey Near Infrared Imaging System) erlaubte es zwei verschiedene IR Farbstoffe für eine gleichzeitige Zweifarben Detektion zu verwenden. Im Falle der in dieser Arbeit gezeigten Experimente wurden zwei verschiedene Primärantikörper und zwei verschiedene Sekundärantikörper mit unterschiedlichen Farbstoffen auf demselben Blot verwendet. Die Sensitivität des Odyssey Systems ist vergleichbar mit Chemolumineszenz auf Röntgenfilm und bietet zudem den Vorteil einer statischen Analyse des Infrarot Signals über einen längeren Zeitraum, ohne Signalverlust. Die SDS-Page und der Western Blot wurden wie bereits unter 2.3.4. und 2.3.5 beschrieben durchgeführt. Die NC-Membran wurde mit 2 % (w/v) Milchpulver in TBS über Nacht bei 4 °C blockiert. Die Membran wurde mit Primärantikörper mit 2 % (w/v) Milchpulver und 0,1 % Tween-20 gelöst in TBS ein bis zwei Stunden bei RT inkubiert. Es folgten drei Waschschrritte á fünf Minuten mit TBST (0,1 % Tween-20). Die Inkubation mit LI-COR IRDye- gekoppelten Sekundärantikörpern erfolgte mit 2% (w/v) Milchpulver und 0,02 % (v/v) SDS in TBST (0,01 % Tween-20) bei RT in Dunkelheit für eine Stunde. Nach drei weiteren Waschschrritten mit TBST (0,1 % Tween-20) wurde die Membran im Dunkeln getrocknet und mit dem Odyssey Scanner analysiert.

2.3.7 Färbung von Proteinen in PA-Gelen

Coomassie Brilliantblau R-250 bindet in saurem Medium hauptsächlich durch elektrostatische Wechselwirkung an freie geladene Amino- und Iminogruppen der Proteine. Dadurch ergibt sich eine signifikante Korrelation zwischen der Farbintensität und dem Anteil des jeweiligen Proteins an Lysin, Arginin und Histidinresten. Die Nachweisgrenze dieser klassischen Färbemethode liegt bei 0,3 – 1 µg pro Proteinbande. Das SDS – Gel wurde nach Entfernung des Sammelgels in der Coomassie Brilliantblau Färbelösung für 60 Minuten bei RT unter leichter Bewegung (Schüttler) inkubiert. Die Färbelösung wurde abgegossen und Entfärber I Lösung wurde für 30 Minuten auf das Gel gegeben. Wiederum wurde

bei RT unter leichter Bewegung inkubiert. Mit Entfärber Lösung II wurde das Gel bei RT unter leichtem schütteln über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Gel zur Konservierung getrocknet, densitometrisch vermessen und zur Molekulargewichtsbestimmung der aufgetrennten Proteine genutzt. Für die folgende gaschromatographische Untersuchung wurde Coomassie Safe blue verwendet (50 ml auf das Gel für 1 Stunde). Danach wurde das Gel 3 x 10 Minuten lang mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ gewaschen.

2.4 Histologische Methoden

2.4.1 *Whole mount* Immunfluoreszenzfärbungen

Die Immunfluoreszenzuntersuchungen wurden stets an *skinned larvae* (d.h. TritonX-100, 1 % (v/v) Behandlung für 15 Minuten bei 4 °C) Gewebe durchgeführt. Dazu wurden die Embryonen immer frisch aus der Petrischale mit Aquarienwasser in eine mit gekühltem Dissektionspuffer gefüllte Schale transferiert. Hier wurden die Tiere mit dem Fischanästhetikum Tricaine anästhesiert, dekapitiert und der Dotterball mitsamt Dotterstil entfernt. Die Autofluoreszenz des Dotters würde ansonsten später bei der Analyse unter dem Fluoreszenz-Mikroskop ein störendes Hintergrundsignal erzeugen. Die Tiere wurden in ein Reaktionsgefäß gegeben und für 15 Minuten bei 4 °C in Skinning Puffer (TritonX-100 1 % (v/v)) unter leichtem schütteln inkubiert. Nach der Behandlung mit dem Detergenz wurde das Gewebe dreimal gründlich mit Dissektionspuffer gewaschen, um das Triton-X100 zu entfernen. Unspezifische Antikörperbindungsstellen wurden durch Inkubation in 3 % (v/v) Ziegenserum und 1 % (w/v) BSA in Dissektionspuffer für 30 Minuten auf Eis abgesättigt. Der Primärantikörper wurde unter Nutzung des Zenon® IgG Labeling Kits, durch Zugabe von Labeling Reagenz (fünf Minuten bei RT) in einem molaren Verhältnis von 3 „antigen-binding fragments“ (Fab) zu 1 Primärantikörper, mit einem Fluorophor markiert. Dabei erkennt ein Fab, welches ein Fluorophor trägt, das Fc-Fragment des Immunglobulin G (IgG) Antikörpers und bindet daran. Durch die Zugabe von Blockierungsreagenz für fünf Minuten bei RT wurden ungebundene Fab neutralisiert, um Kreuzkontaminationen bei der Nutzung mehrerer Primärantikörper desselben Typs zu verhindern. Das entstandene Antikörper-Konjugat wurde in einer entsprechenden Verdünnung für mindestens ein bis zwei Stunden bei 4 °C im Dunkeln auf die Proben gegeben. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass die Fab-Antikörper-Konjugate kleiner und somit leichter in das engmaschige Filamentgitter des Skelettmuskels eindiffundieren konnten. Nach anschließenden Waschen (2 x 5 Minuten Dissektionspuffer) wurden die Proben auf einen Objektträger gegeben und mit einem Deckgläschen vorsichtig gequetscht. Abschließend wurden die Quetschpräparate mit einem Konfokalen Fluoreszenzmikroskop der Firma Olympus (Hamburg, Deutschland) untersucht.

2.4.2 Konfokale Mikroskopie

Die konfokale Mikroskopie erhöht die Auflösung und den Kontrast von Mikrographen durch die Eliminierung von Licht außerhalb der Fokusebene. Dabei erreicht ein konfokales Mikroskop eine sehr geringe

Tiefenschärfe und ermöglicht in z-axialer Richtung virtuelle optische Schnitte durch das Objekt mit entsprechenden Detailinformationen. Kohärentes Licht wird von einem Laser-System emittiert und durch eine Lochblende zu einem dichroitischen Spiegel gesendet

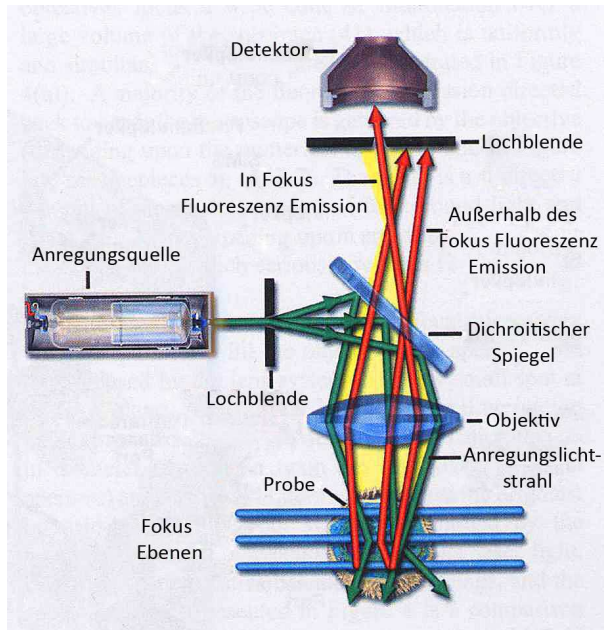


Abbildung 6: Schemazeichnung des Strahlengangs in einem Laser Scanning konfokalen Mikroskop Abb. modifiziert nach Claxton et al., 2006.

Der Laser wird durch den dichroitischen Spiegel reflektiert und dient zur Anregung der Fluoreszenz in den Fluorophoren der Probe. Fluoreszenz beruht auf der Absorption von kurzwelligem Licht und der anschließenden spontanen Emission langwelligeren Lichts. Mit Hilfe eines dichroitischen Spiegels wird das kurzwelligere Licht auf die Probe geleitet und vom Detektor abgeschirmt. Durch den Einsatz verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe und Anregungsquellen ist es möglich in der gleichen Probe mehrere unterschiedliche Antikörper zur Detektion von verschiedenen Proteinen zu verwenden. Die emittierte Fluoreszenz kann den Spiegel aufgrund der geänderten Wellenlänge passieren und wird an einer weiteren Lochblende, welche nur fokussiertes Licht aus einem bestimmten sehr kleinen Bereich der Probe durchlässt auf einen Detektor geleitet.

2.4.3 Vorbereitung von Zebrafähring Embryonen für die Transmissionselektronenmikroskopie

Die Fixierung von Präparaten für die Elektronenmikroskopie beinhaltet eine Glutaraldehydfixierung der Gewebeproteine und eine anschließende Stabilisierung der Membranen mit Osmiumtetroxid. Von den daraufhin in Epon eingebetteten Proben wurden mit einem Ultramikrotom Ultradünnschnittserien erstellt, welche abschließend wiederholt mit den Schwermetallsalzen Uranylacetat und Bleicitrat kontrast-

tiert wurden. Die Elektronenmikroskopie wurde zusammen mit dem Labor von Professor Achilleas Frangakis in Frankfurt am Main, wie folgt durchgeführt:

Die Fixierung mit 1,5 % (v/v) Glutaraldehyd, 1,5 % (w/v) Formaldehyd in 0,1 M Cacodylat Puffer, erfolgte sofort nach der Tötung der Tiere in Köln. Die anschließende Einbettung und Kontrastierung erfolgte zusammen mit Frau Anja Habermann in Frankfurt am Main. Die Proben wurden zunächst mit 0,1 M Cacodylat Puffer 3 x 30 Minuten gewaschen. Im Anschluss wurden die Fischembryonen in Osmiumtetroxid für eine Stunde inkubiert. Danach wurde mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ 3 x 30 Minuten gewaschen. Uranylacetat Lösung (0,5 %) wurde über Nacht auf die Proben gegeben. Eine Aceton Reihe wurde zur Entwässerung des Gewebes angesetzt und anschließend wurden die Tiere einer Epon – Aceton Reihe ausgesetzt bis Sie schließlich bei einem Verhältnis von 2 Teilen Epon zu 1 Teil Aceton über Nacht auf den Schüttler gestellt wurden. Die Tiere wurden für die Transmissionselektronenmikroskopie in 100% Epon zwischen 2 Objektträgern flach eingebettet. Dabei wurden die Objektträger mit Polytetrafluorethylen (PTFE) „Release Agent“ der Firma Ted Pella, Inc. (Wetzlar, Deutschland) überzogen. PTFE erleichterte später das Ablösen des gehärteten Epon Harzes von den Objektträgern. Die Objektträger wurden abschließend bei 80 °C getrocknet. Nach der Trocknung wurden die im Epon Harz eingebetteten Proben mit einer Rasierklinge in die benötigte Form gebracht, um danach mit einem Ultramikrotom geschnitten zu werden. Nach einer Nachkontrastierung der Ultradünnschnitte zuerst mit dem Schwermetallsalz Uranylacetat und danach mit Bleicitrat konnten diese im TEM untersucht werden.

2.5 Biomechanische Methode

2.5.1 Isometrische Kraftmessung an intakten Zebrabärbling Embryonen

Biomechanische Analysen an Zebrabärbling Embryonen wurden bisher an toten Zebrabärblingen in Krebs Puffer wie dieser auch in Organ Bädern verwendet wird durchgeführt (Dou et al., 2008). Zur Bestimmung der Kraftamplituden und der Kinetik der Kraftentwicklung an lebenden Zebrabärbling Embryonen in Frischwasser wurde von meinem Kollegen Jan Eckhardt am Institut für Vegetative Physiologie eine neue Methode etabliert. Der Zebrabärbling Embryo wurde zwischen Kopf und Dottersack äußerst vorsichtig mit einer Nylon Schlaufe, welche Ihrerseits an einem Kraftaufnehmer befestigt war, fixiert. Das Ende des Schwanzes wurde ebenfalls mit einer Nylon Schlaufe fixiert. Die Fesselung des Tieres durch die beiden Schlaufen konnte durch Zugabe von Histoacryl Kleber verbessert werden. Die Temperatur in der Kammer, welche mit Frischwasser befüllt war, konnte nach Belieben justiert werden. Es wurde stets bei RT gemessen. Die Kammer war auf einem Mikroskop montiert und erlaubte damit eine bessere Probenmanipulation. Der Kraftaufnehmer hatte hinreichende Sensitivität und Resonanzfrequenz, um die Amplitude und die Kinetik der Kraftentwicklung zu analysieren. Reproduzierbare Einzelschübe der Muskulatur wurden durch elektrische Feldstimulation (EFS mit 1 Hz und 1,1 ms Puls-

dauer) ausgelöst. Die Embryonen wurden vorgedehnt, damit die maximale Kraft bei 1,1 ms dauernden Pulsen bestimmt werden konnte.

2.6 Erklärung zu verwendeten Chemikalien und Enzymen

In der vorliegenden Arbeit wurden Chemikalien in *pro analysi*-Qualität der Firmen Merck AG (Darmstadt, Deutschland), Sigma (Deisenhofen, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Amersham (Wien, Österreich) und Applichem (Darmstadt, Deutschland) verwendet. Restriktionsenzyme, inklusive der zugehörigen Puffer, stammten von der Firma New England Biolabs (NEB; Schwalbach, Deutschland). Für alle Puffer wurde autoklaviertes H₂O_{dd} verwendet.

2.7 Stammlösungen

10x PBS Stammlösung

Die 10 fache PBS Stammlösung enthielt 1,4 M NaCl, 100 mM KCl, 80 mM Na₂HPO₄, KH₂PO₄ und wurde auf einen pH von 7,4 eingestellt.

10x TBS Stammlösung

Die 10 fache TBS Stammlösung enthielt 1,5 M NaCl, 500 mM Tris HCl und wurde auf einen pH von 7,4 eingestellt.

50x TAE Stammlösung

Die 50 fache TAE Stammlösung enthielt 2 M Tris Base, 50 mM EDTA (pH 8,0) und 1 M Essigsäure.

4x Trenngel-Puffer für SDS-PAGE

Der 4 fache Trenngelpuffer für die SDS-PAGE enthielt 2 M Tris, 20 % SDS und wurde auf einen pH von 8,8 eingestellt.

8x Sammelgelpuffer für SDS-PAGE

Der 8 fache Sammelgelpuffer für die SDS-PAGE enthielt 2 M Tris, 20 % SDS und wurde auf einen pH von 6,8 eingestellt.

10 % APS

10 %tige APS Lösung enthielt 440 mM APS.

10x Laufpuffer für SDS-PAGE

10 facher Laufpuffer für SDS-PAGE enthielt 250 mM Tris, 1,9 M Tricine und 20 % SDS.

2x Laemmli-Probenpuffer

Der 2 fache Laemmli-Probenpuffer enthielt Tris-HCl (pH 6,8), 20 % Glycerol, 4 % SDS und 0,005 % Bromphenolblau.

Imidazol Stammlösung

Die Imidazol Stammlösung enthielt 1 M Imidazol.

Dithiothreitol (DTT) Stammlösung

Die Dithiothreitol (DTT) Stammlösung enthielt 1 M DTT und wurde bei -20 °C zu jeweils 500 µl Aliquots gelagert.

K·Mg·Ac·Na·ATP Stammlösung

Die K·Mg·Ac·Na·ATP Stammlösung enthielt 50 mM Na₂ATP, 50 mM MgAc₂·4H₂O und wurde auf einen pH von 7,0 bei 20 °C eingestellt.

K₄Ac₂EGTA Stammlösung

Die K₄Ac₂EGTA Stammlösung enthielt 250 mM EGTA, 500 mM KAc und wurde auf einen pH von 7,0 bei 20 °C eingestellt.

Proteaseinhibitorcocktail (PIC, 200 fache Stammlösung)

Die 200 fache PIC Stammlösung enthielt 0,5 mM AEBSF, 14,7 µM Antipain, 0,75 mM Aprotinin, 10 µM Leupeptin und wurde in 50 mM Imidazol und 3 mM MgCl₂ bei pH 7,0 gelöst.

Dissektion- und Skinningpuffer

Der Dissektion- und Skinningpuffer enthielt 10 mM Imidazol, 3 mM MgAc₂·4H₂O, 5 mM K₄Ac₂EGTA, 3 mM K Mg Ac Na ATP, 47,7 mM Na₂ CrP, 2 mM DTT, 5 mM NaN₃, 30 mM BDM und wurde bei 4 °C auf einen pH von 7,0 eingestellt. Die Zugabe von 150 µl 200 facher PIC Stammlösung auf 30 ml Dissektion- und Skinningpuffer erfolgte stets kurz nach dem Auftauen des Puffers.

Coomassie Brilliant Blue

Die Coomassie Brilliant Blue Färbelösung enthielt 0,25 % Coomassie BrilliantBlue R-250®, 40 % Ethanol und 10 % Essigsäure.

Entfärbelösung I

Die Entfärbelösung I enthielt 50 % Ethanol und 7 % Essigsäure.

Entfärbelösung II

Die Entfärbelösung II enthielt 5 % Ethanol und 7 % Essigsäure.

Tricaine (3-amino-benzoesäure-ethylester, MS222)

Die Tricaine Stammlösung enthielt 15 mM Tricaine (MS-222) und wurde auf einen pH von 7,0 eingestellt. Die Lagerung der Aliquots erfolgte bei -20 °C.

Methylcellulose

Bei 4 °C wurden 4 g Pulver Methylcellulose in 100 ml H₂O_{dd} über Nacht unter ständigem Rühren gelöst. Im Anschluß wurde die hoch viskose Lösung für eine Stunde bei 6500 rpm zentrifugiert.

Formaldehyd (1,5%)

Unter dem Abzug wurde Formaldehyd in Dissektionspuffer bei 50 °C unter ständigem Rühren innerhalb von ca. 5 Stunden gelöst. Im Anschluß wurde die Lösung in 15 ml Falcons aliquotiert und eingefroren (-20 °C).

2.8 Molekulargewichtsmarker

Bezeichnung	Hersteller
Seebblue® Plus2 Pre-stained Marker	Life Technologies, Darmstadt
Gene Ruler™ 50 bp DNA ladder	Thermo Scientific, Schwerte
Gene Ruler™ 100 bp DNA ladder	Thermo Scientific, Schwerte
Gene Ruler™ 1 kb DNA ladder	Thermo Scientific, Schwerte

2.9 Vektoren

Bezeichnung	Art	Hertsteller
pJET1.2/blunt	Klonierungsvektor	Thermo Scientific, Schwerte
CAP Z alpha 1 beta 1 CP	bakterieller Expressionsvektor	addgene, Cambridge, USA

2.10 Antikörper

Tabelle 13: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper für Western Blot (WB) und Immunfluoreszenz (IF)

Antikörperbezeichnung des Herstellers	Verdün- nung WB	Verdünnung IF
BioGenes <i>pan</i> -CPβ (BioGenes, 38647)	1:100	1:50
Capping protein β-1 (DSHB, mAb1E5.25.4)	1:500	1:20
Sarkomerisches α-Actinin (Sigma, A7811)	---	1:800
β-actin (Sigma, AC-74)	1:2000	---
IRDye 700 DX IgG anti Maus (Li-Cor, 928-38048)	1:15000	---

IRDye 800 CW anti Maus (Li-Cor, 926-32212)	1:15000	---
Zenon® Alexa Fluor 488 IgG1 anti Maus (Z-25002)	---	Molares Verhältnis von 3 (Fab) zu 1 (pAK)
Zenon® Alexa Fluor 555 IgG1 anti Maus (Z-25005)	---	Molares Verhältnis von 3 (Fab) zu 1 (pAK)

2.11 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden bei der Firma MWG Operon synthetisiert und im lyophilisiertem Zustand geliefert. Sie wurden vor der Verwendung in einer Konzentration von 100µM in H₂O_{dd} gelöst.

Tabelle 14: Verwendete Oligonukleotide zur Generierung von PCR-Produkten zur Klonierung und Sequenzierung

Nr.	Bezeichnung des Oligonukleotids	Sequenz des Oligonukleotids von 5'nach 3'	Gen-Name
018	CapZ87-107fwd	CGCTGACAGGGCAGGGTTGTT	<i>CPβ</i>
020	CapZ1364-1343rev	CGGCGATATTCCTGTGACGGGT	<i>CPβ</i>
037	startsiteE1xfwd	TGAATGAGCAGCAGTTGGACT	<i>CPβ</i>
038	StopsignalE8xrev	CTAGCTCTGCTGTTTGCGTTG	<i>CPβ2</i>
039	startsiteE1yfwd	AATGAGCAGCAGTTGGACTGT	<i>CPβ</i>
040	StopsignalE8yrev	CGCTGCAGCTGACGATACTT	<i>CPβ1</i>

Die verwendeten Morpholino-modifizierten Oligonukleotide (MO) wurden von der Firma Gene Tools, LLC (Philomath, USA) hergestellt und bezogen.

Tabelle 15: Verwendete Morpholino-modifizierte Oligonukleotide (MO) und ihre Sequenz.

Bezeichnung des MO	Sequenz des MO von 5' nach 3'	Gen-Name
CAPZbetastartsite	CAGTCCAAGCTGCTCATTTCATGT	<i>Zebrabärbling CPβ</i>
capzbetaspliceE3I3	GTGTAGTGAGCGTGTCTGACCTGTA	<i>Zebrabärbling CPβ</i>
Capzbeta5UTR	GTGTTTCTGGACGCTTGAATAGCTC	<i>Zebrabärbling CPβ</i>
Standard Control Oligo	CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA	<i>Humanes β-globin</i>
Zebrafish p53 Oligo	GCGCCATTGCTTTGCAAGAATTG	<i>Zebrabärbling p53</i>

2.12 Kits

Bezeichnung

Hersteller

QIAquick® Gel Extraction Kit

Qiagen, Hilden

QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen,Hilden
QIAGEN Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
QuantiTect® Reverse Transcription Kit	Qiagen,Hilden
CloneJet™ PCR Cloning Kit	Thermo Scientific, Schwerte
Maxwell® Simply RNA cell Kit	Promega, Mannheim
mMESSAGE mMACHINE® T7 Ultra	Life Technologies, Darmstadt
Zenon® IgG Labeling Kit	Life Technologies, Darmstadt

2.13 Geräte

Bezeichnung

Hersteller

Autoklav

Varioklav 400 E

H+P Labortechnik, Obeschleißheim

Elektrophorese

Powerpack 200

Biorad, München

Sub-cell GT AgaroseGEL *electrophoresis System*

Biorad, München

Gel System *Mighty Small 250*

Hoefer, Hollisto, USA

Gel System SE600

Hoefer, Hollisto,USA

Heizblöcke

Thermoblock

Eppendorf, Hamburg

Injektionsjoystick

InjectMan® NI2

Eppendorf, Hamburg

Injektionspumpe

Femtojet®

Eppendorf, Hamburg

Inkubator

Heracell

Heraeus, Hanau

Brutschrank 5050 E

Heraeus, Hanau

Nadelzieher

P-1000 Micropipette Puller

Sutter Instrument, Novato, USA

Mikroskop

Cx41RF

Olympus, Hamburg

SZ51 Stereomikroskop	Olympus, Hamburg
Digital Sight DS-2MV (Kamera)	Nikon, Düsseldorf
FV1000 Multiphoton Laser Scanning Confocal Microscope	Olympus, Hamburg
<u>PCR Gerät</u>	
Thermocycler	Biometra, Göttingen
<u>Photometer</u>	
DU 640 Spektrophotometer	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld
Nanodrop Spectrophotometer DN-1000	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Odyssey Near Infrared Imaging System	Li-Cor Biosciences, Bad Homburg
Multiskan MS Plate ELISA Reader	Thermo Scientific, Schwerte
<u>pH-Meter</u>	
Microprocessor pH/Ion Meter	
pMX300	WTW, Weilheim
pH 526	WTW, Weilheim
<u>RNS Isolation</u>	
AS2000 Maxwell 16	Promega, Mannheim
<u>Rührer</u>	
IKAMAG RH	IKA Labortechnik, Staufen
KMO2 basic	IKA Labortechnik, Staufen
<u>Schüttler</u>	
Innova 4300	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Innova 4000	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
<u>Ultraschall</u>	
Branson Digital Sonifire	Heinemann, Schwäbisch Gemünd

UV-Transilluminatoren

GelVue GVM20	SYNGENE, Cambridge, GB
Intas Gel Jet Imager 2000	Intas, Göttingen

Waagen

Typ 2472	Sartorius, Göttingen
KERN 822	Gottlieb Kern und Sohn, Albstadt
Typ 1412 MP 8-1	Sartorius, Göttingen
FA-11-4i	Faust, Schaffhausen, Schweiz

Wasserbad

RM6	Lauda, Königshausen
SF	Haake/Fisons, Karlsruhe

Zentrifugen

Typ 5417	Eppendorf Hamburg
Typ 5403	Eppendorf, Hamburg
Avanti J-25I	Beckmann Coulter, Krefeld
Biofuge primo R	Heraeus, Hanau

2.14 Plastikwaren**Bezeichnung**

BD Conical Tubes
 BD Pipets
 Maxisorb 96 well ELISA plates
 Petrischalen
 Pipettenspitzen
 Einmalpipetten
 Safeseal Reagiergefäße

Hersteller

BD Biosciences, Heidelberg
 BD Biosciences, Heidelberg
 Nalgene Nunc International, New York, USA
 Greiner Bio One, Frickenhausen
 Greiner Bio One, Frickenhausen
 VWR International, Langenfeld
 Sarstedt, Nümbrecht

2.15 Glaswaren

Bezeichnung	Hersteller
Deckgläser	Menzel GmbH, Braunschweig
Objektträger	Thermo Scientific, Schwerte
Gefräste Objektträger	VWR International, Langenfeld
Präparierschalen	VWR International, Langenfeld

2.16 Transformation

LB-Medium

Das LB-Medium enthielt 1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt und 1 % NaCl und wurde in 1 l H₂O_{dd} gelöst. Das Autoklavieren des LB-Mediums erfolgte mit nicht fest zugedrehtem Flaschendeckel.

LB-Agar-Platten

Die LB-Agarplatten wurden wie LB-Medium hergestellt und 1,5 % Agar wurde noch hinzugegeben. Nach dem Autoklavieren wurde es auf Handwärme abkühlen gelassen, gegebenenfalls mit Antibiotikum (1:1000) versetzt und in Petrischalen gegossen.

2.17 Bakterienstamm

Bezeichnung	Hersteller
E.coli DH5 α TM	Life Technologies, Darmstadt

2.18 Zebrabärblingstamm

Bezeichnung	Hersteller
COL Stamm	Eigene Zucht

2.19 Software und Internetbasierende Dienste

Bezeichnung	Hersteller
Adobe® Photoshop CS3	Adobe Systems, Inc., San Jose, USA
Adobe® Reader 10.0.1	Adobe Systems, Inc., San Jose, USA
Corel Draw® X4	Corel Corporation, Ottawa, Kanada

Graph Pad Prism 4	Graphpad Software, Inc., La Jolla, USA
ImageJ 1.43u	National Institutes of Health
Microsoft Office 2010	Microsoft Corporation, Redmond, USA

Reverse Complement Tool http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html

Fluorescence Spectra Viewer <https://www.lifetechnologies.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html>

Clustal Omega <http://www.clustal.org/omega/>

Primer BLAST http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome

ExpASy <http://web.expasy.org/translate/>

Des Weiteren wurden die Dienste von PubMed (NCBI), BLAST (Altschul et al., 1997) sowie der Zebraabärling Datenbank ZFIN (www.zfin.org) (Sprague et al., 2001) in Anspruch genommen.

2.20 Externe Unternehmen

BioGenes GmbH, Koepenicker Straße 325, 12555 Berlin

Servicelabor des Zentrums für molekulare Medizin, Robert-Koch-Str. 21, 50931 Köln

Eurofins Genomics GmbH, Anzinger Straße 7a, 85560 Ebersberg

GeneTools, LLC, 1001Summerton Way, Philomath, OR 97370, USA

3 Ergebnisse

3.1 Funktionelle Analyse von CP β im Zebrabärbling

3.1.1 Bioinformatische Analyse und Klonierung der CP β Spleißvarianten im Zebrabärbling

Bereits 1994 wurden die zwei verschiedenen Isoformen der CP β Untereinheit vom Huhn beschrieben (Schafer et al., 1994). Eine Darstellung der CP β Isoformen vom Zebrabärbling erfolgt erstmals in dieser Arbeit. Zebrabärbling CP β (capping protein (actin filament) muscle Z-line, beta, ZFIN: Acc:ZDB-GENE-030131-7023) weist wie das CP β vom Huhn auch zwei unterschiedliche Isoformen auf, welche durch alternatives Spleißen entstehen. Im Gegensatz zum Huhn und diversen anderen Vertebraten findet sich kein Eintrag der Zebrabärbling cDNS von CP β 1 in den Datenbanken. In den Datenbanken findet man nur die CP β 2 Sequenz, die fälschlicherweise als CP β 1 Sequenz deklariert ist. Ein Sequenzvergleich auf Nukleinsäureebene mit dem „Basic Local Alignment Search Tool“ (BLAST, Altschul et al., 1997) des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) des Introns 8 von Zebrabärbling CP β 2 mit der Sequenz von Exon 9 des Hühner CP β 1 ergibt eine Sequenzhomologie. Die erste wichtige Entdeckung dieser Arbeit ist also das Auffinden des CP β 1 spezifischen Exons 9. Vermutlich hat ein Suchalgorithmus die Exon-Intron Grenze nicht erkannt und so liegt die Exon Sequenz von CP β 1 als Teil eines Introns in den Datenbanken vor. Nach der *in silico* Identifikation des Exon 9 von CP β 1 und der Bestätigung durch Sequenzierungen ergibt sich für CP β 1 cDNS ein offener Leserahmen von 822 Basen (Abb. 8, C), welcher für ein Protein von 274 Aminosäuren (Abb.7, A) kodiert. Die bisher in den Datenbanken als CP β 1 deklarierte Sequenz ist nach Sequenzierung und Sequenzvergleich mit Huhn / Maus CP β als CP β 2 cDNS Sequenz identifiziert. CP β 2 verfügt über einen offenen Leserahmen von 819 Basen (Abb.8, C), welcher für ein Protein von 273 Aminosäuren kodiert. Die Sequenzähnlichkeit auf Proteinebene von Zebrabärbling CP β 1 und CP β 2 zu Hühner CP β beträgt 96% bzw. 95%. Die Sequenzähnlichkeit von Zebrabärbling CP β 1 und CP β 2 zu Maus CP β Proteinen beträgt 93% bzw 94%. Beim Vergleich der beiden CP β Isoformen zeigen sich sowohl Unterschiede im C-terminalen Bereich der Aminosäuresequenz der Zebrabärbling CP β Isoformen untereinander als auch beim Vergleich von Zebrabärbling CP β 1 und CP β 2 zu Huhn und Maus CP β 1 und CP β 2 (Abb. 7, A und B, mit Strich markierter Bereich). In der Zebrabärbling Genomdatenbank (NCBI) findet sich ein Genort für CP β auf Chromosom 22. Eine Durchsuchung der „Expressed sequence tag“ (EST)-Datenbanken führt zu einem passenden Transkript für CP β . Diese Beobachtungen und die Tatsache das beide Isoformen eine 99%ige Sequenzhomologie im Bereich von Exon 1 bis Exon 8 auf Nukleinsäureebene aufweisen lässt die Vermutung zu, dass es sich um zwei Spleißvarianten handelt und es kein weiteres Genduplikat im Zebrabärbling Genom gibt. Die Spleißvarianten vom Zebrabärbling CP β Gen unterscheiden sich nur in der Nukleotidsequenz von Exon 9 (Abb. 8, C) und

der Länge der 3'UTR. Zudem hat CPβ1 ein Exon mehr als CPβ2. Dieses Exon befindet sich in der 3'UTR und führt zu dem beobachteten Längenunterschied der CPβ1 3'UTR verglichen mit CPβ2 3'UTR. Dieses alternative Exon 9 der CPβ1 Isoform ist drei Basen länger als das Exon 9 von CPβ2 und fehlt in der Nukleotidsequenz von CPβ2. Das Exon 9 der Isoform CPβ1 wird ab sofort als Exon 9(1) bezeichnet und das Exon 9 der CPβ2 Isoform als Exon 9(2). Exon 9(1) und Exon 9(2) sind in der Sequenz von CPβ1 enthalten, wobei Exon 9(1) proteinkodierend ist und Exon 9(2) den ersten Teil der 3'UTR bildet. Die CPβ2 Sequenz enthält nur Exon 9(2), welches den C-terminalen Teil des CPβ2 kodiert. Ein Aminosäuresequenzvergleich der Zebrabärbling CPβ Isoformen mit Huhn und Maus CPβ Isoformen ist in Abb.7 gezeigt.

A

Danio_erio	MNEQQLDLDCALDMRRLPPQQIEKNLSDLIDLVPFLCEDLLSSVDQPLKIARDKVVGKDYL	60
Gallus_gallus	MSDQQLDLDCALDMRRLPPQQIEKNLSDLIDLVPFLCEDLLSSVDQPLKIARDKVVGKDYL	60
Mus_musculus	MSDQQLDLDCALDMRRLPPQQIEKNLSDLIDLVPFLCEDLLSSVDQPLKIARDKVVGKDYL	60
	*.:*****	
Danio_erio	LCDYNRDGDSYRSFWSNKYPPIDDGAMP SARLRKLEVEANNAFDQYRDLYFEGGVSSVY	120
Gallus_gallus	LCDYNRDGDSYRSFWSNKYPPLEDGAMP SARLRKLEVEANNAFDQYRDLYFEGGVSSVY	120
Mus_musculus	LCDYNRDGDSYRSFWSNKYPPLEDGAMP SARLRKLEVEANNAFDQYRDLYFEGGVSSVY	120
	*****:***:*****	
Danio_erio	LWDLDHGFAGVILIKKAGDGSKKIKGCWDSIHVVEVQEKSSGRTAHYKLTSTVMLWLQIT	180
Gallus_gallus	LWDLDHGFAGVILIKKAGDGSKKIKGCWDSIHVVEVQEKSSGRTAHYKLTSTVMLWLQTN	180
Mus_musculus	LWDLDHGFAGVILIKKAGDGSKKIKGCWDSIHVVEVQEKSSGRTAHYKLTSTVMLWLQTN	180
	*****:	
Danio_erio	KTGSGTMNLGGSLTRQMEKDETVSESSPHIANIGRLVEEMENKIRSTLNEIYFGTKDIV	240
Gallus_gallus	KTGSGTMNLGGSLTRQMEKDETVSDSSPHIANIGRLVEDMENKIRSTLNEIYFGTKDIV	240
Mus_musculus	KSGSGTMNLGGSLTRQMEKDETVSDCSPHIANIGRLVEDMENKIRSTLNEIYFGTKDIV	240
	*:*****:*****:*****:*****	
Exon 9(1)		
Danio_erio	NGLRSLDAIPDNQKRYQLQRELSQVLTQRQIYID---	274
Gallus_gallus	NGLRSLDAIPDNQKRYQLQRELSQVLTQRQIYIQPDN	277
Mus_musculus	NGLRSLDAIPDNHKKFQLQRELSQVLTQRQVYIQPDN	277
	*****:***:***:*****:***:	

B

Danio_erio	MNEQQLDLDCALDMRRLPPQQIEKNLSDLIDLVPFLCEDLLSSVDQPLKIARDKVVGKDYL	60
Gallus_gallus	MSDQQLDLDCALDMRRLPPQQIEKNLSDLIDLVPFLCEDLLSSVDQPLKIARDKVVGKDYL	60
Mus_musculus	MSDQQLDLDCALDMRRLPPQQIEKNLSDLIDLVPFLCEDLLSSVDQPLKIARDKVVGKDYL	60
	*.:*****	
Danio_erio	LCDYNRDGDSYRSFWSNKYPPIDDGAMP SARLRKLEVEANNAFDQYRDLYFEGGVSSVY	120
Gallus_gallus	LCDYNRDGDSYRSFWSNKYPPLEDGAMP SARLRKLEVEANNAFDQYRDLYFEGGVSSVY	120
Mus_musculus	LCDYNRDGDSYRSFWSNKYPPLEDGAMP SARLRKLEVEANNAFDQYRDLYFEGGVSSVY	120
	*****:***:*****	
Danio_erio	LWDLDHGFAGVILIKKAGDGSKKIKGCWDSIHVVEVQEKSSGRTAHYKLTSTVMLWLQIT	180
Gallus_gallus	LWDLDHGFAGVILIKKAGDGSKKIKGCWDSIHVVEVQEKSSGRTAHYKLTSTVMLWLQTN	180
Mus_musculus	LWDLDHGFAGVILIKKAGDGSKKIKGCWDSIHVVEVQEKSSGRTAHYKLTSTVMLWLQTN	180
	*****:	
Danio_erio	KTGSGTMNLGGSLTRQMEKDETVSESSPHIANIGRLVEEMENKIRSTLNEIYFGTKDIV	240
Gallus_gallus	KTGSGTMNLGGSLTRQMEKDETVSDSSPHIANIGRLVEDMENKIRSTLNEIYFGTKDIV	240
Mus_musculus	KSGSGTMNLGGSLTRQMEKDETVSDCSPHIANIGRLVEDMENKIRSTLNEIYFGTKDIV	240
	*:*****:*****:*****:*****	
Exon 9(2)		
Danio_erio	NGLRSVQPLADTKQEALKNDLIQALSQRKQQS	273
Gallus_gallus	NGLRSVQTFADKSKQEALKNDLVEALKRKQQS-	272
Mus_musculus	NGLRSVQTFADKSKQEALKNDLVEALKRKQQC-	272
	***** :***:*****:***:***:	

Abbildung 7: Aminosäuresequenzvergleich von Zebrabärbling (*Danio rerio*), Huhn (*Gallus gallus*) und Maus (*Mus musculus*) CPβ1 und CPβ2

(A) Aminosäuresequenzvergleich von Zebrabärbling (*Danio rerio*), Huhn (*Gallus gallus*) und Maus (*Mus musculus*) CPβ1. Der Ein-Buchstabencode der Aminosäuren wurde verwendet. Sterne (*) symbolisieren identische Aminosäuren, Doppelpunkte (:) symbolisieren Aminosäuren mit konservierten Eigenschaften wie Seitenkettenstruktur und Hydrophobizität, einzelne Punkte (.) symbolisieren Aminosäuren mit unterschiedlichen Eigenschaften und Striche (-) zeigen fehlende Aminosäuren in der Primärsequenz des Proteins an. (B)

Aminosäuresequenzvergleich von Zebrafisch (*Danio rerio*), Huhn (*Gallus gallus*) und Maus (*Mus musculus*) CPβ2. Unter Zuhilfenahme des Internet basierten Dienstes „Clustal Omega“ wurden die Sequenzen aliniert.

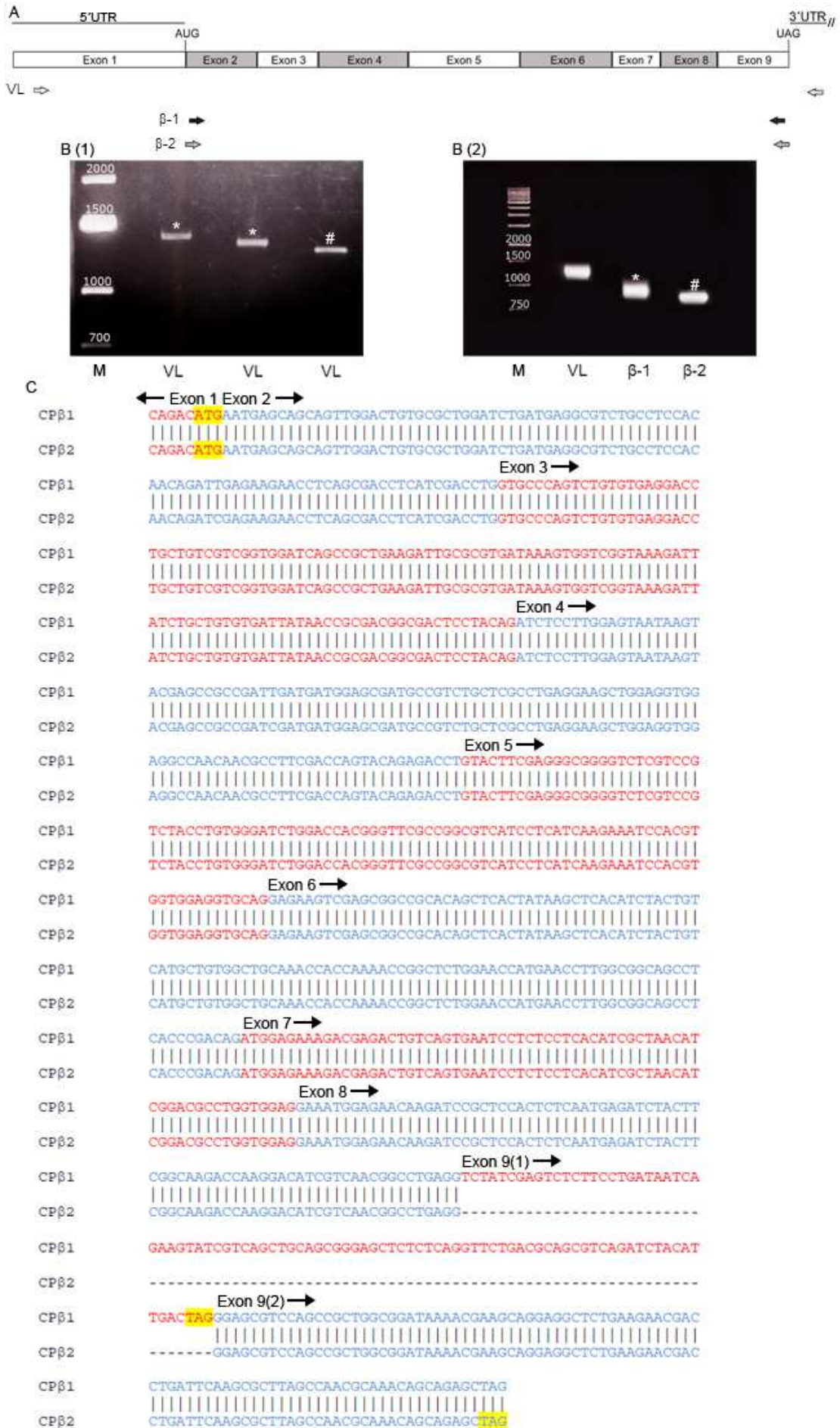


Abbildung 8: Primerstrategie, RT-PCR Ergebnis und CP β 1 und CP β 2 Zebrafisch Nukleotidsequenz

(A) Exonüberblick des CP β Gens mit Primerstrategie zur Amplifikation von Vollängen (VL) CP β cDNS. Primer (weiße Pfeile) liegen im nicht translatierten Bereich des CP β Gens. Primer für „nested“ RT-PCR zur Amplifikation von CP β 1 (schwarze Pfeile) und CP β 2 (graue Pfeile) aus VL CP β cDNS liegen in Exon 2 und Exon 9(1) bzw. Exon 9(2). (B1) RT-PCR, drei distinkte Banden wurden auf dem Gel detektiert. (B2) „nested“ RT-PCR mit Primerpaaren spezifisch für CP β 1 (β -1) und CP β 2 (β -2). VL CP β RT-PCR Produkt wurde zu Kontrollzwecken mitamplifiziert und auf das Gel aufgetragen. Zwei VL CP β RT-PCR Produkte (weiße Sterne (B1)) erlaubt eine Amplifikation von CP β 1 (weißer Stern (B2)) mit einem CP β 1 spezifischen Primerpaar. Ein VL CP β RT-PCR Produkt (weiße Raute (B1)) erlaubt die Amplifikation von CP β 2 (weiße Raute (B2)) mit einem CP β 2 spezifischen Primerpaar. (C) Nukleotidsequenzvergleich von Zebrafisch CP β 1 und CP β 2 mit in alternierenden Farben (rot und blau) markierten Exonen. Start- und Stop-Codon sind gelb unterlegt. Die Sequenzen aller erhaltenden RT-PCR Produkte wurden durch Sequenzierung ermittelt. VL= Vollängen CP β , M=Marker (Einteilung des Markers in Basenpaaren (bp)), 5'UTR= 5'untranslatierte Region, 3'UTR= 3'untranslatierte Region, AUG= Start-Codon des proteinkodierenden Bereiches der CP β mRNS, UAG= Stop-Codon des proteinkodierenden Bereiches der CP β mRNS.

Bei der Amplifikation der Vollängen cDNS des CP β Gens erscheinen drei Banden auf dem Agarose Gel (Abb.8, B(1)). Aus der cDNS zweier Banden (Abb.8, B (1), weiße Sterne) wurde die CP β 1 Isoform mit einem Exon 9(1) spezifischen Primer amplifiziert. Die kürzeste Vollängen cDNS lässt eine Amplifikation mit einem Exon 9(2) spezifischen Primer zu, aber keine Amplifikation mit einem Exon9(1) spezifischen Primer. Hier handelt es sich um die CP β 2 Isoform. Die Vollängen cDNS der CP β 1 und CP β 2 Bande unterscheidet sich in Ihrer Größe (Abb.8, B (2), weißer Stern und weiße Raute). Vergleicht man Zebrafisch CP β 1 mit CP β 2 auf Nukleotidebene so fällt ein Längenunterschied der 3'UTR von 93 Basen auf. Exon 9(2) mit einer Länge von 93 Basen ist in der 3'UTR von CP β 1 enthalten. Zudem ist das Exon 9(1) drei Basen länger als das Exon 9(2), was zu einem Gesamtlängenunterschied der beiden CP β Isoformen von 96 Basen führt. Die Nukleotidsequenz von Exon 9(1) und Exon 9(2) von CP β 1 und CP β 2 stimmen auf Nukleotidebene nicht überein (Abb.8, C).

3.1.2 Expression der CP β Isoformen im Zebrafisch

Die Immunhistochemische Analyse der räumlich-zeitlichen Lokalisation von CP β 1 wurde an drei Zeitpunkten der Zebrafisch Entwicklung an nativen Embryonen durchgeführt. Die Analyse der räumlich-zeitlichen Verteilung der CP β 1 und CP β 2 dient vor allem dazu den CP β *knockdown* in CP β positiven Geweben untersuchen zu können. Die Verteilung von beiden CP β Isoformen wird in 24 SnB (Abb. 9, B), 48 SnB (Abb. 10, B,C,E und F) und 72 SnB (Abb. 11, B,C,E und F) alten Tieren gezeigt. Hier wird nur die Immunhistochemie von spezifischen CP β 1 Antikörperfärbungen (mAb1E5.25.4, spezifisch gegen den C-terminalen Bereich von CP β 1 gerichtet) gezeigt, da die Färbungen mit dem polyklonalen Peptid-Antikörper - gerichtet gegen den hochkonservierten N-terminalen Bereich von CP β (Biogenes *pan*-CP β)- eine ähnliche Färbung aufweist wie die hier für CP β 1 gezeigte Färbung. Indirekte Immunhistochemie zeigt ein CP β 1 und CP β 2 Signal bei 24 SnB Embryonen in den Z-Scheiben. Die Kolokalisation mit α -Actinin (Abb. 9, C) zeigt deutlich, dass CP β 1 und CP β 2 in den Z-Scheiben der Myofibrillen lokalisiert ist. 48 SnB Embryonen zeigen im Bereich der vertikalen Myosepten, zwischen den Myofibrillenbündeln und in den Z Scheiben der Myofibrillen ein CP β 1 (Abb. 10, E) und CP β 2 Signal.

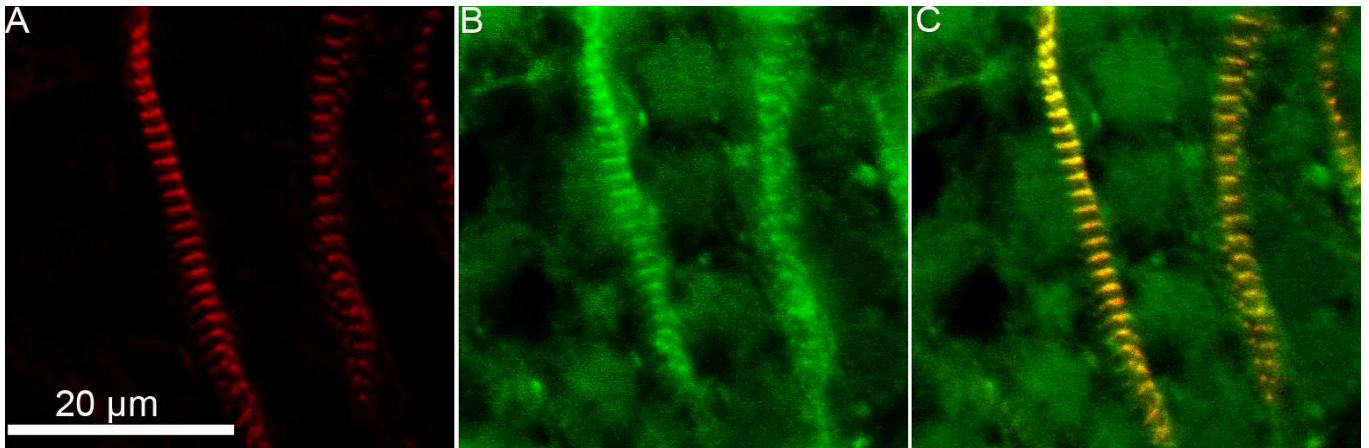


Abbildung 9: *Whole mount* Immunhistochemische Analyse der räumlichen Expression von α -Actinin und CP β 1 in 24 SnB WT Zebrafisch Myofibrillen

A-C zeigen drei Myofibrillen eines 24 SnB WT Embryos. (A) α -Actinin Immunfluoreszenzaufnahme von drei Myofibrillen. (B) CP β 1 Immunfluoreszenzaufnahme von drei Myofibrillen. (C) Überlagerung der kolokalisierten Antikörpersignale in den myofibrillären Z-Scheiben.

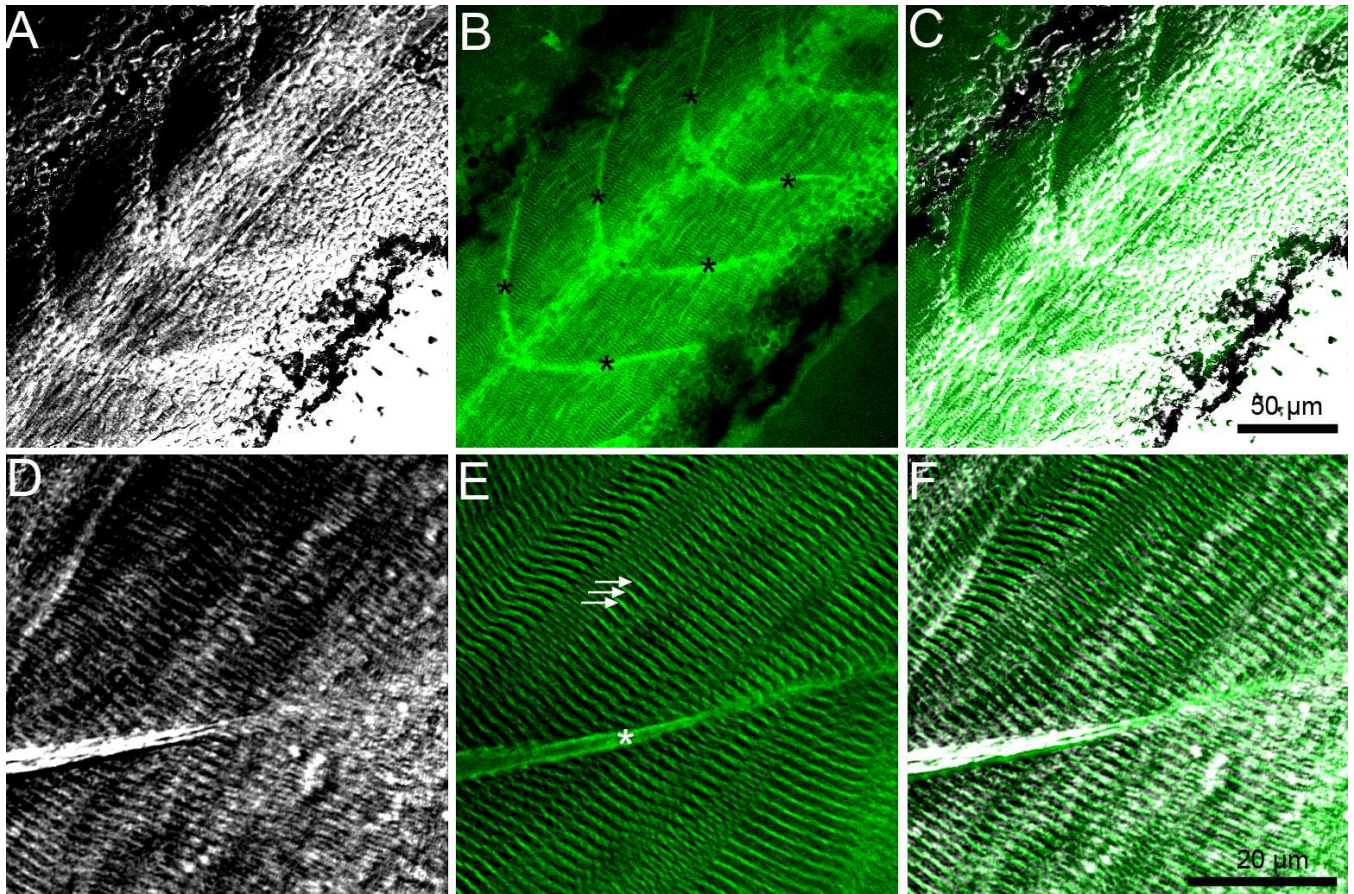


Abbildung 10: *Whole mount* Immunhistochemische Analyse der räumlichen Expression von CP β 1 in 48 SnB WT Zebrafisch Embryonen

A-C zeigen fünf kaudale Somiten eines 48 SnB WT Embryos. D-F zeigen vergrößerte Bereiche aus den darüber liegenden Bildern. A und D zeigen eine Differentialinterferenzkontrastaufnahme, B und E die dazu gehörende Immunfluoreszenzaufnahme und C / F die Überlagerung beider Bilder. In (B) sind die vertikalen Myosepten (schwarze Sterne) stark angefärbt. Ein deutliches Antikörper Signal zeigen auch Myofibrillenbündel und die myofibrillären Zwischenräume. Die untere Reihe (D-F) zeigt einen vergrößerten Ausschnitt eines Teils zweier

kaudal Somiten mit immunreaktivem Myoseptum (weißer Stern). Die Färbung der Z-Scheiben wurde exemplarisch durch drei weiße Pfeile hervorgehoben.

Bei den 72 SnB Embryonen ist die Markierung der Myosepten und die Bereiche zwischen und entlang der Myofibrillen ebenso zu beobachten.

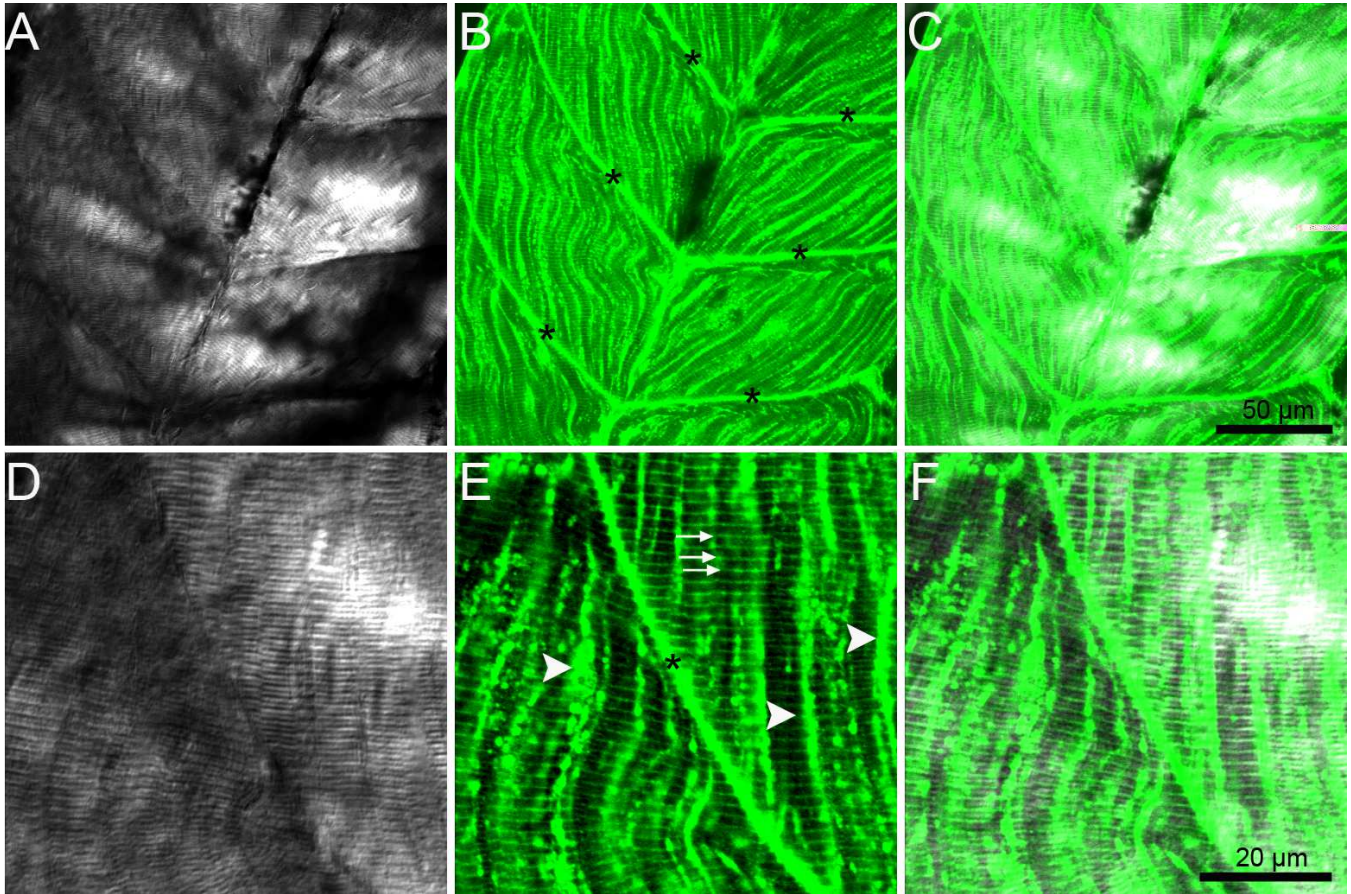


Abbildung 11: Whole mount Immunhistochemische Analyse der räumlichen Expression von CPβ1 in 72 SnB WT Zebrabärbling Embryonen

A-C zeigen vier kaudale Somiten in einem 72 SnB WT Embryos. D-F zeigen vergrößerte Bereiche aus den darüber liegenden Bildern. A und D zeigen eine Differentialinterferenzkontrastaufnahme, B und E die dazu gehörende Immunfluoreszenzaufnahme und C / F die Überlagerung beider Bilder. In (B) sind die vertikalen Myosepten (schwarze Sterne) stark angefärbt. Ein deutliches Antikörper Signal zeigen auch Myofibrillenbündel und die myofibrillären Zwischenräume. Die untere Reihe (D-F) zeigt einen vergrößerten Ausschnitt eines Teils zweier kaudal Somiten mit immunreaktivem Myoseptum (schwarzer Stern). Die Färbung der Z-Scheiben wurde exemplarisch durch drei weiße Pfeile hervorgehoben. Exemplarisch sind drei Stellen der immunreaktiven myofibrillären Zwischenräume mit weißen Pfeilköpfen markiert.

Eine aussagekräftigere Überprüfung der CPβ Expression – bezogen auf das korrekte Molekulargewicht des gesuchten Proteins - lässt sich hingegen mit einem Western-Blot (Abb.12) erzielen. Die in Abbildung 12 unter anti-N-Term. auf der NC-Membran befindlichen Proben wurden mit Biogenes *pan*-CPβ inkubiert. Im Gegenzug wurden die gleichen Proben zur Inkubation mit mAb1E5.25.4 aufgetragen. Die Proben wurden in gleicher Konzentration auf das Gel geladen. Unter anti-N-Term. findet man zwei immunreaktive Banden auf der erwarteten Laufhöhe des CPβ Proteins. Zwei Banden spiegeln die

bereits auf Nukleinsäure-Ebene etablierte Erwartung von zwei Isoformen wider. Da der N-Terminus bei beiden Isoformen absolut identisch ist erkennt Biogenes *pan*-CP β das Epitop von CP β 1 und CP β 2.

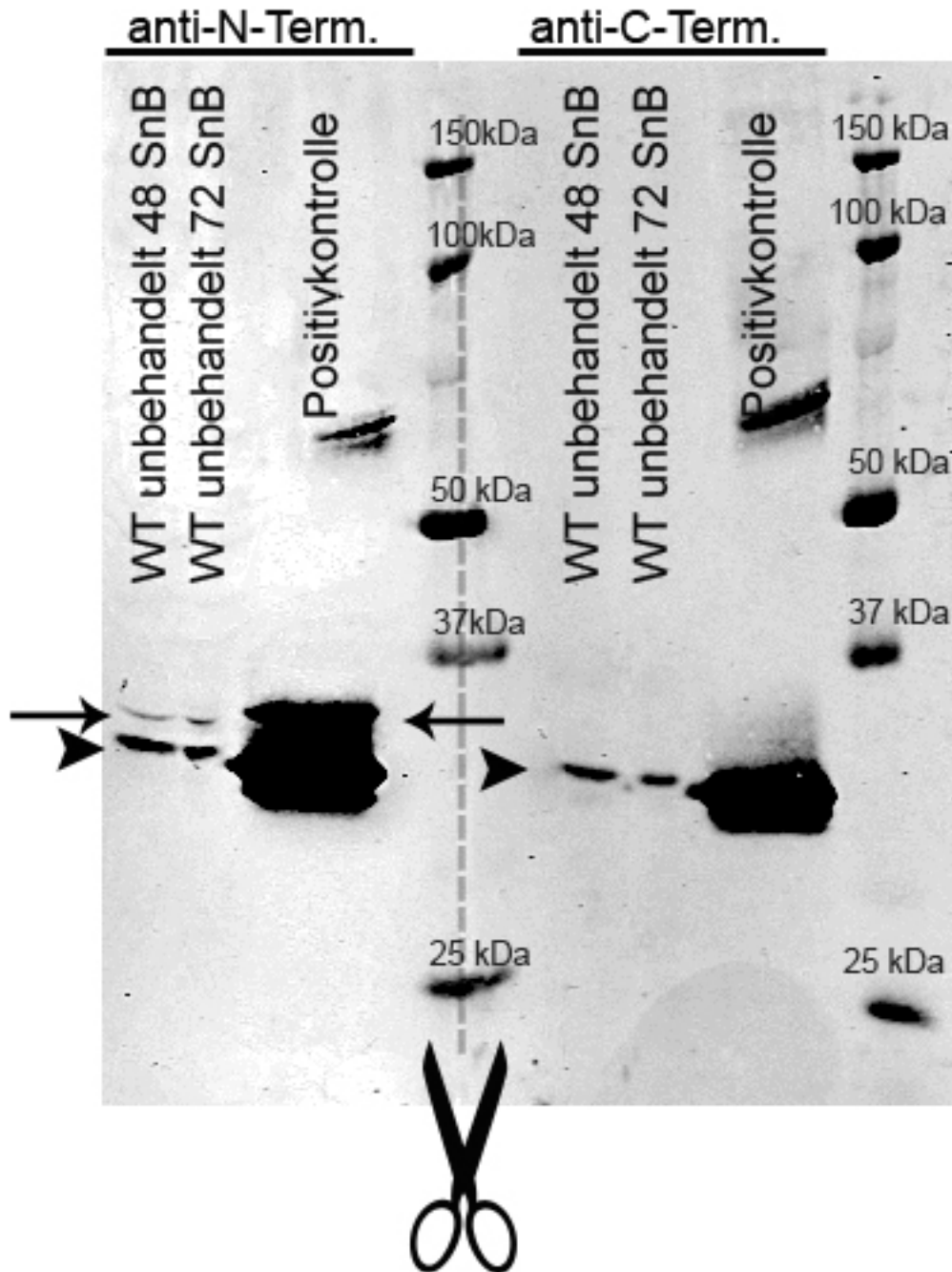


Abbildung 12: Western Blot Analyse der CP β Expression in 48 SnB und 72 SnB WT Zebrafärblingen

Unter anti-N-Term. und unter anti-C-Term. sind jeweils drei Proben (WT unbehandelt 48 SnB, WT unbehandelt 72 SnB und eine Positivkontrolle die 0,18 μ g rekombinantes Hühner CP β enthält) aufgetragen worden. Die Proben unter anti-N-Term. sind mit Biogenes *pan*-CP β inkubiert worden. Es ergeben sich zwei immunreaktive Banden (Pfeil und Pfeilkopf) auf derselben Höhe wie die beiden Banden der Positivkontrolle (obere Bande ist mit Pfeil markiert). Die Proben unter anti-C-Term. sind mit mAb1E5.25.4 inkubiert worden. Eine immunreaktive Bande (Pfeilkopf) auf derselben Höhe wie die Positivkontrolle kann detektiert werden. Der Blot wurde vor der Antikörperinkubation durchgeschnitten (gestrichelte Linie und Scherensymbol zeigen Schnittstelle an) und später zur vereinfachten Darstellung wieder zusammengefügt.

Die Positivkontrolle auf der gleichen Höhe zeigt, dass es sich um das gesuchte Protein handelt. Unter anti-C-Term. findet man eine einzige immunreaktive Bande auf der gleichen Laufhöhe wie die untere Bande unter anti-N-Term.. Ich schlussfolgere daraus, dass es sich um das gesuchte Protein handelt, da zudem auch die Positivkontrolle auf der gleichen Höhe läuft. Der monoklonale Peptid-Antikörper erkennt nur den einzigartigen C-terminalen Bereich von CP β 1 und damit nicht die höher laufende Bande, welche sehr wahrscheinlich CP β 2 repräsentiert.

3.1.3 Morphologische Analyse des CP β *knockdown* im Zebrafärbli

Der *knockdown* der Zebrafärbli CP β Untereinheit wurde durch die Injektion von drei verschiedenen Morpholinos in das 1-4-Zellstadium der Zebrafärbli Embryonen erreicht. Im Folgenden werden die Morpholino behandelten Tiere als Morphanten bezeichnet. Es wurden zwei translationsblockierende Morpholinos (Start-MO und 5'UTR-MO) und ein Morpholino, das das korrekte Spleißen der CP β prä-mRNS verhindert eingesetzt (E3I3-MO). Die relative Überlebensrate der CP β Morphanten im Vergleich zu Kontroll Morphanten kann Abbildung 13 entnommen werden. Hier ist zu betonen, dass die CP β Morphanten mit einer für den Morpholino spezifischen Dosis behandelt wurden (vgl. dazu Abb.16).

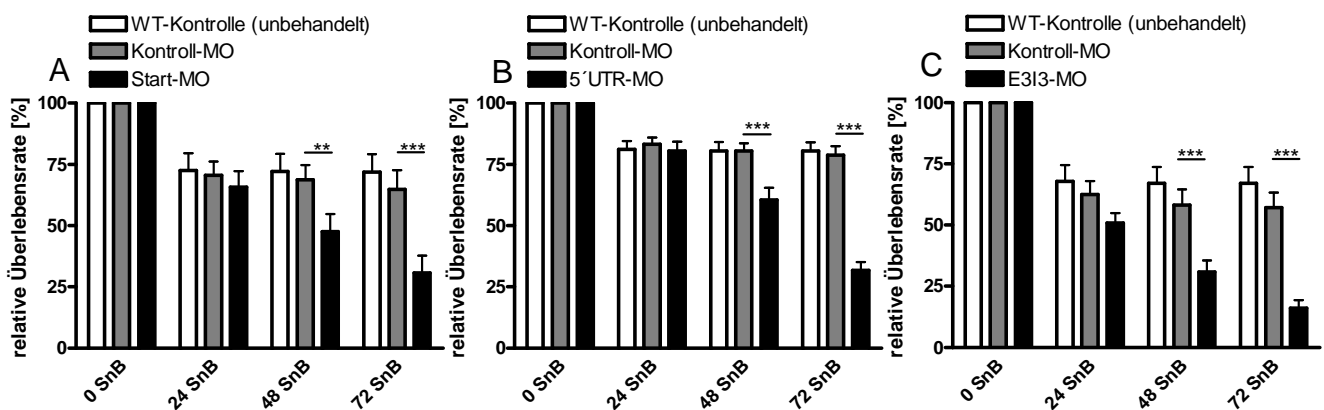


Abbildung 13: Relative Überlebensrate der CP β Morphanten und Kontrollen innerhalb 72 SnB

Sterblichkeit von CP β Morphanten und den dazu gehörigen Kontrollen innerhalb der ersten 72 SnB (A-C). Die Kontrolltiere, sowohl unbehandelter WT als auch Kontroll-MO injizierte Tiere, stammen stets aus demselben Gelege wie die CP β -MO injizierten Tiere. (A) Relative Überlebensrate von unbehandeltem WT, Kontroll-MO injizierten und Start-MO injizierten Tieren. (B) Relative Überlebensrate im Vergleich von 5'UTR-MO injizierten Tieren und den korrespondierenden Kontrollen. (C) Überlebensrate von E3I3-MO injizierten Tieren und Kontrollen. ** p-Wert < 0,001 und *** p-Wert < 0,0001.

Ein wichtiger Aspekt bei der Verwendung von Morpholinos in dieser Arbeit ist die Überlebensrate der Morphanten nach 24 SnB. Alle drei *knockdown* Ansätze zeigen eine Überlebensrate von über 50% 24 SnB. Die Hintergrundsterblichkeit ist relativ hoch bei unter 80% überlebenden unbehandelten WT Embryonen 24 SnB. Der Kontroll Morphant zeigt keine Signifikanzen gegenüber den CP β Morphanten 24 SnB, was darauf schließen lässt, dass die Sterblichkeit nicht an einem toxischen Nebeneffekt liegt. Bei allen drei CP β Morphanten zeigt sich ein signifikanter Unterschied in der Überlebensrate im

Vergleich zu Kontroll Morphanten bei 48 SnB und 72 SnB. Die CP β MO Injektionen führen zu drei sehr ähnlichen Überlebensverläufen der Morphanten. Der Start-MO Morphant und 5'UTR-MO Morphant zeigen eine finale Überlebensrate bei 72 SnB von 30,71 % und 31,71 %. Von den E3I3-MO Morphanten leben 72 SnB noch 16,09 %.

Alle drei CP β Morphanten zeigten eine ähnliche Veränderung der makroskopischen Morphologie. Allerdings zeigen die Morphanten von mildem Phänotyp bis hin zum schweren Phänotyp ein breites Spektrum an phänotypisch veränderten Merkmalen (Abb.14). Die Entwicklung bei Kontroll-MO injizierten Tieren ist um ca. 12 Stunden verzögert gegenüber unbehandelten WT Zebrabärblingen. Außerdem weisen die Kontroll-Morphanten bereits nach 48 SnB eine leichte Wachstumshemmung auf und bleiben etwas kleiner als der unbehandelte WT.

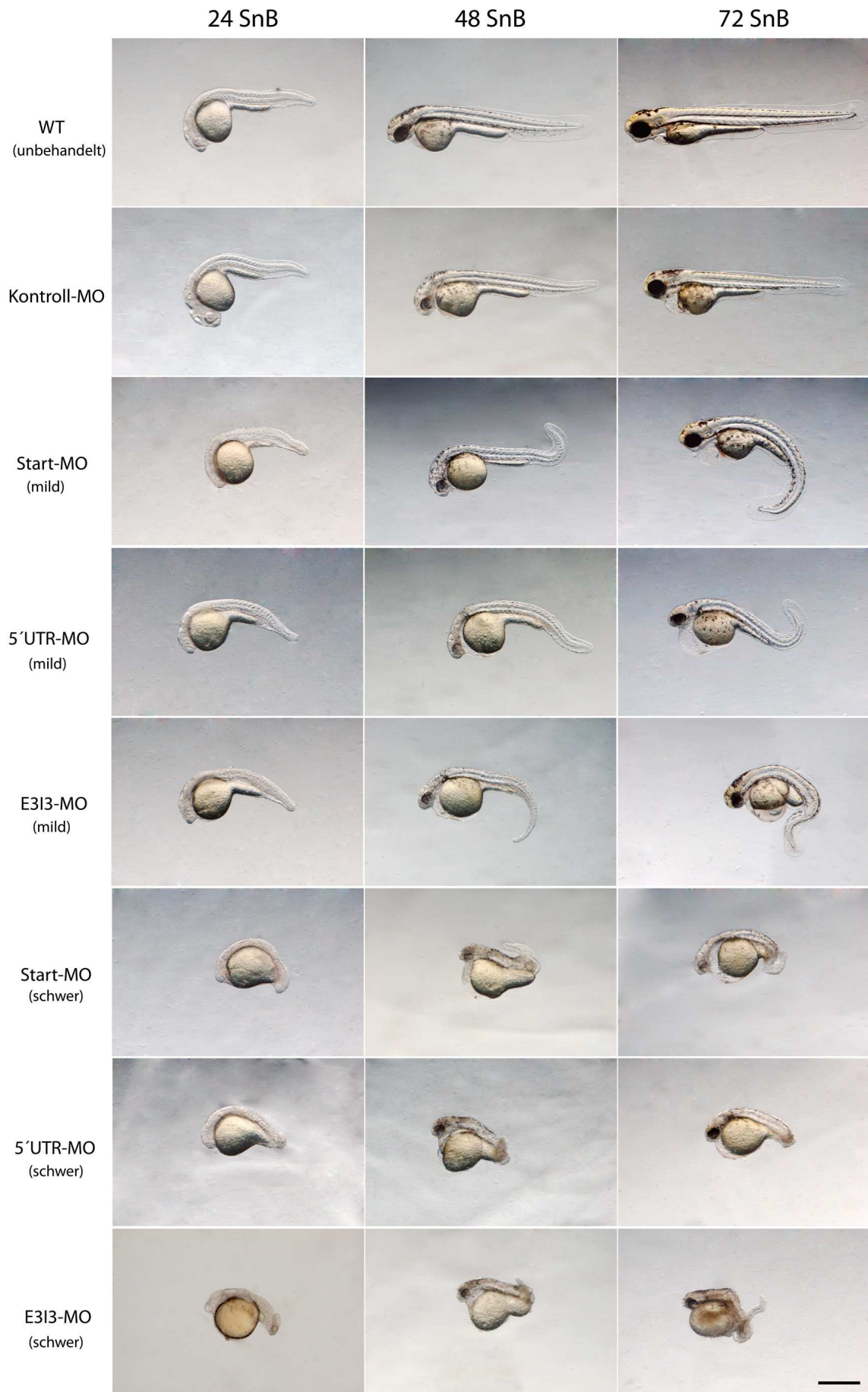


Abbildung 14: Analyse der Morphologie des *knockdown* Phänotypen von CP β Morphanten und Kontrollen

Darstellung der Entwicklung repräsentativer unbehandelter WT Zebrabärblinge (oberste Reihe), Kontroll-MO injizierter Tiere (zweite Reihe von oben), CP β Morphanten mit mildem Phänotyp (dritte bis fünfte Reihe von oben) und starkem Phänotyp (sechste bis achte Reihe von oben). 24 SnB, 48 SnB und 72 SnB Tiere wurden in Methylcellulose unter einem Stereomikroskop ausgerichtet und bei gleicher Vergrößerung fotografiert, laterale Ansicht der Tiere, anterior links im Bild, Maßstabsleiste entspricht 500 μ m.

Der milde Phänotyp zeigt eine deutliche Verzögerung der Embryogenese und zudem leichte Defekte bei der Ausbildung der Körperachse und des Kopfes. Diese Defekte sind bei den schweren Phänotypen stärker ausgeprägt. Bereits 24 SnB kann man Unterschiede zwischen CP β Morphanten und Kontrollen ausmachen. Alle Morphanten weisen eine verkürzte Körperachse, missgestaltete oder ganz fehlende Dottersackerweiterungen und eine gekrümmte Schwanzregion auf. Bei schweren Phänotypen ist die Schwanzregion bisweilen verkümmert, abgeknickt oder noch nicht entwickelt. 48 SnB ist die Körperachse der Morphanten weiterhin kürzer als die der Kontrollen, die Schwanzregion weist eine jetzt noch deutlicher erkennbare Krümmung auf und die Pigmentierung des Rumpfes und der Augen ist gegenüber unbehandelten WT Zebrabärblingen vermindert. Die Krümmung tritt in etwa auf Höhe des Endes der Dottersackerweiterung auf. Zudem kann anhand der Gesamtgröße der Tiere auf eine Wachstumshemmung geschlossen werden. Eine Dottersackerweiterung ist im Falle des schweren Phänotyps nicht klar erkennbar. Vielmehr wird der Dottersack an einer Stelle nur leicht eingeschnürt. In diesem Stadium kann bei den schweren Phänotypen eine Veränderung des Notochords festgestellt werden. Das Notochord erscheint wellig und nicht längs gestreckt wie in den Kontrollen. Die Schwanzregion der schweren Phänotypen ist entweder stark verkürzt, verkümmert oder bereits – an diffusem und bräunlich gefärbtem Gewebe erkennbar - im Abbau begriffen. Außerdem können Somitengrenzen auf Höhe der Dottersackerweiterung und weiter posterior nicht mehr klar erkannt werden. 72 SnB bleibt die beobachtete Wachstumshemmung bestehen. Die Morphanten mit mildem Phänotyp haben jetzt in etwa die Länge und Höhe der Körperachse eines 48 SnB alten unbehandelten WT oder Kontroll Morphanten erreicht. Die Pigmentierung setzt sich fort und ist nun vergleichbar mit der von 24 Stunden jüngerer WT Tiere. Ebenso ist der Kopf-Rumpf Winkel der Morphanten mit milder Ausprägung des Phänotyps (Kimmel et al., 1995) nun gleich dem von 48 SnB alten Kontroll Tieren. Die Morphanten liegen ca. 12, bzw. 24 Stunden hinter der Entwicklung der Kontroll Morphanten bzw. der unbehandelten WT Kontrollen zurück.

Die an Tag drei der Entwicklung erreichte Gesamtlänge des Start-MO Morphanten und Kontrollen kann Abbildung 15 B und Tabelle 17 entnommen werden. Des Weiteren wurde die Länge von drei Somiten (S1, S2 und S3, vgl. dazu die Abb. 15, A , C und Tab.17) bestimmt. Auf Ebene der Somitenlängen zeigt sich die entwicklungsbiologische Nähe von 72 SnB CP β Morphanten und 48 SnB unbehandeltem WT, da sich hier kein signifikanter Unterschied in den Somitenlängen finden lässt. Die Kopfregion der 48 SnB unbehandelten WT ist im ggs. zum 72 SnB CP β Morphanten länger, da sich beim Vergleich der Gesamtlänge ein signifikanter Unterschied ergibt.

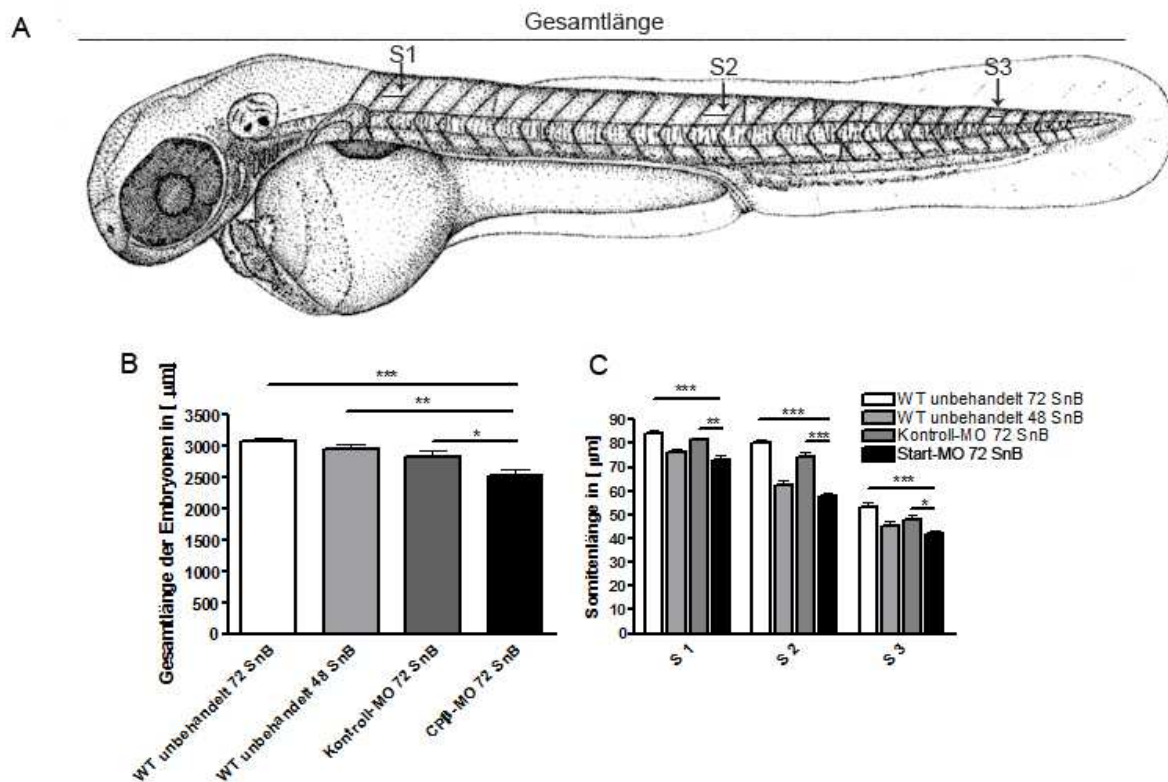


Abbildung 15: Gesamt- und Somitenlänge von WT Zebrabärblingen, Kontroll-Morphanten und CPβ Morphanten

(A) Camera lucida Zeichnung eines 48 SnB WT Zebrabärbling Embryos (modifiziert nach Kimmel et al., 1995). Der Bereich der zur Messung der Gesamtlänge herangezogen wurde ist durch eine Linie oberhalb der Zeichnung gekennzeichnet. Der Flossensaum wurde nicht mitgemessen. Die Somitenlängen wurden an drei Stellen (S1, S2 und S3) gemessen. (B) Gesamtlänge von WT Zebrabärblingen zu zwei Zeitpunkten (48 SnB und 72 SnB) der Entwicklung, von Kontroll-Morphanten 72 SnB und von Start-MO Morphanten 72 SnB (milde Ausprägung des Phänotyps). (C) Vergleich der verschiedenen Somitenlängen (S1, S2 und S3) von 72 SnB-, 48 SnB unbehandeltem WT, 72 SnB Kontroll-Morphanten und 72 SnB Start-MO Morphanten. * entspricht einem p-Wert von <0,05, ** entsprechen einem p-Wert von <0,001, *** entsprechen einem p-Wert von <0,0001.

Tabelle 16: Gesamt- und Somitenlängenübersicht von CPβ Morphanten und Kontrollen

Behandlung und Alter der Embryonen	Gesamtlänge der Embryonen [µm]	Somitenlänge S1 [µm]	Somitenlänge S2 [µm]	Somitenlänge S3 [µm]
WT unbehandelt 72 SnB	3084 (± 32,18***, n=18)	84,21 (± 1,27***, n=20)	80,25 (± 1,23***, n=20)	53,96 (±1,90***, n=20)
WT unbehandelt 48 SnB	2944 (± 99,56**, n=7)	76,05 (±1,35, n=19)	62,16 (±2,15, n=19)	47,20 (±1,59, n=20)
Kontroll-MO 72 SnB	2835 (± 80,79*, n=12)	81,84 (±0,44**, n=19)	74,32 (±1,84***, n=19)	47,95 (±1,77*, n=19)
Start-MO 72 SnB	2533 (± 77,11, n=21)	72,45 (±1,83, n=27)	56,80 (±1,44, n=27)	43,94 (±1,67, n=27)

Die Werte sind MW ± SEM, n entspricht der Anzahl der untersuchten Tiere. Die Signifikanzen wurde mittels 1-way Anova und anschließend Bonferroni-Post-Test bestimmt.

Die Schwanzregion der CPβ Morphanten streckt sich nicht. Die Mehrheit der Morphanten – inklusive der Kontroll Morphanten- bilden Perikard-Ödeme aus. Viele der Morphanten mit schwerem Phänotyp

befinden sich in einem Wachstumsarrest. Sie sind nicht deutlich größer als 24 Stunden zuvor und haben nicht einmal die Länge eines 24 Stunden alten Kontrolltieres erreicht. Die Mehrheit der Tiere zeigt im Bereich posterior der Dottersackweiterung im Schwanzgewebe bräunliche Verfärbungen. Ein klares Zeichen für einen sterbenden Embryo. Auch bei Morphanten mit schwer gestörter Morphologie kann man anhand des Pigmentierungsgrades und des Kopf-Rumpf Winkels auf eine Entwicklungsverzögerung von ca. 12 bzw. 24 Stunden, verglichen mit den entsprechenden Kontrollen, schließen. Bei Berührung mit einer Nadel im Bereich der Ohrplakode zeigen die Kontroll Tiere eine Fluchtreaktion (vgl. CD im Anhang, Video A) und vollführen sehr schnelle Schwimmbewegungen. Wenige Morphanten mit mildem Phänotyp zeigen bei Berührung mit einer Nadel im Bereich der Ohrplakode rotatorische Schwimmbewegungen. Der weitaus häufigere Fall ist das Ausbleiben einer Fortbewegung. Die Tiere vollführen leichte und sehr langsame Bewegungen des verkrümmten Schwanzes oder zeigen kurze Zuckungen (vgl. CD im Anhang, Video B und C). Morphanten mit schwerem Phänotyp bleiben bei Berührung mit der Nadel bewegungslos liegen.

Da die Penetranz, d.h. die prozentuale Wahrscheinlichkeit, mit der der Morpholino den zugehörigen Phänotyp ausbildet, bei den verschiedenen Morpholinos sehr variabel ausfällt, mussten Dosis-Wirkungsdiagramme erstellt werden, um die richtige Dosierung von jedem einzelnen Morpholino zu ermitteln (Abb.16).

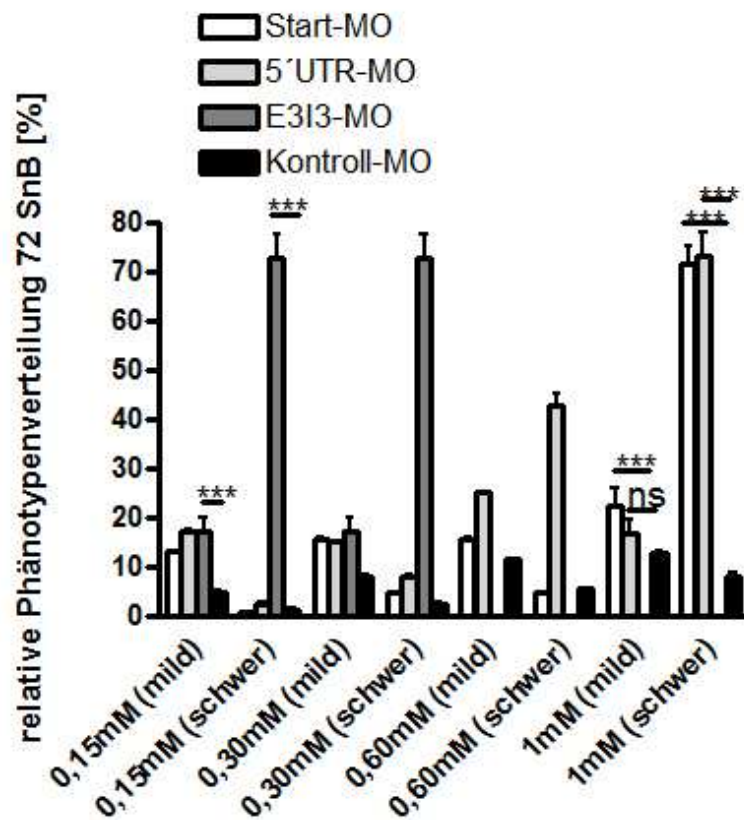


Abbildung 16: Relative Phänotypenverteilung 72 SnB bei vier verschiedenen Morphanten

Phänotypenverteilung und prozentuale Häufigkeit Ihres Auftretens von CP β Morphanten im Vergleich zu Kontroll Morphanten. Es werden jeweils die Phänotypengruppen (mild/schwer) der CP β Morphanten mit den entsprechenden Phänotypengruppen der Kontroll Morphanten verglichen.*** entsprechen einem p-Wert von <0,0001 und ns bedeutet: nicht signifikant.

Für jeden der drei *knockdown*-Ansätze und dem Kontroll-MO wurden vier verschiedene Konzentrationen von Morpholino injiziert. Die relative Häufigkeit der Phänotypen wurde 72 SnB untersucht. Hierbei ergibt sich eine Abhängigkeit von relativer Häufigkeit und Schweregrad der Phänotypen von der eingesetzten Morpholinokonzentration. Es wurde mit der Dosis weitergearbeitet, welche die höchste Penetranz von mildem und schwerem Phänotyp *-in summa-* hervorbrachte und bei der die Überlebensrate bei über 50% 24 SnB lag. Damit sollte die bei steigender Morpholinokonzentration auftretende Toxizität und das Ergebnis verfälschende Nebeneffekte im Verhältnis zum echten Phänotypen abgemildert werden. Im Falle vom Start-MO wurde mit einer Konzentration von 1 mM weitergearbeitet, da die Penetranz mit 92,56 % hier am höchsten ist. Die applizierte Menge beträgt 7,5 ng Morpholino pro Embryo. Die gleiche Konzentration und applizierte Menge wird für den 5'UTR-MO eingesetzt. Die Penetranz für diesen Morpholino ist 94,44 %. Im Gegensatz zu den translationsblockierenden Morpholinos wird der E3I3-MO mit einer Konzentration von 0,15 mM und 1,15 ng Morpholino pro Embryo eingesetzt, da Konzentrationen ab 0,60 mM bereits innerhalb der ersten 24 SnB letal wirken. Die Penetranz des E3I3-MO ist 92,39 %. Entsprechend der verwendeten Morpholino-Konzentration wurde in eine Kontroll-Gruppe aus demselben Gelege ein Kontroll-MO injiziert, um unspezifische Effekte der Morpholinoinjektion ausschließen zu können. Tatsächlich zeigen sich bei insgesamt 11,25 % der Kontroll-MO injizierten Tiere mit einer Kontroll- MO Konzentration von 0,15 mM und bei 16,79 % der Kontroll-MO injizierten Tiere mit einer MO-Konzentration von 1 mM ein unspezifischer Effekt mit Auswirkung auf die Entwicklung des Embryos.

3.1.4 Koinjektion von p53-MO und E3I3-MO als CP β -Morphanten Phänotypen Spezifitätstest

Die Degeneration der Körperachse ist ein typischer Nebeneffekt der Morpholinobehandlung (Bedell et al., 2011) durch Aktivierung von p53 (Robu et al., 2007) und dem damit einhergehenden programmierten Zelltod. Da die Degeneration der Körperachse Bestandteil der Phänotypencharakterisierung in dieser Arbeit ist und der echte CP β Phänotyp möglicherweise durch diesen unspezifischen Nebeneffekt der CP β Morpholinoinjektion überdeckt werden könnte musste durch eine p53-MO Koinjektion zusammen mit dem E3I3-MO diese Möglichkeit ausgeschlossen werden. Der E3I3-MO Morphant wurde aufgrund der geringsten Überlebensrate im Vergleich mit dem Start-MO und 5'UTR-MO Morphanten und eindeutigen Phänotypenverteilung ausgewählt. Um den unspezifischen Nebeneffekt einer p53 vermittelten Apoptose durch CP β Morpholinoinjektion als solchen erkennen zu können wurden p53-MO und der E3I3-MO koinjiziert. Jeder Morpholino wurde mit einer Konzentration von 0,15mM eingesetzt. Der Fokus der Beobachtungen lag auf dem Phänotyp mit schwerer Ausprägung der Körperachsendegeneration. Die Koinjektion besagter Morpholinos verändert

weder signifikant die Phänotypenverteilung des E3I3-MO Morphanten (Penetranz des schweren Phänotypen nach Koinjektion ist 73,3%) gegenüber dem einzeln applizierten E3I3-MO mit einer Penetranz für den schweren Phänotyp von 72,2%, noch verändert es signifikant die Überlebensrate der E3I3-MO behandelten Tiere gegenüber den E3I3-MO injizierten Tieren (Abb.17).

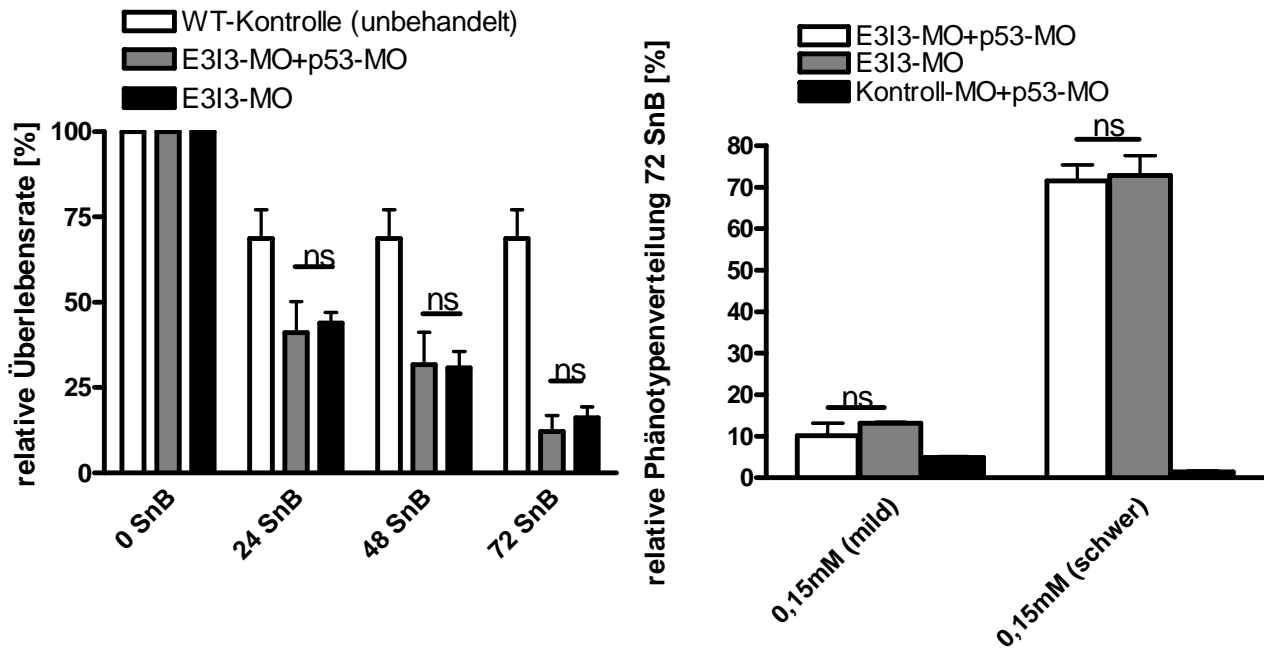


Abbildung 17: Relative Überlebensrate von E3I3-MO+p53-MO, E3I3-MO, Kontroll-MO+p53-MO innerhalb 72 SnB und relative Phänotypenverteilung 72 SnB

(A) Sterblichkeit von E3I3-MO Morphanten, E3I3-MO+p53-MO Morphanten und unbehandeltem WT innerhalb der ersten 72 SnB. Alle Tiere stammen stets aus demselben Gelege, um eine zufällig schwankende Hintergrundsterblichkeit auszuschließen. (B) Phänotypenverteilung und prozentuale Häufigkeit ihres Auftretens von E3I3-MO Morphanten, E3I3-MO+p53-MO Morphanten und Kontroll-MO+p53-MO Morphanten. Es werden jeweils die Phänotypengruppen (mild/schwer) miteinander verglichen. ns bedeutet: nicht signifikant.

Dieses Kontrollexperiment zeigt sehr deutlich, dass der beobachtete Phänotyp nicht auf einen E3I3-MO unspezifischen Nebeneffekt der Apoptose zurück zu führen ist.

3.1.5 RT-PCR Analyse des Start-MO und E3I3-MO CP β 1 *knockdown* im Zebrafisch

Die Überprüfung der Effektivität von Spleißstellen blockierenden Morpholinos wurde durch reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) (Abb.18) nachgewiesen. Die verwendeten Primer zur Amplifikation der cDNS von CP β liegen im 5'UTR und 3'UTR Bereich des Gens und flankieren somit den offenen Leserahmen von CP β (Abb.18, A). Die Sequenz der Primer ist weder exklusiv spezifisch für CP β 1 noch für CP β 2. Alle CP β Isoformen werden mit diesem Primer Satz amplifiziert.

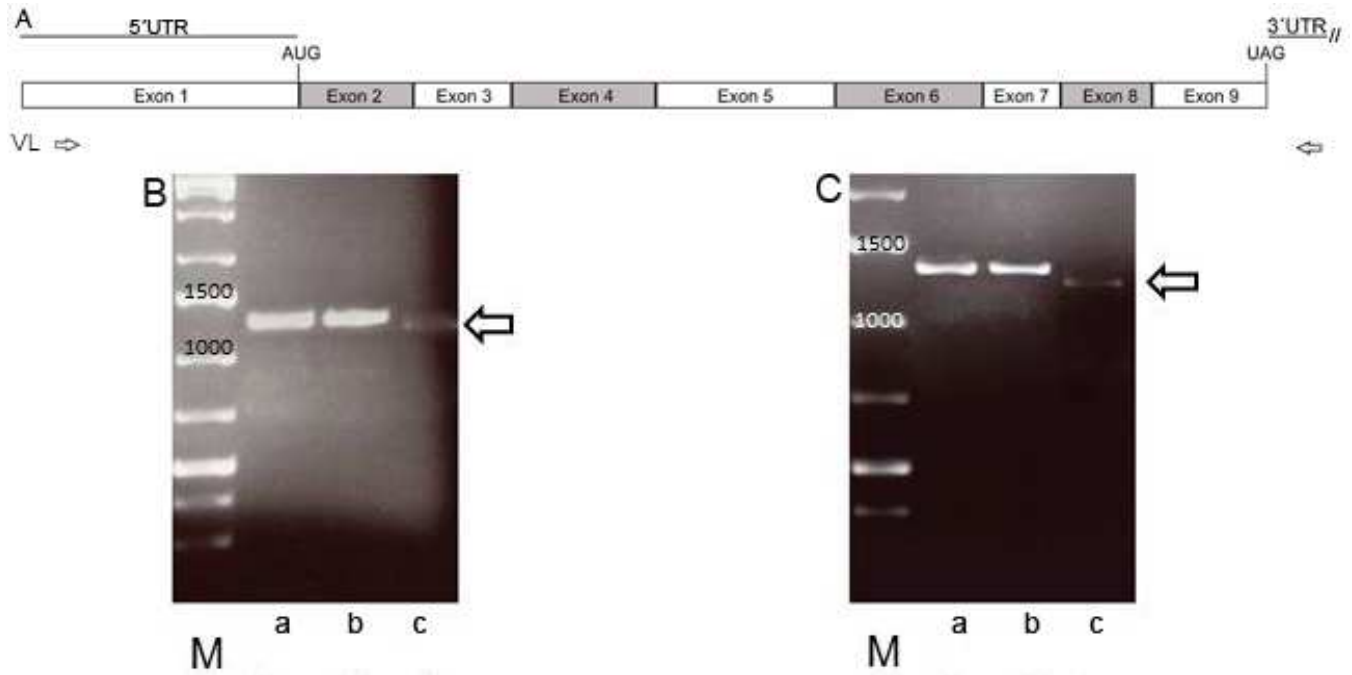


Abbildung 18: Primerstrategie und RT-PCR Ergebnis von CP β Morphanten und Kontrollen

(A) Exonüberblick des CP β Gens mit Primerstrategie zur RT-PCR von CP β cDNS. Primer (weiße Pfeile) liegen im nicht translatierten Bereich des CP β Gens. (B) RT-PCR Ergebnis, M: Marker, Bahn a: 48 SnB unbehandelte WT cDNS RT-PCR Produkt, Bahn b: 72 SnB Kontroll-Morphanten cDNS RT-PCR Produkt und Bahn c: 72 SnB Start-MO Morphanten cDNS RT-PCR Produkt (weißer Pfeil). (C) RT-PCR Ergebnis, M: Marker, Bahn a: 48 SnB unbehandelte WT cDNS RT-PCR Produkt, Bahn b: 72 SnB Kontroll-Morphanten cDNS RT-PCR Produkt und Bahn c: 72 SnB E3I3-MO Morphanten cDNS RT-PCR Produkt (weißer Pfeil). Die Sequenz aller erhaltenen RT-PCR Produkte wurde durch Sequenzierung ermittelt. M: Marker (Einteilung des Markers in bp), 5'UTR: 5'untranslatierte Region, 3'UTR: 3'untranslatierte Region, AUG: Start-Codon des proteinkodierenden Bereiches der CP β mRNS, UAG: Stop-Codon des proteinkodierenden Bereiches der CP β mRNS.

Die eingesetzte cDNS ist in allen drei eingesetzten Proben ungefähr gleich konzentriert. Die Proben wurden in einem gemeinsamen Lauf des Thermocyclers amplifiziert. Ein möglicher Fehler des Peltier-Elements wurde durch wechselseitiges platzieren der Proben an fixen Stellen im Element ausgeschlossen. Es gab in Abhängigkeit der Position der Proben im Element keine Abweichungen der Amplifikationsrate. Die Banden der Morphantenprobe in (B) und (C) (Abb.17. weiße Pfeile) sind deutlich schwächer, als die Banden der 48 SnB unbehandelten WT (a) und der 72 SnB Kontroll-MO injizierten Tiere (b). Zudem sind die beiden Banden der Morphanten (weiße Pfeile) relativ zu den links davon befindlichen Kontroll-Banden nach unten verschoben. Die Länge des amplifizierten cDNS Bereiches ist damit kürzer als die der Kontrollen. Der Start-MO und der E3I3-MO lagern sich an eine zu Ihrer Sequenz komplementäre Sequenz von CP β prä-mRNS an. Im Falle vom E3I3-MO findet die Bindung an der Exon3-Intron3 Spleiß-Donor Seite der prä-mRNS von CP β im Zellkern statt und führt im Falle von CP β durch Spleißen an einer kryptischen Spleißstelle in Exon 3 zu einem Verlust von 49 Basen des Exon 3 und zu einer Leserahmenverschiebung innerhalb der CP β Codonfolge. Durch den neuen Leserahmen taucht ein frühes Stopcodon im Triplet-Code der CP β mRNS auf (Abb.19). Dadurch wird CP β nur bis zum Beginn des Exon 4 translatiert und wird dadurch vermutlich funktionsunfähig.

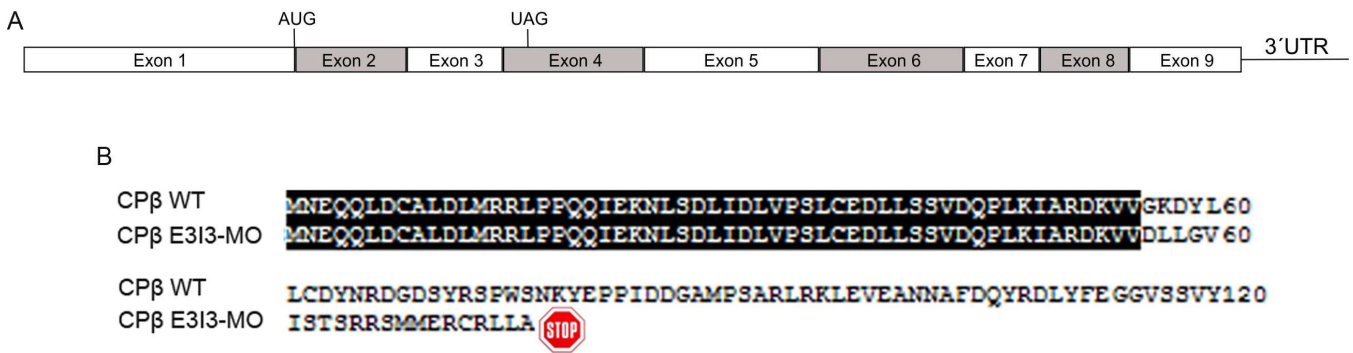


Abbildung 19: E3I3-MO Morphanten CPβ RNS Übersicht und abgeleitete Aminosäuresequenz des E3I3-MO Morphanten CPβ und WT CPβ im Vergleich

(A) Exonüberblick der CPβ RNS, nach E3I3-MO Behandlung taucht ein Stop-Codon (UAG) in Exon 4 auf. (B) Aminosäuresequenzvergleich von E3I3-MO Morphanten CPβ und WT CPβ. Der Ein-Buchstabencode der Aminosäuren wurde verwendet. Schwarz hinterlegte Buchstaben heben die Sequenzhomologie der verglichenen Sequenzen hervor. Das Stoppschild markiert die Position des durch die Leserahmenverschiebung entstandenen Stop-Codons. Um zu diesem Sequenzvergleich zu gelangen wurde die CPβ Sequenz der RT-PCR von E3I3-MO Morphanten unter Zuhilfenahme des Internet basierten Dienstes „ExPASy Translate tool“ unter Berücksichtigung des korrekten Leserahmens in die Aminosäuresequenz übersetzt und die beiden Sequenzen wurden mit dem Internet basierten Programm Clustal Omega aligniert.

Im Falle vom Start Morphanten spannt sich der Morpholino über die Grenzen von Exon 1 und Exon 2 im Bereich des Start-Codons der CPβ mRNA und gilt daher als translationsblockierender Morpholino. Obwohl der Start-MO nur die Translation von CPβ unterbinden soll, führt sein Einsatz zudem zu einem Verlust von 87 Basen des Exon 2 und dem Start-Codon am Ende von Exon 1 von CPβ. Diese Verkürzung der mRNA resultierte allerdings nicht in einer Leserahmenverschiebung innerhalb der CPβ Codonfolge. Die Start-MO CPβ mRNA ist 90 Basen kürzer (Abb.20, B), was auf der Aminosäureebene einen Verlust von 30 Aminosäuren des N-terminalen Bereiches des CPβ Proteins nach sich zieht. Sowohl für den E3I3-MO als auch für den Start-MO findet man die beschriebenen Veränderungen der CPβ mRNA bei mildem und schwerem Phänotyp.

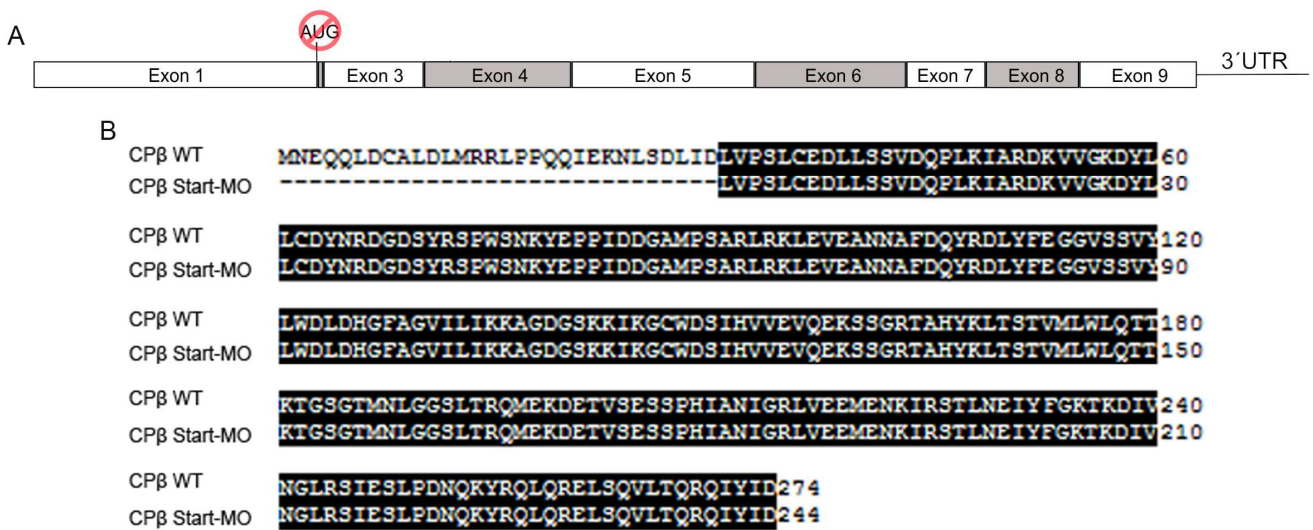


Abbildung 20: Start-MO Morphanten CPβ RNS Übersicht und abgeleitete Aminosäuresequenz des Start-MO Morphanten CPβ1 und WT CPβ1 im Vergleich

(A) Exonüberblick der CPβ RNS, nach Start-MO Behandlung fehlt das Start-Codon und ein Großteil des Exon 2
 (B) Aminosäuresequenzvergleich von Start-MO Morphanten CPβ1 und WT CPβ1. Der Ein-Buchstabencode der Aminosäuren wurde verwendet. Schwarz hinterlegte Buchstaben heben die Sequenzhomologie der verglichenen Sequenzen hervor. Striche (-) hingegen weisen auf fehlende Aminosäuren in der Primärsequenz von CPβ1 hin. Um zu diesem Sequenzvergleich zu gelangen wurde die CPβ1 Sequenz der RT-PCR von Start-MO Morphanten unter Zuhilfenahme des Internet basierten Dienstes „ExPASy Translate tool“ unter Berücksichtigung des korrekten Leserahmens in die Aminosäuresequenz übersetzt und die beiden Sequenzen wurden mit dem Internet basierten Programm Clustal Omega aligniert.

3.1.6 Western-Blot Analyse des CPβ *knockdown* im Zebrafärbling

Um die Effizienz des CPβ *knockdowns* quantitativ zu bestimmen wurden Western-Blots (Abb.21) mit Proteinextrakten von den drei verschiedenen Morphanten und den dazugehörigen Kontrollen durchgeführt. Proteinextrakt aus einer Morphante (Start-MO, E3I3-MO oder 5'UTR-MO injizierte Tiere) wurde stets zusammen mit dem Proteinextrakt aus 48 SnB unbehandelten Zebrafärbling Embryonen und Proteinextrakt aus 72 SnB Kontroll-MO injizierten Tieren aus denselben Gelegen stammend auf die Gele aufgetragen. Die gemeinsamen Elterntiere sollen die biologische Diversität verringern. 24 Stunden jüngere unbehandelte Zebrafärbling Embryonen sollen einen möglichen Unterschied im CPβ Gehalt durch die Entwicklungsverzögerung in den Morphanten reduzieren. Zur Detektion von CPβ1 Protein auf der NC-Membran kam mAb1E5.25.4 (Abb.21, A) und Biogenes *pan*-CPβ (Abb.21, B) zum Einsatz. Als Positivkontrolle wurde 0,18 µg rekombinantes Hühner CPβ Protein verwendet. Die Ladekontrolle ist β-actin. Gegen β-actin wurde das CPβ Signal normalisiert und das Verhältnis in den beiden Graphen (Abb.21, C und D) dargestellt. Beide Western-Blots zeigen eine signifikante Herabregulierung des CPβ Proteins in allen Morphanten verglichen mit unbehandelten Zebrafärbling Embryonen und Kontroll-MO injizierten Tieren.

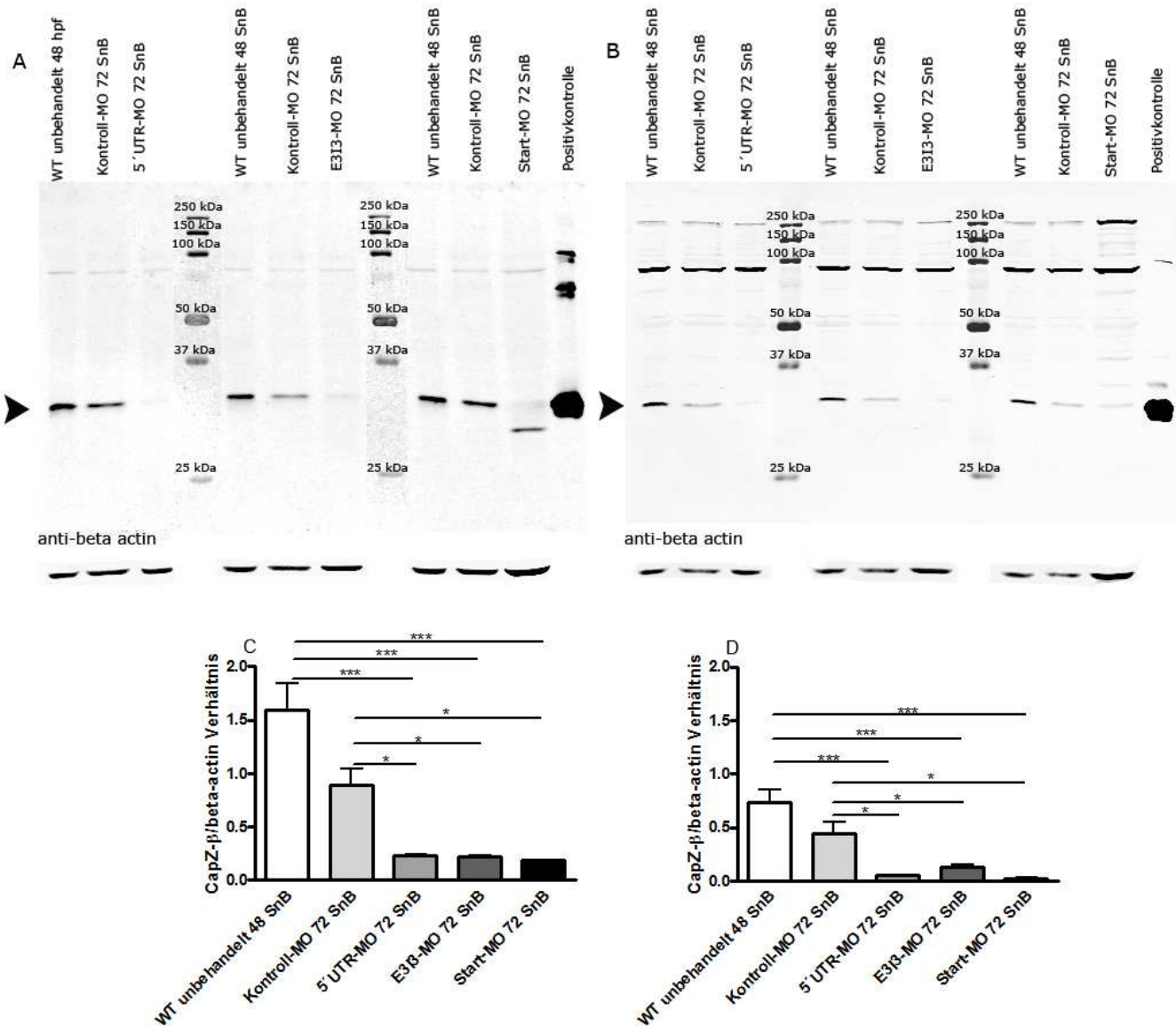


Abbildung 21: Western Blot Analyse des CPβ knockdowns in drei Morphanten Ansätzen

(A) Western-Blot von drei *knockdown*-Ansätzen mit jeweils zwei Kontrollgruppen (WT unbehandelt 48 SnB und Kontroll-MO 72 SnB). Die drei Dreiergruppen werden jeweils von einem Größenstandard voneinander getrennt. Ganz rechts ist auf dem Blot die Positivkontrolle mit 0,18 µg rekombinarem Hühner CPβ aufgetragen. Verwendeter sekundär Antikörper ist mAb 1E5.25.4. Anti-beta actin wurde als Ladekontrolle und zur späteren Normalisierung des CPβ Signals verwendet. Die Laufhöhe von CPβ ist mit einem schwarzen Pfeilkopf markiert. (B) Belegung des Western Blots mit Proben wie in A. Verwendeter sekundär Antikörper ist Biogenes *pan*-CPβ. Die Laufhöhe von CPβ ist mit einem schwarzen Pfeilkopf markiert. (C) Säulen-Diagramm zur Quantifizierung des CPβ Signals aus A nach Normalisierung gegen die Ladekontrolle beta actin. (D) Säulen-Diagramm zur Quantifizierung des CPβ Signals aus B nach Normalisierung gegen die Ladekontrolle beta actin. * p-Wert <0,01 , *** p-Wert <0,0001.

In keinem der Proteinextrakte der drei CPβ Morphanten ist eine immunreaktive Bande auf der korrekten Laufhöhe von CPβ zu detektieren, die eine vergleichbare Intensität wie die Banden der beiden Kontrollgruppen zeigt. Der Start-MO 72 SnB Morphanten Proteinextrakt zeigt eine immunreaktive CPβ Bande mit einem geringeren Molekulargewicht, was die Befunde aus der RT-PCR (Abb.18, B) bestätigt. Die detektierbaren immunreaktiven Banden in Abbildung 21 B sind um einiges

schwächer in der Signalstärke, als die Banden in Abbildung 21 A.. Morphanten Proteinextrakte weisen nur sehr schwache Banden auf der erwarteten Laufrhöhe von CP β auf. Die erwartete Bande für die CP β 2 Isoform wurde nicht detektiert, da vermutlich zu wenig CP β 2 in den Proben enthalten war, um ein ausreichendes Signal zu erzeugen. Der Nachweis bzw. der Ursprung der Bande etwas unterhalb von 100kDa (Abb. 21, B) wurde nicht untersucht. Im Gegensatz zum unbehandelten WT sind die CP β Mengen in den Morphanten um den Faktor 7,03 (5'UTR-MO), 7,1 (E3I3-MO) und 8,5 (Start-MO) geringer (Abb. 21, C). Im Vergleich zum Kontroll-MO liegen die Morphanten um den Faktor 3,9 (5'UTR-MO), 3,95 (E3I3-MO) und 4,7 (Start-MO) hinter der CP β Expression zurück (Abb.21, C). Alle drei CP β Morphanten Proteinextrakte zeigen eine signifikante Reduktion der CP β Menge im Vergleich zum Kontroll-Morphanten Proteinextrakt (Abb. 21, D). Im Vergleich zum unbehandelten WT sind die CP β Mengen in den Morphanten um den Faktor 14,4 (5'UTR-MO), 5,5 (E3I3-MO) und 30 (Start-MO) geringer (Abb. 21, D). Im Vergleich zum Kontroll-MO liegen die Morphanten um den Faktor 8,8 (5'UTR-MO), 3,3 (E3I3-MO) und 22 (Start-MO) hinter der CP β Expression zurück (Abb.21, D). Für jeden der Western-Blots wurden die Proteinextrakte aus Proben der gesamten Phänotypenpopulation mehrerer Morpholino-Injektionsrunden gewonnen.

3.1.7 Immunfluoreszenzaufnahmen der Rumpf und Schwanzregion von E3I3-MO und Start-MO Morphanten und Kontrollen

Um den CP β *knockdown* Phänotyp auf myofibrillärer Ebene zu untersuchen wurden *whole mount* Immunfluoreszenz-Aufnahmen von 72 SnB CP β Morphanten und 48 SnB Kontroll-Morpholino injizierten Tieren gemacht. Die verwendeten Zebrafärbung Embryonen wurden als *skinned larvae*, d.h. nach einer 15 minütigen Behandlung mit 1 % TritonX-100, ohne Fixierung mit Antikörpern gegen skelettales α -Actinin, CP β 1 und Phalloidin inkubiert. Zur Markierung der Zellkerne kam der Farbstoff Hoechst zum Einsatz. In Abbildung 22 werden Immunfluoreszenz-Aufnahmen von 48 SnB Kontroll-Morphanten mit CP β Morphanten hinsichtlich der Myofibrillenverteilung, des CP β 1 und der α -Actinin Verteilung verglichen. In den Kontroll-MO behandelten Embryonen findet man eine gleichmäßige, parallel zueinander ausgerichtete und entlang der antero-posterioren Achse verlaufende Verteilung der Myofibrillenbündel. Die immunhistochemische Färbung in Abbildung 22 A–F wurde mit einem Antikörper gegen α -Actinin angefertigt. Die Zellkerne wurden durch Hoechst Farbstoff blau markiert. In den CP β Morphanten ist die Ausrichtung der einzelnen Myofibrillenbündel zueinander hingegen gestört. Zwischen den Myofibrillenbündeln sind unterschiedlich große Lücken zu erkennen (Abb.22, C und F). Zudem sind die Myofibrillenbündel nicht gleichmäßig, parallel zueinander und entlang der antero-posterioren Achse verteilt. An Somitengrenzen der Morphanten weisen manche Myofibrillenbündel ein erhöhtes α -Actinin Signal auf (Abb.22, C, weiße Pfeilköpfe). Die Myofibrillenbündel sind wellig und beschreiben Kurven. Ein Unterschied in der Myofibrillenverteilung und -dichte zeigt sich besonders gut im Vergleich von anterioren Myotomen der Kontrolle (Abb.22, A) zu anterioren Myotomen der CP β Morphanten mit schwerer Ausprägung des Phänotyps (Abb.22, C).

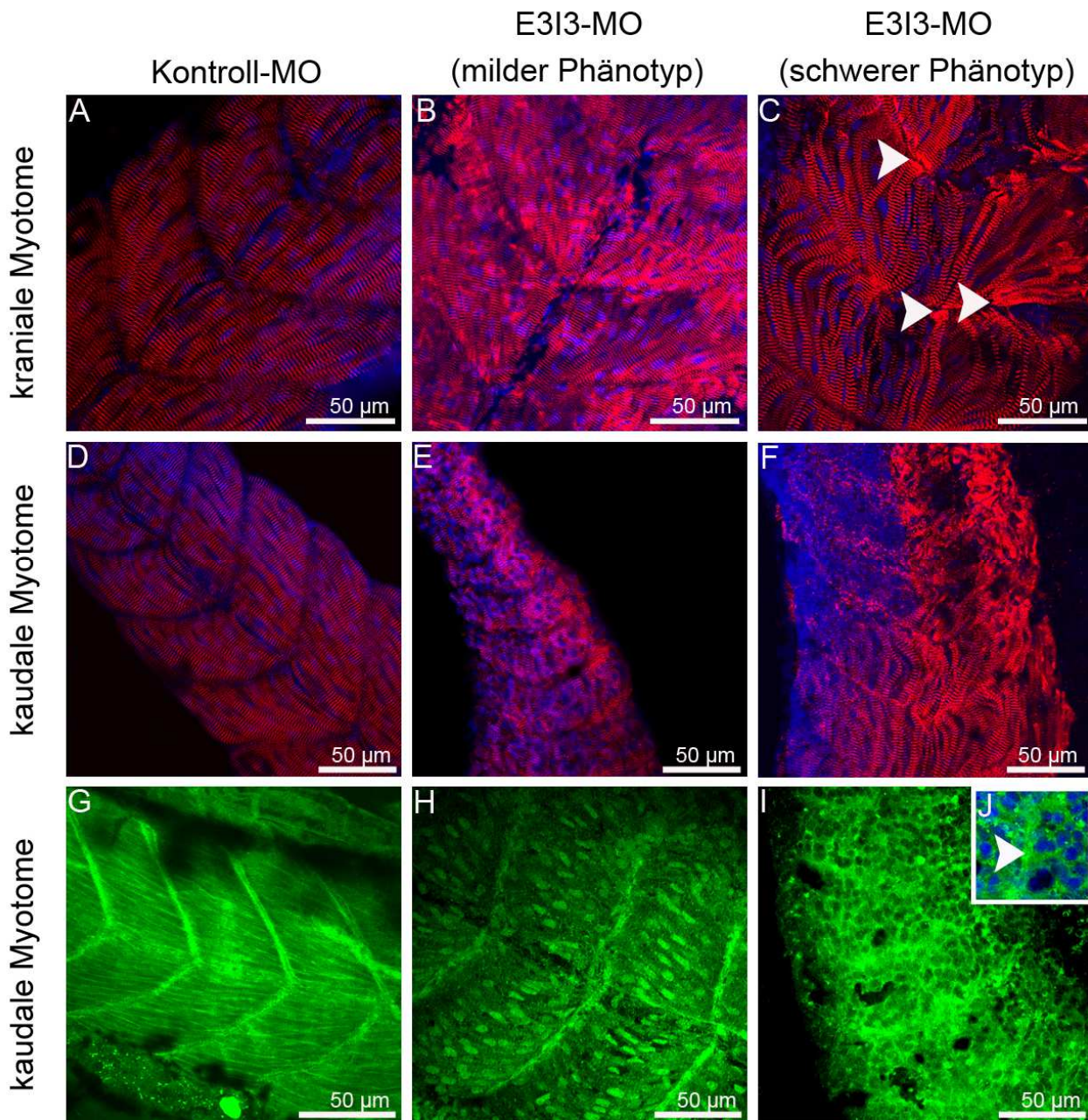


Abbildung 22: Indirekte Immunfluoreszenz von Rumpf und Schwanzregionen von E3I3-MO Morphanten und Kontroll-Morphanten

α -Actinin und Hoechst markierte Immunfluoreszenzdoppelfärbungen in *whole mount* Zebrafisch Embryonen (A-F). Kontroll-MO injizierte Tiere zeigen sowohl im Rumpf (A) als auch in der Schwanzregion (D) eine gleichmäßige Verteilung der Myofibrillenbündel. Der E3I3-MO Morphant hingegen zeigt eine sehr unregelmäßige Verteilung der Myofibrillenbündel im Rumpf (B) als auch in der Schwanzregion (E). In E3I3-MO Morphanten mit schwerer Ausprägung des Phänotyps zeigen sich im Rumpf (C) und in der Schwanzregion (F) deutliche Lücken zwischen den Myofibrillenbündeln bzw. Regionen in kaudalen Somiten weisen gar keine reifen myofibrillären Strukturen auf (F). Die Darstellung in (C) und (F) ist repräsentativ für alle drei CP β Morphanten mit schwerem Phänotyp (C) zeigt eine erhöhte α -Actinin Expression an den Enden der Myofibrillenbündel (weiße Pfeilköpfe). In (G) ist die CP β 1 Expression in 48 SnB Kontroll- Morphanten im Vergleich zur CP β 1 Expression in E3I3-MO Morphanten mit mildem Phänotyp (H) und schwerem Phänotyp (I) gezeigt. (J) ist eine vergrößerte Darstellung der CP β 1 Expression mit Hoechst Färbung der Zellkerne in E3I3-MO Morphant mit schwerem Phänotyp an einer Somitengrenze (weißer Pfeilkopf).

Die CP β 1 Verteilung ist in 48 SnB Kontroll-Morphanten ähnlich wie schon zuvor in Abbildung 10 für CP β 1 in 48 SnB WT Embryonen gezeigt absolut wildtypisch. In CP β Morphanten mit mildem Phänotyp ist die CP β 1 Verteilung (Abb.22, H) gegenüber den Kontrollen verändert. Die Expression in den kaudalen Myotomen ist in den vertikalen Myosepten reduziert und entlang der Myofibrillenbündel auf kurze punktförmige Abschnitte beschränkt. Ein CP β 1 Signal ist in den Z-Scheiben der Sarkomere nicht mehr klar zu erkennen (Abb.22, H). Im Gegensatz zum Kontroll-Morphanten wo CP β 1 entlang der Myofibrillenbündel, in den vertikalen Myosepten und den Z-Scheiben der Sarkomere lokalisiert ist (Abb.22, G). Der Winkel der vertikalen Myosepten ist in den CP β Morphanten mit milder Phänotypenausprägung stumpfer als in den Kontrollen (Abb.22, H). In CP β Morphanten mit schwerer Phänotypenausprägung ist CP β 1 in kaudalen Myotomen (Abb.22, I) weder in vertikalen Myosepten noch entlang der Myofibrillenbündel klar zu detektieren. Eine klare Abgrenzung von Myoseptum und umgebenden Gewebe ist kaum möglich. In CP β 1 Morphanten mit schwerem Phänotyp ist CP β 1 in kreisförmigen schwarz erscheinenden Flecken nicht vorhanden (Abb.22, I). Diese kreisförmigen schwarzen Flecken repräsentieren Zellkerne, wie in Abbildung 22 J nach Zellkernfärbung zu erkennen ist. Der weiße Pfeilkopf in J markiert eine vertikale Myosepte. Ein Ausbleiben bzw. eine Stagnation der Myofibrillogenese kann in posterioren Myotomen der CP β Morphanten mit schwerem Phänotyp (Abb.22, F) beobachtet werden. Die Detailaufnahme aus einem posterioren CP β Morphanten Myotom ohne reife Myofibrillenbündel (Abb.23, D) zeigt punktförmige α -Actinin Signale. Dabei kommen wie an einer Perlenschnur aufgereihte punktförmige α -Actinin Signale (Abb.23, D, weiße Pfeilköpfe), als auch breitere an Z-Scheiben erinnernde Strukturen vor. In kaudalen Myotomen der Kontroll-MO injizierten Tiere (Abb.23, A) findet man in den Lücken zwischen den Myofibrillenbündel ebensolche punktförmige α -Actinin Signale (Abb.23, B, weiße Pfeilköpfe). In 48 SnB alten Kontrolltieren findet man dieses α -Actinin Muster nicht mehr. Der E313-MO Morphant zeigt trotz des 48 stündigen Entwicklungsvorsprunges gegenüber den Kontrolltieren noch Myofibrillogenese Muster.

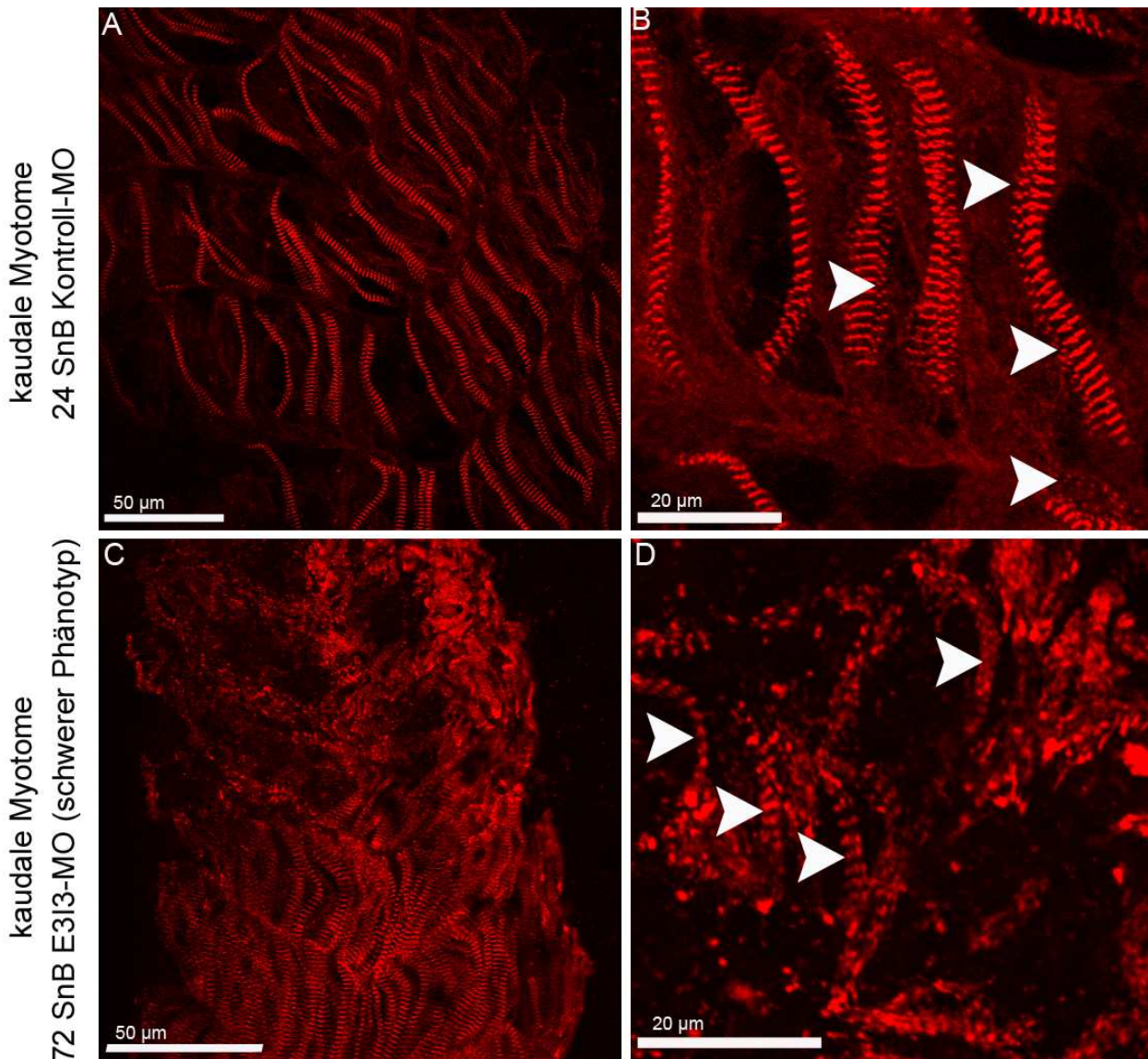
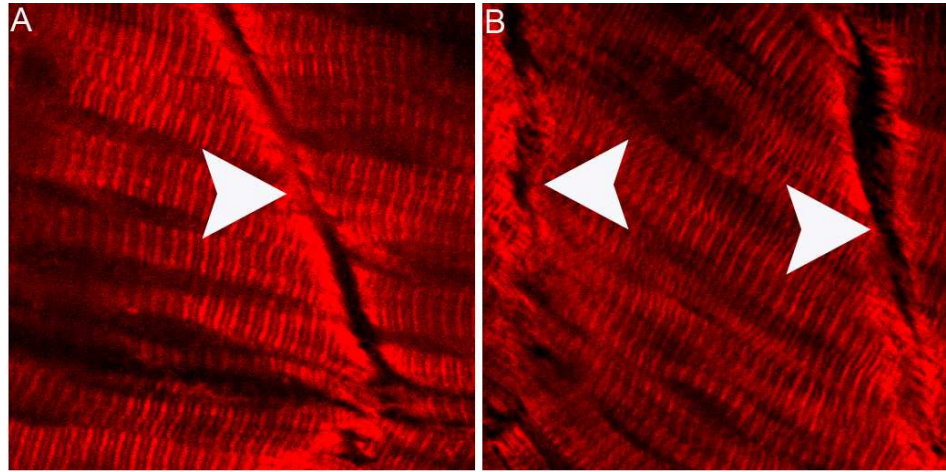


Abbildung 23: Indirekte Immunfluoreszenz der E3I3-MO Morphanten und Kontroll-Morphanten Schwanzregion

α -Actinin markierte Immunfluoreszenzfärbungen in *whole mount* Zebrafisch Embryonen (A-D) 24 SnB Kontroll-MO injizierte Tiere zeigen eine lückenhafte Myofibrillenverteilung in kaudalen Myotomen (A). Teilvergrößerung (B) aus (A) zeigt wie an einer Perlenschnur aufgereichte punktförmige α -Actinin Signale (weiße Pfeilköpfe). In E3I3-MO Morphanten mit schwerer Ausprägung des Phänotyps zeigen sich in der Schwanzregion deutliche Lücken zwischen den Myofibrillenbündeln bzw. weisen gar keine reifen myofibrillären Strukturen auf. Teilvergrößerung (D) aus (B) zeigt sowohl einzeln auftretende punktförmige Signale, als auch wie an einer Perlenschnur aufgereichte punktförmige α -Actinin Signale (weiße Pfeilköpfe).

Die Verwendung des F-Aktin bindenden Phallotoxins Phalloidin, welches seinerseits mit dem fluoreszierenden Farbstoff Alexa 555 gekoppelt war, ermöglichte die Markierung von polymerisiertem F-Aktin in *whole mount* Zebrafisch Embryonen. Es wurden die F-Aktin Muster in der Rumpf- und Schwanzregion von 48 SnB Kontroll-MO injizierten Tieren mit den F-Aktin Mustern von 72 SnB Start-MO Morphanten verglichen. In Abbildung 24 A und B sind Immunfluoreszenzaufnahmen von Schwanzregionen von 48 SnB Kontroll-Morphanten und verschiedenen Ausprägungen des milden Start-MO CP β *knockdown* Phänotyps (Abb. 24, C-H) zu sehen.

Kontrolle



milder Phänotyp

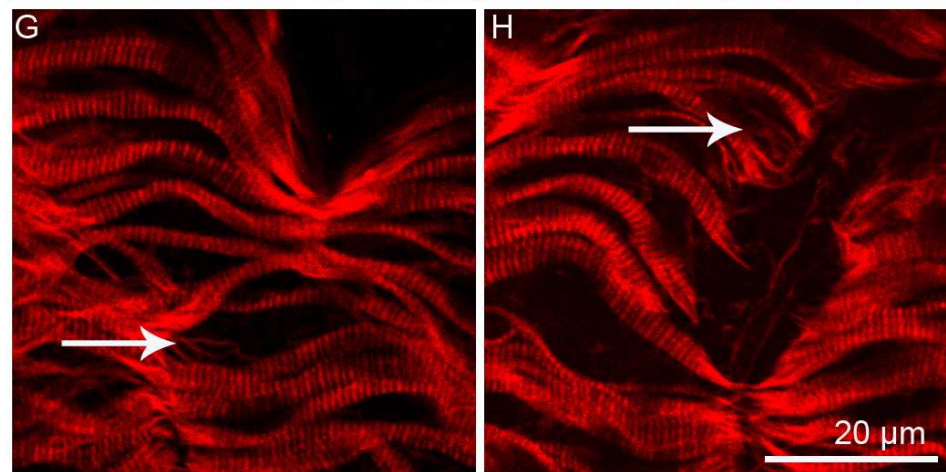
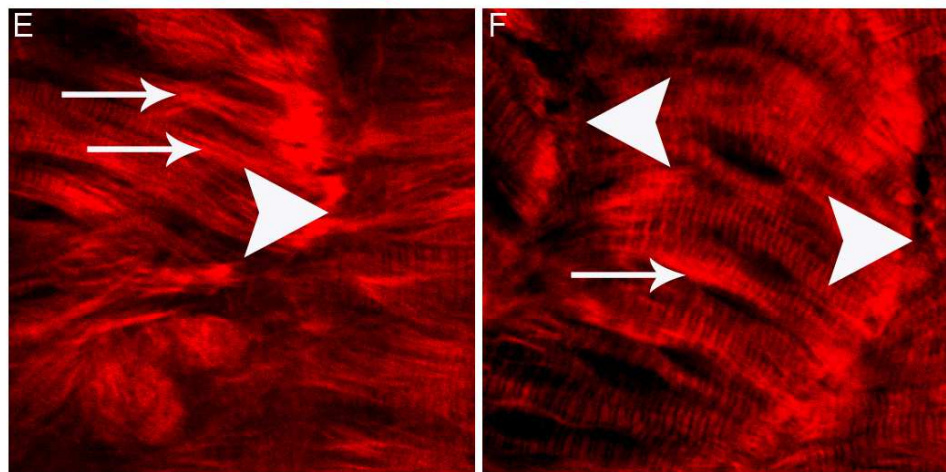
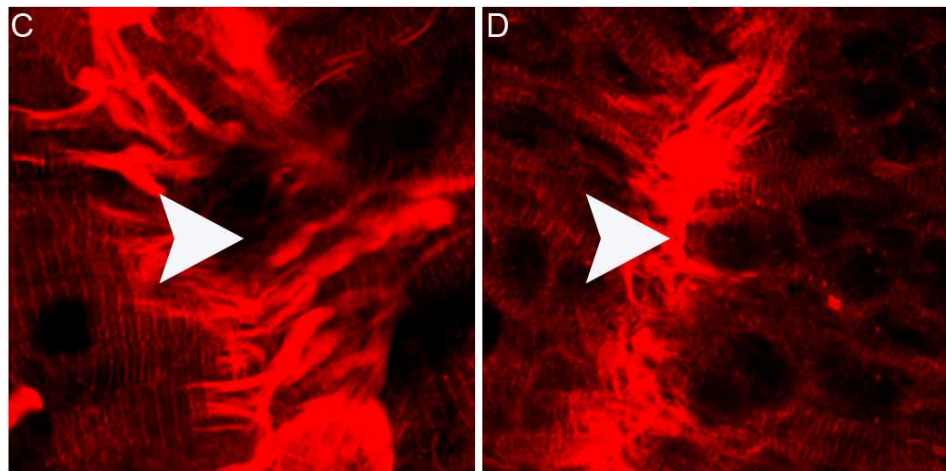


Abbildung 24: Immunfluoreszenzaufnahmen von Schwanzregionen des Start-MO Morphanten und Kontroll-Morphanten

Phalloidin Markierungen von F-Aktin in 48 SnB Kontroll-Morphanten (A und B) und in drei verschiedenen Ausprägungen des milden CP β *knockdown* Phänotypen im Start-MO Morphanten (C - H). Kontroll-Morphanten (A und B) zeigen eine gleichmäßige, parallel zueinander und entlang der antero-posterioren Achse verteilte Myofibrillenbündelorganisation. An vertikalen Myosepten (weiße Pfeile) endet die F-Aktin Polymerisation. C und D zeigen starke F-Aktin Signale im Bereich der vertikalen Myosepten (weiße Pfeilköpfe). Die Myotomgrenzen sind mit F-Aktin durchsetzt. E und F zeigen relativ dicke F-Aktin Stämme innerhalb eines Myotoms ohne sarkomerisches Bandenmuster (weiße Pfeile). Die Myotomgrenzen sind durch weiße Pfeilköpfe markiert. G und H zeigen die lückenhafte und wellige Verteilung der Myofibrillenbündel innerhalb eines Myotoms. Weiße Pfeile heben relativ lange dünne F-Aktin Stränge ohne sarkomerisches Bandenmuster hervor.

Auch bei dieser Untersuchung zeigt sich eine Störung in der Ausrichtung der einzelnen Myofibrillenbündel zueinander. Zwischen den Myofibrillenbündeln sind große Lücken zu erkennen. Zudem sind die Myofibrillenbündel nicht gleichmäßig, parallel zueinander und entlang der antero-posterioren Achse angeordnet (Abb.24, D, G und H). Die Myofibrillenbündel sind wellig und beschreiben Kurven. Innerhalb der Myotome befinden sich Bereiche von F-Aktin, die kein sarkomerisches Bandenmuster aufweisen (Abb.24, E, F, G und H, weiße Pfeile). In den Kontroll-MO behandelten Embryonen findet man eine gleichmäßige, an manchen Stellen durch langgestreckte schmale Lücken getrennte, parallel zueinander ausgerichtete und entlang der antero-posterioren Achse verlaufende Myofibrillenbündelverteilung (Abb.24, A und B). Trotz der leicht unterschiedlichen Myofibrillenbündelmusterausprägung in den verschiedenen CP β Morphanten mit mildem Phänotyp findet man ein immer wiederkehrendes Merkmal im Bereich der vertikalen Myosepten. Die F-Aktin Polymerisation ist insbesondere an vertikalen Myosepten gegenüber der Kontrolle (Abb.24, A und B, weiße Pfeilköpfe) massiv gesteigert (Abb.24 C und D, weiße Pfeilköpfe). Die F-Aktin Lokalisation ohne das für ein Sarkomer typische Bandenmuster ist in den Kontrollen stets limitiert auf das Ende eines Myofibrillenbündels (Abb.24, A und B, weiße Pfeilköpfe), wohingegen die CP β Morphanten F-Aktin Stränge ohne sarkomerisches Bandenmuster mitten in einem Myotom aufweisen (Abb.24, E und F, weiße Pfeile). Die am Ende einer Myofibrille im Bereich der Myosepten austretenden F-Aktin Stränge überschreiten den Bereich zwischen zwei Myotomen nicht und enden in den Kontrollen stets mit Beginn der vertikalen Myosepte, welche den Abschluss eines Myotoms bildet (Abb.24, A und B). Außerdem sind nur Myofibrillenbündel mit klarem sarkomerischen Bandenmuster innerhalb der Myotome der Kontrollen zu beobachten. Die am Ende einer Myofibrille austretenden F-Aktin Stränge überschreiten die Myotomgrenzen und treten in den CP β Morphanten in einer sehr hohen Quantität auf (Abb.24, C und D). CP β Morphanten mit schwerer Ausprägung des CP β *knockdown* Phänotyps zeigen die für den milden Phänotyp beschriebenen F-Aktin Muster, jedoch in einer deutlicheren Ausformung sowohl in quantitativer als auch qualitativer Hinsicht. Hier werden für alle drei Morphanten repräsentative Aufnahmen vom Start-MO Morphanten mit schwerer Ausprägung des Phänotyps gezeigt. Interessanterweise wird in Embryonen mit schwerem Phänotyp neben einer Abweichung in der Myofibrillenbündelverteilung in kaudalen Myotomen – ganz im Gegensatz zum milden Phänotyp - auch in kranialen Myotomen eine Veränderung der Myofibrillenbündelverteilung gefunden. In Abbildung 25 A

sind vier kaudale Myotome eines 48 SnB Kontroll-Morphanten und in Abbildung 25 B ist der kaudale Bereich eines 72 SnB Start-MO Morphanten (schwerer Phänotyp) dargestellt.

schwerer Phänotyp

Kontrolle

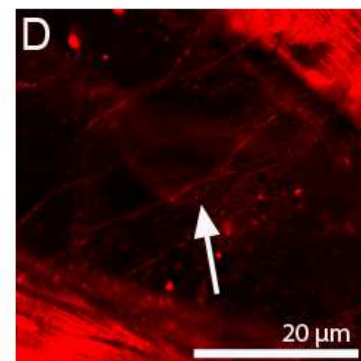
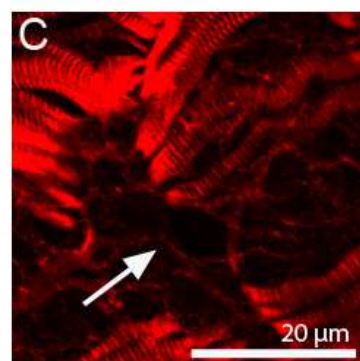
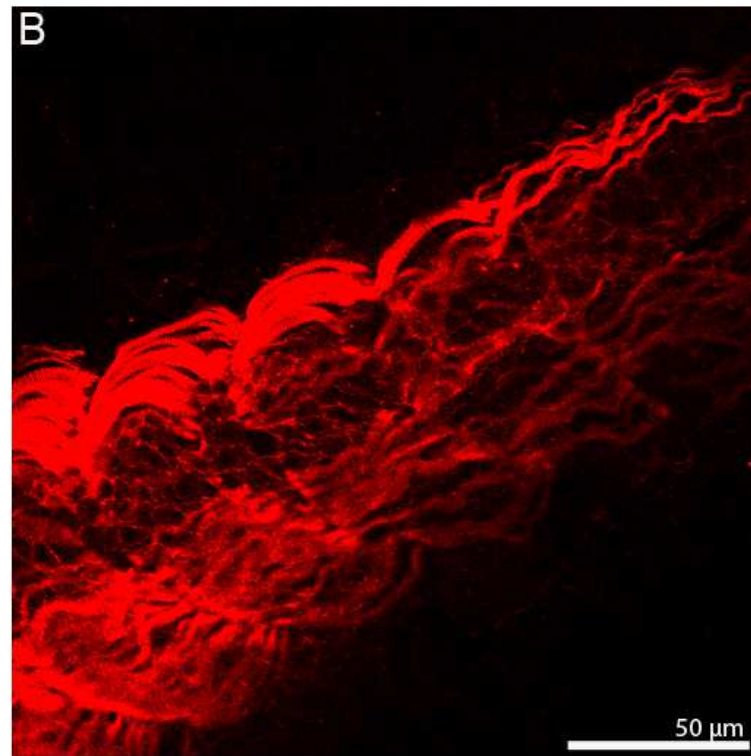
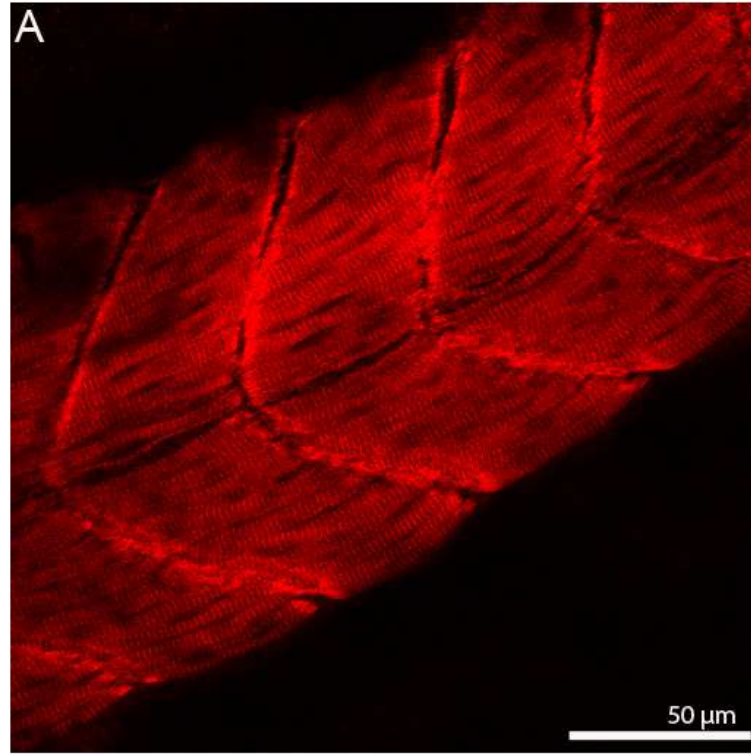


Abbildung 25: Immunfluoreszenzaufnahmen von Schwanzregionen des Start-MO Morphanten und Kontroll-Morphanten

Phalloidin Markierungen von F-Aktin in 48 SnB Kontroll-Morphanten (A) und in der schweren Ausprägung des CP β *knockdown* Phänotypen im Start-MO Morphanten (B-D). (A) Kontroll-Morphanten zeigen eine gleichmäßige, parallel zueinander und entlang der antero-posterioren Achse ausgerichtete Myofibrillenbündelorganisation. (B) Start-MO Morphanten zeigen große Lücken zwischen den Myofibrillenbündeln und F-Aktin Polymerisation innerhalb der Myotome ohne sarkomerisches Bandenmuster. (C) und (D) sind vergrößerte Ausschnitte aus (B) und offenbaren dünne F-Aktin Stränge innerhalb eines Myotoms ohne sarkomerisches Bandenmuster (weiße Pfeile).

In kaudalen Myotomen von Start-MO Morphanten ergeben sich relativ große Lücken zwischen den Myofibrillenbündeln (Abb.25, B). Des Weiteren zeigt sich eine F-Aktin Polymerisation in Bereichen innerhalb der Myotome ohne das typische sarkomerische Bandenmuster (Abb.25, C und D, weißer Pfeil). Zudem ist die Ausrichtung der Myofibrillenbündel entlang der antero-posterioren Achse gestört. In den kaudalen Myotomen der CP β Morphanten mit schwerer Ausprägung des Phänotyps finden sich nur eine deutlich reduzierte Myofibrillenbündelzahl (Abb. 25, B) mit sarkomerischem Bandenmuster verglichen mit den Kontrollen (Abb.25, A). Große Bereiche der kaudalen Myotome erscheinen nahezu frei von Myofibrillenbündeln und sind statt dessen durchsetzt mit feinen F-Aktin Strängen ohne sarkomerisches Bandenmuster (Abb.25, C und D, weiße Pfeile markieren exemplarisch zwei der F-Aktin Stränge).

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse ein konsistentes Bild des CP β *knockdowns* in den drei verschiedenen Morpholino Ansätzen. Alle drei Morpholinos generieren einen ähnlichen gewebespezifischen Phänotypen. Der Phänotyp ist sowohl durch eine Unordnung der Skelettmuskelfibrillen der axialen Skelettmuskulatur als auch durch eine Hemmung der Myofibrillogenese charakterisiert.

3.1.8 Transmissionselektronenmikroskopie der Rumpf und Schwanzregion von CP β Morphanten und WT-Zebrabärblingen

Es wurden Ultradünnschnittserien von Start-MO injizierten 48 SnB und 72 SnB alten Tieren angefertigt und mittels TEM untersucht, um Erkenntnisse über subzelluläre Strukturen während der Myogenese in CP β defizienten Tieren zu gewinnen. Hierbei wurden sowohl der milde als auch der schwere Phänotyp der Start-MO Morphanten im Entwicklungsstadium 48 SnB und 72 SnB berücksichtigt. Außerdem wurden WT-Zebrabärblinge im 18-20 Somiten-Stadium, im Alter von 24 SnB und 48 SnB betrachtet. Die Proben wurden alle nach dem gleichen Protokoll fixiert, dehydriert und in Epon eingebettet (vgl. dazu Abschnitt 2.4.3). 72 SnB alte Morphanten mit schwerem Phänotyp (Abb.26, B) zeigen in kaudal gelegenen Somiten im Vergleich zu 48 SnB alten WT-Zebrabärblingen (Abb.26, A) keine Myofibrillen.

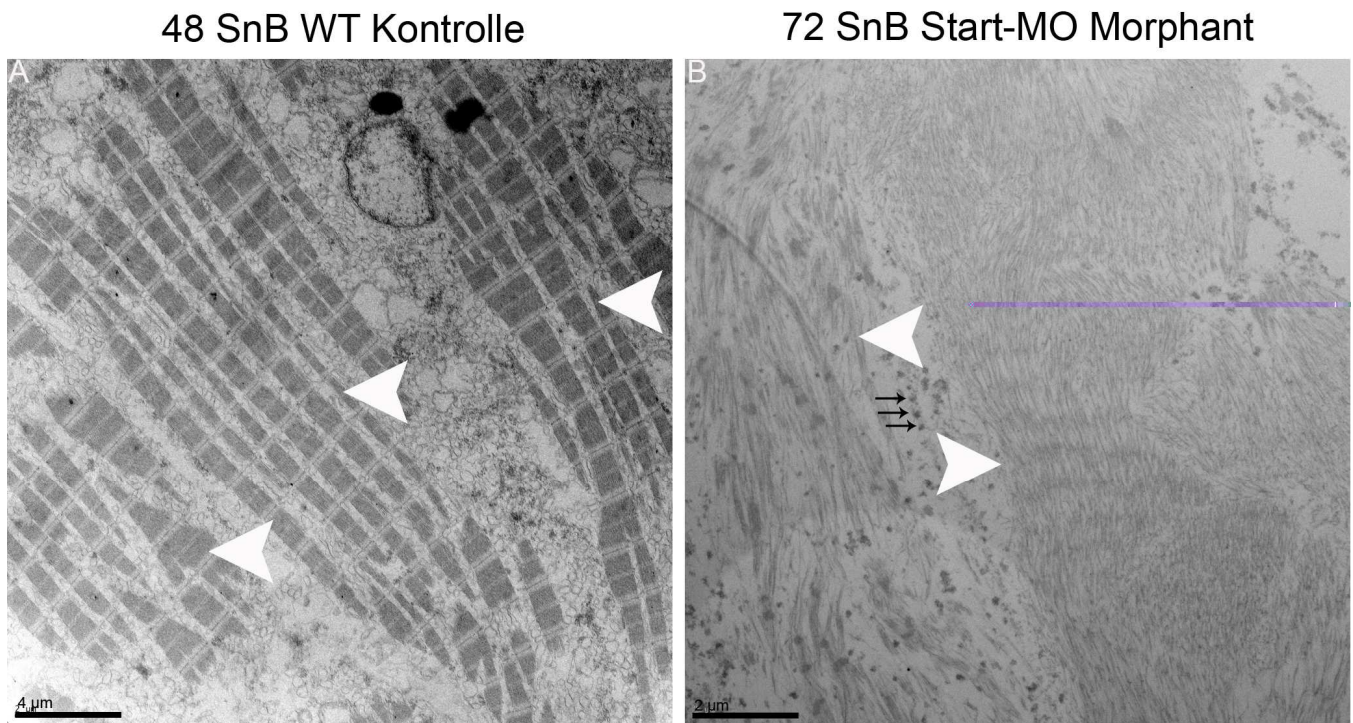


Abbildung 26: TEM Charakterisierung der subzellulären CP β knockdown Phänotypen im Start-MO Morphanten und unbehandelten WT Kontrollen

Elektronenmikrographen (EM) von Myotom aus 72 SnB CP β Start-MO Morphanten (B) und 48 SnB WT Kontrolle (A) im Längsschnitt. (A) In kaudalem Myotom 48 SnB unbehandelter WT Kontrolle sind Myofibrillenbündel zu erkennen (weiße Pfeilköpfe). (B) Myofibrillenbündelverteilung in einem kaudalen Myotom im schweren Phänotyp des Start-MO Morphanten bleibt aus. Das kaudale Myotom im CP β Morphanten zeigt zwei Populationen von Faserstrukturen (dicke weiße Pfeile) und dunkle elektronendichte Punkte (dünne schwarze Pfeile).

Auffällig ist das im distalen Bereich der Myotome des Start-MO Morphanten mit schwerer Ausprägung des Phänotyps reife Sarkomere zu entdecken sind, proximal aber nur an Stressfasern erinnernde Strukturen, welche sich in wenigstens zwei Populationen von faserigen Strukturen aufteilen (Abb.26, B, weiße Pfeilköpfe). Zwischen den Stressfasern erscheinen dunkle -sehr elektronendichte- punktförmige Strukturen (Abb.26, B, dünne schwarze Pfeile), welche an „z-bodies“ erinnern. Die Stressfasern rechts im Bild zeigen keine Berührungspunkte mit den sehr elektronendichten punktförmigen Strukturen. Die beiden Stressfaserpopulationen vermischen sich untereinander nicht. Es konnte weder in 24 SnB noch in 48 SnB alten WT-Zebrabärblingen die hier im Start-MO Morphanten gefundenen und als Stressfasern und „z-bodies“ beschriebenen Strukturen gefunden werden.

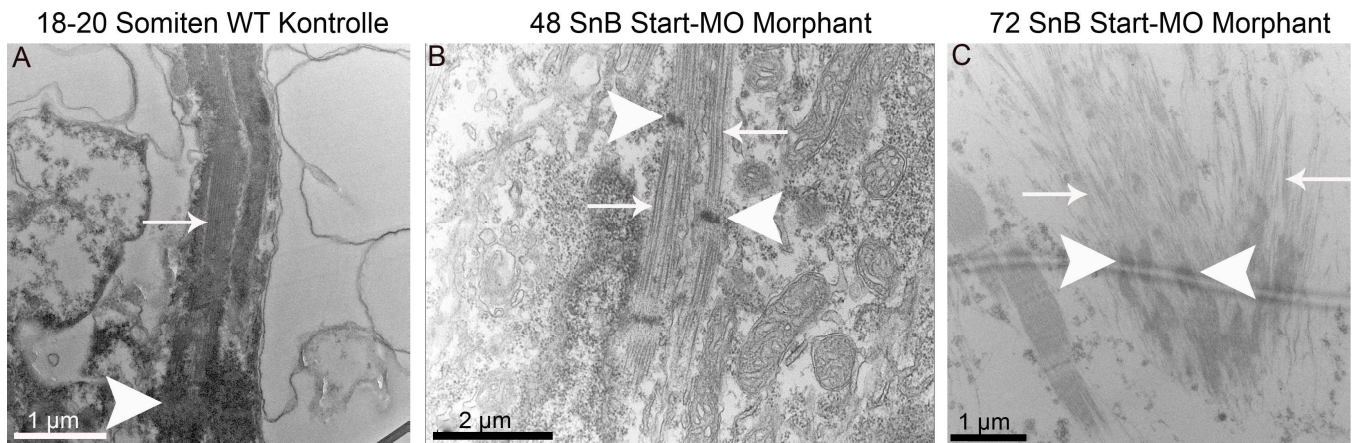


Abbildung 27: TEM Charakterisierung des subzellulären prä-Myofibrillen Phänotyps in CP β Morphanten und unbehandelten WT Kontrollen

EM von Myotomausschnitt aus WT Embryo im 18-20 Somiten Stadium (A), 48 SnB Start-MO Morphant mit milder Ausprägung des Phänotyps (B) und 72 SnB Start-MO Morphant mit schwerer Ausprägung des Phänotyps (C). Der weiße Pfeil in (A) deutet auf die parallel ausgerichteten Fasern in der sich gerade bildenden Myofibrille, der weiße Pfeilkopf markiert eine Struktur, die viele „z-bodies“ beinhaltet. (B) zeigt den Phänotyp zweier Myofibrillen im Start-MO Morphanten, die weißen Pfeile sind auf die Faserstrukturen gerichtet und die weißen Pfeilköpfe auf Z-Scheiben. (C) Weiße Pfeile deuten auf breit auseinander gefächerte faserige Strukturen und weiße Pfeilköpfe heben exemplarisch zwei Bereiche in einem diffusen Konglomerat amorpher Strukturen hervor, welche für einen einzigen „z-body“ unverhältnismäßig groß und viel zu diffus sind (vgl. dazu die Sarkomere links im Bild als Referenzpunkt).

Im 18-20 Somitenstadium des Zebrafärbings WT können Strukturen identifiziert werden, welche an eine frühe Myofibrille erinnern (Abb.27, A). Allerdings weisen die dünnen Filamente eine parallel zueinander ausgerichtete Ordnung auf. Sie haben bereits eine Art Bündel geformt, wohingegen die Stressfasern im 72 SnB Start-MO Morphanten mit schwerem Phänotyp ungeordnet, ohne parallele Ausrichtung zueinander und relativ breit aufgefächert ohne Z-Scheibenstruktur vorkommen (Abb.27, C, weiße Pfeile). Der milde Phänotyp des Start-MO Morphanten zeigt bei 48 SnB dünne Filamente und Z-Scheiben (Abb.27, B), die an jene Strukturen im 48 SnB WT Zebrafärbing erinnern (Abb.29, A). In Querschnitten von distalen Bereichen von 72 SnB Start-MO Morphanten mit schwerem Phänotyp (Abb.28, B) und 48 SnB WT-Zebrafärbingen (Abb.28, A) wird der Unterschied der Myofibrillendichte deutlich.

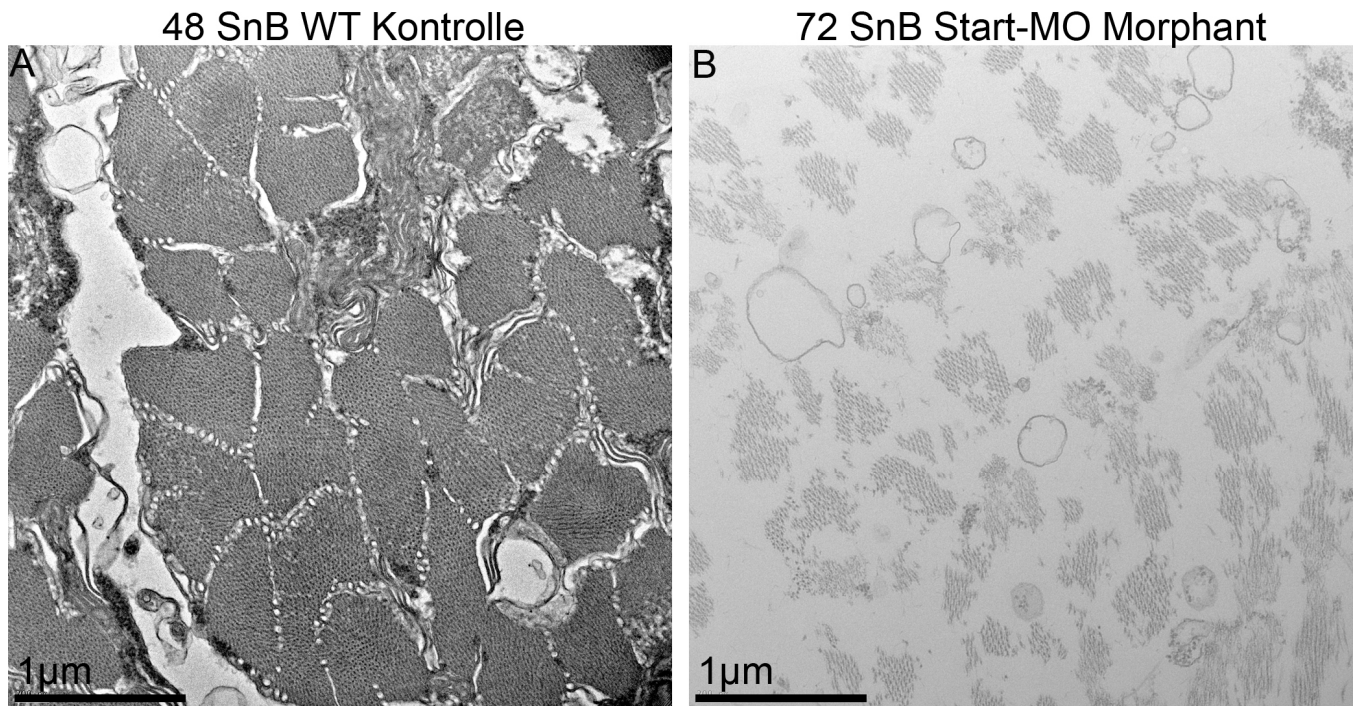


Abbildung 28: TEM Charakterisierung der subzellulären CP β *knockdown* Phänotypen im Start-MO Morphanten und unbehandelten WT Kontrollen

(A) EM von Querschnitt durch den distalen Bereich eines kaudal gelegenen Myotoms in einem 48 SnB WT Embryo, die elektronendichteren Myofibrillenbündel setzen sich gegen die sie umgebenden heller erscheinenden Membranen klar ab. (B) EM von Querschnitt durch den distalen Bereich eines kaudal gelegenen Myotoms eines 72 SnB Start-MO Morphanten mit schwerer Ausprägung des Phänotyps. Die Myofibrillenbündel kommen in deutlich geringer Zahl pro Fläche und haben einen geringeren Durchmesser verglichen mit den Myofibrillenbündeln in der 48 SnB WT Kontrolle.

Die Myofibrillenbündel der Start-MO Morphanten sind in milder und schwerer Ausprägung des Phänotyps signifikant geringer im Durchmesser als die Myofibrillenbündel von 48 SnB WT-Zebrabärblingen (vgl. dazu Abb.30 und Tab.18).

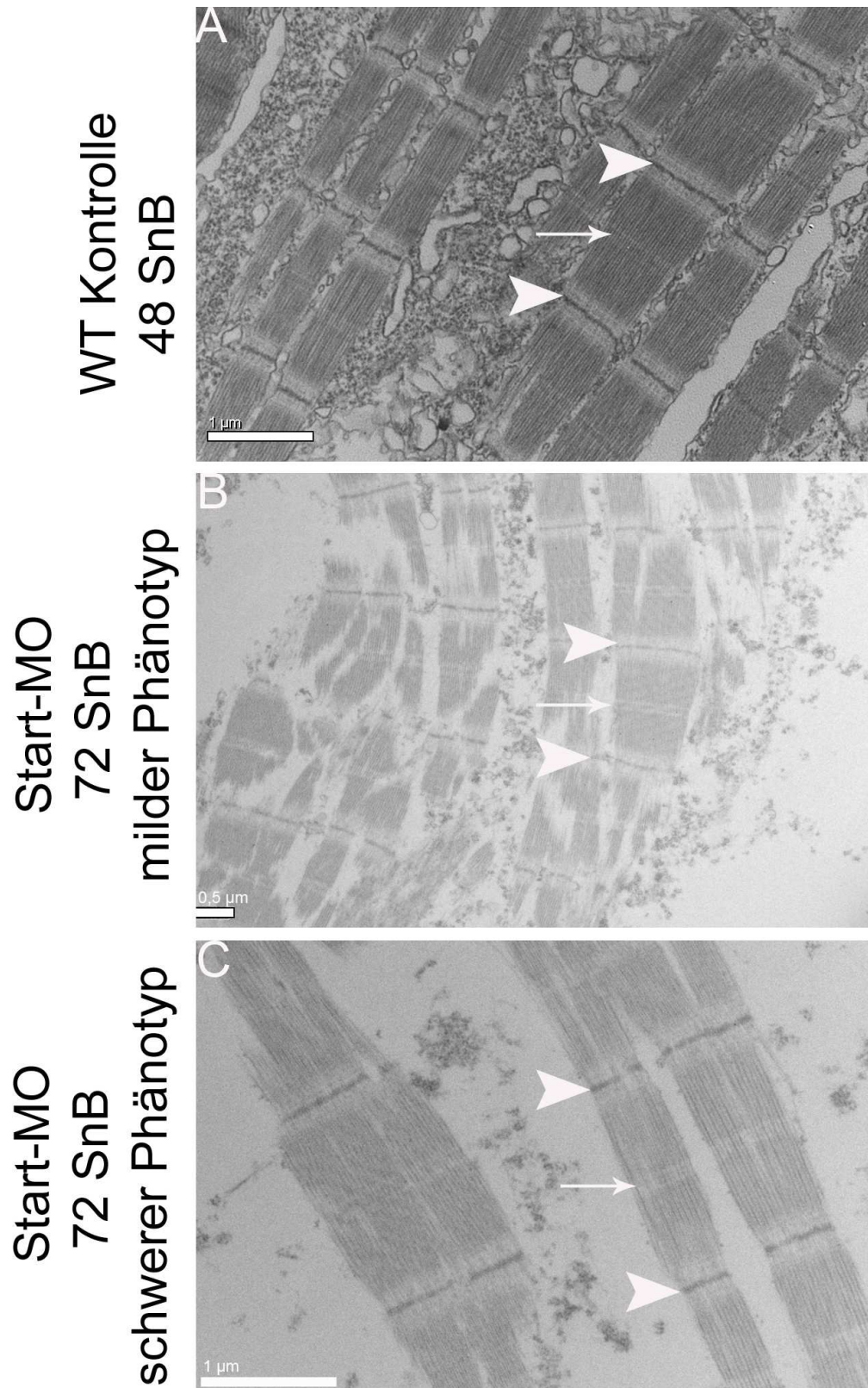


Abbildung 29: TEM Charakterisierung des subzellulären Sarkomer- Phänotypen in Start-MO Morphanten und unbehandelten WT Kontrollen

EM von Sarkomeren aus 48 SnB WT Embryonen (A), 72 SnB Start-MO Morphanten mit milder Ausprägung des Phänotyps (B) und 72 SnB Start-MO Morphanten mit schwerer Ausprägung des Phänotyps (C). Der weiße Pfeil deutet jeweils auf eine M-Bande eines Sarkomers (A-C), die weißen Pfeilköpfe markieren die Z-Scheiben eines Sarkomers (A-C). Die Strukturen sind in Ihrer Erscheinung hoch ähnlich zueinander.

Die Myofibrillen der 72 SnB Start-MO Morphanten zeigen eine ähnliche Sarkomerstruktur, wie der 48 SnB WT (Abb.29, A). Es werden Sarkomere mit klar erkennbaren Strukturen wie A- und I-Bande, M-Bande und Z-Scheibe gebildet (Abb.29, A, B und C, Pfeil markiert M-Bande und Pfeilköpfe Z-Scheiben). Hingegen in 48 SnB Start-MO Morphanten findet man in Tieren mit milder und schwerer Ausprägung des Phänotyps Sarkomere die noch keine M-Bande ausgebildet haben, wie dies auch in 24 SnB WT Tieren der Fall ist.

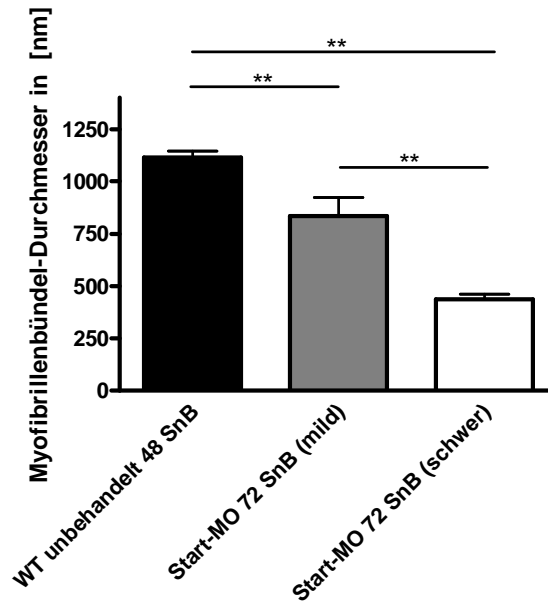


Abbildung 30: Myofibrillenbündel-Durchmesser des Start-MO Morphanten und WT Kontrollen.

Darstellung des Myofibrillenbündel-Durchmesser im Vergleich von Start-MO Morphanten zu 48 SnB WT Kontrollen. Der durchschnittliche Myofibrillenbündel-Durchmesser des Start-MO Morphanten mit milder Ausprägung des Phänotyps ist signifikant geringer als der Myofibrillenbündel-Durchmesser der 48 SnB WT Kontrolle. Der Start-MO Morphant mit schwerer Ausprägung des Phänotyps zeigt ebenso eine signifikante Verringerung des Myofibrillenbündel-Durchmesser im Vergleich zur 48 SnB WT Kontrolle. ** entsprechen einem p-Wert von <0,001.

Tabelle 17: Übersicht über Myofibrillenbündel-Durchmesser bei 72 SnB Start-MO Morphanten und 48 SnB WT Kontrollen

Behandlung und Alter der Embryonen	Myofibrillenbündel-Durchmesser [nm]
WT unbehandelt 48 SnB	1115 ± 30,44 (n= 61)
Start-MO Morphant 72 SnB (mild)	834,7 ± 88,22** (n= 27)
Start-MO Morphant 72 SnB (schwer)	436,9 ± 24,51** (n= 57)

Die Werte sind MW ± SEM, n entspricht der Anzahl der analysierten Myofibrillenbündel. Die Signifikanzen wurde mittels 1-way Anova und anschließendem Bonferroni-Post-Test bestimmt.

Bei der TEM wurde darauf geachtet entwicklungsbiologisch vergleichbare Myotome in den Embryonen auszuwählen. Da Zebrabärblinge einen Entwicklungsgradienten entlang der Körperachse besitzen ist die präzise Auswahl der analysierten Bereiche ausgesprochen wichtig. Unter Berücksichtigung der vorgenannten Parameter zeigt sich ein Entwicklungsrückstand von ca. 24 Stunden der Morphanten verglichen mit WT auf Sarkomerebene. In Tabelle 19 sind die Längenmessungen der Sarkomere, Myosinfilamente und Aktinfilamente in Start-MO Morphanten und 48 SnB WT Kontrollen dargestellt.

Tabelle 18: Längenbestimmung von Sarkomeren, dünnen und dicken Filamenten bei Start-MO Morphanten und 48 SnB WT Kontrollen

Behandlung und Alter der Embryonen	Sarkomerlänge [nm]	Myosinfilamentlänge [nm]	Aktinfilamentlänge [nm]
WT unbehandelt 48 SnB	1724 ± 9,5 (n= 53)	1366 ± 6,8 (n= 53)	790,4 ± 5,75 (n= 53)
Start-MO Morphant 72 SnB	1708 ± 11,37 (n= 47)	1387 ± 9,01 (n= 47)	790 ± 5,91 (n= 47)

Die Werte sind MW ± SEM, n entspricht der Anzahl der analysierten Sarkomere. Die Signifikanzen wurde mittels 1-way Anova und anschließend Bonferroni-Post-Test bestimmt.

Weder die Gesamtlänge der Sarkomere noch die Längen der Aktin – und Myosinfilamente sind in den Start-MO Morphanten signifikant unterschiedlich zur Kontrolle.

3.1.9 Rettungsexperiment des CPβ *knockdown* durch CPβ2-mRNS Injektion

Um heraus zu finden welchen Anteil der partielle Verlust der CPβ2 Isoform am beobachteten Phänotyp hat wurden Rettungsexperimente mit CPβ2-mRNS durchgeführt. Die Koinjektion von CPβ2-mRNS und des 5'UTR-MO führt zu keiner Rettung des Phänotyps zurück zur makroskopischen WT Morphologie (vgl. dazu Abb.14, obere beiden Reihen). Dabei wurden zwei verschiedene CPβ2-mRNS Konzentrationen mit einer konstant bleibenden 5'UTR-MO Konzentration für die Injektionen verwendet. Bei keiner der Versuchsreihen konnte eine Veränderung in der Häufigkeit und der Verteilung der Phänotypen, verglichen mit der Injektion von 5'UTR MO alleine, erreicht werden (Abb.31, A). Beide CPβ2-mRNS Konzentrationen führten nach Injektion zu einer ähnlichen Phänotypenverteilung und Überlebensrate der Tiere (Abb. 31, B). Der milde Phänotyp tritt bei 5'UTR Morphanten mit einer durchschnittlichen Penetranz von 78,21% auf. Der schwere Phänotyp liegt mit einer durchschnittlichen Penetranz von 17,70% deutlich darunter. Insgesamt ergibt dies für den 5'UTR-MO eine Penetranz von durchschnittlich 95,91%. Die 5'UTR-MO+CPβ2-mRNS Injektion resultiert in einer Penetranz für den milden Phänotyp von durchschnittlich 78,27% gegenüber dem schweren Phänotyp mit einer durchschnittlichen Penetranz von 21,71%. Insgesamt ergibt dies für 5'UTR-MO+CPβ2-mRNS behandelte Tiere eine Penetranz von durchschnittlich 99,98%. Es tritt auch keine signifikante Veränderung der Überlebensrate ein verglichen mit 5'UTR-MO injizierten Tieren. Die Überlebensrate der 5'UTR-MO injizierten Embryonen liegt nach 72 SnB bei durchschnittlich 69,23%. Die 5'UTR-MO+CPβ2-mRNS injizierten Tiere weisen eine durchschnittliche Überlebensrate von 61,67% auf.

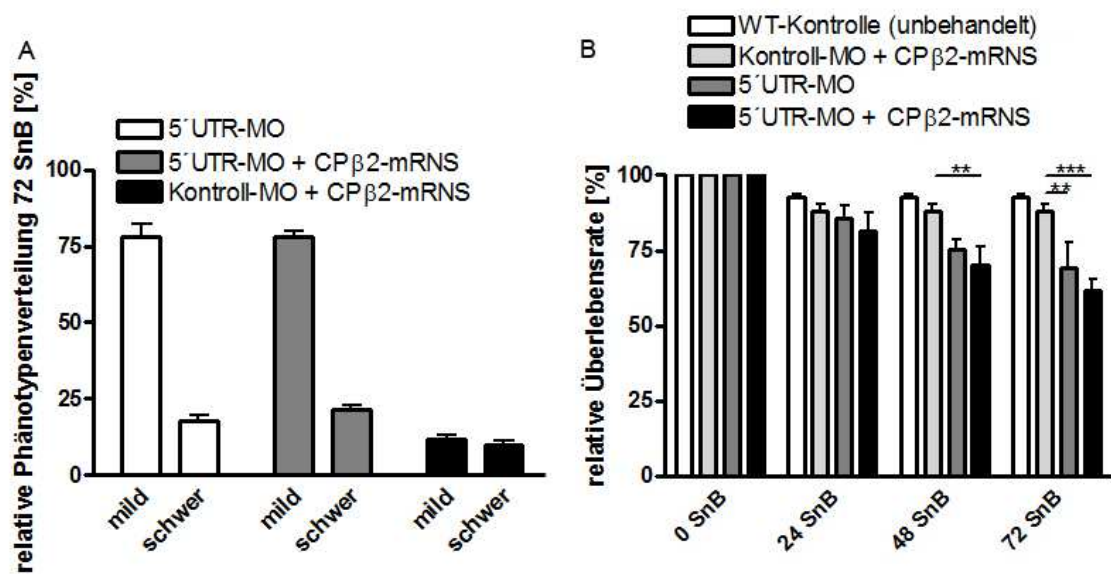


Abbildung 31: Relative Phänotypenverteilung 72 SnB und relative Überlebensrate innerhalb 72SnB von 5'UTR-MO Morphanten, 5'UTR-MO CPβ2mRNS Morphanten und Kontrollen.

(A) Phänotypenverteilung und prozentuale Häufigkeit Ihres Auftretens von 5'UTR-MO CPβ Morphanten im Vergleich zu 5'UTR-MO + CPβ2-mRNS Morphanten und Kontroll-MO + CPβ2 mRNS Morphanten. (B) Überlebensrate von unbehandelten WT-Kontrollen, Kontroll-MO + CPβ2-mRNS Morphanten, 5'UTR-MO Morphanten und 5'UTR-MO +CPβ2-mRNS Morphanten innerhalb der ersten 72 SnB. Alle Tiere stammen stets aus demselben Gelege. ** entsprechen einem p-Wert von <0,001 , *** entsprechen einem p-Wert von <0,0001.

Der 5'UTR-MO Morphant und der gerettete Morphant sind in Ihrem makroskopischen Phänotyp hoch ähnlich zu den bereits beschriebenen Phänotypen der CPβ Morphanten (vgl. Abb.14, untere sechs Reihen). Um die Effektivität des CPβ *knockdown* Rettungsexperimentes quantitativ zu bestimmen wurden Western-Blots (Abb.32, A) mit Proteinextrakten von 72 SnB 5'UTR-MO, 5'UTR-MO+CPβ2-mRNS, Kontroll-MO+CPβ2-mRNS und unbehandeltem 48 SnB WT durchgeführt. 24 Stunden jüngere unbehandelte Zebrabärbling Embryonen sollen einen möglichen Unterschied, im CPβ Gehalt durch die Entwicklungsverzögerung in den Morphanten, reduzieren. Zur Detektion vom CPβ Protein auf der NC-Membran (Abb.32, A) kam der gegen den N-terminalen Teil von CPβ gerichtete Antikörper zum Einsatz. Als Positivkontrolle wurde 0,018µg rekombinantes Hühner CPβ Protein verwendet und in die Ladetaschen zusammen mit dem Marker im PA-Gel gegeben. Die Ladekontrolle ist in diesem Fall die PonceauS gefärbte NC-Membran (Abb.32, B). Die Proben unter A auf dem Western-Blot (Abb.32, A) unterscheiden sich zu den Proben unter B (Abb.32, A) nur im Proteinextrakt der 5'UTR-MO+CPβ2-mRNS 72 SnB Probe.

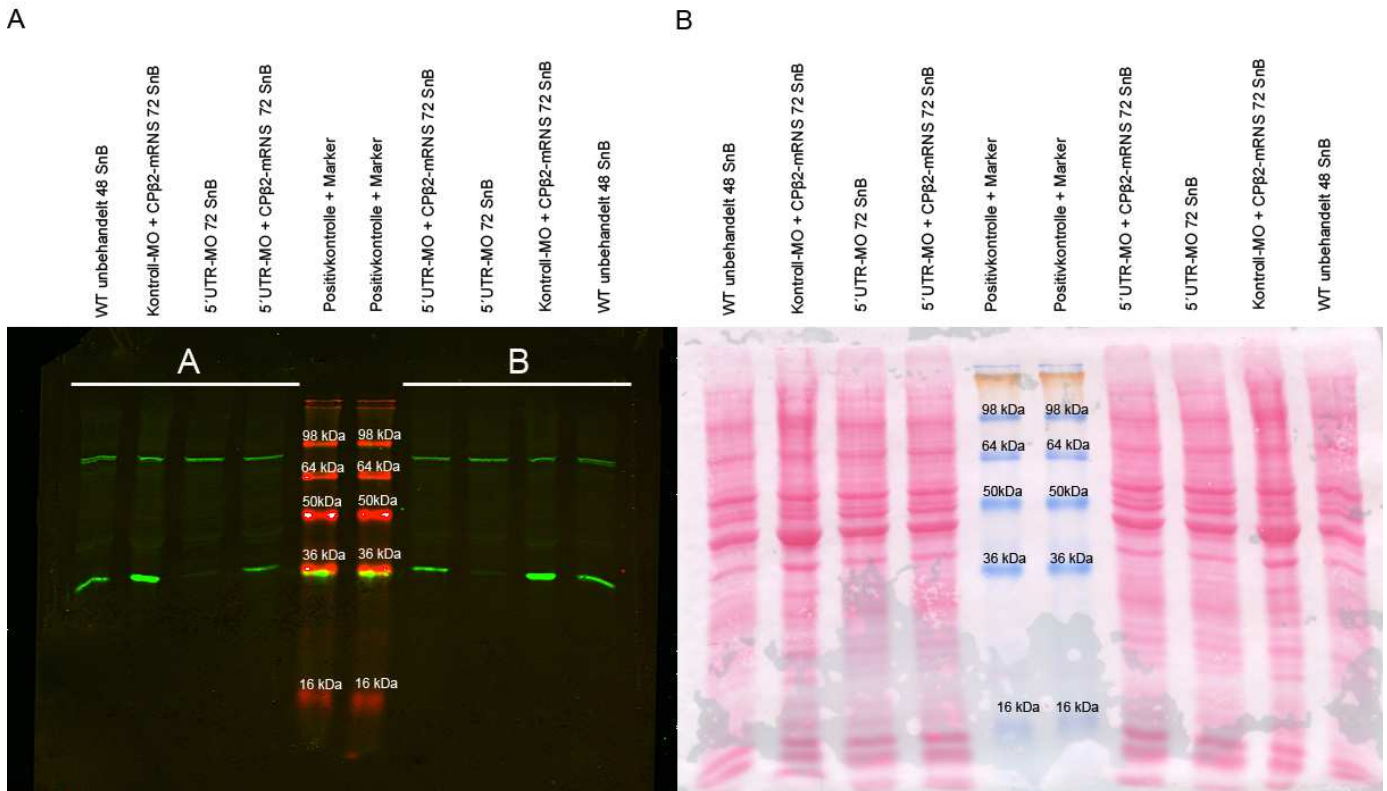


Abbildung 32: Western Blot Analyse des CPβ2 Rettungsexperimentes

(A) Western Blot von zwei unabhängigen Gruppen (A und B). In A und B sind spiegelverkehrt Proteinextrakte aus zwei unabhängigen experimentellen Ansätzen aufgetragen worden. A von links nach rechts: WT unbehandelt 48 SnB, Kontroll-MO + CPβ2-mRNS Morphant 72 SnB, 5'UTR-MO Morphant 72 SnB, 5'UTR-MO + CPβ2-mRNS Morphant 72 SnB und 0,018 µg rekombinantes Hühner CPβ zusammen mit einem Größenstandard in einer Bahn. B die gleiche Menge an Proteinextrakten wie in A aufgetragen aus einer unabhängigen Versuchsreihe. Eine höhere Dosierung der CPβ2-mRNS bei den 5'UTR-MO + CPβ2-mRNS Morphanten wurde bei der Injektion appliziert. Die Rückgewinnung einer immunreaktiven Bande auf der korrekten Laufhöhe für CPβ2 bei den 5'UTR-MO + CPβ2-mRNS Proben spricht für eine Rettung der Proteinexpression im 5'UTR-MO Morphanten. (B) Ponceau S Färbung der NC-Membran als Ladekontrolle. Das Proteinbandenmuster der einzelnen Proben ist identisch.

Die Tiere unter A wurden mit einer CPβ2-mRNS Konzentration von 150 pg behandelt und die Tiere unter B wurden mit einer CPβ2-mRNS von 300 pg behandelt. Das Rettungsexperiment hat auf Proteinebene funktioniert, da eine immunreaktive Proteinbande auf der erwarteten Höhe im CPβ2-mRNS koinjizierten Morphanten auftaucht. Zur Überprüfung der räumlichen Expression von CPβ und F-Aktin wurden Immunfluoreszenzaufnahmen von 72 SnB 5'UTR-MO+CPβ2-mRNS Morphanten und 72 SnB 5'UTR-Morphanten gemacht. Es wurden ausschließlich Morphanten mit milder Ausprägung des Phänotyps untersucht. In kaudalen Myotomen ergibt sich eine erkennbare Änderung in der Dichte bzw. Ausrichtung entlang der antero- posterioren Achse der Myofibrillen im Gegensatz zum 5'UTR-MO Morphanten (Abb.33, A und G).

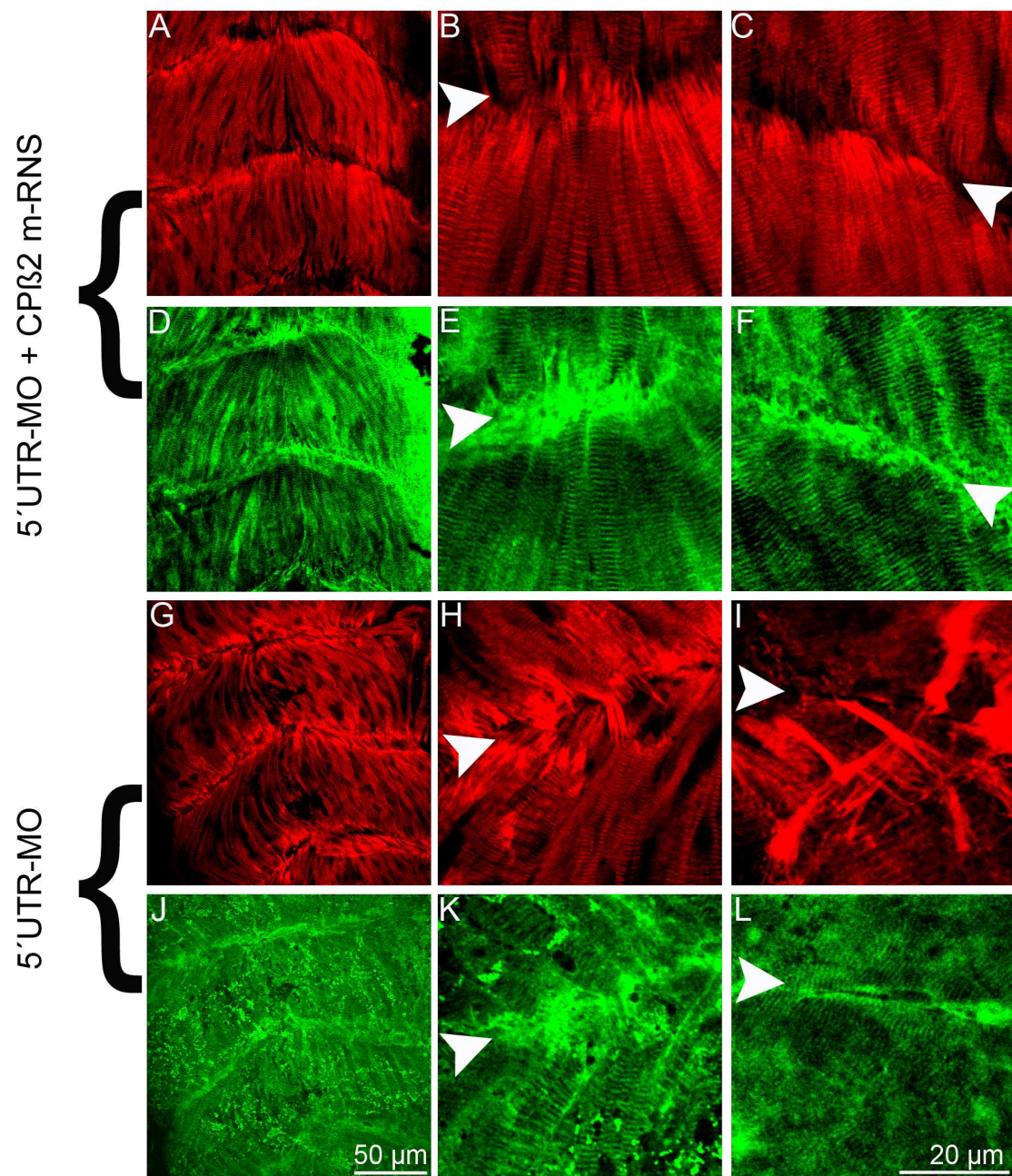


Abbildung 33: Immunfluoreszenzaufnahmen kaudaler Myotome des 5'UTR-MO CPβ2-mRNS Morphanten und des 5'UTR-MO Morphanten.

Phalloidin Markierung von F-Aktin in Myotomen eines 72 SnB 5'UTR-MO CPβ2-mRNS Morphanten (A-C) und die CPβ Markierung im gleichen Tier (D-F). Zum Vergleich die Phalloidin Markierung von F-Aktin eines 72 SnB 5'UTR-MO Morphanten (G-I) und die CPβ Markierung im gleichen Tier (J-L). (A) und (G) zeigen im direkten Vergleich einen deutlichen Unterschied im Bezug auf die Dichte und Ausrichtung der Myofibrillenbündel. In (A) sind die Myofibrillenbündel wesentlich besser entlang der antero-posterioren Achse angelegt und zudem weniger wellig und kurvenreich gebogen als in (G). In (B) und (C) sind zwei Ausschnitte aus (A) vergrößert dargestellt, um die Situation an den vertikalen Myosepten (weiße Pfeilköpfe) aufzuzeigen. Im direkten Vergleich zu H und I ist eine verminderte F-Aktin Polymerisation im Bereich der vertikalen Myosepten auszumachen. Auch scheinen die apikal entspringenden F-Aktin Bündel in B und C nicht die vertikalen Myosepten zu durchwachsen im Gegensatz zu F-Aktin in H und I. Die CPβ Expression ist in den vergrößerten Ausschnitten (E und F von D) klar in den vertikalen Myosepten (weiße Pfeilköpfe), Z-Scheiben und M-Banden auszumachen und in K und L ist die CPβ Expression insbesondere in den vertikalen Myosepten (weiße Pfeilköpfe) deutlich herunter reguliert. 50 µm Maßstabsleiste gilt für A,D,G und J; 20 µm Maßstabsleiste gilt für B,C,E,F,H,I,K und L.

Die Myofibrillenbündel sind weniger wellig und kurvenreich gebogen als die Myofibrillenbündel im 5'UTR-MO Morphanten. Zudem ist die Dichte der Myofibrillen im Vergleich zum 5'UTR-MO Morphanten erhöht. Es sind deutlich weniger Lücken zwischen den Myofibrillen zu beobachten. Die Somitengrenzen weisen eine reduzierte F-Aktin Polymerisation auf verglichen mit dem 5'UTR-MO Morphanten (Abb.33, B und C verglichen mit H und I). Es sind deutlich weniger F-Aktin Bündel zu finden, welche durch die vertikalen Myosepten hindurchwachsen (Abb.33, B und C). Die den Myofibrillen apikal entspringenden F-Aktin Bündel stoppen im Bereich der vertikalen Myosepten. Dieser Phänotyp entspricht der Beobachtung, welche bereits in 48 SnB Kontroll-Morphanten gemacht werden konnte (Abb.33, B und C). Im Bereich der vertikalen Myosepten der 5'UTR-MO Morphanten findet man ein Muster, welches so ähnlich bereits in Abbildung 33 E und F gezeigt wurde. Die CP β 2 Proteinexpression im 5'UTR-MO +CP β 2-mRNS – Morphanten erscheint im wesentlichen ähnlich wie in Abbildung 33 I bereits präsentiert. Hier wurde allerdings der gegen den N-terminalen Teil des CP β Proteins gerichtete Antikörper verwendet. Eine Expression des CP β 2 Proteins in den vertikalen Myosepten, entlang der Myofibrillenbündel, der M-Bande und in den Z-Scheiben konnte gefunden werden (Abb.33, D-F). Eine Expression in der M-Bande hingegen ist neu und wurde in diversen Präparationen von unbehandelten WT, Kontroll-Morphanten und CP β Morphanten zuvor nicht beobachtet. Die CP β 2 Proteinexpression in 5'UTR-Morphanten (Abb.33, J-L) ähnelt der für CP β Morphanten mit mildem Phänotyp in Abbildung 33 J gezeigte. Hier zeigt sich ein diffuses CP β Signal homogen verteilt über das gesamte Präparat. Lediglich punktförmige Bereiche im Präparat setzen sich vom diffusen Hintergrundsignal minimal ab.

3.1.10 Kraftmessung an intakten CP β Morphanten und Kontrollen

Die Testung der isometrischen Kraftentwicklung in Zebrabärbling Embryonen soll die unter Abschnitt 3.1.3 gemachte Beobachtung überprüfen, ob die verminderte Fluchtreaktion bei Stimulation mit einer Nadel auf eine Verringerung der Kraft zurück zu führen ist. Dazu wurden lebende 72 SnB CP β Morphanten mit milder Ausprägung des Phänotyps mit dem Fischanästhetikum Tricaine (40 μ g/ml) betäubt und in die Kraftmessungsapparatur eingespannt. Die Kraftmessungen wurden von Herrn Jan Eckhardt (Institut für Vegetative Physiologie, Uniklinik Köln, Köln) durchgeführt, analysiert und die Daten wurden für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Die Messung der Einzelzuckungen bei 1 Hz und 1,1 ms Dauer zeigt keine Nachzuckungen, welche auf eine Blockade des neuromuskulären Netzwerkes schließen lässt. Die Messung der Einzelzuckungen bei lebenden unbetäubten 72 SnB CP β Morphanten mit milder Ausprägung des Phänotyps zeigt Nachzuckungen, welche auf ein intaktes neuromuskuläres Netzwerk schließen lässt. Mit dieser Methode können die absoluten Kräfte und die Kinetik der Kraftentwicklung ermittelt werden, welche von CP β Morphanten und Kontrollen generiert wird. Die Krafttransientendarstellung und die Auflistung der gemessenen Werte kann Abbildung 34 und Tabelle 20 entnommen werden.

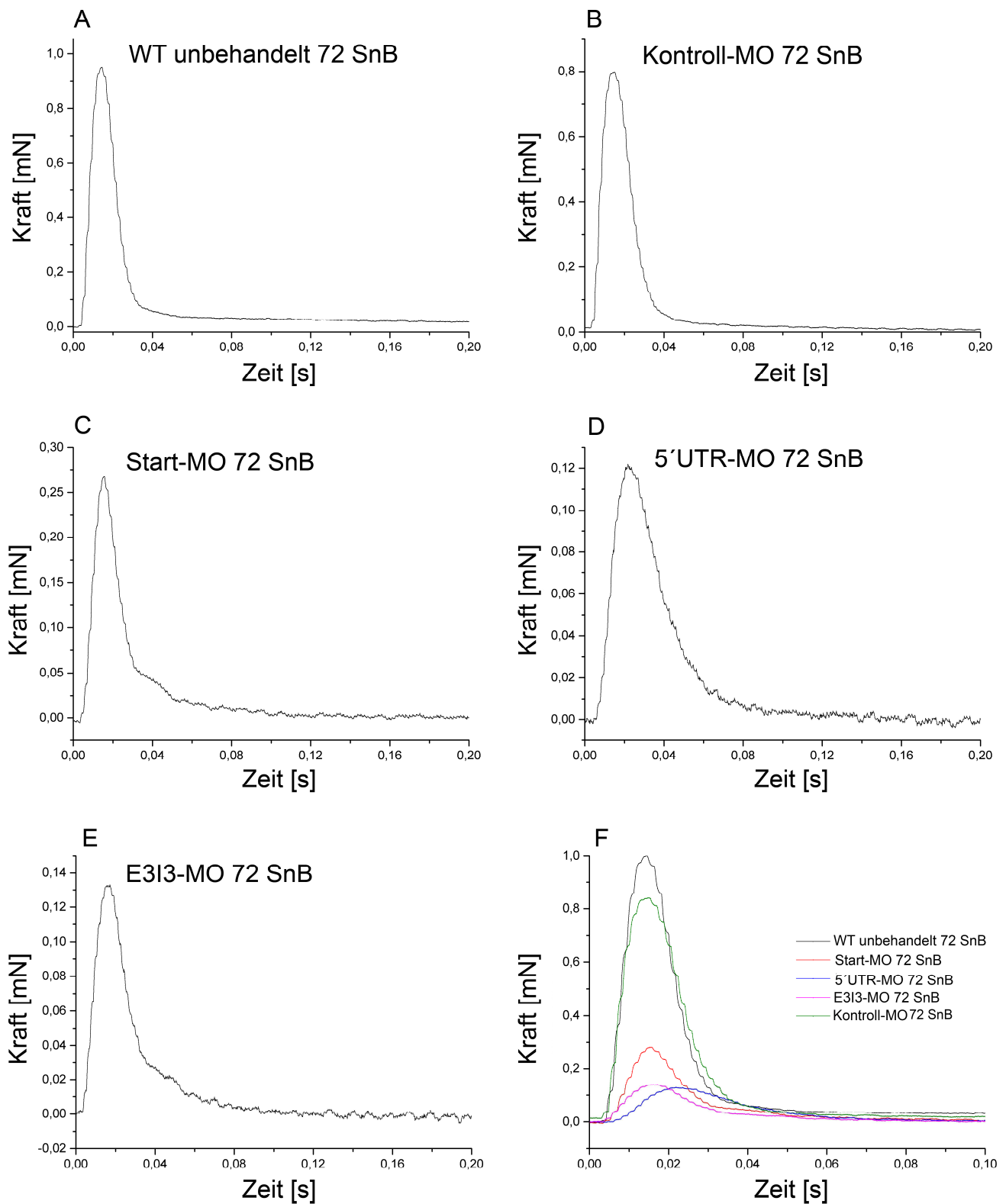


Abbildung 34: Krafttransientendarstellung und Maximalkräfte von intakten CPβ Morphanten und Kontrollen.

(A-F) Sechs Krafttransienten betäubter 72 SnB Morphanten und Kontrollen. Die X-Achse wurde entsprechend skaliert, damit ein Vergleich der Transienten leichter fällt (A-E). (F) Überlagerte Darstellung repräsentativer Krafttransienten der CPβ Morphanten und Kontrollen. [Daten von Herrn M.Sc. Jan Eckhardt]

Die Kinetik der Kraftentwicklung wurde in dieser Arbeit nicht analysiert. Vielmehr wurde der Vergleich zwischen den von CP β Morphanten und von den Kontrollen generierten absoluten und normierten Kraftamplituden angestellt. Zur Normierung der generierten Kräfte wurde der errechnete Durchmesser der dazu gehörenden Tiere einbezogen. Diese Normierung erfolgte durch die Ausmessung der Höhe der Körperachse am posterioren Ende der Dottersackerweiterung und der Verrechnung mit einem Faktor, der sich aus dem Verhältnis von Körperachsenhöhe und -breite ergab. Dieser Faktor kam durch Ausmessen diverser Querschnitte von 72 SnB WT Zebrabärbling Embryonen zu Stande.

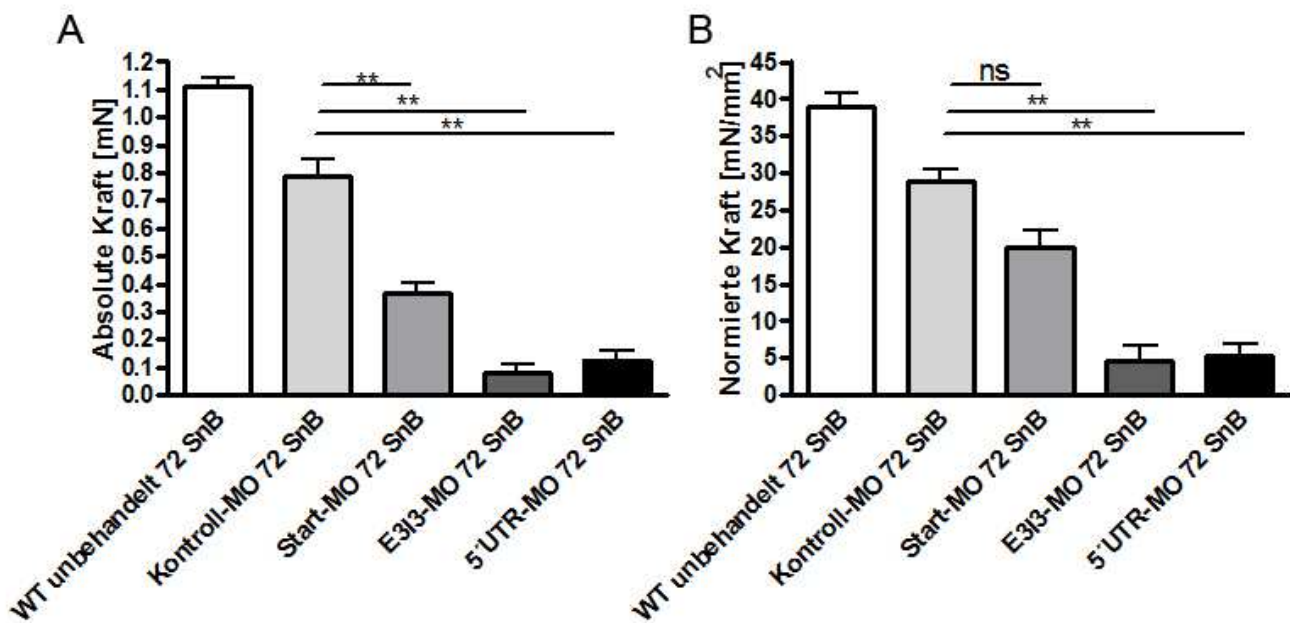


Abbildung 35: Vergleich der absoluten (A) und normierten Kräfte (B) in CP β Morphanten und Kontrollen
 (A) Absolute Kräfte des Start-MO, E3I3-MO, 5'UTR-MO, WT unbehandelt 72 SnB und Kontroll-MO 72 SnB. Alle drei CP β Morphanten zeigen eine signifikante Reduktion der absoluten Kraft verglichen mit Kontroll-MO Morphanten. (B) Die gemessenen absoluten Kräfte wurden gegen den Körperachsendurchmesser normiert. Danach bleiben die von E3I3-MO und 5'UTR-MO produzierten Kräfte signifikant geringer im Vergleich zum Kontroll-MO Morphanten. ** entsprechen einem p-Wert von $<0,001$ und ns bedeutet nicht signifikant.

Tabelle 19: Absolutkräfte von intakten CP β Morphanten und Kontrollen

Bezeichnung und Alter der Embryonen	Absolute Kraft [mN]
WT unbehandelt 72 SnB	$1,10 \pm 0,03$ (n= 12)
Kontroll-MO 72 SnB	$0,78 \pm 0,06$ (n= 9),
Start-MO Morphant 72 SnB	$0,36 \pm 0,04$ ** (n= 4)
E3I3-MO Morphant 72 SnB	$0,08 \pm 0,02$ ** (n= 7)
5'UTR-MO Morphant 72 SnB	$0,12 \pm 0,03$ ** (n= 9).

Die Werte sind MW \pm SEM, n entspricht der Anzahl der analysierten Tiere. Die Signifikanzen wurde mittels 1-way Anova und anschließendem Bonferroni-Post-Test bestimmt.

Tabelle 20: Normierte Kräfte von intakten CP β Morphanten und Kontrollen

Bezeichnung und Alter der Embryonen	Normierte Kraft [mN/mm ²]
WT unbehandelt 72 SnB	38,87 \pm 2,07 (n= 12)
Kontroll-MO 72 SnB	28,89 \pm 1,62 (n= 9),
Start-MO Morphant 72 SnB	19,83 \pm 2,86 ^{ns} (n= 4)
E3I3-MO Morphant 72 SnB	4,54 \pm 2,38** (n= 7)
5'UTR-MO Morphant 72 SnB	5,29 \pm 1,26** (n= 9).

Die Werte sind MW \pm SEM, n entspricht der Anzahl der analysierten Tiere. Die Signifikanzen wurde mittels 1-way Anova und anschließend Bonferroni-Post-Test bestimmt.

Es ergibt sich ein signifikanter Unterschied (p-Wert < 0,001) zwischen 72 SnB Kontroll-Morphanten und 72 SnB E3I3 / 5'UTR Morphanten. Der Start-MO Morphant hingegen zeigt keinen signifikanten Unterschied im Mittel der gemessenen Kraftamplituden verglichen mit den Amplituden der Kontroll-Morphanten.

4 Diskussion

Der Zebrafisch dient als *in vivo* Modellorganismus zur Untersuchung der Funktion des CP in der Frühentwicklung der axialen Zebrafisch Skelettmuskulatur. Da der Zebrafisch und die verwendete Methode der direkten Zielgeninhibition gegenüber CP β defizienten Mäusen (Pyle et al., 2002; Hart und Cooper; 1999) mit juveniler Letalität und einer indirekten durch transgene Überexpression der CP β 2 Untereinheit herbeigeführten CP β 1 Reduktion einen klaren Vorteil gegenüber dem Mausmodell erkennen lässt wurde diesem Modell und der Morpholino Technologie der Vorzug gegeben.

Zudem ist der transparente Zebrafisch Embryo ein geeigneteres Modell für die Untersuchung der *ex utero* ablaufenden Myofibrillogenese im Skelettmuskel eines Vertebraten, als das Mausmodell. Zum ersten Mal untersucht diese Studie die Effekte der Herunterregulierung der skelettmuskelspezifischen CP β Untereinheit in einem *in vivo* Vertebraten System während der Myofibrillogenese im Skelettmuskel.

4.1 Der CP β *knockdown* im Zebrafisch ist spezifisch

Um potentiell unspezifische Effekte des Morpholino induzierten CP β *knockdown* im Zebrafisch auszuschließen wurden drei in der CP β Gensequenz nicht überlappende Morpholino Oligonukleotide zur CP β Geninhibition entworfen und unabhängig voneinander injiziert. Dabei wurden die beiden Phänotypenklassen (mild und schwer) und eine ähnliche Ausprägung des Phänotyps auf makro- und mikroskopischer Ebene bei den drei Morphanten gefunden. Der übereinstimmende Phänotyp bei allen drei CP β Morphanten ist ein erster Hinweis darauf, dass der Phänotyp nicht auf die bloße Anwesenheit eines Morpholinos oder eines unspezifischen Nebeneffektes zurück zu führen ist. Lediglich die Phänotypenverteilung und die Penetranz der einzelnen Morpholinos weichen voneinander ab. Der Kontroll Morphant zeigt keine Signifikanzen in der Sterblichkeit gegenüber den CP β Morphanten zum Zeitpunkt 24 SnB, was darauf schließen lässt, dass die Sterblichkeit der Morphanten nicht an einem toxischen Nebeneffekt liegt.

Das Ausbleiben eines vergleichbaren Phänotypen nach Injektion eines Standard Kontroll Morpholino Oligonukleotides, welches keine Gensequenz im Zebrafischgenom erkennt spricht ebenfalls dafür, dass die Phänotypen spezifisch aus dem gezielten CP β *knockdown* hervorgehen. Dennoch kann die Injektion eines Morpholino Oligonukleotids, dessen Basensequenz keine entsprechende Sequenz im Zebrafischgenom aufweist, unabhängig von seiner Sequenz, aber abhängig von seiner Konzentration bis zu etwa 16 % phänotypisch veränderte Embryonen (vgl. Abb.16) hervorbringen. Daran wird deutlich, dass der Einsatz von Morpholino Oligonukleotiden ohne weitere Kontrollen durchaus problematisch sein kann, wenn die Effektivität des Morpholinos so niedrig ist, dass die durch ihren Einsatz

ausgelösten Veränderungen diesen möglicherweise unspezifischen Effekt nicht signifikant überschreiten. Des Weiteren kann eine auftretende Phänotypenvarianz durch minimal voneinander abweichende Injektionsvolumina hervorgerufen werden (vgl. dazu 4.2., Absatz 3). Eine mögliche Auswirkung dieses systematischen Fehlers findet man vermutlich in der Umkehrung der Phänotypenverteilung des 5'UTR-MO Morphanten (vgl. dazu Abb.16 mit Abb.31, A). Hier zeigt sich die Schwierigkeit der Reproduzierbarkeit der Injektionsergebnisse.

Unbedingte Beachtung muss der bei CP β Morphanten auftretenden Entwicklungsverzögerung geschenkt werden, da die in dieser Arbeit angestellten Vergleiche mit den Kontrollen kein verfälschtes Ergebnis aufgrund potentiell voneinander abweichender Entwicklungsstadien produzieren sollte. In dieser Arbeit wurden die Entwicklungsstadien der Tiere anhand der von Charles B. Kimmel im Jahre 1995 publizierten Zebrabärbling Entwicklungsübersicht (Kimmel et al., 1995) nach Somitenzahl, Kopf-Rumpf Winkel und Grad der Pigmentierung bestimmt. Wenn auch die CP β Morphanten mit schwerer Ausprägung des Phänotyps an Tag drei der Entwicklung nicht die Größe eines 24 SnB WT Tieres erreicht hatten, so waren Sie doch vom Pigmentierungsgrad wesentlich weiter entwickelt. Neben der Problematik einen vergleichbaren Entwicklungsstand der Morphanten und Kontrollen zu identifizieren besteht noch die unterschiedliche physische Beschaffenheit der CP β Morphanten und Kontrollen. Aufgrund mangelnden Muskelgewebes weisen die CP β Morphanten eine - verglichen mit den Kontrollen - wesentlich reduzierte Stabilität auf. Insbesondere die CP β Morphanten mit schwerer Ausprägung des Phänotyps könnten durch eine zu harsche Behandlung während der Präparation verfälschte Resultate liefern. Deswegen wurden diese Tiere genau wie 24 SnB WT Embryonen behandelt. 24 SnB WT Embryonen zeigen keine phänotypischen Auffälligkeiten die mit den beobachteten Phänotypen der CP β Morphanten vergleichbar wären, so dass die Annahme eines Präparationsartefaktes ausgeschlossen werden kann.

Eine Kontrollmöglichkeit um die Effektivität der Geninaktivierung zu überprüfen, bietet die RT-PCR Analyse von Spleißstellen blockierenden Morpholino Oligonukleotiden und der Western Blot. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Spleißstellen blockierendes Morpholino Oligonukleotid verwendet und zwei ursprünglich als translationsblockierende Morpholinos bei der Firma Gene Tools, LLC erworbene Oligonukleotide. Interessanterweise stellte sich eines der translationsblockierenden Morpholinos als Spleißstellen blockierendes Morpholino heraus. Sowohl der Start-MO als auch der E3I3-MO verändern das Spleißprodukt des CP β Gens. Im Falle des Start-MO fehlen in der reifen mRNS die ersten 90 Basen, was auf Proteinebene eine Verkürzung von 30 Aminosäuren ausmacht. Eben dieses Ergebnis wird in den Western Blots bestätigt (vgl. dazu Abb. 21, A). Der Western Blot von Start-MO Morphanten zeigt tatsächlich eine Verschiebung des CP β Proteins in Richtung eines kleineren Molekulargewichtes (vgl. dazu Abb. 21, A). Die Detektion von verkürztem CP β Protein 72 SnB auf dem Western Blot lässt den Schluss zu, dass CP β ohne die ersten 30 Aminosäuren des N-Terminus stabil in der Zelle verbleibt

und nicht abgebaut wird. Ob das verkürzte CP β im Start-MO Morphanten noch funktionsfähig ist und möglicherweise den Unterschied zwischen den Morphanten bei der Kraftentwicklung ausmacht (vgl. dazu Abb.35, A und B) kann nicht beantwortet werden. Im Falle des E3I3-MO kommt es zu einer Leserahmenverschiebung und dadurch zu einem frühen Stop in Exon 4 in der Codonfolge des CP β Transkriptes. Ein verkürztes CP β konnte in Proteinextrakten aus E3I3-MO Morphanten auf Western Blot Ebene nicht nachgewiesen werden. Somit kann davon ausgegangen werden, dass ein derart verkürztes CP β Protein durch das zelleigene Proteasom abgebaut wurde.

Neben diesen Kontrollen wurde noch eine p53-MO Koinjektion vorgenommen, um das bei Morpholinoinjektionen gelegentlich aktivierte p53 Gen durch Blockierung der Translation zu inhibieren. Diese Kontrolle zeigt, dass der E3I3-MO keine unspezifische p53 Antwort in den Morphanten auslöst. Es sei an dieser Stelle aber kurz erwähnt, dass nicht jede p53 Aktivierung in einem Morphanten zwangsläufig als unspezifischer Nebeneffekt betrachtet werden muss. Als Beispiel hierfür sei die Reduktion der Cytochrom C Oxidase durch MO Injektion genannt. Der Zelltod im Gehirn und Neuralrohr kann durch p53 Koinjektion nicht aufgehoben werden (Baden et al., 2007). Somit ist ein unspezifischer Effekt der p53 Aktivierung weitestgehend ausgeschlossen. Dennoch könnte p53 als spezifischer Effekt der Morpholinoinjektion auftreten. Um dies zu überprüfen müsste ein Western Blot mit einem Antikörper gegen die bei Morpholinoinjektionen häufig aktivierte p53 D113 Isoform durchgeführt werden.

Abschließend sei auf die wichtigste Kontrolle zum Ausschluss von unspezifischen Nebeneffekten des *knockdown* eingegangen, dem mRNA – Rettungsexperiment. Es wurde versucht den WT Phänotyp in den Morphanten wiederherzustellen. Dazu wurde eine CP β 2 mRNA mit deletierter Bindesequenz für den 5'UTR-MO mit diesem Morpholino koinjiziert und die Entwicklung der Tiere beobachtet. Dieses Vorgehen soll zeigen, dass der Phänotyp mit der Herunterregulierung des CP β 2 Genproduktes zusammenhängt. Idealerweise hätte eine mRNA Koinjektion der CP β 1 und CP β 2 zusammen mit dem 5'UTR-MO durchgeführt werden sollen, da alle der in dieser Arbeit verwendeten Morpholinos gleichermaßen die CP β 1 und CP β 2 Isoform herunterregulieren. Allerdings kam es zu Schwierigkeiten beim Umschreiben der CP β 1 Sequenz in reife CP β 1 mRNA. Somit blieb in Hinsicht auf den Zeitrahmen dieser Arbeit nur das Rettungsexperiment mit CP β 2 mRNA. Interessanterweise führte die Koinjektion von CP β 2 mRNA und des 5'UTR Morpholinos zu einer Rettung des Phänotypen im Bereich der vertikalen Myosepten und der Myofibrillenorganisation (vgl. dazu Abb. 33, B und C) nicht jedoch zu einer Rettung des makroskopischen Phänotyps. Die Myofibrillenbündel waren weniger wellig und kurvenreich gebogen als die Myofibrillenbündel im 5'UTR-MO Morphanten. Zudem war die Dichte der Myofibrillen im Vergleich zum 5'UTR-MO Morphanten erhöht. Die Somitengrenzen wiesen eine reduzierte F-Aktin Polymerisation auf, verglichen mit dem 5'UTR-MO Morphanten (vgl. dazu Abb.33, B und C mit H und I). Die den Myofibrillen apikal entspringenden F-Aktin Bündel stoppen im Bereich der vertikalen Myosepte. Ein Vorkommen des CP β 2 Proteins in den vertikalen Myosepten, entlang der Myofibrillenbündel, der

M-Bande und in den Z-Scheiben konnte gefunden werden (Abb.33, E und F). Die Detektion von CP β 2 in der M-Bande hingegen ist neu und wurde in diversen Präparationen von unbehandelten WT, Kontroll-Morphanten und CP β Morphanten zuvor nie nachgewiesen. Vermutlich handelt es sich hierbei um einen Überexpressionsphänotypen und zeigt die Reaktion des Morphanten auf die in Überschuss vorhandene CP β 2 mRNA. Es sei an dieser Stelle explizit erwähnt, dass die indirekte Immunfluoreszenz und die Western Blot Analyse mit dem *pan*-CP β Antikörper durchgeführt wurde. Man kann somit nichts über die Expression von CP β 2 im Rettungsexperiment aussagen, da dieser Antikörper beide Isoformen von CP β erkennt. Deswegen ist es an dieser Stelle nötig auf einen CP β 2 spezifischen Antikörper zurückgreifen zu können. Der monoklonale Antikörper gegen Hühner CP β 2 (mAb 3F2.3, Schafer et al., 1996) wurde in dieser Arbeit für die indirekte Immunfluoreszenz und Western Blots getestet. Weder in den Western Blots noch in der indirekten Immunfluoreszenz erkannte der Antikörper irgendein Ziel-epitop innerhalb des Gewebes bzw. des Proteinextraktes.

Die Beobachtungen, dass zwar die Aktinakkumulationen an den vertikalen Myosepten und die Organisation der Myofibrillen im CP β 2 mRNA – Rettungsexperiment verglichen mit dem 5'UTR MO Morphanten wieder wildtypischer erscheinen, aber die makroskopische Morphologie keine Änderung hin zum Wildtyp erkennen lässt, lässt die Vermutung zu, dass CP β 1 und CP β 2 unterschiedliche Funktionen in einem *in vivo* Vertebraten System innehaben. Eben dieses Ergebnis zeigen auch die Untersuchungen an CP defizienten Mäuseherzen (Hart und Cooper, 1999). In ihren Studien mit transgenen Mäusen zeigen sie das CP β 1 und CP β 2 nicht die Funktion des jeweils anderen übernehmen kann.

Vermutlich wird die CP β 1 Isoform für das korrekte Längenwachstum benötigt, da der makroskopische Phänotyp durch die CP β 2 Expression nicht gerettet werden konnte. Es ist hingegen sehr wahrscheinlich, dass CP β 2 die Funktion in der Myofibrillogenese übernimmt, aber für das wildtypische Wachstum der Körperachse die Funktion von CP β 1 alleine oder auch im Zusammenspiel mit CP β 2 benötigt wird. Ein Rettungsexperiment mit CP β 1 allein und mit CP β 2 mRNA zusammen muss durchgeführt werden, damit den Funktionen der einzelnen CP β Isoformen in der Skelettmuskel-Myogenese in einem *in vivo* Vertebraten System auf den Grund gegangen werden kann.

4.2 Zebrabärbling CP β zeigt viele Ähnlichkeiten zu CP β in anderen Vertebraten

CP ist bereits seit den frühen 1980er Jahren bekannt und seitdem in vielen Studien auf seine Funktion und Eigenschaften in Zellkultur oder Mäuseherzen untersucht worden (Schafer et al., 1992; Schafer et al., 1993; Schafer et al., 1994; Schafer et al., 1995; Hart und Cooper, 1999; Pyle et al., 2002; Pyle et al., 2006; Yang et al., 2011; Yang et al., 2012; Gaikis et al., 2013). Im Zebrabärbling gibt es ein orthologes CP β Gen zum Hühner und Maus CP β Gen. Dabei ist das CP β 1 Transkript im Huhn um 113 Basen länger als das CP β 2 Transkript im Huhn (Schafer et al., 1994). In dieser Arbeit wurde herausgefunden, dass das Zebrabärbling CP β 1 Transkript 93 Basen länger als das CP β 2 Transkript im Zebrabärbling ist (vgl. dazu Abschnitt 3.1.1). Im Hühner Transkript von CP β 2 fehlen die letzten kodierenden Basen für

die 32 C-terminalen Aminosäuren des CP β 1 (Schafer et al., 1994). In der vorliegenden Arbeit wurde herausgefunden, dass die letzten kodierenden Basen für die 29 C-terminalen Aminosäuren des CP β 1 im Zebrabärbling nicht in der Sequenz von Zebrabärbling CP β 2 vorkommen (vgl. dazu Abb.7). Der Aminosäuresequenzvergleich der Zebrabärbling Spleißvarianten CP β 1 und CP β 2 zeigt deutliche Unterschiede im C-terminalen Bereich des CP β Proteins. Allerdings sind Zebrabärbling, sowie Hühner und Mäuse CP β 1 und CP β 2 im Bereich der ersten 245 Aminosäuren stark konserviert (vgl. dazu Abb.7). In dieser Arbeit wurden im Zebrabärbling zwei Transkripte für CP β im Gewebe von Rumpf und Schwanzregion, welche hauptsächlich aus Muskelzellen bestehen, gefunden. Die beiden Transkripte weisen eine um 93 bp unterschiedlich lange 3'UTR auf (vgl. Abb.8, C), was evtl. ein Hinweis auf eine gewebespezifische Transkription von CP β 1 im Zebrabärbling sein könnte. Im C-Terminus sind die meisten Unterschiede in der Aminosäuresequenz zwischen CP β 1 und CP β 2 am größten. Dies gilt sowohl für die Spleißvarianten der Maus, des Huhnes als auch der des Zebrabärblings. Diese letzten 29 (CP β 1) bzw. 28 Aminosäuren (CP β 2) im C-Terminus des Zebrabärbling CP β weisen mehr (CP β 1) bzw. gleich viele (CP β 2) Unterschiede zu Hühner und Maus CP β auf als die 245 Aminosäuren davor in der CP β Sequenz (vgl. dazu Abb.7). Die CP β 1 Aminosäuresequenz des Zebrabärbling ist drei Aminosäuren kürzer als die Isoformen des Huhnes und der Maus (vgl. dazu Abb.7, A). Die CP β 2 Aminosäuresequenz des Zebrabärbling ist hingegen eine Aminosäure länger, als die Sequenzen des CP β 2 des Huhnes und der Maus (vgl. dazu Abb.7, B).

Die C-terminale α -Helix (vgl. dazu Abb.4, A) ist amphipatisch und damit sowohl hydrophob als auch hydrophil (vgl. dazu Abb.4, B). Diese Region der CP β Untereinheit hat eine wichtige Funktion bei der Aktinbindung (Hug et al., 1992; Casella und Torres, 1994; Sizonenko et al., 1996). Eine genauere Untersuchung der Aminosäurereste der hydrophoben Seite zeigt im Vergleich der Zebrabärbling Untereinheiten CP β 1 und CP β 2 entweder eine Konservierung oder eine äquivalente Substitution von Aminosäureresten wie (β 1: Lys254 / β 2 Lys254), (β 1: Tyr255 / β 2: Glu255), (β 1: Leu258 / β 2: Leucin 258), (β 1: Glu261 / β 2: Asp261), (β 1: Leu262 / β 2: Leu262), (β 1: Val265 / β 2: Ala265), (β 1: Leu 266 / β 2: Leucin) und (β 1: Arg 269./ β 2: Arg). Auch der Vergleich zwischen Zebrabärbling und Hühner oder Mäusesequenz des CP β zeigt eine Konservierung dieser Aminosäurereste der hydrophoben Seite der C-terminalen α -Helix. Die Studie von Barron-Casella et al. im Jahre 1995 zeigte das Leu 262 und Leu 266 äußerst wichtig sind für die Aktinbindung. Vermutlich bindet Aktin über die hydrophobe Seite der C-terminalen α -Helix an CP β . Diese Funktion scheint im Laufe der Evolution einmal etabliert und im Vertebraten Phylum konserviert zu sein.

Betrachtet man die hydrophile Seite der C-terminalen α -Helix von Zebrabärbling CP β 1 und CP β 2 so fallen Unterschiede bei den Aminosäureresten 256 (β 1: Arg / β 2: Glu) und 260 (β 1: Arg / β 2: Asn) auf. Eine Veränderung der Aminosäurereste auf der hydrophilen Seite der C-terminalen α -Helix kann ein Hinweis auf eine andere Funktion bzw. einen alternativen Bindungspartner sein. Allerdings ist die

hydrophile Seite der C-terminalen α -Helix des CP β im Zebrabärbling stärker konserviert als im Huhn oder der Maus. Ein Sequenzvergleich zwischen Huhn und Maus zeigt zusätzlich zu den Unterschieden in den Aminosäureresten 256 und 260 einen Unterschied bei Aminosäure 267 (β 1: Thr / β 2: Lys) und 268 (β 1: Glu / β 2: Arg) auf der hydrophilen Seite der C-terminalen α -Helix. Im Vergleich von Zebrabärbling CP β 2 Aminosäuresequenz zu Huhn- und Mausequenz fällt eine Deletion eines Serin Restes an Position 267 auf. Dieser zusätzliche Serinrest in der Zebrabärbling Sequenz von CP β 2 ist möglicherweise eine zusätzliche Phosphorylierungsstelle in der C-terminalen α -Helix. Parallel dazu findet man an Position 248 in der Aminosäuresequenz von CP β 1 einen Austausch von Serin im Zebrabärbling gegen ein Alanin in Huhn- bzw. Mausequenz, was ebenso eine mögliche Phosphorylierungsstelle darstellen könnte. Die beiden Isoformen des CP β im Zebrabärbling stellen eventuell eine funktionell nicht ganz separierte Übergangsform zu den vermutlich funktional und subzellulär getrennten Isoformen von Huhn und Maus CP β dar. Wie dem auch sei, über die Zielproteine der C-Termini von Mäuse bzw. Zebrabärbling CP β 1 und CP β 2 ist bis jetzt nichts bekannt.

4.2.1 Räumlich-zeitliche Expression von CP β 1 im Zebrabärbling

Zur Überprüfung der räumlich-zeitlichen Expression der CP β 1 im Zebrabärbling wurden Immunfluoreszenzaufnahmen von *whole mount* Zebrabärbling Embryonen zum Zeitpunkt 48 SnB und 72 SnB gemacht. Es wurden mehrere CP β spezifische Antikörper (abcam, polyklonaler Kaninchen Antikörper gegen CP β (Katalognummer: ab96618); Santa Cruz, polyklonaler Ziegenantikörper gegen C-Terminus von CP β (Katalognummer: sc-27551); Santa Cruz, polyklonaler Ziegenantikörper gegen N-Terminus von CP β (Katalognummer: sc-27552)) für die indirekte Immunfluoreszenz getestet, die Zebrabärbling CP β nicht erkannten. Die letztlich in dieser Arbeit verwendeten Antikörper gegen CP β waren ein eigens für diese Arbeit bei der Firma BioGenes hergestellter polyklonaler Kaninchen Peptidantikörper (pan-CP β) und ein von der Developmental Studies Hybridoma Bank vertriebener monoklonaler Maus Antikörper gegen den C-terminalen Bereich von CP β 1 (mAb1E5.25.4). mAb1E5.25.4 Antikörper erkennt spezifisch Hühner Skelettmuskel CP β 1 (Schafer et al., 1993) und wurde aufgrund der bewiesenen Spezifität zur Markierung von CP β 1 mittels indirekter Immunfluoreszenz in Zebrabärbling Muskelgewebe benutzt. In anderen Studien der Schaferschen Arbeitsgruppe wurde derselbe Antikörper als Werkzeug eingesetzt, um die Bindung von CP β 1 an Aktin zu blockieren. Es wurde argumentiert, dass die Bindung des mAb1E5.25.4 an CP β 1 und eine gleichzeitige Bindung von Aktin an CP β 1 ausgeschlossen ist (Hug et al., 1992; Schafer et al., 1995). Dieser scheinbare Widerspruch wird in den Studien der Arbeitsgruppe um John Cooper nicht diskutiert. Die vorliegende Arbeit belegt, dass der Antikörper in der Z-Scheibe bindet in der CP β 1 eine Bindung mit sarkomerischem F-Aktin eingehen soll. Vorstellbar ist folgendes Szenario der sehr langsam verlaufenden Antikörper –CP β 1 Bindungsreaktion im Zebrabärbling Muskelgewebe: Der Antikörper bindet sowohl an CP β 1 an F-Aktin gebunden in der Z-Scheibe von reifen Myofibrillen als auch an ungebundenes CP β 1 frei im Zytoplasma der Muskelzelle. Für diese Hypothese spricht die hohe Dynamik von Z-Scheibenproteinen in reifen Myofibrillen (Wang et

al., 2005) von lebenden Skelettmuskelzellen im Zebrabärbling (Sanger et al., 2009). Weiterhin spricht für diese Hypothese, dass in *Acanthamoeba castellanii* (Cooper et al., 1984) und *Saccharomyces cerevisiae* (Amatruda et al., 1990) bis zu ca. 2/3 des CP frei im Zytoplasma ohne Aktinbindung gefunden wurde. Die Hypothese ist durchaus vorstellbar, da sich die widersprechenden Ergebnisse der Arbeitsgruppe um John Cooper darin widerspiegeln. CP β 1 ist an Aktin gebunden und reduziert dadurch die Bindungsaffinität des Antikörpers für CP β 1. Bindet der Antikörper hingegen nicht an Aktin gebundenes CP β 1 so wird die Bindungsaffinität von CP β 1 für Aktin reduziert und der Einbau in die Z-Scheibe wäre verlangsamt. Mit dieser Hypothese ist gleichzeitig die in dieser Arbeit benötigte Antikörperinkubation über Nacht auf unfixiertem Zebrabärbling Muskelgewebe erklärt. Die langsame Geschwindigkeit der Antikörper – CP β 1 Reaktion wäre zudem mit der Engmaschigkeit der Gitterstruktur eines Skelettmuskels und der damit einhergehenden langsamen Antikörper Diffusion bis zum Zielepitop erklärbar (Kraft et al., 1995).

Eine Fixierung des Zebrabärblingmuskelgewebes mit 4%igem Formaldehyd in Dissektionspuffer und anschließender Inkubation mit mAb1E5.25.4 über Nacht führt zu keinem oder nur sehr schwachen Signalen in den Z-Scheiben der Sarkomere von distal gelegenen Myofibrillen (Daten nicht gezeigt) verglichen mit dem identischen Protokoll für natives Zebrabärblingmuskelgewebe, wo sämtliche Z-Scheiben aller Myofibrillen markiert werden. Formaldehyd bildet Querverbindungen zwischen Proteinen durch Methylen Brücken aus und erhält die zelluläre Struktur (Jamur et al., 2010a). Der Nachteil einer Fixierung mit Formaldehyd ist zum einen die Möglichkeit einer Konformationsänderung der Proteine (Neuhaus et al., 1998) und zum anderen die Notwendigkeit einer Permeabilisierung der Zellmembran, um dem Antikörper einen Zugang zum Zielprotein zu ermöglichen. Das verwendete Detergenz Triton X-100 permeabilisiert die Membran durch Auflösung und Extraktion von Lipiden was möglicherweise zu einer Koextraktion von hydrophoben Membran Proteinen führen könnte (zusammengefasst in Melan et al., 1999; Jamur et al., 2010b). Auch wenn die Kombination von Formaldehyd und Triton X-100 die beste Präservierung und Zugänglichkeit von Proteinen für Antikörper darstellt (Stadler et al., 2010), so stellt sich dennoch die Frage ob diese Methode die *in vivo* Proteinverteilung wiedergibt. Interessanterweise zeigt sich eine einheitliche Z-Scheiben Färbung in fixierten Hühnerskelettmuskelmyotuben (Schafer et al., 1993). Eine Erklärung für die schwache Wirksamkeit des Antikörpers in fixiertem Zebrabärblingmuskelgewebe gegenüber nativem Gewebe könnte das weiter oben beschriebene - Querverbindungen zwischen den Proteinen schaffende- Formaldehyd liefern. Vermutlich braucht der Antikörper bis zu seinem Zielepitop aufgrund einer noch engmaschigeren Muskelstruktur wesentlich länger. In dieser Arbeit wurden Antikörperinkubationen über Nacht getestet, was für eine vollständige Z-Scheiben Markierung in allen Zebrabärbling Sarkomeren ausreichend lang ist. Eine längere Inkubation der Proben wurde nicht vorgenommen, da mit keiner Verbesserung der Färbung gerechnet wurde.

Hühner Herzmuskelmyotuben wurden auf die gewebespezifische und die subzelluläre Verteilung der CP β 1 und CP β 2 untersucht (Schafer et al., 1994). Dabei wurde der mAb1E5 zur CP β 1-Detektion verwendet. Die CP β 1 kommt diffus verteilt im Zytoplasma der Hühner Herzmuskelmyotube und in den Z-Scheiben der Sarkomere vor. CP β 2 findet man an Zell-Zell Kontaktstellen und den Plasmamembranen der Hühner Herzmuskelmyotuben (Schafer et al., 1994). Die Ergebnisse dieser Studie zur Lokalisation von CP β 1 im 48 SnB und 72 SnB Zebrabärbling Embryo zeigen übereinstimmend mit einer weiteren Studie von Schafer (Schafer et al., 1993), in der die CP β 1 Expression in Skelettmuskelzellen untersucht wurde, ein Expressionsmuster von CP β 1 in den Z-Scheiben der Sarkomere der Skelettmuskulatur und einer CP β 1 Lokalisation zwischen und entlang der Myofibrillen und zusätzlich an den vertikalen Myosepten. Das CP β 1 Immunfluoreszenzsignal scheint zwischen den Myofibrillen an der Zellperipherie bzw. nahe der Zellmembran lokalisiert zu sein und ähnelt damit der Verteilung von CP β 1 in Hühner Skelettmuskelzellen. In dieser Arbeit wurde keine Kollokalisationsstudie mit einem Zellmembranmarker wie z.B. A-cam gemacht und somit kann nur spekuliert werden, dass Zebrabärbling CP β 1 eine vergleichbare räumliche Expression in Skelettmuskelzellen wie Hühner CP β 1 in Skelettmuskelzellen aufweist. Ebenso muss die Aussage einer CP β 1 Expression in bzw. an den vertikalen Myosepten spekulativ bleiben, da eine Kollokalisierung mit einem Myoseptenmarker wie z.B. Vinculin ausblieb. Dennoch erscheint ein CP β 1 Signal an bzw. in den Myosepten des Zebrabärbling durchaus glaubhaft, da die den Myosepten angelagerten MTJ unter anderem aus Aktinfilamentbündeln und Aktin bindenden Proteinen bestehen (Charvet et al., 2011). Dazu passen würde die Beobachtung des CP β 1 Antikörper Signals am Ende von isolierten Skelettmuskelmyofibrillen aus Zebrabärblingen (Sabrina Rippl, unveröffentlichte Daten). Der Prozess der MTJ Entwicklung und der damit verbundenen Verankerung der Myofibrillen im Bereich der vertikalen Myosepten im Zebrabärbling kann Abbildung 36 entnommen werden.

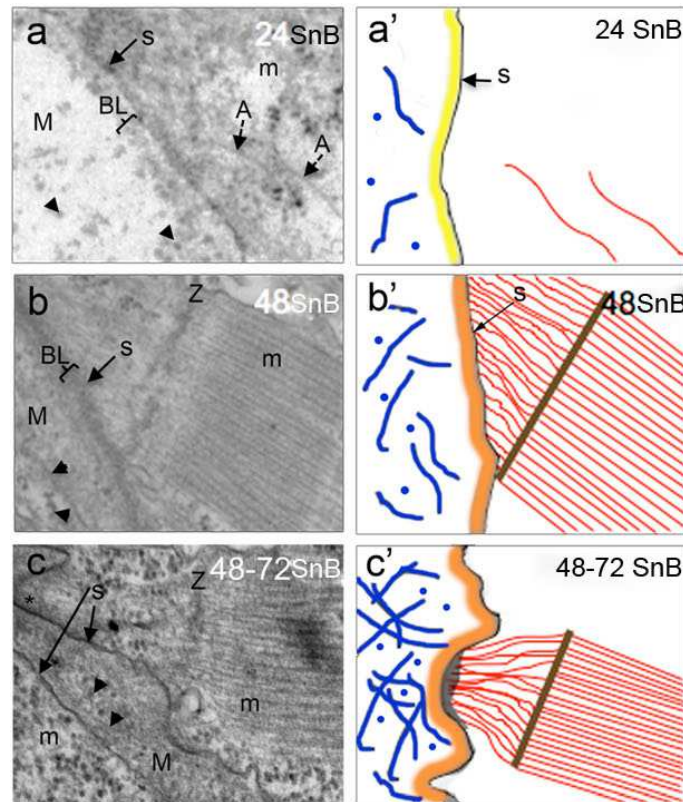


Abbildung 36 Verlauf der MTJ-Entwicklung zu drei Zeitpunkten im Zebraquariabärbling

TEM Aufnahmen von Längsschnitten von Zebraquariabärbling Myosepten von 24 SnB bis 72 SnB alten Tieren während der MTJ-Entwicklung (a-c) und korrespondierend rechts daneben interpretative Zeichnungen (a'-c') der TEM. In den Zeichnungen sind Kollagenfibrillen im Myoseptum (M, Pfeilköpfe) blau, die Basallamina (BL) ist gelb oder orange, die Z-Scheibe (Z) ist braun, Aktinfilamente (A mit gepunktetem Pfeil) sind rot, das Sarkolemma (S mit Pfeil) der Muskelzellen (m) und der subsarkolemmale Bereich (*) sind in grau oder in schwarz dargestellt. a, a' Erstes Auftreten von Kollagenfibrillen im Myoseptenstroma zeitlich mit Beginn der Myofibrillogenese. Die Basallamina umgibt die Muskelzelle und zeigt Unterbrechungen. b, b' Aktinfilamente der letzten Z-Scheibe verbinden sich mit Sarkolemma. Die Basallamina ist gut differenziert. Kollagenfibrillen sind zahlreicher, zerstreut und zufällig organisiert. Das Myoseptum ist zellenlos. c, c' Das Sarkolemma zeigt Einstülpungen an welche die Aktinfilamente ankern. Der subsarkolemmale Bereich ist elektronendicht. Longitudinale und transversale Kollagenfibrillen in Myosepta interagieren nicht mit dem Sarkolemma. Abb. modifiziert nach Charvet et al., 2011.

Möglicherweise bindet CP an das (+) – Ende von F-Aktin, was seinerseits aus der letzten Z-Scheibe einer Myofibrille entspringt und Richtung vertikale Myosepte wächst (vgl. dazu Abb. 36 und Charvet et al., 2011). Dabei ist die Polarität der Aktinfilamente zu beachten, da das schnell wachsende Ende durch CP in der Z-Scheibe am weiteren polymerisieren gehindert würde. Hier werden vermutlich die Aktinfilamente des letzten Sarkomers durch die Z-Scheibe hindurchwachsen und erst am Sarkolemma durch CP am weiteren polymerisieren gehindert werden. Damit wäre das sehr starke CP β 1 Antikörpersignal im Bereich der vertikalen Myosepten erklärbar, da sehr viele Myofibrillen in bzw. an den vertikalen Myosepten enden und jedes Aktinfilament ein CP an seinem (+) Ende trägt.

Zur Überprüfung der Spezifität der Antikörperfärbungen von CP β 1 im Zebraquariabärbling Skelettmuskel wurden zwei verschiedene gegen CP β gerichtete Antikörper verwendet. Sowohl der mAb1E5.25.4 – spezifisch zur Detektion von CP β 1 – als auch der Biogenes *pan*-CP β Antikörper zeigen eine absolut

identische subzelluläre Verteilung. Beachtenswert ist diese Entdeckung insofern als das man wenigstens eine minimale Abweichung des mAb1E5.25.4 Antikörpersignals gegenüber einem *pan*-CP β Antikörpersignal im Zebrafisch Skelettmuskel erwartet. Schließlich postulieren Schafer et al. im Jahre 1994 unterschiedliche Lokalisationen und Funktionen für die beiden Isoformen CP β 1 und CP β 2 in Hühner Herzmuskelzellkultur. Diese Untersuchung wird untermauert durch die Beobachtungen die Hart und Cooper 1999 an transgenen Mäuseherzen machen. Eine Lokalisationsstudie zur Verteilung von CP β 1 und CP β 2 *in situ* in Skelettmuskelzellen eines Vertebraten wurde bis zum heutigen Tage nicht durchgeführt. Somit gibt das Ergebnis eines identischen Antikörpersignals nach indirekter Immunfluoreszenz von CP β 1 und CP β 2 im Skelettmuskel des Zebrafisch Raum für Spekulationen. Eine mögliche Variante, die das Ergebnis erklärt wäre, dass CP β 1 in einer sehr viel höheren Konzentration als CP β 2 vorliegt und damit einen Großteil des Biogenes *pan*-CP β Antikörpers abfängt. Möglich ist auch, dass das Epitop der CP β 2 durch Interaktionspartner verdeckt wird und aus diesem Grund nicht vom Antikörper erkannt werden kann. Für beide Hypothesen spricht der Fakt, dass eine Antikörpermarkierung der CP β 2 mit einem monoklonalen Antikörper (mAb 3F2.3, Schafer et al., 1996), welcher spezifisch für die CP β 2 des Huhnes ist, zu sehr schwachen und schwer detektierbaren Signalen im Zebrafisch Skelettmuskel führte (Daten nicht gezeigt). Die Antikörpersignale wurden –wenn es überhaupt zu einer Färbung kam- entlang der Myofibrillen und in bzw. an den vertikalen Myosepten gefunden, was zu der Hypothese eines nahezu identischen Musters von CP β 1 und CP β 2 im Skelettmuskel des Zebrafischs führt.

Der Western Blot mit Proteinextrakten aus 48 SnB und 72 SnB Zebrafisch Rumpf und Schwanzregion ergibt im Falle der Inkubation der Trägermembran mit mAb1E5.25.4 eine distinkte Bande auf der Höhe der Positivkontrolle (rekombinantes Hühner CP β) und stimmt mit den Ergebnissen der Western Blots mit mAb1E5 für Proteinextrakte aus Hühner Brustmuskel, Herzmuskel und aufgereinigtem Hühner CP β überein (Hug et al., 1992; Schafer et al., 1993; Schafer et al., 1994). Zur Überprüfung der Antikörperspezifität wurde auch hier der Biogenes *pan*-CP β eingesetzt. Eine der zwei detektierbaren Banden läuft im Vergleich zur Bande im Western Blot der mit mAb1E5.25.4 inkubiert wurde auf der gleichen Höhe. Die andere Bande läuft etwas höher, was jedoch nicht zum *in silico* ermittelten geringeren Molekulargewicht des CP β 2 passt. Weiterhin zeigt auch die Positivkontrolle eine höher laufende Bande, was nicht zu erwarten ist, da diese nur die α 1 und β 1 Untereinheit von Hühner CP enthält. Diese Tatsache könnte auch die zwischen 50kDa und 100kDa erscheinende Bande erklären, die möglicherweise CP im dimerisierten Zustand zeigt. Was genau zu der Doppelbande bei der Positivkontrolle und den Zebrafisch Proteinextrakten führt bleibt unerklärlich und muss z.B. durch eine Sequenzierung des Hühner CP α 1 β 1 enthaltenden Vektors untersucht werden. Eine Immunpräzipitation mit dem polyclonalen Peptidantikörper bringt keine verwertbaren Ergebnisse aufgrund einer entweder zu geringen Antigenkonzentration (CP β 1 und CP β 2) in den Proben oder einer geringen Affinität des Antikörpers gegenüber dem Epitop oder einer zu geringen Antikörperkonzentration. CP β 1 ist in 48 SnB und 72 SnB

Zebrabärbling Rumpf und Schwanzregion exprimiert. Die CP β 1 ist die dominante, aber nicht ausschließliche Isoform im Skelettmuskel und CP β 2 die dominante, aber nicht ausschließliche Isoform in nicht-Muskel Gewebe (Schafer et al., 1994). CP konnte in diversen Epithelgeweben vom Huhn und dort in enger Assoziation mit Zellmembranen nachgewiesen werden (Schafer et al., 1992).

4.3 CP β *knockdown* im Zebrabärbling führt zu Entwicklungsverzögerung und verzögerter Myofibrillogenese

Zur Untersuchung der Folgen einer CP β Defizienz während der frühen Embryo- und Organogenese im Zebrabärbling wurde die CP β Translation durch Injektion von Morpholinos in befruchtete Zebrabärbling Eier (1-4 Zell-Stadium) inhibiert. Die Western Blot Analysen ergaben, dass die Proteinmenge von CP β im Durchschnitt der drei *knockdown* Ansätze nach Normierung gegen beta-Actin auf ein um den Faktor 4 (vgl. dazu Abb. 21, C) bzw. 11 (vgl. dazu Abb. 21, D) geringeres Niveau verglichen mit Kontroll-MO injizierten Zebrabärbling Embryonen gebracht wurde.

4.3.1 Makroskopische Morphologie der CP β Morphanten

Die Analyse der Morphologie der einzelnen Morphanten erfordert eine Einteilung in zwei Klassen, da sich zwei deutlich unterschiedliche Phänotypen zeigen. Eine Einteilung in zwei oder mehr Phänotypenklassen sind bei Verwendung der Morpholino Technologie üblich (Neacsu et al., 2014). Eine Einteilung der Morphantenpopulation in eine Gruppe mit minimal gestörter Morphologie (milder Phänotyp) und in eine Gruppe mit erheblich gestörter Morphologie (schwerer Phänotyp) wurde vorgenommen. Dabei wurde sowohl die Größe der Tiere, die Entwicklung der Körperachse, als auch die Beweglichkeit nach einem applizierten Reiz als Auswahlkriterium bestimmt. Die Degeneration der Körperachse ist ein typischer Nebeneffekt der Morpholinobehandlung (Bedell et al., 2011), die durch Aktivierung von *p53* (Robu et al., 2007) und dem damit einhergehenden programmierten Zelltod entsteht. Durch Koinjektion von einem *p53* Morpholino konnte die Beteiligung eines unspezifischen Nebeneffektes an der Entstehung des CP β Morphanten Phänotyps zwar nicht komplett ausgeschlossen werden, da *p53* koinjizierte E313-MO Morphanten denselben Phänotyp, relative Verteilung in der Population und dieselbe Überlebenschance zeigten wie nicht *p53* koinjizierte E313-MO Morphanten (vgl. dazu Abb.16). Wenn der beobachtete Phänotyp durch Apoptose (Morpholino induzierter Nebeneffekt) ausgelöst würde hätte der *p53* Morpholino den Anteil des schweren Phänotyps und dessen relative Verteilung in der Morphantenpopulation reduzieren müssen. Durch die durchgeführten Experimente konnte nachgewiesen werden, dass die Expression des CP β 1 Gens 48 SnB sehr wichtig im Bereich posterior der Dottersackerweiterung im Muskelgewebe des Zebrabärbling Schwanzbereiches und für eine fortschreitende Myogenese unabdingbar zu sein scheint. Der Wachstumsdefekt der CP β Morphanten könnte ein Hinweis auf die direkte Beteiligung von CP β bei der Zellstreckung der Muskelzellen in kaudalen Somiten sein. Möglicherweise wird die Aktinnukleierung durch CP β initiiert (Caldwell et al., 1984) oder ist erforderlich damit die Polymerisation von Aktin räumlich-zeitlich koordiniert ablaufen kann (Carlier und Pantaloni; 1997) und die

Zellen sich gerichtet verlängern können. Durch die Streckung der Myoblasten wird evtl. auch die Ausdehnung der Myotome bewirkt und die Tiere erhalten entsprechend der Zellstreckung eine längere Körperachse.

4.3.2 Körperachsenwachstum und Myofibrillogenese in CP β Morphanten

In Immunfluoreszenzfärbungen von nativem CP β Morphanten Muskelgewebe in kranialen sowie in kaudalen Myotomen von CP β Morphanten mit milder Phänotypenausprägung ist das CP β Verteilungsmuster ähnlich wie in den Kontrollen. Vermutlich handelt es sich bei den Morphanten mit milder Ausprägung des Phänotyps um eine Variante des *knockdowns* in dem die Reduktion des Zielproteins weniger effizient erfolgte, als in den Morphanten mit schwerer Ausprägung des Phänotyps, wo eine mit den Kontrollen vergleichbare CP β 1 Antikörperfärbung der kaudalen Myotome stets ausblieb. Ein quantitativer Vergleich der CP β Reduktion zwischen den beiden Phänotypenklassen wurde aufgrund der geringen Ausbeute an Proteinextrakt aus den Morphanten und in Anbetracht der im Rahmen dieses Projektes zur Verfügung stehenden Zeit unterlassen. Andererseits könnte der starke Phänotyp das Resultat einer zusätzlichen oder auch im schlimmsten Falle nur auf die Inhibition eines zufälligen, nicht im Fokus der Untersuchung stehenden, Genes sein, welches eine Morpholino Bindung mit einer irrelevanten mRNA eingeht. Um solche Fehler in der Zielgeninhibition zu vermeiden wird ein gut annotiertes und komplett sequenziertes Genom des Zebrafisches benötigt. Die Möglichkeit eines unspezifischen Gen *knockdowns* besteht allerdings, da zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit das Zebrafisch Genom noch nicht vollständig sequenziert und assembliert war (The Danio rerio Sequencing Project ;http://www.sanger.ac.uk/Projects/D_rerio/; Wellcome Trust Sanger Institute). Am wahrscheinlichsten ist aber eine auftretende Phänotypenvarianz durch minimal voneinander abweichende Injektionsvolumina. Es ist durchaus schwierig in die sehr kleinen Embryonen des Zebrafisches eine reproduzierbare Menge (5nl) an Injektionslösung abzusetzen, wenn Injektionsnadeln zwischen Injektionen einer zusammenhängenden Injektionsserie – aufgrund von mechanischer Beschädigung oder Verstopfung durch auskristallisierte Injektionslösung - getauscht werden müssen und das Injektionsvolumen durch Messung per Mikroküvette neu kalibriert werden muss. Ein weiterer wichtiger Faktor der zu vermeintlichen Phänotypen führt ist das Injektionsvolumen selber. Durch die Injektion von reiner Injektionslösung (0,1 M KCl, 0,2 % Phenol Rot und H₂O_{dd}) kann das Volumen bestimmt werden, welches keine morphologische Veränderung hervorruft. In dieser Arbeit lag das Injektionsvolumen bei 5 nl pro Embryo. Bei diesem Volumen wurde keine Veränderung des sich entwickelnden Embryos bei Injektion von reiner Injektionslösung festgestellt. Ab einer applizierten Menge von 10 nl reiner Injektionslösung pro Embryo kam es gehäuft zur Störung der Embryonalentwicklung (Daten nicht gezeigt).

Die Immunfluoreszenzaufnahmen von nativen kaudalen Myotomen in CP β Morphanten (milder und schwerer Phänotyp) mit skelettalem α -Actinin Antikörper zeigen eine lückenhafte und nicht streng entlang der antero-posterioren Achse verlaufende Myofibrillenbündelverteilung. Die Myofibrillenbündel-

dichte erscheint aufgrund der zahlreichen erkennbaren Zellkerne reduziert, was im Vergleich zur 24 Stunden jüngeren Kontrolle auf eine Hemmung der Myofibrillogenese hinweist. Weiterhin zeigt sich insbesondere in der Nähe von Myotomgrenzen (vertikalen Myosepten) eine erhöhte α -Actinin Menge im Vergleich zu Kontroll-MO injizierten Tieren. An 24 SnB Embryonen können entlang der antero-posterioren Körperachse sämtliche Myofibrillogenese-stadien innerhalb eines einzelnen Embryos untersucht werden. In den jüngsten Somiten, d.h. den kaudalen Myotomen sind – sowohl in 24 SnB WT Embryonen als auch in den CP β Morphanten - wie an einer Perlenschnur aufgereihete punktförmige α -Actinin Signale (vgl. dazu Abb.23, B und D, weiße Pfeilköpfe) zu finden. Interessanterweise beschreiben Sanger et al., dass hohe Konzentration von α -Actinin enthaltenden „z-bodies“ am Ende von reifen Myofibrillen in der Nähe von Somitengrenzen in 24 SnB WT Zebrabärblingen zu finden sind. In jüngeren Somiten entdeckt die Arbeitsgruppe wie an einer Perlenschnur aufgereihete punktförmige α -Actinin Signale und Minisarkomere, die gepunktete α -Actinin Signale in Strukturen die an „z-bodies“ erinnern aufweisen. Des Weiteren berichten Sanger et al. von Z-Scheiben mit gepunkteten α -Actinin Signalen, die sich zu einer lückenlosen Z-Scheibe verbinden. Die Arbeitsgruppe postuliert, dass das Myofibrillenwachstum an den Somitengrenzen stattfindet und damit zugleich die Ausdehnung der Somiten erfolgt. Die Beobachtungen resultierend aus den Immunfluoreszenz Aufnahmen aus Sanger et al. 2009 stimmen mit den hier gezeigten Ergebnissen überein. Berücksichtigt man die ähnlichen Immunfluoreszenzprotokolle für die Antikörperfärbungen der Zebrabärbling Embryonen in Sanger et al. und für die in dieser Dissertationsschrift gezeigten Embryonen so erhalten die Ergebnisse eine wesentlich größere Stichhaltigkeit was Ihre Vergleichbarkeit angeht. Ebenso wie Sanger et al. 2009 wird hier in 24 SnB WT Embryonen das als punktförmige α -Actinin Signal beschriebene Muster gefunden (vgl. dazu Abb.23, B und D). Der wesentliche Unterschied zwischen den 72 SnB E3I3-MO Morphanten mit schwerer Phänotypenausprägung und den 24 SnB Kontrolltieren ist die verzögerte Myofibrillogenese in kaudalen Myotomen, die bereits nach 48 SnB in kaudalen Myotomen der Kontrollen abgeschlossen ist. CP β könnte also eine Funktion während der Myofibrillogenese im Zebrabärbling Embryo innehaben. Insbesondere lassen die Immunfluoreszenz Aufnahmen der kaudalen Somiten der CP β Morphanten mit schwerer Ausprägung des Phänotyps eine essentielle Funktion der CP β Untereinheit in der Myofibrillogenese vermuten. Die vielen erkennbaren Zellkerne in den E3I3-MO Morphanten (vgl. dazu Abb. 22, B, C, E, F und J) könnten auf eine erhöhte Zellproliferation durch Mitose hinweisen. In dieser Arbeit wurden die Zellkernzahlen von CP β Morphanten und Kontrollen nicht bestimmt und miteinander verglichen. Eine genaue Bestimmung der Zellkerne in den Kontrollen ist wegen der die Zellkerne verdeckenden Myofibrillen nicht machbar.

Wie bereits unter Punkt 4.1 erwähnt wurde ein verstärktes CP β 1 Antikörper Signal am distalen Ende von isolierten intakten Zebrabärbling Skelettmuskelfibrillen beobachtet (Sabrina Rippl, unveröffentlichte Daten). In den vertikalen Myosepten von 48 SnB und 72 SnB Kontrollen wurde stets ein sehr starkes CP β 1 Antikörpersignal (mAb1E5.25.4 und Biogenes *pan*-CP β) detektiert. Vermutlich bindet CP

an das (+) – Ende von F-Aktin, was seinerseits aus der letzten Z-Scheibe einer Myofibrille entspringt und Richtung vertikale Myosepte wächst (Charvet et al., 2011). Damit könnte das sehr starke CP β 1 Antikörpersignal im Bereich der vertikalen Myosepten erklärt werden, da sehr viele Myofibrillen in bzw. an den vertikalen Myosepten enden. Gleichzeitig könnte ein Fehlen des Aktin Polymerisationshemmers CP durch die drastische Reduktion der CP β Untereinheit im Bereich der Myosepten zu einer massiv gesteigerten Aktin Polymerisation führen. Vergleichbare Ergebnisse fand man in CP defizienten Tauf- liegen in denen es zu erheblich gesteigerter Aktin Polymerisation in Nicht-Muskelgewebe kam (Delalle et al., 2005; Fernández et al., 2011; Frank et al., 2006; Ogienko et al., 2013). Eine weitere Erklärung für die in dieser Arbeit beobachteten massiven Aktinansammlungen und zugleich die starke Anfärbung von α -Actinin im Bereich der Somitengrenzen von CP β Morphanten könnte mit der Vermutung von Sanger et al. zusammenhängen, dass die Myofibrillogenese an den Somitengrenzen stattfindet und könnte durch die Beobachtung des Abbaus von zytoplasmatischem Aktin und α -Actinin während der Umstellung von einem generalisierten Zytoskelett zu einem Muskel spezifischen Zytoskelett unterstützt werden (Denning et al., 1988). Die α -Actinin und Aktin Ansammlungen an den Somitengrenzen wären in dieser Überlegung zum Abbau frei gegebene zytoplasmatische Isoformen des Zytoskelettes. Das diese Aktin und α -Actinin Ansammlungen in dieser Menge auftreten und in den Kontrollen nie entdeckt wurden, könnte laut Schafer et al. mit der Tatsache erklärt werden, dass die Aktin Untereinheiten die sich normalerweise zum sarkomerischen Teil der I-Bande organisiert hätten, sich jetzt unorganisiert neben den amorphen zytoplasmatischen Aktin und α -Actinin Strukturen ansammeln. Das fehlende sarkomerische Bandenmuster könnte direkt mit der CP β Defizienz in den CP β Morphanten zusammenhängen. In Zellkulturuntersuchungen an Hühner Skelettmuskelfibrotuben zur CP β 1 Inhibition wurde auch eine Verzögerung der Myofibrillogenese und der Organisation von F-Aktin in I-Banden gefunden (Schafer et al., 1995). CP β scheint also eine entscheidende Schlüsselposition in der frühen Myofibrillogenese im Zebrafisch zu spielen. Die Untersuchungen zur Lokalisation von CP β 1 während der Myofibrillogenese in Hühnerskelettmuskelfibrotuben (Schafer et al., 1993) zeigte CP β 1 kolokalisiert an frühen Z-Scheiben (in dieser Arbeit als „z-bodies“ bezeichnet). Die Überlegungen von Schafer zur Funktion von CP β 1 in der Myofibrillogenese mündet in den folgenden vier Hypothesen: (1) CP β 1 bindet an „z-bodies“ und startet die Polymerisation von Aktin beginnend an der Z-Scheibe und initiiert damit das Filament Wachstum von der Z-Scheibe aus. (2) CP β 1 bindet an die „z-bodies“ und fängt Aktinfilamente der Stressfasern ein und verankert diese in der Z-Scheibe. (3) Aktinfilamente der Stressfasern mit CP β 1 gebunden an ihrem (+)-Ende diffundieren an „z-bodies“ und werden durch eine Interaktion von CP β 1 mit einem Bindungspartner in der Z-Scheibe verankert. Die Hypothesen kulminieren in der folgenden Hypothese (4): CP β 1 bindet an und stabilisiert die Aktinfilamente in den I-Banden der entstehenden Myofibrillen. Die Aktinfilamente werden durch die Interaktion mit weiteren Aktin bindenden Proteinen, die bisher nicht identifiziert werden konnten, in die I-Bandenorganisation im Sarkomer dirigiert. Laut Schafer ist es sehr wahrscheinlich, dass CP zusammen mit anderen Proteinen, die an Aktin bzw. an CP binden können, in der Frühphase der Myofibrillogenese die Aktinfilamente zu den „z-bodies“ transportiert und evtl. auch die

Organisation der reifen Myofibrillen untereinander in der Myogenese orchestriert. Zu dieser Überlegung passt die Spekulation das CP β 1 sowohl Aktin auf der hydrophoben Seite der C-terminalen α -Helix bindet und zeitgleich einen weiteren Interaktionspartner auf der hydrophilen Seite der C-terminalen α -Helix der CP β 1 Untereinheit hat (Yamashita et al., 2003).

4.3.3 Ultrastrukturelle Untersuchungen der Start-MO Morphanten und Kontrollen

TEM der Rumpf und Schwanzregion von CP β Morphanten und WT-Zebrabärblingen sichert die Beobachtungen aus den IF Aufnahmen ab, da in den EM ähnliche Strukturen erkannt wurden. Insbesondere die Untersuchung von kaudalen Myotomen erbrachte einen tiefen Einblick in die Organisation der Stressfasern und „z-bodies“. Um die IF Aufnahmen und die EM in ihrer Aussage vergleichbar zu machen hätte die Immunogold-Methode zur Anwendung kommen müssen, um spezifische Proteine in den entdeckten Strukturen entsprechend identifizieren zu können. Im Vergleich zu elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Myofibrillogenese in einschlägiger Literatur (Briggs et al., 1995; Peng et al., 1981; Shimada et al., 1977; Fischman, 1970; Kelly, 1969; Fischman, 1967) und den dort entdeckten Strukturen decken sich die Strukturen in kaudalen Myotomen der CP β Morphanten nur bedingt. Insbesondere in den Längsschnitten der CP β Morphanten Myotome beobachtet man streng voneinander getrennte Bereiche für dünne und dicke Filamente (vgl. dazu Abb.23, E). In fast allen der mir bekannten elektronenmikroskopischen Studien der Myofibrillogenese, sei es in Hühnerskelettmuskel Explantaten oder Zellkultur, wurden die dünnen und dicken Filamente eng benachbart und miteinander verwoben vorgefunden (Briggs et al., 1995; Peng et al., 1981; Shimada et al., 1977; Fischman, 1970; Kelly, 1969). Eine Ausnahme bildet hier das Myofibrillogenesemodell von H. Holtzer für Skelettmuskelzellen (Holtzer et al., 1997) in dem er postuliert, dass sich Myofibrillen aus separat entstehenden Strukturen bilden. In seinem Modell läuft der Aufbau von dünnen/dicken Filamenten und Z-Scheiben räumlich getrennt voneinander ab. Die entstehenden „I-Z-I bodies“ werden mit den dicken Filamenten durch das Titin Molekül verbunden und bilden dadurch reife Myofibrillen. Eine ähnliche Verteilung der dünnen/dicken Filamente und „z-bodies“ die in den Start-MO Morphanten mit schwerer Ausprägung des Phänotyps gefunden wurden, werden in TEM-Studien zur Myofibrillogenese gefunden, die das sogenannte „Stitching Model“ nach Holtzer unterstützen (Antin et al., 1981; Toyama et al., 1982). In diesen Studien wird Taxol zur Behandlung der Zellen verwendet. Taxol wirkt, indem es die Mitose stört. Durch die Bindung an β -Tubulin wird der Abbau der Mikrotubuli gestört, welche bei der Mitose Bestandteil der Mitosespindel sind. Taxol wirkt somit auf alle sich teilenden Zellen und kann dementsprechende Nebenwirkungen verursachen, die Holtzer in seiner 1997 erschienenen Studie durch TEM Untersuchungen an unbehandelten Zellen versucht zu relativieren. In dieser Studie an unbehandelten Zellen ähneln die gezeigten Strukturen der Myofibrillogenese allerdings nicht mehr so sehr den beobachteten Strukturen in den Start-MO Morphanten.

Entweder haben wir es mit einem anderen Zeitpunkt – als dem in den oben aufgeführten Studien zur Myofibrillogenese gezeigt - der Myofibrillogenese oder einem direkten bzw. indirekten Effekt der CP β Reduktion zu tun. Das die Strukturen in Taxol behandelten Zellen so ähnlich wie in den Start-MO Morphanten aussehen könnte in der Tat auf einen Effekt der CP β MO Behandlung hinweisen, die der Taxol Behandlung ähnelt. Ob dieser Effekt direkt mit dem CP β *knockdown* im Zusammenhang steht oder aufgrund eines Sekundäreffektes auftritt kann hier nicht geklärt werden. Ein Artefakt aufgrund der Fixierung und Dehydrierung des Gewebes kann ausgeschlossen werden. Gegen ein Fixierungsartefakt sprechen die Untersuchungen an 18-20 Somiten und 24 SnB Zebrafisch Embryonen, welche derselben Präparation wie die der Morphanten unterzogen wurden und keine Strukturen wie die in den Morphanten gefundenen aufwiesen. Gerade in WT Tieren im 18-20 Somiten Stadium und 24 SnB wäre ein Fixierungsartefakt am ehesten zu erwarten, da die Struktur und Größe dieser Tiere der des Morphanten mit schwerer Ausprägung des Phänotyps am ähnlichsten sind.

4.4 Z-Scheiben assoziierte Proteine sind in CP β Morphanten in ihrer Expression verändert

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Frau Prof. Bettina Warscheid konnte das Proteom der CP β Morphanten mit Kontroll-MO injizierten Morphanten verglichen werden. Diverse Z-Scheiben assoziierte Aktin bindende Proteine sind in den CP β Morphanten im Vergleich zu den Kontrollen signifikant hochreguliert (Wiese et al., unveröffentlichte Daten). Die in CP β Morphanten hoch- bzw. herunter regulierten Proteine, die entweder mit der M-Bande oder der Z-Scheibe eines Sarkomers assoziiert sind können der Abbildung 36 entnommen werden. Im Folgenden sollen sechs der hoch regulierten Proteine in CP β Morphanten, die in Assoziation mit der Z-Scheibe und direkter oder indirekter Verbindung mit CP β stehen könnten, im Zusammenhang mit der Myofibrillogenese oder der Bewahrung der Muskelintegrität diskutiert werden.

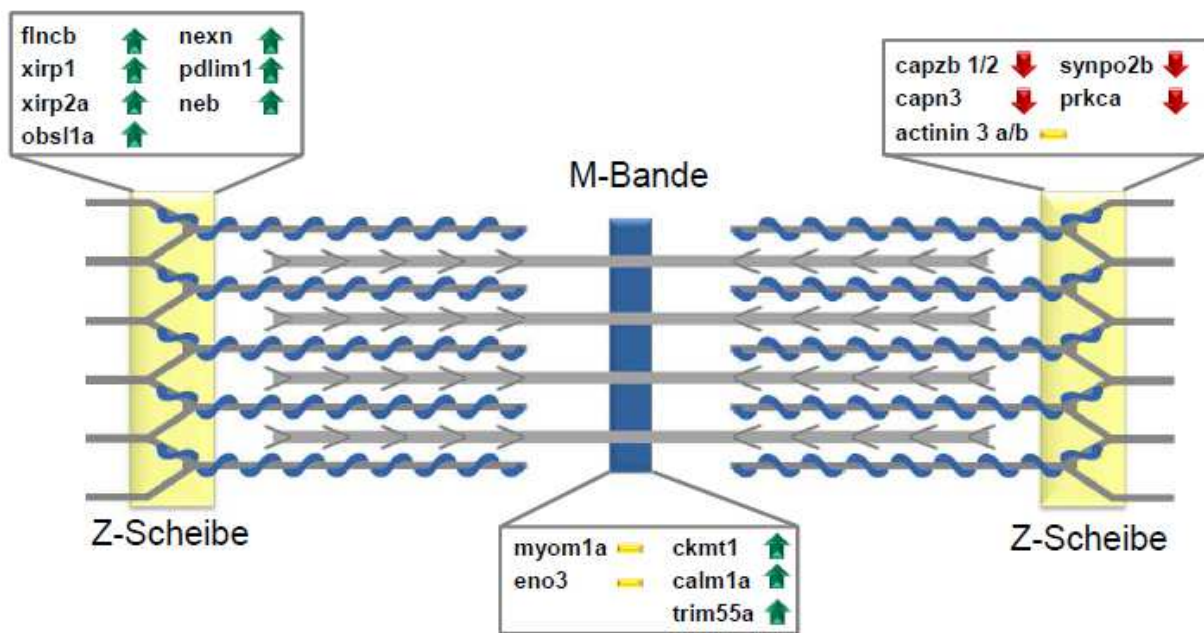


Abbildung 37: Schematische Darstellung der hoch- und herunterregulierten Gene im CPβ Morphanten und Ihre Lokalisation im Sarkomer. Abb. von Wiese et al., unveröffentlichte Daten.

Filamin C (flncb) ist in CPβ Morphanten hochreguliert und zeigt interessanterweise in Embryos des japanischen Reisfisches (Medaka, *Oryzias latipes*) ein Expressionsmuster welches der Verteilung von CPβ in Zebrafisch Embryonen ähnelt. Filamin C ist in den MTJ, dem Sarkolemma und den Z-Scheiben der Sarkomere des Skelettmuskels exprimiert (Fujita et al., 2012). Ein Filamin C Morphant wurde generiert und es konnten degenerative Prozesse an den Myofibrillen nahe der MTJ, eine Ablösung der Myofibrillen vom Sarkolemma und eine Störung der Z-Scheiben Struktur gefunden werden (Fujita et al., 2012). Ebenso wie in CPβ Morphanten zeigten die Filamin C Morphanten große Lücken zwischen den Myofibrillen und wellige/ kurvige Myofibrillen die der Richtung entlang der antero-posterioren Achse nicht strikt folgten. Die Medaka Forscher spekulieren, dass Filamin C eine Funktion in der Verbindung des Aktin-Zytoskelettes mit dem Dystrophin assoziierten Glycoprotein Komplexes (DGC) und Integrin an den MTJ hat. Weiterhin schlagen sie eine Rolle für Filamin C in der lateralen Verbindung zwischen Myofibrillen oder zwischen Myofibrillen und dem Sarkolemma vor. Aufgrund der nahezu identischen Expression von Filamin C in Medaka Embryos verglichen mit der CPβ1 Lokalisation in Zebrafisch Embryonen und der hoch ähnlichen Muskel-Phänotypen in der embryonalen Frühentwicklung beider Morphanten könnte eine direkte oder indirekte funktionale Beziehung zwischen CPβ und Filamin C in der Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität des Skelettmuskels bestehen. Dabei könnte Filamin C durch seine Aktinfilament quervernetzende Funktion insbesondere an den MTJ der vertikalen Myosepten zusammen mit seinem Interaktionspartner Xin actin-binding repeat containing protein 1/2 (xirp1 und xirp2) (Kley et al., 2013) für die korrekte Ausrichtung und Organisation der aus der letzten Z-Scheibe entspringenden Aktinfilamente eines Sarkomers verantwortlich sein. Eine Hochregulation beider Proteine könnte aufgrund der massiven Aktinfilament Akkumulation an den vertikalen

Myosepten passieren und möglicherweise durch eine negative Rückkopplungsschleife aufgrund der CP Defizienz in den CP β Morphanten ausgelöst worden sein.

Unterstützt wird diese Hypothese durch den Phänotypen des Zebrafisch dmd ta222a Mutant (Synonym: *sapje*, *sap*). Dieser Mutant wurde als Träger des Dystrophin Nullallels identifiziert (Bassett et al., 2003). Dabei zeigten die dag1hu3072 Mutanten eine Ablösung der Myofibrillen von den vertikalen Myosepten und das Aufreißen des Sarkolemmas wurde beschrieben (Lin et al., 2011). Möglicherweise besteht eine funktionelle Abhängigkeit zwischen CP, Filamin C/Xirp1/2 und Dystrophin in der Organisation und Verankerung der Aktinfilamente des Zytoskelettes und der Sarkomere im Sarkolemma der Muskelzelle.

Nebulin (*neb*) ist ebenfalls in CP β Morphanten hoch reguliert und wurde als Interaktionspartner von CP in den Z-Scheiben reifer Sarkomere gefunden (Pappas et al., 2008). Es wurde vorgeschlagen, dass Nebulin mit dem Aktinfilament assoziierten CP eine Interaktion eingeht und damit eine strukturelle Verbindung zwischen den Sarkomeren einer Myofibrille schafft. In Nebulin defizienten Hühner Skelettmuskelmyotuben kann eine drastische Reduktion der CP an den Z-Scheiben entdeckt werden. Diese Beobachtung könnte ein Hinweis auf die Funktion von Nebulin sein CP an die Z-Scheibe zu dirigieren. Die Myofibrillogenese läuft weitestgehend normal ab bis auf wenige Stressfasern und gegeneinander verschobene Z-Scheiben, was auf eine Verzögerung der Myofibrillogenese hinweist. In einer Arbeit über Nebulin *knockout* Mäuse findet man in Soleus Muskelfasern breitere Z-Scheiben und gegeneinander verschobene Myofibrillen (Tonino et al., 2010). Die Forscher finden weiterhin eine Hochregulierung von Desmin in den Nebulin *knockout* Muskelfasern. Sie vermuten eine Interaktion von Nebulin und den relativ steifen Desminfilamenten an der Z-Scheibe, was zu einer lateralen Verbindung der Myofibrillen untereinander führen könnte. Möglicherweise ist die Interaktion von CP und Nebulin nicht wichtig für eine normal ablaufende Myofibrillogenese, da Nebulin eines der letzten myofibrillären Proteine ist, welches sich in reifen Sarkomeren finden lässt (Komiya et al., 1992). Schließlich bestimmt Nebulin die Länge der dünnen Filamente im Skelettmuskelsarkomer und benötigt dafür offensichtlich nicht die Interaktion mit CP, da die Längen der dünnen Filamente in den Sarkomeren der CP β Morphanten keine signifikante Abweichung gegenüber den Kontrollen zeigen (vgl. dazu Tab 18).

Nexilin (*nexn*) wurde in den Z-Scheiben der Zebrafisch Herzmuskel – und Skelettmuskelsarkomeren in 72 SnB Embryonen gefunden (Hassel et al., 2009). Ein Nexilin *knockdown* via Morpholino Technologie führt unter unstimulierten Bedingungen zu keinem offensichtlichen Skelettmuskelphänotypen. Im Gegensatz dazu zeigen die Sarkomere in Herzmuskelmyofibrillen Ablösungen der Myofilamente von den Z-Scheiben. Bei elektrischer Stimulation der Skelettmuskulatur zeigen Nexilin Morphanten dieselben Ablösungen der Filamente von der Z-Scheibe wie bereits im Herzen des Fisches beobachtet. Die Schlussfolgerung einer essentiellen Funktion von Nexilin für die Aufrechterhaltung der Muskelintegrität bei Belastung liegt also nahe. Möglicherweise ankert Nexilin (71 kDa), das CP in seinem Molekularge-

wicht nahezu gleich, die Aktinfilamente mit seinen beiden F-Aktin Bindedomänen (Ohtsuka et al., 1998) an Komponenten der Z-Scheibe und ersetzt durch seine Überexpression damit die Funktion vom herabreguliertem CP in der CP β Morphanten Skelettmuskulatur. Eine weitere mögliche Funktion könnte das Aktin bindende Nexilin während der frühen Myofibrillogenese einnehmen. Es ist möglich, dass Nexilin neben CP für den Transport von Aktinfilamenten an die „z-bodies“ benötigt wird, um diese dann dort zu verankern.

Obscurin-like 1 (obs1) Protein ist eng verwandt mit Obscurin, einem Riesenstrukturprotein, welches für die korrekte Anordnung der Sarkomere benötigt wird. Obscurin-like 1 Protein wurde an interkalierenden Scheiben, in der Perinuklearregion, über Z-Scheiben, M-Banden und zwischen den Myofibrillen von Rattenherzmyozyten gefunden (Geisler et al., 2007). In Knochenfischen fand eine Genomduplikation statt, welche zu zwei homologen Genen (obs1a und obs1b) für obs1 führte. Die Sequenz vom OBSL1 Protein zeigt ähnliche Sequenzmotive wie die sarkomerischen Proteine Titin, Myomesin, M-Protein und Obscurin. Mit diesen Motiven interagieren die vorgenannten Proteine mit anderen Proteinen und stabilisieren dabei die Sarkomerstruktur (zusammengefasst in Agarkova und Perriard, 2005). Die Lokalisation von Obscurin-like 1 Protein an den interkalierenden Scheiben, der Perinuklearregion, M-Bande und Z-Scheibe könnte auf eine Interaktion mit membrangebundenen Komplexen hinweisen. Möglicherweise fungiert OBSL1 als eine Art Adaptorprotein für das zelluläre Netzwerk, was Intermediärfilamente, Mikrofilamente oder das Aktinfilamentsystem beinhaltet und diese an membrangebundene Strukturen wie Kostamere, interkalierende Scheiben und fokale Adhäsionen bindet. OBSL1 findet sich hauptsächlich über und zwischen den Z-Scheiben (Geisler et al., 2007). Die Obscurin-like 1a Überexpression in den CP β Morphanten könnte für die Organisation der Myofibrillen während der Myofibrillogenese benötigt werden, denn die Resultate von Obscurin siRNS behandelten Rattenskelettmyotuben sprechen für eine Funktion von Obscurin im Aufbau der M-Bande, A-Bande und der korrekten Ausrichtung des sarkoplasmatischen retikulären Netzwerkes um den kontraktilem Apparat herum (Kontrogiani-Konstantopoulos et al., 2006). Möglicherweise ist obs1 hochreguliert, weil die Myofibrillen in den CP β Morphanten keine lateralen Kontakte geknüpft haben (vgl. dazu Abb. 22, C) und durch OBSL1 während der noch ablaufenden Myofibrillogenese in Ihrer Ausrichtung organisiert werden müssen.

PDLIM 1 oder auch CLP36 ist ein Mitglied der ALP/Enigma Protein Familie und wurde in enger Assoziation mit Stressfasern in der Funktion des Stressfaser- und fokale Adhäsionen-Aufbau in verschiedenen Zelllinien gefunden (Tamura et al., 2007; Hasegawa et al., 2010; Maeda et al., 2009; Tamura et al., 2010). Es ist relativ wenig über die subzelluläre Lokalisation und Funktion von CLP 36 in *in vivo* Systemen bekannt. CLP 36 soll mit nicht-Muskel α -Actinin 1 und α -Actinin 4 assoziiert sein (Vallénus et al., 2000). Des Weiteren wurde gezeigt, dass hCLIM1, das Ortholog zum Ratten CLP36 an α -Actinin 2 bindet und in der Z-Scheibe menschlicher Herzmyofibrillen mit α -Actinin kolokalisiert ist. Es wurde als Adaptorprotein vorgeschlagen, welches andere Proteine an das Zytoskelett bringen kann.

Die in den CP β Morphanten herunter regulierte Ca²⁺ abhängige Calpain-3 Protease (capn3) hat PDLIM1 als Zielprotein und spaltet ein 8 kDa großes Fragment vom C-Terminus ab (Bertipaglia et al., 2009). Die Clik1 Proteinkinase bindet an die C-terminale LIM Domäne von PDLIM1 (Vallenius et al., 2002). PDLIM1 rekrutiert Clik1 an das Aktin Zytoskelett, wo Calpain-3 möglicherweise als indirekter Regulator von Clik1 durch die Abspaltung der C-terminalen LIM Domäne Clik1 frei setzt und der Kinase die Translokation in den Zellkern ermöglicht (Bertipaglia et al., 2009). Möglicherweise ist PDLIM1 am Aufbau und der Stabilisierung der Stressfasern durch die Rekrutierung von Muskel α -Actinin in Form von z-bodies an dieselben in der frühen Phase der Myofibrillogenese beteiligt. Möglicherweise ist PDLIM1 aber auch hochreguliert, um das Fehlen von CP β an den Kontaktstellen des stark exprimierten Aktinzytoskelettes mit dem Sarkolemma zu kompensieren, da es genauso wie CP α -Actinin bindet (Papa et al., 1999) und als Adaptorprotein zwischen membranständigen Proteinen und dem intrazellulären Aktinzytoskelett fungiert.

5 Zusammenfassung

CP β ist eine von zwei Untereinheiten des CP, welches an die schnell wachsenden Enden (+ Enden) von Aktinfilamenten bindet und das Anlagern und Abwandern von Aktinmonomeren verhindert. Hier wurde der Zebrafärbling als *in vivo* Vertebraten Modellorganismus herangezogen, um in CP β *knockdown* Studien zum ersten Mal etwas über die Funktion von CP β in einem sich entwickelnden Vertebratensystem während der Entwicklung der Skelettmuskulatur zu lernen.

Die Genstruktur, alternative Spleißprodukte und deren Proteinsequenzen von CP β sind zwischen Zebrafärbling und höheren Vertebraten stark konserviert. Insbesondere die als Aktinbindedomäne identifizierte C-terminale α -Helix ist in Ihrer Aminosäuresequenz konserviert. Neben einer unterschiedlich langen α -Helix bestehen wesentliche Unterschiede zwischen Zebrafärbling und anderen Vertebraten in der Substitution einer Aminosäure durch Serin (CP β 1 \rightarrow Serin 248) oder einem zusätzlichen Serin (CP β 2 \rightarrow Serin 267) in der C-terminalen α -Helix. CP β 1 und CP β 2 wurden bei indirekter Immunfluoreszenz in 48 SnB und 72 SnB *whole mount* Zebrafärbling Embryonen in einer identischen Verteilung an den vertikalen Myosepten, entlang der Skelettmuskelfibrillen und in den Z-Scheiben der Skelettmuskulatur gefunden. Der CP β *knockdown* führt zu schweren Wachstumsdefekten und Störungen der Skelettmuskelentwicklung wie sie bereits in Zebrafärbling Mutanten, die Modelle von muskulären Dys-trophien darstellen, beschrieben wurden. Die in dieser Studie gemachten Entdeckungen lassen auf zwei wichtige Funktionen von CP β schließen. Zum einen scheint CP β bei der Kontrolle des Wachstums des Zebrafärbling Embryos beteiligt zu sein und zum anderen scheint CP β während der Entwicklung der Skelettmuskulatur in einem *in vivo* Vertebratensystem eine entscheidende Rolle zu spielen.

6 Abstract

CP β is one of two subunits of CP, which caps the barbed end of actin filaments and prevents actin monomers from (de-) polymerising. Here, the zebrafish as an *in vivo* vertebrate model organism was used to conduct a CP β *knockdown* study. For the first time we examined the function of CP β in a developing vertebrate system to learn about its role in the development of skeletal muscle.

The gene structure, alternative splice products and the protein sequence of CP β is highly conserved between zebrafish and higher vertebrates. Notably the c-terminal α -helix recognized as the actin binding domain is also conserved in its amino acid sequence. Besides a different length of the α -helix significant differences between zebrafish and other vertebrates exist in the substitution of one amino acid by a serine (CP β 1 \rightarrow serine 248) or an additional serine (CP β 2 \rightarrow serine 267) in the c-terminal α -helix. CP β 1 and CP β 2 were detected by indirect immunofluorescent labeling in 48 hpf and 72 hpf *whole mount* zebrafish embryos in an identical pattern in vertical myosepta, alongside of skeletal myofibrils and in the Z-discs of skeletal muscles. CP β *knockdown* leads to severe growth defects and impairment of the development of skeletal muscles as it has been described for zebrafish mutants representing models of muscular dystrophies. The results of this study hint at two pivotal roles for CP β . On the one hand CP β seems to be part of the growth control in the zebrafish embryo and on the other hand CP β seems to play a decisive role in the development of the skeletal musculature in a vertebrate system.

7 Literaturverzeichnis

Agarkova, I. & Perriard, J.C. The M-band: an elastic web that crosslinks thick filaments in the center of the sarcomere. *Trends Cell Biol* **15**, 477-85 (2005).

Altschul, S.F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-402 (1997).

Amatruda, J.F., Cannon, J.F., Tatchell, K., Hug, C. & Cooper, J.A. Disruption of the actin cytoskeleton in yeast capping protein mutants. *Nature* **344**, 352-4 (1990).

Amatruda, J.F. & Cooper, J.A. Purification, characterization, and immunofluorescence localization of *Saccharomyces cerevisiae* capping protein. *J Cell Biol* **117**, 1067-76 (1992).

Amsterdam, A. *et al.* A large-scale insertional mutagenesis screen in zebrafish. *Genes Dev* **13**, 2713-24 (1999).

Amsterdam, A. & Hopkins, N. Mutagenesis strategies in zebrafish for identifying genes involved in development and disease. *Trends Genet* **22**, 473-8 (2006).

Antin, P.B. *et al.* Taxol induces postmitotic myoblasts to assemble interdigitating microtubule-myosin arrays that exclude actin filaments *J Cell Biol* **90**, 300-308 (1981)

Baden, K.N., Murray, J., Capaldi, R.A. & Guillemin, K. Early developmental pathology due to cytochrome c oxidase deficiency is revealed by a new zebrafish model. *J Biol Chem* **282**, 34839-49 (2007).

Barbazuk, W.B. *et al.* The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome Res* **10**, 1351-8 (2000).

Barron-Casella, E.A. *et al.* Sequence analysis and chromosomal localization of human Cap Z. Conserved residues within the actin-binding domain may link Cap Z to gelsolin/severin and profilin protein families. *J Biol Chem* **270**, 21472-9 (1995).

Bedell, V.M. *et al.* In vivo genome editing using a high-efficiency TALEN system. *Nature* **491**, 114-8 (2012).

Bedell, V.M., Westcot, S.E. & Ekker, S.C. Lessons from morpholino-based screening in zebrafish. *Brief Funct Genomics* **10**, 181-8 (2011).

Beis, D. & Stainier, D.Y. In vivo cell biology: following the zebrafish trend. *Trends Cell Biol* **16**, 105-12 (2006).

Bertipaglia, I. *et al.* A proteomic study of calpain-3 and its involvement in limb girdle muscular dystrophy type 2a. *Cell Calcium* **46**, 356-63 (2009).

Borisov, A.B., Kontrogianni-Konstantopoulos, A., Bloch, R.J., Westfall, M.V. & Russell, M.W. Dynamics of obscurin localization during differentiation and remodeling of cardiac

myocytes: obscurin as an integrator of myofibrillar structure. *J Histochem Cytochem* **52**, 1117-27 (2004).

Briggs, R.T., Scordilis, S.P. & Powell, J.A. Myofibrillogenesis in rodent skeletal muscle in vitro: two pathways involving thick filament aggregates. *Tissue Cell* **27**, 91-104 (1995).

Caldwell, J.E., Heiss, S.G., Mermall, V. & Cooper, J.A. Effects of CapZ, an actin capping protein of muscle, on the polymerization of actin. *Biochemistry* **28**, 8506-14 (1989).

Carlier, M.F. & Pantaloni, D. Control of actin dynamics in cell motility. *J Mol Biol* **269**, 459-67 (1997).

Cartwright, J., Jr. & Goldstein, M.A. Microtubules in soleus muscles of the postnatal and adult rat. *J Ultrastruct Res* **79**, 74-84 (1982).

Casella, J.F., Craig, S.W., Maack, D.J. & Brown, A.E. Cap Z(36/32), a barbed end actin-capping protein, is a component of the Z-line of skeletal muscle. *J Cell Biol* **105**, 371-9 (1987).

Casella, J.F., Maack, D.J. & Lin, S. Purification and initial characterization of a protein from skeletal muscle that caps the barbed ends of actin filaments. *J Biol Chem* **261**, 10915-21 (1986).

Casella, J.F. & Torres, M.A. Interaction of Cap Z with actin. The NH₂-terminal domains of the alpha 1 and beta subunits are not required for actin capping, and alpha 1 beta and alpha 2 beta heterodimers bind differentially to actin. *J Biol Chem* **269**, 6992-8 (1994).

Chang, N. *et al.* Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in zebrafish embryos. *Cell Res* **23**, 465-72 (2013).

Charvet, B., Malbouyres, M., Pagnon-Minot, A., Ruggiero, F. & Le Guellec, D. Development of the zebrafish myoseptum with emphasis on the myotendinous junction. *Cell Tissue Res* **346**, 439-49 (2011).

Clark, K.A., McElhinny, A.S., Beckerle, M.C. & Gregorio, C.C. Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* **18**, 637-706 (2002).

Cooper, J.A., Blum, J.D. & Pollard, T.D. Acanthamoeba castellanii capping protein: properties, mechanism of action, immunologic cross-reactivity, and localization. *J Cell Biol* **99**, 217-25 (1984).

Crawford, B.D., Henry, C.A., Clason, T.A., Becker, A.L. & Hille, M.B. Activity and distribution of paxillin, focal adhesion kinase, and cadherin indicate cooperative roles during zebrafish morphogenesis. *Mol Biol Cell* **14**, 3065-81 (2003).

Dabiri, G.A., Turnacioglu, K.K., Sanger, J.M. & Sanger, J.W. Myofibrillogenesis visualized in living embryonic cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 9493-8 (1997).

- Danowski, B.A., Imanaka-Yoshida, K., Sanger, J.M. & Sanger, J.W. Costameres are sites of force transmission to the substratum in adult rat cardiomyocytes. *J Cell Biol* **118**, 1411-20 (1992).
- Delalle, I., Pflieger, C.M., Buff, E., Lueras, P. & Hariharan, I.K. Mutations in the *Drosophila* orthologs of the F-actin capping protein alpha- and beta-subunits cause actin accumulation and subsequent retinal degeneration. *Genetics* **171**, 1757-65 (2005).
- Denning, G.M., Kim, I.S. & Fulton, A.B. Shedding of cytoplasmic actins by developing muscle cells. *J Cell Sci* **89 (Pt 2)**, 273-82 (1988).
- Dooley, K. & Zon, L.I. Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Curr Opin Genet Dev* **10**, 252-6 (2000).
- Driever, W. & Fishman, M.C. The zebrafish: heritable disorders in transparent embryos. *J Clin Invest* **97**, 1788-94 (1996).
- Du, A., Sanger, J.M., Linask, K.K. & Sanger, J.W. Myofibrillogenesis in the first cardiomyocytes formed from isolated quail precardiac mesoderm. *Dev Biol* **257**, 382-94 (2003).
- Du, A., Sanger, J.M. & Sanger, J.W. Cardiac myofibrillogenesis inside intact embryonic hearts. *Dev Biol* **318**, 236-46 (2008).
- Dubois, G.M., Haftek, Z., Crozet, C., Garrone, R. & Le Guellec, D. Structure and spatio temporal expression of the full length DNA complementary to RNA coding for alpha2 type I collagen of zebrafish. *Gene* **294**, 55-65 (2002).
- Eckert, C., Goretzki, A., Faberova, M. & Kollmar, M. Conservation and divergence between cytoplasmic and muscle-specific actin capping proteins: insights from the crystal structure of cytoplasmic Cap32/34 from *Dictyostelium discoideum*. *BMC Struct Biol* **12**, 12 (2012).
- Ekker, S.C. & Larson, J.D. Morphant technology in model developmental systems. *Genesis* **30**, 89-93 (2001).
- Ervasti, J.M. Costameres: the Achilles' heel of Herculean muscle. *J Biol Chem* **278**, 13591-4 (2003).
- Fernandez, B.G. *et al.* Actin-Capping Protein and the Hippo pathway regulate F-actin and tissue growth in *Drosophila*. *Development* **138**, 2337-46 (2011).
- Fischman, D.A. An electron microscope study of myofibril formation in embryonic chick skeletal muscle. *J Cell Biol* **32**, 557-75 (1967).
- Fischman, D.A. The synthesis and assembly of myofibrils in embryonic muscle. *Curr Top Dev Biol* **5**, 235-80 (1970).
- Frank, D., Kuhn, C., Katus, H.A. & Frey, N. The sarcomeric Z-disc: a nodal point in signalling and disease. *J Mol Med (Berl)* **84**, 446-68 (2006).

- Frank, D.J., Hopmann, R., Lenartowska, M. & Miller, K.G. Capping protein and the Arp2/3 complex regulate nonbundle actin filament assembly to indirectly control actin bundle positioning during *Drosophila melanogaster* bristle development. *Mol Biol Cell* **17**, 3930-9 (2006).
- Fujita, M. *et al.* Filamin C plays an essential role in the maintenance of the structural integrity of cardiac and skeletal muscles, revealed by the medaka mutant zacro. *Dev Biol* **361**, 79-89 (2012).
- Gaikis, L., Stewart, D., Johnson, R. & Pyle, W.G. Identifying a role of the actin capping protein CapZ in beta-adrenergic receptor signalling. *Acta Physiol (Oxf)* **207**, 173-82 (2013).
- Geisler, S.B. *et al.* Obscurin-like 1, OBSL1, is a novel cytoskeletal protein related to obscurin. *Genomics* **89**, 521-31 (2007).
- Gemballa, S. & Vogel, F. Spatial arrangement of white muscle fibers and myoseptal tendons in fishes. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **133**, 1013-37 (2002).
- Golson, M.L., Sanger, J.M. & Sanger, J.W. Inhibitors arrest myofibrillogenesis in skeletal muscle cells at early stages of assembly. *Cell Motil Cytoskeleton* **59**, 1-16 (2004).
- Granato, M. *et al.* Genes controlling and mediating locomotion behavior of the zebrafish embryo and larva. *Development* **123**, 399-413 (1996).
- Grunwald, D.J. & Eisen, J.S. Headwaters of the zebrafish -- emergence of a new model vertebrate. *Nat Rev Genet* **3**, 717-24 (2002).
- Gundersen, G.G., Khawaja, S. & Bulinski, J.C. Generation of a stable, posttranslationally modified microtubule array is an early event in myogenic differentiation. *J Cell Biol* **109**, 2275-88 (1989).
- Haffter, P. *et al.* The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* **123**, 1-36 (1996).
- Hart, M.C. & Cooper, J.A. Vertebrate isoforms of actin capping protein beta have distinct functions *In vivo*. *J Cell Biol* **147**, 1287-98 (1999).
- Hart, M.C., Korshunova, Y.O. & Cooper, J.A. Vertebrates have conserved capping protein alpha isoforms with specific expression patterns. *Cell Motil Cytoskeleton* **38**, 120-32 (1997).
- Hasegawa, T. *et al.* CLP36 interacts with palladin in dorsal root ganglion neurons. *Neurosci Lett* **476**, 53-7 (2010).
- Hassel, D. *et al.* Nexilin mutations destabilize cardiac Z-disks and lead to dilated cardiomyopathy. *Nat Med* **15**, 1281-8 (2009).
- Henry, C.A. & Amacher, S.L. Zebrafish slow muscle cell migration induces a wave of fast muscle morphogenesis. *Dev Cell* **7**, 917-23 (2004).

- Henry, C.A. *et al.* Roles for zebrafish focal adhesion kinase in notochord and somite morphogenesis. *Dev Biol* **240**, 474-87 (2001).
- Holley, S.A. & Nusslein-Volhard, C. Somitogenesis in zebrafish. *Curr Top Dev Biol* **47**, 247-77 (2000).
- Holtzer, H. *et al.* Independent assembly of 1.6 microns long bipolar MHC filaments and I-Z-I bodies. *Cell Struct Funct* **22**, 83-93 (1997).
- Hopmann, R., Cooper, J.A. & Miller, K.G. Actin organization, bristle morphology, and viability are affected by actin capping protein mutations in *Drosophila*. *J Cell Biol* **133**, 1293-305 (1996).
- Huang, P. *et al.* Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs. *Nat Biotechnol* **29**, 699-700 (2011).
- Hudziak, R.M. *et al.* Resistance of morpholino phosphorodiamidate oligomers to enzymatic degradation. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* **6**, 267-72 (1996).
- Hug, C. *et al.* Capping protein levels influence actin assembly and cell motility in dictyostelium. *Cell* **81**, 591-600 (1995).
- Hug, C., Miller, T.M., Torres, M.A., Casella, J.F. & Cooper, J.A. Identification and characterization of an actin-binding site of CapZ. *J Cell Biol* **116**, 923-31 (1992).
- Hwang, W.Y. *et al.* Heritable and precise zebrafish genome editing using a CRISPR-Cas system. *PLoS One* **8**, e68708 (2013a).
- Hwang, W.Y. *et al.* Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol* **31**, 227-9 (2013b).
- Isenberg, G., Aebi, U. & Pollard, T.D. An actin-binding protein from *Acanthamoeba* regulates actin filament polymerization and interactions. *Nature* **288**, 455-9 (1980).
- Jamur, M.C. & Oliver, C. Cell fixatives for immunostaining. *Methods Mol Biol* **588**, 55-61 (2010a).
- Jamur, M.C. & Oliver, C. Permeabilization of cell membranes. *Methods Mol Biol* **588**, 63-6 (2010b).
- Jung, G., Remmert, K., Wu, X., Volosky, J.M. & Hammer, J.A., 3rd. The Dictyostelium CARMIL protein links capping protein and the Arp2/3 complex to type I myosins through their SH3 domains. *J Cell Biol* **153**, 1479-97 (2001).
- Keller, T.C., 3rd. Structure and function of titin and nebulin. *Curr Opin Cell Biol* **7**, 32-8 (1995).
- Kelly, D.E. Myofibrillogenesis and Z-band differentiation. *Anat Rec* **163**, 403-25 (1969).
- Kilimann, M.W. & Isenberg, G. Actin filament capping protein from bovine brain. *EMBO J* **1**, 889-94 (1982).

- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. & Schilling, T.F. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* **203**, 253-310 (1995).
- Kley, R.A. *et al.* Impairment of protein degradation in myofibrillar myopathy caused by FLNC/filamin C mutations. *Autophagy* **9**, 422-3 (2013).
- Komiyama, M., Zhou, Z.H., Maruyama, K. & Shimada, Y. Spatial relationship of nebulin relative to other myofibrillar proteins during myogenesis in embryonic chick skeletal muscle cells in vitro. *J Muscle Res Cell Motil* **13**, 48-54 (1992).
- Kontogianni-Konstantopoulos, A. *et al.* Obscurin modulates the assembly and organization of sarcomeres and the sarcoplasmic reticulum. *FASEB J* **20**, 2102-11 (2006).
- Kraft, T. *et al.* Equilibration and exchange of fluorescently labeled molecules in skinned skeletal muscle fibers visualized by confocal microscopy. *Biophys J* **69**, 1246-58 (1995).
- Kudo, H., Amizuka, N., Araki, K., Inohaya, K. & Kudo, A. Zebrafish periostin is required for the adhesion of muscle fiber bundles to the myoseptum and for the differentiation of muscle fibers. *Dev Biol* **267**, 473-87 (2004).
- Loisel, T.P., Boujemaa, R., Pantaloni, D. & Carlier, M.F. Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. *Nature* **401**, 613-6 (1999).
- LoRusso, S.M., Rhee, D., Sanger, J.M. & Sanger, J.W. Premyofibrils in spreading adult cardiomyocytes in tissue culture: evidence for reexpression of the embryonic program for myofibrillogenesis in adult cells. *Cell Motil Cytoskeleton* **37**, 183-98 (1997).
- Maeda, M. *et al.* Characterization of interaction between CLP36 and palladin. *FEBS J* **276**, 2775-85 (2009).
- Maruyama, K. *et al.* Beta-actinin is equivalent to Cap Z protein. *J Biol Chem* **265**, 8712-5 (1990).
- Maves, L., Jackman, W. & Kimmel, C.B. FGF3 and FGF8 mediate a rhombomere 4 signaling activity in the zebrafish hindbrain. *Development* **129**, 3825-37 (2002).
- Melan, M.A. Overview of cell fixatives and cell membrane permeants. *Methods Mol Biol* **115**, 45-55 (1999).
- Metscher, B.D. & Ahlberg, P.E. Zebrafish in context: uses of a laboratory model in comparative studies. *Dev Biol* **210**, 1-14 (1999).
- Mullis, K. *et al.* Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**, 263-73 (1986).
- Neacsu, C.D. *et al.* Matrilin-1 is essential for zebrafish development by facilitating collagen II secretion. *J Biol Chem* **289**, 1505-18 (2014).

- Neuhaus, E.M., Horstmann, H., Almers, W., Maniak, M. & Soldati, T. Ethane-freezing/methanol-fixation of cell monolayers: a procedure for improved preservation of structure and antigenicity for light and electron microscopies. *J Struct Biol* **121**, 326-42 (1998).
- Ogienko, A.A. *et al.* Capping protein beta is required for actin cytoskeleton organisation and cell migration during *Drosophila* oogenesis. *Cell Biol Int* **37**, 149-59 (2013).
- Ohtsuka, T. *et al.* Nexilin: a novel actin filament-binding protein localized at cell-matrix adherens junction. *J Cell Biol* **143**, 1227-38 (1998).
- Palmgren, S., Ojala, P.J., Wear, M.A., Cooper, J.A. & Lappalainen, P. Interactions with PIP2, ADP-actin monomers, and capping protein regulate the activity and localization of yeast twinfilin. *J Cell Biol* **155**, 251-60 (2001).
- Papa, I. *et al.* Alpha actinin-CapZ, an anchoring complex for thin filaments in Z-line. *J Muscle Res Cell Motil* **20**, 187-97 (1999).
- Pappas, C.T., Bhattacharya, N., Cooper, J.A. & Gregorio, C.C. Nebulin interacts with CapZ and regulates thin filament architecture within the Z-disc. *Mol Biol Cell* **19**, 1837-47 (2008).
- Parsons, M.J., Campos, I., Hirst, E.M. & Stemple, D.L. Removal of dystroglycan causes severe muscular dystrophy in zebrafish embryos. *Development* **129**, 3505-12 (2002).
- Peng, H.B., Wolosewick, J.J. & Cheng, P.C. The development of myofibrils in cultured muscle cells: a whole-mount and thin-section electron microscopic study. *Dev Biol* **88**, 121-36 (1981).
- Piepenburg, O., Grimmer, D., Williams, P.H. & Smith, J.C. Activin redux: specification of mesodermal pattern in *Xenopus* by graded concentrations of endogenous activin B. *Development* **131**, 4977-86 (2004).
- Pyle, W.G. *et al.* Actin capping protein: an essential element in protein kinase signaling to the myofilaments. *Circ Res* **90**, 1299-306 (2002).
- Pyle, W.G., La Rotta, G., de Tombe, P.P., Sumandea, M.P. & Solaro, R.J. Control of cardiac myofilament activation and PKC-beta11 signaling through the actin capping protein, CapZ. *J Mol Cell Cardiol* **41**, 537-43 (2006).
- Raeker, M.O. & Russell, M.W. Obscurin depletion impairs organization of skeletal muscle in developing zebrafish embryos. *J Biomed Biotechnol* **2011**, 479135 (2011).
- Raeker, M.O. *et al.* Obscurin is required for the lateral alignment of striated myofibrils in zebrafish. *Dev Dyn* **235**, 2018-29 (2006).
- Rhee, D., Sanger, J.M. & Sanger, J.W. The premyofibril: evidence for its role in myofibrillogenesis. *Cell Motil Cytoskeleton* **28**, 1-24 (1994).
- Robu, M.E. *et al.* p53 activation by knockdown technologies. *PLoS Genet* **3**, e78 (2007).

- Sander, J.D. *et al.* Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs. *Nat Biotechnol* **29**, 697-8 (2011).
- Sanger, J.W. *et al.* Myofibrillogenesis in skeletal muscle cells. *Clin Orthop Relat Res*, S153-62 (2002).
- Sanger, J.W. *et al.* How to build a myofibril. *J Muscle Res Cell Motil* **26**, 343-54 (2005).
- Sanger, J.W., Wang, J., Holloway, B., Du, A. & Sanger, J.M. Myofibrillogenesis in skeletal muscle cells in zebrafish. *Cell Motil Cytoskeleton* **66**, 556-66 (2009).
- Schafer, D.A., Hug, C. & Cooper, J.A. Inhibition of CapZ during myofibrillogenesis alters assembly of actin filaments. *J Cell Biol* **128**, 61-70 (1995).
- Schafer, D.A., Jennings, P.B. & Cooper, J.A. Dynamics of capping protein and actin assembly in vitro: uncapping barbed ends by polyphosphoinositides. *J Cell Biol* **135**, 169-79 (1996).
- Schafer, D.A., Korshunova, Y.O., Schroer, T.A. & Cooper, J.A. Differential localization and sequence analysis of capping protein beta-subunit isoforms of vertebrates. *J Cell Biol* **127**, 453-65 (1994).
- Schafer, D.A., Mooseker, M.S. & Cooper, J.A. Localization of capping protein in chicken epithelial cells by immunofluorescence and biochemical fractionation. *J Cell Biol* **118**, 335-46 (1992).
- Schafer, D.A., Waddle, J.A. & Cooper, J.A. Localization of CapZ during myofibrillogenesis in cultured chicken muscle. *Cell Motil Cytoskeleton* **25**, 317-35 (1993).
- Schleicher, M., Gerisch, G. & Isenberg, G. New actin-binding proteins from Dictyostelium discoideum. *EMBO J* **3**, 2095-100 (1984).
- Sehnert, A.J. *et al.* Cardiac troponin T is essential in sarcomere assembly and cardiac contractility. *Nat Genet* **31**, 106-10 (2002).
- Shimada, Y. & Obinata, T. Polarity of actin filaments at the initial stage of myofibril assembly in myogenic cells in vitro. *J Cell Biol* **72**, 777-85 (1977).
- Siebrands, C.C., Sanger, J.M. & Sanger, J.W. Myofibrillogenesis in skeletal muscle cells in the presence of taxol. *Cell Motil Cytoskeleton* **58**, 39-52 (2004).
- Sizonenko, G.I., Karpova, T.S., Gattermeir, D.J. & Cooper, J.A. Mutational analysis of capping protein function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **7**, 1-15 (1996).
- Sprague, J., Doerry, E., Douglas, S. & Westerfield, M. The Zebrafish Information Network (ZFIN): a resource for genetic, genomic and developmental research. *Nucleic Acids Res* **29**, 87-90 (2001).
- Stadler, C., Skogs, M., Brismar, H., Uhlen, M. & Lundberg, E. A single fixation protocol for proteome-wide immunofluorescence localization studies. *J Proteomics* **73**, 1067-78 (2010).

- Stainier, D.Y. Zebrafish genetics and vertebrate heart formation. *Nat Rev Genet* **2**, 39-48 (2001).
- Summerton, J. & Weller, D. Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* **7**, 187-95 (1997).
- Tamura, N., Ohno, K., Katayama, T., Kanayama, N. & Sato, K. The PDZ-LIM protein CLP36 is required for actin stress fiber formation and focal adhesion assembly in BeWo cells. *Biochem Biophys Res Commun* **364**, 589-94 (2007).
- Tamura, N. *et al.* Expression of stress fiber-associated protein CLP36 during differentiation of Rcho-1 trophoblast giant cells. *Placenta* **31**, 743-5 (2010).
- Toyama, Y. *et al.* Effects of taxol and Colcemid on myofibrillogenesis *PNAS* **79** (21) 6556-6560 (1982)
- Tonino, P. *et al.* Reduced myofibrillar connectivity and increased Z-disk width in nebulin-deficient skeletal muscle. *J Cell Sci* **123**, 384-91 (2010).
- Vallénus, T., Luukko, K. & Makela, T.P. CLP-36 PDZ-LIM protein associates with nonmuscle alpha-actinin-1 and alpha-actinin-4. *J Biol Chem* **275**, 11100-5 (2000).
- Vallénus, T. & Makela, T.P. Clik1: a novel kinase targeted to actin stress fibers by the CLP-36 PDZ-LIM protein. *J Cell Sci* **115**, 2067-73 (2002).
- von Bulow, M., Rackwitz, H.R., Zimbelmann, R. & Franke, W.W. CP beta3, a novel isoform of an actin-binding protein, is a component of the cytoskeletal calyx of the mammalian sperm head. *Exp Cell Res* **233**, 216-24 (1997).
- Waddle, J.A., Cooper, J.A. & Waterston, R.H. The alpha and beta subunits of nematode actin capping protein function in yeast. *Mol Biol Cell* **4**, 907-17 (1993).
- Wang, J. *et al.* Ectopic expression and dynamics of TPM1alpha and TPM1kappa in myofibrils of avian myotubes. *Cell Motil Cytoskeleton* **64**, 767-76 (2007).
- Wang, J. *et al.* Dynamics of Z-band based proteins in developing skeletal muscle cells. *Cell Motil Cytoskeleton* **61**, 34-48 (2005).
- Waterman, R.E. Development of the lateral musculature in the teleost, *Brachydanio rerio*: a fine structural study. *Am J Anat* **125**, 457-93 (1969).
- Xiao, A. *et al.* Chromosomal deletions and inversions mediated by TALENs and CRISPR/Cas in zebrafish. *Nucleic Acids Res* **41**, e141 (2013).
- Yamashita, A., Maeda, K. & Maeda, Y. Crystal structure of CapZ: structural basis for actin filament barbed end capping. *EMBO J* **22**, 1529-38 (2003).
- Yang, F.H. & Pyle, W.G. Cardiac actin capping protein reduction and protein kinase C inhibition maintain myofilament function during cardioplegic arrest. *Cell Physiol Biochem* **27**, 263-72 (2011).

Yang, F.H. & Pyle, W.G. Reduced cardiac CapZ protein protects hearts against acute ischemia-reperfusion injury and enhances preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* **52**, 761-72 (2012).

Zamecnik, P.C. & Stephenson, M.L. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 280-4 (1978)..

Zu, Y. *et al.* TALEN-mediated precise genome modification by homologous recombination in zebrafish. *Nat Methods* **10**, 329-31 (2013).

8 Erklärung zur Mitwirkung von Kollaboratoren

Bei der Versuchsdurchführung und Generierung der Daten der Kraftmessungen an intakten Zebrabärbling Embryonen konnte ich freundlicherweise auf die Expertise und die Unterstützung meines Kollegen Jan Eckhardt zurückgreifen. Er hat alle Kraftmessungen selbstständig durchgeführt und die generierten Daten zur Verfügung gestellt. Frau Anja Habermann hat in enger Kollaboration mit mir die Präparationen, die Herstellung der Ultradünnschnittserien der Zebrabärbling Embryonen ausgeführt und die Schnitte zur TEM Analyse zur Verfügung gestellt. Heike Wiese und Lena Reimann danke ich für die quantitative Proteom Analyse der WT Zebrabärbling Embryonen und der CP β Morphanten mittels Kationen Austausch Chromatographie gefolgt von nano-HPLC/Elektrospray Ionisierungstendem Massenspektrometrie (ESI-MS/MS). Frau Mechthild Schröter danke ich für die in dieser Arbeit verwendete Positivkontrolle (rekombinantes Hühner CP). Sie hat das Protein exprimiert, aufgereinigt und mir zur Verfügung gestellt.

9 Danksagung

Mein Dank gilt Frau Prof. Dr. Pfitzer für die Möglichkeit meine Dissertation in Ihrem Institut durchführen zu können, Ihrer Bereitschaft ein Gutachten anzufertigen und Ihrem Einsatz als Prüferin in meiner Disputation. Herrn Prof. Dr. Hammerschmidt danke ich für die freundliche Bereitschaft ein Gutachten über diese Arbeit anzufertigen und als Prüfer in meiner Disputation zur Verfügung zu stehen. Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. Plickert für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission. Vom ganzen Herzen möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Stehle bedanken, für die Möglichkeit die Projekte durchzuführen, die lehrreiche Betreuung während dieser Zeit, dem Verständnis mit dem er mir begegnet ist und für die hilfreichen Ideen und Tipps die er mir in der Schreibphase dieser Arbeit zukommen ließ. Nicht zuletzt danke ich Ihm für seine Teilnahme an meiner Disputation als Beisitzer.

Mein Dank gilt außerdem meinen Kollegen aus der Vegetativen Physiologie der Uniklinik Köln, der Biochemie II der Uniklinik Köln, dem Institut für Biologie II (Biochemie) der Universität Freiburg und dem Frankfurt Molecular Life Science Institute (FMLS). Ich möchte mich aufrichtig für die technische Unterstützung, die kreativen Ideen und den freundschaftlichen Umgang bedanken. Insbesondere gilt mein Dank an dieser Stelle Frau Dr. Mechthild Schröter, Frau Dr. Gudrun Borchert und Herrn Prof. Dr. Symeon Papadopoulos für die intensive, ausdauernde und kreative Unterstützung im Bereich der Molekularbiologie, Biochemie und konfokalen Mikroskopie.

Meine Liebe und meinen tief empfundenen Dank möchte ich meiner Freundin Sophie aussprechen, die mich seelisch in schwierigen Zeiten immer unterstützt hat. Diese Arbeit ist Dir gewidmet.

10 Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen noch nicht veröffentlicht worden ist, sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Matthias Hammer-schmidt betreut worden.

Köln, November 2014

Marco Bitzer

Teilpublikationen

The role of the actin capping protein (CapZ) for force development and force kinetics in skeletal myofibrils

S. Rippl, **M. Bitzer**, S. Papadopoulos, M. Schroeter, G. Pfitzer, R. Stehle in Abstracts of the 93rd Annual Meeting of the German Physiological Society 13-15 March 2014, Mainz, Germany

Characterisation of CapZ deficient zebrafish larvae utilizing a novel force measurement technique

M. Bitzer, J. Eckhardt, A. Habermann, M. Schroeter, S. Papadopoulos, A. Frangakis, G. Pfitzer, R. Stehle in Abstracts of the 93rd Annual Meeting of the German Physiological Society 13-15 March 2014, Mainz, Germany

Anhang



Abbildung 38: Morpholinobindestellen in Zebrafärbling CPβ

(A) Schematische Darstellung der Exone 1-3 und des Intron 3 zur Veranschaulichung der Bindestellen der drei verwendeten Morpholinos im CPβ Transkript. (B) CPβ Nukleotidsequenz mit grau unterlegten Bindestellen der drei in dieser Arbeit verwendeten 25 mer Morpholino – modifizierten – Oligonukleotide (5'UTR-MO, Start-MO und E3I3-MO). Zur leichteren Orientierung ist das Startcodon (ATG) des offenen Leserahmens rot unterstrichen und der Beginn der Intron Sequenz von Intron 3 in kleinen Buchstaben dargestellt.