

**Untersuchungen zur Rolle von Transkripten unbekannter
Funktion für die Kardiomyogenese und Funktion von
Kardiomyozyten im Zebrafisch (*Danio rerio*) und in
murinen embryonalen Stammzellen**

Inaugural- Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Rabea Niemann

aus Emmerich

Köln, 2011

Berichtersteller:

PD Dr. Martin Gajewski
Prof. Dr. Sigrun Korsching
Prof. Dr. Agapios Sachinidis

Tag der mündlichen Prüfung:

27. Mai 2011

für Markus und Sven

„Die besten Dinge im Leben sind nicht die, die man für Geld bekommt.“

Albert Einstein (1879-1955)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VIII
1. Einleitung.....	1
1.1 Herzentwicklung Wirbeltier (Vertebrata)	1
1.2 Embryonale Stammzellen	4
2. Material.....	9
2.1 Verwendete Puffer und Lösungen	9
2.2 Verwendete Oligonukleotide	9
2.3 Morpholino-modifizierte antisense Oligonukleotide.....	12
2.4 Verwendete shRNA Konstrukte in pGFP-V-RS Vektor	13
2.5 Software.....	13
3. Methoden	15
3.1 Zebrafischmethoden	15
3.1.1 Haltung Zebrafisch und Gewinnung von Embryonen	15
3.1.1.1 Beschreibung und Herkunft	15
3.1.1.2 Haltung	15
3.1.1.3 Gewinnung von Embryonen	16
3.1.1.4 Unterdrückung der Melanophorenbildung.....	16
3.1.2 Dechorionisierung und Lagerung von Zebrafisch-Embryonen	17
3.1.2.1 Mechanische Dechorionisierung von Embryonen.....	17
3.1.3 <i>in situ</i> Hybridisierung mit Digoxigenin markierten RNA Sonden an ganzen Embryonen	17
3.1.3.1 Hitzebehandlung von Zebrafisch Embryonen (nach mündl. Mitteilung M. Gajewski).....	18
3.1.3.2 Proteinase K-Behandlung von Zebrafisch Embryonen	18
3.1.3.3 Behandlung mit Essigsäureanhydrid	19
3.1.3.4 Vorhybridisierung.....	19
3.1.3.5 Hybridisierung.....	19
3.1.3.6 Waschschrte	19
3.1.3.7 Antikörper Inkubation.....	20
3.1.3.8 Farbsubstratreaktion.....	20
3.1.3.9 Lösungen für die <i>in situ</i> Hybridisierung	20

3.1.4 Analyse von Embryonen nach <i>in situ</i> Hybridisierung.....	21
3.1.5 Injektion von Morpholino-modifizierten antisense Oligonukleotiden	21
3.1.5.1 Herstellung der Kapillaren	21
3.1.5.2 Vorbereitung der Injektionslösung	22
3.1.5.3 Injektionen	22
3.1.6 Analyse von morphologischen Effekten	23
3.1.7 Analyse der Herzschlagrate	23
3.1.8 Diaminofluoren (DAF)- Färbung (modifiziert von Miwa et al., 1991).....	23
3.1.9 Generierung von Kontroll-Konstrukten zur Überprüfung der Spezifität der Morpholino-modifizierten antisense Oligonukleotiden (MO).....	24
3.2 Zellkulturmethoden	25
3.2.1 Kultivierung von ES-Zellen	25
3.2.2 Einfrieren und Auftauen von ES-Zellen	25
3.2.3 Differenzierung von ES-Zellen	26
3.2.4 Transfektion von ES-Zellen mittels Elektroporation.....	27
3.2.5 Immunohistochemie (IHC).....	27
3.2.6 Mikroarray-Analyse	28
3.2.7 Genontologie (Gene Ontology, GO).....	29
3.3 Molekularbiologische Methoden	29
3.3.1 RNA Isolation	29
3.3.1.1 gesamtRNA Isolation aus Zebrafischembryonen.....	29
3.3.1.2 gesamtRNA Isolation aus ES-Zellen.....	30
3.3.2 cDNA Synthese	30
3.3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR) (Mullis et al., 1986; Erlich, 1989).....	30
3.3.4 DNA Sequenzierung.....	31
3.3.5 Quantitative PCR.....	31
3.3.6 Aufreinigung von PCR-Fragmenten aus Agarosegelen (Gelextraktion)	32
3.3.7 <i>in vitro</i> Transkription für die Herstellung von <i>in situ</i> Sonden.....	32
3.4 Bioanalytische Methoden.....	33
3.4.1 Datenbankrecherche nach Homologen im Zebrafisch.....	33
3.4.2 Ermittlung des „ <i>open reading frame</i> “ (ORF) und der 5' UTR der Kandidatengene	34
4. Ergebnisse	35

4.1 Identifizierung von Kandidatengen in ES-Zellen und respektive im Zebrafisch	35
4.2 Identifikation der kandidatengen-spezifischen Expressionsdomänen in Zebrafischembryonen	52
4.3 Ermittlung der 5'UTR zur Herstellung von genspezifischen Morpholino-modifizierten antisense Oligonukleotiden (MO)	53
4.4 <i>knockdown</i> der Kandidatengene durch Injektion von genspezifischen Morpholino-modifizierten antisense Oligonukleotiden (MO).....	55
4.5 Morphologische Veränderungen nach Injektion genspezifischer MOs	57
4.5.1 Auswirkungen der zfM07-I_anti5' ^{MO} und zfM07-II_anti5' ^{MO} Injektionen	57
4.5.2 Auswirkungen der zfJ20-I_anti5' ^{MO} und zfJ20-II_anti5' ^{MO} Injektionen ..	59
4.5.3 Auswirkungen der zfMHC5-I_anti5' ^{MO} und zfMHC5-II_anti5' ^{MO} Injektionen.....	62
4.5.4 Auswirkungen der zfDdit4I-I_anti5' ^{MO} und zfDdit4I-II_anti5' ^{MO} Injektionen	64
4.5.5 Auswirkungen der zfZfp365-I_anti5' ^{MO} und zfZfp365-II_anti5' ^{MO} Injektionen.....	64
4.5.6 Auswirkungen der zfZfp533-I_anti5' ^{MO} und zfZfp533-II_anti5' ^{MO} Injektionen.....	67
4.6 Expression der Kandidatengene in ES-Zellen	71
4.7 Generierung und Analyse von stabilen <i>knockdown</i> -Klonen gegen die Kandidatengene durch Transfektion von CGR8-ES-Zellen	72
4.8 Auswirkungen des <i>knockdown</i> der Kandidatengene auf die Expression von speziellen Markern der drei Keimblätter	75
4.9 Mikroarrayanalyse der A130092J06Rik und Zfp533 <i>knockdown</i> EBs.....	79
5. Diskussion	89
5.1 Analyse der sechs Kandidatengene im Zebrafisch	89
5.2 Analyse der Kandidatengene in murinen embryonalen Stammzellen.....	95
6. Zusammenfassung	98
7. Abstract	99
8. Literaturverzeichnis	100
9. Anhang	107
10. Erklärung zur Mitwirkung von Kollaboratoren	116
11. Danksagung	117

Erklärung	118
Veröffentlichungen	118

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
a-c-actin	Alpha Actin (cardiac)
AFP	Alpha Fetoprotein
α MHC	α Myosin heavy chain (Myh6)
amhc	Atrial Myosin heavy chain
α SMA	Alpha smooth muscle actin
AP	alkalische Phosphatase
aRNA	Amplifizierte RNA
AS	Aminosäure
BMP2	Bone morphogenetic protein 2
bp	Basenpaare
bpm	beats per minute (Schläge pro Minute)
BSA	Bovine serum albumine (Rinderserumalbumine)
bzw.	beziehungsweise
°C	Temperatur in Grad Celsius
ca.	circa
Chaps	3-[N-(3-Cholanamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
CO ₂	Kohlendioxid
cDNA	komplementäre (engl. complementary) Desoxyribonukleinsäure
Cmlc2	Cardiac myosin light chain 2
d	Day(s) (Tag(e))
DAF	Diaminofluoren
DAVID	Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
DCN	Decorin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DES	Desmin
DET	Differentially expressed transcripts
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dpf	days post fertilisation (Tage nach der Befruchtung)
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure
EBs	Embryoid bodies (Embryonalkörperchen)
ECACC	European Collection of Cell Cultures

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	Enhanced grün fluoreszierendes Protein
EST	Expressed sequence tag
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
et al.	und andere
EtOH	Ethanol
μ F	Micro Farad
FACS	Fluorescence activated cell sorting (Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung)
FBS	Fetal bovine serum (Fötales Rinderserum)
Fgf5	Fibroblast growth factor 5
Flk1	Fetal liver kinase (VEGFR2)
Flt1	Fms-related Tyrosin Kinase 1 (VEGFR1)
Foxa2	Forkhead box A2
g	Gramm
μ g	Microgramm
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GMEM	Glasgow's buffered minimal essential Medium
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
hpf	hours post fertilisation (Stunden nach der Befruchtung)
Hybmix	Hybridisierungs-Lösung
Hspb8	Heat shock 22kDa protein 8p
IgG	Immunglobulin G
IMDM	Iscove's modified Dulbecco's Medium
kb	Kilobasen (1000 Basenpaare)
LIF	Leukämie inhibierender Faktor
Mef2c	Myocyte enhancer factor 2c
MeOH	Methanol
min	Minute
MLC2v	Ventricular myosin regulatory light chain
ml	Milliliter
mM	millimolar
MO	Morpholino antisense Oligomer
Myf5	Myogenic factor 5

ng	Nanogramm
PAX6	Paired box gene 6
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatsalzpuffer)
PBST	Phosphate buffered saline + Tween-20
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
PSM	Präsomitisches paraxiales Mesoderm
PTU	1-phenyl-2-thiourea
qPCR	Qualitative Real-Time (Echtzeit) Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
Sema3a	Semaphorin 3A
SSC	Sodium chloride/Sodium citrate (Natriumchlorid/Natriumcitrat)
SSCT	SSC + Tween-20
Std.	Stunde(n)
TAE	Tris-Acetat Elektrophoresepuffer
Tbra	T Brachyury
Tbx20	T-box 20
TGF	Transforming growth factor
TNNC	Cardiac Troponin C
TNNT	Cardiac Troponin T (cTNT)
TTR	Transthyretin
U	Unit, Enzymeinheit
ün	über Nacht
UV	Ultra violett
V	Volt
VEGF	Vascular endothelial growth factor
vmhc	Ventricular myosin heavy chain
wt	Wildtyp
zf	Zebrafisch
Zfp	Zinkfingerprotein
z.T.	zum Teil
z.B.	zum Beispiel

Nukleotide innerhalb einer Nukleinsäuresequenz sind durch den Anfangsbuchstaben der Base bezeichnet (A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin)

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.1** Entwicklung der drei Keimblätter während der humanen Embryogenese und der ES-Zellentwicklung
- Abb. 1.2** Regulation der Herzentwicklung aus dem Mesoderm durch verschiedene Signaltransduktionswege
-
- Abb. 4.1** Auszug aus der Ensembl-Datenbank zur Darstellung genereller Informationen über 4930506M07Rik
- Abb. 4.2** Abgleich von 4930506M07Rik im Maus-, Mensch- und Zebrafischgenom.
- Abb. 4.3** Auszug aus der Ensembl-Datenbank zur Darstellung der Proteindomänen von 4930506M07Rik
- Abb. 4.4** EST Abgleich in der bio-GPS- und Gene-Hub-GEPIS-Datenbank zur Darstellung der Expression von 4930506M07Rik in verschiedenen Geweben
- Abb. 4.5** EST Abgleich in der bio-GPS- und Gene-Hub-GEPIS-Datenbank zur Darstellung der Expression von 9530057J20Rik in verschiedenen Geweben
- Abb. 4.6** Auszug aus der Ensembl-Datenbank zur Darstellung genereller Informationen über A130092J06Rik
- Abb. 4.7** Abgleich von A130092J06Rik im Maus-, Mensch- und Zebrafischgenom.
- Abb. 4.8** EST Abgleich in der Gene-Hub-GEPIS- und bioGPS-Datenbank zur Darstellung der Expression von A130092J06Rik in verschiedenen Geweben
- Abb. 4.9** Auszug aus der Ensembl-Datenbank zur Darstellung genereller Informationen über Ddit4l
- Abb. 4.10** Abgleich von Ddit4l im Maus-, Mensch- und Zebrafischgenom
- Abb. 4.11** EST Abgleich in der Gene-Hub-GEPIS- und bioGPS-Datenbank zur Darstellung der Expression von Ddit4l in verschiedenen Geweben

- Abb. 4.12** Auszug aus der Ensembl-Datenbank zur Darstellung genereller Informationen über *zfp365*
- Abb. 4.13** Abgleich von *Zfp365* im Maus-, Mensch- und Zebrafischgenom
- Abb. 4.14** Auszug aus der Ensembl-Datenbank zur Darstellung der Proteindomänen von *Zfp365*
- Abb. 4.15** EST Abgleich in der Gene-Hub-GEPIS- und bioGPS-Datenbank zur Darstellung der Expression von *Zfp365* in verschiedenen Geweben
- Abb. 4.16** Auszug aus der Ensembl-Datenbank zur Darstellung genereller Informationen über *Zfp533*
- Abb. 4.17** Abgleich von *Zfp533* im Maus-, Mensch- und Zebrafischgenom
- Abb. 4.18** Auszug aus der Ensembl-Datenbank zur Darstellung der Proteindomänen von *Zfp365*
- Abb. 4.19** EST Abgleich in der Gene-Hub-GEPIS- und bioGPS-Datenbank zur Darstellung der Expression von *Zfp533* in verschiedenen Geweben
- Abb. 4.20** Herzspezifische Expressionsmuster von 5 der 6 Kandidatengene
- Abb. 4.21** 5'UTR Bereich und der Beginn des ORF der 5 Kandidatengene
- Abb. 4.22** Kontrolle der Spezifität der verwendeten Morpholino-modifizierten antisense Oligonukleotide durch den Effekt der MO auf die jeweilige MO-Zielsequenz+EGFP mRNS
- Abb. 4.23** Morphologische Defekte nach Injektion von *zfM07-I_anti5'^{MO}* und *zfM07-II_anti5'^{MO}*
- Abb. 4.24** Diaminofluorenfärbung zur Markierung von Erythrozyten
- Abb. 4.25** Morphologische Defekte nach Injektion von *zfJ20-I_anti5'^{MO}* und *zfJ20-II_anti5'^{MO}*
- Abb. 4.26** Auswirkungen der *zfJ20-I_anti5'^{MO}* und *zfJ20-II_anti5'^{MO}*-Injektionen auf die Expressionsdomäne von *cm1c2* im Herzen
- Abb. 4.27** Morphologische Defekte nach Injektion von *zfMHC5-I_anti5'^{MO}* und *zfMHC5-II_anti5'^{MO}*
- Abb. 4.28** Auswirkungen der *zfMHC5-I_anti5'^{MO}* und *zfMHC5-II_anti5'^{MO}* - Injektionen auf die Expressionsdomäne von *cm1c2* im Herzen
- Abb. 4.29** Morphologische Defekte nach Injektion von *zfZfp365-I_anti5'^{MO}* und *zfZfp365-II_anti5'^{MO}*

- Abb. 4.30** Auswirkungen der zfZfp365-I_anti5^{'MO} und zfZfp365-II_anti5^{'MO} - Injektionen auf die Expressionsdomäne von *cmlc2* im Herzen
- Abb. 4.31** Morphologische Defekte nach Injektion von zfZfp533-I_anti5^{'MO} und zfZfp533-II_anti5^{'MO}
- Abb. 4.32** Morphologische Defekte nach Injektion von zfZfp533-I_anti5^{'MO} und zfZfp533-II_anti5^{'MO}
- Abb. 4.33** Morphologische Defekte nach Injektion von zfZfp533-I_anti5^{'MO} und zfZfp533-II_anti5^{'MO}
- Abb. 4.34** Auswirkungen auf Blutkreislauf nach Injektion von zfZfp533-I_anti5^{'MO} und zfZfp533-II_anti5^{'MO}
- Abb. 4.35** Diaminofluorenfärbung zur Markierung von Erythrozyten
- Abb. 4.36** Halbquantitative (RT) PCR zur Ermittlung des Expressionsmusters der Kandidatengene in undifferenzierten ES-Zellen und differenzierten EBs
- Abb. 4.37** Halbquantitative (RT) PCR zur Kontrolle des Transkriptgehalts der Gene in den jeweiligen *knockdown*-Klonen
- Abb. 4.38** Generierung stabiler *knockdown*-Klone
- Abb. 4.39** Übersicht über eine semiquantitative (RT) PCR-Analyse der *knockdown*-Klone mit spezifischen Markern
- Abb. 4.40** Übersicht über eine quantitative RT PCR-Analyse der *knockdown*-Klone mit spezifischen Markern
- Abb. 4.41** Immunohistochemische Färbung mit Antikörpern gegen α MHC und Myocardin
- Abb. 4.42** Immunohistochemische Färbung mit Antikörpern gegen VEGF
- Abb. 4.43** Hauptkomponentenanalyse (principal component analysis (PCA))
- Abb. 4.44** *Heatmap* der hierarchischen Clusteranalyse

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 Verwendete Oligonukleotide

Tabelle 2.2 Verwendete Morpholino modifizierte antisense Oligonukleotide (^{MO})

Tabelle 2.3 Verwendete shRNA Konstrukte in pGFP-V-RS Vektor

Tabelle 3.1 Dauer Proteinase-K-Behandlung

Tabelle 3.2 Komponenten für Injektionslösungen

Tabelle 3.3 PCR-Profil zur DNA Amplifikation

Tabelle 3.4 PCR-Profil für DNA Sequenzierung

Tabelle 3.5 PCR-Profil für quantitative RT PCR

Tabelle 4.1 Resultat der Datenbankrecherche nach Homologen Zebrafischgenen

Tabelle 4.2 Übersicht über die Injektionen mit zfM07-I_anti5'^{MO} und zfM07-II_anti5'^{MO} und dazugehörige Kontrollen

Tabelle 4.3 Übersicht über die Injektionen mit zfJ20-I_anti5'^{MO} und zfJ20-II_anti5'^{MO} und dazugehörige Kontrollen

Tabelle 4.4 Übersicht über die Injektionen mit zfMHC5-I_anti5'^{MO} und zfMHC5-II_anti5'^{MO} und dazugehörige Kontrollen

Tabelle 4.5 Übersicht über die Injektionen mit zfDdit4I-I_anti5'^{MO} und zfDdit4I-II_anti5'^{MO} und dazugehörige Kontrollen

Tabelle 4.6 Übersicht über die Injektionen mit zfZfp365-I_anti5'^{MO} und zfZfp365-II_anti5'^{MO} und dazugehörige Kontrollen

Tabelle 4.7 Übersicht über die Injektionen mit zfZfp533-I_anti5'^{MO} und zfZfp533-II_anti5'^{MO} und dazugehörige Kontrollen

Tabelle 4.8 Anzahl der aus knockdown-Klonen generierten EBs mit schlagenden Arealen

Tabelle 4.9 Übersicht über einige in *knockdown* A130092J06Rik hochregulierte Gene

Tabelle 4.10 Übersicht über einige in *knockdown* A130092J06Rik herunterregulierte Gene

Tabelle 4.11 Übersicht über einige in *knockdown* A130092J06Rik herunterregulierte kardiale Marker

Tabelle 4.12 Übersicht über einige in *knockdown* Zfp533 hochregulierte Gene

Tabelle 4.13 Übersicht über einige in *knockdown* Zfp533 herunterregulierte Gene

Tabelle 4.14 Übersicht über einige in *knockdown* Zfp533 herunterregulierte Hämatoipoese betreffende und vaskuläre Marker

1. Einleitung

Herz-Kreislauferkrankungen sind eine der häufigsten Todesursachen. Laut der „European cardiovascular disease statistics 2008“, veröffentlicht durch das European Heart Network im Februar 2008 (<http://www.heartstats.org/datapage.asp?id=7683>), sterben jährlich 4,3 Millionen Menschen in Europa an ihren Folgen. Dies ist beinahe die Hälfte aller Todesfälle in Europa (48%).

Eine der weit verbreitetsten Herz-Kreislauferkrankungen ist ein durch den Verlust von funktionalen Kardiomyozyten hervorgerufener Herzfehler, auch Kardiomyopathie genannt.

Daher ist es ein erster Schritt, in Hinblick auf zukünftige Therapiemöglichkeiten, das genetische Netzwerk zu verstehen, das zu funktionalen Kardiomyozyten führt.

1.1 Herzentwicklung Wirbeltier (Vertebrata)

Während der Embryogenese entstehen aus den drei Keimblättern (Meso-, Endo- und Ektoderm) die Organe (Abb. 1.1).

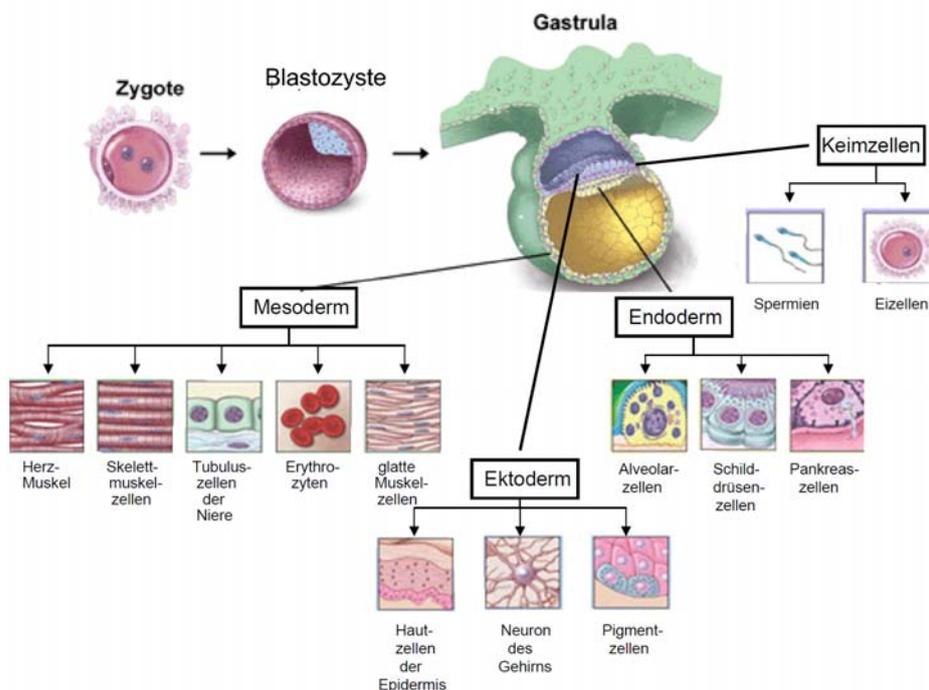


Abb.1.1: Entwicklung der drei Keimblätter während der humanen Embryogenese und der ES-Zellentwicklung (Abbildung modifiziert nach NIH, National Institute of Health, 2001)

Das Herz ist das erste funktionierende Organ des Vertebratenembryos, das während der Organogenese gebildet wird. Viele Fragen hinsichtlich beteiligter Gene und molekularer Signalwege bleiben derzeit noch offen.

Der Zebrafisch (*Danio rerio*) bietet in diesem Zusammenhang eine gute Möglichkeit die Herzentwicklung im Embryo *in vivo* zu untersuchen.

Als Modellorganismus bietet der Zebrafisch im Vergleich zu vielen anderen Tierarten durch seine Eigenschaften folgende Vorteile:

- Das Fischherz ist der Prototyp des Vertebratenherzens. Der Herzbildungsprozess im Fisch ist vergleichbar mit dem anderer Vertebraten.

Bereits zwei Tage nach der Befruchtung ist das kardiovaskuläre System des Zebrafisches fast vollständig ausgebildet.

- Das Genom des Zebrafisch ist nahezu vollständig sequenziert.
- Die Embryonen entwickeln sich vollständig außerhalb der Mutter. Sie sind optisch durchsichtig, entwickeln sich schnell und sind von geringer Größe. Die Haltung nimmt wenig Platz in Anspruch. Die Fische sind in 12-16 Wochen geschlechtsreif und jedes Weibchen kann bei idealen Bedingungen wöchentlich 100-200 Eier ablaichen (Metscher et al., 1999).
- Zusätzlich zu diesen Eigenschaften bietet der Zebrafisch den großen Vorteil, dass er aufgrund seiner Größe nicht vollständig von einem funktionsfähigen kardiovaskulären System abhängig ist. Selbst wenn die Blutzirkulation komplett fehlt, können Zebrafischembryonen durch passive Diffusion des Sauerstoffs überleben und sich für einige Tage normal weiterentwickeln (Chen, 1996). Dies macht sie zu einem hervorragenden Organismus zur Analyse selbst schwerer kardiovaskulärer Defekte.
- Der Zebrafisch ist für genetische Modifikationen gut zugänglich. Hierzu stehen technische Möglichkeiten, wie RNA-Überexpression, Morpholino basierter antisense Gen-*Knockdown* oder die Erzeugung transgener Zebrafischlinien zu Verfügung.

Das embryonale Herz ist ein kontrahierendes Blutgefäß mit einer äußeren Muskelschicht (Myokard) und einer inneren Endothelschicht (Endokard). Myokard-

und Endokardzellen entstammen beide aus bilateralen mesodermalen Zellpopulationen nahe der Hinterhirn- (Medulla oblongata) Region. Kurz bevor die Zirkulation einsetzt, wandern diese Zellen median ventral zur Mittellinie und bilden einen linearen Herzschauch. Dieser einfache Schlauch unterliegt komplexen morphogenetischen Schritten, die zu einem Organ mit Kammern und Klappen führen, das den Blutfluss reguliert (Stainer, 2002). Der Herzschauch selbst besteht aus drei Schichten: Epikard, Myokard und Endokard. Die äußerste Schicht und Grenze zur Perikardhöhle ist das Epikard, gefolgt vom Myokard. Zusammen bilden sie das Myoepikard. Der Abstand vom Myokardmantel zum Endokardschauch wird von der Herzgallerte ausgefüllt. Das Herzlumen wird von den Endokardzellen ausgekleidet.

Bereits im anterioren lateralen Plattenmesoderm, dem Ursprungsort der Herzvorläuferzellen, ist festgelegt, welche künftige Position jeder einzelnen Zelle zugewiesen ist. Dies kann durch spezifische Genexpressionsmuster verfolgt werden.

Die Kardiogenese erfolgt über eine komplexe Serie von Schritten:

1. Determinierung von Mesoderm- und Neuralleistenzellen für die Herzbildung,
2. Wachstums- und Differenzierungsvorgänge zu Kardiomyozyten und
3. Wanderungs- und Umformungsvorgänge zur Bildung des Herzens.

(<http://www.embryology.ch/allemand/pcardio/herzentwick01.html>)

Ein wichtiger Schritt während der Morphogenese ist die Entwicklung vom Schlauch zur Schleife, das sogenannte „*looping*“ des Herzens. Durch diese Drehung wird, wie auch bei der Entwicklung höherer Vertebraten, die endgültige Position der Kammern festgelegt. Zeitgleich reifen die sporadisch kontraktile Kardiomyozyten zu speziellen Kardiomyozyten von Atrium und Ventrikel heran, bilden ein spezialisiertes Erregungsleitungssystem aus und beginnen zu proliferieren. *Myosin Heavy Chain* (MHC) Expression skizziert die Herzkammern, was mit dem beginnenden Herzschlag übereinstimmt, aber einer offensichtlichen Kammerbildung vorangeht (Stainier and Fishman, 1992; Weinstein, 1996).

Das endgültig gebildete Herz besteht aus Sinus venosus, Atrium, Ventrikel und Bulbus arteriosus. Der Bulbus arteriosus geht später in die ventrale Aorta über.

Der Sinus venosus ist der Schrittmacher und kontrahiert als erstes. Eine Welle von Muskelkontraktionen pflanzt sich dann bis zum Ventrikel fort. Damit der Vorwärtsfluss des Blutes aufrechterhalten wird, entspannt sich das Atrium nicht bevor der Ventrikel kontrahiert.

Die Herzklappen bilden sich an den Grenzen der Kammern, um einen Rückfluss zu verhindern. Als Reaktion auf ein Myokardsignal nehmen Endokardzellen an den Grenzen der Kammer einen mesenchymalen Charakter an und wandern in die Herzgallerte, die extrazelluläre Matrix zwischen Myokard und Endokard. Dort formen sie einen Endokardzellhaufen. Dieser Vorgang wird als endokardiale Kissenbildung bezeichnet. Bei einem als „*remodelling*“ bezeichneten Prozess werden aus den Kissen später Klappen gebildet (Eisenberg et al., 1995; Nakajima et al., 2000). Die embryonale Herzentwicklung verläuft bis zu diesem Zeitpunkt bei allen Vertebraten gleich, allerdings ist die eigentliche Herzentwicklung im Fisch nun abgeschlossen. Es folgt nur noch eine Vergrößerung durch Zellteilung. Höhere Vertebraten entwickeln ihr Kreislaufsystem weiter.

Zeitlich gesehen nehmen diese Vorgänge die ersten zwei Tage im Leben eines Zebrafischembryos, die ersten 12 Tage im Leben eines Mausembryos und die ersten 35 Tage im Leben eines menschlichen Embryos in Anspruch (Stainier, 2002).

1.2 Embryonale Stammzellen

Zur Untersuchung der zur Herzentwicklung gehörenden Differenzierungsvorgänge eines zellulären Systems unter künstlichen Bedingungen (*in vitro*) eignen sich embryonale Stammzellen (ES-Zellen) der Maus (*Mus musculus*) hervorragend. Die Forschung an embryonalen Stammzellen ist in den letzten Jahren für den Bereich der Grundlagenforschung und der regenerativen Medizin immer interessanter geworden.

ES-Zellen zeichnen sich durch zwei Eigenschaften aus:

- Ihrer Pluripotenz, also ihrer Fähigkeit noch in die Zellen aller drei Keimblätter differenzieren zu können.
- Ihrer Fähigkeit sich selbst zu erneuern, indem durch mitotische Zellteilung zwei identische Tochterzellen entstehen.

Erstmals beschrieben wurde die Isolierung und Vermehrung von pluripotenten embryonalen Stammzellen aus der inneren Zellmasse (engl. „inner cell mass“, ICM) von Embryonen im Blastozystenstadium 1981 (Evans und Kaufman, 1981; Martin, 1981). Es konnte gezeigt werden, dass sich so gewonnene murine embryonale Stammzellen nach Injektion in frühe Mausembryonen an der Bildung aller Zelltypen des adulten Tieres inklusive der der Keimbahn beteiligen, womit ein Rückschluss auf ihre Pluripotenz gezogen werden konnte (Bradley et al., 1984). Durch die Fähigkeit der Selbsterneuerung können ES-Zellen unter speziellen Kulturbedingungen nahezu unbegrenzt im undifferenzierten Stadium gehalten und vermehrt werden (Gough et al., 1989; Pease et al., 1990; Matsui et al., 1992; Furue et al., 2005).

In Abwesenheit vom Leukämie inhibierenden Faktor (LIF), einem Differenzierungshemmenden Protein, konnte *in vitro* gezeigt werden, dass es zu einer spontanen Differenzierung der ES-Zellen in Zellen aller drei Keimblätter und der Keimzellen kam (Keller, 1995; Rodaway, 2001; Sachinidis et al., 2003; Trounson, 2002; Toyooka, 2003). Bei der Differenzierung von ES-Zellen entstehen multizelluläre Aggregate (sog. Embryonalkörperchen, engl. „embryoid bodies“), durch deren Kultivierung die Entwicklung von frühen Kardiomyoblasten zu differenzierten Kardiomyozyten nachgewiesen werden konnte (Maltsev et al., 1994). Die Bildung von Kardiomyozyten, sowohl *in vivo* durch die Mesoderminduktion als auch *in vitro* durch ES-Zell-Differenzierung, erfordert eine Aktivierung der gleichen Signaltransduktionswege (Abb.1.2). Die entwicklungsbiologischen Prozesse bezüglich der kardialen Induktion und der Herzbildung sind zwischen den verschiedenen Spezies stark konserviert (Tonissen et al., 1994).

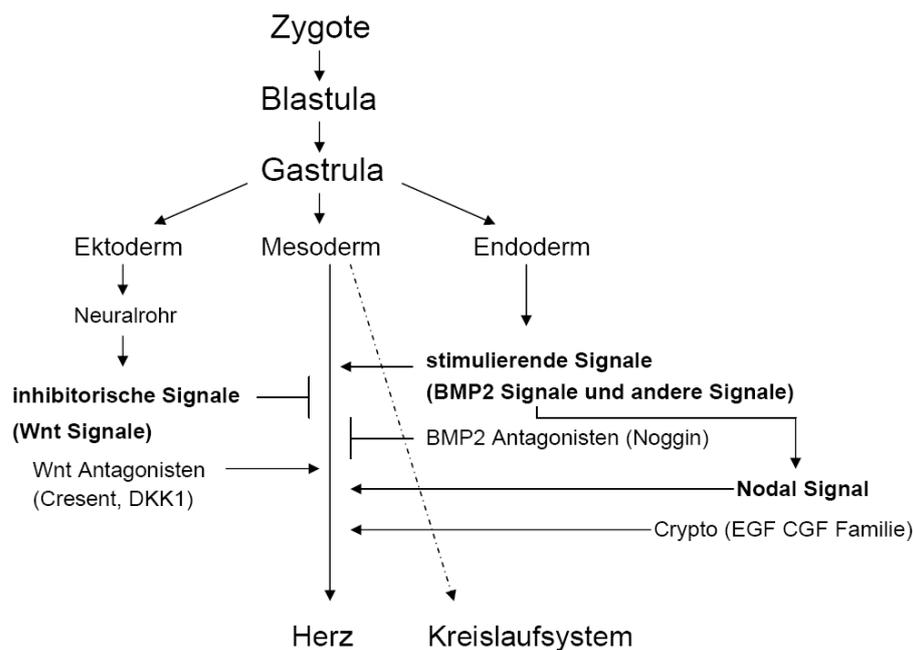


Abb.1.2: Regulation der Herzentwicklung aus dem Mesoderm durch verschiedene Signaltransduktionswege (Abbildung modifiziert nach Sachinidis et al., 2003)

Aus ES-Zellen hervorgegangene Kardiomyozyten bestehen aus Vorläuferpopulationen, die imstande sind multiple kardiale Linien hervorzubringen. Dies legt nahe, dass ES-Zell-Differenzierung ein stichhaltiges Modell ist, um die Entwicklung von verschiedenen Herzgeweben zu erforschen (Cristoforou et al., 2008).

Um den Regulationsmechanismus zu steuern, der zur kardialen Differenzierung und somit zur Entwicklung von verschiedenen Herzgeweben führt, ist es unabdingbar, dass zu gezielten Zeitpunkten in der Embryonalentwicklung und bestimmten Orten im Embryo Botenstoffe, wie z.B. Transkriptionsfaktoren, in einer bestimmten Menge exprimiert werden.

Eine wichtige Rolle in der Initiierung des sequentiellen Prozesses der Kardiogenese spielen verschiedene Mitglieder der TGF- β -Superfamilie (Transforming growth factor) wie z.B. TGF- β -, Nodal und BMPs (Bone morphogenetic proteins) (van Wijk et al., 2007; Foley et al., 2004; Zaffran et al., 2002; Ladd, et al, 1998; Schlange et al., 2000). BMP-abhängige Signalwege wiederum aktivieren spezielle Transkriptionsfaktoren wie Nkx2.5, Gata4 und Mef2c, die ihrerseits dann wiederum herzspezifische Gene wie α -MHC und MLC2v aktivieren (Lev et al., 2005).

Viele Fragen hinsichtlich beteiligter Gene und molekularer Signalwege bleiben derzeit aber noch offen. Daher ist eine Untersuchung neuer Transkripte und ihre Rolle für die Kardiogenese von großem Interesse.

1.3 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Eine der häufigsten vorkommenden kardiovaskulären Erkrankungen ist ein durch Verlust von funktionellen Kardiomyozyten auftretender Herzfehler (Kardiomyopathie). Voraussetzung für eine zukünftige Behandlungsmöglichkeit dieser Erkrankung mittels Zelltransplantationstherapie ist die Aufklärung der Kardiomyozytenentwicklung aus embryonalen Stammzellen.

Im Rahmen einer früheren Dissertation im Institut für Neurophysiologie wurde eine Überexpression von bestimmten Genen unbekannter Funktion in Kardiomyozyten, die aus Maus ES-Zellen abgeleitet waren, nachgewiesen (Doss et al., 2007a+b).

Die Hauptzielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, die Funktion sechs dieser Gene für die Entwicklung von intakten Kardiomyozyten mittels *functional genomics knockdown*-Methoden *in vivo* (Zebrafischmodell) und *in vitro* (ES-Zell-Modell) zu ermitteln. Mit Hilfe von *in situ* Hybridisierung im Zebrafisch sollte geklärt werden, ob diese sechs Gene im Herzgewebe und anderen Organen exprimiert werden. Ein *knockdown* der Gene mit Morpholino-modifizierten Oligonukleotiden im Zebrafisch sollte zeigen, welche Funktion den Genen für die Entwicklung und Funktion des kardiovaskulären Systems zukommt. Darüber hinaus sollte untersucht werden, welche Auswirkungen ein *knockdown* dieser Gene mittels einer stabilen shRNA Vektortransfektion auf das Differenzierungspotential von murinen ES-Zellen insbesondere zu Kardiomyozyten hat.

2. Material

2.1 Verwendete Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen, die nicht separat aufgelistet sind, wurden nach Sambrook et al. (1989) hergestellt.

Puffer und Lösungen, die Bestandteile von Fertigkits sind, werden ihrer Zusammensetzung nach nicht extra aufgeführt.

Die nachfolgend aufgeführten wässrigen Lösungen wurden mit doppelt deionisiertem Wasser angesetzt und anschließend - wenn nicht anders erwähnt - autoklaviert. Die Lagerung erfolgte, sofern nicht anders beschrieben, bei Raumtemperatur oder nach Herstellerangaben. Alle verwendeten Chemikalien und Fertiglösungen entsprachen mindestens der Reinheitsstufe „pro analysis“.

2.2 Verwendete Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion bezogen. Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden in einem entsprechenden Volumen H₂O gelöst, um eine Stammlösung von 100 µM zu erhalten.

Eine Übersicht der benutzten Oligonukleotide (Arbeitskonzentration 15 µM) befindet sich in Tabelle 2.1. Einige Oligonukleotide wurden um die T3 und T7-Promotersequenz verlängert. Diese Promotersequenzen dienen zum direkten Einsatz der PCR-Fragmente für eine *in vitro* Transkription. Die T3 bzw. T7-Sequenzen sind in Tab. 2.1 kursiv dargestellt.

Bereiche, in denen die Oligonukleotide zur leichteren Klonierung eines PCR-Produktes um Restriktionsschnittstellen verlängert wurden, sind grau unterlegt.

Tabelle 2.1: Verwendete Oligonukleotide. T7- bzw. T3-Promotersequenz sind kursiv dargestellt und Restriktionsschnittstellen grau unterlegt.
fwd=forward, rev=reverse

Zebrafisch		
Oligonukleotide zur Generierung von PCR-Produkten für die <i>in vitro</i> Transkription		
Gen	Name	Sequenz von 5' nach 3'
4930506M07Rik	zfM07_fwd	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGT CTT GAA GAG CAG
4930506M07Rik	zfM07_rev	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGT CAG ATC CAC AAC
9530057J20Rik	zfJ20_fwd	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA TTT CTC TAC ACA

9530057J20Rik	zfJ20_rev	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC AGA GAT CTG TTT
A130092J06Rik	zfMHC5_fwd	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA GCT TCC AGA CCT
A130092J06Rik	zfMHC5_rev	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC GCC ACA TCA GCA
Ddit4I	zfDdit4I_fwd	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGG CCT GTG GCC TAA
Ddit4I	zfDdit4I_rev	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC ACA AGA ACT GAA
Zfp365	zfZfp365_fwd	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA ATG ATG AGG ACA
Zfp365	zfZfp365_rev	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CCA GCT GTC GTA
Zfp533	zfZfp533_rev	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGT CCA AAC TCA AAG
Zfp533	zfZfp533_rev	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGT CGA ATG GGT CCG
vmhc	vmhc_rev	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC CCA CAT CAC
vmhc	vmhc_fwd	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA GGA AAG AGC
amhc	amhc_rev	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGT TTC TTT CAA
amhc	amhc_fwd	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGC GAG ATA TGA
cmlc2	cmlc2_rev	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC AGC AGT TAC
cmlc2	cmlc2_fwd	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA TGG AGT TAT
Oligonukleotide zur Generierung von 5'UTR-Fragmenten		
4930506M07Rik	zfM07_5'UTR_fwd	ATG ACA CTA CTG TCC ACA TG
4930506M07Rik	zfM07_5'UTR_rev	CTA TAA AGA GCG AGA GCA CT
9530057J20Rik	zfJ20_5'UTR_fwd	CTA TGG AGG GTC TTT GTG AG
9530057J20Rik	zfJ20_5'UTR_rev	GGC GGT TTT TCG TTT GAT GT
A130092J06Rik	zfMHC5_5'UTR_fwd	TGG CCA TGC CTT GTC TAG TG
A130092J06Rik	zfMHC5_5'UTR_rev	CGC GGC CAC AAG AAC ATC AA
Ddit4I	zfDdit4I_5'UTR_fwd	CGG ATC CGA CGA GTG TTT TG
Ddit4I	zfDdit4I_5'UTR_rev	GTT CAT TCG ATA TCA AGC CG
Zfp365	zfZfp365_5'UTR_fwd	GCC TTG TCT TGC TTT GCC TA
Zfp365	zfZfp365_5'UTR_rev	ACA GAC CAC CTG TCA ACA AC
Zfp533	zfZfp533_5'UTR_rev	
Zfp533	zfZfp533_5'UTR_rev	AGT TGA CAG CCA CTT TGC AC
Oligonukleotide zur Generierung von Klonierungsprodukten		
4930506M07Rik	M07_UTRklonfwd	TCG ATC GAT CCA CCA ACA ACT GGG GTT AT
4930506M07Rik	M07_UTRklonrev	TAT CCA TGG GCT ATA AAG AGC GAG AGC AC
9530057J20Rik	J20_UTRklonfwd	CGCG ATC GAT CAG TTT TGA AAT GAT CTA AA
9530057J20Rik	J20_UTRklonrev	ATAT CCA TGG CAT GGC GGT TTT TCG TTT GA
A130092J06Rik	MHC5_UTRklonfwd	GTA ATC GAT CCT TCA AAC CGC GTC TAG TC
A130092J06Rik	MHC5_UTRklonrev	AAT CCA TGG TGA CAA GGG ATG ACC CAT TC
Ddit4I	Ddit4I_UTRklonfwd	CAT ATC GAT GGA TCC GAC GAG TGT TTT GC
Ddit4I	Ddit4I_UTRklonrev	TTA CCA TGG TTG TTC AGT CGA TAT CAA GC
Zfp365	Zfp365_UTRklonfwd	GCGC ATC GAT AGT TTT ATT GTC TAG TTT AT
Zfp365	Zfp365_UTRklonrev	TTAT CCA TGG CCT GGC AAC ACA GAT GTT AG
Zfp533	Zfp533_UTRklonfwd	CGCG ATC GAT CAT CTG TCA GCT CCG CTT TA
Zfp533	Zfp533_UTRklonrev	ATAT CCA TGG GCA GCC AAC GGC TCT GTA CT
Maus		
Oligonukleotide zur Generierung von PCR-Produkten		
4930506M07Rik	M07_mesc_fwd	GTG TCC CCT AAC ACC TGA GC
4930506M07Rik	M07_mesc_rev	AGC CTG GTC TTT GGT TTG G
9530057J20Rik	J20_mesc_fwd	TGC ATC CAG GGG TAA CAT AA
9530057J20Rik	J20_mesc_rev	TGA TCC AGT GCT TTT TGC AC

A130092J06Rik	MHC5_mesc_fwd	AGC TGA GCA TCG AGG TGA AT
A130092J06Rik	MHC5_mesc_rev	CAC ATG AGG ACC TGT GCA TC
Ddit4l	Ddit4l_mesc_fwd	GCA CGT GAA CTT GGA GAT TG
Ddit4l	Ddit4l_mesc_rev	CTG AGG AGA AGC GAC CTC TG
Zfp365	Zfp365_mesc_fwd	TTC TGT TTG CAA CCA TCC TG
Zfp365	Zfp365_mesc_rev	CCT TTC TTG GCT GGT CTG AA
Zfp 533	Zfp533_mesc_fwd	CAA GCC GAA GGC ATA AAG AC
Zfp 533	Zfp533_mesc_rev	GGG GTG AAG ACA GGA ACG TA
GAPDH	GAPDH fwd	GGT GCT GAG TAT GTC GTG GA
GAPDH	GAPDH rev	CGG AGA TGA TGA CCC TTT TG
MEF-2c	MEF-2c fwd	TCA TCT CTG TCT GGC TTC AAC
MEF-2c	MEF-2c rev	GGT GGT GGT ACG GTC TCC
VEGF	VEGF fwd	TCC ACC ATG CCA AGT GGT
VEGF	VEGF rev	TCG GGG TAC TCC TGG AAG AT
Hspb8	Hspb8 fwd	TCA TTG GCT CAC CTC AGT GT
Hspb8	Hspb8 rev	CTT GGT GGT GAT GGT TTG AG
Fgf5	Fgf5 fwd	GCT GTG TCT CAG GGG ATT GT
Fgf5	Fgf5 rev	TCT TGG CTT TCC CTC TCT TG
Foxa2	Foxa2 fwd	ACA CGC CAA ACC TCC CTA CT
Foxa2	Foxa2 rev	GGC ACC TTG AGA AAG CAG TC
α Sma	α Sma fwd	CTA TTC AGG CTG TGC TGT CC
α Sma	α Sma rev	CCA AGT CCA GAC GCA TGA T
TnnC	TnnC fwd	CAG CAA AGG GAA GTC TGA GG
TnnC	TnnC rev	CGT AAT GGT CTC ACC TGT GG
Tbx20	Tbx20 fwd	ATC GCC GCG CTT ATG TCC AG
Tbx20	Tbx20 rev	CCC CGC CGC CAA ACT CC
α MHC	α MHC fwd	GCT GGG CTC CCT GGA CAT TGA
α MHC	α MHC rev	CCT GGG CCT GGA TTC TGG TGA T
Myocardin	Myocardin fwd	AGT GGG CCC AGC ATT TTC AAC ATC
Myocardin	Myocardin rev	CCC TCC CCA TTT TCC CCA CTT C
TTR	TTR fwd	CTT CCC TTC GAC TCT TCC TC
TTR	TTR rev	CTG TGA AAA CCA CAT CCG CG
a-c-actin	a-c-actin fwd	AGC CCA GAG CAA GCG ACG TAT
a-c-actin	a-c-actin rev	AGT CAG TGA GGT CCC GAC CAG
Nodal	Nodal fwd	GGC GCA AGA TGT GGA CGT GAC
Nodal	Nodal rev	ACA TTG TGG TGG CGA CAG GT
Pax6	PAX6_F	AGT GAA TGG GCG GAG TTA TG
Pax6	PAX6_R	TGA GAC ATG TCA GGT TCA CTC C
Sema3A	SEMA3A_F	TTG GCA ATT TCA GAG GAG AAA
Sema3A	SEMA3A_R	CAT GAA TCC GTG TTC CAC AG
Neurod1	NEUROD1_F	AGG TTT GTC CCA GCC CAC TA
Neurod1	NEUROD1_R	GGG GAC TGG TAG GAG TAG GG
AFP	AFP_F	TCT TCC ACA AGG ATC TGT GC
AFP	AFP_R	TGC AGC ACT TCT CCA AAA GG
DCN	DCN_F	GAG GGA ACT CCA CTT GGA CA
DCN	DCN_R	CTC ACA GCC GAG TAG GAA GC
Flt1	FLT1_F	CGG TTC ACC TGG ACT GAG AC
Flt1	FLT1_R	TCA GAT TCA TCG TCC TGC AC

Tbra	BRACHYURY_T_F	ACT GGT CTA GCC TCG GAG TG
Tbra	BRACHYURY_T_R	GAG CCT CGA AAG AAC TGA GC
MYF5	MYF5_F	CTG TCT GGT CCC GAA AGA AC
MYF5	MYF5_R	TGG AGA GAG GGA AGC TGT GT
DES	DES_F	CAG GAC CTG CTC AAT GTG AA
DES	DES_R	TGG ACT TCA GAA CCC CTT TG
BMP2	BMP2_F	AGA CCA CCG GCT GGA GAG
BMP2	BMP2_R	GTT CCC GGA AGA TCT GGA GT
Gata4	GATA4_F	TCT CAC TAT GGG CAC AGC AG
Gata4	GATA4_R	AAG AGT CCT GCT TGG AGC TG
Hand1	HAND1_F	CAA GGA TGC ACA AGC AGG T
Hand1	HAND1_R	GCG CCC TTT AAT CCT CTT CT
cTnT	cTnT fwd	GCA CAG TGG ACT TCG ATG AG
cTnT	cTnT rev	TGC AGC ATC ATC TTC AGC TC
Flk1	Flk1 fwd	TAG GTG CCT CCC CAT ACC CTGG
Flk1	Flk1 rev	TGG CCG GCT CTT TCG CTT ACTG
Gata1	Gata1 fwd	TTG GAC ACC TTG AAG ACGG
Gata1	Gata1 rev	GCA TAA GAT GGC TGA CAG GC

2.3 Morpholino-modifizierte antisense Oligonukleotide

Die in Tabelle 2.2 aufgelisteten und verwendeten Morpholino-modifizierten antisense Oligonukleotide wurden von der Firma Gene Tools synthetisiert und geliefert.

Tabelle 2.2: Verwendete Morpholino-modifizierte antisense Oligonukleotide (^{MO})

Gen	Name	Sequenz von 5' nach 3'
4930506M07Rik	zfM07-I_anti5' ^{MO}	ACCACCAATGACTTGCACACGAACT
	zfM07-II_anti5' ^{MO}	GCATCACTAGACAAATGACTAAGTA
9530057J20Rik	zfJ20-I_anti5' ^{MO}	CGTTTTGATGTTTTGAGCAAGCTGAA
	zfJ20-II_anti5' ^{MO}	CACAAAGCCATATGCAACATTTAAG
A130092J06Rik	zfMHC5-I_anti5' ^{MO}	GTACACTAGACAAGGGATAACCCTT
	zfMHC5-II_anti5' ^{MO}	GGCTGACACTCAGAATAACGCAGAC
Ddit4l	zfDdit4l-I_anti5' ^{MO}	GGCAGCTGCTGGAGTCTGCAGAGAT
	zfDdit4l-II_anti5' ^{MO}	CGTGTGTATCCTCAAGTCTGATGGC
Zfp365	zfZfp365-I_anti5' ^{MO}	CACAAGTGTAGTTGATCCAAAGTGC
	zfZfp365-II_anti5' ^{MO}	TTTCATAGGCAAAGCAAGACAAGGC
Zfp533	zfZfp533-I_anti5' ^{MO}	TTTGGTCAGAGCAGCTGGCAGTGAC
	zfZfp533-II_anti5' ^{MO}	TTGTAGTGCGCCTCGGCTTGGCTAT
	Random Seq. MO	CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA

2.4 Verwendete shRNA Konstrukte in pGFP-V-RS Vektor

Die verwendeten shRNA Konstrukte gegen das jeweilige Kandidatengen in pGFP-V-RS Vektor wurden von der Firma OriGene bezogen (Tab. 2.3).

Tabelle 2.3: Verwendete shRNA Konstrukte in pGFP-V-RS Vektor

Gen	Pasmid	Katalognummer
4930506M07Rik	Hush 29mer shRNA GFP Klonierungsvektor (pGFP-V-RS) Gen ID=71653	TG504574
A130092J06Rik	Hush 29mer shRNA GFP Klonierungsvektor (pGFP-V-RS) Gen ID=241303	TG513112
Zfp365	Hush 29mer shRNA GFP Klonierungsvektor (pGFP-V-RS) Gen ID=216049	TG506468
Zfp533	Hush 29mer shRNA GFP Klonierungsvektor (pGFP-V-RS) Gen ID=154313	TG314297
Kontrolle	Negativ Kontroll shRNA GFP Klonierungsvektor (pGFP-V-RS)	TR30007
Kontrolle	Wirkungslose negativ Kontroll shRNA Kasette in GFP Klonierungsvektor (pGFP-V-RS)	TR30013

2.5 Software

Acrobat Reader 7.0 (*Adobe*)

AxioVision 2.0.5.3 (*Zeiss*)

BioEdit 7.0.5.2 (*Tom Hall, Department of Microbiology, North Carolina State University*)

EditSeq 4.04, MapDraw 4.04, MegAlign 4.04 (*DNASTAR*)

Entrez (*National Center for Biotechnology Information = NCBI*)

Office 2003 (*Microsoft*)

Photoshop CS2 (*Adobe*)

Vector NTI Suite 8 (*Infor Max, Inc.*)

Windows XP Home Edition (*Microsoft*)

Des weiteren wurden die Dienste von PubMed (*NCBI*), BLAST (Altschul et al., 1997), der Zebrafisch Datenbank ZFIN (www.zfin.org) (Sprague et al., 2001) sowie

der Datenbanken Gene-Hub-GEPIS (Zhang et al., 2007) und bioGPS (<http://biogps.gnf.org>) (Wu et al., 2009) in Anspruch genommen.

3. Methoden

3.1 Zebrafischmethoden

3.1.1 Haltung Zebrafisch und Gewinnung von Embryonen

3.1.1.1 Beschreibung und Herkunft

Der Zebrafisch *Danio rerio* ist ein den Zuflüssen des Ganges in Bengalen (Indien und Bangladesch) und Pakistan entstammender tropischer Süßwasserfisch, der im adulten Zustand eine durchschnittliche Körpergröße von drei bis vier Zentimetern erreicht und zur Familie der *Cyprinidae* (Karpfenfische) gehört. Die für diese Arbeit verwendeten Zebrafische wurden in Kölner Tierhandlungen bezogen. Zudem gab es drei transgene Linien, *cmlc2::gfp*, *fli::EGFP* und *Gata1:DsRed*, die für diese Arbeit benutzt wurden. Die Erlaubnis mit der *cmlc2::gfp* Linie arbeiten zu dürfen, erhielten wir vom Hersteller dieser Linie, Geoff Burns (Burns et al., 2005). Die *fli::EGFP* Linie kann öffentlich vom Oregon Resource Center bezogen werden. Beide transgene Linien erhielten wir mit freundlicher Unterstützung von Dr. Rauch von der Universität Heidelberg. *Gata1:DsRed* transgene Fische, die ursprünglich wie zuvor beschrieben im Labor von Dr. Leonard Zon, Children's Hospital Boston und Howard Hughes Medical Institute, generiert wurden (Traver et al., 2003), erhielten wir mit freundlicher Unterstützung von Jean-Pierre Levraud. Die erhaltenen Zebrafische dienten als Elterntiere für Nachzuchten.

3.1.1.2 Haltung

Ab dem 4. Lebenstag wurden die Zebrafische in einer Zebrafisch-Aquarienanlage, bestehend aus mehreren seriellen Einheiten, bei einer Wassertemperatur zwischen 26 und 28°C gehalten (Mullins et al., 1994). Die Anlage wurde kontinuierlich mit Frischwasser versorgt, wobei täglich 1/10 des Flüssigkeitsvolumens durch Frischwasser ersetzt wurde. Dazu wurde Leitungswasser 1:1 mit deionisiertem Wasser gemischt. Innerhalb der Aquarienanlage wurde das Wasser durch ein Pumpensystem in Zirkulation versetzt. Dabei wurden Schwebeteilchen durch integrierte Filtereinheiten aus dem Wasser herausgesiebt und das gefilterte Wasser anschließend durch UV-Bestrahlung sterilisiert. Der Akkumulation toxischer Substanzen (z.B. Nitrit) wurde

durch eine bakterielle Aufbereitung des Wassers entgegengewirkt. Die Fütterung der Fische erfolgte 3 mal täglich. Neben dem gängigen Trockenfutter (TetraMin) wurden Salinenkrebse und Bosmidien gefüttert, um eine ausgewogene Ernährung der Fische zu gewährleisten. Der Hell-Dunkel Rhythmus wurde auf 14 Stunden Licht und 10 Stunden Dunkelheit eingestellt.

3.1.1.3 Gewinnung von Embryonen

Die Gewinnung der Embryonen für die verschiedenen Experimente erfolgte morgens mit Beginn der Lichtphase. Hierzu wurden am Abend vor dem gewünschten Ablichtermin Kreuzungen von jeweils einem Weibchen und zwei Männchen in dafür vorgesehene Plastikablaichboxen angesetzt. In diesen Boxen konnten Weibchen und Männchen durch eine Trennscheibe voneinander getrennt gehalten werden. Direkt zu Beginn der Hellphase erfolgte die Eiablage, wobei durch gezieltes Entfernen der Trennscheiben in einem gewissen Zeitfenster der Zeitpunkt des Ablachens beeinflusst werden konnte. Zwanzig bis dreißig Minuten nach dem Ziehen der Trennscheibe konnten die Embryonen, die durch ein Gitter auf den Boden der Ablaichbox fielen und somit von den Elterntieren abgeschirmt waren (Zebrafische sind Laichräuber), abgesammelt werden. Überführt in Petrischalen wurden diese dann bis zum gewünschten Entwicklungsstadium bei 23 – 28 °C in Aquarienwasser gehalten.

3.1.1.4 Unterdrückung der Melanophorenbildung

Die Unterdrückung der Pigmentbildung diente zur erleichterten Beobachtung und Dokumentation der Zebrafische. Zu diesem Zweck wurden die Embryonen im 26 Somitenstadium (22 hpf) (nach Kimmel et al., 1995) nach der Befruchtung in 0,2 mM 1-phenyl-2-thiourea (PTU; Sigma) in Aquarienwasser überführt (Lawson et al., 2002).

PTU Lösung:

0,2 mM PTU (Stammlösung: 2mM in H₂O)

in Aquarienwasser

3.1.2 Dechorionisierung und Lagerung von Zebrafisch-Embryonen

3.1.2.1 Mechanische Dechorionisierung von Embryonen

Für die Durchführung der Experimente und zur besseren Dokumentation wurden mit Hilfe spitzer Uhrmacherpinzetten Embryonen, die noch nicht selbständig geschlüpft waren, vom Chorion befreit. Zur Betäubung der Fische wurden diese zunächst in „Tricaine“ (MS222, Sigma) überführt (siehe Westerfield, M. (2007) THE ZEBRAFISH BOOK, 5th Edition; A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*), Eugene, University of Oregon Press). Anschließend wurden die Embryonen in 4% Paraformaldehyd (PFA) in PBS (phosphate buffered saline) überführt und zwei Stunden bei Raumtemperatur (RT) oder über Nacht (ÜN) bei 4°C fixiert. So fixierte Embryonen konnten über mehrere Wochen stabil bei 4°C gelagert werden. Für Folgeexperimente wurden die Embryonen in 1xPBST (PBS + 0,1% Tween-20) überführt.

Lösungen:

20 x PBS:

2,76 M NaCl
50 mM KCl
160 mM Na₂HPO₄
50 mM KH₂PO₄

Tricaine:

(3-amino-benzoesäure-ethylester, MS222)
400 mg Tricaine
97,9 ml H₂O
2,1 ml Tris pH 9
pH7, Lagerung bei -20°C

3.1.3 *in situ* Hybridisierung mit Digoxigenin markierten RNA Sonden an ganzen Embryonen

Das Verfahren der *in situ* Hybridisierung dient zur Detektion der räumlichen Expression von RNA. Dabei ermöglichen Digoxigenin markierte antisense RNA-Sonden eine nicht radioaktive Technik (Tautz und Pfeifle, 1989).

Die fixierten Embryonen wurden mit Digoxigenin markierten antisense RNA-Sonden inkubiert. Die hybridisierten Sonden wurden immunochemisch, mittels alkalische Phosphatase (AP) gekoppelter anti-Digoxigenin F_{ab} Fragmente

nachgewiesen, wobei durch die enzymatische Umsetzung spezifischer Substrate farbige Präzipitate erzeugt wurden.

Die *in situ* Hybridisierung erfolgte nach dem in einigen Punkten modifizierten Protokoll von Schulte-Merker et al. (1992). Die Modifikation bestand bei jüngeren Embryonen in einem Austausch der Proteinase K-Behandlung nach dem Fixierungsschritt durch eine Hitzebehandlung. Des Weiteren wurden einige Lösungen in ihrer Zusammensetzung verändert. Für die automatisierte *in situ* Hybridisierung wurde der *InsituPro* Automat (Abimed) verwendet (Plickert et al., 1997).

3.1.3.1 Hitzebehandlung von Zebrafisch Embryonen (nach mündl. Mitteilung M. Gajewski)

Die Hitzebehandlung diente zur Denaturierung möglicher mit der mRNA assoziierten Ribosomen und anderer Proteine, um die mRNA somit zugänglich für die markierten antisense RNA-Sonden zu machen.

Hierzu wurden die in 1xPBST überführten Embryonen 10 Minuten in zuvor gekochtem Wasser inkubiert, das Zusammenkleben der Embryonen durch gelegentliches Invertieren unterbunden und anschließend 5 Minuten auf Eis abgekühlt, um eine Renaturierung der Proteine zu verhindern.

3.1.3.2 Proteinase K-Behandlung von Zebrafisch Embryonen

Die Proteinase K-Behandlung erleichtert den Zugang der mRNA für die markierte antisense RNA-Sonde. Insbesondere bei älteren Larven kam diese Behandlung zur Anwendung, da auf diese Weise erheblich intensivere Färbungen zustande kamen.

Die Embryonen wurden zunächst in 1xPBST überführt und dann, je nach Entwicklungsstadium, in einer Proteinase K-Lösung (10 µg/ml) (Stammlösung 10mg/ml) inkubiert.

Tabelle 3.1: Dauer Proteinase-K-Behandlung

Entwicklungsstadium	Dauer Proteinase-K-Behandlung
48 hpf	30 min
3dpf	40 min
5dpf	45 min

Nach der Inkubation mit Proteinase K wurden die Embryonen für 20 Minuten in 4% PFA fixiert und für Folgeexperimente 5 mal 5 Minuten mit 1xPBST gewaschen.

3.1.3.3 Behandlung mit Essigsäureanhydrid

Die Behandlung mit Essigsäureanhydrid führt zu einer Inhibition endogener Phosphatasen und reduziert eine unspezifische Hintergrundfärbung bei späterer Verwendung phosphatasegekoppelter Antikörper.

Die Embryonen wurden 2 mal 5 Minuten mit 150 µl PBST gewaschen. Dann wurden sie in 150 µl einer Lösung aus 2,5 µl Essigsäureanhydrid pro ml 0,1 M Triethanolamin (pH 7,8) überführt und 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Embryonen 4 mal 10 Minuten mit 150 µl PBST gewaschen.

3.1.3.4 Vorhybridisierung

Die Embryonen wurden 5 Minuten in Hybridisierungs-Lösung (Hybmix) inkubiert. Anschließend wurde der Hybmix erneuert und die Embryonen darin eine Stunde bei 65°C inkubiert.

3.1.3.5 Hybridisierung

Nun erfolgte eine Inkubation mit Sonde für 16 Stunden bei 65°C. Dazu wurde die antisense RNA-Sonde (~ 1 µl der Sonde) in ein kleines Volumen Hybmix aufgenommen (20-100 ng Sonde pro ml Hybmix).

3.1.3.6 Waschschrirte

Es erfolgten mehrere Waschschrirte bei 65°C, um die Sonde vollständig zu entfernen und somit auch unspezifische Wechselwirkungen zwischen Sonde und mRNA zu verhindern:

1. 30 Minuten Hybmix
2. 2 x 30 Minuten Lösung aus 50% Hybmix / 50% 2 x SSCT
3. 2 x 30 Minuten 0,2 x SSCT.

3.1.3.7 Antikörper Inkubation

Die Embryonen wurden 2 mal 10 Minuten mit PBST bei RT gewaschen, dann 10 Minuten in Block I-, und anschließend 60 Minuten mit Block II-Lösung bei RT inkubiert. Zur eigentlichen Antikörperinkubation wurde die Block II-Lösung durch 150 µl einer 1:2000 Verdünnung anti-Digoxigenin-AP F_{ab} Fragmente (Roche) in Block II-Lösung ersetzt und die Embryonen 4 Stunden bei RT inkubiert. Anschließend wurde 8 mal 15 Minuten bei RT mit PBST gewaschen.

3.1.3.8 Farbsubstratreaktion

Der für die alkalische Phosphatase benötigte pH-Wert wurde durch eine Inkubation der Embryonen für 10 Minuten in 500 µl AP-Puffer adaptiert. Die Farbreaktion erfolgte durch Überführung der Embryonen in 500 µl *BM-Purple*-Substrat (Roche). Die Inkubation erfolgte im Dunkeln. Die Dauer der Farbreaktion hing von der mRNA-Konzentration ab.

Nach gewünschter Farbtintensität wurde die Farbsubstratreaktion durch mehrmaliges Waschen mit PBST gestoppt. Eine endgültige Inaktivierung der alkalischen Phosphatase wurde durch Fixierung der Embryonen in 4% PFA in PBS erzielt.

3.1.3.9 Lösungen für die *in situ* Hybridisierung

20 x PBS

2,76 M NaCl
50 mM KCl
160 mM Na₂HPO₄
50 mM KH₂PO₄

1 x PBST

1 x PBS
0,1 % Tween-20

20 x SSC

3 M NaCl
0,3 M NaCitrat
pH 4,7

2 x SSCT

2 x SSC
0,1 % Tween-20

0,2 × SSCT

0,2 × SSC
0,1 % Tween-20

AP-Puffer

100 mM Tris pH 9,5
50 mM MgCl₂
100 mM NaCl
0,1 % Tween-20
5 mM Levamisol (aus 1M Stammlösung)

TEA/AA

0,1 M Triethanolamin pH 8
0,25% Essigsäureanhydrid
Lagerung bei 4°C

Block-Lösungen

Block I: 0,2 % BSA (Bovine Serum Albumine) in PBST
Block II: 0,2 % BSA / 5 % Schaf-Serum
(hitzeinaktiviert für 1h bei 56°C) in PBST

Hybmix

50 % Formamid (aus 100% Formamid Stammlösung)
5 × SSC (aus 20 x SSC Stammlösung)
1 % *Boehringer Block* (Roche)
1 mg/ml Hefe RNS (Roche) (aus 10mg/ml Stammlösung)
100 µg/ml Heparin (aus 10 mg/ml Stammlösung)
1 × Denhards (aus 100 x Denhards Stammlösung)
0,1 % Tween-20 (aus 10% Tween Stammlösung)
0,1 % Chaps (aus 10% Chaps Stammlösung)
5 mM EDTA (aus 0,5 M Stammlösung)
Lagerung bei -20°C

3.1.4 Analyse von Embryonen nach *in situ* Hybridisierung

Die gefärbten Embryonen wurden vollständig in 4 % Methylcellulose (Sigma) auf einen Hohlschliff Objektträger überführt und mit einer feinen Präpariernadel in eine geeignete Position gebracht. Mittels eines Stereomikroskops (*MZFLIII*; Leica) wurden die Embryonen anschließend analysiert und mit einer Digitalkamera (*DFC 480*, Leica) fotografiert.

Herstellung der 4% Methylcellulose-Lösung:

Es wurden 4 g Methylcellulose in 100 ml VE Wasser gegeben. Unter ständigem Rühren wurde das Pulver bei 4°C über Nacht gelöst. Im Anschluss wurde die hoch viskose Lösung für eine Stunde bei 6500 rpm zentrifugiert.

3.1.5 Injektion von Morpholino-modifizierten antisense Oligonukleotiden**3.1.5.1 Herstellung der Kapillaren**

Die für die Injektion benötigten Glaskapillaren mit Filament (Länge = 100mm, Außendurchmesser 0,1mm, Wandstärke = 0,21mm) (Hilgenberg) wurden mit Hilfe eines Sutter P9 Micropipette Puller (Sutter) gezogen (Parameter: erhitzen = 537, ziehen = 100, Geschwindigkeit = 100, Zeit = 150) und mit 1 – 1,5 µl der Morpholinoinjektionslösung rückseitig beladen.

3.1.5.2 Vorbereitung der Injektionslösung

Die im lyophilisiertem Zustand gelieferten Morpholino-modifizierten antisense Oligonukleotide (Gene Tools) wurden in H₂O gelöst, so dass die Konzentration der Stammlösung 3 mM betrug.

Aus dieser Stammlösung wurde dann die Injektionslösung hergestellt. Diese bestand aus H₂O, Phenolrot (Sigma) und KCl. Phenolrot wurde der Lösung zugesetzt, um das injizierte Volumen sichtbar zu machen und somit besser kontrollieren zu können. Die Injektionskonzentration der Morpholino-modifizierten Oligonukleotide betrug zwischen 0,6 und 1 mM.

Tabelle 3.2: Komponenten für Injektionslösungen

Komponente	Endkonzentration
Morpholino-modifizierte Oligonukleotide	0,6 – 1 mM
Phenolrot	0,2 % (Stammlösung: 2%)
KCl	0,1 M (Stammlösung: 1M)

3.1.5.3 Injektionen

Die Injektionen erfolgten mit Hilfe der Injektionsanlage Femtojet® (Eppendorf). Dazu wurde die Injektionslösung direkt in den Dotter unterhalb der Zelle(n) von Embryonen im Ein- bis Zweizellstadium injiziert. Das Injektionsvolumen betrug zwischen 5-10 nl.

Direkt im Anschluss an die Injektion wurden die Embryonen in Petrischalen mit Aquarienwasser überführt und konnten sich dort bis zur Auswertung bei 23°C entwickeln. Wie im Abschnitt 3.1.1.4 beschrieben, wurden die Embryonen im 26 Somitenstadium (22 hpf) zur Unterdrückung der Melanophorenbildung in eine 0,2 mM PTU-Lösung überführt.

Aus jedem Gelege wurden parallel zu den injizierten Embryonen nicht-injizierte Embryonen als Kontrollansatz bei gleichen Entwicklungsbedingungen gehalten.

3.1.6 Analyse von morphologischen Effekten

Lebende Embryonen wurden vom Aquarienwasser in 4%ige Methylcellulose (Sigma) überführt und auf einen Objektträger mit Hohlschliff gegeben. Die weitere Analyse erfolgte wie bei der Analyse von *in situ* Präparaten.

3.1.7 Analyse der Herzschlagrate

Zur Analyse des Herzschlags wurden die Zebrafische mittels Stereomikroskops beobachtet. Es wurde jeweils ein Morpholino-injiziertes Gelege und ein Wildtypgelege, die unter gleichen Bedingungen gehalten wurden, ausgezählt. Über eine Zeitspanne von einer Minute wurden die Kontraktionen des Herzens mit Hilfe einer Stoppuhr und eines Koloniezählers aus der Zellkultur gemessen. Aus den ermittelten Messergebnissen wurden das arithmetische Mittel und der dazugehörige Fehler bestimmt.

3.1.8 Diaminofluoren (DAF)- Färbung (modifiziert von Miwa et al., 1991)

Mit Hilfe der DAF-Färbung lassen sich Erythrozyten in fixierten Embryonen detektieren und visualisieren. Erythrozyten, die Hämoglobin synthetisiert haben, oxidieren mit Hilfe der Hämoglobin Peroxidase das Diaminofluoren, wodurch eine braune Färbung entsteht.

Für diese Färbung mussten die Embryonen mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur in 4% PFA fixiert worden sein. Anschließend wurde 3 mal mit PBST gewaschen.

Nun wurden die Embryonen für 1 Stunde bei Raumtemperatur in DAF-Färbelösung im Dunkeln inkubiert. Zu diesem Ansatz wurde dann 30%iges H₂O₂ hinzugefügt, bis eine Endkonzentration des H₂O₂ in der Lösung von 0,3% vorlag. Die Embryonen wurden weitere 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Embryonen erneut 3 mal mit PBST gewaschen und über Nacht bei 4°C in 4% PFA nachfixiert.

Für Folgeexperimente wurden die Embryonen wieder mit PBST gewaschen.

Lösungen:DAF-Färbelösung:

0,01% Diaminofluoren

200 mM Tris (pH 7,0)

0,05% Tween-20

3.1.9 Generierung von Kontroll-Konstrukten zur Überprüfung der Spezifität der Morpholino-modifizierten antisense Oligonukleotiden (MO)

mRNA und cDNA wurden wie in Kapitel 3.3.1.1 bzw. 3.3.2 beschrieben hergestellt. Die verwendeten Oligonukleotide zur Generierung von 5'UTR-Fragmenten sind in Tabelle 2.1 aufgeführt und wurden um die Restriktionsschnittstellen ClaI bzw. NcoI, je nach ihrer Orientierung, verlängert. Zur Herstellung der Kontroll-Konstrukte, die die 5'UTR des jeweiligen Gens inklusive Zielsequenz der beiden verwendeten Morpholino-modifizierten antisense Oligonukleotide vorgeschaltet vor einem GFP Reporter enthielten, wurden die 5'UTR-PCR-Fragmente und ein pCS2+ Vektor, der bereits eGFP enthielt, mit den Enzymen ClaI und NcoI (NEB) verdaut. Die Restriktion und Ligation wurden im Allgemeinen nach Sambrook und Russel (1989) durchgeführt. Für die DNA-Ligation wurde die ATP-abhängige T4 DNA-Ligase nach Angaben des Herstellers (Invitrogen) verwendet. Es wurde ein Ligationsansatz mit einem molaren Verhältnis Vektor zu Insert von 1:3 angestrebt und nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Masse}_{\text{Fragment}} [\text{ng}] = 125 \text{ ng} \times \text{Länge Fragment (bp)} / \text{Länge Vektor (bp)}.$$

Die Plasmidaufreinigung und Plasmid-DNA-Isolierung erfolgte per Miniprep mit dem Promega „Wizard Plus SV Minipreps“ Kit nach Angaben des Herstellers.

Die Linearisierung der Plasmide erfolgte mit NotI, um die Transkription vom SP6 Promoter aus zu lenken. Die mRNA wurde mit Hilfe des mMessage mMachine Kits der Firma Ambion nach Angaben des Herstellers synthetisiert. Die so erhaltene mRNA wurde in einer Größenordnung von 250 ng/μl (versetzt mit 0,1 mol/L KCL und 0,2% Phenolrot) in 1-Zellstadiumembryonen injiziert (siehe Kapitel 3.1.5.3). Anschließend wurden die Embryonen in Petrischalen mit Aquarienwasser überführt und bis zur Auswertung bei 23°C gehalten.

3.2 Zellkulturmethoden

3.2.1 Kultivierung von ES-Zellen

Alle Experimente wurden mit der murinen ES-Zelllinie CGR8 (ECACC Nr. 95011018) durchgeführt.

25 cm² Kulturflaschen wurden mit 0,2% Gelatine (Sigma-Aldrich) ausgekleidet, um die Zelladhärenz zu verbessern. In diesen Flaschen erfolgte die Kultivierung unter Feederzell-freien Bedingungen in einem Standard-ES-Zellmedium bestehend aus Glasgow's Minimum Essential Medium (GMEM, Invitrogen), versetzt mit 10% fötalem Rinderserum (FBS, GIBCO), 2mmol/l L-Glutamin, 100 U/ml Leukämie inhibierender Faktor (LIF-1, Calbiochem) und 50 µmol/l β-Mercaptoethanol (Invitrogen) wie bereits beschrieben (Gissel et al., 2005). Die Zellen wurden jeden alternierenden Tag bei einer Konfluenz zwischen 60 - 70% passagiert. Dabei kann der Zusammenschluss von einzelnen Zellen zu größeren Zellverbänden unter dem Lichtmikroskop verfolgt werden.

Die entstandenen Zellverbände wurden mittels des proteolytischen Agens Trypsin/EDTA (Invitrogen) wieder zu Einzelzellen dissoziiert. Hierzu wurden die Zellen mit 37°C warmen PBS gewaschen, 2-5 Minuten mit Trypsin/EDTA Lösung inkubiert, die vom Flaschenboden gelösten Zellen vorsichtig mit einer Pipette in Einzelzellen aufgetrennt und zum Abstoppen der Reaktion in das 5-fache Volumen des Kulturmediums gegeben. Nach anschließender Zentrifugation (5 Minuten; 1000 rpm) wurden die Zellen dann je nach gewünschter Zelldichte in Kulturmedium resuspendiert und in die vorbereiteten gelatinisierten Kulturflaschen überführt.

Die Flaschen wurden bei 37°C, 5% CO₂ –Gehalt und einer relativen Luftfeuchte von 95% in einem Inkubator inkubiert

3.2.2 Einfrieren und Auftauen von ES-Zellen

CGR8-ES-Zellen können in flüssigem Stickstoff gelagert und nach Bedarf aufgetaut und kultiviert werden.

Zum Einfrieren wurden die Zellen wie in Kapitel 3.2.1 dissoziiert, mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer gezählt und nach der Zentrifugation möglichst schnell und

vorsichtig in eiskaltes Einfriermedium (90% fötales Rinderserum (FBS, GIBCO), 10% Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich)) überführt. Der Titer der Zellen sollte 1×10^6 Zellen/ml betragen. Anschließend wurden die Zellen in Kryotubes für zwei Tage bei -80°C eingefroren, bevor sie im flüssigen Stickstoff gelagert wurden. 24 Stunden nachdem die Zellen in den Stickstoff überführt wurden, wurde ein Kontrollkryotube der Zellen aufgetaut, um zu überprüfen, ob der Einfrierprozess erfolgreich war.

Zum Auftauen wurde ein 15 ml Falcon-Röhrchen mit 10 ml 37°C warmen Kulturmedium vorbereitet. Die Zellen wurden zügig in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut. Die aufgetauten Zellen wurden in das vorbereitete Medium überführt und 6 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert, anschließend in Kulturmedium resuspendiert und in eine zuvor gelatinierte Kulturflasche überführt. Die Flaschen wurden bei 37°C , 5% CO_2 -Gehalt und einer relativen Luftfeuchte von 95% in einem Inkubator inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Medium gewechselt, um tote Zellen und andere Rückstände zu entfernen. Danach wurden die Zellen wie in Kapitel 3.2.1 kultiviert.

3.2.3 Differenzierung von ES-Zellen

Die ES-Zelldifferenzierung erfolgte mit einem konventionellen hängende-Tropfen-Protokoll (Gissel et al., 2005). Im Deckel einer 10 cm Bakterienchale wurden Tropfen à 20 μl aus einer Trypsindissoziierten ES-Zellsuspension ($2,5 \times 10^4$ Zellen/ml) generiert. Die Zellsuspension wurde mit Differenzierungsmedium (DM – Iscove's modifiziertes Dulbecco's Medium (IMDM), GIBCO) hergestellt, welchem 20% fötales Kalbserum, 1% nicht essentielle Aminosäuren, 2mmol/l L-Glutamin und 100 $\mu\text{mol/l}$ b-Mercaptoethanol hinzugefügt wurden. Anschließend wurde der Deckel vorsichtig auf den unteren Teil der Bakterienchale, der 5ml PBS enthielt, gesetzt. Die Schalen wurden bei 37°C , 5% CO_2 -Gehalt und einer relativen Luftfeuchte von 95% in einem Inkubator für zwei Tage inkubiert. Es kommt zur Bildung von multizellulären Aggregaten (EBs), die dann mittels Differenzierungsmedium gesammelt und in eine neue 10 cm Bakterienchale überführt wurden. Die EBs wurden bei 37°C in 5% CO_2 -Gehalt im Inkubator unter Schütteln gehalten. Jeden alternierenden Tag wurde das Medium gewechselt.

Nach acht Tagen der Differenzierung konnten schlagende Areale mit Hilfe eines Mikroskops beobachtet werden. Die Anzahl der schlagenden EBs pro Schale wurde ausgezählt.

3.2.4 Transfektion von ES-Zellen mittels Elektroporation

Zur Herstellung stabiler *Knockdown*-Klone gegen die zu untersuchenden Gene, wurden von der Firma OriGene (Rockville, MD) die Säugetier shRNA Expressionsvektoren pGFP-V-RS gegen das jeweilige Gen und entsprechende Kontrollvektoren bezogen.

Die Anwendung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

10^6 CGR8 ES-Zellen in PBS (frei von Ca^+ und Mg^+) wurden mit 25 μg des Vektors mittels Bio-Rad Gene Pulser (Hercules) Elektroporator transfiziert. Die Elektroporation erfolgte mit 500 μF und 240V wie zuvor beschrieben (Andressen et al., 2001). Die transfizierten Zellen wurden, wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, kultiviert und mit 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Pyromycin (Invitrogen) selektiert. Nach 10 bis 14 Tagen wurden die GFP exprimierenden Klone unter dem Fluoreszenzstereomikroskop aussortiert und für weitere Experimente verwendet.

3.2.5 Immunohistochemie (IHC)

Für die Immunohistochemie wurden 13 Tage alte EBs mittels Trypsin/EDTA-Lösung (Invitrogen) dissoziiert und in 6-Well-Zellkulturplatten auf zuvor mit 0,2% Gelatine (Sigma-Aldrich) überzogenen Deckgläsern in Differenzierungsmedium (siehe Kapitel 3.2.3) ausplattiert. Nach 48 Stunden wurden die dissoziierten EBs 15 Minuten mit PBS gewaschen und anschließend mit eiskaltem Methanol für 30 Minuten bei -20°C fixiert. Danach wurden die dissoziierten EBs 2 mal 15 Minuten mit einer Waschlösung (FACS wash (BD Bioscience) + 0,1% Saponin (Sigma)) gewaschen. Es erfolgte eine Inkubation der dissoziierten EBs in 5% BSA für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Nachdem dann 1 mal für 15 Minuten mit Waschlösung gewaschen wurde, wurden die dissoziierten EBs mit dem primären Antikörper (1:200 verdünnt in Waschlösung) bei 4°C über Nacht inkubiert.

Folgende primäre Antikörper wurden verwendet:

- Mouse monoclonal to heavy chain cardiac Myosin (αMHC) (Abcam)

- Mouse monoclonal to VEGF (Sigma)
- Mouse polyclonal to Myocardin (Abcam)

Die dissoziierten EBs wurden dann 3 mal für 15 Minuten mit Waschlösung bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend wurden die dissoziierten EBs mit dem, zum Fluorochrom des primären Antikörpers spezifischen, sekundären Antikörper in Waschlösung (1µl/ml) für 1 ½ Stunden bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die verwendeten sekundären Antikörper waren Anti-mouse IgG Alexa Fluor 488 und 594 (Invitrogen). Zum Färben der Nuklei war der Antikörperlösung Hoechst 33342 Dye (Sigma Aldrich) zugefügt. Zum Schluß wurde 2 mal 10 Minuten mit Waschlösung gewaschen und die Deckgläser mit Prolong Gold (Invitrogen) auf Objektträgern befestigt. Die so präparierten dissoziierten EBs konnten bei -20°C für längere Zeit gelagert werden. Aufnahmen der immunohistochemischen Färbung wurden mit dem inversen Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axiovert 200 vorgenommen.

3.2.6 Mikroarray-Analyse

TotalRNA wurde mittels des RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aus den aus den *knockdown*-Klonen und Wildtyp CGR8 ES-Zellen gewonnenen EBs isoliert. Die Qualität der RNA wurde mit der denaturierten Agarosegel Methode bestätigt. 100 ng total RNA wurden für die aRNA Amplifikation mit GeneChip® 3' IVT Express Kit (Affimetrix) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Nach 16 Stunden biotinylierter *in vitro* Transkription wurde die aRNA aufgereinigt. 15 µg der aufgereinigten aRNA wurden mit Fragmentationslösung fragmentiert. 12,5 µg der fragmentierten aRNA wurden mit Mouse Genome 430 2.0 Arrays für 16 Stunden bei 45°C im Hybridisierungssofen hybridisiert. Dann wurden die Arrays gewaschen und mit Phycoerythrin mit Affymetrix Fluidics Station 450 gefärbt und mittels Affymetrix Gene-Chip Scanner 3000 7G gescannt. Die Qualitätskontrollmatrizen wurden mit Affymetrix GCOS Software bestimmt.

Die CEL-Dateien wurden für weitere Analysen verwendet. Die Daten wurden einer Hintergrundkorrektur unterzogen und der RMA (robust multi-array average) wurde

mit R-Bioconductor-Paketen normalisiert (Bolstad et al., 2003). Die hierarchische Clusteranalyse wurde unter Verwendung der Cluster (Eisen Labor) Software durchgeführt. Ebenso wurde eine Hauptkomponentenanalyse mit made4 (Multivariate analysis of microarray data using ADE4) -Paketen mit R-bioC unternommen. Zur Bestimmung der unterschiedlich exprimierten Transkripte (differentially expressed transcripts, DET) wurde die empirische Bayes-Methode mit dem LIMMA (Linear Models for Microarray data) -Paket in R angewandt (Smyth, 2004). Die original p-Werte (p-values) wurden mit der Benjamini Hochberg Methode in LIMMA mit $P \leq 0,05$ angeglichen, um die *False Discovery Rate* (FDR) zu finden. Des weiteren wurden die Transkripte mit einem log *Fold Change* von 1,5 oder -1,5 gefiltert, um eine engere Auswahl zu treffen.

3.2.7 Genontologie (Gene Ontology, GO)

Zur Bestimmung der biologischen Bedeutung von DET wurde die Datenbank für *Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID) genutzt. DAVID stellt biologische Prozesse, molekulare Funktion und zelluläre Komponenten für DET mit einem EASE *Enrichment Score* $P \leq 0,01$ zur Verfügung (Dennis et al., 2003; Hosack et al., 2003).

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 RNA Isolation

3.3.1.1 gesamtRNA Isolation aus Zebrafischembryonen

Die gesamtRNA wurde mit Hilfe von Trizol (Gibco) isoliert. Dazu wurden Embryonen in Trizol homogenisiert (1ml Trizol / 100 Embryonen).

Das Homogenisat wurde mit 12000xg bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert, um das aufgebrochene Zellmaterial am Boden zu sammeln. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 200 µl Chloroform pro ml Trizol zum Überstand gegeben, 15 Sekunden gevortext und 3 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt der Proben mit 12000xg bei 4°C für 15 Minuten, wurde die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß

überführt und mit 500 µl Isopropanol pro ml Trizol gemischt. Es folgte ein Inkubationsschritt für 10 Minuten bei Raumtemperatur und Zentrifugation mit 12000xg bei 4°C für 15 Minuten.

Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 1 ml 75% EtOH gewaschen. Die Lösung wurde vorsichtig kurz gemischt und 5 Minuten bei 4°C mit 7500xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet maximal 5 Minuten getrocknet.

Nach dem Trocknen wurde das RNA-Pellet in 200 µl H₂O pro ml Trizol resuspendiert und bei 37°C 10 Minuten inkubiert.

3.3.1.2 gesamtRNA Isolation aus ES-Zellen

Die gesamtRNA wurde unter Verwendung des RNeasy-Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.3.2 cDNA Synthese

Die cDNA wurde durch Erst-Strang-Synthese unter Verwendung des SuperScriptIII-RT-Kit (Invitrogen), SuperScript Vilo-Kit (Invitrogen) oder des Erst-Strang-Synthese-Kits der Firma Promega nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR) (Mullis et al., 1986; Erlich, 1989)

Die Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) ist ein Verfahren zur gezielten Amplifizierung von DNA *in vitro*. Durch Verwendung der thermostabilen DNA-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus* (Taq Polymerase) beim Polymerisationszyklus ist es möglich, den gesamten Ablauf der PCR zu automatisieren. Zur Durchführung der PCR wurden die Taq-Polymerase von der Firma Amplicon und die PCR Maschinen *Mastercycler Gradient* und *Mastercycler Personal* (Eppendorf) verwendet.

Reaktionsprofil:

Tabelle: 3.3 PCR-Profil zur DNA Amplifikation

Schritt 1	Denaturierung	95°C	2 min	
Schritt 2	Denaturierung	95°C	30 sec	
Schritt 3	Anlagerung der Primer	Temperatur Primerabhängig	30 sec	} Wiederholung 34x
Schritt 4	Extension	72°C	In Abhängigkeit von der Länge des gewünschten PCR-Produkts (1 min/kb)	
Schritt 5	Elongation	72°C	5 min	
Schritt 6	hold 12°C			

3.3.4 DNA Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA-Fragmente erfolgte im Institut für Genetik der Universität zu Köln nach Sanger (Sanger et al., 1977). Folgender

Reaktionsansatz und

PCR-Profil

Tabelle 3.4: PCR-Profil für DNA Sequenzierung

BigDye	0,5 µl
Puffer	1,75 µl
Oligonukleotid	0,5 µl
DNA / Plasmid	10ng / 100ng

Schritt 1	94°C	1 min	
Schritt 2	94°C	10 sec	} x 34
Schritt 3	55°C	15 sec	
Schritt 4	60°C	4 min	
Schritt 5	Hold 12°C		

wurden verwendet.

3.3.5 Quantitative PCR

Das Verfahren der quantitativen PCR wurde mit Hilfe des ABI-7500 Fast PCR Systems (Applied Biosystems) durchgeführt. Hierzu wurde der SYBR Green PCR Master Mix (MESA FAST Mix, Eurogentec) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Folgendes PCR-Profil wurde eingesetzt:

Tabelle 3.5 : PCR-Profil für quantitative PCR

Schritt 1	95°C	5 min	
Schritt 2	95°C	15 sec	} 40 x
Schritt 3	60°C	30 sec	
Schritt 4	72°C	30 sec	

Das mRNA Niveau wurde gegen ein endogenes Kontrollniveau (GAPDH) normalisiert und mittels der *Cycle-Threshold-* (Ct) Methode kalkuliert. Die relative Expressionhöhe der Zielgene wurde in einer Excel-Datei dargestellt.

3.3.6 Aufreinigung von PCR-Fragmenten aus Agarosegelen (Gelextraktion)

Zur elektrophoretischen Trennung von Nukleinsäuren wurden Gele mit einem Agaroseanteil zwischen 0,8 % und 1,2 % in 1 × Tris-Acetat Elektrophorese (TAE)-Puffer verwendet, wobei der Agaroseanteil von der Größe der zu analysierenden Nukleinsäuren abhängt (Sambrook et al., 1989). Die Proben wurden mit 1/6 6 mal Ladepuffer II versetzt und in 1 mal TAE in einer Flachbettgelkammer aufgetrennt. Um die Nukleinsäurebanden nachweisen zu können, wurden die Gele mit Ethidiumbromid versetzt (2µl Ethidiumbromidlösung (10µg/ml) auf 100 ml), so dass sie auf einem UV-Transiluminator (*Gene Flash*; Syngene) sichtbar gemacht und fotografiert werden konnten. Die Bande des gewünschte PCR-Fragments wurde mit Hilfe einer Skalpellklinge aus dem Agarosegel ausgeschnitten und das erhaltene Gelstück in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Aufreinigung erfolgte über das Rapid PCR Purification System (Marligen Biosciences Inc.) nach Angaben des Herstellers.

Verwendeter Ladepuffer II (Sambrook et al., 1989):

0,25% Bromphenolblau

0,25% Xylencynol FF

15% Ficoll (Typ 400; Pharmacia) in H₂O

Verwendeter Größenstandard:

2-log-DNA-ladder (New England Biolabs)

3.3.7 *in vitro* Transkription für die Herstellung von *in situ* Sonden

Markierte antisense Ribonukleinsäure (RNA) Sonden für die *in situ* Hybridisierungen wurden durch Amplifikation der gewünschten Fragmente durch PCR generiert, wobei Oligonukleotide mit T7- bzw. T3-Promotersequenz verwendet wurden. Entsprechend dem auf der DNA Matrize vorhandenen

Promoter, erfolgte die Herstellung der Sonde mittels der Polymerase T7 oder T3 (Roche). Die Markierung der Sonden erfolgte mit Digoxigenin unter Verwendung des *Digoxigenin-RNA Labeling Mix* der Firma Roche.

Transkriptionsansatz:

500ng PCR-Produkt

2 μ l 10 \times Dig RNA Labeling Mix

2 μ l RNS Polymerase (20 U/ μ l)

2 μ l 10 \times Transkriptionspuffer (enthält 60 mM MgCl₂) und

1 μ l RNase Inhibitor (40U/ μ l, Roche)

Mit H₂O_{DEPC} (DEPC = Diethylpyrocarbonat) wurde auf ein Gesamtvolumen von 20 μ l aufgefüllt.

Die Lösung wurde 3-4 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 1 μ l DNase (RNase frei) (10U/ μ l) zugefügt und für 15 Minuten bei 37°C inkubiert, um die DNA-Matrize abzubauen. Durch Zugabe von 1 μ l RNase freiem 0,2M EDTA (pH=8,0) wurde die Reaktion abgestoppt. Über eine Ethanolfällung mit 2,5x Volumen 100% Ethanol und 1/10 Volumen 4M LiCl für mindestens 2 Stunden bei -20°C erfolgte die Aufreinigung der Transkripte. Die gefällte Lösung wurde anschließend mit 70%igem Ethanol gewaschen und das RNA-Pellet in 20 μ l H₂O_{DEPC} gelöst. 1/2 μ l RNase Inhibitor (40U/ μ l) wurde zugegeben und für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Die dauerhafte Aufbewahrung bei -20°C wurde durch die Zugabe von einem Volumen Formamid ermöglicht. Die Qualität der Transkription wurde durch Auftragen von 2,5% des Transkriptionsansatzes auf einem 1%igen Agarosegel überprüft.

3.4 Bioanalytische Methoden

3.4.1 Datenbankrecherche nach Homologen im Zebrafisch

Die aus einer Musterung stammenden Maus-Kardiomyozyten (Doss et al., 2007a+b) wurden wie folgt auf Homologie im Zebrafisch untersucht.

Zunächst wurde über die Suchfunktion des National Center of Biotechnology Information (NCBI) die gegebene Nummer für den Datenbankeintrag aufgerufen. Über die *Entrez*-Funktion des NCBI konnte die Proteinsequenz des entsprechenden Gens ermittelt werden. Anhand dieser Sequenz konnte dann mit Hilfe des BlastP-Programms in der Datenbank von ensembl (<http://www.ensembl.org>) die Suche nach dem homologen Gen im Zebrafisch durchgeführt werden. Hierzu wurde die Zv6 verwendet.

3.4.2 Ermittlung des „*open reading frame*“ (ORF) und der 5' UTR der Kandidatengene

Die aus der Datenbankrecherche erhaltenen Transkriptsequenzen der Kandidatengene mussten für die Bestimmung der Morpholinosequenz um die 5'UTR verlängert werden. Zunächst musste hierfür, falls nicht schon vorhanden, das Start-Methionin des ORF bestimmt werden. Dazu wurde das 5'-Ende der Transkriptsequenz mit Hilfe des BlastN-Programms in der Datenbank gegen ESTs (*expressed sequence tagged sites*) abgeglichen. Die erhaltene Sequenzverlängerung konnte mit dem Programm MapDraw (DNASTAR) in eine Proteinsequenz umgeschrieben werden. Diese wurde dann auf ein mögliches Start-ATG untersucht. Sobald dieses identifiziert werden konnte, wurde die verlängerte Sequenz erneut mit BlastN gegen die EST-Datenbank abgeglichen und um die gefundene Sequenz (5' UTR) verlängert.

4. Ergebnisse

4.1 Identifizierung von Kandidatengen in ES-Zellen und respektive im Zebrafisch

In unserer Arbeitsgruppe haben wir durch die Verwendung von Mouse Embryonic Fibroblast (MEF) freien murinen CGR8 embryonalen Stammzellen ein verbessertes ES-Zellmodell für die konsistente Genexpression und Entwicklungsstudien etabliert (Gissel et al., 2005). Um die Schwierigkeiten zu umgehen, während der embryonalen Entwicklung eine ausreichende Menge an mesodermalen Zellen und Kardiomyozyten isolieren zu müssen, wurden transgene α -Myosin Heavy Chain- (α -MHC, kanonischer Marker für Kardiomyozyten), T (Brachyury)- (kanonischer Marker für das naszierende Mesoderm) und BMP2- (kanonischer Marker für das kardiogene Mesoderm) ES-Zelllinien entwickelt, die sowohl Puromycinresistenz als auch enhanced grün fluoreszierendes Protein (EGFP) unter der Kontrolle des jeweiligen Promoters exprimieren und somit ermöglichen, reine puromycinresistente und EGFP-positive α -MHC⁺ Kardiomyozyten, T (Brachyury)⁺ und BMP2⁺ mesodermale Zellen zu generieren. Durch eine großangelegte Expressionsstudie mit Affymetrix Expressionsmikroarrays wurde das komplette Transkriptom dieser reinen mesodermalen Zellen und Kardiomyozyten ermittelt (Doss et al., 2007a+b).

Bioinformatische Studien der Genexpression in den aus ES-Zellen hervorgegangen Kardiomyozyten spiegeln die biologischen, physiologischen und funktionellen Prozesse wieder, die in heranreifenden Kardiomyozyten auftreten (Doss et al., 2007a). Zusätzlich wurden die Gene (sowohl annotierte als auch neue nicht-annotierte), die speziell in den beiden mesodermalen Zelllinien hochreguliert waren, analysiert und identifiziert (Doss et al., 2007b).

Aus diesen Analysen konnten wir zwei Gene

- A130092J06Rik und
- Zfp533

identifizieren, die im Vergleich zu undifferenzierten ES-Zellen und Kontroll-EBs spezifisch in den Kardiomyozyten hochreguliert waren.

Ebenso wurden zwei Gene

- 9530057J20Rik und
- Ddit4l

identifiziert, die im Vergleich zu undifferenzierten ES-Zellen und Kontroll-EBs in mesodermalen Zellen und Kardiomyozyten hochreguliert waren.

Weitere zwei Gene

- 4930506M07Rik und
- Zfp365

wurden identifiziert, die im Vergleich zu undifferenzierten ES-Zellen und Kontroll-EBs speziell in mesodermalen Zellen hochreguliert, aber in Kardiomyozyten runterreguliert waren.

Diese Gene wurden ausgewählt, da eine erhöhte Kardiomyogenese, definiert als eine Zunahme der aus ES-Zellen hervorgegangenen Kardiomyozyten, entweder bedingt durch eine gezielte Zunahme der mesodermalen T(Brachyury)⁺- und/oder BMP2⁺-Zellpopulationen aus ES-Zellen oder durch die gezielte Differenzierung der mesodermalen Zellpopulation in kardiale Zellen auftreten kann.

Den möglichen Einfluss dieser insgesamt sechs Gene in Hinblick auf die Kardiomyogenese gilt es zu untersuchen.

Der erste Schritt zu Beginn dieser Doktorarbeit bestand in der Identifizierung der homologen Zebrafischgene zu den oben aufgeführten Mausgenen. Hierfür wurde eine BlastP-Analyse in der Ensembl-Datenbank durchgeführt (vergleiche Kapitel 3, Abschnitt 3.4.1). Alle sechs Gene konnten bei dieser Recherche eindeutig zugeordnet werden und dienten als Grundlage für die *in vivo* Untersuchungen der vorliegenden Arbeit (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1 Resultat der Datenbankrecherche nach Homologen Zebrafischgenen

Maus			Zebrafisch		
Name	Riken-Nummer bzw. Gennamen	Zugriffscodes (Accession Nr.)	Zugriffscodes (Accession Nr.)	Ensembl Transkript ID (Release 45)	Name
Shootin1	4930506M07Rik	NP_001107784	NP_001185690	ENSDART00000058027	zfShootin1
J20	9530057J20Rik			ENSDART00000047108	zfJ20
Fam78a	A130092J06Rik	NP_780720	NP_001107947	ENSDART00000097171	ZfFam78a
Ddit4l	Ddit4l	NP_084419	NP_956401	ENSDART00000054788	zfDdit4l

Zfp365	Zfp365	NP_848794	XP_001339691		zfZfp365
Zfp533	Zfp533	NP_848838	XP_001338404	ENSDART00000059446	zfZfp533

Eine erste Idee, welche Rolle die Gene im Genom spielen könnten, liefert eine Analyse ihrer Proteinsequenz in der Maus-, Zebrafisch- und Menschengenomdatenbank.

Die identifizierten Proteindomänen können durch Literaturhinweise auf ihre mögliche Funktion untersucht werden.

Einen Einblick der Expression der Gene in den einzelnen Geweben liefert eine Analyse ihrer EST (Expressed Sequence Tag)-Daten in Sequenzdatenbanken. Die Häufigkeit, wie oft ESTs in cDNA-Datenbanken bestimmter Gewebe auftreten, kann Auskunft darüber geben, wie spezifisch die exprimierten Gene für das entsprechende Gewebe sind. Dies wird in Datenbanken wie Gene-Hub-GEPIS (Zhang et al., 2007) und bioGPS (<http://biogps.gnf.org>) (Wu et al., 2009) veranschaulicht.

4930506M07Rik

Die Maus-cDNA-Sequenz 4930506M07Rik (Synonym: Shootin1) umfasst ein 631 Aminosäuren kodierendes Protein, das durch eine 4081 Basenpaare enthaltende mRNA-Sequenz kodiert wird. Diese ist auf Chromosom 19: 58599204-59599203 der genomischen Sequenz lokalisiert (Abb. 4.1).

In Abbildung 4.2 ist eine Übersicht über die Sequenzähnlichkeit von 4930506M07Rik im Maus-, Mensch- und Zebrafischgenom dargestellt.


```

ref|NP_001107784|      EEMDRIKKGVHLRPVNQTA-RPKAKPDSLKGSSEAVDELKGLGTLNKSTSSRSLKSLGP
ref|NP_001120683|      EEMDRIKKGVHLRPVNQTA-RPKTKPESSKGCESAVDELKGLGTLNKSTSSRSLKSLDP
ref|NP_001185690|      EMMLRIKKGVLQRPVQTTNRVVRPGPKPTASNSAIQELQGLLNTVKRPGPSSSPGPRPP
                        ***  *****  *****  **  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

ref|NP_001107784|      ENSE-TELERILRRRK--LTAEADSSSPTGILATSESKSMPVLGVSVSVTKSALNKKTLE
ref|NP_001120683|      ENSE-TELERILRRRK--VTAEADSSSPTGILATSESKSMPVLGVSVSVTKTALNKKTLE
ref|NP_001185690|      SPSEKSELEKALQRRREAVKSAKNNTNPSSVVDLTQIKQ-----TRS-----
                        **  ***  *  **  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

ref|NP_001107784|      AEFNNPCPLTPEPGEGRKLEGCTNPKVTFQPPSKGGYRRKCVGSENQAEFVVVLDPVST
ref|NP_001120683|      AEFNSPSPPTPEPGEGRKLEGCTSSKVTFQPPSSIGCRKKYIDGEKQAEFVVVLDPVST
ref|NP_001185690|      -----EPGQN-----
                        ***

ref|NP_001107784|      HEPQTKDQAAEKDPTQFEEEGGETOPEYKEDSGGKTGETDSSNC-----
ref|NP_001120683|      HEPQTKDQVAEKDPTQHKEDEGEIQPENKEDSIENVRETDSNC-----
ref|NP_001185690|      ----TGQ-----ETLRHTTTTICTEQLS
                        *  **  *  *  *  *  *  *
    
```

Abb. 4.2: Abgleich von 4930506M07Rik im Maus-, Mensch- und Zebrafischgenom. Übereinstimmungen sind durch einen Stern gekennzeichnet.

Folgende Proteinsequenzen konnten für 4930506M07Rik in der Ensembl-Datenbank ermittelt werden (Abb. 4.3).

1. Cyclase-assoziierte Proteine (CAPs) sind hoch konservierte Actin-bindende Proteine. CAPs enthalten C-terminal eine Actin-bindende Domäne, die das Actin in Bezug auf Zellsignale reguliert und verantwortlich für die normale Zellmorphologie, Zellteilung und Wachstum ist (Freeman et al., 2000).
2. Tropomyosin ist ein Strukturprotein, das an der Kontraktion der Muskelzellen beteiligt ist.

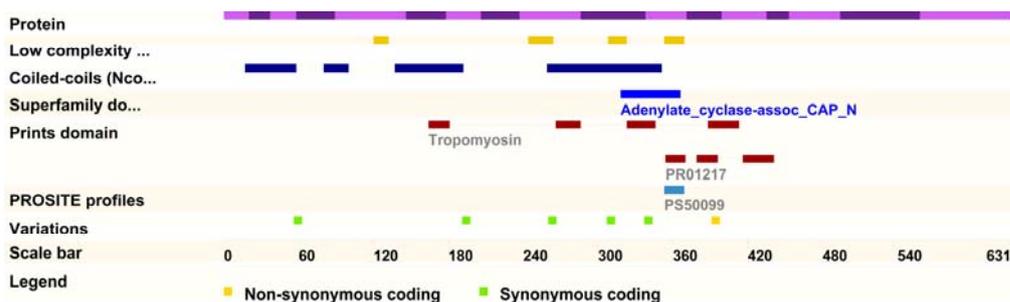


Abb 4.3: Auszug aus der Ensembl-Datenbank zur Darstellung der Proteindomänen von 4930506M07Rik

Einen Einblick der Expression von 4930506M07Rik in den einzelnen Geweben liefert eine Analyse ihrer EST (Expressed Sequence Tag)-Daten in der Gene-Hub-GEPIS- und bioGPS-Datenbank (Abb. 4.4). Allerdings scheint keine Expression im Herzgewebe vorhanden zu sein.

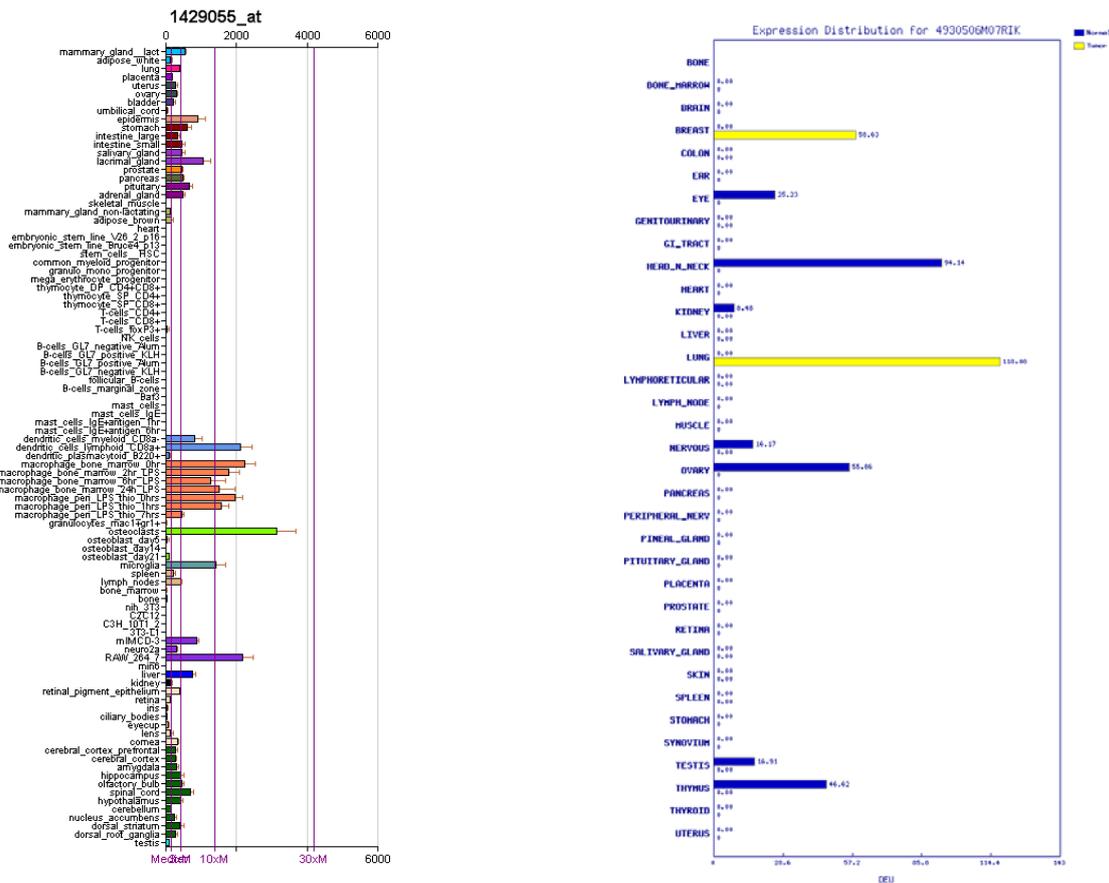


Abb. 4.4: EST Abgleich in der bio-GPS- und Gene-Hub-GEPIS-Datenbank zur Darstellung der Expression von 4930506M07Rik in verschiedenen Geweben.

9530057J20Rik

Einen Einblick der Expression von 9530057J20Rik in den einzelnen Geweben liefert eine Analyse ihrer EST (Expressed Sequence Tag)-Daten in der bioGPS-Datenbank (Abb. 4.5). Die Expression ist nur auf wenige Gewebe beschränkt. Es scheint keine Expression im Herz vorhanden zu sein.

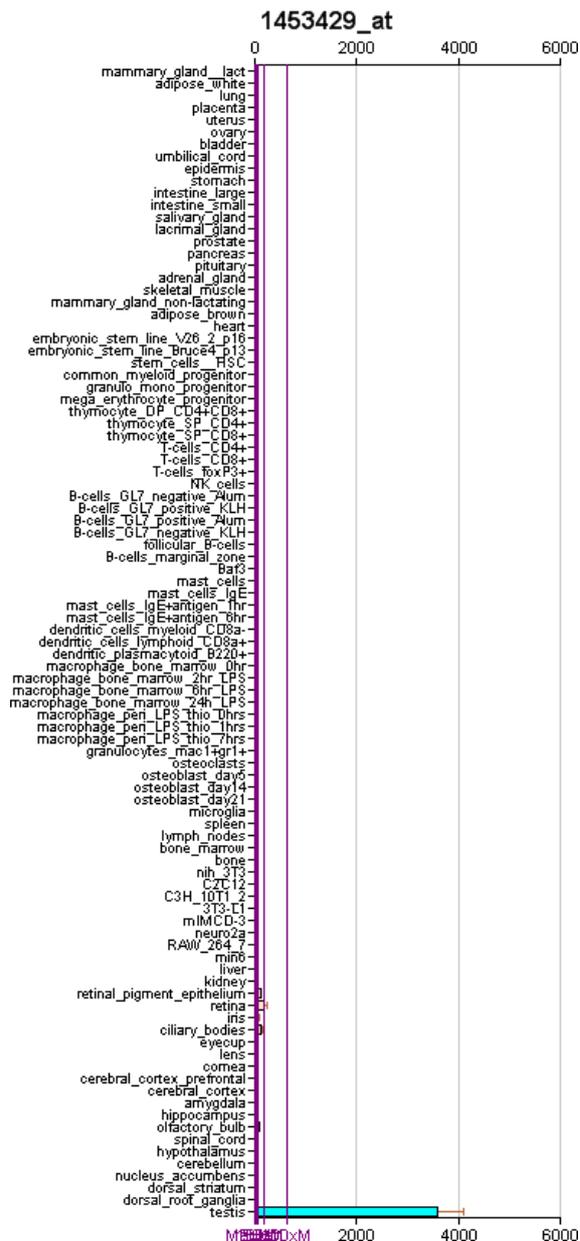


Abb. 4.5: EST Abgleich in der bio-GPS- und Gene-Hub-GEPIS-Datenbank zur Darstellung der Expression von 9530057J20Rik in verschiedenen Geweben.

A130092J06Rik

Die Maus-cDNA-Sequenz A130092J06Rik (Synonym Fam78a) umfasst ein 283 Aminosäuren kodierendes Protein, dass durch eine 4107 Basenpaare lange

mRNA-Sequenz kodiert wird. Diese ist auf Chromosom 2: 31422977- 32422976 der genomischen Sequenz lokalisiert (Abb. 4.6).

In Abbildung 4.7 ist eine Übersicht über die Sequenzähnlichkeit von A130092J06Rik im Maus-, Mensch- und Zebrafischgenom dargestellt.

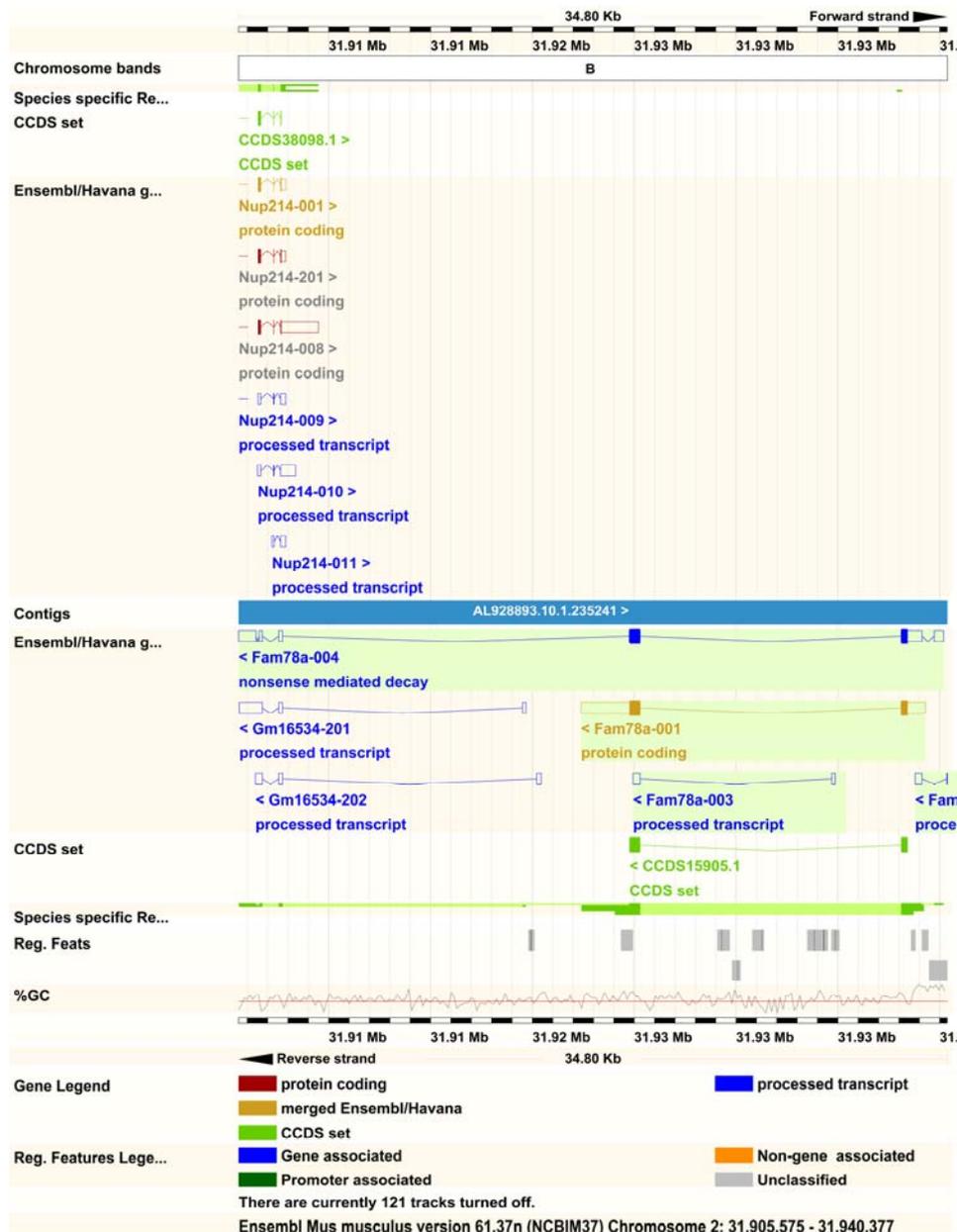


Abb.4.6: Auszug aus der Ensembl-Datenbank zur Darstellung genereller Informationen über A130092J06Rik

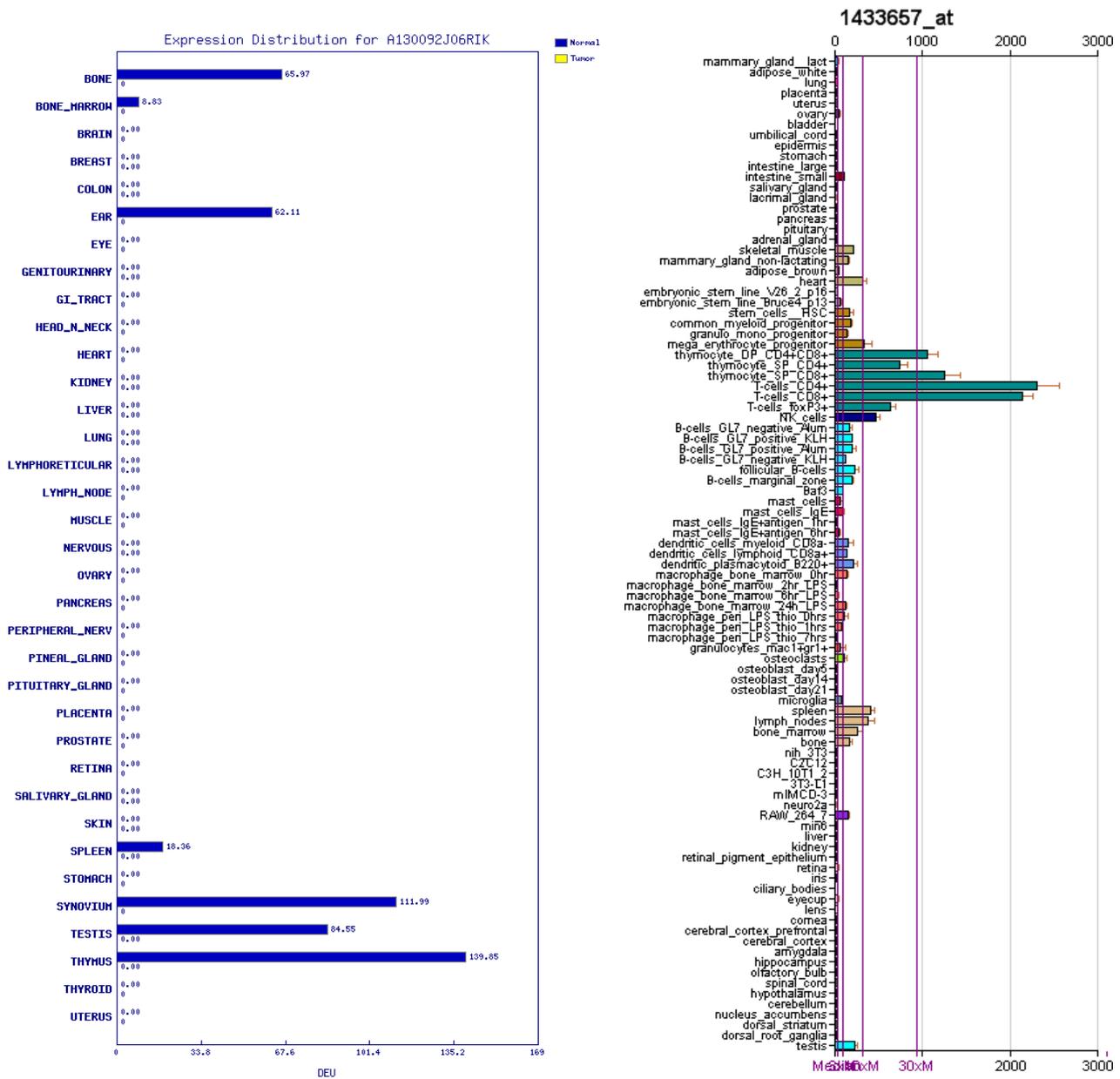


Abb. 4.8: EST Abgleich in der Gene-Hub-GEPIS- und bioGPS-Datenbank zur Darstellung der Expression von A130092J06RIK in verschiedenen Geweben.

Ddit4l

Die Maus-cDNA-Sequenz Ddit4l umfasst ein 193 Aminosäuren kodierendes Protein, dass durch eine 2722 Basenpaare lange mRNA-Sequenz kodiert wird. Diese ist auf Chromosom 3: 136787937-137787936 der genomischen Sequenz lokalisiert (Abb. 4.9).

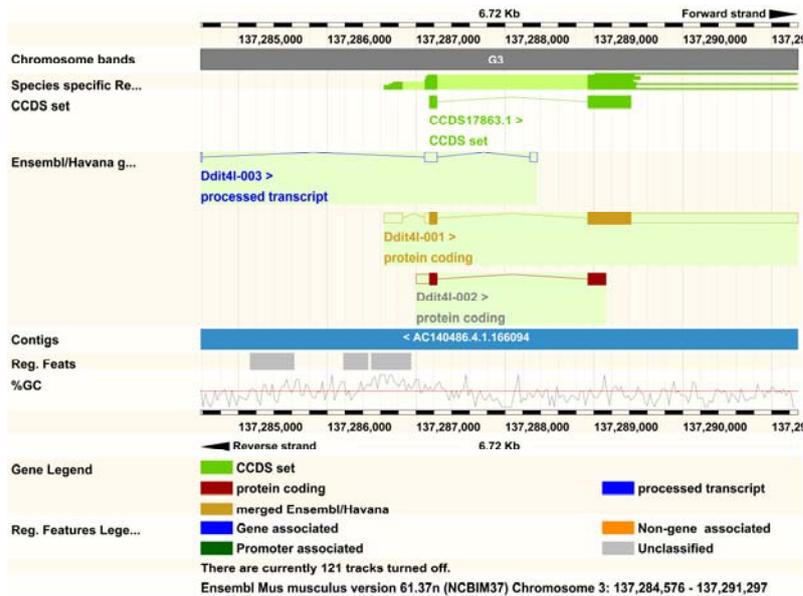


Abb.4.9: Auszug aus der Ensembl-Datenbank zur Darstellung genereller Informationen über Ddit4l

In Abbildung 4.10 ist eine Übersicht über die Sequenzähnlichkeit von Ddit4l im Maus-, Mensch- und Zebrafischgenom dargestellt.

```

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

ref|NP_084419|      ----MVATGSLSSKNPA-----SISELLDGGYHPSGLSDFDYWDYV-----
ref|NP_660287|      ----MVATGSLSSKNPA-----SISELLDCGYHPESLSDFDYWDYV-----
ref|NP_956401|      MQDQLISSLSSEDSSTPTSDAPAKRLSWSKLMQKLHSSQSLDSDSDNHSSTDDSSDSG
                    *      *      *      *      *      *      *      *

ref|NP_084419|      ---VPEPNLNEVV--FEETTCQNLVKMLENCLSRKQTKLGC SKVLVPEKLTQRIAQDVL
ref|NP_660287|      ---VPEPNLNEVI--FEESTCQNLVKMLENCLSKSKQTKLGC SKVLVPEKLTQRIAQDVL
ref|NP_956401|      SICIPDVSQSEFFDPTEEALCKEVVQLIALNLTDKDGVLHCSKLLIPEKLEHIGQELV
                    *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

ref|NP_084419|      RLSSTPCGLRGVMHVNLEIENVCKKLDRIVCDA SVVPTFELTLVFKQESC-PWTS LKD
ref|NP_660287|      RLSSTPCGLRGVMHVNLEIENVCKKLDRIVCDS SVVPTFELTLVFKQENC-SWTSFRD
ref|NP_956401|      HLSVSEPCGLRGALIDLCVEQDGSCHAAAQI AVDPYLVPTFQLTLVLR LDRGLWPKIQG
                    **      *      *      *      *      *      *      *      *

ref|NP_084419|      FFFSRGRFSSGLKRTLILSSGFR LVKKKLYSLIGTTVIEEC
ref|NP_660287|      FFFSRGRFSSGFRRTLILSSGFR LVKKKLYSLIGTTVIEGS
ref|NP_956401|      LFTGRSPASPAVRRALRLSTGFRAIKRKYSS-EELLIEEC
                    *      *      *      *      *      *      *      *      *
    
```

Abb. 4.10: Abgleich von Ddit4l im Maus-, Mensch- und Zebrafischgenom. Übereinstimmungen sind durch einen Stern gekennzeichnet

Abbildung 4.11 veranschaulicht die Expression von Ddit4l in einigen Geweben. Jedoch scheint Ddit4l nicht im Herzgewebe exprimiert zu sein.

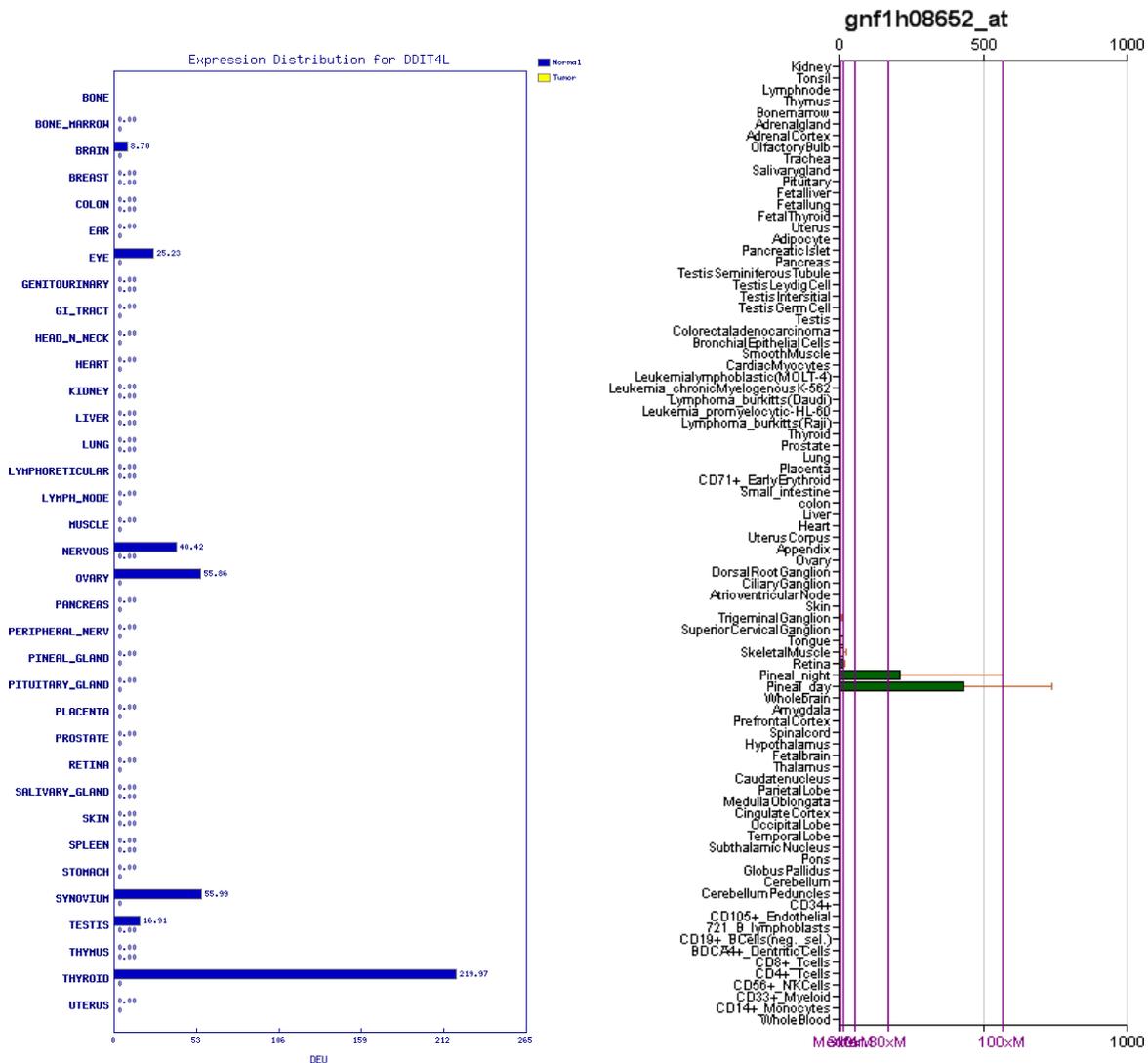


Abb. 4.11: EST Abgleich in der Gene-Hub-GEPIS- und bioGPS-Datenbank zur Darstellung der Expression von Ddit4l in verschiedenen Geweben

Zfp365

Die Maus-cDNA-Sequenz Zfp365 umfasst ein 408 Aminosäuren kodierendes Protein, das durch eine 4259 Basenpaare lange mRNA-Sequenz kodiert wird. Diese ist auf Chromosom 10: 66862131-67862130 der genomischen Sequenz lokalisiert (Abb. 4.12).

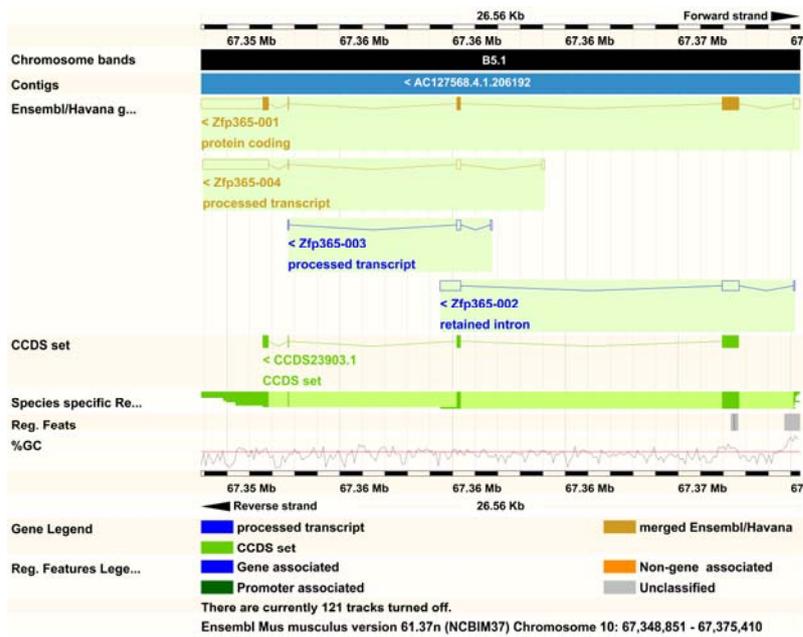


Abb.4.12: Auszug aus der Ensembl-Datenbank zur Darstellung genereller Informationen über Zfp365

In Abbildung 4.13 ist eine Übersicht über die Sequenzähnlichkeit von Zfp365 im Maus-, Mensch- und Zebrafischgenom dargestellt.

```

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

ref|NP_848794|      MQQTTFEESRYHWQDSLENAVVC-----LPPRCPRCGDHTFRFSLSSLRHLEFHSY
ref|NP_055766|      MQQKAFEESRYPWQESFENVAVC-----LPLRCPRCGDHTFRFSLSSLRHLEFHSY
ref|XP_001339691|   MQQKVCSTRNTALF---VKNQACGAGATSHLPPRCPRCGEQERFHTLSSLRHLEYNHFP
                    ***          *          *          *          *          *          *

ref|NP_848794|      EERTLLTKCSLLPSLKDTELLRSELKQGVLRGHAKVTKQSSYVNLYSISHGSKDT
ref|NP_055766|      EERTLLTKCSLFPCLKDTELLRSELKQGVLRGHAKVTKQSSYVNLYSISHGSKDR
ref|XP_001339691|   HTKHDISL-----LSPRDLCHSER--KEGCKIPS-ADTHKVRDAGTSTNSSTRGEHKHM
                    *          *          *          *          *          *          *

ref|NP_848794|      KPF-EMVAERPVSVYQTYTAVDIRADSLDAPCASPLPTQDTKAAFEAHVREKFNRMVEA
ref|NP_055766|      KPF-EVVAERPVSVYQTYTAMDLDHDSLDRGSPGLPTSDTKASFEAHVREKFNRMVEA
ref|XP_001339691|   QPASQKLPERSLSV-----GDASAGPLSAP-----VASVEKRLEGMMRT
                    *          **          *          *          *          *          *

ref|NP_848794|      VDRTEIEKRIDKLTKELAQKTAELLEVRAAFAQLTQKKQEVQRRERALNKQVDVAVEMIAV
ref|NP_055766|      VDRTEIEKRIDKLTKELAQKTAELLEVRAAFAVQLTQKKQEVQRRERALNRQVDVAVEMIAV
ref|XP_001339691|   ANSSMERRLLRSLSELAQTDTAILCERAHSHHLAQEKQEVLERERALSQVDAVMVIAT
                    *          *          *          *          *          *          *

ref|NP_848794|      LKQRLTESEELLRKEEEVTFNHFLEAAAEKEVQGKARLQDFIENLLQRVELAEKQLEY
ref|NP_055766|      LRQRLTESEELLRKEEEVTFNHFLEAAAEKEVQGKARLQDFIENLLQRVELAEKQLEY
ref|XP_001339691|   LKQQLSISEHELEERREQEVIITIQKFLAAAEHEMCGKVLRRFIESLLRRLSLAEKLEY
                    *          *          *          *          *          *          *

ref|NP_848794|      YQSQQASGFSCDTSEHMLTDIPSNRKPCLSRGHQHSVCNHPMRAHFHLKGRSYLKKAK
ref|NP_055766|      YQSQQASGFVRDLSGHVLTDISSNRKPCLSRGHPSVCNHPDLKAHFHPKGRNHLKKAK
ref|XP_001339691|   YQRGPHRHYCTAHSVPLPSELAPQRITQSRSSGE-----HLEQDE
                    **          *          *          *          *          *          *

ref|NP_848794|      DERAGMQPAKAIHEPAESPREFFRPAKKGHEGLSRKGNFRPKMAKKKPTAIVNII
ref|NP_055766|      DDRASMQPAKAIHEQAESSRDLCRPPKKGELGFGKGNIRPKMAKKKPTAIVNII
ref|XP_001339691|   DEEQQLL-----AQSGWGLSKGAAGRLGYDSWSQRRRSDGYEV
                    *          *          *          *          *          *
    
```

Abb. 4.13: Abgleich von Zfp365 im Maus-, Mensch- und Zebrafischgenom. Übereinstimmungen sind durch einen Stern gekennzeichnet.

In der Ensembl-Datenbank wurde für Zfp365 die Znf_C2H2 und die Znf_C2H2-like Domäne gefunden (Abb. 4.14). Diese Domänen gehören zur Klasse der Zinkfingerproteine.

Die Funktion von Zfp365 ist unbekannt.

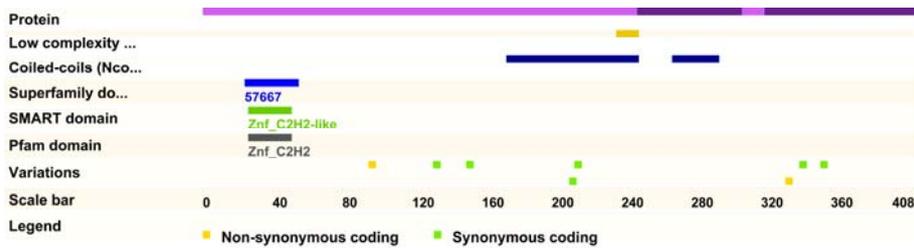


Abb 4.14: Auszug aus der Ensembl-Datenbank zur Darstellung der Proteindomänen von Zfp365.

Die folgende Abbildung 4.15 zeigt die Expression von Zfp365 in einigen Geweben. Das Herzgewebe zählt nicht dazu.

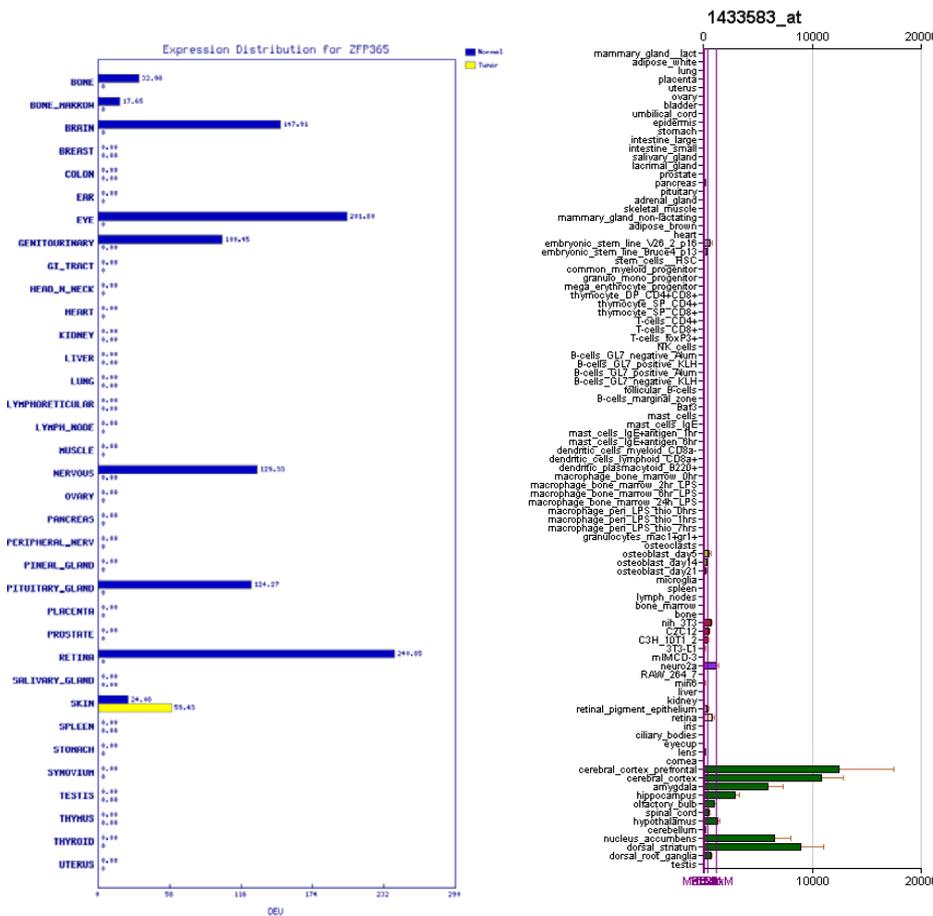


Abb. 4.15: EST Abgleich in der Gene-Hub-GEPIS- und bioGPS-Datenbank zur Darstellung der Expression von Zfp365 in verschiedenen Geweben

Zfp533

Die Maus-cDNA-Sequenz Zfp533 umfasst ein 482 Aminosäuren kodierendes Protein, dass durch eine 2734 Basenpaare lange mRNA-Sequenz kodiert wird. Diese ist auf Chromosom 2: 76953194-77953193 der genomischen Sequenz lokalisiert (Abb. 4.16).

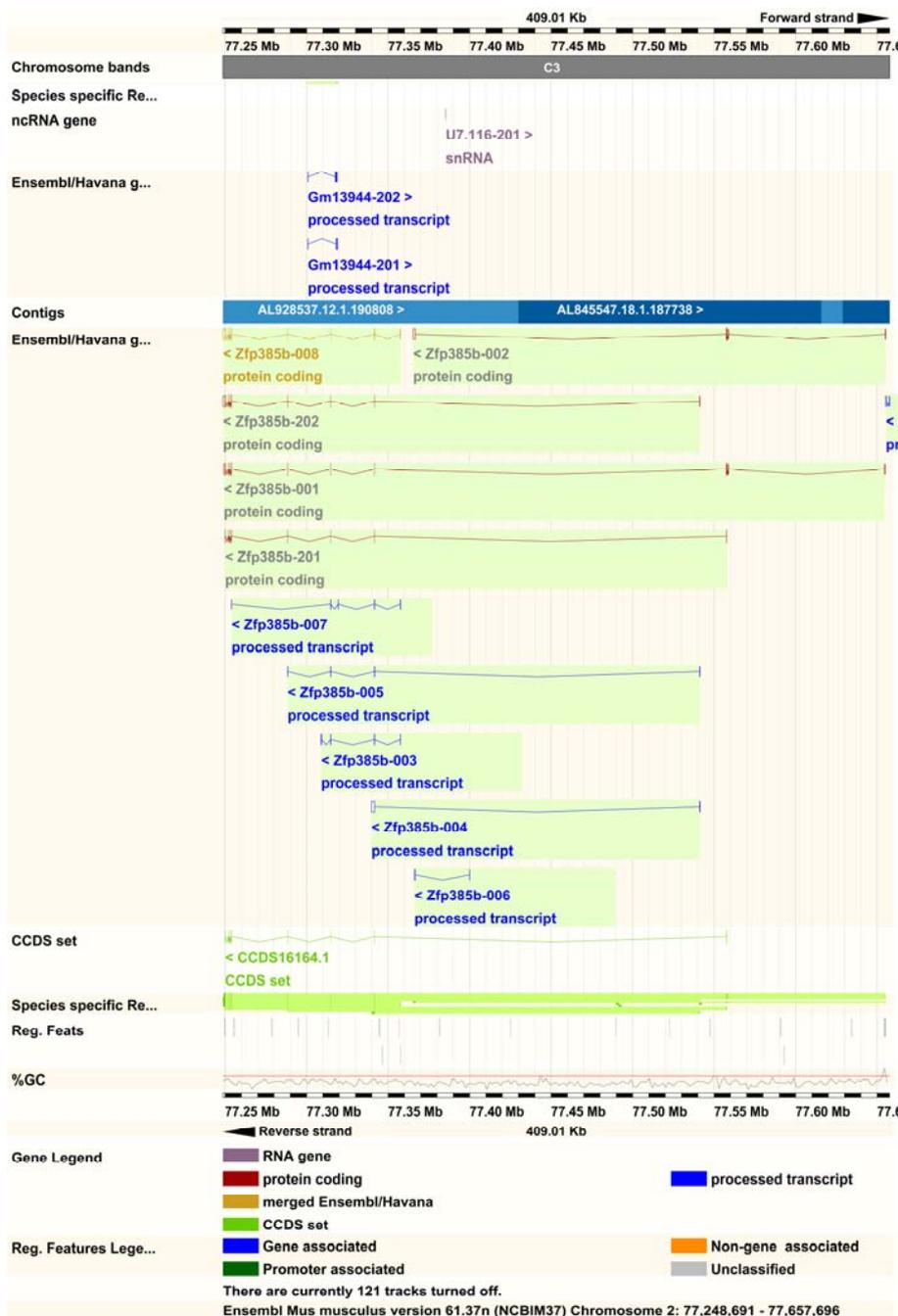


Abb.4.16: Auszug aus der Ensembl-Datenbank zur Darstellung genereller Informationen über Zfp533

In Abbildung 4.17 ist eine Übersicht über die Sequenzähnlichkeit von Zfp533 im Maus-, Mensch- und Zebrafischgenom dargestellt.

```

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

ref|NP_848838|          MNMATFLRGFEKGLKNDRPGDQFSKEKKKILFSFCEVCNIQLNSAAQAQVHYDGKSHRK
ref|NP_689733|          MNMANFLRGFEKGIKNDRPEDQLSKEKKKILFSFCEVCNIQLNSAAQAQVHSGKSHRK
ref|XP_001338404|      -----

ref|NP_848838|          RVKQLSDGQPPPPVQGSVPLLAGPCPCPGPGPNTSTGSACHTTTLPALVRTPTLMMQPSL
ref|NP_689733|          RVKQLSDGQPPPPAQAS-----PSSNSSTGSTCHTTTLPALVRTPTLMMQPSL
ref|XP_001338404|      -----MSNRVDVHRAAALNEANKTNNIQLQHTHT
                                     *      *      *

ref|NP_848838|          DIKPFMSFPVDSSSAVGLFPNFNTMDPVQKAVINHTFGVSIIPKKKQVISCNVCQLRFNS
ref|NP_689733|          DIKPFMSFPVDSSSAVGLFPNFNTMDPVQKAVINHTFGVSIIPKKKQVISCNVCQLRFNS
ref|XP_001338404|      -----FQDTLDSGFQ-----MNAVQKAVLHHTISTSAPSKRK-AMSCGVCHLRFNS
                                     **      *      *****      *      *      *      *      *      *      *      *

ref|NP_848838|          DSQAEAHYKGSKHAKKVKALEATK---NKPKMVPSKDSAKANPSCSIRPGTGDSSD-KSE
ref|NP_689733|          DSQAEAHYKGSKHAKKVKALDATK---NKPKMVPSKDSAKANPSCSITPITGNNSD-KSE
ref|XP_001338404|      QSQALAHYKGTKHAHKKLSLDAPKCLKHKSSASRENTKELPKGLVPSTVAYSEDRKGG
                                     ***      *****      *      *      *      *      *      *      *      *

ref|NP_848838|          DKGKIKATSS-----SQPSGSEGGSFLLK-----SGTTPPLPGAIAISPSKSTNGAPGSV
ref|NP_689733|          DKGKIKASS-----SQPSSESGSFLLK-----SGTTPPLPGAATSPSKSTNGAPGTV
ref|XP_001338404|      DAGALVAPSSPSSAPASGPSTDTSTESASVSGEEDGSSCTPVPP-----ESEENHSGTSP
                                     *      *      *      *      *      *      *      *      *

ref|NP_848838|          AESEEEKAKKLLYCSLCKVAVNSLSQLEAHNTGSKHKTMVEARNAGAPIKSYPRPGSRLK
ref|NP_689733|          VESEEEKAKKLLYCSLCKVAVNSLSQLEAHNTGSKHKTMVEARNAGAPIKSYPRPGSRLK
ref|XP_001338404|      SETEDEKALRLLYCSLCKVAVNSVSLDAHNSGTHKHKTMLEARSNGSISKFPRTGQKSK
                                     *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

ref|NP_848838|          VQNGSK---GSGLQNKMFHCEICDVHVNSEIQLKQHISSRRHKDRVAGKPLPKYSPYNK
ref|NP_689733|          MQNGSK---GSGLQNKTFHCEICDVHVNSEIQLKQHISSRRHKDRVAGKPLPKYSPYNK
ref|XP_001338404|      LPTDASKTADTGLQNKTFHCETCDVRVNSETQLKQHISSRRHKDRAAGKPAKPKFSPYTK
                                     *****      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

ref|NP_848838|          LQRSPSILAALKLAFQKDLMKPLA---PTFLSSPL-AAAAVSSALSIPRPSASLQAAA
ref|NP_689733|          LQRSPSILAALKLAFQKDMMKPLA---PAFLSSPLAAAAAVSSALSIPRPSASLQAPA
ref|XP_001338404|      TQRGASKQTVKMPVVGKDLCSPLTTRIMPShLAAVAAAAASIGSTFPLRACHNPTLFQTQS
                                     **      *      *      *      *      *      *      *      *      *

ref|NP_848838|          IPPALLRPGHGPIRATPASILFAPY
ref|NP_689733|          IPPALLRPGHGPIRATPASILFAPY
ref|XP_001338404|      LPAALLRPAGPIRTAHTPLLFAPY
                                     *      *****      *      *      *      *

```

Abb. 4.17: Abgleich von Zfp533 im Maus-, Mensch- und Zebrafischgenom. Übereinstimmungen sind durch einen Stern gekennzeichnet.

In der Ensembl-Datenbank wurden die Znf_U1 und die Znf_C2H2-like Domäne für Zfp533 gefunden (Abb. 4.18). Diese Domänen gehören zur Klasse der Zinkfingerproteine.

Die Funktion von Zfp533 ist unbekannt.

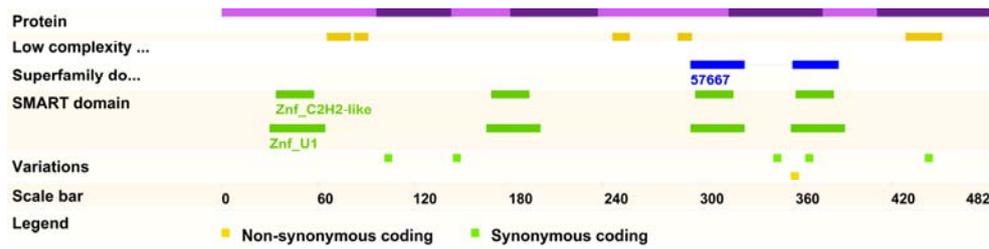


Abb 4.18: Auszug aus der Ensembl-Datenbank zur Darstellung der Proteindomänen von Zfp533.

Die folgende Abbildung 4.19 zeigt die Expression von Zfp533 in einigen Geweben. Unter anderem ist eine Expression im Herzgewebe dargestellt.

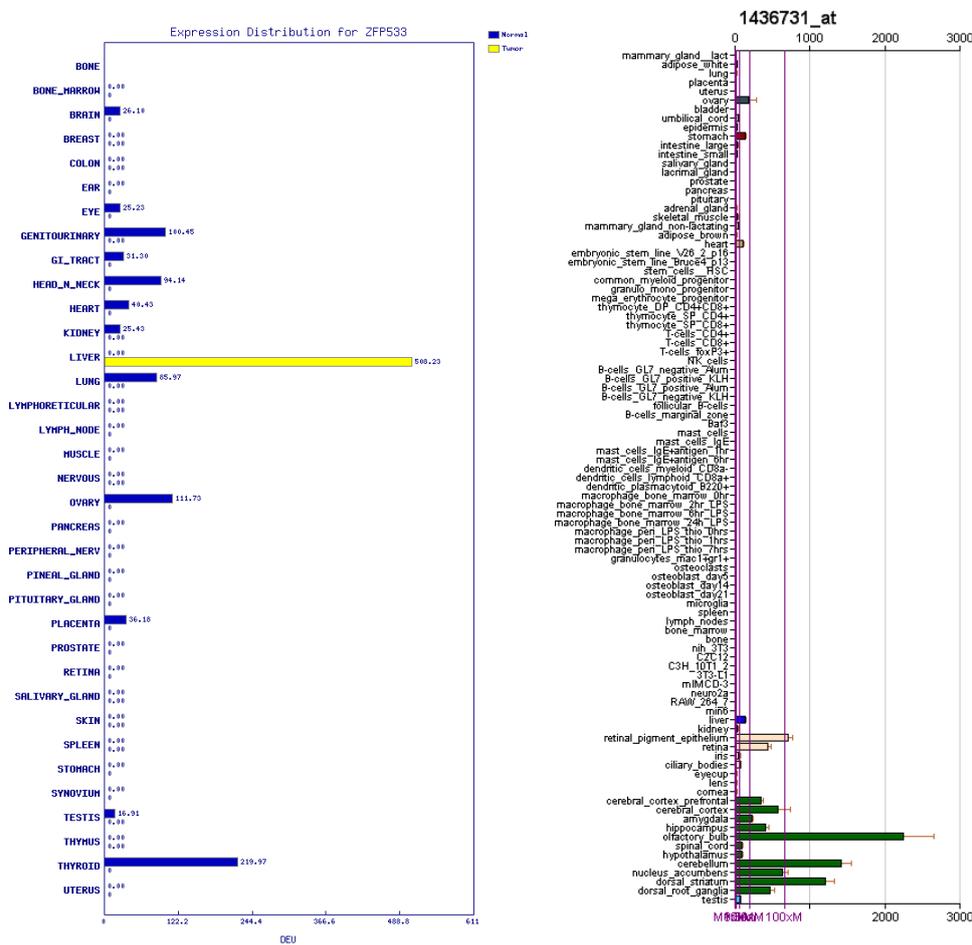


Abb. 4.19: EST Abgleich in der Gene-Hub-GEPIS- und bioGPS-Datenbank zur Darstellung der Expression von Zfp533 in verschiedenen Geweben

4.2 Identifikation der kandidatengen-spezifischen Expressionsdomänen in Zebrafischembryonen

Für 5 der insgesamt 6 Kandidatengene konnte eine herzspezifische Expression nachgewiesen werden (Abb. 4.20). Alle Gene sind jedoch auch noch in anderen Geweben exprimiert, was im folgenden für jedes der 6 Gene beschrieben wird.

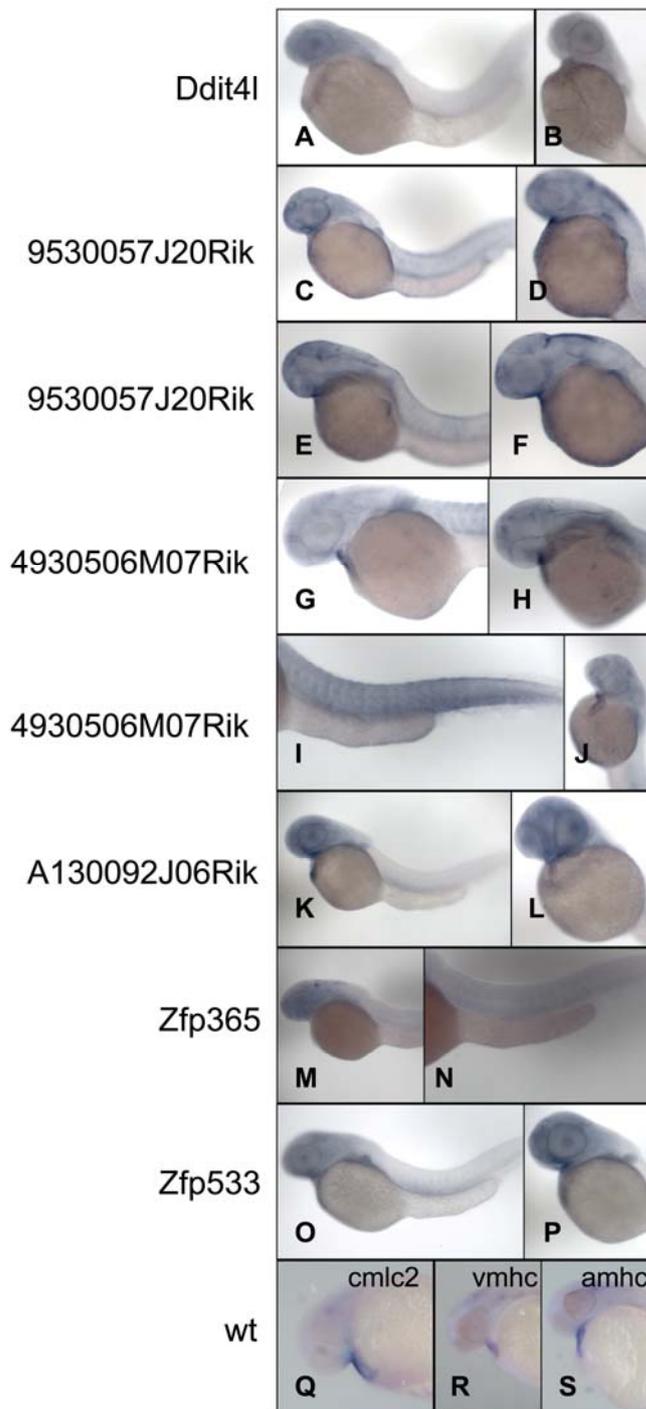


Abb 4.20: Herzspezifische Expressionsmuster von 5 der 6 Kandidatengene. Zum Vergleich wurde *amhc*, ein Marker der nur im Atrium exprimiert wird (Berdougo et al., 2003) (S), *vmhc* (ventricular myosin heavy chain) (R) und *cmlc2* (cardiac myosin light chain 2) (Yelon et al., 1999) (Q) herangezogen. Die Embryonen zeigen Genexpression in der Herzregion (A-H, J-L und O-P). Zudem zeigen die Gene *zf4930506M07Rik* (I), *zfZfp365* (N) und *zfZfp533* (O) Expression in den Somiten. Im Fall von *zf4930506M07Rik* (H), *zf9530057J20Rik* (E+F) und *zfZfp533* (P) auch in den Adern der Kopfregion.

Alle Embryonen befinden sich im long pec Stadium (48hpf); ventrale Ansicht, anterior oben

Abbildung 4.20 zeigt die Expression der 6 Kandidatengene (A-P) im Vergleich zu den spezifischen Markern *cmhc2* (cardiac myosin light chain 2), *vmhc* (ventricular myosin heavy chain) (beide Yelon et al., 1999) und *amhc* (atrial myosin heavy chain) (Berdougo et al., 2003) (Q-S). Mit Ausnahme von *Zfp365* zeigen alle Gene eine Herzfärbung. Allerdings unterscheiden sich ihre Expressionsmuster von denen der Markergene. Es scheint als wäre das Gewebe der Expressiondomäne dünner oder die Zellzahl geringer. Im Fall von *Ddit4l* erscheint die Färbung eher im Bereich der zuführenden Blutgefäße zu liegen.

Neben der Herzfärbung weisen alle Embryonen eine Färbung im Kopfbereich auf. Zudem zeigen die Gene *zf4930506M07Rik* (Abb. 4.20 I), *zfZfp365* (Abb. 4.20 N) und *zfZfp533* (Abb. 4.20 O) Expression in den Somiten und im Fall von *zf4930506M07Rik* (Abb. 4.20 H), *zf9530057J20Rik* (Abb. 4.20 E+F) und *zfZfp533* (Abb. 4.20 P) auch in den Adern der Kopfregion.

4.3 Ermittlung der 5'UTR zur Herstellung von genspezifischen Morpholino-modifizierten antisense Oligonukleotiden (MO)

Bei den sechs Kandidatengenen handelt es sich um Gene, deren Funktion noch unbekannt ist. Da eine Splice-Morpholino-Strategie evtl. zu unübersichtlichen Nebeneffekten führt, wurde eine 5'MO basierende Strategie gewählt. Hierfür ist es notwendig die 5'UTR zu identifizieren. Nach Angaben des Herstellers (Gene Tools) ist die Effizienz des *knockdown* um so größer, desto näher der Morpholino gegen das 5'-Ende des Gens gerichtet ist. Zu diesem Zweck wurden die 5'Enden der Kandidatengene mit BlastN analysiert (Altschul et al., 1997).

Hierzu wurden verschiedene Zebrafisch-Datenbanken durchmustert (siehe Kapitel 3, Abschnitt 3.4.2). Für *zfA130092J06Rik* und *zfZfp533* musste außerdem der Beginn des ORF (*open reading frame*) ermittelt werden.

Die, aufgrund bioinformatischer Weise erhaltenen, 5'Enden wurden mittels eines *Primer walks* verifiziert. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2.1 aufgeführt. Die Primer wurden so angelegt, dass sie in Abständen von 100 bis 150 bp aufeinander folgten.

In der folgenden Abbildung sind die 5'UTR-Regionen und der Beginn des ORF der Gene gezeigt:

4930506M07Rik:

ttatccttagcaataagagacttattagtagacataatgtgtatataaatatgtaggctaacataaaaatattttgtgacaatt
aataccaccaacaactggggtattaaaattattttggaagtgcgtgtgcaagtcattgggtggttttattcacttattcaa
ttattatatttcacaaattattttacttagtcattttgtctagtgatgcagtgctctcgctctttatagcagtaattctagt
gtctgacagaaacctgtggtttacatggtcagtttaacggtgaacacacgcgggggaatgtaggtgtgttcaggtaaatcat
ttcctgtcccgttgcgctctgcttactgtttttgtcggaagagtattaaatcatttaccacaactttcaatg

9530057J20Rik:

Acagttttgaaatgatctaaatgattttcttaaatggtgcatatggctttgtgataattttcttttttcagcttgctcaaaac
atcaaacgaaaaaccgcatg

A130092J06Rik:

ccttcaaaccgcgtctagtcctgcttattctgagtgctcacggtgtgtagtggtgcgttattcaaagtgtgtagtg
tgcaatattttgatggccatgccttctagtgctgcttataactgagggttattccttgatagtggtgcatta
ttctgaggggtcatcccttctgcaacgtgacttattctaaagtgtgtagtggtgcattatttctagggcatct
cttctaaagtgtgcatacttctaaagggttatcccttctgctagtgtagcagaatgggtc
atcccttctgcaagtgtgcactaattcttcagtgcttagtggtgatgattctgggggtcatcccttctgt

Ddit4I:

Cggatccgacgagtggttttgcaggatctctgcagactccagcagctgccgcactcaatccgcttctcacacac
gcctttgttcgctcttagtctttgttacggactattcaccaacagaaaagccatcagacttgaggatacaca
cggcttgatatacgactgaacaatg

Zfp365:

agttttattgtctagtttattttattgtaaagcactttggatcaactacagttgtgttaaattgggctctata
aataaagtttgccttgtcttgccttgcctatgaaatctaactctgtgtgcccaggtcttttaatatgtttt
ttatgttgttggacaggtggtctgtcatg

Zfp533:

acatctgtcagctccgctttaattcagatagccaagccgaggcgcactacaaaggcagtaaacatgccaaagaa
gctcaaagcacaggagtcaccgaaaaataagcagaaaagtgcagtcgcccaggacagcggcactaagacaatc
accagcacctccaccaacaccaccaccaccaccaccactcctcctgcactgcagtcactgccagctgct
ctgacccaaaacagagaaaagtacagagccgttggctgcgcaaaagtcccagcctccccgcaagcttttgtgcc
agctcctgttgcgcccgcggtggcattagtgcccagccttgcagacagcaccggtgcatgcccagcccacc
accgagccgacaggactcgcagtgccctgaagaacacctccaacca

Abb. 4.21 : 5'UTR Bereich und der Beginn des ORF der 5 Kandidatengene. Das Start-ATG ist grau unterlegt. Morpholinosequenz (unterstrichen)

4.4 knockdown der Kandidatengene durch Injektion von genspezifischen Morpholino-modifizierten antisense Oligonukleotiden (MO)

Zur Klärung der Frage, ob und in welcher Weise die Kandidatengene an der Funktion oder Entwicklung des Herzens bzw. Vaskularsystems beteiligt sind, wurden Injektionen mit Morpholino-modifizierten antisense Oligonukleotiden (MO) durchgeführt. Die Wirkungsweise der Morpholino-modifizierten antisense Oligonukleotide liegt in der Anlagerung an die zu ihrer Sequenz komplementäre mRNA, und somit in der Hinderung der Translation. Folglich wird das betreffende Gen zwar noch transkribiert, die Translation zum Protein bleibt allerdings weitestgehend aus.

Die Injektionen erfolgten jeweils mit zwei genspezifischen Morpholinos gegen 4930506M07Rik (zfM07-I_anti5'^{MO} und zfM07-II_anti5'^{MO}), 9530057J20Rik (zfJ20-I_anti5'^{MO} und zfJ20-II_anti5'^{MO}), A130092J06Rik (zfMHC5-I_anti5'^{MO} und zfMHC5-II_anti5'^{MO}), Ddit4l (zfDdit4l-I_anti5'^{MO} und zfDdit4l-II_anti5'^{MO}), Zfp365 (zfZfp365-I_anti5'^{MO} und zfZfp365-II_anti5'^{MO}) sowie Zfp533 (zfZfp533-I_anti5'^{MO} und zfZfp533-II_anti5'^{MO}). Außerdem wurde ein Kontroll-Morpholino injiziert, dessen Sequenz zufällig zusammengesetzt war. Die Dosis des Morpholino wurde so eingestellt, dass die durch Injektion verursachte Todesrate bei 5-10% lag. Zu hohe MO-Konzentrationen können toxische Nebeneffekte mit sich bringen und sogar tödlich auf den Embryo wirken (Heasman, 2002).

Die morphologischen Defekte der Morpholino-injizierten Embryonen wurden mit Hilfe des Stereomikroskops identifiziert. Zur leichteren Visualisierung der Defekte am Herzen und den Adern wurden transgene Zebrafischlinien eingesetzt. Hierzu wurde zum einen die *fli::EGFP* Linie benutzt, weil diese den fluoreszenten Reporter GFP nur im Vaskularsystem exprimiert (Lawson et al., 2002). Mit Hilfe der transgenen Linie konnten die Defekte unter dem Fluoreszenzstereomikroskop sichtbar gemacht werden. Zusätzlich kamen noch die *cm1c2::gfp* Linie (Burns et al., 2005) und die *Gata1::DsRed* Linie (Traver et al., 2003) zum Einsatz.

Zur Überprüfung der Spezifität der verwendeten Morpholino-modifizierten antisense Oligonukleotide, wurde die zu ihrer Sequenz komplementäre mRNA mit Hilfe eines Kontrollkonstruktes (siehe Kapitel 3.1.9) *in vitro* transkribiert. Das

Konstrukt enthielt die Zielsequenz der jeweiligen Morpholino-modifizierten antisense Oligonukleotide vorgeschaltet zu einer EGFP-Reportersequenz. Die Injektion dieses Konstruktes alleine, als auch in Kombination mit dem Kontroll-Morpholino führte für alle 6 Gene zu einer deutlichen Fluoreszenz in den Embryonen. Im Gegensatz dazu führte die Injektion der mRNA in Kombination mit dem entsprechenden MO zu einer Unterdrückung der EGFP-Expression, was auf eine spezifische Bindung des MO an die 5'UTR zurückzuführen ist (Abb. 4.22)

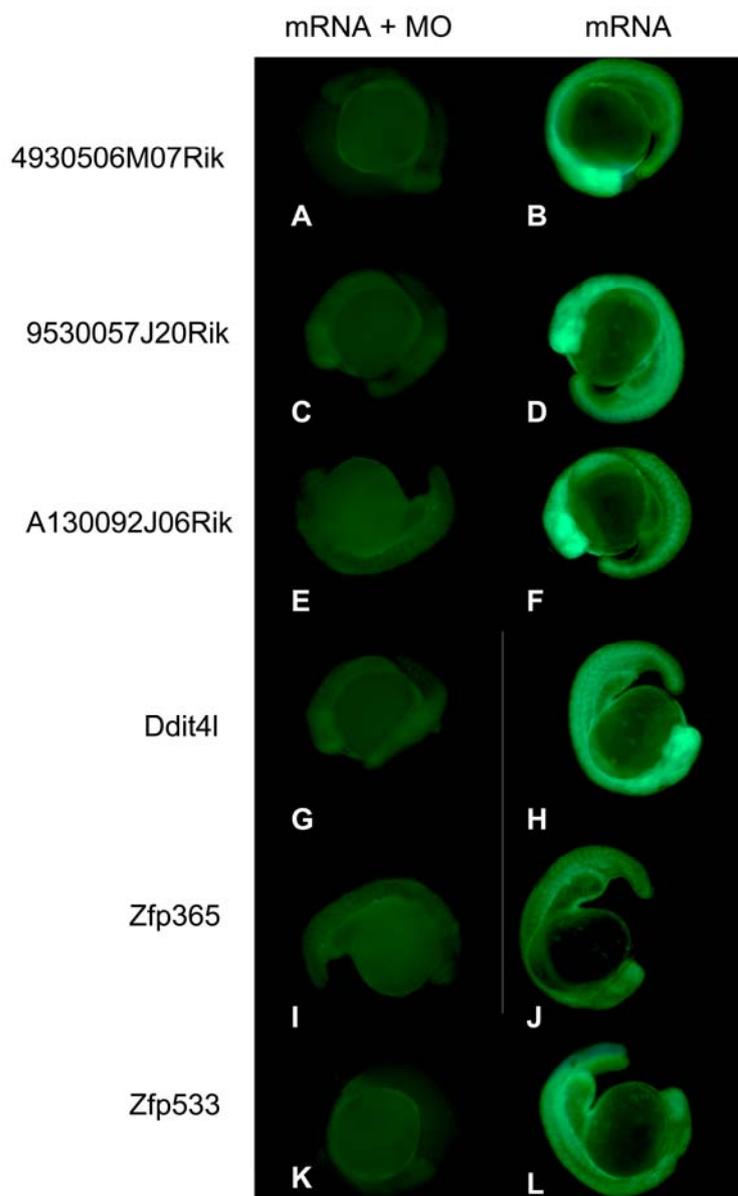


Abb. 4.22: Kontrolle der Spezifität der verwendeten Morpholino-modifizierten antisense Oligonukleotide durch den Effekt der MO auf die jeweilige MO-Zielsequenz+EGFP mRNA. Die mRNA wurde alleine (B, D, F, H, J, L) oder in Kombination mit dem entsprechenden MO (A, C, E, G, I, K) injiziert. Letzteres führte zur Unterdrückung der EGFP-Expression. Embryonen: 20 hpf

Eine andere Methode, die Defekte zu verdeutlichen, war die *in situ* Hybridisierung mit einem spezifischen Herzmarker. So diente *cm1c2* (cardiac myosin light chain 2) (Yelon et al., 1999) zur Analyse des gesamten Herzens, z.B. in Bezug auf die Größe oder Anordnung der beiden Herzkammern zueinander.

Desweiteren konnten mit einer Diaminofluorenlösung die roten Blutzellen in den Morpholino-injizierten Embryonen visualisiert werden.

4.5 Morphologische Veränderungen nach Injektion genspezifischer MOs

4.5.1 Auswirkungen der zfM07-I_anti5^{MO} und zfM07-II_anti5^{MO} Injektionen

Der zfM07-I_anti5^{MO} und zfM07-II_anti5^{MO} wurde in einer Konzentration von 0,75 mM und 1 mM injiziert. Eine Übersicht über die beobachteten Defekte und deren Penetranz ist in Tabelle 4.2 dargestellt.

Tabelle 4.2: Übersicht über die Injektionen mit zfM07-I_anti5^{MO} und zfM07-II_anti5^{MO} und dazugehörige Kontrollen

Behandlung der Embryonen	Konz. mM	Anzahl Larven gesamt	Anzahl Experimente	Kein Looping des Herzens		Vaskulardefekt		Blutansammlungen		Gehirn-Defekt		Herzödem	
				Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
uninjiziert	-	283	15	0	0	0	0	1	0,35	0	0	3	1,06
4930506M07Rik MO_1	0,75	52	2	23	44	37	71	24	46	21	40	19	37
	1	127	4	103	81	89	70	72	57	74	58	93	73
4930506M07Rik MO_2	0,75	68	2	26	38	48	71	31	46	23	34	24	35
	1	118	4	98	83	90	76	75	64	81	69	88	75
Random Seq. MO	1	79	3	0	0	1	1,3	2	2,5	0	0	2	2,5

Verglichen mit Embryonen, die mit dem Kontroll-Morpholino (Random Sequenz MO) injiziert wurden, zeigten die mit dem zfM07-I_anti5^{MO} und zfM07-II_anti5^{MO} injizierten Tiere die in den folgenden Abbildungen dargestellten morphologischen Defekte mit hoher Penetranz (siehe auch Tabelle 4.2). Die Injektion des zfM07-

I_anti5^{MO} und zfM07-II_anti5^{MO} unterdrückte ein Looping des Herzens (MO1: ø 62,5 % der Tiere; MO2: ø 60,5 % der Tiere) (Abb. 4.23 C) und verursachte eine Blutansammlung im Bereich der Kopfadern (MO1: ø 51,5 % der Tiere; MO2: ø 55 % der Tiere) (Abb. 4.24 D) teilweise gepaart mit Gehirndefekten (MO1: ø 49 % der Tiere; MO2: ø 51,5 % der Tiere) (Abb. 4.23 B). Zusätzlich führte die Injektion zu Störungen im Aufbau des Vaskularsystems im Bereich der Kopfadern und des Rumpfes (MO1: ø 70,5% der Tiere; MO2: ø 73,5 % der Tiere) (Abb 4.23 G). Die intersegmentalen Adern (Intersegmental vessels = ISV) (Isogai et al., 2001) waren unvollständig, nicht richtig miteinander verknüpft bzw. fehlten an einigen Stellen.

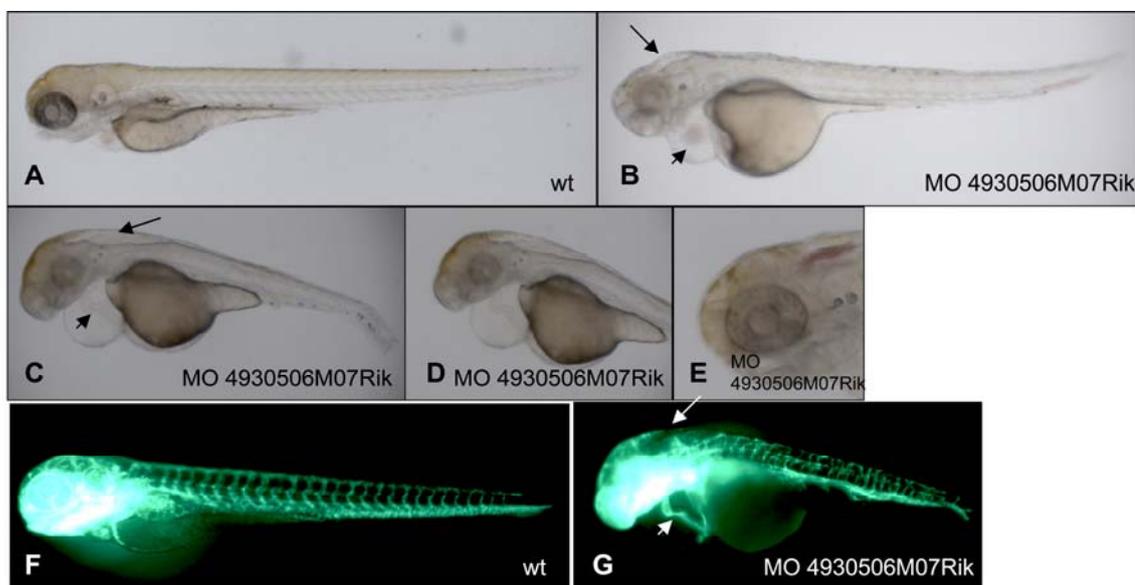


Abb. 4.23: Morphologische Defekte nach Injektion von zfM07-I_anti5^{MO} und zfM07-II_anti5^{MO} (A) Wildtyp Kontrolle, (B) nach Injektion von 0,75 mM zfM07-I_anti5^{MO}, (C-E) nach Injektion von 0,75 mM zfM07-II_anti5^{MO}, (F) Wildtyp Kontrolle fli::EGFP Linie, (G) nach Injektion von 0,75 mM zfM07-II_anti5^{MO} in fli::EGFP Linie
Larven: 3dpf; Pfeil: Gehirndefekt; Pfeilkopf: Herzdefekt

Die Blutansammlungen in den Morpholino-injizierten Tieren konnten zusätzlich mit Hilfe der Diaminofluoren- (DAF) Färbung visualisiert werden (Abb. 4.24 D, durch den Pfeil angezeigt).

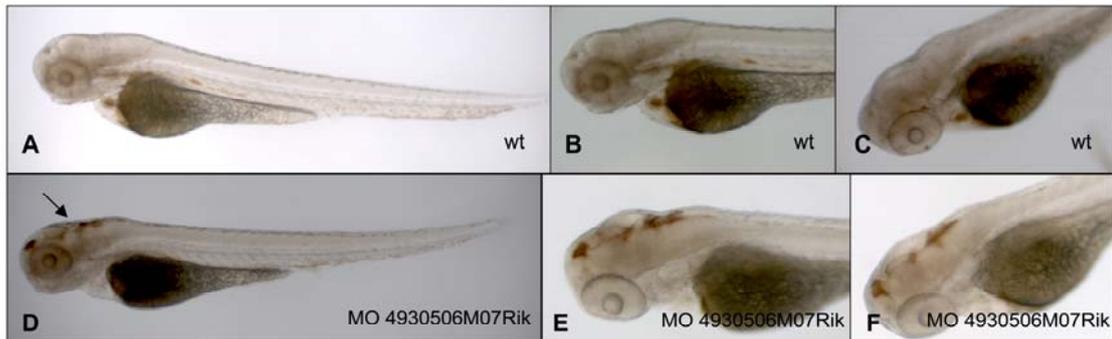


Abb. 4.24: Diaminofluorenfärbung zur Markierung von Erythrozyten (A-C) Wildtyp Kontrolle, (D-F) nach Injektion von 0,75 mM zfM07-I_anti5^{MO} Larven: 3dpf; Pfeil: Blutansammlung

Die Expressionsdomänen von zf4930506M07Rik im Herz und in den Adern des Kopfes lassen sich in Zusammenhang bringen mit den beobachteten Effekten. Die Morpholino-injizierten Embryonen zeigen, dass der *knockdown* des Gens zu Herzdefekten und Defekten im Vaskularsystem führt, teilweise gepaart mit Blutansammlungen im Kopf. Diese Übereinstimmungen lassen vermuten, dass zf4930506M07Rik Einfluss auf die Entwicklung oder Funktion des kardiovaskulären Systems hat.

4.5.2 Auswirkungen der zfJ20-I_anti5^{MO} und zfJ20-II_anti5^{MO} Injektionen

Der zfJ20-I_anti5^{MO} und zfJ20-II_anti5^{MO} wurde in einer Konzentration von 0,75 mM und 1 mM injiziert. Eine Übersicht über die beobachteten Defekte und deren Penetranz ist in Tabelle 4.3 dargestellt.

Tabelle 4.3 Übersicht über die Injektionen mit zfJ20-I_anti5^{MO} und zfJ20-II_anti5^{MO} und dazugehörige Kontrollen

Behandlung der Embryonen	Konz. mM	Anzahl Larven gesamt	Anzahl Experimente	Gestörte Notochordbildung		Verkürzte Körperachse		Gekrümmter Schwanz	
				Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
uninjiziert	-	257	15	0	0	1	0,4	0	0
9530057J20Rik MO_1	0,75	63	2	36	57	27	43	18	29
	1	124	4	109	88	93	75	78	63
9530057J20Rik MO_2	0,75	58	2	32	55	19	33	21	36
	1	132	4	112	85	94	71	69	52
Random Seq. MO	1	65	3	0	0	1	1,5	1	1,5

Die Injektion von zfJ20-I_anti5^{MO} und zfJ20-II_anti5^{MO} führte in den injizierten Tieren zu einigen morphologischen Defekten mit hoher Penetranz (siehe auch Tabelle 4.3). Zum Vergleich dienten Embryonen, die mit dem Kontroll-Morpholino (Random Sequenz MO) injiziert wurden. Die Injektion des zfJ20-I_anti5^{MO} und zfJ20-II_anti5^{MO} verursachte eine gestörte Notochordbildung (MO1: ø 72,5 % der Tiere; MO2: ø 70 % der Tiere) (Abb. 4.25 D+E), eine verkürzte Körperachse im Vergleich zum Wildtyp (MO1: ø 59 % der Tiere; MO2: ø 52 % der Tiere) (Abb. 4.25 C+E) und einen gekrümmten Schwanz (MO1: ø 46 % der Tiere; MO2: ø 44 % der Tiere) (Abb. 4.25 E). Die morphologischen Defekte sind in der folgenden Abbildung gezeigt.

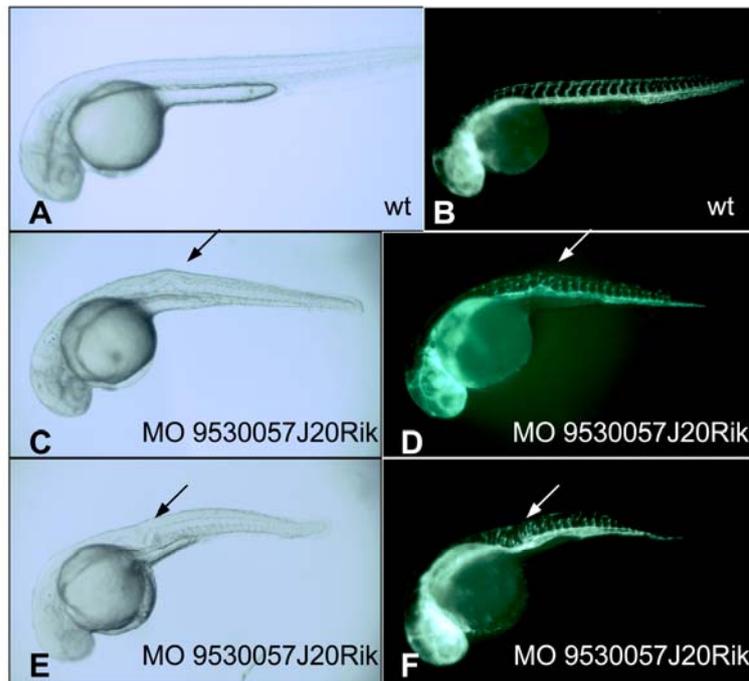


Abb. 4.25: Morphologische Defekte nach Injektion von $zfJ20-I_anti5^{MO}$ und $zfJ20-II_anti5^{MO}$ (A) Wildtyp Kontrolle, (C) nach Injektion von 0,75 mM $zfJ20-I_anti5^{MO}$, (E) nach Injektion von 0,75 mM $zfJ20-II_anti5^{MO}$, (B) Wildtyp Kontrolle *fli::EGFP* Linie, (D) nach Injektion von 0,75 mM $zfJ20-I_anti5^{MO}$ in *fli::EGFP* Linie, (F) nach Injektion von 0,75 mM $zfJ20-II_anti5^{MO}$ in *fli::EGFP* Linie
Larven: 3dpf; Pfeil: Notochorddefekt

Zusätzlich zu den oben aufgeführten morphologischen Defekten, deutet eine *in situ* Hybridisierung in den Morpholino-injizierten Embryonen auf eine Vergrößerung des Herzens hin (Abb. 4.26). Die Expressionsdomäne von *cmlc2* ist in $zfJ20-I_anti5^{MO}$ und $zfJ20-II_anti5^{MO}$ injizierten Tieren deutlich größer (MO1: \varnothing 64 % der Tiere; MO2: \varnothing 61 % der Tiere) im Vergleich zum Wildtyp.

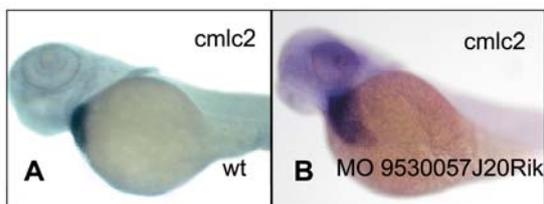


Abb. 4.26 Auswirkungen der $zfJ20-I_anti5^{MO}$ und $zfJ20-II_anti5^{MO}$ -Injektionen auf die Expressionsdomäne von *cmlc2* im Herzen
(A) *cmlc2* Expression im Wildtyp, (B) nach Injektion von 0,75 mM $zfJ20-I_anti5^{MO}$
Larven: 3dpf

4.5.3 Auswirkungen der zfMHC5-I_anti5^{MO} und zfMHC5-II_anti5^{MO}

Injektionen

Der zfMHC5-I_anti5^{MO} und zfMHC5-II_anti5^{MO} wurde in einer Konzentration von 0,75 mM und 1 mM injiziert. Eine Übersicht über die beobachteten Defekte und deren Penetranz ist in Tabelle 4.4 dargestellt.

Tabelle 4.4 Übersicht über die Injektionen mit zfMHC5-I_anti5^{MO} und zfMHC5-II_anti5^{MO} und dazugehörige Kontrollen

Behandlung der Embryonen	Konz. mM	Anzahl Larven gesamt	Anzahl Experimente	Vergrößert es Atrium		Ventrikel schlägt nicht		Kein Looping des Herzens		Kein/schwacher Blutfluss nach 4dpf	
				Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
uninjiziert	-	197	15	1	0,5	0	0	1	0,5	0	0
A130092J06Rik MO_1	0,75	54	2	24	44	21	39	26	48	18	33
	1	128	4	97	76	88	69	91	71	78	61
A130092J06Rik MO_2	0,75	61	2	23	38	19	31	20	33	22	36
	1	129	4	102	79	79	61	105	81	66	51
Random Seq. MO	1	63	3	2	3,1	0	0	1	1,6	1	1,6

Die morphologischen Defekte, die nach Injektion von zfMHC5-I_anti5^{MO} und zfMHC5-II_anti5^{MO} in den Tieren auftraten, verglichen mit Embryonen, die mit dem Kontroll-Morpholino (Random Sequenz MO) injiziert wurden, waren alle auf das kardiovaskuläre System bezogen. Die injizierten Tiere zeigten diese Defekte mit hoher Penetranz (siehe auch Tabelle 4.4). Die folgenden Abbildungen geben einen Einblick in die Auswirkungen der Morpholinoinjektion. Die Injektion des zfMHC5-I_anti5^{MO} und zfMHC5-II_anti5^{MO} unterdrückte ein Looping des Herzens (MO1: ø 59,5 % der Tiere; MO2: ø 57 % der Tiere) (Abb. 4.27 C+E), verursachte eine Vergrößerung des Atriums (MO1: ø 60 % der Tiere; MO2: ø 58,5 % der Tiere) (Abb. 4.27 C+E) und führte dazu, dass der Ventrikel keine eigene spontane Kontraktion zeigte (MO1: ø 54 % der Tiere; MO2: ø 46 % der Tiere). Teilweise waren diese Defekte gepaart mit einem schwachen bzw. gar nicht vorhandenen Blutfluss nach 4dpf (MO1: ø 47 % der Tiere; MO2: ø 43,5 % der Tiere).

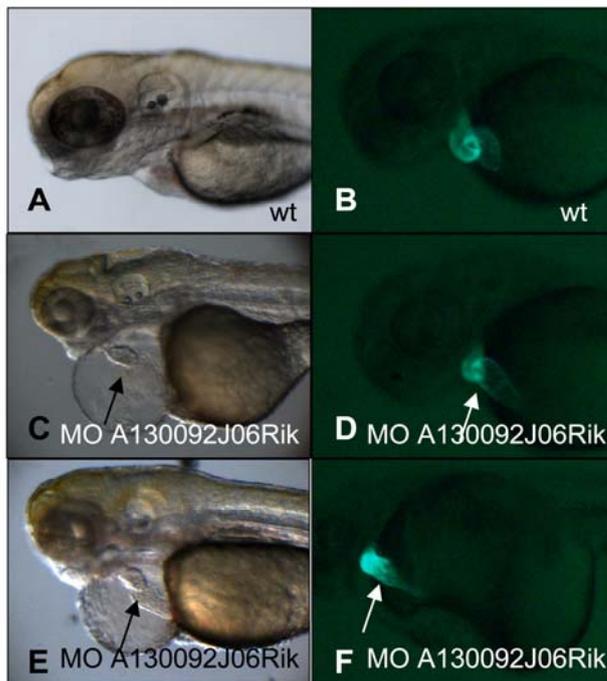


Abb. 4.27: Morphologische Defekte nach Injektion von zfMHC5-I_anti5^{MO} und zfMHC5-II_anti5^{MO} (A) Wildtyp Kontrolle, (C) nach Injektion von 0,75 mM zfMHC5-I_anti5^{MO}, (E) nach Injektion von 0,75 mM zfMHC5-II_anti5^{MO}, (B) Wildtyp Kontrolle *cmlc2::gfp* Linie, (D) nach Injektion von 0,75 mM zfMHC5-I_anti5^{MO} in *cmlc2::gfp* Linie, (F) nach Injektion von 0,75 mM zfMHC5-II_anti5^{MO} in *cmlc2::gfp* Linie
Larven: 3dpf; Pfeil: Herzdefekte

Zusätzlich zu den in Abbildung 4.27 gezeigten Herzdefekten, konnte auch mittels *in situ* Hybridisierung eine Vergrößerung des Atriums und ein nicht vorhandenes Looping des Herzens in den Morpholino-injizierten Embryonen dargestellt werden (Abb. 4.28). Die Expressionsdomäne von *cmlc2* ist in zfMHC5-I_anti5^{MO} und zfMHC5-II_anti5^{MO} injizierten Tieren deutlich größer im Vergleich zum Wildtyp.

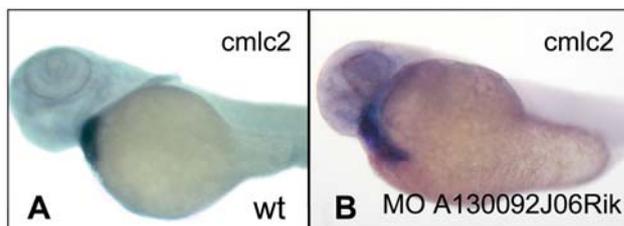


Abb. 4.28 Auswirkungen der zfMHC5-I_anti5^{MO} und zfMHC5-II_anti5^{MO} -Injektionen auf die Expressionsdomäne von *cmlc2* im Herzen
(A) *cmlc2* Expression im Wildtyp, (B) nach Injektion von 0,75 mM zfMHC5-I_anti5^{MO}
Larven: 3dpf

Es gibt eine Übereinstimmung der Ergebnisse. Die Expression des Gens im Herz, die bei der *in situ* Hybridisierung detektiert wurde, kann durch *knockdown* des

Gens bestätigt werden. Eine Injektion von zfMHC5-I_anti5^{MO} und zfMHC5-II_anti5^{MO} führt zu Herzdefekten.

4.5.4 Auswirkungen der zfDdit4I-I_anti5^{MO} und zfDdit4I-II_anti5^{MO}

Injektionen

Der zfDdit4I-I_anti5^{MO} und zfDdit4I-II_anti5^{MO} wurde in einer Konzentration von 0,75 mM und 1 mM injiziert. Eine Übersicht über die beobachteten Defekte und deren Penetranz ist in Tabelle 4.5 dargestellt.

Tabelle 4.5 Übersicht über die Injektionen mit zfDdit4I-I_anti5^{MO} und zfDdit4I-II_anti5^{MO} und dazugehörige Kontrollen

Behandlung der Embryonen	Konz. mM	Anzahl Larven gesamt	Anzahl Experimente	Vergrößertes Atrium		Blutansammlungen		Herzödem	
				Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
uninjiziert	-	224	15	1	0,4	0	0	1	0,4
Ddit4I MO_1	0,75	61	2	0	0	1	1,6	1	1,6
	1	133	4	2	1,5	0	0	1	0,8
Ddit4I MO_2	0,75	67	2	1	1,5	0	0	0	0
	1	114	4	3	2,6	1	0,9	1	0,9
Random Seq. MO	1	74	3	2	2,7	1	1,4	3	4,1

Die Injektion von zfDdit4I-I_anti5^{MO} und zfDdit4I-II_anti5^{MO} zeigte keine signifikanten morphologischen Auswirkungen auf die Embryonen (Tab. 4.5)

4.5.5 Auswirkungen der zfZfp365-I_anti5^{MO} und zfZfp365-II_anti5^{MO}

Injektionen

Der zfZfp365-I_anti5^{MO} und zfZfp365-II_anti5^{MO} wurde in einer Konzentration von 0,75 mM und 1 mM injiziert. Eine Übersicht über die beobachteten Defekte und deren Penetranz ist in Tabelle 4.6 dargestellt.

Tabelle 4.6 Übersicht über die Injektionen mit zfZfp365-I_anti5^{MO} und zfZfp365-II_anti5^{MO} und dazugehörige Kontrollen

Behandlung der Embryonen	Konz. mM	Anzahl Larven gesamt	Anzahl Experimente	Verkürzte Körperachse		Vaskulardefekt		Kein/wenig Blutfluss nach 4dpf		Langsamer Herzschlag*	
				Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
uninjiziert	-	217	15	2	0,9	0	0	0	0	1	0,5
Zfp365 MO_1	0,75	48	2	17	35	23	48	18	38	15	31
	1	126	4	93	74	105	83	78	62	83	66
Zfp365 MO_2	0,75	53	2	16	30	26	49	25	47	13	25
	1	137	4	84	61	113	82	76	55	87	64
Random Seq. MO	1	56	3	2	3,6	0	0	0	0	2	3,6
*Wildtyp	153 bpm ± 6,5										
Zfp365 MO	108 bpm ± 4,7										

Verglichen mit Embryonen, die mit dem Kontroll-Morpholino (Random Sequenz MO) injiziert wurden, zeigten die mit dem zfZfp365-I_anti5^{MO} und zfZfp365-II_anti5^{MO} injizierten Tiere die in den folgenden Abbildungen dargestellten morphologischen Defekte mit hoher Penetranz (siehe auch Tabelle 4.6). Die Injektion des zfZfp365-I_anti5^{MO} und zfZfp365-II_anti5^{MO} führte zu einer verkürzten Körperachse (MO1: ø 54,5 % der Tiere; MO2: ø 45,5 % der Tiere), verursachte Störungen im Aufbau des Vaskularsystems im Bereich des Dotters (MO1: ø 65,5 % der Tiere; MO2: ø 65,5 % der Tiere) (Abb. 4.29 E). Im weiteren Entwicklungsverlauf wurde ein Stillstand des Blutflusses festgestellt (MO1: ø 50 % der Tiere; MO2: ø 51 % der Tiere). Zusätzlich führte die Injektion zu einer geringeren Zahl an Herzschlägen (MO1: ø 48,5% der Tiere; MO2: ø 44,5 % der Tiere). So schlug das Herz im Gegensatz zum Wildtyp (ca. 153 bpm ± 6,5) nur etwa 108 ± 4,7 mal in der Minute.

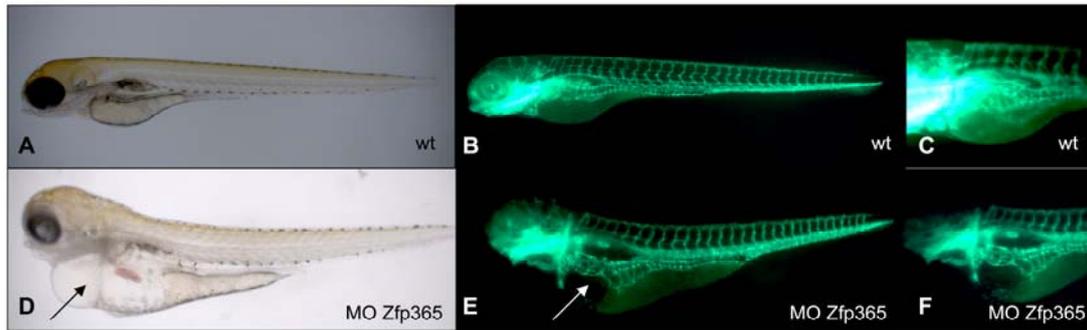


Abb. 4.29 Morphologische Defekte nach Injektion von $zfZfp365-I_anti5^{MO}$ und $zfZfp365-II_anti5^{MO}$ (A) Wildtyp Kontrolle, (B) Wildtyp Kontrolle *fli::EGFP* Linie, (C) vergrößerter Ausschnitt aus B, (D) nach Injektion von 0,75 mM $zfZfp365-I_anti5^{MO}$, (E) nach Injektion von 0,75 mM $zfZfp365-II_anti5^{MO}$ in *fli::EGFP* Linie, (F) vergrößerter Ausschnitt aus E
Larven: 3dpf; schwarzer Pfeil: Herzödem; weißer Pfeil: Vaskulardefekt

Mögliche Beobachtungen in Hinblick auf Veränderungen des Herzens wurden mit *in situ* Hybridisierung weiter untersucht.

Hierbei ist eine massive Vergrößerung der Expressionsdomäne von *cmlc2* in den injizierten Tieren zu erkennen, aber zeitgleich scheint sich auch das Expressionsmuster verändert zu haben (MO1: \varnothing 55,5 % der Tiere; MO2: \varnothing 58 % der Tiere). Es sieht so aus als wären zusätzlich zur üblichen herzspezifischen Expressionsdomäne weitere Bereiche gefärbt (Abb. 4.30 B). Diese Bereiche decken sich mit den in Abbildung 4.29 D und E mit einem Pfeil gekennzeichneten morphologischen Veränderungen der injizierten Tiere.

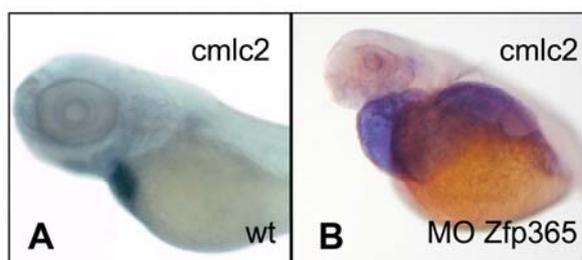


Abb. 4.30: Auswirkungen der $zfZfp365-I_anti5^{MO}$ und $zfZfp365-II_anti5^{MO}$ -Injektionen auf die Expressionsdomäne von *cmlc2* im Herzen
(A) *cmlc2* Expression im Wildtyp, (B) nach Injektion von 0,75 mM $zfZfp365-I_anti5^{MO}$
Larven: 3dpf

Es scheint eine Übereinstimmung zwischen der Expression in den Somiten und den Vaskularsystemdefekten zu geben. Wie in der Literatur vielfach beschrieben, orientieren sich die ISVs auf dem Weg zu ihrem Zielort entlang der Somiten. Die

Somiten haben einen Einfluss auf die Bildung des Gefäßsystems. Es besteht also ein Zusammenhang zwischen der Expression von zfZfp365 in den Somiten und den durch *knockdown* hervorgerufenen Störungen des Vaskularsystems. ZfZfp365 scheint einen Einfluss auf die Bildung oder Aufrechterhaltung des kardiovaskulären Systems zu haben.

4.5.6 Auswirkungen der zfZfp533-I_anti5^{MO} und zfZfp533-II_anti5^{MO}

Injektionen

Der zfZfp533-I_anti5^{MO} und zfZfp533-II_anti5^{MO} wurde in einer Konzentration von 0,75 mM und 1 mM injiziert. Eine Übersicht über die beobachteten Defekte und deren Penetranz ist in Tabelle 4.7 dargestellt.

Tabelle 4.7 Übersicht über die Injektionen mit zfZfp533-I_anti5^{MO} und zfZfp533-II_anti5^{MO} und dazugehörige Kontrollen

Behandlung der Embryonen	Konz. mM	Anzahl Larven gesamt	Anzahl Experimente	Kein Looping des Herzens		Vergrößertes Atrium		Vaskulardefekte		Blutansammlungen im Schwanz		Kein Blutfluss	
				Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
uninjiziert	-	244	15	2	2,9	0	0	1	0,4	0	0	1	0,4
Zfp533 MO_1	0,75	57	2	37	65	41	72	17	30	35	61	42	74
	1	135	4	77	57	85	63	62	46	78	58	93	69
Zfp533 MO_2	0,75	68	2	21	31	34	50	21	31	24	35	46	68
	1	115	4	72	63	76	66	68	59	69	60	88	77
Random Seq. MO	1	69	3	1	1,4	1	1,4	1	1,4	2	2,9	0	0

Die Injektion von zfZfp533-I_anti5^{MO} und zfZfp533-II_anti5^{MO} hatte hauptsächlich Auswirkungen auf das kardiovaskuläre System der Tiere. Verglichen mit Embryonen, die mit dem Kontroll-Morpholino (Random Sequenz MO) injiziert wurden, zeigten die mit dem zfZfp533-I_anti5^{MO} und zfZfp533-II_anti5^{MO} injizierten Tiere die in den folgenden Abbildungen dargestellten morphologischen Defekte mit hoher Penetranz (siehe auch Tabelle 4.7). Die Injektion verursachte eine Unterdrückung des Herzloopings (MO1: ø 61 % der Tiere; MO2: ø 47 % der

Tiere) (Abb. 4.31 C) und führte zu einem vergrößerten Atrium (MO1: \varnothing 67,5 % der Tiere; MO2: \varnothing 58 % der Tiere) (Abb. 4.31 C).



Abb. 4.31: Morphologische Defekte nach Injektion von zfzfp533-I_anti5^{MO} und zfzfp533-II_anti5^{MO} (A) Wildtyp Kontrolle, (B) vergrößerter Ausschnitt aus B, (C) nach Injektion von 0,75 mM zfzfp533-I_anti5^{MO}, (D) vergrößerter Ausschnitt aus E
Larven: 3dpf; Pfeil: Herzdefekt

Zudem konnten Störungen im Aufbau des Vaskularsystems entdeckt werden (MO1: \varnothing 38 % der Tiere; MO2: \varnothing 45 % der Tiere) (Abb. 4.32 F). Die intersegmentalen Adern (Intersegmental vessels = ISV) (Isogai et al., 2001) waren unvollständig, nicht richtig miteinander verknüpft bzw. fehlten an einigen Stellen. Ebenso waren im Bereich der caudalen Vene (CV) (Isogai et al., 2001) Blutansammlungen zu beobachten (MO1: \varnothing 59,5 % der Tiere; MO2: \varnothing 47,5 % der Tiere) (Abb. 4.32 D) und es wurde ein Stillstand des Blutflusses festgestellt (MO1: \varnothing 71,5 % der Tiere; MO2: \varnothing 72,5 % der Tiere).

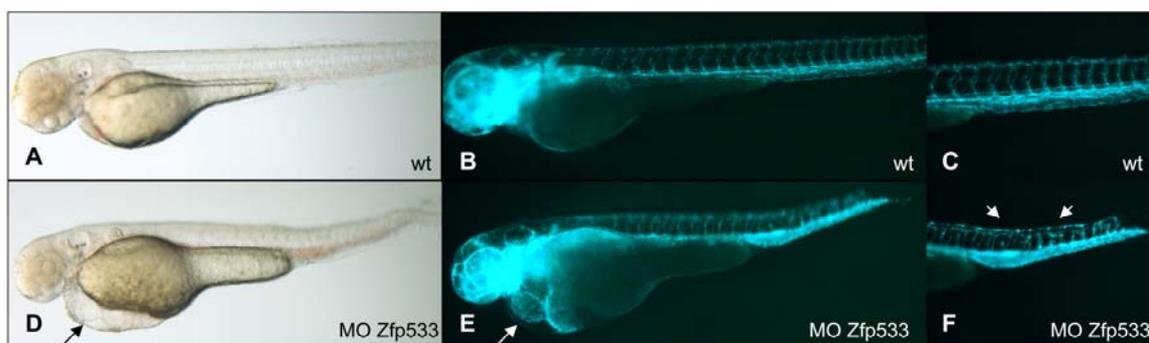


Abb. 4.32 (A) Wildtyp Kontrolle, (B) Wildtyp Kontrolle fli::EGFP Linie, (C) vergrößerter Ausschnitt aus B, (D) nach Injektion von 0,75 mM zfzfp533-I_anti5^{MO}, (E) nach Injektion von 0,75 mM zfzfp533-I_anti5^{MO} in fli::EGFP Linie, (F) vergrößerter Ausschnitt aus E
Larven: 3dpf; Pfeil: vergrößertes Atrium; Pfeilkopf: Vaskulardefekt

Die Auswirkungen der Injektionen auf das kardiovaskuläre System der Tiere konnte auch durch die Verwendung der transgenen Zebrafischlinien *fli::EGFP* und *cmlc2::GFP* nachgewiesen werden. In Abbildung 4.33 sind das vergrößerte Atrium, der Herzschlauch, der auf ein Ausbleiben des Loopings hindeutet, sowie das unregelmäßige und teilweise lückenhafte Muster der intersegmentalen Adern auf Zellbasis dargestellt. Die *fli::EGFP* Linie verdeutlicht die Anordnung der Endothelzellen (Abb. 4.33 A+B, D+E), die *cmlc2::GFP* Linie zeigt die Myokardzellen (Abb. 4.33 C+F). Die Vergrößerung des Atriums scheint auf das Endothelgewebe zurückzuführen zu sein (Abb.4.33 E).



Abb. 4.33 Morphologische Defekte nach Injektion von *zfZfp533-I_anti5^{MO}* und *zfZfp533-II_anti5^{MO}* (A) Wildtyp Kontrolle *fli::EGFP* Linie, (B) vergrößerter Ausschnitt aus A, (C) Wildtyp Kontrolle *cmlc2::GFP* Linie, (D) nach Injektion von 0,75 mM *zfZfp533-I_anti5^{MO}* in *fli::EGFP* Linie, (E) vergrößerter Ausschnitt aus D (F) nach Injektion von 0,75 mM *zfZfp533-I_anti5^{MO}* in *cmlc2::GFP* Linie

Larven: 3dpf; Pfeil: Herzschlauch

Ein weiterer Defekt durch den *knockdown* von *zfZfp533* wird durch die Verwendung der transgenen Zebrafischlinie *Gata1:DsRed* in Abbildung 4.34 veranschaulicht. Offenbar hat die Injektion von *zfZfp533-I_anti5^{MO}* und *zfZfp533-II_anti5^{MO}* Auswirkungen auf das blutbildende System der Tiere. Zum einen ist, wie oben beschrieben, ein Stillstand des Blutflusses in den injizierten Tieren zu beobachten, zum anderen scheint die Anzahl der Blutzellen im Gegensatz zum Wildtyp verringert zu sein (MO1: \varnothing 73 % der Tiere; MO2: \varnothing 69,5 % der Tiere) (Abb. 4.34 D).

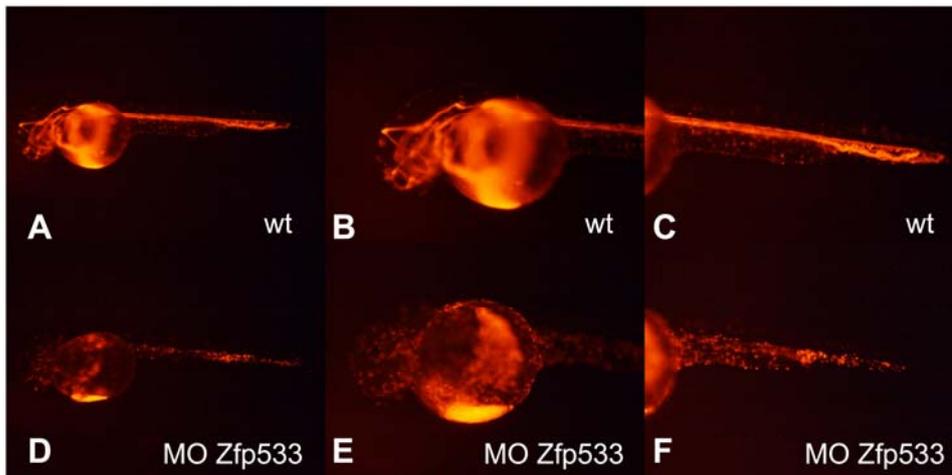


Abb. 4.34 Auswirkungen auf Blutkreislauf nach Injektion von zfZfp533-I_anti5^{MO} und zfZfp533-II_anti5^{MO}

(A) Wildtyp Kontrolle *Gata1:DsRed*, (B+C) vergrößerter Ausschnitt aus A, (D) nach Injektion von 0,75 mM zfZfp533-I_anti5^{MO} in *Gata1:DsRed* Linie, (E+F) vergrößerter Ausschnitt aus D
Larven: 3dpf

Die verringerte Zahl der Blutzellen in den Morpholino-injizierten Tieren im Gegensatz zum Wildtyp konnte zusätzlich mit Hilfe der Diaminofluoren- (DAF) Färbung visualisiert werden (Abb. 4.35).

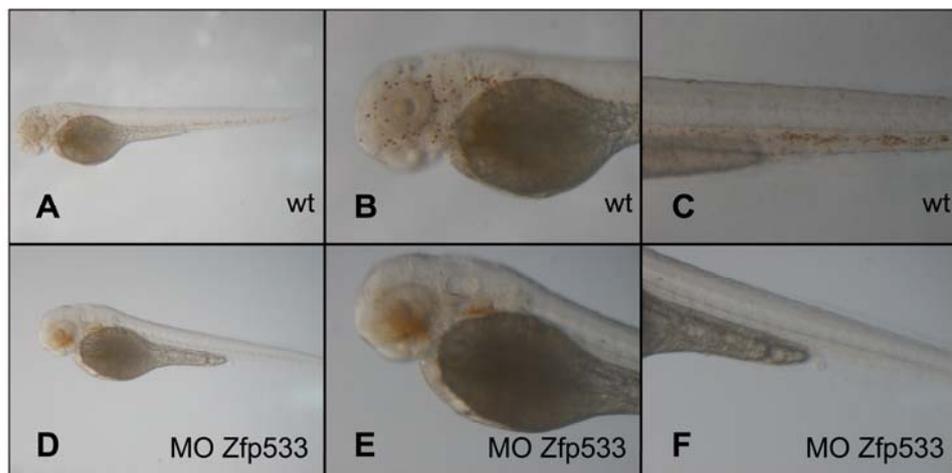


Abb. 4.35 Diaminofluorenfärbung zur Markierung von Erythrozyten

(A) Wildtyp Kontrolle, (B+C) vergrößerter Ausschnitt aus A, (D) nach Injektion von 0,75 mM zfZfp533-I_anti5^{MO}, (E+F) vergrößerter Ausschnitt aus C
Larven: 3dpf

In Hinblick auf die Ergebnisse kann eine Übereinstimmung festgestellt werden.

Die durch die *in situ* Hybridisierung detektierte Expression von zfZfp533 im Herz, kann durch *knockdown* des Gens bestätigt werden. Die Injektion von zfZfp533-I_anti5^{MO} und zfZfp533-II_anti5^{MO} führt zu Herzdefekten.

Ebenso scheint ein Zusammenhang zwischen der Expression in den Somiten und den Vaskulardefekten zu bestehen. zfZfp533 scheint wichtig für die Entwicklung und Funktion des Herzens, der Blutgefäße und des blutbildenden Systems zu sein.

4.6 Expression der Kandidatengene in ES-Zellen

Nach dem Überblick, den die *in vivo* Analyse der Kandidatengene im Zebrafisch lieferte, folgt nun eine Untersuchung der Kandidatengene *in vitro* mittels murinen CGR8-ES-Zellen.

Nach Durchsicht und Auswertung der vorangegangenen *in vivo*-Ergebnisse, wurde die Zahl der zu untersuchenden Kandidatengene auf 4 von ehemals 6 Gene beschränkt. zfDditl4l zeigte nach Injektion der genspezifischen Morpholinos keine signifikanten morphologischen Defekte. zfJ20 zeigte ebenfalls keine signifikanten Defekte das kardiovaskuläre System betreffend. Daher erschienen diese beiden Gene für die Fragestellung dieser Arbeit als weniger relevant und wurden nicht weiter untersucht.

Murine embryonale Stammzellen sind in der Lage, *in vitro* in Zellen aller drei Keimblätter zu differenzieren. Bei der Differenzierung von ES-Zellen zu Embryonalkörperchen und durch deren Kultivierung ist die Entwicklung von frühen Kardiomyoblasten zu differenzierten Kardiomyozyten möglich (Maltsev et al., 1994). Während der Differenzierung gibt es ein entwicklungsspezifisch kontrolliertes Expressionmuster verschiedener Komponenten, z.B. herzspezifischer Gene, Proteine und Rezeptoren.

Zur Untersuchung des Expressionsmusters der Kandidatengene, wurden diese durch Embryonalkörperchenbildung differenziert und anschließend mittels halbquantitativer (RT) PCR analysiert. Abbildung 4.36 zeigt die Expression der Kandidatengene im Vergleich zum herzspezifischen Marker α -MHC (Myh6).

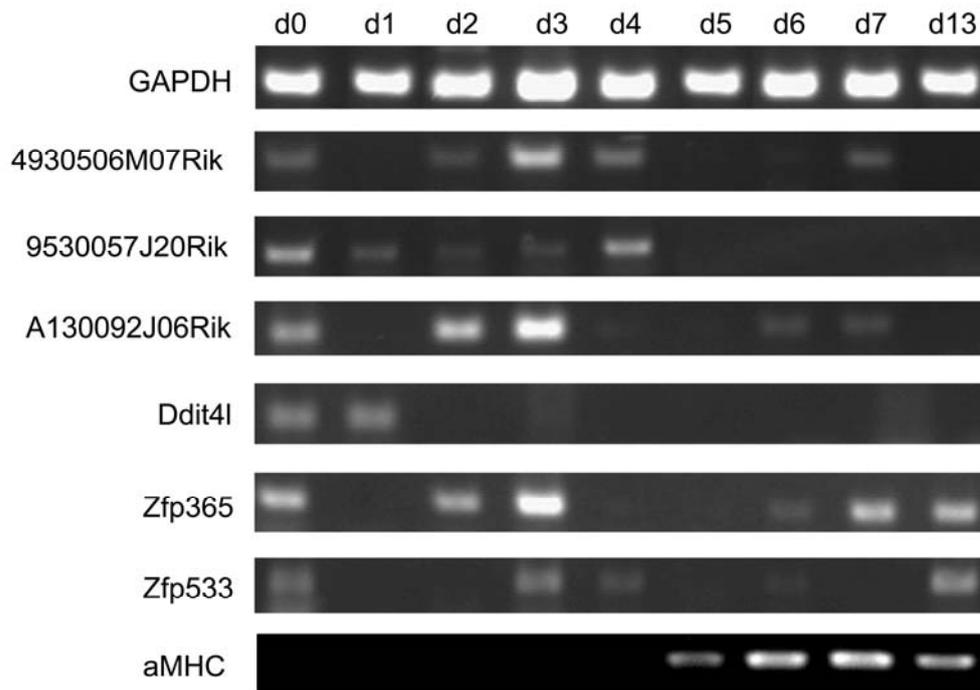


Abb.: 4.36: Halbquantitative (RT) PCR zur Ermittlung des Expressionsmusters der Kandidatengene in undifferenzierten ES-Zellen und differenzierten EBs. Zum Vergleich dient der kardiale Marker α MHC.

Im Gegensatz zum spezifischen Herzmuskelprotein α MHC sind alle Kandidatengene bereits in ES-Zellen exprimiert. Die Expression von α MHC beginnt erst ab Tag 5. Aufgrund der frühen Expression der Kandidatengene bereits in ES-Zellen, aber auch später in ihrer Entwicklung, könnten sie einen Einfluss auf die Bildung und Entwicklung von Kardiomyozyten bereits im mesodermalen Stadium haben. Zum Vergleich sei aufgeführt, dass der mesodermale Marker *Tbra* erst ab Tag 3 exprimiert wird.

4.7 Generierung und Analyse von stabilen *knockdown*-Klonen gegen die Kandidatengene durch Transfektion von CGR8-ES-Zellen

Zur Generierung von stabilen *knockdown*-Klonen gegen die Kandidatengene wurden CGR8-ES-Zellen mit pGFP-V-RS Plasmidvektoren (OriGene), die die shRNA des entsprechenden Gens exprimierten, mittels Elektroporation transfiziert. Diese Vektoren enthielten CMV-Promoter gesteuertes tGFP und ein

Pyromygingen, welches eine Selektion der Klone mit korrekter Transfektion ermöglichte. Die stark GFP exprimierenden Klone, die eine erfolgreiche Transfektion und somit einen *knockdown* der Gene darstellen, wurden ausgewählt und für weitere funktionelle Studien der ES-Zell-Differenzierung verwendet. Der erfolgreiche *knockdown* wurde mittels halbquantitativer (RT) PCR verifiziert. Wie in Abbildung 4.37 gezeigt, wiesen alle ausgewählten Klone eine deutliche geringere Transkriptmenge der Gene auf als der Wildtyp. Somit war der *knockdown* erfolgreich.

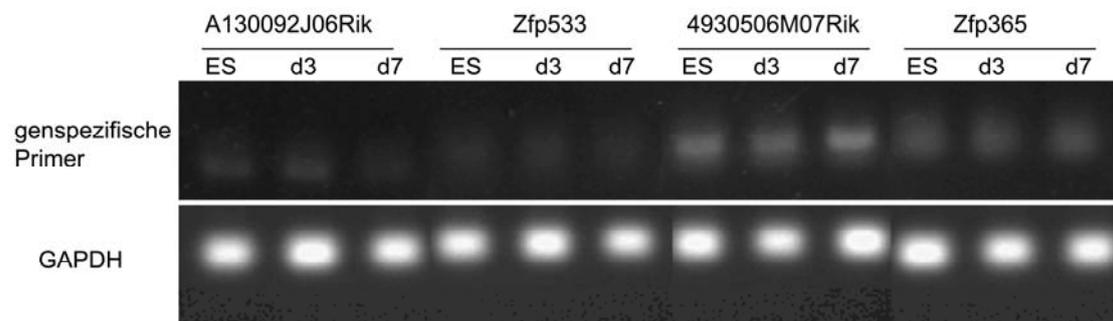


Abb. 4.37 Halbquantitative (RT) PCR zur Kontrolle des Transkriptgehalts der Gene in den jeweiligen *knockdown*-Klonen

Alle Klone wurden mindestens zwei Wochen kultiviert bevor sie für weitere Untersuchungen verwendet wurden.

Die Klone behielten ihre pluripotente Art und wiesen in Bezug auf ihre Morphologie, Proliferation und Wachstumseigenschaften keine Unterschiede zu Wildtyp CGR8-ES-Zellen und den Kontrollvektor transfizierten Klonen auf (Abb 4.38).

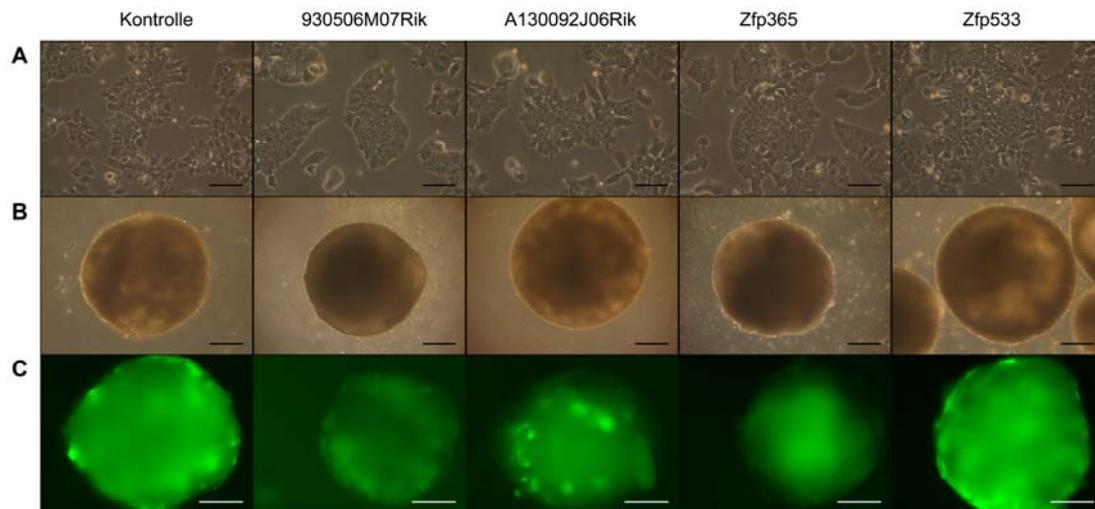


Abb.4.38: Generierung stabiler *knockdown*-Klone.

A) ES-Zellen der mit Kontrollvektor und spezifischen *knockdown*-Vektoren transfizierten Zellen (B) aus A gewonnene EBs (Durchlicht), (D) aus A gewonnene EBs (Fluoreszenzmikroskop). Maßstabsbalken: 100 μ m

Bei der Differenzierung von ES-Zellen zu Embryonalkörperchen (EBs) kommt es zu einer spontanen Differenzierung in die Zellen der drei Keimblätter, welche sich schließlich zu Kardiomyozyten entwickeln und als charakteristisches Merkmal schlagende Areale hervorbringen. Nach zehn Tagen der Differenzierung konnten schlagende Areale mit Hilfe eines Mikroskops beobachtet werden. Die Anzahl der schlagenden EBs pro Schale wurde ausgezählt (Tab. 4.8). In der Kontrolle wiesen durchschnittlich 40,25% der EBs schlagende Areale auf. Ähnlich hierzu verhielt sich 4930506M07Rik mit durchschnittlich 41,35% der EBs. Die anderen *knockdown*-Klone zeigten eine reduzierte Anzahl an EBs mit schlagenden Arealen (A130092J06Rik \emptyset 14,5%, Zfp365 \emptyset 23,45% und Zfp533 \emptyset 21,1%).

Tab. 4.8: Anzahl der aus knockdown-Klonen generierten EBs mit schlagenden Arealen

Knockdown	Anzahl EBs gesamt	davon schlagend	davon nicht schlagend	Prozentzahl schlagende EBs
Kontrolle	87	36	51	41,4
Kontrolle	128	50	78	39,1
4930506M07Rik	99	39	60	39,4
4930506M07Rik	134	58	76	43,3
A130092J06Rik	114	18	96	16,9
A130092J06Rik	107	13	94	12,1
Zfp365	122	23	99	18,9
Zfp365	157	44	113	28
Zfp533	151	35	116	23,2
Zfp533	116	22	94	19

4.8 Auswirkungen des *knockdown* der Kandidatengene auf die Expression von speziellen Markern der drei Keimblätter

Die Ergebnisse der Zebrafischstudie zeigten eine Beteiligung der Kandidatengene an der Bildung oder Funktion des Herzens. Ebenso weisen die oben aufgeführten Resultate, dass nach *knockdown* der Gene in ES-Zellen und anschließender Differenzierung bei 3 der Kandidatengene eine reduzierte Zahl schlagender Areale in den Kardiomyozyten zu finden sind, darauf hin, dass die Kandidatengene eine Rolle für die Kardiomyogenese und Funktion von Kardiomyozyten spielen könnten. Dies sollte nun weiter überprüft werden, indem die Auswirkungen des *knockdowns* auf die Expression spezieller Marker, insbesondere natürlich des Mesoderms, mittels semiquantitativer (RT) PCR validiert wurden. Eine Übersicht findet sich in Abbildung 4.39.

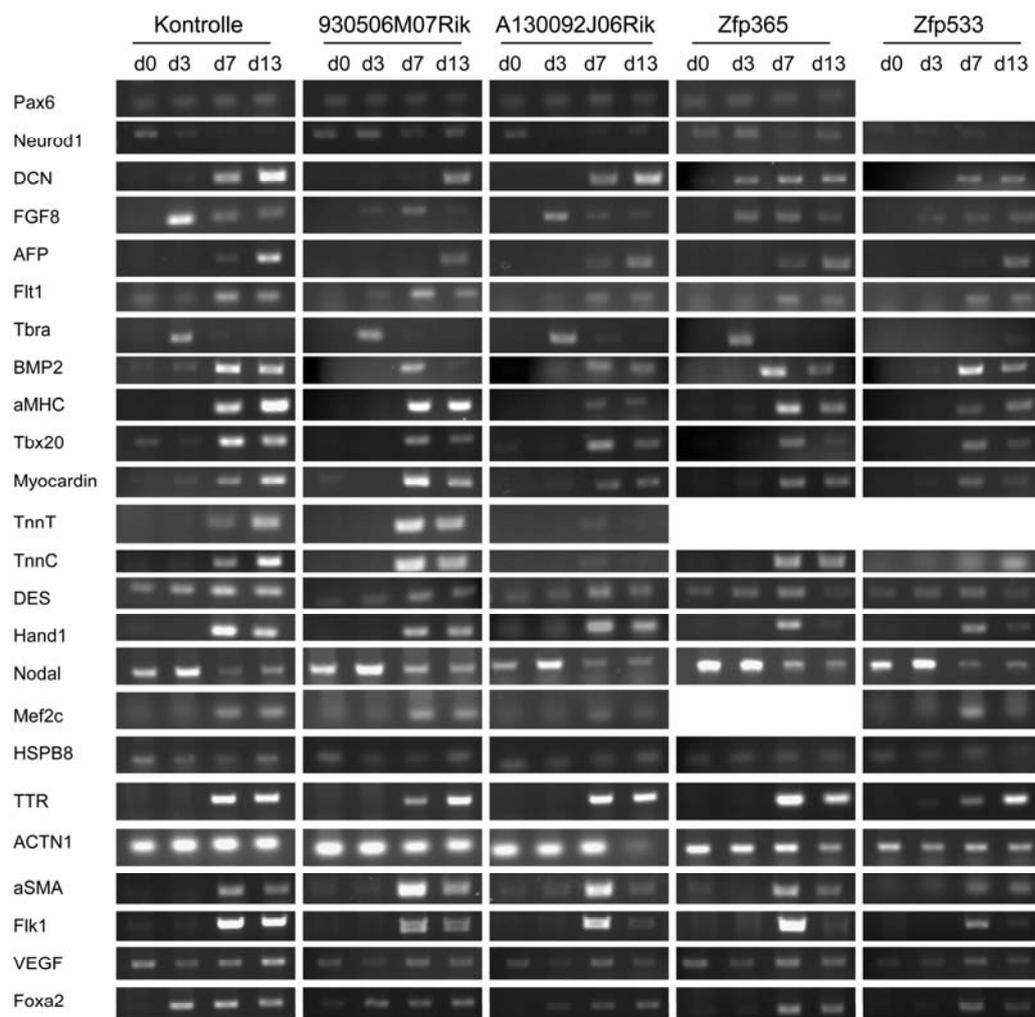
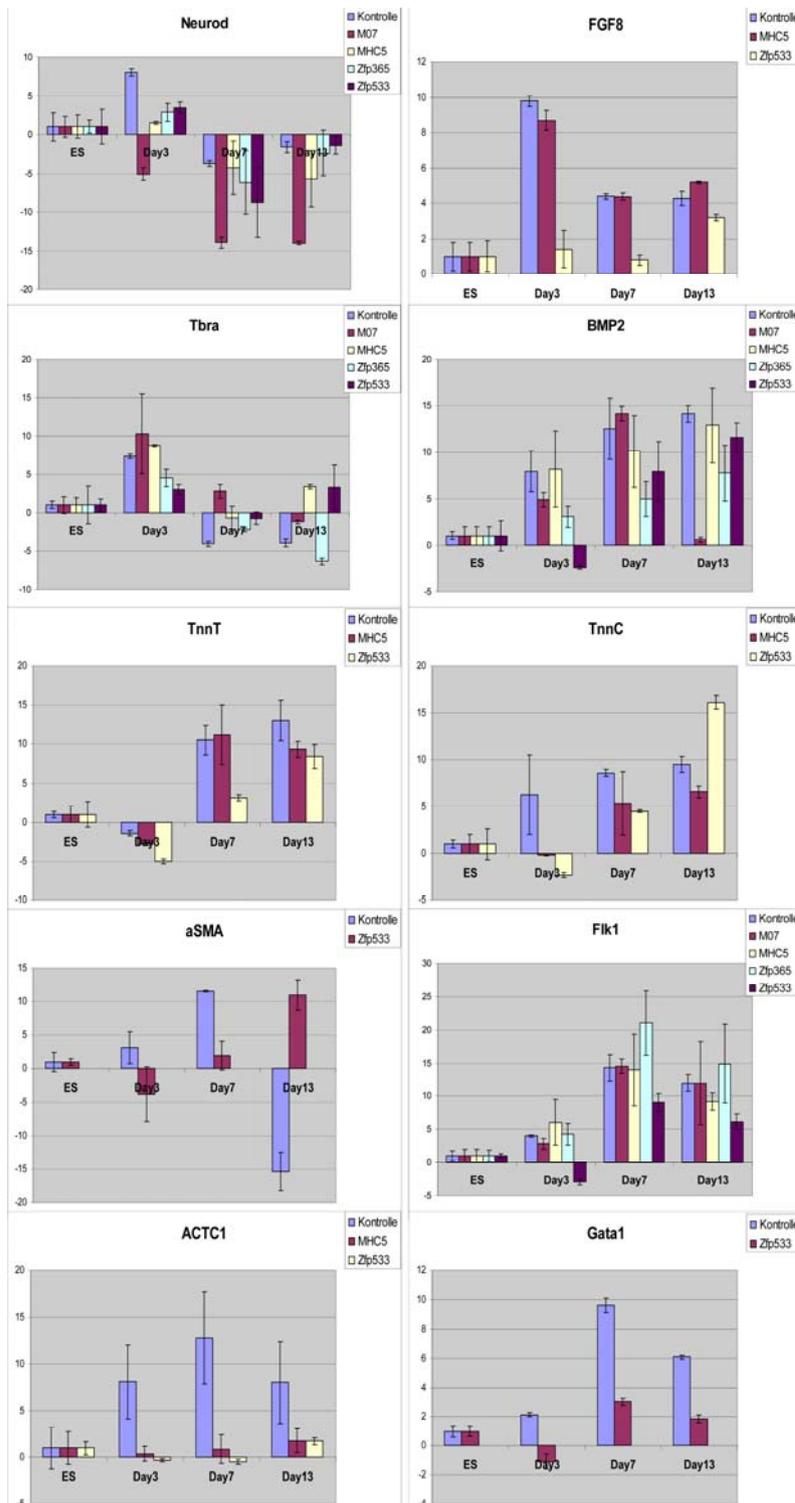


Abb. 4.39: Übersicht über eine semiquantitative (RT) PCR-Analyse der *knockdown*-Klone mit spezifischen Markern

Wie die Abbildung 4.39 zeigt, waren bei *knockdown* von A130092J06Rik die kardialen Marker (α MHC, Tbx20, Myocardin, TnnT und TnnC) ebenso wie BMP2 im Vergleich zum Wildtyp deutlich runterreguliert. Im Falle von Zfp533 waren dies die vaskulären Marker (α SMA, Flk1, VEGF) und Tbra.



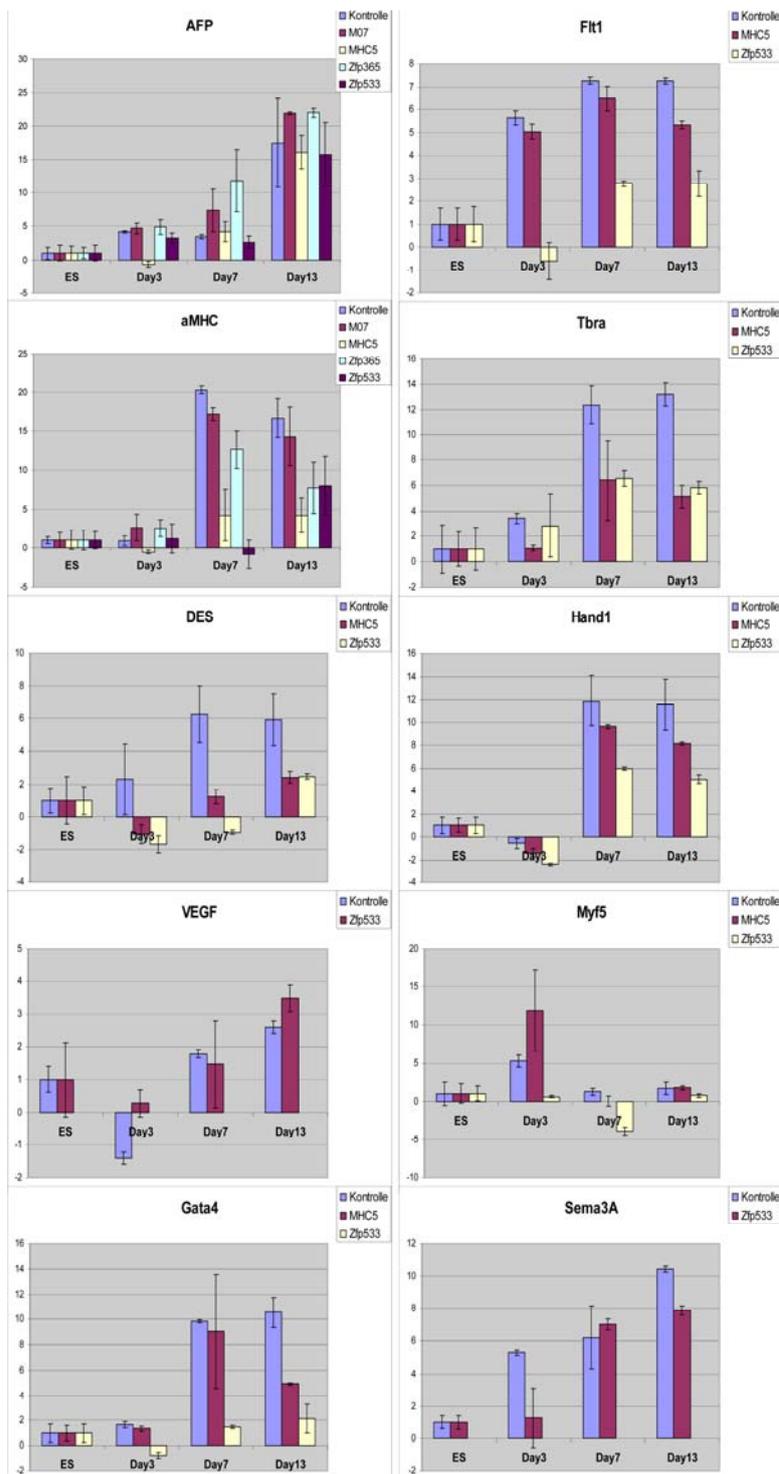


Abb. 4.40: Übersicht über eine quantitative PCR-Analyse der *knockdown*-Klone mit spezifischen Markern

Die Ergebnisse der quantitativen PCR spiegeln die Ergebnisse der semiquantitativen PCR größtenteils wieder (Abb. 4.40).

Zur Kontrolle der in der semiquantitativen und quantitativen PCR erhaltenen Ergebnisse zum *knockdown* von A130092J06Rik und Zfp533, wurde zusätzlich eine immunohistochemische Färbung mit Antikörpern gegen α MHC und Myocardin und respektive gegen VEGF durchgeführt.

Die Abbildung 4.41 zeigt, wie auch schon die PCR-Ergebnisse zuvor, eine Abwesenheit von α MHC und Myocardin in den A130092J06Rik *knockdown* EBs im Vergleich zum Wildtyp.

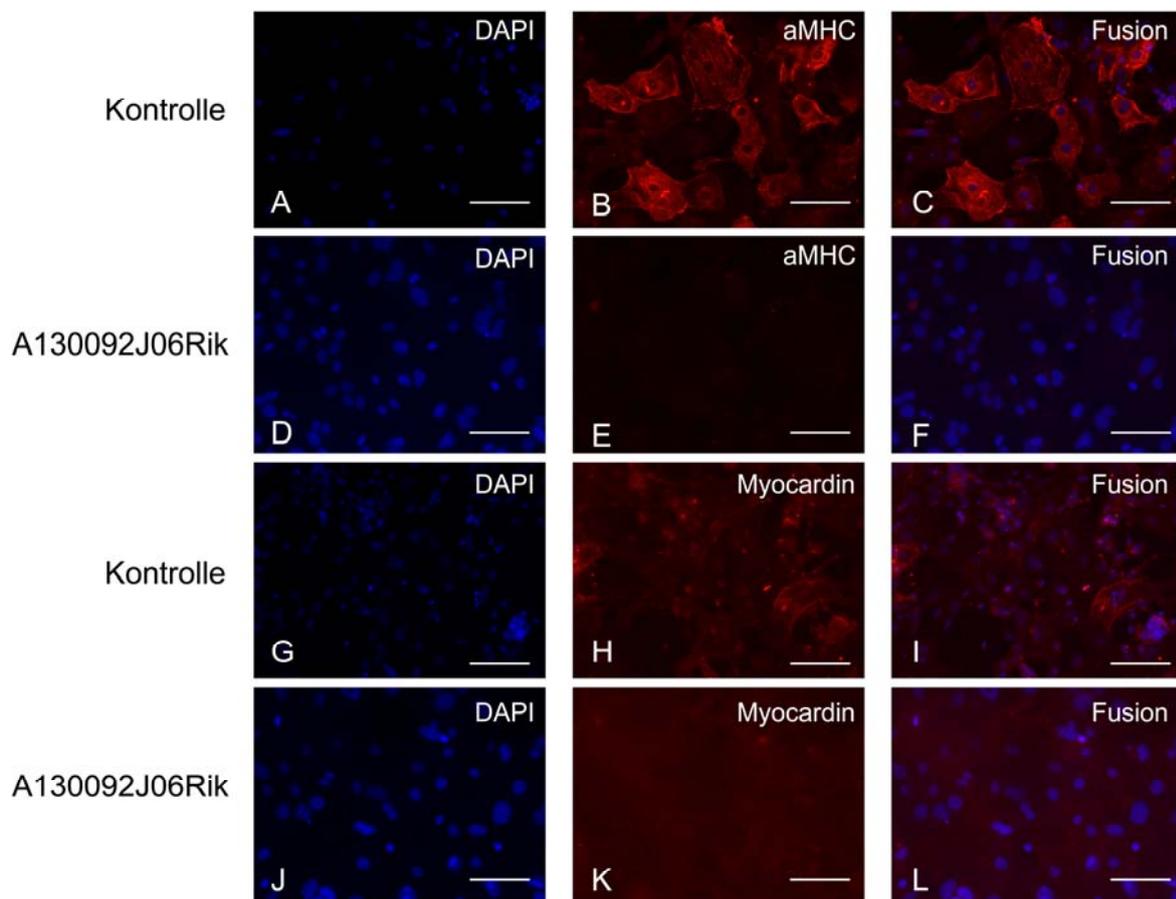


Abb. 4.41: Immunohistochemische Färbung mit Antikörpern gegen α MHC (B+E) und Myocardin (H+K).

Maßstabsbalken: 100 μ m

Ebenso verdeutlicht eine immunohistochemische Färbung mit spezifischen Antikörpern die Abwesenheit von VEGF in den Zfp533 *knockdown* EBs im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 4.42).

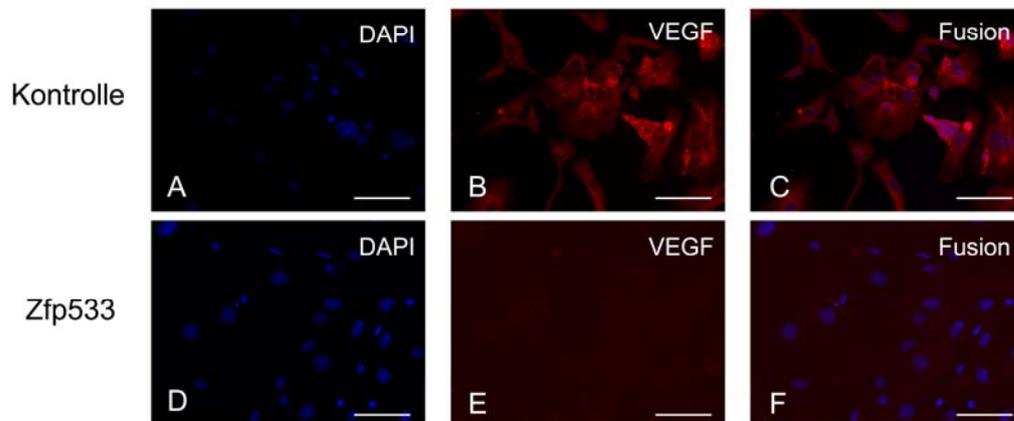


Abb. 4.42: Immunohistochemische Färbung mit Antikörpern gegen VEGF (B+E). Maßstabsbalken: 100 μ m

4.9 Mikroarrayanalyse der A130092J06Rik und Zfp533 *knockdown* EBs

Aus den anfangs 6 zu untersuchenden Kandidatengenen kristallisierten sich aufgrund der Ergebnisse hinsichtlich ihrer evtl. Rolle für die Kardiomyogenese und Funktion von Kardiomyozyten die Gene A130092J06Rik und Zfp533 für eine Mikroarrayanalyse heraus.

Die Mikroarrayanalyse bietet den großen Vorteil, dass mit ihr simultan die Expression tausender Gene bzw. Sequenzen untersucht werden kann.

Eine Expressionsstudie mit Affymetrix Expressionsmikroarrays sollte die Unterschiede zwischen dem Transkriptom von *knockdown* A130092J06Rik-Tag-13-EBs und *knockdown* Zfp533-Tag-13-EBs zu Kontroll-Tag13-EBs identifizieren. Eine Untersuchung des gesamten Transkriptoms ist notwendig, um Unterschiede in den biologischen Schlüsselprozessen und Signalwegen zu identifizieren. Zur Klassifizierung der Varianzen im Datensatz wurde eine Hauptkomponentenanalyse (principal component analysis (PCA)) der Transkriptome durchgeführt (Abb. 4.43). Der Abstand zwischen den Punkten, welche die einzelnen Proben darstellen, spiegelt den Grad der Ähnlichkeit bzw. Unterschiede der Proben wieder.

PC 1 zeigt einen deutlichen Unterschied zwischen der Kontrolle und *knockdown* A130092J06Rik (36,9%) (Abb. 4.43 A) sowie *knockdown* Zfp533 EBs (49,4%) (Abb. 4.43 C). Zum Vergleich wurden die Kontrolle und *knockdown*

A130092J06Rik sowie *knockdown* Zfp533 EBs gegenüber undifferenzierten Kontroll-ES-Zellen untersucht. Abbildung 4.43 zeigt auch hier deutliche Unterschiede von den ES-Zellen zu den 13 Tage alten EBs. Im Fall von *knockdown* A130092J06Rik beträgt die Varianz 50,9% (Abb. 4.43 B), für *knockdown* Zfp533 beträgt sie 47,6% (Abb. 4.43 D).

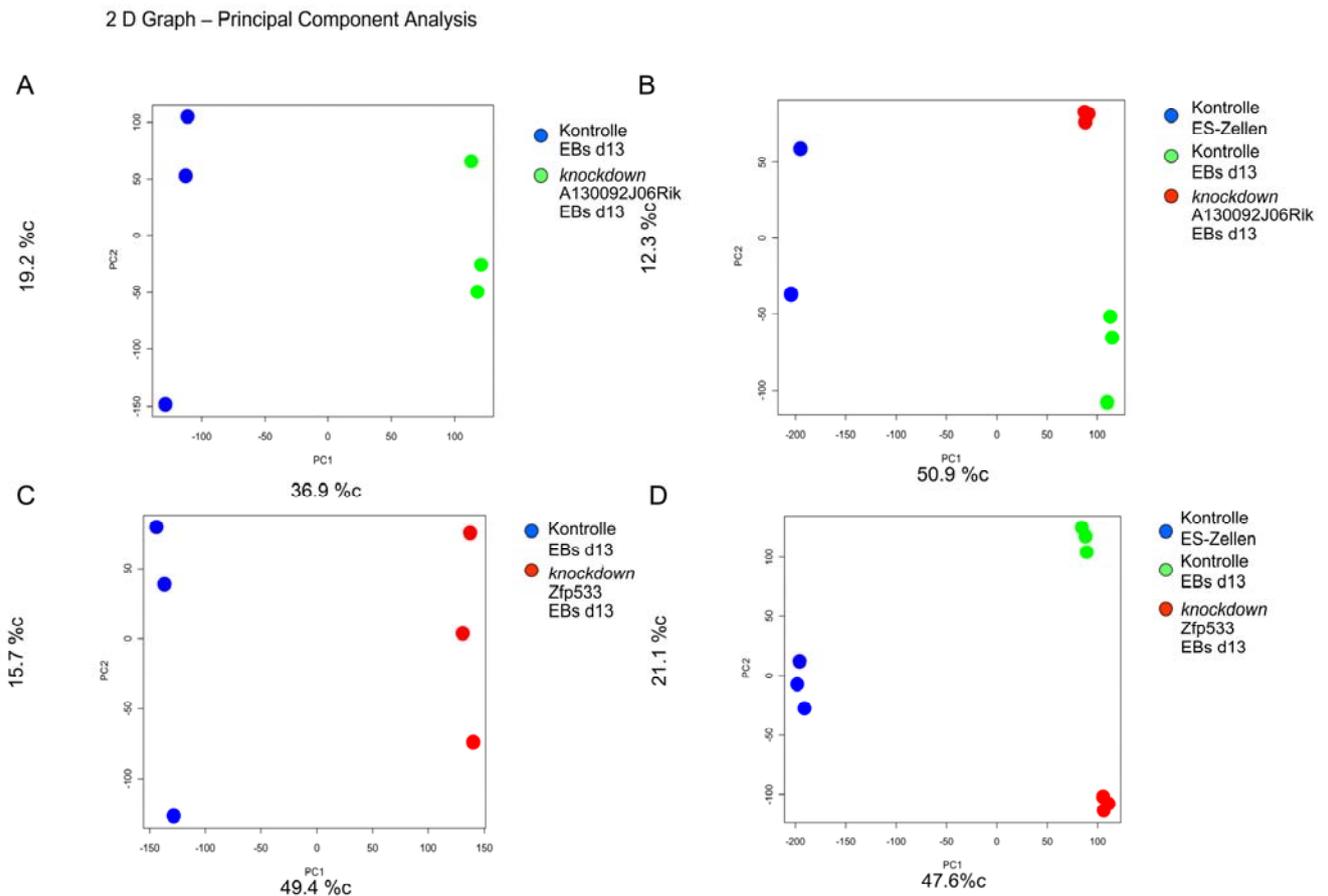


Abb. 4.43: Hauptkomponentenanalyse (principal component analysis (PCA) der genomweiten Expression von 13 Tage alten Kontroll-EBs zu 13 Tage alten *knockdown* A130092J06Rik (A) und *knockdown* Zfp533 EBs (C), bzw. von undifferenzierten Kontroll-ES-Zellen zu 13 Tage alten Kontroll-EBs und 13 Tage alten *knockdown* A130092J06Rik EBs (B) sowie zu 13 Tage alten Kontroll-EBs und 13 Tage alten *knockdown* Zfp533 EBs (D).

Des weiteren wurde eine *Heatmap* der hierarchischen Clusteranalyse erstellt (Abb. 4.44). Hochregulierte Cluster sind rot markiert, herunterregulierte sind grün gekennzeichnet.

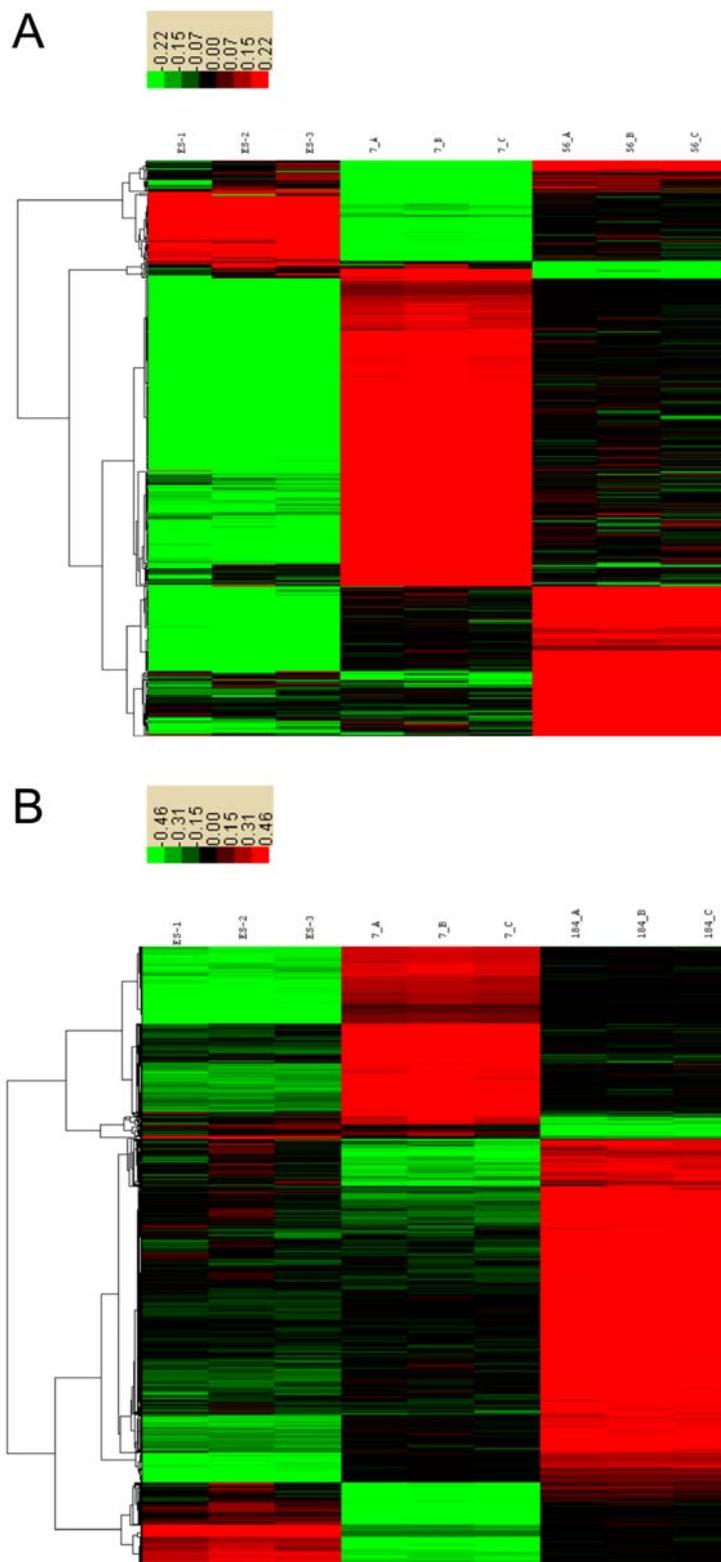


Abb. 4.44: *Heatmap* der hierarchischen Clusteranalyse von undifferenzierten Kontroll-ES-Zellen (ES) zu 13 Tage alten Kontroll-EBs (#7) und 13 Tage alten *knockdown* A130092J06Rik EBs (#56) (A) sowie zu 13 Tage alten Kontroll-EBs (#7) und 13 Tage alten *knockdown* Zfp533 EBs (#184) (B). Hochreguliert: rot; herunterreguliert: grün

Die Expressionsstudie mit Affymetrix Expressionsmikroarrays lieferte für den *knockdown* A130092J06Rik insgesamt 491 unterschiedlich exprimierte Gene (Differentially Expressed Genes, DEG), ermittelt durch einen p-Wert (p-value) von ≤ 0.05 . Von diesen insgesamt 491 Genen waren 215 hochreguliert und 276 herunterreguliert.

Tabelle 4.9: Übersicht über einige in *knockdown* A130092J06Rik hochregulierte Gene

Kategorie	GO term	Anzahl Gene	p-value	Gene
GOTERM_BP_FAT	regulation of transcription, DNA-dependent	40	7,85E-08	ZSCAN4-PS3, NEPN, ZSCAN4-PS2, SOX2, PRRX1, GM13138, PRRX2, RHOX4E, PAX1, RHOX4F, RHOX4G, PLAGL1, RHOX4B, FOXH1, RHOX4A, RHOX4D, FOXQ1, RHOX4C, CDKN2A, LHX1, GATA3, HEY2, HBA-X, PRL2C2, TWIST1, GM13242, RHOX6, RHOX5, REX2, TBX3, EPAS1, ZSCAN4F, TCFAP2C, ZFP600, FOXA1, EOMES, ZSCAN4A, ZSCAN4C, ISL1, RHOX9, LOC100048814, SALL4, FOXG1, ZFP7, EBF1, VGLL2, KLF4
GOTERM_BP_FAT	embryonic development ending in birth or egg hatching	16	6,16E-05	TBX3, EPAS1, PRRX1, EOMES, GJB5, CDH1, PRRX2, PAX1, ADA, PLG, CITED1, EYA1, RDH10, SALL4, KRT8, TWIST1
GOTERM_BP_FAT	chordate embryonic development	16	5,54E-05	TBX3, EPAS1, PRRX1, EOMES, GJB5, CDH1, PRRX2, PAX1, ADA, PLG, CITED1, EYA1, RDH10, SALL4, KRT8, TWIST1
GOTERM_BP_FAT	neuron differentiation	10	0,030552	CCK, MCOLN3, LHX1, FOXA1, SOX2, FOXG1, EOMES, ID4, ISL1, GDNF
GOTERM_BP_FAT	blood vessel development	9	0,005264	TBX3, EPAS1, HEY2, PRRX1, SOX17, PRRX2, CITED1, PLG, PRL2C2
GOTERM_BP_FAT	urogenital system development	7	0,005254	RDH10, EYA1, LHX1, SALL1, GATA3, FOXA1, GDNF
GOTERM_BP_FAT	kidney development	6	0,00626	RDH10, EYA1, LHX1, SALL1, GATA3, GDNF

In den hochregulierten Genen (Tab. 4.9) war, im Gegensatz zu den herunterregulierten Genen (Tab. 4.10), keine Genontologie (Gene Ontology, GO) für biologische Prozesse, die die kardiale Funktion betreffen, zu finden. Die Daten in Tabelle 4.10 deuten darauf hin, dass der *knockdown* von A130092J06Rik Einfluss auf die Expression einiger wichtiger Gene für die kardiale Entwicklung hat.

Eine vollständige Auflistung aller gefundener GOs befindet sich im Anhang.

Tabelle 4.10: Übersicht über einige in *knockdown* A130092J06Rik herunterregulierte Gene

Kategorie	GO term	Anzahl Gene	p-value	Gene
GOTERM_BP_FAT	extracellular matrix organization	9	2,26E-05	SMOC2, ITGA8, FBLN5, COL3A1, POSTN, LOX, COL11A1, COL5A2, COL5A1
GOTERM_BP_FAT	collagen fibril organization	5	9,03E-05	COL3A1, LOX, COL11A1, COL5A2, COL5A1
GOTERM_BP_FAT	vesicle-mediated transport		0,020251	MYO5A, MRC1, FCGR2B, IRF8, MYO1F, FCER1G, IGH-6, ABCA1, STAB2, SIRPA, FCGR1, FCGR3
GOTERM_BP_FAT	embryonic organ morphogenesis	8	0,002755	HOXD9, TSHZ1, FGF9, ITGA8, TGFB3, GAS1, ZIC1, COL11A1
GOTERM_BP_FAT	blood vessel development	10	0,002212	WNT2, NRP1, FGF9, TBX20, COL3A1, ITGA4, LOX, COL5A1, WT1, PITX2
GOTERM_BP_FAT	heart development	9	0,004557	NRP1, PLN, TBX20, MYH6, SOX6, ITGA4, COL11A1, COL5A1, PITX2
GOTERM_BP_FAT	cardiac muscle tissue development	4	0,028571	PLN, MYH6, COL11A1, PITX2
GOTERM_BP_FAT	ion transport	16	0,018795	SLC9A9, PTPRC, ATP1B1, CLCA2, CLCA1, GABRA3, KCNAB1, KCNA1, SLCO2B1, WNT2, P2RY6, CYBB, PLN, SLC4A4, ATP6V0D2, KCTD12
GOTERM_BP_FAT	extracellular matrix	27	5,72E-14	FMOD, ADAMTSL1, COL3A1, ADAMTS15, TGFB3, POSTN, DCN, CPZ, WNT2, SMOC2, COL9A2, LAMB2, LOX, COL8A2, COL11A1, LOXL1, FN1, FBN1,

				NID2, COL5A2, COL5A1, COL4A5, LAMA2, FBLN2, FREM1, COL1A2, ADAMTS5
	collagen	7	1,26E-07	COL3A1, COL1A2, LOX, COL11A1, COL5A2, COL5A1, COL4A5

In der folgenden Tabelle 4.11 sind die essentiellen Marker für die kardiale Entwicklung aufgeführt, die durch den *knockdown* von A130092J06Rik beeinflusst sind.

Tabelle 4.11: Übersicht über einige in *knockdown* A130092J06Rik herunterregulierte kardiale Marker

Gen	Fold change
Myh6	-3,34142
Tgfb3	-2,07628
Wnt2	-2,66038
Kcnab1	-3,18559
P2ry12	-3,02993
Sox6	-2,95709
Lpl	-2,71947
Smoc2	-2,67061
Dsc2	-2,6698
Myo1f	-2,64846
Pln	-2,58291
Bicc1	-2,38737
Fbln2	-2,3397
Sgce	-2,28251
Myo5a	-2,20293
Ctss	-2,18959
Casp1	-2,15563
Gucy1a3	-2,11924
Kcna1	-2,08318
Zfhx3	-2,07801
Tgfb3	-2,07628
Lama2	-2,01866
Tbx20	-2,01321

Insgesamt läßt sich aus den Ergebnissen, die der *knockdown* von A130092J06Rik im Zebrafisch und in murinen ES-Zellen erbracht hat, folgern, dass A130092J06Rik eine wichtige Rolle für die Kardiomyogenese und Funktion von Kardiomyozyten hat und der *knockdown* zu Beeinträchtigungen der kardialen Entwicklung führt.

Für den *knockdown* Zfp533 lieferte die Expressionsstudie mit Affymetrix Expressionsmikroarrays insgesamt 1682 unterschiedlich exprimierte Gene (Differentially Expressed Genes, DEG), ermittelt durch einen p-Wert (p-value) von ≤ 0.05 . Von diesen insgesamt 1682 Genen waren 1162 hochreguliert und 520 herunterreguliert.

In den hochregulierten Genen (Tab. 4.12) war die Genontologie von biologischen Prozessen für die kardiale Funktion zu finden.

Eine vollständige Auflistung aller gefundenen GOs befindet sich im Anhang.

Tabelle 4.12: Übersicht über einige in *knockdown* Zfp533 hochregulierte Gene

Kategorie	GO term	Anzahl Gene	p-value	Gene
GOTERM_BP_FAT	chordate embryonic development	46	1,68E-12	RBP4, 2610005L07RIK, ENAH, PRRX1, ZEB2, CDH1, ZEB1, TTN, TPM1, SHH, ZIC2, VCAM1, DAB2, APOB, CHD8, G2E3, CHD7, SERPINA1B, POU5F1, DNMT3L, ANKRD11, KRT8, TDGF1, CYR61, GM12241, MLL2, CCNB1IP1, TBX3, NASP, NODAL, EOMES, HSPG2, SPINT1, BIRC6, MYH6, SIX4, MYH9, UBE2B, RDH10, EP300, SALL4, TSC1, ZMIZ1, ZIC5, PBX1, GNAS, PTCH1
GOTERM_BP_FAT	embryonic morphogenesis	39	1,34E-10	RBP4, 2610005L07RIK, ENAH, CRABP2, SOX2, PRRX1, ZEB2, COL2A1, ZBTB16, ZEB1, SHH, ZIC2, VCAM1, CHD7, POU5F1, LHX1, TDGF1, FBN2, CYR61, GM12241, NANOG, TBX3, NODAL, OTX2, HSPG2, EOMES, SPINT1, SIX4, ACVR2B, RDH10, DKK1, SALL4, TSC1, LAMA5, FOXG1, ZIC5, PBX1, GNAS, PTCH1, NSD1
GOTERM_BP_FAT	embryonic organ development	22	4,04E-05	RBP4, 2610005L07RIK, NODAL, OTX2, SOX2, HSPG2, PRRX1, EOMES, SPINT1, BIRC6, COL2A1, SIX4, ZEB1, SHH, VCAM1, RDH10, CHD7, FOXG1, KRT8, PBX1, GNAS, CYR61
GOTERM_BP_FAT	respiratory system development	15	5,02E-05	RBP4, NODAL, FOXA1, SOX2, FOXP1, SHH, RDH10, ACVR2B, EP300, CHD7, LAMA5, CTGF,

				HHIP, CUX1, NFIB
GOTERM_BP_FAT	limb development	14	1,30E-04	TBX3, CRABP2, PRRX1, COL2A1, ZBTB16, SHH, RDH10, CHD7, DKK1, SALL4, PTCH1, GNAS, PBX1, FBN2
GOTERM_BP_FAT	neural tube development	8	0,018287	ENAH, TSC1, NODAL, ZIC5, ZEB2, PTCH1, SHH, GM12241, ZIC2
GOTERM_BP_FAT	embryonic skeletal system development	11	3,49E-04	2610005L07RIK, RBP4, RDH10, NODAL, PRRX1, HSPG2, GNAS, PBX1, SIX4, ZEB1, SHH
GOTERM_BP_FAT	heart development	29	8,58E-10	RBP4, FGF15, ERBB3, COL2A1, TTN, TPM1, PTEN, ZIC3, SHH, VCAM1, FOXH1, CHD7, TDGF1, SEMA3C, TBX3, NODAL, HSPG2, CENPF, MYH6, FOXP1, ACVR2B, SALL4, EP300, TSC1, ID2, PKP2, ZMIZ1, PTCH1, VCAN
GOTERM_BP_FAT	cardiac muscle tissue development	9	4,80E-04	RBP4, TSC1, TDGF1, HSPG2, MYH6, TTN, PTEN, TPM1, FOXP1
GOTERM_BP_FAT	striated muscle tissue development	13	8,84E-04	RBP4, HSPG2, MYH6, SIX4, TTN, TPM1, FLNB, PTEN, FOXP1, SHH, EP300, TSC1, TDGF1
GOTERM_BP_FAT	actin cytoskeleton organization	14	0,002879	MTSS1, ENAH, TRPM7, RICTOR, MYH6, TTN, MYH9, CDC42BPG, NISCH, ATP2C1, LIMCH1, FAT1, PAFAH1B1, ABL2
GOTERM_BP_FAT	embryonic organ morphogenesis	15	7,82E-04	2610005L07RIK, RBP4, NODAL, SOX2, OTX2, PRRX1, HSPG2, COL2A1, ZEB1, SIX4, SHH, RDH10, CHD7, FOXG1, GNAS
GOTERM_BP_FAT	vasculature development	19	0,001387	RTN4, TBX3, NODAL, PRRX1, SPINT1, MYH9, FZD5, PTEN, MEIS1, SHH, ZFP826, APOB, CHD7, CTGF, ZMIZ1, TDGF1, SEMA3C, FIGF, CYR61
GOTERM_BP_FAT	urogenital system development	15	2,91E-04	RBP4, FOXA1, ZBTB16, PTEN, SHH, ZFP826, RDH10, ACVR2B, TSC1, LAMA5, LHX1, SALL1, GATA3, PBX1, HELLS

Der *knockdown* von Zfp533 scheint Einfluss auf die Expression einiger wichtiger Gene für die Hämatopoiese und vaskuläre Entwicklung zu haben (Tab. 4.13). Diese waren im Vergleich zum Wildtyp deutlich herunterreguliert.

Tabelle 4.13: Übersicht über einige in *knockdown* Zfp533 herunterregulierte Gene

Kategorie	GO term	Anzahl Gene	p-value	Gene
GOTERM_BP_FAT	hemopoietic or lymphoid organ development	16	0,001380681	PTPRC, CCR1, TGFBR2, SOX6, VAV1, KDR, HBA-A1, TAL1, HBA-A2, BCL2A1D, ALAS2, TNFSF11, AHSP, HBB-B1, HBB-B2, FAS, HBA-X, CD28
GOTERM_BP_FAT	erythrocyte differentiation	6	0,003884378	HBA-A1, HBA-A2, TAL1, ALAS2, AHSP, SOX6, HBA-X
GOTERM_BP_FAT	blood coagulation	7	0,004279892	P2RY12, PLEK, PROCR, GP1BB, PF4, SERPING1, ENTPD1
GOTERM_BP_FAT	vasculature development	14	0,003547545	EMCN, NRP1, TGFBR2, ELK3, WT1, KDR, EDNRA, WNT2, ALDH1A2, AGTR1A, ZFPM2, SOX18, ANGPT1, LOX
GOTERM_BP_FAT	vasculogenesis	5	0,014295611	TGFBR2, ZFPM2, SOX18, WT1, KDR
GOTERM_BP_FAT	blood vessel morphogenesis	10	0,030218429	EDNRA, EMCN, NRP1, TGFBR2, ANGPT1, ZFPM2, SOX18, ELK3, WT1, KDR
GOTERM_BP_FAT	blood circulation	7	0,035370125	WNT2, EDNRA, FLI1, AGTR1A, KCNJ8, PTGS1, GUCY1A3
GOTERM_BP_FAT	extracellular matrix	28	1,94E-08	FMOD, ADAMTSL1, MAMDC2, LUM, ADAMTS15, TGFB3, POSTN, DCN, TIMP2, CPZ, WNT2, SMOC2, OGN, ALB, PTN, LOX, ADAMTS12, ENTPD1, LOXL1, COL8A2, ANGPTL4, ADAM10, CCDC80, COL4A6, COL4A5, COL1A2, ADAM12, ADAMTS5
GOTERM_BP_FAT	angiogenesis	8	0,027242333	EDNRA, EMCN, NRP1, TGFBR2, ANGPT1, SOX18, ELK3, KDR

Einige der durch den *knockdown* von Zfp533 herunterregulierten essentiellen Marker für die Hämatopoiese und vaskuläre Entwicklung sind in der folgenden Tabelle 4.14 aufgeführt.

Tabelle 4.14: Übersicht über einige in *knockdown* Zfp533 herunterregulierte Hämatoopoese betreffende und vaskuläre Marker

Gen	Fold change	Gen	Fold change
Adamts12	-2,04058	Kcnab1	-4,15019
Aebp1	-2,11986	Kdr	-2,07886
Ahsp	-2,76841	Lpl	-3,37596
Aif1	-4,87871	Lum	-3,63
Alas2	-2,40948	Maf	-3,35803
Alb	-2,28723	Mbnl3	-2,55974
Alox5ap	-2,05399	Mmrn1	-3,00924
Angpt1	-2,41967	Nfe2	-2,03697
Angptl4	-2,77184	Nrp1	-2,31022
Angptl7	-2,3917	P2ry12	-4,66766
Aplnr	-2,68377	Pdgfrl	-2,66109
Col1a2	-2,04023	Pf4	-4,13447
Col8a2	-3,64371	Plek	-4,35282
Cx3cr1	-3,83661	Prpc	-2,00114
Dsc2	-2,84305	Procr	-2,36719
Ednra	-2,37467	Ptgs1	-3,80286
Eltd1	-2,35979	Rgs2	-2,36858
Fbln5	-2,71827	Slc40a1	-2,24505
Fermt3	-3,54264	Slc4a1	-7,15851
Fli1	-2,62077	Smoc2	-6,5835
Gp1bb	-2,49844	Sox18	-2,22861
Gucy1b3	-2,01707	Sox6	-3,26296
Gypa	-3,61829	Srpx2	-2,01178
Gypc	-2,46827	Tal1	-2,17597
Hba-a1 /// Hba-a2	-12,1255	Tek	-3,24503
Hba-x	-16,9029	Tgfb3	-2,36912
Hbb-b1 /// Hbb-b2	-13,1736	Thbs1	-2,38153
Hbb-b2	-10,0848	Timp2	-2,04972
Hbb-bh1	-20,9896	Tspan32	-4,83199
Hbb-y	-25,1677	Tubb2a	-2,00587
Hemgn	-4,93345	Vav1	-2,23951
Hpgds	-4,3704	Zfpm2	-2,89038
Itga8	-2,27116		

Abschließend läßt sich eine Übereinstimmung der aus dem *knockdown* von Zfp533 im Zebrafisch und in murinen ES-Zellen erbrachten Ergebnisse feststellen. Alle Resultate deuten darauf hin, dass Zfp533 eine wichtige Rolle für die Hämatoopoese, die Entwicklung oder Aufrechterhaltung der Blutgefäße und die Entwicklung und Funktion des Herzens spielt.

5. Diskussion

Die wissenschaftliche Forschung ist an entwicklungsbiologischen Prozessen und Regulationsmechanismen von embryonalen Stammzellen sehr interessiert. ES-Zellen sind in der Lage, sich in voll funktionsfähige, kontraktile Kardiomyozyten zu entwickeln (Doetschman et al., 1985 ; Wobus, et al, 1991 ; Maltsev et al., 1994 ; Metzger et al., 1995 ; Mummery et al., 2002). Daher setzt die medizinische Forschung große Hoffnung in die Entwicklung neuer Behandlungsmöglichkeiten von Herzerkrankungen durch Stammzelltherapie. Für eine gezielte Anwendung ist es unumgänglich, das genetische Netzwerk genau zu verstehen. Das Wissen über die beteiligten Faktoren und deren zeitliches und räumliches Expressionsmuster ist grundlegend für das Verständnis der Herzentwicklung. Daher ist die Kenntnis über die Rolle von Transkripten unbekannter Funktion für die Kardiomyogenese und Funktion von Kardiomyozyten in embryonalen Stammzellen von großem Interesse.

Die vorliegende Arbeit untersucht die Gene 4930506M07Rik, 9530057J20Rik, A130092J06Rik, Ddit4l, Zfp365 und Zfp533 auf eine mögliche Beteiligung an der kardialen Entwicklung. Es handelt sich hierbei um Gene, die in Maus-Kardiomyozyten und/oder murinen mesodermalen Zelllinien identifiziert wurden (siehe Kapitel 4.1).

5.1 Analyse der sechs Kandidatengene im Zebrafisch

Um einen ersten Einblick in die Funktion der sechs Kandidatengene zu erhalten, wurden die homologen Kandidatengene der Maus im Zebrafisch analysiert. Ziel war eine Identifizierung und erste funktionale Charakterisierung *in vivo*.

Es konnte mittels *in situ* Hybridisierung gezeigt werden, dass – mit Ausnahme von zfZfp365 – alle Gene im Herz exprimiert waren. Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass sie an der Herzentwicklung beteiligt sein könnten.

Zur Klärung der Frage, ob und in welcher Weise die Kandidatengene an der Funktion oder Entwicklung des Herzens bzw. Vaskularsystems beteiligt sind, wurden Injektionen mit Morpholino-modifizierten antisense Oligonukleotiden (MO) durchgeführt. Der dadurch hervorgerufene *knockdown* der Kandidatengene führte in drei Fällen zu Herzdefekten und bekräftigt damit die These, dass diese Gene in

die Herzentwicklung involviert sein könnten. Der *knockdown* von zf4930506M07Rik zeigte ein Ausbleiben des Herzloopings (Kapitel 4.5.1; Abb.: 4.21). zfA130092J06Rik *knockdown* führte zu einem vergrößerten Atrium (Kapitel 4.5.3; Abb.: 4.25). Ebenso wurde ein Looping des Herzens unterbunden (Abb.: 4.25). Der Ventrikel zeigte keine eigene spontane Kontraktion. *In situ* Hybridisierung mit dem kardialen Marker *cmlc2* bestätigte die gefundene vergrößerte Herzregion (Abb. 4.26). *Knockdown* von zfZfp533 verursachte ein Ausbleiben des Herzloopings und eine Vergrößerung des Atriums (Kapitel 4.5.6; Abb.: 4.29).

Zu erwähnen sei hier, dass der *knockdown* von zf9530057J20Rik zwar keine direkt sichtbaren Herzdefekte verursachte, *in situ* Hybridisierung mit dem kardialen Marker *cmlc2* aber auf eine Vergrößerung des Atriums hindeutet (Abb.: 4.24). Ebenso bemerkenswert ist die veränderte Expressionsdomäne von *cmlc2* in zfZfp365 *knockdown*-Tieren (Abb. 4.28). Zwar weisen sie keinerlei sichtbare morphologische Defekte in der Herzregion auf, aber nach *in situ* Hybridisierung scheinen zur üblichen herzspezifischen Expression weitere Bereiche gefärbt zu sein. Bereiche um das Herz herum sind mit angefärbt, was den Schluss zulässt, dass kardiale Zellen außerhalb ihres Zielortes liegen. Mögliche Gründe hierfür könnten eine Reprogrammierung bzw. Falschprogrammierung von kardialen Zellen sein oder eine vorzeitige Unterbrechung der Wanderung der kardialen Zellen während der Kardiogenese.

Neben Herzdefekten traten in 4 Fällen auch Defekte des Vaskularsystems auf. Der *knockdown* von zf4930506M07Rik, zf9530057J20Rik, zfZfp365 und zfZfp533 zeigte in unterschiedlichen Bereichen eine gestörte Bildung des Kreislaufsystems. Bei zf4930506M07Rik traten diese zum Teil gepaart mit Blutansammlungen auf (Abb.: 4.21 und 4.22). Die Vaskulardefekte von zfZfp365 scheinen sich mit der oben beschriebenen veränderten Expression von *cmlc2* zu decken (Abb. 4.27). Der *knockdown* von zfZfp533 scheint sowohl das Vaskularsystem, als auch das blutbildende System zu beeinflussen (Abb. 4.30 und 4.32).

In einer Reihe verschiedener Studien wurden im Jahr 1996 und 1998 (Stainier et al., 1996; Alexander et al., 1998) viele Mutationen entdeckt, die die Entwicklung des Zebrafischembryos beeinflussen (zusammengefasst in Stainier et al., 2002). Einige Beispiele sind im Folgenden aufgezählt.

Ein Fehler in der Fusion der bilateralen Herzprimordia (primitiver Myokardschlauch) führt zu einer Bildung von zwei Herzen, *cardia bifida* genannt. In der Mutante *lonely atrium* ist kein Herzventrikel sichtbar und das Atrium ist direkt an den Ausflusstrakt gekoppelt. *santa* hat ein enorm vergrößertes Herz. Die relative Position der zwei Herzkammern ist in der Mutante *overlooped* gestört. Die Mutanten *scotch tape* und *superglue* führen zu einer signifikanten Reduktion der Herzgallerte zwischen den beiden Herzschichten (Chen et al., 1996). Weitere Mutationen, die eine Störung der Herzbildung zur Folge haben, sind z.B. *miles apart* und *bonnie und clyde*. Sie stören die Fusion des primitiven Myokardschlauchs, was in der Bildung von zwei Herzen auf jeder Seite der Mittellinie resultiert (*cardia bifida*). Der *cloche* Mutante fehlen die Endokardzellen. Die Myokardschicht wird trotz der Abwesenheit von Endokardzellen gebildet, ist aber dysmorph: der Ventrikel ist in seiner Größe reduziert und die Herzwände des Atriums sind ausgedehnt. In *pandora* findet man hauptsächlich eine Kammer, das Atrium, der Ventrikel ist deutlich reduziert (Stainier et al., 1996). Mutationen die die Funktion des Herzens beeinflussen, kann man in zwei Kategorien unterscheiden. In die Beeinflussung der Herzkontraktion, also der Stärke oder Zahl der Herzschläge, oder die Beeinflussung des Rhythmus des Herzschlags, also der Kontraktion der beiden Kammern zueinander (Chen et al., 1996). In der Mutante *breakdance* wurde ein Verhältnis der Herzschlagrate von Atrium zu Ventrikel von 2:1, in der Mutante *hiphop* sogar von 3:1 gemessen (Chen et al., 1996).

Ein morphologischer Defekt den die Injektion eines MOs gegen *zfA130092J06Rik* mit sich bringt, ist die Vergrößerung des Atriums. Zeitgleich ist keine Kontraktion des Ventrikels vorhanden. Diese Beobachtungen lassen Vermutungen offen, ob es sich um zwei voneinander getrennte Defekte handelt, oder ob diese Defekte miteinander verknüpft sind, das vergrößerte Atrium also ein sekundärer Defekt wäre

Es ist denkbar, dass das Atrium normal angelegt wurde, aber durch vermehrten Muskelaufbau und damit verbundene Größenzunahme die fehlende Funktion des defekten Ventrikels kompensieren musste. Die Muskelzunahme kam wahrscheinlich durch erhöhte Beanspruchung zustande. Durch erhöhte Schlagkraft des Atriums wurde vermutlich versucht, die Zirkulation des Blutes aufrecht zu erhalten.

Eine Vergrößerung des Atriums scheint nicht auszureichen, da der Blutfluss nach vier Tagen in den zfA130092J06Rik injizierten Tieren zum Erliegen kam.

Diese Beobachtungen wurden auch schon in der oben erwähnten Mutantenmusterung 1996 für andere Mutationen gemacht.

In der ventrikelspezifischen Mutantengruppe kontrahiert der Ventrikel nur schwach, und obwohl das Atrium mit Kraft schlägt, kommt die Zirkulation doch bald zum Stillstand. Das Atrium in den ventrikelspezifischen Mutanten weitet sich hinter dem fehlenden Ventrikel aus (Stainier et al., 1996).

Zu den im *knockdown* von zf4930506M07Rik beobachteten Vaskulardefekten, zum Teil gekoppelt mit Blutansammlungen, traten in der Musterung von 1996 ähnliche Störungen des Blutgefäßsystems auf.

In verschiedenen Mutanten wurden Blutansammlungen sichtbar nachdem die Zirkulation eingesetzt hat. Oftmals in Regionen ohne offensichtliche signifikante Defekte, was zu Überlegungen führt, ob es sich dabei um ein Problem der Montage oder Erhaltung von Blutgefäßen handelt (Stainier et al., 1996).

Die Bildung eines geschlossenen Blutkreislaufsystems in Vertebraten ist ein komplexer Prozess, in den eine Vielzahl von Signalmolekülen involviert sind und der eine Reihe verschiedener Verhaltensmuster der Zellen mit sich bringt (Cleaver und Krieg, 1999). Endothelvorläuferzellen, oder Angioblasten, entstehen im lateralen Mesoderm von Vertebratenembryonen und unterliegen zwei Hauptprozessen, der Vaskulogenese und der Angiogenese. Die Vaskulogenese beschreibt die *de novo* Bildung von Blutgefäßen aus dem Zusammenschluss von Angioblasten (Risau und Flamme, 1995). Im Gegensatz dazu versteht man unter Angiogenese die Bildung von neuen Gefäßen aus bereits bestehenden. Die Blutgefäße haben alle eine ähnliche histologische Struktur. Sie bestehen aus zwei Basiszelltypen, den vaskulären Endothelzellen und den vaskulären glatten Muskelzellen. Die innere Auskleidung der Blutgefäße, angrenzend an das Lumen, ist ein dünnes, einschichtiges Epithel aus vaskulären Endothelzellen. Glatte Muskelzellen (oder Perizyten) umgeben die Endothelzellen.

Die Blutzirkulation trägt nicht zur Bildung des primären Netzwerks bei. Dies belegen Versuche mit *silent heart (sih)* Mutationen. Die Herzen homozygoter *sih* Zebrafische schlagen, aufgrund eines Defekts in der Expression von kardialem

Troponin T, nicht (Sehnert et al., 2002). Bis auf die fehlende Zirkulation entwickelt diese Mutante das primäre Gefäßsystem normal (Isogai et al., 2003).

Das Blutgefäßsystem ist in zwei separate aber miteinander verknüpfte Netzwerke aus arteriellen und venösen Blutgefäßen unterteilt. Diese Netzwerke sind sowohl morphologisch als auch funktionell sehr unterschiedlich voneinander. Historisch wurde diese Differenzierung hauptsächlich auf physiologische Kräfte wie Richtung und Druck des Blutflusses zurückgeführt. Studien haben den Erwerb der arteriellen gegenüber der venösen Identität untersucht. Zellmarkierungsexperimente haben gezeigt, dass einzelne Angioblasten im LPM, die mit einem fluoreszentelem Tracer markiert wurden, entweder nur zu arteriellen oder venösen Endothelzellen führen, aber nicht zu beiden Zelltypen (Zhong et al., 2000, 2001). Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Entscheidung über das arteriell-venöse Schicksal schon sehr früh gefasst wird, bevor die Angioblasten zur Mittellinie wandern. Weitere Studien im Zebrafisch haben einen molekularen Weg definiert, der zum Erwerb des arteriellen Schicksals während der Embryogenese führt (Lamont und Childs, 2006). Durch mRNA und Morpholino Injektionen in Kombination mit Mutanten und transgenen Zebrafischembryonen war es möglich mehrere Signalwege gleichzeitig zu beeinflussen und somit die genetische Hierarchie aufzudecken, die für die arterielle Differenzierung verantwortlich ist (Ungos und Weinstein, 2008).

Dieser Signalweg enthält bekannte Signalmoleküle wie *Sonic hedgehog (Shh)*, *Vascular endothelial growth factor (Vegf)*, *Notch* und Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K).

Das *Hedgehog (Shh)* -Signal steht an der Spitze der genetischen Hierarchie. *Shh* wird vom Notochord exprimiert. Ein Verlust des *Shh*-Signals führt zu einem Fehler in der Bildung der dorsalen Aorta (Lawson et al., 2002).

Vegf arbeitet unterhalb von *Shh* und vermittelt die Fähigkeit von *Shh*, die Bildung der dorsalen Aorta zu regulieren, da die Überexpression von *Vegf* mRNA die Expression von arteriellen Markern in Abwesenheit des *Shh*-Signals erhalten kann. Ebenso wie *Shh* beeinflusst *Vegf* das arterielle Schicksal. *Vegf* wird von den Somiten exprimiert. Diese Expression wird durch *Shh*-Signale des Notochords induziert und reguliert (Lawson et al., 2002). Neben *Shh* und *Vegf* spielt auch der

Notch-Signalweg eine Rolle in der Determinierung des arteriellen Schicksals (Lawson et al., 2001).

Der Signalweg unterhalb von *Notch* wurde in Zebrafischstudien beschrieben. Eine Mutation im Zebrafischhomolog der Phospholipase C γ -1 (*plcg1*), bekannt für den Einfluss auf die normale Funktion von *Vegf*, wurde identifiziert (Lawson et al., 2003). Diese *plcg1*-Mutante zeigt spezifische Defekte in der Bildung der Arterie und einen Verlust in der Expression arterienspezifischer Marker. Der Verlust von *Notch*-, *Vegf*- oder *Shh*-Signalen führt zum Verlust der arteriellen Identität, während exogene Aktivierung oder Überexpression dieser Faktoren eine ektopische Expression von arteriellen Markern nach sich zieht (Ungos und Weinstein, 2008).

Der *knockdown* von *zfZfp533* scheint sowohl das Vaskularsystem, als auch das blutbildende System zu beeinflussen. Es gibt Hinweise darauf, dass die Führung der Gefäße durch das Gewebe an ihren Zielort gestört sein könnten.

Experimentelle Studien im Zebrafisch haben ergeben, dass der Semaphorin-Plexin-Signalweg eine bedeutende Rolle in der Führung der ISV spielt, indem er das Wachstum dieser Gefäße auf definierte Bereiche entlang der intersegmentalen Begrenzungen beschränkt (Torres-Vazquez et al., 2004). So führt z.B. der Verlust der *plxnd1*-Funktion im Zebrafisch zu ISVs die aufs Geratewohl quer durch die Somiten wachsen und Verzweigungen bilden.

Die Expression von *zfZfp533* in den Somiten und die Ausbildung von Defekten in den ISVs nach Injektion von *zfZfp533* MO legt nahe, dass dieses Gen möglicherweise für die Bildung des Gefäßsystems verantwortlich ist. Das vergrößerte Atrium könnte durch eine kardiale Hypertrophie hervorgerufen werden. Sie führt dazu, dass die einzelnen Muskelfasern an Dicke zunehmen, ohne aber gleichzeitig das Gefäßsystem zu erweitern. Es handelt sich um einen Kompensationsmechanismus, der durch vasoaktive Peptide, wie Endothelin und Angiotensin II, aktiviert wird. Diese Peptide werden von neonatalen Kardiomyozyten, die unter Einwirkung mechanischer Kräfte stehen, gesteigert produziert (Komuro 2000 und 2001).

Generell kann man aus diesen Beobachtungen schließen, dass es sich bei 4930506M07Rik, A130092J06Rik, *Zfp365* und *Zfp533* um Gene handelt, die Einfluss auf das kardiovaskuläre System besitzen.

5.2 Analyse der Kandidatengene in murinen embryonalen Stammzellen

Nach dem Überblick, den die *in vivo* Analyse der Kandidatengene im Zebrafisch lieferte, folgt nun eine Untersuchung der Kandidatengene *in vitro* mittels murinen CGR8-ES-Zellen.

Die Zahl der zu untersuchenden Kandidatengene wurde, nach Durchsicht und Auswertung der vorangegangenen *in vivo*-Ergebnisse, auf 4 von ehemals 6 Gene beschränkt. *zfDditl4l* zeigte nach Injektion der genspezifischen Morpholinos keine signifikanten morphologischen Defekte. *zfJ20* zeigte ebenfalls keine signifikanten Defekte das kardiovaskuläre System betreffend. Daher erschienen diese beiden Gene für die Fragestellung dieser Arbeit als weniger relevant und wurden nicht weiter untersucht.

Trotzdem wurde zunächst das Expressionsmuster aller sechs Kandidatengene untersucht. Im Gegensatz zum spezifischen Herzmuskelprotein α MHC sind alle Kandidatengene bereits in ES-Zellen exprimiert. Die Expression von α MHC beginnt erst ab Tag 5 (Abb. 4.34). Das embryonale Herz ist ein kontrahierendes Blutgefäß mit einer äußeren Muskelschicht (Myokard) und einer inneren Endothelschicht (Endokard). Myokard- und Endokardzellen entstammen beide aus bilateralen mesodermalen Zellpopulationen. Viele mesodermale Transkriptionsfaktoren, wie BMP2, *Tbra*, *Nkx2.5*, *Gata4* und *MLC2v* steuern während der ES-Zell-Differenzierung der Reihe nach die Bildung von schlagenden Arealen in den EBs. Diese schlagenden Areale sind ein charakteristisches Merkmal für Kardiomyozyten. Aufgrund der frühen Expression der Kandidatengene bereits in ES-Zellen, aber auch später in ihrer Entwicklung, könnten sie einen Einfluß auf die Bildung und Entwicklung von Kardiomyozyten bereits im mesodermalen Stadium haben. Zum Vergleich sei aufgeführt, dass der mesodermale Marker *Tbra* erst ab Tag 3 exprimiert wird.

Zur Klärung der Frage, ob und in welcher Weise die Kandidatengene an der Funktion oder Entwicklung des Herzens bzw. Vaskularsystems beteiligt sind, wurden stabile *knockdown*-Klone gegen die Kandidatengene (4930506M07Rik, A130092J06Rik, *Zfp365* und *Zfp533*) generiert. Die Klone behielten ihre

pluripotente Art und wiesen in Bezug auf ihre Morphologie, Proliferation und Wachstumseigenschaften keine Unterschiede zu Wildtyp CGR8-ES-Zellen und den Kontrollvektor-transfizierten Klonen auf (Abb 4.38). Nach zehn Tagen der Differenzierung konnten schlagende Areale beobachtet werden. Ähnlich wie der Wildtyp verhielt sich 4930506M07Rik. Die anderen *knockdown*-Klone zeigten eine reduzierte Anzahl an EBs mit schlagenden Arealen (Tab. 4.8). Dies könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, dass diese Gene für die Herzentwicklung von Bedeutung sind.

Die Auswirkungen des *knockdowns* auf die Expression spezieller Marker, insbesondere natürlich des Mesoderms, wurden mittels semiquantitativer (RT) PCR validiert. Während der Differenzierung kann ein spezifisches Expressionsmuster verschiedener herzspezifischer Gene beobachtet werden. So sind viele Transkriptionsfaktoren bekannt, die eine entscheidende Rolle in der frühen kardialen Entwicklung haben (Wobus et al., 1998). Charakteristische Marker für Kardiomyozyten sind z.B. die Transkriptionsfaktoren Bmp2, Tbra, Nkx2.5, Mef2c und Hand1.

Nach *knockdown* von A130092J06Rik waren die kardialen Marker (α MHC, Tbx20, Myocardin, TnnT und TnnC) ebenso wie BMP2 im Vergleich zum Wildtyp deutlich runterreguliert. Im Falle von Zfp533 waren dies die vaskulären Marker (α SMA, Fik1, VEGF) und Tbra (Abb. 4.39).

Dies ist ein weiteres Indiz, dass speziell A130092J06Rik eine Rolle für die Kardiomyogenese und Funktion von Kardiomyozyten spielen könnte. Zfp533 scheint ein Faktor in der Vaskularentwicklung zu sein.

Eine Entwicklung in kardiale bzw. vaskuläre Zellen ist auf embryonale Vorläuferzellen im Seitenplattenmesoderm zurückzuführen. Die frühe Expression von A130092J06Rik und Zfp533 (Abb. 4.34) und damit wahrscheinlich auch frühe Wirkung auf den Regulationsmechanismus, scheint zu einem Zeitpunkt einzusetzen, an dem sich beide Zelltypen noch gemeinsam entwickeln (Wang et al., 2007).

Kardiovaskuläre Vorläuferzellen besitzen die Möglichkeit in Kardiomyozyten, glatte Muskelzellen und Endothelzellen zu differenzieren (Kattman et al., 2006; Wu et al., 2006; Moretti et al., 2006).

Die Ergebnisse der quantitativen PCR spiegeln die Ergebnisse der semiquantitativen (RT) PCR größtenteils wieder (Abb. 4.40).

Da speziell A130092J06Rik und Zfp533 einen Einfluss auf die Herz- bzw. Vaskularentwicklung zu haben scheinen, wurde die verminderte Expression der Marker α MHC, Myocardin sowie VEGF durch immunohistochemische Färbung validiert (Abb. 4.39 bzw. 4.40). Wie zu erwarten, war die Expression der drei Marker signifikant reduziert.

Daraufhin wurde zur Ermittlung eines globalen Überblicks der Gene A130092J06Rik und Zfp533 eine Mikroarrayanalyse durchgeführt. Diese stützt die These, dass A130092J06Rik eine Rolle für die Kardiomyogenese und Funktion von Kardiomyozyten spielen könnte. Insgesamt konnten 22 kardiale Marker entdeckt werden, die nach *knockdown* von A130092J06Rik im Vergleich zum Wildtyp herunterreguliert waren (Tab. 4.11). Zu diesen zählten unter anderem α MHC (Myh6), Tgfb3, Wnt2, Kcnab1 und Tbx20.

Zudem konnte die These gestützt werden, dass *knockdown* von Zfp533 Einfluss auf die Hämatopoiese und vaskuläre Entwicklung haben könnte. Die Expression einiger wichtiger Gene für die Hämatopoiese und vaskuläre Entwicklung war beeinflusst (Tab. 4.13). Unter anderem waren dies Col8a2, Fli1, Nrp1 und KDR (VEGF).

Diese waren im Vergleich zum Wildtyp deutlich herunterreguliert.

Aus den zuvor beschriebenen Beobachtungen kann der Schluss gezogen werden, dass die beiden spezifisch in den Kardiomyozyten hochregulierten Gene

- A130092J06Rik und
- Zfp533

eine entscheidende Rolle für die Kardiomyogenese spielen.

Mit der Charakterisierung von A130092J06Rik und Zfp533 als wichtige Faktoren für die Kardiomyogenese, wurde ein interessantes Feld eröffnet, dessen detaillierterer Erforschung es nachzugehen gilt.

6. Zusammenfassung

Herz-Kreislaufkrankungen sind eine der häufigsten Todesursachen in Europa. Ein durch den Verlust von funktionalen Kardiomyozyten hervorgerufener Herzfehler ist am weit verbreitetsten. Daher ist es ein erster Schritt, in Hinblick auf zukünftige Therapiemöglichkeiten, das genetische Netzwerk zu verstehen, das zu funktionalen Kardiomyozyten führt. Viele Fragen hinsichtlich beteiligter Gene und molekularer Signalwege bleiben derzeit aber noch offen. Daher ist eine Untersuchung von Transkripten unbekannter Funktion und ihre Rolle für die Kardiogenese von großem Interesse. Durch eine großangelegte Expressionsstudie mit Affymetrix Expressionsmikroarrays in der Arbeitsgruppe wurde das komplette Transkriptom von reinen mesodermalen Zellen und Kardiomyozyten ermittelt (Doss et al., 2007a+b). Aus diesen Analysen konnten wir zwei Gene A130092J06Rik und Zfp533 identifizieren, die spezifisch in den Kardiomyozyten hochreguliert waren. Ebenso wurden zwei Gene 9530057J20Rik und Ddit4l identifiziert, die in mesodermalen Zellen und Kardiomyozyten hochreguliert waren. Weitere zwei Gene 4930506M07Rik und Zfp365 wurden identifiziert, die in mesodermalen Zellen hochreguliert, aber in Kardiomyozyten runterreguliert waren. Als Vergleich dienten jeweils undifferenzierte ES-Zellen und Kontroll-EBs. Um eine erste funktionale Charakterisierung dieser Gene für eine intakte Herzentwicklung zu erhalten, wurden durch Injektion von Morpholino-modifizierten Oligonukleotiden *knockdown*-Studien im Zebrafisch durchgeführt. *knockdown* von 4930506M07Rik, A130092J06Rik und Zfp533 führte zu Herzdefekten. Ebenso wurde das Differenzierungspotential der Gene in murinen ES-Zellen untersucht. Hierzu wurde mit Hilfe der short hairpin RNA (shRNA) Methode die Genexpression inhibiert. Besonders für A130092J06Rik konnte eine wichtige Rolle für die Differenzierung von ES-Zellen zu frühen mesodermalen Zellen und intakten Kardiomyozyten dargelegt werden. Für Zfp533 konnte zudem ein Einfluss auf die Hämatopoiese und vaskuläre Entwicklung nachgewiesen werden. Mittels PCR, Immunohistochemie und Mikroarrayanalysen wurde gezeigt, dass der *knockdown* der beiden Gene die Expression spezifischer mesodermaler und kardialer Marker signifikant reduzierte. Die vorliegenden Resultate zeigen, dass die beiden, spezifisch in Kardiomyozyten hochregulierten, Gene A130092J06Rik und Zfp533 eine entscheidende Rolle für die Kardiomyogenese spielen.

7. Abstract

Heart failure due to the loss of functional cardiomyocytes is one of the most frequent cardiovascular diseases. Understanding the genetic network that leads to functional cardiomyocytes is the first step to develop future therapies. Two murine engineered mesodermal ESC lines as well as a cardiac-specific ESC line were established in our group. A global transcriptome analysis yielded two genes A130092J06Rik and Zfp533 up-regulated in cardiomyocytes, two genes 9530057J20Rik and Ddit4l up-regulated in cardiomyocytes and pure mesodermal cells and two genes 4930506M07Rik and Zfp365 up-regulated in pure mesodermal, but down-regulated in cardiomyocytes (Doss et al., 2007a+b). We were interested in a fast screen for the functional role of transcripts with unknown function (TUFs) for an intact activity of the heart. Therefore we searched for homologues in the zebrafish genome and performed a morpholino-based *knockdown* approach. Morpholino-oligonucleotide injections of 4930506M07Rik, A130092J06Rik und Zfp533 caused highly specific cardiovascular defects in the majority of them such as altering of heart morphology and defects to a different extent and penetrance. For *knockdown* of the gene expression in murine ESCs to further analyze the potential for cellular differentiation, short hairpin RNA (shRNA) was used. PCR, Immunohistochemistry and microarray analysis indicated that the *knockdown* of A130092J06Rik and Zfp533 suppresses the expression of specific mesodermal and cardiac marker genes significantly. The present results demonstrate that, the in cardiomyocytes specifically up-regulated, genes A130092J06Rik and Zfp533 play a crucial role in cardiomyogenesis.

8. Literaturverzeichnis

- Alexander, J., Stainier, D. Y. R. and Yelon, D.** (1998). Screening mosaic F₁-females for mutations affecting zebrafish heart induction and patterning. *Dev. Genet.* **22**, 288-299.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J.** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-402.
- Andressen, C., Stocker, E., Klinz, F.J., et al.** (2001). Nestin-specific green fluorescent protein expression in embryonic stem cell-derived neural precursor cells used for transplantation. *Stem Cells* **19**, 419-424.
- Berdougo, E., Coleman, H., Lee, D. H., Stainier, D. Y. R. and Yelon, D.** (2003). Mutation of weak atrium/atrial myosin heavy chain disrupts atrial function and influences ventricular morphogenesis in zebrafish. *Development* **130**, 6121-6129.
- Bolstad, B.M., Irizarry, R.A., Astrand, M., Speed, T.P.** (2003). A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* **19**, 185-193.
- Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M.H., Robertson, E.** (1984). Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* **309**, 255-256.
- Burns, C.G., Milan, D.J., Grande, E.J., Rottbauer, W., MacRae, C.A., Fishman, M.C.** (2005). High-throughput assay for small molecules that modulate zebrafish embryonic heart rate. *Nat.Chem.Biol.* **1**, 263-264.
- Chen, J.-N., Haffter, P., Odenthal, J., Vogelsang, E., et al.** (1996). Mutations affecting the cardiovascular system and other internal organs in zebrafish. *Development* **123**, 293-302.
- Cleaver, O. and Krieg, P. A.** (1999). Molecular mechanisms of vascular development. *Heart Development, San Diego: Academic Press*, 221-252.
- Christoforou, N., Miller, R.A., Hill, C.M., Jie, C.C., McCallion, A.S., Gearhard, J.D.** (2008). Mouse ES cell derived cardiac precursor cells are multipotent and facilitate identification of novel cardiac genes. *J.Clin.Invest.* **118**, 894-903.
- Dennis, G., Jr., Sherman, B.T., Hosack, D.A., et al.** (2003) DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol.* **4**, 3.
- Doetschman, T.C., Eistetter, H., Katz, M., Schmidt, W., Kemler, R.** (1985). The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J.Embryol.Exp.Morphol.* **87**, 27-45.

- Doss, M.X., Winkler, J., Chen, S., Hippler-Altenburg, R., Sotiriadou, I., Halbach, M., Pfannkuche, K., Liang, H., Schulz, H., Hummel, O., Hübner, N., Rottscheidt, R., Hescheler, J. and Sachinidis, A.** (2007a). Global transcriptome analysis of murine embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Genome Biol* **8**, R:56.
- Doss, M.X., Chen, S., Winkler, J., Hippler-Altenburg, R., Odenthal, M., Wickenhauser, C., Balaraman, S., Schulz, H., Hummel, O., Hubner, N., Ghosh-Choudhury, N., Sotiriadou, I., Hescheler, J., Sachinidis, A.** (2007b) Transcriptomic and phenotypic analysis of murine embryonic stem cell derived BMP2+ lineage cells: an insight into mesodermal patterning. *Genome Biol.* **8**, R184.
- Eisenberg, L. M. and Markwald, R. R.** (1995). Molecular regulation of atrioventricular valvuloseptal morphogenesis. *Circ. Res.* **77**, 1-6.
- Erlich, H. A.** (1989). Polymerase chain reaction. *J. Clin. Immunol.* **6**, 437-447.
- Evans, M.J., Kaufman, M.H.** Establishment in Culture of Pluripotential Cells from Mouse Embryos. (1981). *Nature* **292**, 154-6.
- Foley, A., Mercola, M.** (2004). Heart induction: embryology to cardiomyocyte regeneration. *Trends Cardiovasc.Med.* **14**, 121-125.
- Freeman, N.L., Field, J.** (2000). Mammalian homolog of the yeast cyclase associated protein, CAP/Srv2p, regulates actin filament assembly. *Cell Motil.Cytoskeleton* **45**, 106-120.
- Furue, M., Okamoto, T., Hayashi, Y., et al.** (2005). Leukemia inhibitory factor as an anti-apoptotic mitogen for pluripotent mouse embryonic stem cells in a serum-free medium without feeder cells. *In Vitro Cell Dev.Biol.Anim.* **41**, 19-28.
- Gissel, C., Voolstra, C., Doss, M.X., et al.** (2005). An optimized embryonic stem cell model for consistent gene expression and developmental studies: a fundamental study. *Thromb.Haemost.* **94**, 719-727.
- Gough, N.M., Williams, R.L.** (1998). The pleiotropic actions of leukemia inhibitory factor. *Cancer Cells* **1**(3), 77-80.
- Heasman, J.** (2002). Morpholino oligos: making sense of antisense?. *Dev Biol* **243**, 209-14.
- Hosack, D.A., Dennis, G., Jr., Sherman, B.T., Lane, H.C., Lempicki, R.A.** (2003). Identifying biological themes within lists of genes with EASE. *Genome Biol.* **4**, R70
- Isogai, S., Horiguchi, M. and Weinstein, B. M.** (2001). The vascular anatomy of the developing zebrafish: an atlas of embryonic and early larval development. *Dev Biol* **230**, 278-301.

- Isogai, S., Lawson, N. D., Torrealday, S., Horiguchi, M. and Weinstein, B. M.** (2003). Angiogenic network formation in the developing vertebrate trunk. *Development* **130**, 5281-5290.
- Kattman, S.J., Huber, T.L., Keller, G.M.** (2006). Multipotent flk-1+ cardiovascular progenitor cells give rise to the cardiomyocyte, endothelial, and vascular smooth muscle lineages. *Dev.Cell* **11**, 723-732.
- Keller, G.M.** (1995). In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Curr.Opin.Cell Biol.* **7**, 862-869.
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B. and Schilling, T. F.** (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* **203**, 253-310.
- Komuro, I.** Molecular mechanism of mechanical stress-induced cardiac hypertrophy. (2000) *Jpn Heart J* **41**, 117-129.
- Komuro, I.** Molecular mechanism of cardiac hypertrophy and development. (2001) *Jpn Circ J* **65**, 353-358.
- Ladd, A.N., Yatskievych, T.A., Antin, P.B.** (1998). Regulation of avian cardiac myogenesis by activin/TGFbeta and bone morphogenetic proteins. *Dev.Biol.* **204**, 407-419.
- Lamont, R. E. and Childs, S.** (2006). MAPping out arteries and veins. *Sci STKE*, pe39.
- Lawson, N. D., Scheer, N., Pham, V. N., Kim, C. H., Chitnis, A. B., Campos-Ortega, J. A. and Weinstein, B. M.** (2001). Notch signaling is required for arterial-venous differentiation during embryonic vascular development. *Development* **128**, 3675-3683.
- Lawson, N. D. and Weinstein, B. M.** (2002). In vivo imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish. *Dev Biol* **248**, 307-318.
- Lawson, N. D., Vogel, A. M. and Weinstein, B. M.** (2002). Sonic hedgehog and vascular endothelial growth factor act upstream of the Notch pathway during arterial endothelial differentiation. *Dev. Cell* **3**, 127-136.
- Lawson, N. D., Mugford, J. W., Diamond, B. A. and Weinstein, B. M.** (2003). Phospholipase C gamma-1 is required downstream of vascular endothelial growth factor during arterial development. *Genes Dev.* **17**, 1346-1351.
- Lev, S., Kehat, I., Gepstein, L.** (2005). Differentiation pathways in human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **1047**, 50-65.
- Maltsev, V.A., Wobus, A.M. Rohwedel, J., Bader, M., Hescheler, J.** (1994) Cardiomyocytes differentiated in *vitro* from embryonic stem cells developmentally express cardiac-specific genes and ionic currents. *Circ Res* **75**, 223-244.

Martin, G.R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. (1981) *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **78**, 7634-7638.

Matsui, Y., Zsebo, K., Hogan, B.L. (1992). Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* **70**, 841-847.

Metzger, J.M., Lin, W.I., Johnston, R.A., Westfall, M.V., Samuelson, L.C. (1995). Myosin heavy chain expression in contracting myocytes isolated during embryonic stem cell cardiogenesis. *Circ.Res.* **76**, 710-719.

Metscher, B.D., Ahlberg, P.E. (1999). Zebrafish in context: uses of a laboratory model in comparative studies. *Dev.Biol.* **210**, 1-14.

Miwa, Y., Atsumi, T., Imai, N. and Ikawa, Y. (1991). Primitive erythropoiesis of mouse teratocarcinoma stem cells PCC3/A/1 in serum-free medium. *Development* **111**, 543-549

Moretti, A., Caron, L., Nakano, A., et al. (2006). Multipotent embryonic isl1+ progenitor cells lead to cardiac, smooth muscle, and endothelial cell diversification. *Cell* **127**, 1151-1165.

Mullins, M. C., Hammerschmidt, M., Haffter, P. and Nusslein-Volhard, C. (1994). Large-scale mutagenesis in the zebrafish: in search of genes controlling development in a vertebrate. *Curr Biol* **4**, 189-202.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51**, 263-73.

Mummery, C., Ward, D., van den Brink, C.E., et al. (2002). Cardiomyocyte differentiation of mouse and human embryonic stem cells. *J.Anat.* **200**, 233-242.

Nakajima, Y., Yamagishi, T., Hokari, S. and Nakamura, H. (2000). Mechanisms involved in valvuloseptal endocardial cushion formation in early cardiogenesis: roles of transforming growth factor (TGF)-beta and bone morphogenetic protein (BMP). *Anat. Rec.* **258**, 119-127.

NIH, National Institute of Health, Scientific Progress and Future Research Directions, in Report on *Stem Cells*. 2001, NIH: Bethesda (USA).

Pease, S., Braghetta, P., Gearing, D., Grail, D., Williams, R.L. (1990). Isolation of embryonic stem (ES) cells in media supplemented with recombinant leukemia inhibitory factor (LIF). *Dev.Biol.* **141**, 344-352.

Pease, S., Williams, R.L. (1990). Formation of germ-line chimeras from embryonic stem cells maintained with recombinant leukemia inhibitory factor. *Exp.Cell Res.* **190**, 209-211.

Plickert, G., Gajewski, M., Gehrke, G., Gausepohl, H., Schlossherr, J. and Ibrahim, H. (1997). Automated *in situ* detection (AISD) of biomolecules. *Dev. Genes Evol.* **207**, 362-367.

Risau, W. and Flamme, I. (1995). Vasculogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **289**, 64-76.

Rodaway, A., Patient, R. (2001). Mesendoderm. an ancient germ layer? *Cell* **105**, 169-172.

Sachinidis, A., Fleischmann, B.K., Kolossov, E., Wartenberg, M. Sauer, H., and Hescheler, J. (2003). Cardiac specific differentiation of mouse embryonic stem cells. (2003). *Cardiovasc Res* **58**, 278-291.

Sachinidis, A., Gissel, C., Nierhoff, D., Hippler-Altenburg, R., Sauer, H., Wartenburg, M. and Hescheler, J. (2003). Identification of platelet-derived growth factor-BB as cardiogenesis-inducing factor in mouse embryonic stem cells under serum-free conditions. *Cell Physiol. Biochem.* **13**, 423-429.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. Third edition. Cold Spring Harbor, New York: *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-7.

Schlange, T., Andree, B., Arnold, H.H., Brand, T. (2000). BMP2 is required for early heart development during a distinct time period. *Mech.Dev.* **91**, 259-270.

Schulte-Merker, S., Ho, R., Herrmann, B. G. and Nüsslein-Vollhard, C. (1992). The protein product of zebrafish homolog of the mouse *T* gene is expressed in nuclei of the germ ring and the notochord of the early embryo. *Development* **116**, 1021-1032.

Sehnert, A. J., Huq, A., Weinstein, B. M., Walker, C., Fishman, M. and Stainier, D. Y. R. (2002). Cardiac troponin T is essential in sarcomere assembly and cardiac contractility. *Nature Genetics* **31**, 106-110.

Smyth, G.K. (2004) Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat.Appl.Genet.Mol.Biol.* **3**, Article3.

Sprague, J., Doerry, E., Douglas, S. and Westerfield, M. (2001). The Zebrafish Information Network (ZFIN): a resource for genetic, genomic and developmental research. *Nucleic Acids Res* **29**, 87-90.

Stainier, D. Y. R. and Fishman, M. C. (1992). Patterning the zebrafish heart tube: acquisition of anterior-posterior polarity. *Dev. Biol.* **153**, 91-101.

Stainier, D. Y. R., Lee, R. K. and Fishman, M. C. (1993). Cardiovascular development in the zebrafish. I. Myocardial fate map and heart tube formation. *Development* **119**, 31-40.

Stainier, D. Y. R., Fouquet, B., Chen, J.-N., Warren, K. S., Weinstein, B. M., Meiler, S. E., Mohideen, M.-A. P. K., Neuhauss, S. C. F., Solnica-Krezel, L., Schier, A. F., Zwartkruis, F., Stemple, D. L., Malicki, J., Driever, W. and Fishman, M. C. (1996). Mutations affecting the formation and function of the cardiovascular system in the zebrafish embryo. *Development* **123**, 285-292.

Stainier, D. Y. R. (2002). Zebrafish genetics and vertebrate heart formation. *Nature Genetics* **2**, 39-48.

Tautz, D. and Pfeifle, C. (1989). A non-radioactive in situ hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene hunchback. *Chromosoma* **98**, 81-5.

Tonissen, K.F., Drysdale, T.A., Lints, T.J., Harvey, R.P., Krieg, P.A. Xnkx-2.5, A *Xenopus* Gene-Related to Nkx-2.5 and Tinman – Evidence for A Conserved Role in Cardiac Development. (1994). *Dev Biol* **162**, 325-8.

Torres-Vazquez, J., Gitler, A. D., Fraser, S. D., Berk, J. D., Pham, V. N., Fishman, M., Childs, S., Epstein, J. A. and Weinstein, B. M. (2004). Semaphorin-plexin signaling guides patterning of the developing vasculature. *Dev Cell* **7**, 117-123.

Toyooka, Y., Tsunekawa, N., Akasu, R., Noce, T. (2003). Embryonic stem cells can form germ cells in vitro. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**, 11457-11462.

Traver, D., Paw, B.H., Poss, K.D., Penberthy, W.T., Lin, S., Zon, L.I. (2003). Transplantation and in vivo imaging of multilineage engraftment in zebrafish bloodless mutants. *Nat.Immunol.* **4**, 1238-1246.

Trounson, A. (2002). Human embryonic stem cells: mother of all cell and tissue types. *Reprod.Biomed.Online.* **4** Suppl 1:58-63.

Ungos, J. and Weinstein, B. M. (2008). Vascular development in the zebrafish. *Dev Biol* **18**, 301-332.

van Wijk, B., Moorman, A.F., van den Hoff, M.J. (2007). Role of bone morphogenetic proteins in cardiac differentiation. *Cardiovasc.Res.* **74**, 244-255.

Wang, H., Charles, P.C., Wu, Y., Ren, R., Pi, X., Moser, M., Barshishat-Kupper, M., Rubin, J.S., Perou, C., Bautch, V., Patterson, C. (2006) Gene expression profile signatures indicate a role for Wnt signaling in endothelial commitment from embryonic stem cells. *Circ Res.* **98**, 1331-1339.

- Wang, H., Gilner, J.B., Bautch, V.L., et al.** (2007). Wnt2 coordinates the commitment of mesoderm to hematopoietic, endothelial, and cardiac lineages in embryoid bodies. *J.Biol.Chem.* **282**, 782-791.
- Weinstein, B.M., Fishman, M.C.** (1996). Cardiovascular morphogenesis in zebrafish. *Cardiovasc.Res.* **31** Spec No:E17-E24.
- Westerfield M.** *THE ZEBRAFISH BOOK; A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. Eugene, University of Oregon Press; 1993. 5th Edition 2007
- Wobus, A.M., Guan, K.** (1998). Embryonic Stem Cell-Derived Cardiac Differentiation: Modulation of Differentiation and "Loss-of-Function" Analysis In Vitro. *Trends Cardiovasc.Med.* **8**, 64-74.
- Wobus, A.M., Wallukat, G., Hescheler, J.** Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca²⁺ channel blockers. (1991). *Differentiation* **48**, 173-182.
- Wu, S.M., Fujiwara, Y., Cibulsky, S.M., Clapham, D.E., Lien, C.L., Schultheiss, T.M. et al.** (2006). Developmental Origin of a Bipotential Myocardial and Smooth Muscle Cell Precursor in the Mammalian Heart. *Cell* **127**, 1137-50.
- Wu, C., Orozco, C., Boyer, J., et al.** (2009). BioGPS: an extensible and customizable portal for querying and organizing gene annotation resources. *Genome Biol.* **10**, R130.
- Yelon, D., Home, S. A. and Stainier, D. Y. R.** (1999). Restricted expression of cardiac myosin genes reveals regulated aspects of heart tube assembly in zebrafish. *Dev. Biol.* **214**, 23-37.
- Zaffran, S., Xu, X., Lo, P.C., Lee, H.H., Frasch, M.** (2002). Cardiogenesis in the Drosophila model: control mechanisms during early induction and diversification of cardiac progenitors. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* **67**, 1-12.
- Zhang Y, Luoh SM, Hon LS, Baertsch R, Wood WI, Zhang Z.** (2007). GeneHub-GEPIS: digital expression profiling for normal and cancer tissues based on an integrated gene database. *Nucleic Acids Res.* **35**, W152-W158.
- Zhong, T. P., Rosenberg, M., Mohideen, M. A., Weinstein, B. M. and Fishman, M. C.** (2000). Gridlock, an HLH gene required for assembly of the aorta in zebrafish. *Science* **287**, 1820-1824.
- Zhong, T. P., Childs, S., Leu, J. P. and Fishman, M. C.** (2001). Gridlock signalling pathway fashions the first embryonic artery. *Nature* **414**, 216-220.

9. Anhang

Durch Mikroarray ermittelte Gen-Ontologie in A130092J06Rik *knockdown*:

Gene Ontologies Enriched with Upregulated Transcripts

Term	PValue
GO:0051252~regulation of RNA metabolic process	4,88E-08
GO:0006355~regulation of transcription, DNA-dependent	9,96E-08
GO:0009888~tissue development	4,86E-07
GO:0001890~placenta development	5,18E-06
GO:0019219~regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	6,53E-06
GO:0031326~regulation of cellular biosynthetic process	1,06E-05
GO:0048568~embryonic organ development	1,48E-05
GO:0008284~positive regulation of cell proliferation	1,58E-05
GO:0010468~regulation of gene expression	1,59E-05
GO:0045449~regulation of transcription	1,91E-05
GO:0010556~regulation of macromolecule biosynthetic process	2,11E-05
GO:0043009~chordate embryonic development	6,50E-05
GO:0009887~organ morphogenesis	3,00E-04
GO:0060284~regulation of cell development	3,86E-04
GO:0001892~embryonic placenta development	5,62E-04
GO:0035113~embryonic appendage morphogenesis	7,18E-04
GO:0030326~embryonic limb morphogenesis	7,18E-04
GO:0001701~in utero embryonic development	7,70E-04
GO:0045596~negative regulation of cell differentiation	9,40E-04
GO:0043583~ear development	0,001035
GO:0048729~tissue morphogenesis	0,001321
GO:0045935~positive regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	0,001557
GO:0035108~limb morphogenesis	0,001738
GO:0014031~mesenchymal cell development	0,001779
GO:0051173~positive regulation of nitrogen compound metabolic process	0,002075
GO:0048762~mesenchymal cell differentiation	0,002078
GO:0060485~mesenchyme development	0,00224
GO:0045893~positive regulation of transcription, DNA-dependent	0,002249
GO:0045941~positive regulation of transcription	0,002353
GO:0051254~positive regulation of RNA metabolic process	0,002386
GO:0010628~positive regulation of gene expression	0,002971
GO:0050767~regulation of neurogenesis	0,003473
GO:0001656~metanephros development	0,003854
GO:0010604~positive regulation of macromolecule metabolic process	0,004358
GO:0031325~positive regulation of cellular metabolic process	0,005103
GO:0002052~positive regulation of neuroblast proliferation	0,005176
GO:0045664~regulation of neuron differentiation	0,005482
GO:0014033~neural crest cell differentiation	0,005697
GO:0014032~neural crest cell development	0,005697
GO:0001568~blood vessel development	0,005779
GO:0010557~positive regulation of macromolecule biosynthetic process	0,005934
GO:0045665~negative regulation of neuron differentiation	0,006198
GO:0042472~inner ear morphogenesis	0,006451
GO:0001944~vasculature development	0,006662
GO:0001822~kidney development	0,006697
GO:0045892~negative regulation of transcription, DNA-dependent	0,007288

GO:0007596~blood coagulation	0,007524
GO:0051253~negative regulation of RNA metabolic process	0,00759
GO:0044106~cellular amine metabolic process	0,007644
GO:0031328~positive regulation of cellular biosynthetic process	0,008239
GO:0006413~translational initiation	0,008461
GO:0009309~amine biosynthetic process	0,008707
GO:0009891~positive regulation of biosynthetic process	0,008851
GO:0048699~generation of neurons	0,009145
GO:0005911~cell-cell junction	7,49E-07
GO:0043296~apical junction complex	4,81E-05
GO:0016327~apicolateral plasma membrane	5,45E-05
GO:0030054~cell junction	0,005089
GO:0004252~serine-type endopeptidase activity	2,14E-04
GO:0008236~serine-type peptidase activity	4,65E-04
GO:0004175~endopeptidase activity	9,31E-04
GO:0008238~exopeptidase activity	0,003051
mmu04530:Tight junction	6,56E-04
mmu04514:Cell adhesion molecules (CAMs)	0,001307
mmu00260:Glycine, serine and threonine metabolism	0,002033
mmu04670:Leukocyte transendothelial migration	0,002451
mmu04610:Complement and coagulation cascades	0,002901

Gene Ontologies Enriched with Downregulated Transcripts

Term	PValue
GO:0006911~phagocytosis, engulfment	5,29E-07
GO:0050778~positive regulation of immune response	3,85E-06
GO:0019724~B cell mediated immunity	9,52E-06
GO:0006909~phagocytosis	2,00E-05
GO:0031347~regulation of defense response	2,49E-05
GO:0002449~lymphocyte mediated immunity	2,69E-05
GO:0002526~acute inflammatory response	4,08E-05
GO:0045807~positive regulation of endocytosis	4,11E-05
GO:0002861~regulation of inflammatory response to antigenic stimulus	4,64E-05
GO:0002673~regulation of acute inflammatory response	4,64E-05
GO:0050727~regulation of inflammatory response	4,82E-05
GO:0009887~organ morphogenesis	5,33E-05
GO:0002697~regulation of immune effector process	6,96E-05
GO:0032103~positive regulation of response to external stimulus	8,11E-05
GO:0002706~regulation of lymphocyte mediated immunity	1,02E-04
GO:0050766~positive regulation of phagocytosis	1,28E-04
GO:0051050~positive regulation of transport	1,45E-04
GO:0050729~positive regulation of inflammatory response	1,53E-04
GO:0002703~regulation of leukocyte mediated immunity	1,54E-04
GO:0031325~positive regulation of cellular metabolic process	1,55E-04
GO:0050764~regulation of phagocytosis	1,80E-04
GO:0031328~positive regulation of cellular biosynthetic process	2,14E-04
GO:0009891~positive regulation of biosynthetic process	2,37E-04
GO:0030324~lung development	2,99E-04
GO:0030100~regulation of endocytosis	3,24E-04
GO:0030323~respiratory tube development	3,33E-04
GO:0010647~positive regulation of cell communication	3,46E-04
GO:0051173~positive regulation of nitrogen compound metabolic process	3,80E-04

GO:0002863~positive regulation of inflammatory response to antigenic stimulus	3,98E-04
GO:0002864~regulation of acute inflammatory response to antigenic stimulus	3,98E-04
GO:0002822~regulation of adaptive immune response based on somatic recombination of immune receptors built from immunoglobulin superfamily domains	4,60E-04
GO:0002819~regulation of adaptive immune response	4,60E-04
GO:0002253~activation of immune response	4,75E-04
GO:0048568~embryonic organ development	4,88E-04
GO:0031349~positive regulation of defense response	4,99E-04
GO:0016485~protein processing	6,06E-04
GO:0045935~positive regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	8,22E-04
GO:0051604~protein maturation	8,52E-04
GO:0009967~positive regulation of signal transduction	8,63E-04
GO:0010604~positive regulation of macromolecule metabolic process	0,001016
GO:0002705~positive regulation of leukocyte mediated immunity	0,001136
GO:0002708~positive regulation of lymphocyte mediated immunity	0,001136
GO:0010557~positive regulation of macromolecule biosynthetic process	0,001211
GO:0042590~antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen via MHC class I	0,001299
GO:0006897~endocytosis	0,001529
GO:0042471~ear morphogenesis	0,001848
GO:0016477~cell migration	0,001888
GO:0002699~positive regulation of immune effector process	0,001923
GO:0001568~blood vessel development	0,002113
GO:0001944~vasculature development	0,00249
GO:0048562~embryonic organ morphogenesis	0,002659
GO:0002437~inflammatory response to antigenic stimulus	0,002688
GO:0015698~inorganic anion transport	0,002723
GO:0060627~regulation of vesicle-mediated transport	0,002723
GO:0009888~tissue development	0,00287
GO:0007423~sensory organ development	0,002995
GO:0030879~mammary gland development	0,003178
GO:0002888~positive regulation of myeloid leukocyte mediated immunity	0,003556
GO:0030595~leukocyte chemotaxis	0,00362
GO:0060326~cell chemotaxis	0,00362
GO:0006820~anion transport	0,003983
GO:0007507~heart development	0,004384
GO:0002866~positive regulation of acute inflammatory response to antigenic stimulus	0,00563
GO:0002696~positive regulation of leukocyte activation	0,005793
GO:0050867~positive regulation of cell activation	0,006299
GO:0002675~positive regulation of acute inflammatory response	0,006829
GO:0002824~positive regulation of adaptive immune response based on somatic recombination of immune receptors built from immunoglobulin superfamily domains	0,006982
GO:0002821~positive regulation of adaptive immune response	0,006982
GO:0043583~ear development	0,007116
GO:0048732~gland development	0,007951
GO:0006956~complement activation	0,008193
GO:0042742~defense response to bacterium	0,008316
GO:0006935~chemotaxis	0,008636
GO:0045893~positive regulation of transcription, DNA-dependent	0,008922
GO:0002694~regulation of leukocyte activation	0,00896
GO:0045941~positive regulation of transcription	0,009047
GO:0051254~positive regulation of RNA metabolic process	0,009387

GO:0006910~phagocytosis, recognition	0,009539
GO:0005581~collagen	5,66E-08
GO:0044459~plasma membrane part	2,07E-07
GO:0031226~intrinsic to plasma membrane	5,02E-07
GO:0009897~external side of plasma membrane	9,15E-07
GO:0005887~integral to plasma membrane	1,06E-06
GO:0005604~basement membrane	2,12E-06
GO:0031224~intrinsic to membrane	0,003507
GO:0016021~integral to membrane	0,004489
GO:0008201~heparin binding	5,33E-07
GO:0019864~IgG binding	1,59E-05
GO:0005509~calcium ion binding	1,13E-04
GO:0019763~immunoglobulin receptor activity	8,21E-04
mmu04512:ECM-receptor interaction	1,67E-07
mmu04510:Focal adhesion	8,14E-05
mmu05414:Dilated cardiomyopathy	2,66E-04
mmu05322:Systemic lupus erythematosus	0,002969
mmu04610:Complement and coagulation cascades	0,003741
mmu05410:Hypertrophic cardiomyopathy (HCM)	0,006072

Durch Mikroarray ermittelte Gen-Ontologie in Zfp533 *knockdown*:**Gene Ontologies Enriched with Upregulated Transcripts**

Term	PValue
GO:0043009~chordate embryonic development	7,98E-12
GO:0009888~tissue development	4,88E-10
GO:0007507~heart development	2,42E-09
GO:0001701~in utero embryonic development	9,10E-09
GO:0016071~mRNA metabolic process	1,21E-08
GO:0009887~organ morphogenesis	2,17E-08
GO:0006397~mRNA processing	2,26E-08
GO:0010629~negative regulation of gene expression	1,91E-07
GO:0010468~regulation of gene expression	2,15E-07
GO:0019219~regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	3,82E-07
GO:0006396~RNA processing	8,93E-07
GO:0045449~regulation of transcription	1,19E-06
GO:0010605~negative regulation of macromolecule metabolic process	1,64E-06
GO:0045892~negative regulation of transcription, DNA-dependent	2,32E-06
GO:0051253~negative regulation of RNA metabolic process	2,63E-06
GO:0016481~negative regulation of transcription	4,15E-06
GO:0031326~regulation of cellular biosynthetic process	4,72E-06
GO:0008380~RNA splicing	5,15E-06
GO:0045934~negative regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	5,82E-06
GO:0010558~negative regulation of macromolecule biosynthetic process	6,45E-06
GO:0010556~regulation of macromolecule biosynthetic process	6,59E-06
GO:0051172~negative regulation of nitrogen compound metabolic process	7,14E-06
GO:0031327~negative regulation of cellular biosynthetic process	1,17E-05
GO:0009890~negative regulation of biosynthetic process	1,44E-05
GO:0048729~tissue morphogenesis	2,19E-05
GO:0031324~negative regulation of cellular metabolic process	2,80E-05
GO:0016568~chromatin modification	5,89E-05
GO:0051252~regulation of RNA metabolic process	6,18E-05
GO:0009952~anterior/posterior pattern formation	6,75E-05
GO:0016070~RNA metabolic process	7,55E-05
GO:0048568~embryonic organ development	7,98E-05
GO:0002009~morphogenesis of an epithelium	8,83E-05
GO:0048864~stem cell development	9,41E-05
GO:0035113~embryonic appendage morphogenesis	1,11E-04
GO:0030326~embryonic limb morphogenesis	1,11E-04
GO:0035108~limb morphogenesis	1,47E-04
GO:0007283~spermatogenesis	1,77E-04
GO:0006355~regulation of transcription, DNA-dependent	1,83E-04
GO:0045941~positive regulation of transcription	1,92E-04
GO:0003007~heart morphogenesis	1,97E-04
GO:0010628~positive regulation of gene expression	3,13E-04
GO:0045935~positive regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	3,25E-04
GO:0030324~lung development	3,98E-04
GO:0030323~respiratory tube development	4,69E-04
GO:0045893~positive regulation of transcription, DNA-dependent	4,86E-04
GO:0010604~positive regulation of macromolecule metabolic process	5,01E-04
GO:0045596~negative regulation of cell differentiation	5,03E-04

GO:0048706~embryonic skeletal system development	5,07E-04
GO:0051254~positive regulation of RNA metabolic process	5,47E-04
GO:0051173~positive regulation of nitrogen compound metabolic process	5,53E-04
GO:0040029~regulation of gene expression, epigenetic	5,94E-04
GO:0030900~forebrain development	5,97E-04
GO:0010557~positive regulation of macromolecule biosynthetic process	6,29E-04
GO:0016458~gene silencing	6,58E-04
GO:0048738~cardiac muscle tissue development	6,58E-04
GO:0019827~stem cell maintenance	7,37E-04
GO:0060537~muscle tissue development	7,62E-04
GO:0014033~neural crest cell differentiation	7,73E-04
GO:0014032~neural crest cell development	7,73E-04
GO:0035148~tube lumen formation	8,32E-04
GO:0048806~genitalia development	9,16E-04
GO:0014031~mesenchymal cell development	9,93E-04
GO:0060429~epithelium development	0,001002
GO:0007517~muscle organ development	0,001028
GO:0031328~positive regulation of cellular biosynthetic process	0,001227
GO:0048562~embryonic organ morphogenesis	0,001234
GO:0048762~mesenchymal cell differentiation	0,001279
GO:0016331~morphogenesis of embryonic epithelium	0,001311
GO:0031325~positive regulation of cellular metabolic process	0,001324
GO:0014706~striated muscle tissue development	0,001331
GO:0060562~epithelial tube morphogenesis	0,001421
GO:0060485~mesenchyme development	0,001444
GO:0009891~positive regulation of biosynthetic process	0,001456
GO:0001841~neural tube formation	0,001626
GO:0048705~skeletal system morphogenesis	0,001628
GO:0007417~central nervous system development	0,001918
GO:0001838~embryonic epithelial tube formation	0,002278
GO:0007281~germ cell development	0,002327
GO:0001944~vasculature development	0,002345
GO:0007492~endoderm development	0,002732
GO:0014020~primary neural tube formation	0,002828
GO:0035196~gene silencing by miRNA, production of miRNAs	0,002847
GO:0043583~ear development	0,002889
GO:0007423~sensory organ development	0,003159
GO:0043066~negative regulation of apoptosis	0,003473
GO:0001822~kidney development	0,003554
GO:0016477~cell migration	0,003628
GO:0031050~dsRNA fragmentation	0,003964
GO:0001667~ameboidal cell migration	0,00403
GO:0043069~negative regulation of programmed cell death	0,004282
GO:0001568~blood vessel development	0,004282
GO:0060548~negative regulation of cell death	0,004472
GO:0007398~ectoderm development	0,005826
GO:0048704~embryonic skeletal system morphogenesis	0,005975
GO:0001825~blastocyst formation	0,006012
GO:0030540~female genitalia development	0,006666
GO:0031532~actin cytoskeleton reorganization	0,006907
GO:0010464~regulation of mesenchymal cell proliferation	0,007085
GO:0001755~neural crest cell migration	0,007085
GO:0048514~blood vessel morphogenesis	0,008029

GO:0034754~cellular hormone metabolic process	0,008251
GO:0048701~embryonic cranial skeleton morphogenesis	0,008277
GO:0043632~modification-dependent macromolecule catabolic process	0,008598
GO:0008284~positive regulation of cell proliferation	0,008659
GO:0006259~DNA metabolic process	0,00975
GO:0005634~nucleus	2,51E-19
GO:0043229~intracellular organelle	1,12E-12
GO:0044428~nuclear part	5,27E-10
GO:0043231~intracellular membrane-bounded organelle	1,68E-08
GO:0031981~nuclear lumen	2,54E-06
GO:0005654~nucleoplasm	7,24E-06
GO:0044446~intracellular organelle part	3,01E-05
GO:0044451~nucleoplasm part	4,15E-05
GO:0070013~intracellular organelle lumen	1,03E-04
GO:0043232~intracellular non-membrane-bounded organelle	1,88E-04
GO:0016324~apical plasma membrane	2,96E-04
GO:0005681~spliceosome	5,75E-04
GO:0000792~heterochromatin	0,001068
GO:0005911~cell-cell junction	0,001243
GO:0005694~chromosome	0,002241
GO:0000785~chromatin	0,002325
GO:0044427~chromosomal part	0,002904
GO:0005905~coated pit	0,003117
GO:0043292~contractile fiber	0,003163
GO:0030017~sarcomere	0,003791
GO:0000803~sex chromosome	0,004641
GO:0043296~apical junction complex	0,004763
GO:0016327~apicolateral plasma membrane	0,005417
GO:0015629~actin cytoskeleton	0,005862
GO:0044449~contractile fiber part	0,005889
GO:0030529~ribonucleoprotein complex	0,006728
GO:0000790~nuclear chromatin	0,007679
GO:0030016~myofibril	0,008231
GO:0046914~transition metal ion binding	2,03E-06
GO:0032559~adenyl ribonucleotide binding	6,30E-04
GO:0019787~small conjugating protein ligase activity	0,001587
GO:0003705~RNA polymerase II transcription factor activity, enhancer binding	0,002007
mmu04120:Ubiquitin mediated proteolysis	2,31E-04
mmu04530:Tight junction	8,33E-04
mmu04340:Hedgehog signaling pathway	0,002831

Gene Ontologies Enriched with Downregulated Transcripts

Term	PValue
m_eicosanoidPathway:Eicosanoid Metabolism	0,006125
GO:0051050~positive regulation of transport	4,98E-06
GO:0006909~phagocytosis	8,43E-06
GO:0019724~B cell mediated immunity	9,32E-06
GO:0006911~phagocytosis, engulfment	1,10E-05
GO:0006935~chemotaxis	2,13E-05
GO:0002694~regulation of leukocyte activation	2,66E-05
GO:0002449~lymphocyte mediated immunity	3,38E-05
GO:0050867~positive regulation of cell activation	5,96E-05
GO:0015671~oxygen transport	6,04E-05

GO:0045807~positive regulation of endocytosis	7,43E-05
GO:0050864~regulation of B cell activation	1,62E-04
GO:0050778~positive regulation of immune response	1,63E-04
GO:0060326~cell chemotaxis	2,39E-04
GO:0030595~leukocyte chemotaxis	2,39E-04
GO:0002696~positive regulation of leukocyte activation	2,68E-04
GO:0051249~regulation of lymphocyte activation	2,69E-04
GO:0030097~hemopoiesis	3,37E-04
GO:0002861~regulation of inflammatory response to antigenic stimulus	4,98E-04
GO:0002673~regulation of acute inflammatory response	4,98E-04
GO:0030324~lung development	6,26E-04
GO:0030323~respiratory tube development	7,13E-04
GO:0006897~endocytosis	7,38E-04
GO:0030100~regulation of endocytosis	8,15E-04
GO:0051251~positive regulation of lymphocyte activation	9,08E-04
GO:0051604~protein maturation	0,001042
GO:0030099~myeloid cell differentiation	0,001042
GO:0048534~hemopoietic or lymphoid organ development	0,001071
GO:0050871~positive regulation of B cell activation	0,001082
GO:0002819~regulation of adaptive immune response	0,001211
GO:0002822~regulation of adaptive immune response based on somatic recombination of immune receptors built from immunoglobulin superfamily domains	0,001211
GO:0050766~positive regulation of phagocytosis	0,001324
GO:0050727~regulation of inflammatory response	0,001329
GO:0032103~positive regulation of response to external stimulus	0,001381
GO:0050729~positive regulation of inflammatory response	0,001562
GO:0002526~acute inflammatory response	0,001727
GO:0042981~regulation of apoptosis	0,001809
GO:0050764~regulation of phagocytosis	0,001829
GO:0060627~regulation of vesicle-mediated transport	0,001989
GO:0043067~regulation of programmed cell death	0,002116
GO:0050900~leukocyte migration	0,002153
GO:0001568~blood vessel development	0,002338
GO:0002864~regulation of acute inflammatory response to antigenic stimulus	0,002373
GO:0002863~positive regulation of inflammatory response to antigenic stimulus	0,002373
GO:0006910~phagocytosis, recognition	0,002373
GO:0002253~activation of immune response	0,002439
GO:0002706~regulation of lymphocyte mediated immunity	0,002624
GO:0002697~regulation of immune effector process	0,002779
GO:0050870~positive regulation of T cell activation	0,002836
GO:0001944~vasculature development	0,002893
GO:0016485~protein processing	0,003155
GO:0008284~positive regulation of cell proliferation	0,00325
GO:0030218~erythrocyte differentiation	0,003512
GO:0007596~blood coagulation	0,003813
GO:0002703~regulation of leukocyte mediated immunity	0,003813
GO:0042590~antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen via MHC class I	0,004384
GO:0030168~platelet activation	0,004432
GO:0045597~positive regulation of cell differentiation	0,004472
GO:0034101~erythrocyte homeostasis	0,004575
GO:0045582~positive regulation of T cell differentiation	0,004624
GO:0007229~integrin-mediated signaling pathway	0,005717

GO:0002824~positive regulation of adaptive immune response based on somatic recombination of immune receptors built from immunoglobulin superfamily domains	0,005767
GO:0002821~positive regulation of adaptive immune response	0,005767
GO:0045621~positive regulation of lymphocyte differentiation	0,005767
GO:0031347~regulation of defense response	0,006623
GO:0050670~regulation of lymphocyte proliferation	0,007323
GO:0032944~regulation of mononuclear cell proliferation	0,007323
GO:0010647~positive regulation of cell communication	0,00759
GO:0045619~regulation of lymphocyte differentiation	0,007908
GO:0070663~regulation of leukocyte proliferation	0,008238
GO:0002437~inflammatory response to antigenic stimulus	0,008949
GO:0009897~external side of plasma membrane	1,17E-06
GO:0005833~hemoglobin complex	1,73E-05
GO:0031226~intrinsic to plasma membrane	3,92E-04
GO:0005887~integral to plasma membrane	5,04E-04
GO:0044459~plasma membrane part	6,71E-04
GO:0031224~intrinsic to membrane	0,001299
GO:0005604~basement membrane	0,001351
GO:0016021~integral to membrane	0,001408
GO:0000323~lytic vacuole	0,002716
GO:0005773~vacuole	0,007203
GO:0005581~collagen	0,008687
GO:0019864~IgG binding	1,03E-04
GO:0008201~heparin binding	4,78E-04
GO:0008009~chemokine activity	0,001399
GO:0042379~chemokine receptor binding	0,001576
GO:0019763~immunoglobulin receptor activity	0,002836
mmu04142:Lysosome	0,001192
mmu04060:Cytokine-cytokine receptor interaction	0,002022
mmu04062:Chemokine signaling pathway	0,003216
mmu05322:Systemic lupus erythematosus	0,005943

10. Erklärung zur Mitwirkung von Kollaboratoren

Bei der Versuchsdurchführung und Generierung der Daten der Affymetrix Mikroarrayanalyse wurde ich freundlicherweise von meinen Kollegen Kesavan Meganathan, Smita Jagtap und John Antonydas Gaspar unterstützt.

Sie trugen die Mikroarrayanalyse und die Gen-Ontologie-Daten zu den *knockdown*-Versuchen von A130092J06Rik und Zfp533 bei.

11. Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Agapios Sachinidis für die Überlassung des Themas und die Ermöglichung meiner Dissertation in seiner Arbeitsgruppe. Herr Prof. Sachinidis hat mir jede erbetene Hilfe zukommen lassen und ist mir die gesamte Zeit über beratend zur Seite gestanden.

Herrn PD Dr. Martin Gajewski danke ich dafür, dass er die vorliegende Dissertation betreute und immer hilfreich zur Seite stand. Seine engagierte und lehrreiche Betreuung schon während meiner Diplomarbeit, hat mir auch für die Erstellung dieser Arbeit sehr geholfen.

Frau Prof. Dr. Sigrun Korsching möchte ich für die Erstellung des Gutachtens dieser Dissertation danken.

Ich danke allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe und des gesamten Instituts für eine angenehme Arbeitsatmosphäre. Mein besonderer Dank gilt meinen Kollegen Kesavan Meganathan, Smita Jagtap, Vilas Wagh, John Antonydas Gaspar und Rita Altenburg für die Freundschaft, die Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Danken möchte ich natürlich auch meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig 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 PD Dr. Martin Gajewski und Prof. Dr. Agapios Sachinidis betreut worden.

Köln, März 2011

Rabea Niemann

Veröffentlichungen

Auszüge dieser Arbeit werden voraussichtlich in Kürze publiziert.

Mariappan D, Niemann R, Gajewski M, et al. Somitovasculin, a novel endothelial-specific transcript involved in the vasculature development.

Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol. 2009;29:1823-1829