

INAUGURAL-DISSERTATION

**A2BP1-vermitteltes RNA-Spleißen ist essentiell für die
kardiale Funktion im Zebrafisch**

von
Diplom-Biologin Karen Sonia Frese

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich – Mathematischen
Gesamtfakultät
der
Ruprecht – Karls – Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Dipl. Biologin Karen Sonia Frese
aus Buenos Aires
Heidelberg, August 2013

Tag der mündlichen Prüfung:

Thema

**A2BP1-vermitteltes RNA-Spleißen ist essentiell für die
kardiale Funktion im Zebrafisch**

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Wieland
Prof. Dr. Wolfgang Rottbauer

Für meine Familie

Inhalt

1	Zusammenfassung.....	4
1.1	Abstract.....	5
2	Einleitung.....	6
2.1	RNA-Spleißen	6
2.2	Alternatives Spleißen	9
2.3	Spleißfaktoren.....	12
2.4	Der Spleißfaktor A2BP1 ist ein evolutionär hochkonserviertes Protein.....	15
2.5	Der Zebrafisch als Modellorganismus.....	17
3	Zielsetzung der Arbeit	19
4	Material	20
4.1	Biologisches Material.....	20
4.1.1	Fischlinien	20
4.2	Verwendete Puffer und Lösungen	20
4.3	Verwendete Oligonukleotide.....	22
4.4	Morpholino-modifizierte antisense Oligonukleotide	24
4.5	Enzyme.....	24
4.6	Plasmide.....	24
4.7	Antikörper	24
4.8	Geräte	25
4.9	Datenbanken/Server.....	25
4.10	Software.....	26
5	Methoden	27
5.1	Zebrafisch Methoden.....	27
5.1.1	Aufzucht und Haltung von Zebrafischen	27
5.1.2	Gewinnung von Embryonen	27
5.1.3	Foto- und Videodokumentation	27
5.1.4	Mikroinjektion	28
5.1.5	RNA <i>antisense in situ</i> -Hybridisierung (ISH).....	30
5.1.6	Histologische Analyse	31
5.1.7	Elektronenmikroskopische Analyse.....	32
5.2	Molekularbiologische Methoden.....	32
5.2.1	DNA-Isolation aus Zebrafischgewebe.....	32

5.2.2	Aufreinigung von DNA	33
5.2.3	RNA-Isolation aus Zebrafisch-Gewebe für den Spleißnachweis	33
5.2.4	Reverse Transkription.....	34
5.2.5	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	35
5.2.6	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	35
5.2.7	Quantitative Real-Time-PCR.....	36
5.2.8	Agarose-Gelelektrophorese	37
5.2.9	Gelextraktion	38
5.2.10	Restriktionsverdau von DNA	38
5.2.11	Transformation von <i>E. coli</i>	38
5.2.12	Antibiotika und Selektionsmedien	39
5.2.13	Isolation von Plasmid-DNA	40
5.3	Biochemische Methoden	40
5.3.1	Immunfluoreszenzfärbung an Zebrafischembryonen.....	40
5.4	Transkriptom Sequenzierung.....	41
5.4.1	Herstellung der Sequenzierbibliothek.....	42
5.4.2	Next Generation Sequencing.....	43
5.4.3	Assemblierung der Rohdaten-Mapping auf das Referenzgenom	44
5.4.4	RPKM-Normalisierung	44
5.4.5	Ermittlung der alternativen Spleißereignisse	45
5.4.6	Gengruppen Anreicherungsanalyse - <i>gen set enrichment analyse GSEA</i>	45
5.4.7	Validierung von Spleißereignisse mittels qPCR	46
6	Ergebnisse	48
6.1	Identifizierung des <i>a2bp1</i> Zebrafischorthologs	48
6.2	Expression von <i>a2bp1</i> in der Herz- und Skelettmuskulatur des Zebrafisches.....	50
6.3	Der Funktionsverlust von A2BP1 führt im Zebrafisch zu einer progradienten Herzinsuffizienz	51
6.4	Genomweite Transkriptom-Profil-Analyse im Zebrafisch	55
6.4.1	Analyse der Genexpression im Zebrafisch mittels RNA-Sequenzierung	56
6.4.2	Identifikation neuer Transkript-Varianten durch RNA-Sequenzierung.....	59
6.4.3	Validierung von aberranten Spleißmustern in einem <i>a2bp1</i> -defizienten Hintergrund und Ermittlung ihrer biologischen Funktion	61
6.4.4	Funktionelle Analyse der validierten falsch-gespleißten Transkripte	64

7	Diskussion	68
7.1	Der Spleißfaktor <i>a2bp1</i> spielt eine essentielle Rolle für die Herzfunktion im Zebrafisch	68
7.1.1	mRNA Sequenzierung des Zebrafisch-Transkriptoms	69
7.1.2	Die <i>a2bp1</i> -Depletion führt zu aberrant gepleißten Transkripten in embryonalen Zebrafischherzen	72
8	Ausblick.....	77
9	Literaturverzeichnis.....	79
10	Publikationsverzeichnis	87
11	Abbildungsverzeichnis.....	90
12	Tabellenverzeichnis.....	92
13	Abkürzungen und Firmenverzeichnis.....	93
13.1	Abkürzungsverzeichnis	93
13.2	Firmenverzeichnis.....	98
13.3	Anhang	100
14	Danksagung.....	101

1 Zusammenfassung

Alternatives Spleißen (AS) ist ein grundlegender Mechanismus der Genregulation und der Bildung der enormen Vielfalt des Proteoms von Eukaryoten. AS wird gewebe- oder entwicklungsabhängig durch *trans*-wirkende Faktoren und *cis*-wirkende RNA-Sequenzmotive reguliert. Dennoch sind die Komplexität der alternativen Spleißprozesse, die damit verbundenen Spleißregulatoren und die funktionellen Auswirkungen der alternativ gespleißten Transkripte unzureichend verstanden. AS spielt eine wichtige Rolle bei physiologische und pathogene Prozesse. Einer zunehmender Anzahl von Erkrankungen im Menschen werden Veränderungen des mRNA-Spleißens zugeschrieben. Daher sind die Aufklärung von Spleiß-abhängigen Mechanismen und Spleißregulatoren Gegenstand aktueller Forschung. In der vorliegenden Arbeit wurde zum einen die funktionelle Rolle des Spleißregulators A2BP1 *in vivo* aufgeklärt und zum anderen die Transkriptom-Vielfalt des Zebrafischherzens mittels mRNA-Sequenzierung analysiert um anschließend das *a2bp1*-vermittelte Spleißen zu charakterisieren. Der Funktionsverlust des *a2bp1*-Spleißfaktors, welcher in neuronalen-, Skelettmuskel- und Herzzellen exprimiert wird, führt zu einer progressiven kontraktile Dysfunktion des Herzens. Durch vergleichende Analysen von Spleißmustern in *a2bp1*- und Kontroll-injizierten Zebrafischembryonen wurden mehrere Transkripte als neue Zielgene des Spleißfaktors *a2bp1* identifiziert. Die *in vivo* Analyse aberrant gespleißter Transkripte zeigte, dass eine korrekte Isoform-Expression der Zielgene *actn3a*, *huG*, *ktn1*, *ptpla* und *camk2g* essentiell für die Herzfunktion ist.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse werden signifikant zu einem besseren Verständnis hinsichtlich der Bedeutung von Spleißprozessen im Herzen und der Pathogenese und Ätiologie von Herzmuskelerkrankungen beitragen.

1.1 Abstract

Alternative mRNA splicing (AS) is one of the key mechanisms for the proteomic and functional diversity of eukaryotes and is tightly regulated in a cell type- and developmental stage-specific manner. However, the complex nature of the splicing process, its associated splicing regulators and the biological consequences of alternatively spliced transcripts are only partially understood. AS influences development, physiology, and disease. An increasing number of human diseases have been attributed to alterations in mRNA splicing as a result of genetic mutations and/or environmental causes highlighting the relevance of AS. Hence, it is crucial to improve our understanding of the biological significance of alternative splicing. Within this thesis, I investigated the transcriptomic diversity in the zebrafish heart using deep-transcriptome sequencing and consequently elucidated the functional role of the novel splicing regulator A2BP1 *in vivo*. Loss of function of *a2bp1*, which is expressed in neurons, skeletal muscle cells and cardiomyocytes leads to progressive cardiac contractile dysfunction. The *a2bp1*-mediated splicing analysis revealed several transcripts as novel targets of the splicing factor *a2bp1*. Splice junction blockage experiments showed that a balanced isoform expression of the targets like *actn3a*, *hug*, *ktn1*, *ptpla* and *camk2g* is necessary for maintaining cardiac function.

2 Einleitung

Die Analyse des menschlichen Genoms gilt als einer der größten Erfolge in der Geschichte der Wissenschaften. Das Humangenomprojekt (HPG) wurde im April 2003 abgeschlossen und das menschliche Genom gilt als entschlüsselt. Die wohl größte Überraschung war die Entdeckung, dass der Mensch nur über ca. 20.000 - 25.000 Gene verfügt (Lander et al. 2001). Die Anzahl von menschlichen Proteinen wird auf etwa 100.000 geschätzt und widerspricht grundlegend der vor noch nicht allzu langer Zeit anerkannten Ein-Gen-ein-Enzym-Hypothese. Mittlerweile sind eine Reihe von Mechanismen bekannt, die zu dieser Proteomvielfalt führen. Einen großen Beitrag hat hier das alternative Spleißen.

2.1 RNA-Spleißen

In Eukaryoten enthalten die Primärtranskripte der Gene nichtkodierende Bereiche (Introne), die vor der Translation entfernt werden müssen, um zu funktionellen Proteinen zu führen. Das Entfernen (Spleißen) der Introne, deren Länge und Anzahl pro Gen ist sehr variabel und wird durch einen Multi-Protein-RNA Komplex, das Spleissosom, katalysiert.

Über 95 % der menschlichen Gene, die mehrere Exone und Introne enthalten, durchlaufen alternatives Spleißen (Matlin et al. 2005; Pan et al. 2008; E. T. Wang et al. 2008). Gesteuert durch Transkriptionsfaktoren und *cis*-Elemente, wie Promotoren, *Enhancer*- und *Silencer*-Sequenzen, wird zunächst die primäre mRNA (prä-mRNA) durch die RNA-Polymerase II nach der entsprechenden DNA-Sequenzvorlage transkribiert.

Die drei wesentlichen mRNA Prozessierungsschritte sind das Anfügen eines 5'-Cap (*capping*), die Polyadenylierung des 3'-Endes und das Spleißen. Während des capping wird an das 5'-Ende der prä-mRNA 7-Methylguanosin-Triphosphat angeheftet, welches die RNA vor dem Abbau durch Nukleasen schützt und den Transport der mRNA durch die Kernporen und die Anheftung an die Ribosomen ermöglicht. Am 3'-OH Ende wird die prä-mRNA polyadenyliert, indem 50 bis 200 Adenylreste angehängt werden. Die Polyadenylierung schützt die mRNA vor enzymatischem Abbau und bestimmt damit die

Halbwertszeit der RNA. Das Spleißen ist der bei weitem aufwendigste Schritt und kommt auch bei ribosomaler und Transfer-RNA vor. Während des Spleißvorganges (Abb. 1) werden die Introne entfernt und die Exone in kontinuierlicher Reihenfolge zusammengesetzt. Das Spleißen findet während der oder im Anschluss an die Transkription im Zellkern statt und verläuft unabhängig von den übrigen RNA-Modifikationen. Die Spleißreaktion bedarf eines präzisen Ablaufs, dabei spielt die korrekte Erkennung von Exon-Intron-Grenzen, den so genannten *cis*-Sequenzen oder Spleißstellen eine wichtige Rolle. Die 5'-Spleißsequenz (*acceptor site*) markiert den Übergang vom Exon zum Intron, welches mit einer konservierten Sequenz in Form eines GT-Dinukleotids beginnt. Die 3'-Spleißsequenz (*donor site*) AG liegt am Ende des Introns (GT-AG-Regel). Zu den *cis*-Erkennungssequenzen gehören außerdem ein Polypyrimidintrakt (15 - 25 Pyrimidin-Basen) vor der 3'-Spleißsequenz, sowie ein Adenosin als sogenannter Verzweigungspunkt (*branchpoint*). Das Erkennen der 3'-Spleißsequenz erfolgt über ein einzelnes A-Nukleotid innerhalb des Verzweigungspunktes, der sich 18 - 40 Nukleotide in 5' Richtung (*upstream*) befindet. Die eigentliche Spleißreaktion beinhaltet zwei aufeinanderfolgende transesterifizierende Reaktionen. Im ersten Schritt bildet sich eine Phosphodiesterbindung zwischen der Phosphatgruppe der 5'-Spleißsequenz und der 2'-OH-Gruppe des Verzweigungspunktes, gefolgt von der Ligation der beiden Exons und der Freisetzung des Introns in „Lasso-Form“ (Grabowski et al. 1984). Die Katalyse erfolgt durch das Spleißosom, einen Komplex aus den fünf kleinen nukleären Ribonukleoproteinpartikeln (*small nuclear ribonucleoprotein particles, snRNPs*) U1, U2, U4, U5, U6 und mehr als 150 weiteren Proteinen. Diese binden räumlich und zeitlich geordnet an die prä-mRNA und initiieren so den Spleißvorgang. Die Spleißreaktion erfordert eine Reihe von teilweise ATP-abhängigen Umgruppierungen des Spleißosoms (Abb. 1, Spleißosom Assemblierung) vor der eigentlichen Reaktion. Im ersten Schritt, der Bildung des E-Komplexes, bindet der U2AF-Komplex (*auxiliary factor, U2*) an das 3'-AG bzw. den Polypyrimidintrakt des Introns. Das SF1-Protein (*splice factor 1, SF1*) bindet am Verzweigungspunkt und das U1 Protein bindet an das 5'-GU, wodurch die Bildung des E-Komplexes beendet ist. Bei der Bildung des A-Komplexes, dem zweiten Schritt der Spleißosom-Assemblierung, wird der Spleißfaktor SF1 von der RNA gelöst und der U2AF-

Komplex rekrutiert das U2 Protein zum Verzweigungspunkt, womit die Intronenden an snRNPs gebunden sind. Die Bildung des B-Komplexes wird durch die Bindung von drei weiteren snRNPs (U4, U6, U5) und das Ablösen der beiden U2AF-Untereinheiten von der Prä-mRNA vollendet. Durch das Umarrangieren der gebundenen snRNPs bildet sich schließlich der katalytisch aktive C-Komplex (Abb. 1). Nachdem sich die an der prä-mRNA gebundenen Spleißosom-Proteine gelöst haben, ist die Spleißreaktion abgeschlossen (Chen and Manley 2009; Qin Li et al. 2007b).

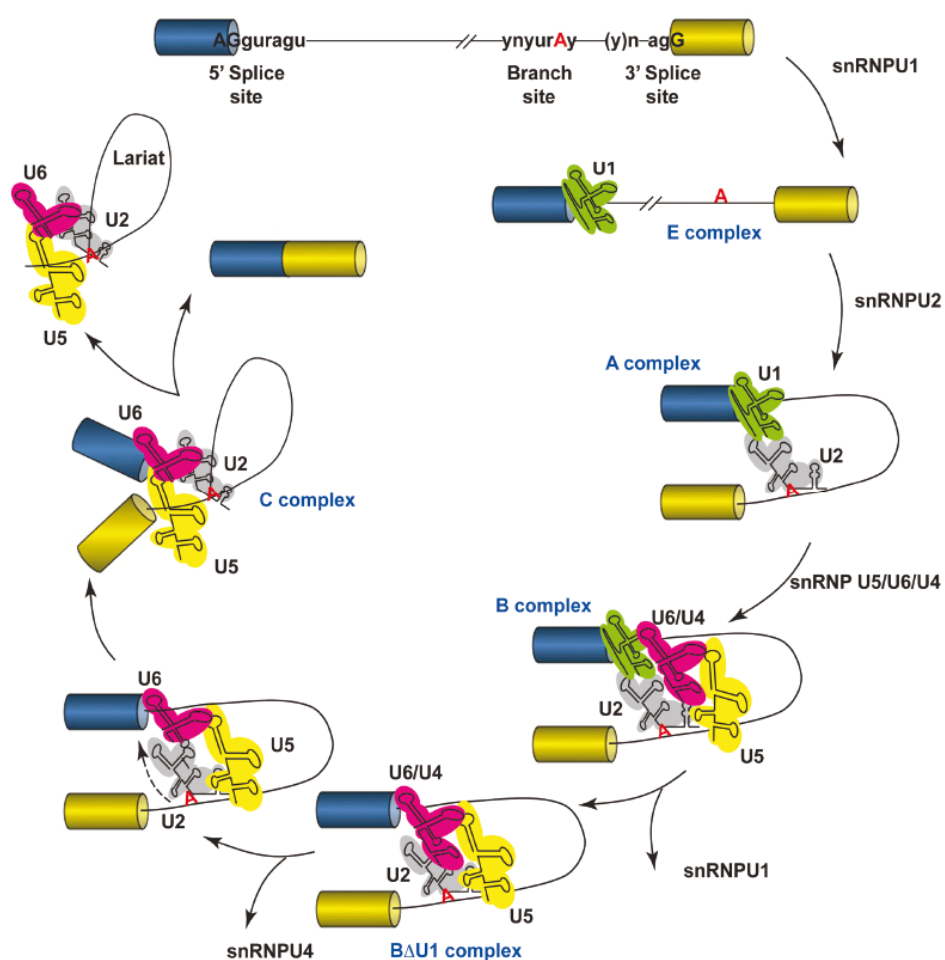


Abb. 1: Schematische Darstellung der Spleißreaktion. Zwei Exone (Zylinder) sind durch ein Intron (Linie) getrennt. An der 5'-Spleißstelle, dem Verzweigungspunkt und der 3'-Spleißstelle sind die Konsensus-Sequenzen angegeben, wobei n eine beliebige Nukleotidsequenz, r ein Purin, und y ein Pyrimidin darstellen. Der Polypyrimidintrakt ist zwischen dem Verzweigungspunkt und der 3'-Spleißstelle lokalisiert. In der Abbildung ist die Haupt-Spleißosommassemblierung dargestellt, bestehend aus dem E-, A-, B-, und C-Komplex, sowie die Wechselwirkung der snRNPs mit der prä-mRNA und die Entfernung der Introne (Pistoni et al. 2010).

Weitere für das Spleißen wichtige Sequenzabschnitte der prä-mRNA sind die sogenannten *cis*-agierenden Elemente wie exonische bzw. intronische *Enhancer*- (ESE, ISE) und *Silencer*-Sequenzen (ESS, ISS). Dabei handelt es sich um schwach konservierte Bereiche, die sowohl in Intronen als auch in Exonen zu finden sind. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass ESEs häufig von SR-Proteinen gebunden werden. Die SR-Proteine gehören zur Familie der RNA-bindenden Proteine, die sich durch das Vorhandensein einer Serin- und Arginin-reichen Domäne im C-terminalen Bereich auszeichnen. SR-Proteine können dann die Bindung von U2AF35 an die 3'-Spleißsequenz stabilisieren (*Enhancer*-abhängiges Spleißen) (Hofmann et al. 2000; Sanford et al. 2003; Wu et al. 2006).

Eine entgegengesetzte Wirkung haben exonische Enhancer-Sequenzen (ESS). Diese Elemente können von heterogenen nukleären Ribonukleoproteinen (hnRNP) gebunden werden, welche den Aufbau des Spleißosoms behindern und dadurch das Spleißen reprimieren (Bourgeois et al. 2004; Ladd and Cooper 2002; Pozzoli and Sironi 2005). Das Vorhandensein von ESS- und ESE-Elementen in alternativ gespleißten Exonen ermöglicht eine genaue Kontrolle der zelltypspezifischen sowie entwicklungs- und aktivierungsabhängigen Expression verschiedener Spleißformen eines Proteins (Fairbrother et al. 2002; Z. Wang et al. 2004; Zheng 2004).

2.2 Alternatives Spleißen

Beim konstitutiven Spleißen werden alle Exone eines Gens in der Reihenfolge ihres genomischen Auftretens aneinander gefügt. Aus einer Transkriptionseinheit entsteht also genau eine mRNA und nach deren Translation ein bestimmtes Polypeptid.

Beim alternativen Spleißen (AS) dagegen können aus ein und derselben Transkriptionseinheit mehrere verschiedene reife mRNA-Moleküle und durch deren Translation unterschiedliche Polypeptide gebildet werden. Alternatives Spleißen von prä-mRNAs wird auch als differenzielles oder gewebespezifisches Spleißen bezeichnet und gilt als eine der Hauptquellen für die Proteomkomplexität in Eukaryoten.

Aktuellen Schätzungen zufolge werden 92-94 % der humanen Gene mit mehreren Exonen alternativ gespleißt (Barash et al. 2010; Griffith et al. 2010). Neben anderen Mechanismen

wie der alternativen Transkriptionsinitiation, alternativer Polyadenylierung und RNA-Editierung ist der posttranskriptionelle Prozess das wichtigste Bindeglied zwischen der relativ geringen Anzahl an Genen im Vergleich zu der wesentlich höheren Anzahl an Transkripten und Proteinen in höheren Eukaryoten. Beim alternativen Spleißen können aus einem Primärtranskript (und damit einem Ursprungsgen) verschiedene mRNAs (Spleißvarianten) entstehen, die letztendlich zu funktionell unterschiedlichen Proteinen führen können (Abb. 2).

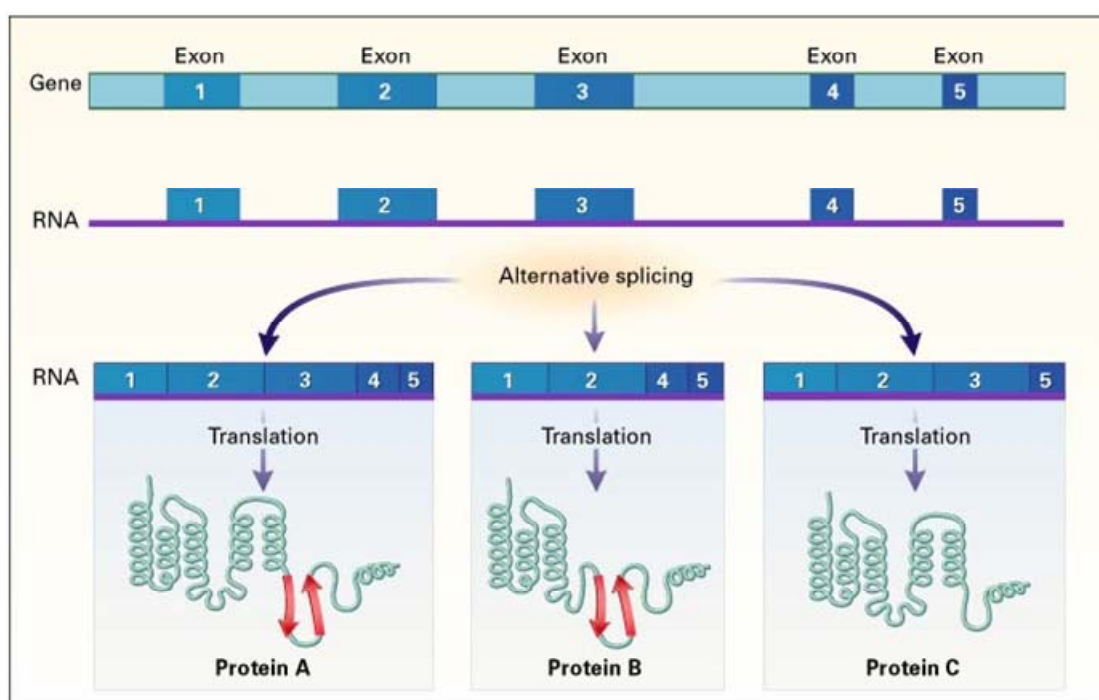


Abb. 2: Schematische Darstellung des alternativen Spleißens. (National Human Genome Research Institute).

Es existieren verschiedene Möglichkeiten für alternatives Spleißen, zum Beispiel das Überspringen von Exonen (exon-skipping), sich gegenseitig ausschließende Exone, das Beibehalten von Intronen (intron-retention) oder die Benutzung unterschiedlicher 5'- oder 3'-Spleißstellen (Abb. 3). In Vertebraten ist beispielsweise das Überspringen von Exonen die am häufigsten verwendete Form des alternativen Spleißens, wohingegen in Pflanzen das Beibehalten von Intronen häufiger zu finden ist (Kim et al. 2007). Als Folge des alternativen Spleißens können verkürzte Proteine durch alternative Stopp-Codons oder Verschiebungen des Leserasters entstehen.

Das alternative Spleißen ist ein koordiniert ablaufender Prozess, der gewebespezifisch und entwicklungsabhängig streng reguliert ist (Johnson et al. 2003; Pan et al. 2008; E. T. Wang et al. 2008). Ein Beispiel für einen Regulationsmechanismus durch alternatives Spleißen findet sich bei der gewebe- bzw. zellspezifischen Regulation der mitochondrialen ATP-Synthase- γ -Untereinheit. Das alternativ gespleißte Exon 9 wird im Herz- und Skelettmuskelgewebe vorwiegend herausgespleißt, während es in Hirn- und Leberzellen integriert wird (Hayakawa et al. 2002)

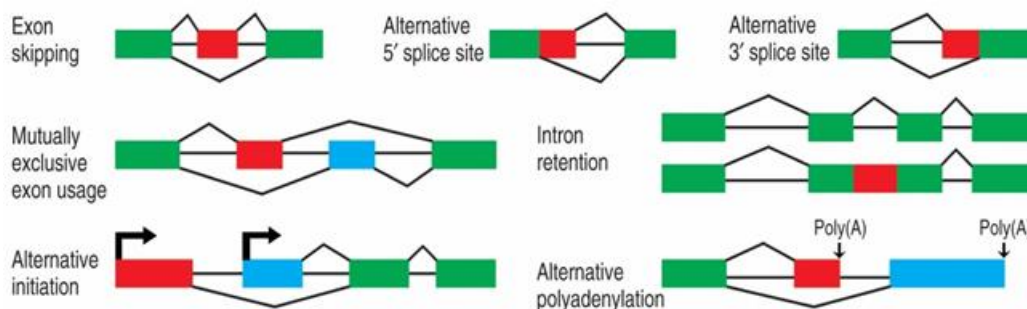


Abb. 3: Die fünf häufigsten Typen des alternativen Spleißens. Die konstitutiven Exone sind als grüne, die alternativen Exone als rote Boxen dargestellt. Die Linien über und unter den Boxen geben die möglichen Spleiß-Vorgänge an. Die Exone können alternative 5'- oder 3'-Spleißerkennungsstellen besitzen. Ein Exon kann übersprungen oder eingeschlossen werden. Es können mehrere alternative Exone zwischen den konstitutiven Exonen liegen, so dass zwischen den alternativen Exonen gewählt wird. Ein Intron kann vollständig in der mRNA zurückbehalten und translatiert werden (Z. X. Lu et al. 2012).

Eine bestimmte prä-mRNA-Sequenz kann also in Abhängigkeit von Ort und Entwicklungszeitpunkt durch das alternative Spleißen des primären RNA-Transkriptes zur Synthese unterschiedlich funktioneller Proteine beitragen. Wie sich in den letzten Jahren herausgestellt hat, tritt das alternative Spleißen insbesondere bei höher entwickelten Organismen sehr häufig auf. Die Regulation des alternativen Spleißens ist von dem zu spleißenden Gen, von Spleißfaktoren und anderen Proteinen abhängig. Die komplexen Regulationsmechanismen, die einen korrekten Ablauf des alternativen Spleißens ermöglichen, sind Gegenstand aktueller Forschung, vor allem im Hinblick auf eine Fehlregulation des zelltypspezifischen alternativen Spleißens in verschiedenen Erkrankungen (Cooper et al. 2009; Faustino and Cooper 2003; Venables 2004; G. S. Wang and Cooper 2007).

2.3 Spleißfaktoren

Alternatives Spleißen (AS) wird gewebe- oder entwicklungsabhängig, durch trans-wirkende Faktoren und cis-wirkende RNA-Sequenzmotive reguliert (Bandziulis et al. 1989). Unzählige Proteinfaktoren erkennen spezifische Sequenzen innerhalb der prä-mRNA und regulieren das Spleißen. Diese Spleißregulatoren bestimmen die Effizienz und die Benutzung bestimmter Spleißstellen, indem sie an intronische oder exonische Sequenzelemente in der prä-mRNA binden, die sogenannten Spleiß-Enhancer bzw. Silencer, und so das Spleißosom positiv oder negativ regulieren (Abb. 4) (Ke et al. 2008; Z. Wang and Burge 2008).

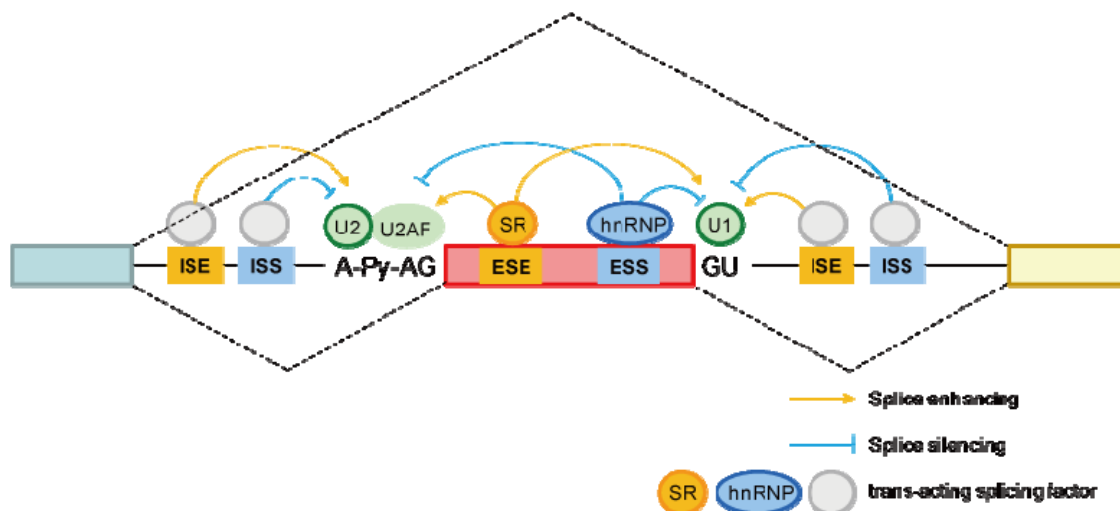


Abb. 4: Regulation des alternativen Spleißens durch cis-Elemente (ESE, ESS, ISE und ISS) und trans-aktierenden Spleißfaktoren (SR-Protein, hnRNP) (H-DBAS human-transcriptome DataBase for Alternative Splicing; <http://www.h-invitational.jp/h-dbas/index.jsp>).

Zu den am besten charakterisierten Spleißregulatoren gehören die SR-Proteine (Proteine, die eine Serin-Arginin-reiche Domäne enthalten) sowie die hnRNP-, Nova-, PTB-, FOX-, TIA-, CUGBP-, CELF- und MBNL-Proteine (David and Manley 2008; Gabut et al. 2008; Q. Li et al. 2007a; Matlin et al. 2005). Viele Spleißfaktoren zeichnen sich durch RRM- (RNA recognition motif) oder SR- (Serin-Arginin-rich) Domänen aus, welche für die Bindung an der mRNA und demzufolge für die Spleißfunktion essentiell sind. Das RRM-Erkennungsmotiv ist das am weitesten verbreitete und am besten untersuchte Strukturmotiv der RNA-bindenden Domänen. Derzeit sind mehr als 7000 identifizierte

RRM-Domänen in über 4100 annotierten Proteinen bekannt (Barash et al. 2010). Spleißregulatoren, wie die hnRNPs-, snRNP-, SR-, SR-Proteinkinasen und Fox-Proteine besitzen eine oder mehrere RRM-Domänen. Heute sind mehr als 171 cis-RNA-Motive bekannt, die in der Nähe von alternativ gespleißten Exonen gefunden wurden oder mit Erkennungssequenzen von Spleißregulatoren assoziiert sind (Barash et al. 2010; Castle et al. 2008; Fagnani et al. 2007; Sugnet et al. 2006; X. H. Zhang and Chasin 2004). Inzwischen sind die Erkennungssequenzen einiger Spleißfaktoren entschlüsselt worden. Fox-Proteine erkennen das Penta- bzw. Hexanukleotid [U] GCAUG, wohingegen Nova1/2-Proteine an das YCAY Cluster binden. PTB-Proteine bevorzugen CU-reiche Sequenzen und die Spleißfaktoren MBNL und CELF-like binden spezifisch an YGCUYK-CUG und UG-reiche Sequenzen (Chan and Black 1997; Licatalosi et al. 2008; Minovitsky et al. 2005; Ule et al. 2006). Die Bindung der RRM-Domäne erfolgt sequenz- oder strukturspezifisch an die einzelsträngige RNA. Obwohl eine einzelne Domäne für die Bindung ausreichend ist, wird häufig die Spezifität durch die Interaktion mehrerer RRM-Domänen deutlich erhöht (Allain et al. 1996; Allain et al. 2000; Deardorff and Sachs 1997; Sachs et al. 1987).

Häufig bilden Spleißregulatoren komplexe Netzwerke, welche die Expression von Gengruppen miteinander verknüpfen. Ein Beispiel ist das Nova1/2-RNA-Netzwerk im Gehirn, welches die Expression mehrerer Gene reguliert (Ule et al., 2003). Die Identifizierung solcher Netzwerke zwischen Spleißregulatoren und alternativ prozessierten prä-mRNAs, sowie die Identifizierung und funktionelle Charakterisierung von Mutationen in Spleißerkennungssequenzen und Spleißfaktoren stehen aktuell im Fokus der Spleißforschung.

Alternative Spleißprozesse sind sowohl unter normalen Bedingungen als auch bei verschiedenen Krankheitsbildern und deren Entwicklung von großer Bedeutung (Cooper et al. 2009; Faustino and Cooper 2003; G. S. Wang and Cooper 2007). Gestörte Spleißprozesse oder Mutationen in Spleißregulatoren wurden bereits mit Defekten in der Embryonalentwicklung, zellulärer Differenzierung und mit der Pathogenese verschiedener Krankheiten in Verbindung gebracht (Ars et al. 2000; Creemers et al. 2006). Veränderungen im Spleißmechanismus spielen eine wichtige Rolle bei Krebserkrankungen oder psychischen Störungen (Cork et al. 2008; French et al. 2007; Venables et al. 2008).

Sie nehmen aber auch eine Schlüsselrolle in der Pathogenese von kardialen Erkrankungen wie Herzinsuffizienz und kardialer Hypertrophie ein. Kürzlich wurde in verschiedenen Publikationen gezeigt, dass Mutationen in Spleißregulatoren einen erheblichen Anteil zur Entstehung und Entwicklung von Kardiovaskulären Krankheitsbildern beitragen.

Mutationen in dem Spleißregulator RBM20 wurden in bis zu circa 3 % der Patienten mit idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie (dilated cardiomyopathy; DCM) gefunden und wird mit progressiver Herzinsuffizienz und einer erhöhten Prävalenz von Vorhofflimmern assoziiert (Brauch et al. 2009; Refaat et al. 2012). Gou et al., konnten zeigen, dass RBM20 im Herzgewebe stark exprimiert wird. Weiterhin hat eine Analyse des menschlichen sowie des Ratten-Herztranskriptoms eine RBM20-abhängige Regulation von alternativem Spleißen für verschiedene Gene gezeigt. Neben Titin (TTN) wurden weitere 30 kardial relevante Genen mit einer konservierten Spleiß-Signatur zwischen Menschen und Ratten identifiziert. Diese Studie und weitere Studien unterstreichen die Schlüsselrolle der post-transkriptionellen Regulation in der Herzfunktion und bieten mechanistische Einblicke in die Pathogenese der menschlichen Herzinsuffizienz (Abb. 5) (Guo et al. 2012b; D. Li et al. 2010; Neagoe et al. 2002; Refaat et al. 2012).

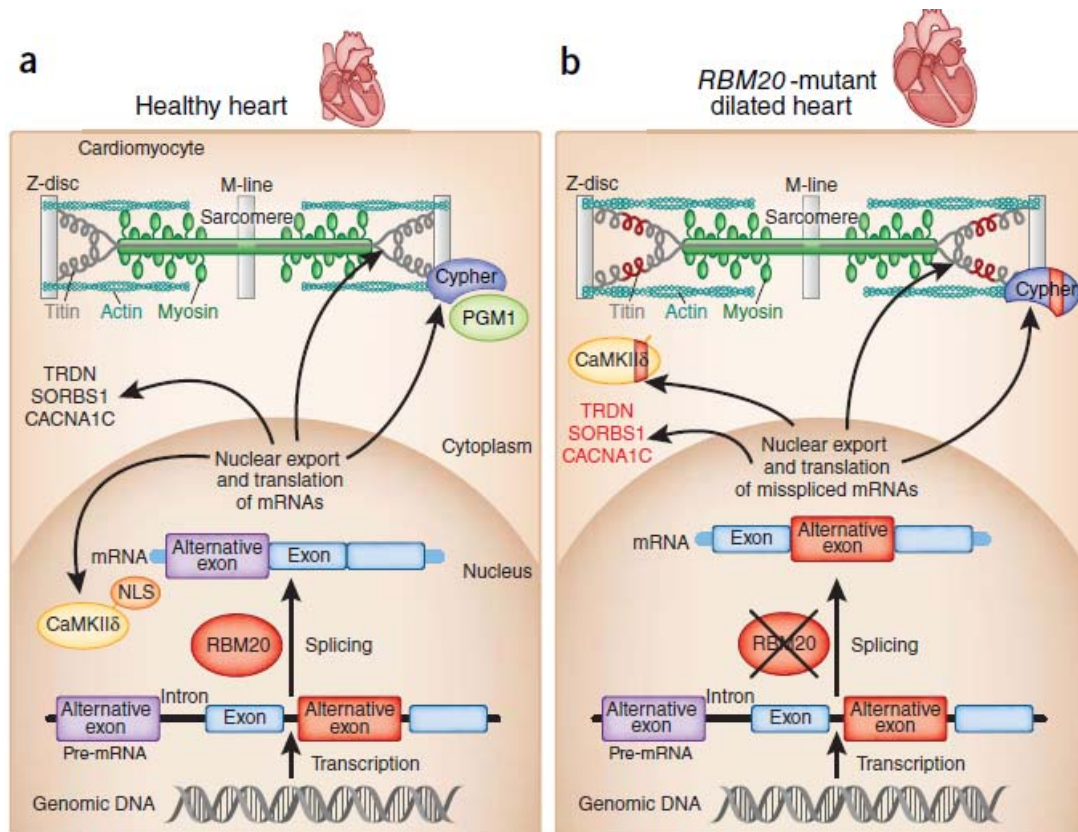


Abb. 5 Mutationen im Spleißfaktor RBM20 führen zur dilatativen Kardiomyopathie durch pathologisches Spleißen von kardialen Proteinen. (a) Normalerweise wird die DNA in eine reife prä-mRNA prozessiert, indem Introne und Exone entfernt werden. Diese reife mRNA gelangt dann aus dem Kern und wird in Protein translatiert. Bei einem gesunden Herzen sind Spleißfaktoren wie RBM20 Teil der Spleißmaschinerie, die das mRNA-Spleißen spezifisch steuern. (b) Guo *et al.* konnten zeigen, dass Mutationen in RBM20 zu einem anomalen mRNA-Spleißmuster von kardialen Proteinen führt. Abberant gespleißte mRNAs werden aus dem Zellkern exportiert und zu pathologischen Proteinisofomen in Kardiomyozyten translatiert (Linke and Bucker 2012)

2.4 Der Spleißfaktor A2BP1 ist ein evolutionär hochkonserviertes Protein

Das A2BP1 Protein, auch bekannt als RBFOX1, gehört zur Familie der RBFOX Proteine, die noch zwei weitere Mitglieder enthält: RBFOX-2 oder RBM9 und RBFOX3. Die RBFOX-Proteine sind Spleißregulatoren, die eine evolutionär hochkonservierte RNA-Bindedomäne (RNA recognition domain, RRM) besitzen (Abb. 10). Die Proteine dieser Familie sind an diversen Schritten des mRNA-Metabolismus, wie zum Beispiel Spleißen von prä-mRNAs und intrazellulärem mRNA-Transport, beteiligt (Jin et al. 2003). In Abbildung 10 A ist ein strukturbasiertes multiples Sequenzalignment der RRM-Domänen von RBFOX-Proteinen und deren Homologen dargestellt (Kuroyanagi 2009). Die Funktion

der RBFOX-Proteine als Spleißregulatoren ist von einer intakten RRM Domäne abhängig, die spezifisch an Ziel-RNAs binden kann. Im Gegensatz zur hochkonservierten RRM-Domäne, die sich im mittleren Bereich des Proteins befindet, sind die N- und C-terminalen Bereiche weniger konserviert, aber dennoch einzigartig für die RBFOX-Proteinfamilie (Kuroyanagi et al. 2006; Nakahata and Kawamoto 2005) (Abb. 10B)

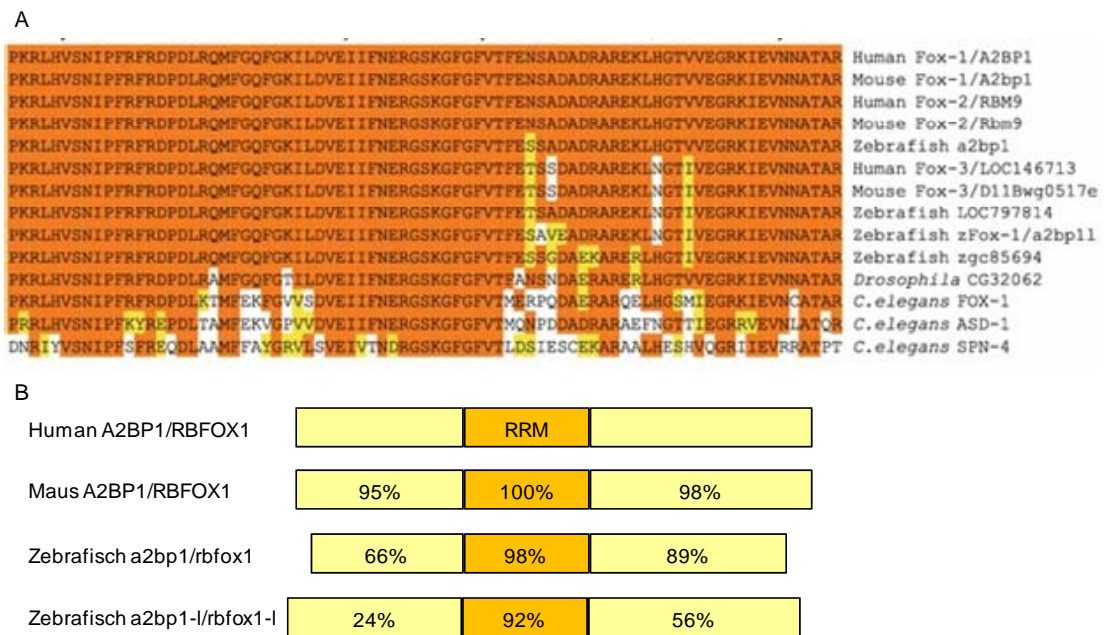


Abb. 6: Multiples Alignment der RRM-Domäne von RBFOX-Proteinen und ausgewählten Homologen. (A) Ein Aminosäuresequenz-Alignment der RRM-Domäne von Fox-1-Proteinen in Mensch und Maus (Fox-1, Fox-2- und Fox-3), Zebrafisch (*a2bp1*, LOC797814, *zFox-1/2bp11* und *zgc85694*), Fruchtfliege (*D. melanogaster* CG32062) und Nematoden (*C. elegans* FOX-1, ASD-1 und SPN-4). Identische Aminosäuren wurden orange schattiert und die mit ähnlichen Eigenschaften wurden gelb unterlegt. (B) Schematische Darstellung der RRM-Domänen des humanen-A2BP1-, Maus-A2BP1- und Zebrafisch- A2BP1 und A2BP1like-Proteins. Die RRM-Domänen, C- und N-Termini Homologien sind im Vergleich zum humanen Protein angegeben.

Das RNA-Erkennungsmotiv (RRM) oder Ribonukleoprotein Domäne (RNP) genannt, ist die am häufigsten vorkommende RNA-Bindungsdomäne in Eukaryoten. Es wird geschätzt, dass beim Menschen etwa 2 % aller Genprodukte RRM Erkennungsmotive beinhalten (Maris et al, 2005).

RBFOX-Proteine sind gewebespezifische Spleißregulatoren, die speziell das Motiv (U)GCAUG erkennen und binden. Experimentelle Studien haben gezeigt, dass das GCAUG Pentanukleotid und UGCAUG Hexanukleotid häufig down- und upstream von alternativ gespleißten Exonen vorkommen. Dieses RBFOX-bindende Element fungiert als eine Art Spleiß-Silencer, wenn es in Intronen upstream von alternativ gespleißten Exonen vorliegt (Abb. 11A), kann aber ein Exon-Skipping induzieren, wenn es in der downstream Intron-

Region liegt. (Abb. 11B) (Black 1992; Huh and Hynes 1994; Yeo et al. 2009; Zhang et al. 2008)

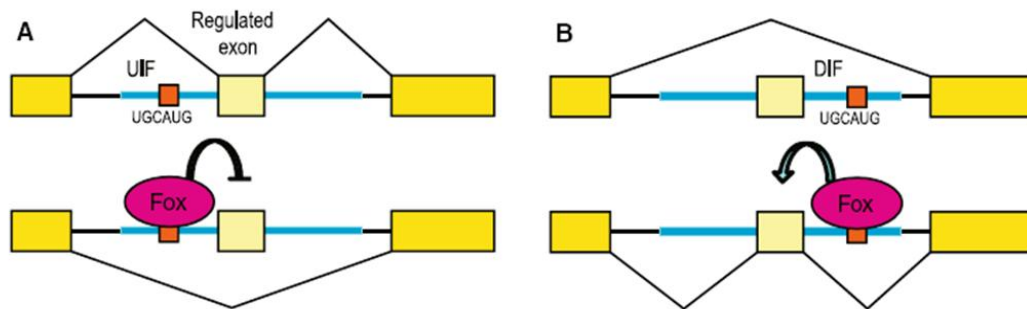


Abb. 7: Schematische Darstellung der alternativen Spleißregulierung durch die Fox-1-Proteine. (A) Die Fox-1-Proteine reprimieren die Exon-Integration durch Bindung an das (U) GCAUG-Element in der *upstream*-Intron flankierenden (UIF) Region. (B) Liegt das (U) GCAUG-Element in der *downstream*-Intron flankierenden (DIF) Region wird die Exonaufnahme durch die FOX-Proteine vermittelt. Die Rechtecke zeigen Exone, Introne sind als horizontalen Linien dargestellt. Die blauen Linien stellen die UIF und DIF Regionen dar. Die orange-farbenen Kästen zeigen die (U) GCAUG-Elemente. Diese (U) GCAUG-Elemente sind häufig in mehreren Kopien vorhanden, was eine stärkere Wirkung auf die Spleißregulation ausübt (Kuroyanagi 2009).

2.5 Der Zebrafisch als Modellorganismus

Der Zebrafisch (*Danio rerio*), ein tropischer Süßwasserfisch aus der Gruppe der Kärpflinge (*Cyprinidae*), hat sich in den vergangenen Jahren zum etablierten Vertebratenmodell in der Genomforschung entwickelt und wird für die Erforschung von Entwicklungs- und Pathogeneseprozessen eingesetzt (Beis und Stainier, 2006; Dodd et al., 2000). Adulte Zebrafische sind mit ihrer Größe von 3 - 4 cm in großer Anzahl und bei geringen Kosten zu halten.

Der Zebrafisch entwickelt sich mit einer Generationszeit von etwa drei Monaten sehr schnell, bereits drei Tage nach der Befruchtung sind alle Organe differenziert. Zu diesem Zeitpunkt entspricht die Reife des Herz-Kreislauf-System der Embryonen dem eines neugeborenen Säugers (Stainier et al. 1993; Yelon et al. 1999). 24 Stunden nach der Befruchtung (*hours post fertilisation*, hpf) sind erste peristaltische Kontraktionen des Herzens zu beobachten. Nach weiteren 12 Stunden besitzen die Embryonen zwei deutlich voneinander getrennte Herzkammern, die zu diesem Zeitpunkt bereits kräftig kontrahieren.

Im Vergleich zu Invertebraten, zu denen die Modellorganismen *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* zählen, sind Anatomie und Genetik des Zebrafisches dem Menschen ähnlicher. Zebrafischembryonen kombinieren viele Vorteile wie Transparenz und externe Entwicklung, welche eine Beobachtung der Herzfunktion *in vivo* ermöglichen. Ein weiterer Vorteil des Zebrafisch-Modell ist, dass das Zebrafischgenom weitgehend bekannt ist, und sich daher hervorragend für Transkriptom- und Genom-Sequenzierungsanalysen eignet. Zudem können durch Mikroinjektion in die befruchteten Eier Genfunktionen schnell und einfach ausgeschaltet, sowie Überexpression induziert werden.

Der bei weitem wichtigste Vorteil des Zebrafisches für die Analyse kardialer Erkrankungen ist, dass die Embryonen in den ersten Entwicklungstagen nicht auf ein funktionierendes Herz-Kreislauf-System angewiesen sind (Burggren and Pinder 1991; Peterson and Fishman 2004). Die Versorgung mit Sauerstoff erfolgt in diesem Zeitraum durch Diffusion aus dem umgebenden Medium über die Haut und die Kiemen. Dies ermöglicht die Analyse selbst schwerster kardialer Phänotypen, die zum Beispiel im Mausmodell aufgrund embryonaler Letalität nicht funktionell charakterisiert werden können (Vogel et al. 2009). Neben den beschriebenen Vorteilen des Zebrafisches ist es vor allem die genetische Manipulierbarkeit, die dazu beigetragen hat ihn als Modellorganismus zu etablieren.

3 Zielsetzung der Arbeit

Alternatives Spleißen ist an einer Vielzahl von Erkrankungen ursächlich beteiligt. Schätzungen zufolge sind circa 50 - 60 % aller krankheitsverursachenden Gendefekte Mutationen, welche das Spleißen direkt oder indirekt betreffen (Hammond and Wood 2011). Hauptsächlich handelt es sich dabei um Mutationen in Spleiß-Erkennungssequenzen oder in Spleißregulatoren. Mutationen, welche zur Dysfunktion dieser Spleißregulatoren führen, wurden mit der Pathogenese verschiedener Erkrankungen in Verbindung gebracht. So wurden Mutationen im Spleißregulator RBM20 mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM) sowie Arrhythmien assoziiert (Brauch et al. 2009; Guo et al. 2012a; D. Li et al. 2010), weshalb RBM20 als diagnostischer Marker diskutiert wird. Die weitere Aufklärung von Spleiß-abhängigen Mechanismen und Spleißregulatoren ist daher Gegenstand intensiver Forschung und unabdingbar um in Zukunft neue und spezifischere Therapien entwickeln zu können.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe des Zebrafisches die Funktion des neuen Spleißregulators A2BP1 *in vivo* zu analysieren. Um die Rolle des A2BP1 Proteins während der Herzentwicklung zu evaluieren, wurde ein *reverse genetics* Ansatz gewählt. Weiterhin sollten potenzielle Ziel-Transkripte des Spleißregulators identifiziert werden, um ein besseres Verständnis über die komplexen Netzwerke der Spleißregulatoren zu erlangen.

4 Material

4.1 Biologisches Material

4.1.1 Fischlinien

Für diese Arbeit wurden die Wildtyp-Linien AB, TüAB und WIK sowie die transgene Linie Tg [*myl7:rasGFP*] und die im Boston-screen isolierte rezessive Zebrafischmutante *hiphop*^{tx218} verwendet.

4.2 Verwendete Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen, sofern nicht anders erwähnt, wurden nach Sambrook et al. (1989) hergestellt und in doppelt deionisiertem Wasser angesetzt. Das doppelt deionisierten Wasser wurde mit einer „Purelab Plus UV/UF“ Filteranlage der Firma USF aufbereitet. Für kleine Mengen wurde „Aqua ad injectabilia“ der Firma Braun verwendet. Beides wird im Folgenden als ddH₂O bezeichnet.

Blockpuffer 1 (in situ):	2 mg/ml BSA in PBST 5% Schafserum
Blockpuffer 2 (in situ):	2 mg/ml BSA in PBST
Blockpuffer 1 (IF):	10% FCS in PBDT
Blockpuffer 2 (IF):	1,5% FCS in PBDT
Blotpuffer:	25 mM Tris 190 mM Glycin 15% Methanol pH 8,3
Citratpuffer:	8,2 mM Zitronensäure 1,8 mM Natriumcitrat, pH 6,0
DENT's Bleach:	20% DMSO, 30% H ₂ O ₂ in Methanol
DENT's Fix:	20% DMSO in Methanol

Deyolking Buffer:	55 mM NaCl 1,8 mM KCl 1,25 mM NaHCO ₃
DNA-Ladepuffer (6x):	30% Glycerol 0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylencyanol
E3-Medium:	4 mM NaCl 0,17 mM KCl 0,33 mM CaCl ₂ 0,33 mM MgSO ₄
Hybridisierungspuffer:	50% Formamid 25% 20x SSC 5 mg/ml Torula RNA 50 µg/ml Heparin 0,1% Tween 20
Infiltrationslösung:	100 ml JB-4 Embedding Solution A (Monomer) 1,25 g Benzoyl Peroxidase Plasticized (Catalyst)
Lysepuffer:	10 mM Tris-HCl, pH 8,3 50 mM KCl 0,3% Tween 20 0,3% Nonidet-P40
Mesab:	4 mg/ml Ethyl- <i>m</i> -Aminobenzoat- Methansulfonat 1% Na ₂ HPO ₄ pH 7,0 - 7,5
NTMT:	0,1 M NaCl 0,1 M Tris-HCl, pH 9,5 50 mM MgCl ₂ 0,1% Tween 20

PBDT:	1% DMSO in PBS
PBS:	137 mM NaCl 2,68 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
PBSBT:	0,2% BSA in PBST
PBST:	0,1% Tween 20 in PBS
4% PFA/PBS:	4% Paraformaldehyd bei 68°C in PBS lösen, pH mit 1 M NaOH auf 7,0 einstellen
Proteinase K-Lösung:	10 mg/ml Proteinase K
PTU (100x):	3 g 1-Phenyl-2-Thiourea in 1 l E3 lösen und lichtgeschützt aufbewahren
RNAse-freies ddH₂O:	0,5% (v/v) DEPC, Inkubation über Nacht bei RT, anschließend autoklavieren
SDS-Laufpuffer:	25 mM Tris 190 mM Glycin 0,1% SDS
SSC (20x):	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat pH 7,0
TBE:	89 mM Tris 89 mM Borsäure 2 mM EDTA pH 8,0 (NaOH)

4.3 Verwendete Oligonukleotide

DNA-Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion bezogen. Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden in einem entsprechenden Volumen ddH₂O gelöst, um eine Stammlösung von 50 µM zu erhalten. Eine Übersicht der benutzten Oligonukleotide befindet sich in Tabelle 1.

Tabelle 1: Verwendete Oligonukleotide

Gen	Name	Sequenz von 5 nach 3'
a2bp1	a2bp1 ISP-F	CTGCAGGGATTGGGACTAAG
a2bp1	a2bp1 ISP-R	TTAATATGGCGCGAAACGAC
a2bp1	a2bp1 ISP-F2	ATGGAGGAAAAAGGGAGCAA
a2bp1	a2bp1 ISP-R2	TTAATATGGCGCGAAACGAC
a2bp1	a2bp1-splice fow	CATCGGCCAGTTCGCTCCC
a2bp1	a2bp1-splice-rev	GATTTCAACATCTAAGATTTTACC
actn3a	actn3a-co-E2-fow	TGGTGCAACTCTCACCTGCGT
actn3a	actn3a-co-E2-rev	ACCTCCAGCAGCAGCATGAGC
actn3a	actn3a-E5	GACTGCCCTACAGGAACGT
actn3a	actn3a-E6 rev	ATGAGGGCACAAAGTGCCAGGC
actn3a	actn3a-E6 fow	AGACCTGACCTCATCGACTACTCCA
actn3a	actn3a-E7	GCAGTGTTGAGATTGCCAATTGGG
actn3a	actn3a-co-E2-fow	TGGTGCAACTCTCACCTGCGT
camk2g1	camk2g1-co-E6 fow	CCATTGCATCAGTCAGATCCTGGAG
camk2g1	camk2g1-co-E6 rev	AAGGTCTCTGTGCACGATGTCATGC
camk2g1	camk2g1 E13	CAAAAAGGCAGATGGAGTCAAG
camk2g1	camk2g1 E14 rev	TCGGTGTAGAAGAGGCCGTGTTG
camk2g1	camk2g1 E14 fow	CAACACGGCCTCTTCTACACCGA
camk2g1	camk2g1 E15	CTTTGGCCATCGACGGGGTT
ktn1	ktn1-co-E4-fow	GGCTCATGTTTCAGTCCTCTGCTCTG
ktn1	ktn1-co-E4-rev	TGGCAGGCGCTGGAACAGGA
ktn1	ktn1 E24	GGAAGAGCTGCTTGAGTTGAGGGA
ktn1	ktn1 E25 rev	GCGCCTCCATAGCGCTCCAG
ktn1	ktn1 E25 fow	CTGGAGCGCTATGGAGGCGC
ktn1	ktn1 E26	CGGTATGTGCGGCAGGAGTCTGT
hug	hug E5 co fow	GCCACAGTTTAGGGTACGGATTTGT
hug	hug E5 co rev	GGCCATTGAGTGTATTGATTGCCCT
hug	hug E2	TGTAAAGTGTCTACATGGCCGT
hug	hug E3 rev	GAGCTGGCACCCCTTGAGAGT
hug	hug E3 fow	ACTCTACAAGGGTGCCAGCTC
hug	hug E4	GCTCATCGCCATGGGGTCC
ptpla	ptpla E1 co fow	CCTTCAGAAAGGCACCCATAAAGGC
ptpla	ptpla _E1 co fow	CTCCAGCAGTGCAAATGTCTGGA
ptpla	ptpla E3	TGGGGTCCAAGTGTGTTCTCGGA
ptpla	ptpla E5	CAGTTCACCAACTACTCCAGTGGG

4.4 Morpholino-modifizierte antisense Oligonukleotide

Die in Tabelle 2 aufgelisteten und verwendeten Morpholino-modifizierten antisense Oligonukleotide wurden von der Firma Gene Tools (Philomath, USA) synthetisiert und geliefert.

Tabelle 2: Verwendete Morpholinos

Gen	MO-target site	Sequenz von 5' nach 3'
za2bp1	MO1-star site	ATGGAGGAAAAAGGGAGCAAGATGGTGG
za2bp1	MO2-E6/I6	AAATgtaagaacaagctccctt
zactn3a	MO-I5/E6	tccaactaagacacagaccacaaac
zcamk2g	MO-E14/I14	GGTTACACAGAGATGAGGTACCATC
zhug	MO-I2/E3	ACAAACCTGCAGCAACAGATCAGTT
zktn1	MO-I24/E25	AGCTCCTAGTCAGTTTCAGAGAAAC
zptpla	MO-E4/I5	GCTTCATGCCCCATTTGTACCTGGC

4.5 Enzyme

Die verwendeten Enzyme wurden von der Firma New England Biolabs bezogen. Sofern nicht anders angegeben, wurden die vom Hersteller empfohlenen Reaktionsbedingungen gewählt.

4.6 Plasmide

Für die Herstellung der *a2bp1 in situ*-Sonden diente der Vektor pCRII (Invitrogen).

4.7 Antikörper

Primäre Antikörper:

- anti-Myosin MF20 (Developmental Studies Hybridoma Bank, DSHB)
- anti-atriales Myosin S46 (DSHB)

Sekundäre Antikörper:

- Goat-anti-mouse IgG1-FITC (Southern Biotech)
- Goat-anti-mouse IgG2b-TRITC (Southern Biotech)

4.8 Geräte

Analysenwaage	Kern
Autoklav Systec V-150	Systec
Bioanalyser2100	Agilent
Brutschrank HeraCell	Heraeus
Feinwaage CP 124 S	Sartorius
Hitzeversiegler	ABGene
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf
Kühl- und Gefrierschränke Premium	Liebherr
Magnetrührer MR 3001 K	Omnilab
Mikrowelle	Bosch
PCR-Cycler	Eppendorf
Pipetten (mechanisch)	Eppendorf
qPCR	Applied Biosystems
Schüttelinkubator SM-30 Control	Edmund Bühler GmbH
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Vortex Reax Top	Heidolph
Wasserbad Isotemp 2	Fisher Scientific

4.9 Datenbanken/Server

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vor allem die folgenden Datenbanken verwendet:

Boxshade	http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html
ClustalW	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/
Ensembl	http://www.ensembl.org
Geo	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/
KEGG	http://www.genome.jp/kegg/

NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
Pubmed	http://ncbi.nih.gov/entrez/query.fcgi
Sanger	http://www.sanger.ac.uk
Spliceman	http://fairbrother.biomed.brown.edu/spliceman/index.cgi
UCSC	http://genome.ucsc.edu/
Vega	http://vega.sanger.ac.uk
Zfin	http://zfin.org
Zebrafish SSR	http://danio.mgh.harvard.edu/markers/ssr.html

4.10 Software

Im Rahmen dieser Arbeit wurde folgende Software verwendet:

Bioanalyser 2100 Expert	Agilent
Boxshade	EmbNet
ClustalW	EmbNet
Endnote X7	Thomson Reuters
Excel	Microsoft Office
CLC Genomics Workbench	CLC Genomics
Oligo Perfect™ Designer	Life Technologies
Powerpoint	Microsoft Office
Photoshop 7.0	Adobe
Adobe Premiere	Adobe
Primer 3	Whitehead Inst. for Biomedical Research
PVR plus	Ulead
Word	Microsoft Office

5 Methoden

5.1 Zebrafisch Methoden

5.1.1 Aufzucht und Haltung von Zebrafischen

Die Aufzucht, Haltung und Verpaarung der Zebrafische erfolgte analog der Beschreibung von Westerfield et al. (Westerfield 1995). Die Haltung erfolgte bei konstanter Temperatur von Wasser und Umgebung und mit einem definierten Tag-Nacht-Rhythmus von 13 Stunden Helligkeit und 11 Stunden Dunkelheit. Die Aquarienanlage stammt von der Firma Schwarz.

5.1.2 Gewinnung von Embryonen

Die Gewinnung der Embryonen für die verschiedenen Experimente erfolgte morgens mit Beginn der Lichtphase. Hierzu wurden am Abend zuvor Weibchen und Männchen in dafür vorgesehene Plastikablaichboxen verpaart. In diesen Boxen konnten Weibchen und Männchen durch eine Trennscheibe voneinander getrennt gehalten werden. Direkt zu Beginn der Hellphase erfolgte die Eiablage, etwa 20 bis 30 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, abgesammelt werden. Überführt in Petrischalen wurden diese dann bis zum gewünschten Entwicklungsstadium bei 29 °C im Inkubator gehalten

5.1.3 Foto- und Videodokumentation

Lebende Embryonen wurden auf einen Objektträger in 2,5 % Methylcellulose überführt und mit Hilfe einer Präpariernadel ausgerichtet. Die Fotodokumentation erfolgte an einem Stereomikroskop im Durchlicht. Die Bilder wurden mit einer Digitalkamera aufgenommen und mit einem Bildbearbeitungsprogramm bearbeitet. Videoaufnahmen erfolgten für mindestens zehn Sekunden und wurden direkt digitalisiert. Die Bearbeitung der Filme erfolgte mit den Programmen Adobe Premiere und Virtual Dub (Avery Lee).

Fixierte und gefärbte Embryonen wurden an einem Stereomikroskop im Hellfeld oder unter Fluoreszenzanregung dokumentiert. Hellfeld- und Fluoreszenzaufnahmen von Schnitten erfolgten an einem Durchlicht- / Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss. Um die Pigmentbildung zu unterdrücken 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), was zur erleichterten Beobachtung und Dokumentation der Zebrafische diente.

Material:

- Mulden-Objektträger
- 2,5% Methylzellulose in E3-Medium
- Präpariernadel
- Stereomikroskop MZFLIII (Leica)
- Mikroskop Axioskop 2 (Zeiss)
- Mikroskop DM IRB (Leica)
- Digitalkameras DC 500 und AcioCam MRc (Leica)
- Framegrabber VS-USB 2800D (V-Stream)
- Videokamera CF 15/4 MC (Kafpa)
- Fluoreszenzvideokamera EI 4 (Proxitronic)
- Bearbeitungssoftware Adobe Photoshop, Adobe Premiere, Virtual Dub 1.7 (

5.1.4 Mikroinjektion**Vorbereitung der Injektionslösung**

Die im lyophilisierten Zustand gelieferten Morpholino-modifizierten antisense Oligonukleotide (Gene Tools) wurden in ddH₂O gelöst, so dass die Konzentration der Stammlösung 5 mM betrug. Aus dieser Stammlösung wurde dann die Injektionslösung hergestellt. Die Injektionskonzentration der Morpholino-modifizierten Oligonukleotide betrug zwischen 0,065 und 1 mM.

Injektionen

Die Injektionen erfolgten mit Hilfe der Injektionsanlage Femtojet® (Eppendorf). Das Aufreihen der befruchteten Zebrafisch-Oozyten für die Mikroinjektion erfolgte in speziellen Injektionsrampen aus Agarose. Zur Herstellung der Injektionsrampen wurde eine Plastikmatrize in flüssige 3 % ige Agarose gegeben und nach deren Erstarren wieder entnommen. So entstanden sechs asymmetrische Rinnen von 3 mm Breite und 5 cm Länge. Die Injektionsnadeln wurden mit einem Kapillarenzieher aus Glaskapillaren gezogen. Hierfür wurde ein 2-Schritt-Programm mit 72°C und 67°C verwendet. Die Injektion in die Zebrafischembryonen erfolgte im Ein- bis Vier-Zell-Stadium. Hierzu wurden die Eier spätestens eine halbe Stunde nach der Eiablage in den Rinnen der Injektionsrampe nebeneinander liegend aufgereiht und überschüssiges Medium abgesaugt. Mit Hilfe einer Injektionsapparatur wurde direkt in die Zelle oder in den Dotter injiziert. Der Kapillardruck betrug 15 hPa, die Injektionsdauer 0,1 sek, der Injektionsdruck wurde der Nadel angepasst. Nach der Injektion wurden die Embryonen in Petrischalen mit E3-Medium überführt. Sechs Stunden später wurden lebende Embryonen in eine neue Schale mit E3-Medium überführt, dem am nächsten Tag zur Unterdrückung der Pigmentbildung 1x PTU zugesetzt wurde. Aus jedem Gelege wurden parallel zu den injizierten Embryonen nicht-injizierte Embryonen als Kontrollansatz bei gleichen Entwicklungsbedingungen gehalten.

Material:

- Agarose (Invitrogen)
- Petrischalen (Greiner Bio-one)
- Injektionsmatrize (Fa. Adaptive Science Tools)
- Glaskapillaren 1,0 mm (World Precision Instruments)
- Kapillarenzieher PC-10 (Narishige)
- Injektionsapparatur Femtojet (Eppendorf)

5.1.5 RNA *antisense in situ*-Hybridisierung (ISH)

Das Verfahren der *in situ* Hybridisierung dient zur Detektion der räumlichen Expression von RNA. Dabei werden Digoxigenin markierte *antisense* RNA Sonden verwendet. Für die Herstellung einer einzelsträngigen RNA-*antisense* Sonde für die *in situ*-Hybridisierung wurden spezifische Gensequenzen amplifiziert und in den Vektor pCRII mit den Phagenpromotoren SP6 und T7 kloniert. Die Gensequenzen wurden so gewählt, dass sie Teile der untranslatierten Region enthielten, um die Homologie zu anderen Genen gering zu halten. Das generierte Plasmid wurde durch ein Restriktionsverdau hinter dem Insert linearisiert, um die Termination der Transkription zu gewährleisten. Anschließend wurde der nicht-kodierende Strang *in vitro* transkribiert, um die *antisense* RNA-Sonde zu erhalten. Für die Transkription wurden Digoxigenin-markierte Nukleotide verwendet. Für einen typischen Ansatz wurde 1 µg Plasmid linearisiert und über ein Agarosegel mit anschließender Gelextraktion aufgereinigt. Zu dem Plasmid in 20 µl ddH₂O wurden 3 µl 10x Transkriptionspuffer, 3 µl Digoxigenin-RNA-Labeling Mix, 1,5 µl RNase-Inhibitor und 2,5 µl SP6- oder T7-Polymerase gegeben. Die Transkription erfolgte für 2 - 3 h bei 37°C, anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 1,5 µl DNase I für 15 min bei 37°C degradiert. Die RNA wurde durch Zugabe von 3 µl 0,2 M EDTA, 3,75 µl 4 M LiCl und 112,5 µl Ethanol abs. gefällt. Die Fällung erfolgte für 30 min bei -80°C. Im Anschluss wurde die RNA durch Zentrifugation bei 20.000 g für 15 min bei 4°C pelletiert, mit 75% Ethanol in RNase-freiem ddH₂O gewaschen und getrocknet. Die RNA-Sonde wurde in 100 µl RNase-freiem ddH₂O aufgenommen und bei -80°C gelagert. Für die *in situ*-Hybridisierung wurden Zebrafischembryonen in 4% PFA/PBS bei 4°C über Nacht fixiert und in Methanol bei -20°C gelagert. Anschließend wurden die Embryonen in einer absteigenden Methanolreihe (75%, 50%, 25% in PBT) rehydriert und vier Mal in PBST gewaschen (je 5 min). Durch einen Verdau mit Proteinase K (0,1 µg/ml in PBST) wurden die Embryonen für die Sonde permeabel gemacht. Die Zeit des Verdau richtete sich nach dem Entwicklungsstadium der Embryonen:

>24 hpf	kein Proteinase K Verdau
24 hpf	10-15 min
48 hpf	35 min
72 hpf	50 min

Nach dem Verdau wurden die Embryonen zweimal in PBST gewaschen und für 20 min bei RT in 4% PFA/PBS refixiert. Nach fünfmaligem Waschen in PBST für je 5 min wurden die Embryonen in Hybridisierungspuffer (Hyb) gegeben, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Diese Prähybridisierung erfolgte für mindestens 4 h bei 70°C. Anschließend wurde die RNA-Sonde 1:100 in Hybridisierungspuffer verdünnt, auf 70°C vorgeheizt und zu den Embryonen gegeben und über Nacht bei 70°C inkubiert. Um die Stringenz der Bindung zu erhöhen, wurde anschließend eine Reihe von Waschschrritten durchgeführt:

Je 10 min bei 70°C	75 %, 50 %, 25 % Hyb in 2x SSC
2 x 10 min bei 70°C	2x SSC
2 x 30 min bei 70°C	0,2x SSC
Je 5 min bei RT	75 %, 50 %, 25 % 0,2x SSC in PBST
2 x 5 min bei RT	PBST

Unspezifische Antikörperbindungsstellen zu blocken, wurden die Embryonen in Blockingpuffer 2 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden Alkalische Phosphatase-konjugierte anti-Digoxigenin Fab-Fragmente 1:2000 in Blockingpuffer verdünnt und zu den Embryonen gegeben, die Inkubation erfolgte bei 4°C über Nacht. Nachfolgend wurde 2x 5 min und 4x 15 min mit 2mg/ml BSA/PBT gewaschen. Anschließend wurden die Embryonen in 12- oder 24-Loch-Zellkulturschalen überführt und 3x 5 min mit frisch hergestelltem NTMT Puffer äquilibriert. Die Färbereaktion erfolgte bei RT mit 20 µl NBT/BCIP-Lösung/ml NTMT im Dunkeln unter leichtem Schütteln. Die Dauer der Farbreaktion hing von der mRNA-Konzentration ab. Nach gewünschter Farbintensität wurde die Farbsubstratreaktion durch mehrmaliges Waschen mit PBST gestoppt

Die gefärbten Embryonen wurden vollständig in 4 % Methylcellulose auf einen Hohlsliff Objektträger überführt und mit einer feinen Präpariernadel in eine geeignete Position gebracht. Mittels eines Stereomikroskops wurden die Embryonen anschließend analysiert und mit einer Digitalkamera fotografiert.

5.1.6 Histologische Analyse

Für histologische Analysen wurden die Zebrafischembryonen in 4% Paraformaldehyd/PBS bei 4°C über Nacht fixiert und anschließend in 50 % Ethanol gelagert. Vor der Einbettung

wurden die Embryonen in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70 %, 80 %, 90 %, 100 %) dehydriert und anschließend bei 4°C über Nacht in frisch hergestellter Infiltrationslösung inkubiert. Die Einbettung erfolgte in 1,5 ml frischer Infiltrationslösung, welcher 60 µl JB4-Lösung B zugegeben wurden. Mit einer Präpariernadel wurden die Embryonen in einer Einbettungsform seitlich liegend ausgerichtet. Am nächsten Tag wurden die erstarrten Blöckchen aus der Form gelöst und fertig ausgehärtet.

Mit Hilfe eines Mikrotoms wurden 4 - 5 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträgern aufgereiht. Die Färbung erfolgte durch jeweils zehnmütige Inkubation in Hämatoxylin und Eosin, gefolgt von je einem Waschschrift unter fließendem Wasser.

Material:

- Infiltrationslösung (Polysciences)
- JB4-Lösung B (Polysciences)
- Präpariernadel
- Einbettungsform (Leica)
- Mikrotom 2145 (Leica)
- Hämatoxylin/Eosin (Sigma)

5.1.7 Elektronenmikroskopische Analyse

Für elektronenmikroskopische Aufnahmen wurden die Embryonen in 3% Glutaraldehyd, 0,1 % Pikrinsäure, 0,3 % Triton bei 4°C über Nacht fixiert. Anschließend wurden Ultradünnschnitte der Embryonen angefertigt und elektronenmikroskopisch analysiert.

5.2 Molekularbiologische Methoden**5.2.1 DNA-Isolation aus Zebrafischgewebe**

Zur Isolation genomischer DNA wurden Zebrafischembryonen oder Schwanzflossengewebe adulter Fische in einer 96-Well-Platte in Methanol gesammelt und für mindestens zwei Stunden bei -80°C inkubiert. Anschließend wurde das Methanol

vollständig abgezogen und das Gewebe in Lysepuffer mit 1 mg/ml Proteinase K bei 50°C lysiert. Die Lyse erfolgte über Nacht, anschließend wurde die Proteinase K durch Inkubation bei 98°C für 10 min inaktiviert. Das Lysat wurde kurz abzentrifugiert, 1:25 in ddH₂O verdünnt und für PCR-Analysen eingesetzt.

Material:

- 96-Well-Platten (ABGene)
- Methanol (Sigma)
- Inkubationsofen (Fa. Heraeus)
- Proteinase K (Fa. Roche) in Lysepuffer (1 mg/ml)

5.2.2 Aufreinigung von DNA

Die DNA wurde durch eine Ammoniumacetat-Fällung gereinigt. Für die Fällung wurde ½ Volumen 7,5 M Ammoniumacetat (Roth) mit der DNA gemischt und 2½ Volumen eiskaltes Ethanol abs. zugegeben. Nach mindestens 30 min Inkubation bei -20 °C wurde die DNA durch Zentrifugieren bei 14000 rpm und 4 °C für 15 min pelletiert. Anschließend wurde die DNA mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen (15 min, 4 °C, 14000 rpm) und an der Luft getrocknet. Die gefällte DNA wurde dann in ddH₂O (Braun) aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

5.2.3 RNA-Isolation aus Zebrafisch-Gewebe für den Spleißnachweis

Für die Isolation von Total-RNA aus Zebrafischembryonen wurden die Embryonen mit 800 µl Trizol versetzt. Anschließend wurden sie durch das Aufziehen durch eine Kanüle (ø 0,6 und 0,4 mm) homogenisiert. Das Homogenat wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 160 µl Chloroform versetzt. Nach kräftigem Schütteln für 15 sek wurde erneut für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zentrifugation bei 12.000 g und 4°C für 15 min erfolgte die Trennung der Phasen, die farblose wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung der RNA wurde der Ansatz mit 400 µl Isopropanol versetzt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die RNA wurde durch Zentrifugation bei 7.500 g und 4°C für 15 min pelletiert. Das RNA-Pellet wurde mit 75 %

Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet, anschließend wurde die RNA in RNase-freiem ddH₂O aufgenommen und für 10 min bei 55°C gelöst. Die Konzentration wurde bestimmt und auf 0,5 µg/µl eingestellt. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

Material:

- Trizol-Reagenz (Invitrogen)
- Einweg-Kanülen BD Microlance 3 ø 0,4 x 19 mm und 0,6 x 25 mm (BD)
- Einweg-Spritzen BD Discardit II 1 ml (BD)
- Chloroform (Fa. Sigma)
- Isopropanol (Fa. Sigma)
- RNase-freies H₂O
- 75 % Ethanol (Fa. AppliChem) in DEPC-H₂O
- Kühlzentrifuge 5417R (Fa. Eppendorf)
- Spektralphotometer GeneQuant II (Fa. Pharmacia Biotech)

5.2.4 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird RNA in cDNA (complementary DNA) umgeschrieben. Für die Herstellung von cDNA wurden 1 µg Total-RNA (in 10 µl) eingesetzt. Die RNA wurde zunächst für 5 min bei 68°C inkubiert. Der Transkriptionsansatz bestand aus 10 µl Total-RNA (5 µg), 4 µl 5x Reverse Transkriptase-Puffer, 1 µl 1 mM dNTP-Mix, 1 µl RNase-Inhibitor, 1 µl 1,5 µM pd(N₆)- oder oligo(dT)-Primer, 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl Superscript Reverse Transkriptase. Die Transkription erfolgte für 1 h bei 37°C, anschließend wurde der Ansatz für 5 min auf 95°C erhitzt, sofort auf Eis gestellt und abzentrifugiert. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

Material:

- 5x RT-Puffer, 0,1 M DTT, Superscript Reverse Transkriptase (Invitrogen)
- dNTP-Mix, RNA-Guard RNase-Inhibitor (Roche)
- pd(N₆)- und oligo (dT)-Primer (Invitrogen und Metabion)

5.2.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren erfolgte am Spektrophotometer NanoDrop oder Bioanalyser.

Material:

- Spektrophotometer NanoDrop (PeqLab)
- Bioanalyser 2100 (Agilent)

5.2.6 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist ein Verfahren zur selektiven Amplifikation von DNA-Abschnitten (Erich 1989; Mullis et al. 1986).

Die Reaktion besteht aus drei Schritten. Im ersten Schritt erfolgt die Hitzedenaturierung der doppelsträngigen Ausgangs-DNA. Im nächsten Schritt hybridisieren zwei Oligonukleotide an die nun einzelsträngige DNA (*annealing*), wo sie im anschließenden Elongationsschritt als Primer für die Neusynthese des Komplementärstranges dienen. Durch vielfaches Durchlaufen dieser Zyklen wird der gewählte DNA-Abschnitt exponentiell amplifiziert. Das Standard-PCR-Programm bestand aus einem initialen Denaturierungsschritt bei 94°C, gefolgt von 35 - 50 Zyklen aus 30 sek Denaturierung (94°C), 50 sek Annealing und 1 min Elongation (72°C). Die Annealing-Temperatur wurde aus den Schmelztemperaturen der verwendeten Primer ermittelt. Der Standard-PCR-Ansatz enthielt 6,69 µl ddH₂O, 1 µl 10x PCR-Puffer, 0,1 µl 20 mM dNTP-Mix, 2 x 0,08 µl 50 µM Primer und 0,05 µl *Taq*-DNA-Polymerase. In Abhängigkeit der verwendeten DNA-Polymerase und der Zielsetzung wurden der PCR-Ansatz und das Programm modifiziert.

Material:

- *Taq*-Polymerase und 10x PCR-Puffer (Qiagen)
- Phusion-Polymerase und 5x PCR-Puffer (Finnzymes)
- dNTP-Mix (Roche)
- Oligonukleotid-Primer (Metabion)
- Thermocycler PTC-100 (MJ Research)

5.2.7 Quantitative Real-Time-PCR

Bei der SYBR-qPCR heftet sich der Fluoreszenzfarbstoff, welcher DNA-bindende Eigenschaften besitzt, an der entstehende Doppelstrang-DNA und sendet nach Anregung ein Fluoreszenzsignal bestimmter Wellenlänge (494 und 521 nm) aus. Somit lässt sich bei jedem Temperaturzyklus der PCR der Anstieg der Fluoreszenz als Maß für die Produktentstehung verfolgen (daher „Echtzeit“-PCR) (Higuchi et al. 1993). Abweichungen in der Fragmentlänge oder Primer-Dimere lassen sich mittels Schmelzkurvenanalyse differenzieren. Die Quantifizierung erfolgt dabei über eine Standardkurve und das logarithmische Verhältnis zwischen der Ausgangsmenge der PCR-Matrize zu dem Zyklus, an dem erstmals das spezifische PCR-Produkt detektiert werden kann und den Hintergrund überschreitet. Zur Normalisierung der Quantifizierungsergebnisse werden diese in ein relatives Verhältnis zur Menge eines Referenzgens gesetzt, die proportional zur eingesetzten RNA-Menge ist.

Zur Ermittlung der Transkript Isoformen bzw. Exon-Verwendung wurde in der vorliegenden Arbeit die RNA aus 48 Stunden alten *MO-a2bp1* und *MO-control* injizierten Zebrafischembryonen und Herzen isoliert. Mit einem DNaseI-Verdau erfolgte anschließend die Entfernung genomischer DNA und durch eine LiCl-Fällung wurde die RNA gereinigt. Abschließend erfolgte die cDNA Synthese. Die Detektion der Fluoreszenzsignale von SYBR Green erfolgte mit dem 7000 Sequence Detection System von Applied Biosystems. Das Primerdesign für die RT-PCR wurde mit Oligo Perfect™ Designer (Life Technologies) durchgeführt. Die Primer wurden vor einem Einsatz mit Hilfe eines Primereffizienztest auf ihre Sequenzspezifität getestet. Für die qRT-PCR wurden 6 µl 1:50 verdünnte cDNA, 4 µl Primermix 2µM(Metabion) und 10 µl SYBR Green eingesetzt. Das RT-PCR-Programm umfasste folgende Schritte:

50 °C 2 min

95 °C 15 min

95 °C 15 sek (Denaturierung)	} 40 Zyklen
T _m °C 30 sek (Annealing)	
72 °C Y (Elongation)	

95 °C 15 sek	}	Dissoziationsschritt
60 °C 20 sek		
95 °C 15 sek		

Die Annealing-Temperatur (T_m) richtete sich nach der Schmelztemperatur der jeweiligen Primer. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte nach jedem Zyklus bei 72 °C. Der Dissoziationsschritt am Ende der qRT-PCR diente der Kontrolle der Homogenität des PCR Produktes. Als Referenz diente eine Amplifikation eines nicht alternativ gespleißten Exon. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte über die Berechnung der ΔCt -Methode (Pfaffl 2001). Es wurden drei biologische Replikate durchgeführt, aus denen die Mittelwerte errechnet wurden. Von den Mittelwerten der zu untersuchenden Spleißvarianten wurde der Mittelwert des Referenzexons subtrahiert um die ΔCt -Werte zu berechnen. Auf der Grundlage der ermittelten ΔCt -Werte können z.B. zwei Gruppen/Bedingungen miteinander verglichen werden, wobei die ΔCt -Werte der verschiedenen Gruppen von einander abgezogen werden ($\Delta\Delta Ct$ -Werte). Der Unterschied der Transkriptvarianten/Exon-Verwendung wurde berechnet durch $2^{\Delta\Delta Ct}$. Die Signifikanzen in den Spleiß-Analysen wurden durch t-Test mit ermittelt.

5.2.8 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wandern aufgrund der negativen Ladung ihrer Phosphatgruppen in einem elektrischen Feld, daher können sie in einem Agarosegel nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Fragmente hängt dabei von der Konzentration des Gels, der Größe der DNA sowie der angelegten Spannung ab. Zu analytischen und präparativen Zwecken wurden Gele aus 1-2 % Agarose (w/v) in TBE verwendet, die zur Visualisierung der DNA mit Ethidiumbromid versetzt wurden. Die DNA-Fragmente wurden in 1x DNA-Ladepuffer in die Taschen des Gels eingebracht. Die Auftrennung erfolgte in 0,5x TBE und mit 5 V/cm. Als Größenstandard diente eine 100 bp oder 1 kb DNA-Leiter. Nach der Auftrennung wurde die DNA durch UV-Anregung des Ethidiumbromids bei 254 nm sichtbar gemacht und das Bandenmuster dokumentiert.

Material:

- Agarose (Invitrogen)
- Ethidiumbromid (Sigma)
- DNA-Massenstandard (Gibco BRL)
- Elektrophoresekammern und Gelkämme (PeqLab)
- Spannungsquelle (Biometra)
- Geldokumentationseinheit (MWG Biotech)

5.2.9 Gelextraktion

Unter UV-Licht (Wellenlänge 365 nm) wurden die DNA-Banden im Gel sichtbar gemacht und mit Hilfe eines Einweg-Skalpells ausgeschnitten. Die Extraktion der DNA erfolgte unter Verwendung des „QIAquick Gel Extraction Kit“ nach den Angaben des Herstellers.

Material:

- QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)

5.2.10 Restriktionsverdau von DNA

Der Restriktionsverdau von DNA erfolgte nach den Angaben des Enzym-Herstellers (NEB). In einem typischen Ansatz wurde 1 µg Plasmid-DNA in einem Volumen von 50 µl unter Zugabe von 5 µl 10x Puffer, ggf. 0,5 µl BSA und 1 µl Restriktionsenzym verdaut.

Material:

- Restriktionsendonukleasen mit 10x Puffer und 100x BSA (NEB)

5.2.11 Transformation von *E. coli*

Für die Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurde ein Zell-Aliquot auf Eis aufgetaut und mit 3 µl Ligationsansatz versehen. Dieser Ansatz wurde für 30 min auf Eis

inkubiert, die Transformation erfolgte durch anschließenden Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad. Für die Transformation elektrisch kompetenter Zellen wurden dem Zell-Aliquot 1 µl Ligationsansatz zugegeben. Die Zellen wurden anschließend in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt und für 0,1 sek mit 1,8 kV elektroporiert. Nach der Transformation wurden die Zellen stets in 250 µl SOC-Medium aufgenommen, für 1 h bei 37°C und 200 rpm inkubiert und auf Selektionsplatten ausgestrichen.

Material:

- chemisch und elektrisch kompetente TOP10-Zellen (Invitrogen)
- Elektroporationsküvetten (Bio-Rad)
- Elektroporator (Bio-Rad)
- SOC-Medium (Invitrogen)

5.2.12 Antibiotika und Selektionsmedien

Von den verwendeten Antibiotika wurden Stammlösungen (Ampicillin: 100 mg/ml, Kanamycin: 50 mg/ml, Chloramphenicol: 25 mg/ml) angesetzt, steril filtriert und in Aliquots bei -20°C gelagert. Für die Herstellung von Selektionsmedien wurde LB-Medium autoklaviert und nach der Abkühlung im Verhältnis 1:1000 mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt. Für die Herstellung von Selektionsplatten wurde LB-Agar autoklaviert, 1:1000 mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt und steril in Petrischalen gegossen. Selektionsmedien und -platten wurden bei 4°C gelagert.

Material:

- Antibiotika (Sigma)
- LB-Agar (Fluka)
- LB Broth (Fluka)

5.2.13 Isolation von Plasmid-DNA

Zur Isolation von Plasmid-DNA wurden 5 ml Selektionsmedium mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Für große Mengen Plasmid-DNA wurden 200 ml Selektionsmedium mit 10 µl der 5 ml-Vorkultur versetzt und wie oben über Nacht inkubiert. Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte unter Verwendung des „QIAprep Spin Miniprep Kit“ bzw. des „Qiagen Plasmid Maxi Kit“ nach den Angaben des Herstellers.

Material:

- QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen)
- Qiagen Plasmid Maxi Kit mit QIAFilter Maxi Cartridges (Qiagen)

5.3 Biochemische Methoden

5.3.1 Immunfluoreszenzfärbung an Zebrafischembryonen

Für Immunfluoreszenzfärbungen wurden die Zebrafischembryonen in DENT's Fix über Nacht bei RT fixiert. Anschließend wurden die Embryonen über Nacht bei RT in DENT's Bleach entfärbt und bei -20°C in Methanol gelagert. Vor der Färbung wurden die Embryonen in einer absteigenden Methanolreihe (75%, 50%, 25% in PBST) rehydriert und anschließend 4 x 5 min in PBST gewaschen.

Das Blockieren unspezifischer Bindungsstellen für den Antikörper erfolgte in Blockpuffer 1 für 90 min bei 4°C. Der Primärantikörper wurde nach Herstellerempfehlung in Blockpuffer 2 verdünnt (1:10 bis 1:50). Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte bei 4°C über Nacht. Anschließend wurden die Embryonen 4 x für 30 min in Blockpuffer 2 gewaschen. Bei Doppelfärbungen wurde nun mit dem zweiten Primärantikörper inkubiert (4°C über Nacht). Der Fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper wurde 1:100 in Blockpuffer 2 verdünnt, die Inkubation erfolgte lichtgeschützt bei 4°C über Nacht oder bei RT für 2 h. Bei Doppelfärbungen wurden die beiden Sekundärantikörper gemeinsam inkubiert. Nach der Inkubation wurde 2 x mit PBSBT gewaschen und die Färbung dokumentiert.

Material:

- 6-Well Zellkulturplatten (Nunc)

5.4 Transkriptom Sequenzierung

Zur Transkriptom-Sequenzierung wurde in dieser Arbeit der SOLiD 4 Sequencer (ABI) verwendet, der auf dem Prinzip der Sequenzierung durch Ligation beruht. Bei der Sequenzierung des gesamten Transkriptoms wird zunächst die mRNA in cDNA umgeschrieben, welche in voller Länge sequenziert wird. Danach wurden die Sequenzier-Reads, die die Sequenzierinformation enthalten, auf Sequenzähnlichkeiten zu bereits bekannten Sequenzen in öffentlich zugänglichen Datenbanken untersucht. Bei der Assemblierung der Transkripte wurde auf bereits bestehende DNA-Sequenz-Datenbanken zurückgegriffen. Die Sequenzierung, die Herstellung der Sequenzierbibliothek und die Assemblierung wurde in Kooperation mit der Firma Febit AG durchgeführt. Das beinhaltete die Konzentrationsmessung, die Qualitätskontrolle, die reverse Transkription der RNA-Proben, sowie die Auswertung und statistische Analyse der Daten. Die Sequenzierung erfolgte an einem ABI-SOLiD-4-Sequenzierer. Der SOLiD-Sequenzierer erzeugt Leselängen von etwa 35-50 bp bei insgesamt 6 Giga Basen pro Lauf. Die verwendete Methode erlaubt es Transkripte in sehr geringer Kopienzahl (statistisch < 1 Molekül pro Zelle), sicher nachzuweisen. Die wichtigsten Schritte im Arbeitsablauf zur Einzelzellanalyse mit dem SOLiD-System umfassen die Lyse einzelner Zellen, die cDNA-Synthese, Adapterligation und die abschließende Amplifikation der so entstandenen Sequenzierbibliothek. In Abb. 10 ist der mRNA-Sequenzierungsablauf dargestellt.

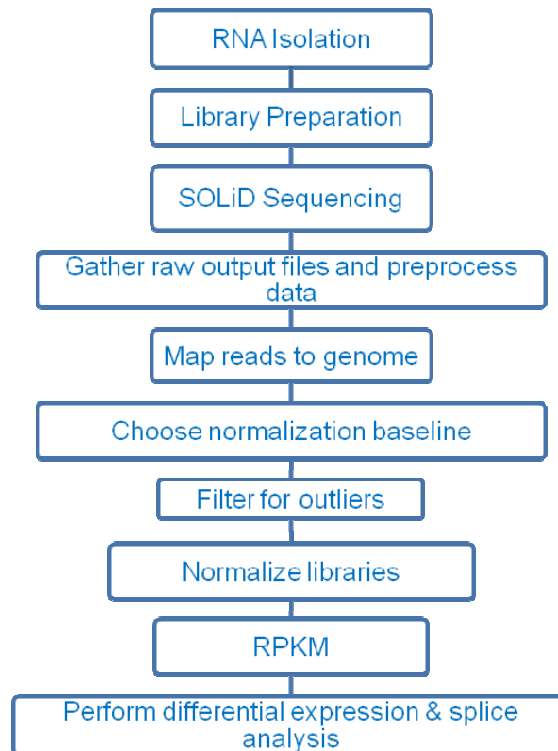


Abb. 8: mRNA- Sequenzierungsablauf

5.4.1 Herstellung der Sequenzierbibliothek

Für die Sequenzierbibliothek wurde aus MO-a2bp1 und MO-control injizierten Embryonen die gesamte RNA herzspezifisch (heart) sowie aus ganzen Embryonen (whole fish) mit Hilfe des mRNA-Mini Kit der Firma Qiagen isoliert. 4 bis 6 µg Gesamt-RNA der embryonalen Zebrafischherzen und 9 bis 25 µg aus ganzen Zebrafischembryonen wurden mit dem Ambion[®] MICROPOLY (A) Purist™ Kit angereichert, um alle mRNA-Transkripte zu erhalten (siehe Tabelle3).

Tabelle 3: Verwendete RNA-Konzentration für die Anreicherung

A2BP1 whole fish 48 hpf	BC13	393 ng/µl	25,4 µg used
Mock (a2pb1) whole fish 48 hpf	BC14	1100 ng/µl	9,1 µg used
A2BP1 heart 48 hpf	BC15	12,1 ng/µl	4,1 µg used
Mock heart 48 hpf	BC16	18,1 ng/µl	6,2 µg used

500 ng jeder Probe wurden für die Fragmentierung mit RNase III verwendet. Die Reinigung der fragmentierten RNA erfolgte mit Hilfe des RiboMinus™ Concentration

Module (Invitrogen). Für die Ligation der SOLiD-Adapter wurden die in der Tabelle 4 angegebenen Konzentrationen zu der angereicherten Fraktion zugegeben.

Tabelle 4: Verwendete SOLiD-adapter Konzentration

A2bp1 whole fish 48 hpf	63 ng
Mock (a2pb1) whole fish 48 hpf	78 ng
A2pb1 heart 48 hpf	145 ng
Mock heart 48 hpf	48 ng

Anschließend wurden die mRNAs in cDNA mit Hilfe des ArryScript™-Reverse-Transkriptase Kit transkribiert und die cDNA-Fragmente zwischen 150 und 250 nt (mRNAs + Adapter) aus einem 6 % TBE Harnstoff-Gel (Novex-System, Invitrogen) isoliert. Die daraus gewonnene RNA wurde mit einer 16-Zyklen-PCR unter Verwendung der gleichen 5'-Primer für jede Probe und sechs verschiedenen 3'-Primer-Sequenzen, welche Barcode-Sequenzen beinhalteten (SOLiD Multiplexing Strichkodierung Kit 01-16) amplifiziert. Insgesamt sechs gereinigte und Barcode markierten DNA-Bibliotheken wurden mit einem HS-DNA-Chip mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer gemessen und anschließend in äquimolarer Menge vereinigt.

5.4.2 Next Generation Sequencing

Das SOLiD-System (ABI) beruht auf dem Verfahren der Sequenzierung durch Ligation. Die zu sequenzierenden Moleküle werden zunächst einzeln an 1 µm-beads gekoppelt und durch eine Amplifikation in einer Wasser-in-Öl-Emulsion, der so genannten Emulsions-PCR (emPCR) klonal vermehrt. Die bis zu 300 Mio Beads mit den Sequenziervorlagen werden auf einen festen Untergrund aufgebracht und dem zu sequenzierenden Template-Strang wird anschließend ein Gemisch aus farbmarkierten Oktamer-Nukleotiden mit unterschiedlichen Sequenzen zugegeben. Diese werden bei passender Komplementarität an dem unbekanntem DNA-Strang durch Ligation fest gebunden. Die entsprechende Fluoreszenzfarbe zeigt die Sequenz des gebundenen farbmarkierte Oktamer-Nukleotides an. Im nächsten Zyklus wird die Fluoreszenz entfernt und ein neues Oligonukleotid gebunden, das wiederum Basen entziffert. Die Leseweite des SOLiD Sequenzierer betrug zwischen 35 und 50 Basen pro Sequenzier-Read (*reads*). Das

verwendete Farbkodierungsverfahren ermöglichte eine sehr hohe Lesegenauigkeit. Die höchste Datenmenge pro Lauf betrug 30 GB. Diese vom SOLID System verwendete Kombination aus kürzeren Sequenzier-Reads zusammen mit der hohen Anzahl an parallel sequenzierten Molekülen eignet sich sehr gut für Genexpressionanalysen unter verschiedenen Bedingungen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die vereinigten Sequenzierbibliotheken auf eine Konzentration von 60 pg/μl für die Sequenzierung verdünnt, an 1 μm-Beads gekoppelt und nach dem SOLiD Standard Verfahren, wie zuvor beschrieben, weiterverarbeitet.

5.4.3 Assemblierung der Rohdaten-Mapping auf das Referenzgenom

Die Sequenzier-Reads wurden mit der Bioscope Software (LifeTechnologies) gegen das Zebrafisch Genom (*Danio rerio* zv8) assembliert. Zusätzlich zur genomischen Sequenz wurden auch rRNA-, tRNA-Sequenzen sowie Sequenzen der Adapter und Homopolymer-Sequenzen (Poly-A, Poly-T) als Filter für die Assemblierung verwendet, um falsch-positive Ergebnisse zu minimieren. Zur Identifizierung von Exon-Intron-überspannenden *reads*, wurden alle möglichen Zweierkombinationen von Exonen basierend auf der Zebrafisch-Datenbank (UCSC; zv8) zur Auswertung miteinbezogen.

5.4.4 RPKM-Normalisierung

Bei der RNA-Sequenzierung kann es aufgrund der Fragmentierung der Sequenzier-Reads mit steigender Fragmentlänge zur einer theoretisch größeren Zahl an Sequenzen kommen wodurch ein systematischer Fehler entsteht. Daher wurde in dieser Arbeit die weit verbreitete Normalisierung auf „reads per Kilobase Transkript per million (mappable) reads“ (RPKM) zur Analyse der differentiellen Regulation und zur Identifizierung der häufigsten Transkripte verwendet. Dabei muss die Länge der Transkripte bekannt sein, um die Zahl der Sequenzier-Reads pro Kilobase Transkript pro Millionen kartierter *reads* zu erhalten (Mortazavi et al. 2008).

Der RPKM-Wert lässt sich mit Hilfe folgender Formel berechnen:

$$\text{RPKM} = \frac{10^9 \times (\text{number of mapped reads of an mRNA})}{(\text{total number of mapped reads in a sample}) \times (\text{sum of the exons in base pairs})}$$

5.4.5 Ermittlung der alternativen Spleißereignisse

Für die Analyse von Spleißereignissen wurden *reads* über Intron-Exon-Übergängen verwendet. Diese wurden zuvor durch das Assemblieren an Ein- oder Zwei-Exon-Kombinationen der Referenzsequenz identifiziert. Die Spleiß-Übergänge in den Proben wurden berechnet, indem einzelne *reads* über ein Intron-Exon-Übergänge (parts per million; ppm) im Verhältnis zu der gesamt Anzahl an *reads* über Intron-Exon-Übergängen in dieser Probe gesetzt wurden.

Für die Identifizierung und Quantifizierung der Spleißvorgänge von einzelnen Exonen in den Proben (Test-oder Referenz-Probe) wurde folgende Formel verwendet. Die Quantifizierung basiert auf der Abdeckung der Intron-Exon-Übergängen.

$$\text{score} = \frac{\text{CoverageA}_{(i,i+2)}}{(\text{CoverageB})_{(i,i+2)}} \times \frac{(\text{CoverageB})_{(i,i+1)} + (\text{CoverageB})_{(i+1,i+2)}}{(\text{CoverageA})_{(i,i+1)} (\text{CoverageA})_{(i+1,i+2)}}$$

CoverageA, CoverageB : Abdeckungs der Exon-Übergänge in der Test- oder Referenzprobe; i : Exon Anzahl

5.4.6 Gengruppen Anreicherungsanalyse - *gen set enrichment analyse GSEA*

Im Unterschied zur differentiellen Genexpression einzelner Gene werden mit der Gengruppen Anreicherungsanalyse (GSEA) Gengruppen (Gene Set) bestimmt, die statistisch signifikante Expressionsunterschiede zwischen zwei Bedingungen zeigen. Die Gengruppen sind *a priori* definiert und diese hierarchisch angeordnete Genliste wird systematisch auf die Verteilung von Komponenten bestimmter Gengruppen getestet. Dadurch lässt sich prüfen, ob ganze Gengruppen statistisch signifikant in einer einzelnen Bedingungen stärker oder schwächer transkribiert vorliegen. Zudem können geringe Unterschiede in der Transkription einzelner Gene in einer funktionell verknüpften

Gengruppe zusammengenommen einen großen Einfluß auf biologische Funktionen ausüben. Die Gengruppen für eine solche Analyse definieren sich z.B. über eine molekulare Funktion, eine funktionelle Abhängigkeit oder eine gemeinsame Regulation. Die statistische Auswertung basiert auf einer kumulativen Statistik und einer Adjustierung des Multiplen-Testverfahrens.

5.4.7 Validierung von Spleißereignisse mittels qPCR

Zur Verifizierung der Ergebnisse aus der RNA-Sequenzierung wurde die Expression verschiedener Isoformen mittels qPCR gemessen. Für die qPCR wurde cDNA aus 2-Tage alten Zebrafischembryonen und isoliertes Herzgewebe, die mit MO-control und MO-a2bp1 injiziert wurden, verwendet. Dabei wurde RNA von guter Qualität (RIN ≥ 6) verwendet.

Die Quantifizierung erfolgte unter Verwendung von zwei qPCR Strategien, die auf eine alternative Exon-Verwendung (Inklusion/Exklusion) basiert. Die hier eingesetzte „Exon-Triplett-Strategie“ ermöglicht die Detektion von Transkriptvarianten mit und ohne das alternativ gespleißte (AS) Exon (Abb. 9). Dazu wurde zunächst eine qPCR durchgeführt, bei der die Primer die konstitutiven Exone (Abb. 9A; grüne Kästen) erkennen. Bei dieser Amplifikation werden sowohl die langen als auch die kurzen Isoformen (mit und ohne das AS Exon) detektiert. Beim zweiten Schritt binden die Primer gezielt das AS Exon (rotes Kästchen) sowie die flankierenden, konstitutiven Exone (Abb. 9B). Auf diese Weise können die langen Isoformen spezifisch erfasst werden. Anschließend wird das relative Verhältnis der langen und kurzen Isoformen berechnet und zwischen den MO1-a2bp1 und MO-control injizierten Embryonen verglichen.

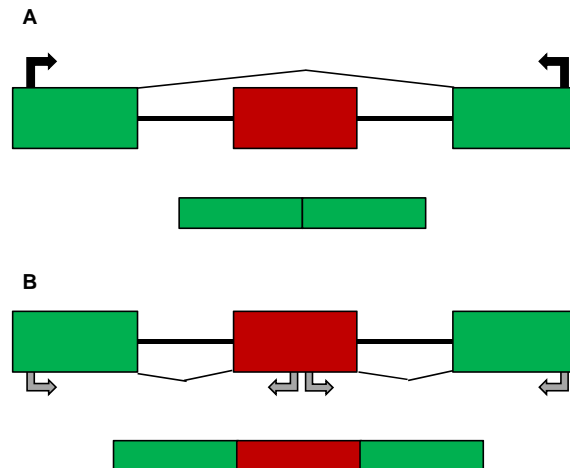


Abb. 9: Schematische Darstellung der Primerbindungsstellen für die Quantifizierung der Isoformen.

Die Sensitivität dieses Verfahrens wurde mit einer Spike-in Kontrolle bestimmt, wobei die Spezifität der eingesetzten Primer mit Hilfe eines Primereffizienztest untersucht wurde. Für jedes untersuchte Gen wurde der Mittelwert aus drei biologischen Replikaten berechnet. Die Normalisierung der Ct-Werte fand anhand der Amplifikation eines konstitutiven Exons statt. Alle Evaluierungen erfolgten herzspezifisch sowie mit ganzen Embryonen. Anschließend wurden die Reaktionsprodukte mittels Gelelektrophorese analysiert. Nur PCR-Reaktionen, welche eine Bande der erwarteten Größe lieferten, wurde in die Auswertung mit einbezogen.

Alle für die Validierung verwendeten Primer sind in der Tabelle 1 aufgelistet.

6 Ergebnisse

6.1 Identifizierung des *a2bp1* Zebrafischorthologs

Im Rahmen einer GWAS (Meder et al. 2013) konnten genetische Assoziationen in mehrere Gene mit der DCM gefunden werden. A2BP1, einer dieser Loci, ist ein relativ neu entdecktes Spliceregulator mit unbekannter kardialer Funktion. Zu Beginn dieser Arbeit stellte sich also die Frage, ob es im Zebrafisch ein oder eventuell mehrere humane A2BP1 Orthologe gibt. Das humane A2BP1 Gen (ENSG00000078328) wurde mit dem BLAST-Algorithmus gegen die Zebrafisch Genomdatenbank ENSEMBL abgeglichen. Im Zebrafisch wurden neben dem *a2bp1* Gen (*rbfox1*, Chr. 3; ENSDARG00000014746) drei weitere RBFOX-Paralogue identifiziert (Gallagher et al. 2011). Diese Sequenzen wurden als *rbfox1l* (*fox-1/a2bp1-like*, Chr.16; ENSDARG00000021184), *rbfox2* (*rbm9*, Chr. 6; ENSDARG00000021184) und *rbfox3* (Chr. 12, ENSDARG00000010083) bezeichnet.

Die Sequenz des Zebrafisch *a2bp1/rbfox1* Gens besitzt die größte Homologie zum humanen A2BP1 und wird im weiteren als Zebrafisch *a2bp1* bezeichnet. Das *a2bp1* Gen ist auf dem Zebrafischchromosom 3 lokalisiert. Es sind sechs Isoformen bekannt, von denen fünf proteinkodierend sind (Abb. 10) (www.ensembl.org; Zv9).

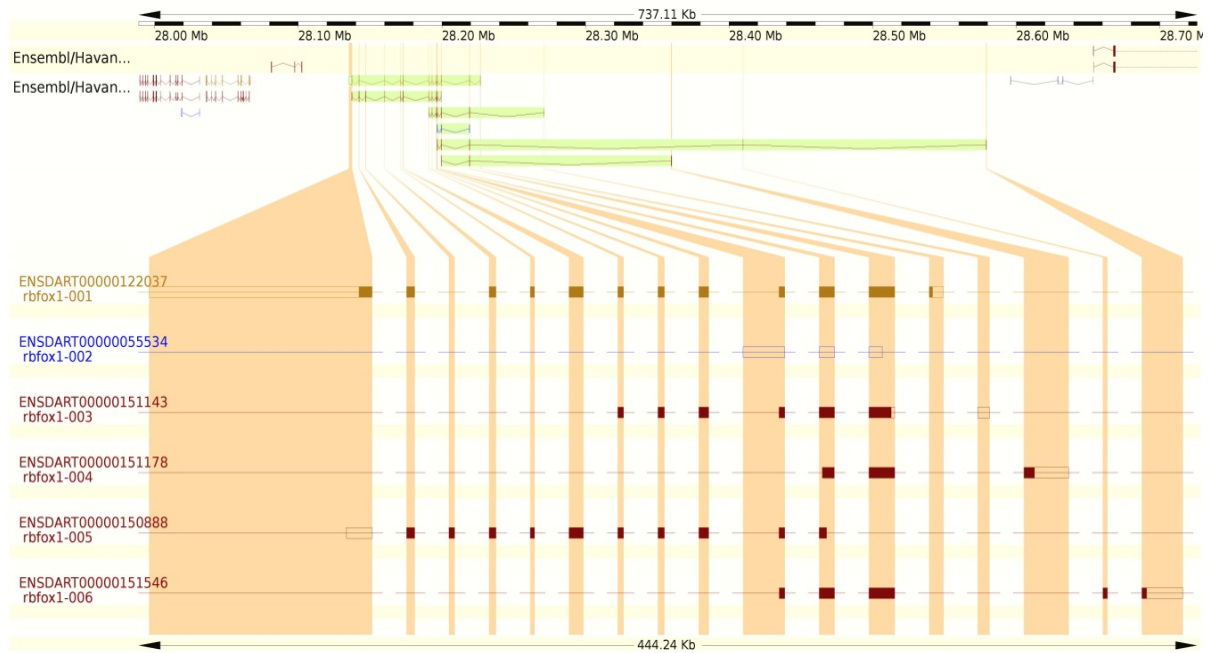


Abb. 10: Schematische Darstellung der mRNA-Spleißvarianten des A2BP1-Gens. Durch alternatives Spleißen von A2BP1 können sechs mRNA-Isoformen entstehen (<http://www.ensembl.org/>)

Um den Grad der Konservierung zwischen humanem *a2bp1* und dem zebrafischspezifischen Ortholog zu ermitteln, wurden die Proteinsequenzen mit Hilfe der Programme ClustalW und Boxshade analysiert. Humanes und Zebrafisch A2BP1 sind zu 84 % konserviert. Bei näherer Betrachtung der funktionellen RRM-Domäne wird deutlich, dass hier die Konservierung (98%) im Vergleich zum Gesamtprotein (84%) signifikant höher ist (Abb. 11).

human	MLASQGVLLH SY GVPMIVPAAPY LP GL IQ GNQEEAAAAPDTMAQPYASAQFAPPQNGIPAE
mouse	MLASQGVLLH SY GVPMIVPAAPY LP GL IQ GNQEEAAAAPDTMAQPYASAQFAPPQNGIPAE
zebrafish	----- VEEKCSKME ----- QGNQDAFA PE DTMAQ PE PSAQFAPPQNGIPAE
human	YTAPHPHPAPEYTGQTTVP EH TLNLYPP AQ THSEQ SP ADTSAQTVSGTATQTDAAAPT DG
mouse	YTAPHPHPAPEYTGQTTVP EH TLNLYPP IQ THSEQ SP ADTSAQTVSGTATQTDAAAPT DG
zebrafish	YT PS HPHP TP Y SG Q TP V A EHTLNLY TP AQTHSEQ SP SG PD NS IQ AVSGTATQTD SA QTD S
human	QPQTQPS ENT EN KS QPKRLHVSNI PF FRDPDLRQ MF GQFGKILDVEI IF NERGSKGF GF
mouse	QPQTQPS ENT ES KS QPKRLHVSNI PF FRDPDLRQ MF GQFGKILDVEI IF NERGSKGF GF
zebrafish	QQ Q TS SE TE IK IK QPKRLHVSNI PF FRDPDLRQ MF GQFGKILDVEI IF NERGSKGF GF
	RBD Domain
human	VTFENSADADRAREK LH GT VV EGRKIEVNNATARVMTNKKTVN PY TNGWKLNP VV GA VS
mouse	VTFENSADADRAREK LH GT VV EGRKIEVNNATARVMTNKKTVN PY TNGWKLNP VV GA VS
zebrafish	VT FE SSADADRAREK LH GT VV EGRKIEVNNATARVMTNKKTVN PY ANGWKLNP VV GA VS
human	PEFYAGTVLL CO AN Q EGSS MY SA PS SLVYTSAMP GF PYPAAT- AAA AYRGAHLRGRGR TV
mouse	P Y AGTVLL CO AN Q EGSS MY SA PS SLVYTSAMP GF PYPAAT- AAA AYRGAHLRGRGR TV
zebrafish	PEFYA----- V PGFPYPAAT AAA AYRGAHLRGRGR TV
human	YNTFRAA AP PP IP AYGGV VY Q EP VYGNKLL Q GGY AA RYA Q PT PA TAA AY SDSYGR VYA
mouse	YNTFRAA AP PP IP AYGGV VY Q EP VYGNKLL Q GGY AA RYA Q PT PA TAA AY SDSYGR VYA
zebrafish	YNTFRAA AP PP IP AYGGV VY Q GF Y G -AD Y GGY TA RY Y Q PT AT AA AYSDSYGR VYA
human	ADPYH H ALAP AT Y GV GAMNA FAP LTD AK TRSHADD VGL VL SSL Q AS I Y RG GY NR FAP Y
mouse	ADPYH H ALAP AT Y GV GAMNA FAP LTD AK TRSHADD VGL VL SSL Q AS I Y RG GY NR FAP Y
zebrafish	ADPY N HALAP AT Y SV GAMNA FAP LTD AK TRSHADD VGL VL SSL Q AS I Y RG GY S R FAP Y

Abb. 11: Sequenzalignment des A2BP1-Gens zwischen Mensch, Maus und Zebrafisch. Die Homologie zwischen Mensch und Zebrafisch beträgt 84 %. Schwarz unterlegte Bereiche geben konservierte Aminosäuren an, weiße nicht-konservierte und graue Boxen zeigen Aminosäuren mit ähnlichen chemischen Eigenschaften. Die RNA-bindende Domäne (RRM) ist blau markiert, hier beträgt die Sequenzähnlichkeit 98 %.

6.2 Expression von *a2bp1* in der Herz- und Skelettmuskulatur des Zebrafisches

Aus Untersuchungen in der Maus und im Menschen ist bekannt, dass *a2bp1* in Skelett- und Herzmuskelzellen exprimiert wird (Jin et al. 2003; Lieberman et al. 2001; Shibata et al. 2000; Underwood et al. 2005). Um die lokale Expression des Zebrafisch *a2bp1* Transkriptes zu evaluieren, wurde die *a2bp1* Expression mittels RNA antisense *in situ*-Hybridisierung an verschiedenen Entwicklungsstadien analysiert. Eine starke *a2bp1* Expression war erst ab 48 hpf detektierbar. Zu diesem Zeitpunkt ist das kardiovaskuläre System des Zebrafisches fast vollständig ausgebildet und die Embryonalentwicklung abgeschlossen. *a2bp1*-Transkripte wurden hochspezifisch im Kopfbereich, Skelett- und Herzmuskelzellen nachgewiesen (Abb. 12A-B).



Abb. 12: Das *a2bp1*-Gen zeigt eine Expression im Kopfbereich, in der Herz- und der Skelettmuskulatur. (A) In der lateralen Ansicht eines Wildtyp-Embryos bei 72 hpf wird *a2bp1* im Kopf, Herz- und Skelettmuskulatur exprimiert. (B) In der ventralen Ansicht ist sichtbar, dass *a2bp1* bei 48 hpf im gesamten Herzen exprimiert wird.

6.3 Der Funktionsverlust von A2BP1 führt im Zebrafisch zu einer progradienten Herzinsuffizienz

Um die funktionelle und strukturelle Rolle von *a2bp1* *in vivo* zu charakterisieren, wurde ein *reverse genetics* Ansatz gewählt, in dem das *a2bp1*-Gen durch Injektion von modifizierten antisense-Oligonukleotiden (Morpholinos, MO) inaktiviert wurde. Die Morpholinos waren gegen den translationalen Start der *za2bp1* mRNA (MO1) oder gegen die Spleißdonorstelle von Intron 5/Exon 6 (MO2) gerichtet und wurden in das Ein-Zell-Stadium von Wildtyp Zebrafischembryonen injiziert (Abb. 13).

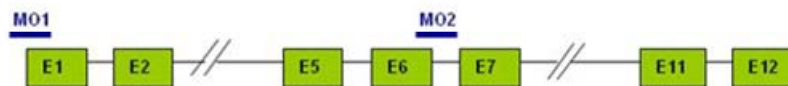


Abb. 13: Ziel-Region der *a2bp1*-Morpholinos. Graphische Darstellung der Ziel-Regionen

Nach Injektion des gegen die Spleißdonorstelle gerichtete Morpholino ($n = 100$) entwickelten 72 % der Embryonen einen kardialen Phänotyp. Das injizierte Morpholino war gegen den translationalen Start gerichtet und zeigte bei 85 % ($n = 159$) der Embryonen einen identischen Phänotyp (Abb. 13A-B). Im Vergleich dazu führte die Injektion mit einem Kontroll-Morpholino (*MO-control*) in gleicher Konzentration zu keinen offensichtlichen morphologischen oder funktionellen Anomalien (Abb. 14A). Um die Wirkung des Spleiß-Morpholinos zu validieren wurde eine cDNA *splice-site* Analyse durchgeführt. Die Blockierung der Spleißdonorstelle von Exon 6 führt zu einem vollständigen Verlust von Exon 6. Aufgrund der höheren Effizienz des Start-

Morpholinos wurden alle nachfolgenden Experimente mit diesem Morpholino durchgeführt.

In den ersten 24 Stunden nach der Befruchtung (hpf) zeigen MO1-injizierten Embryonen keinerlei Auffälligkeiten im Vergleich zu MO-*control* injizierten Zebrafischen. Zu diesem Entwicklungszeitpunkt lassen sich bereits die ersten peristaltischen Kontraktionen des Herzschlauches beobachten. Erste Manifestationen einer Herzinsuffizienz zeigen die MO1-injizierten Embryonen (MO-*a2bp1*) zwischen 42 – 48 hpf. Ab 48 hpf entwickeln diese ein dilatiertes Atrium und eine stark eingeschränkte Blutzirkulation, begleitet von einem stark ausgeprägten Perikardödem und einer verminderten kontraktile Funktion des Ventrikels (Abb. 14B). Zudem zeigen einige der *a2bp1*-defizienten Embryonen Malformationen der Hirnstrukturen. Es konnte kein definierter Vorder- und Mittelhirn Bereich beobachtet werden. Allerdings wurden die beobachteten entwicklungsbezogenen neuronalen Schäden in dieser Arbeit nicht weiter charakterisiert

Im weiteren Entwicklungsverlauf nimmt die Dilatation des Atriums zu und die Kontraktilität beider Kammer ab, bis es bei 120 hpf oft zum vollständigen Herz-Kreislauf Versagen kommt. Die progressive Herzinsuffizienz von MO-*a2bp1* injizierten Zebrafischembryonen wurde durch die Messung der Verkürzungsfraction (fractional shortening, FS) quantifiziert (Abb. 14C-D). Die fraktionelle Verkürzung ist ein einfaches Maß für die Pumpfunktion des Herzens und errechnet sich aus $FS (\%) = [(enddiastolischer \text{ Durchmesser} - endsystolischer \text{ Durchmesser}) / enddiastolischer \text{ Durchmesser}] \times 100$ und wird in Prozent angegeben. Die Kontraktilität der *a2bp1*-defizienten Embryonen nahm schrittweise von $28 \pm 3,2 \%$ (48 hpf) bis $18 \pm 3,9 \%$ (72 hpf) ab. Bei 96 hpf konnte nur eine sehr geringe Kontraktilität gemessen werden (Abb. 14D).

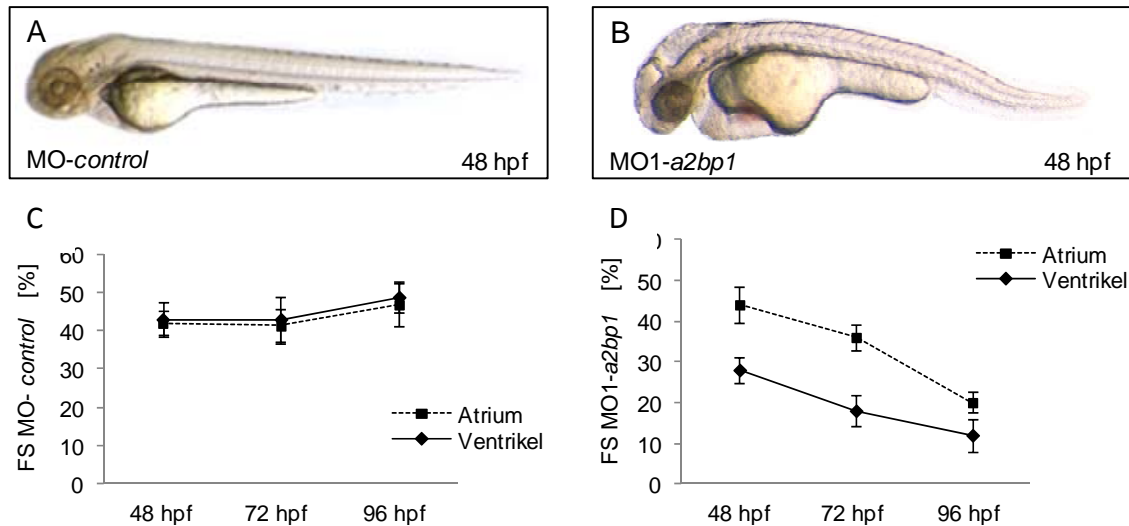


Abb. 14: *a2bp1*-knockdown führt zu Herzinsuffizienz im Zebrafisch. Laterale Ansicht eines MO-control (A) und MO-*a2bp1* (B) injizierten Zebrafisches bei 48 hpf. Die Injektion des *a2bp1* Morpholinos induziert eine starke Dilatation des Atriums sowie ein deutliches Hirn- und Perikardödem. (C-D) Die Messung der Verkürzungsfraction *a2bp1*-defizienter Embryonen zeigte, dass die Kontraktilität des Ventrikels in den ersten drei Tagen der Entwicklung abnimmt.

Um zu untersuchen, ob der beobachtete Phänotyp auf einem morphologischen Defekt beruht, wurde die Struktur der Herzen histologisch und ultrastrukturell untersucht. Hierfür wurden transversale Paraffinschnitte von MO1-*a2bp1* und MO-control injizierten Embryonen angefertigt. Der histologische Befund zeigte, dass die endokardialen und myokardialen Schichten der Kammern MO1 injizierter Embryonen normal entwickelt waren. Diese bildeten einen mehrschichtigen Ventrikel und ein einschichtiges Atrium aus und wiesen keinerlei Unterschiede zu den MO-control injizierten Embryonen auf. Zudem zeigte die histologische Analyse, dass die Herzkammern *a2bp1*-defizienter Embryonen klar definiert sind und durch einem atrio-ventrikulären Ring (Abb. 15B) voneinander getrennt werden. Gelegentlich wurden auch *a2bp1*-defiziente Embryonen mit einer Fehlbildungen des atrio-ventrikulären Kanals (AV) beobachtet, vermutlich aufgrund der ausgeprägten Dilatation des Atriums.

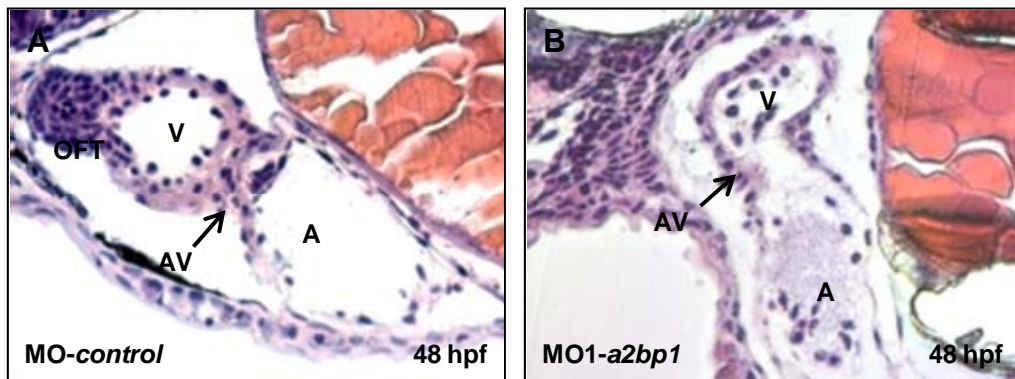


Abb. 15: Die *a2bp1*-Inaktivierung hat keinen Einfluss auf die strukturelle Herzentwicklung. Die MO-*a2bp1* (B) und MO-control (A) injizierten Embryonen zeigten eine deutliche Differenzierung und Abgrenzung von Atrium (A) und Ventrikel (V) durch den atrio-ventrikulären Ring (AV). Es werden Endokard- und Myokardzellschichten ausgebildet.

Auf molekularer Ebene zeigten die *a2bp1*-defizienten Embryonen normal entwickelte Herzkammern. Die Kammerspezifizierung wurde mit Hilfe spezifischer Antikörper untersucht. Der MF20 Antikörper detektiert eine Myosin-Schwer-Kette in Atrium und Ventrikel, wohingegen der S46 Antikörper nur die Myosine im Atrium markiert (Abb. 16). Die Kammerspezifizierung wurde vom Knockdown des Spleißfaktors A2BP1 nicht beeinträchtigt.

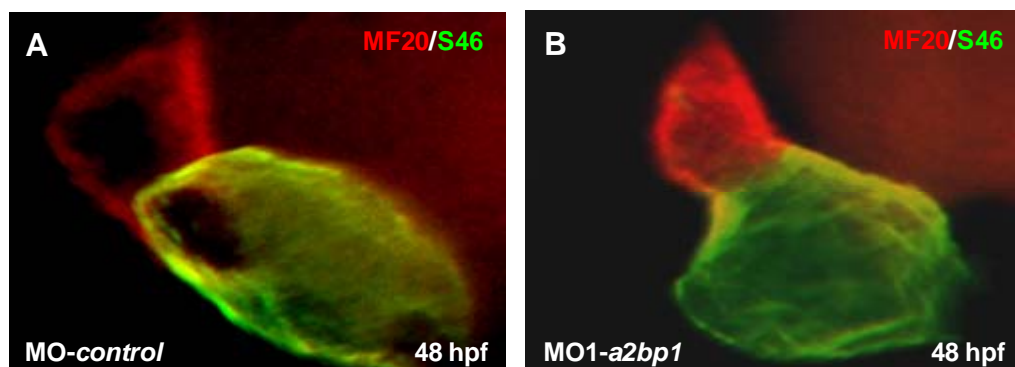


Abb. 16: Die molekulare Kammerdifferenzierung ist in *a2bp1*-defizienten Embryonen nicht verändert. Die MO-control (A) und MO-*a2bp1* (B) injizierten Embryonen zeigten keine Unterschiede in der Expression verschiedener Myosin-Schwere-Ketten. Der MF20 Antikörper erkennt die Myosin-Schwere-Ketten in beiden Kammern (rot) und S46 nur die atrialspezifischen Myosin-Schwere-Ketten (grün).

Darüber hinaus ergab eine ultrastrukturelle Untersuchung mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) offensichtlich normal entwickelte Sarkomere in der Herz- und Skelettmuskulatur (Abb. 17). Die Sarkomere in beiden Zelltypen waren in den Knockdown Embryonen nicht von den MO-control injizierten Embryonen zu unterscheiden. Die Sarkomere zeigten bei 48 Stunden alten Embryonen

zu beiden Seiten deutlich von den Z-Scheiben abgegrenzte, hochorganisierte, parallel angeordnete dicke und dünne Filamente.

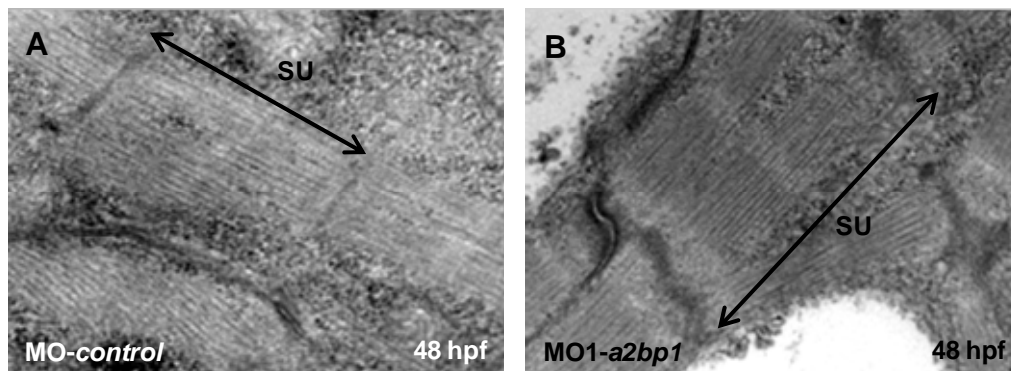


Abb. 17: Die Skelettmuskulatur Sarkomerogenese ist in $\alpha 2bp1$ -defizienten Embryonen nicht gestört. Die Sarkomerstruktur der 48 hpf MO- $\alpha 2bp1$ injizierten Embryonen zeigte im Vergleich zu MO-control Fischen keine Anomalitäten. Die Sarkomere in der Skelett- und Herzmuskulatur zeigten parallel angeordnete Myosine und Aktine, sowie eine große Zahl an reifen Sarkomeren, welche durch die Z-Scheiben abgegrenzt waren. SU= sarcomeric unit

Zusammenfassend waren keine strukturellen Entwicklungsstörungen erkennbar, die die Entwicklung einer Herzinsuffizienz in $\alpha 2bp1$ -defizienten Embryonen erklären könnten. Dies deutet darauf hin, dass der beobachtete Phänotyp eher auf einem funktionellen Defekt als auf strukturellen Anomalien beruht.

Da es sich bei $\alpha 2bp1$ um einen Spleißfaktor handelt wurde als nächstes untersucht, wie das globale Spleißmuster in Zebrafischembryonen, insbesondere im Herzen, aussieht. Des Weiteren wurde untersucht, ob und in wie weit sich dieses globale Spleißmuster nach A2BP1-Depletion in den Zebrafisch-Embryonen verändert. Hierfür wurde zuerst das gesamte Transkriptom von Zebrafisch Embryonen mit Hochdurchsatz-Sequenzierung (RNA-Seq) analysiert.

6.4 Genomweite Transkriptom-Profil-Analyse im Zebrafisch

Mit der NGS-Transkriptomanalyse können Prozesse wie Genexpression, Isoform diversität, allelspezifische Expression und RNA-Editing analysiert werden (Karen S. Frese 2013). Insbesondere lassen sich gezielt diejenigen Bereiche des Genoms erfassen, die funktionell wichtig sind und somit Aussagen über die Genaktivität und deren Regulation in verschiedenen Entwicklungsstadien und Geweben eines Organismus gewinnen.

In dieser Arbeit wurde das Zebrafisch-Transkriptom mittels RNA-Sequenzierung untersucht und das *a2bp1*-vermittelte Spleißen näher analysiert.

6.4.1 Analyse der Genexpression im Zebrafisch mittels RNA-Sequenzierung

Zur Transkriptom-Sequenzierung wurde die Gesamt-RNA aus 2-Tage alten Zebrafischen (n=70) und explantierte Zebrafischherzen (n=400) isoliert und für die Herstellung der Sequenzier-Bibliotheken verwendet (siehe Methodenteil Kapitel 5.4.1). Zur Auswertung der gelesenen Sequenzen, wurde der sogenannte „*read count*“ Ansatz verwendet um über Häufigkeit der gelesenen Transskripte deren Expressionsgrad zu bestimmen. Die Sequenzcluster wurden schließlich entsprechend ihrer Häufigkeit („*read counts*“) sortiert (Abb. 18). Wie erwartet konnte mittels NGS die Expression herzspezifischer Gene identifiziert werden (Abb. 18A, rote Markierung). Insgesamt wurden 9099 Transkripteinheiten entdeckt, die eine differentielle Transkriptexpression in Zebrafischherzen (rote Markierung) im Vergleich zu dem Gesamtembryogewebe (blaue Markierung) zeigten (Abb. 18A). Nach einem hierarchischen Clustering (Abb.18B-C), konnten verschiedene Cluster identifiziert werden. Cluster 33 z.B. zeigt eine Teilmenge an Genen die vor allem im Zebrafischembryo exprimiert sind (Abb. 18B). Darunter sind Gene vertreten, die in der Muskulatur, den Somiten, und im ZNS exprimiert werden, wie z.B. *tpm3*, *vdac2*, *glulb* und *ywhab1* (Abb.18B). Dagegen wurden im Cluster 93 z.B. Gene gefunden, die vor allem kardial exprimiert werden und an der Herzfunktion beteiligt sind (Abb. 18C). Die Gene Tropomyosin 4 (*trop4*), Myosin-Leichte-Kette-7 (*myl7*), kardiale Myosin-leichte-Kette-1 (*cmlc1*) waren in den Herzen höher exprimiert. Die Ergebnisse der hier durchgeführten RNA-Sequenzierung verdeutlichen die Spezifität und Sensitivität der RNA-Seq. als neue Methode zur gewebespezifischen Transkriptom-Analyse im Zebrafisch.

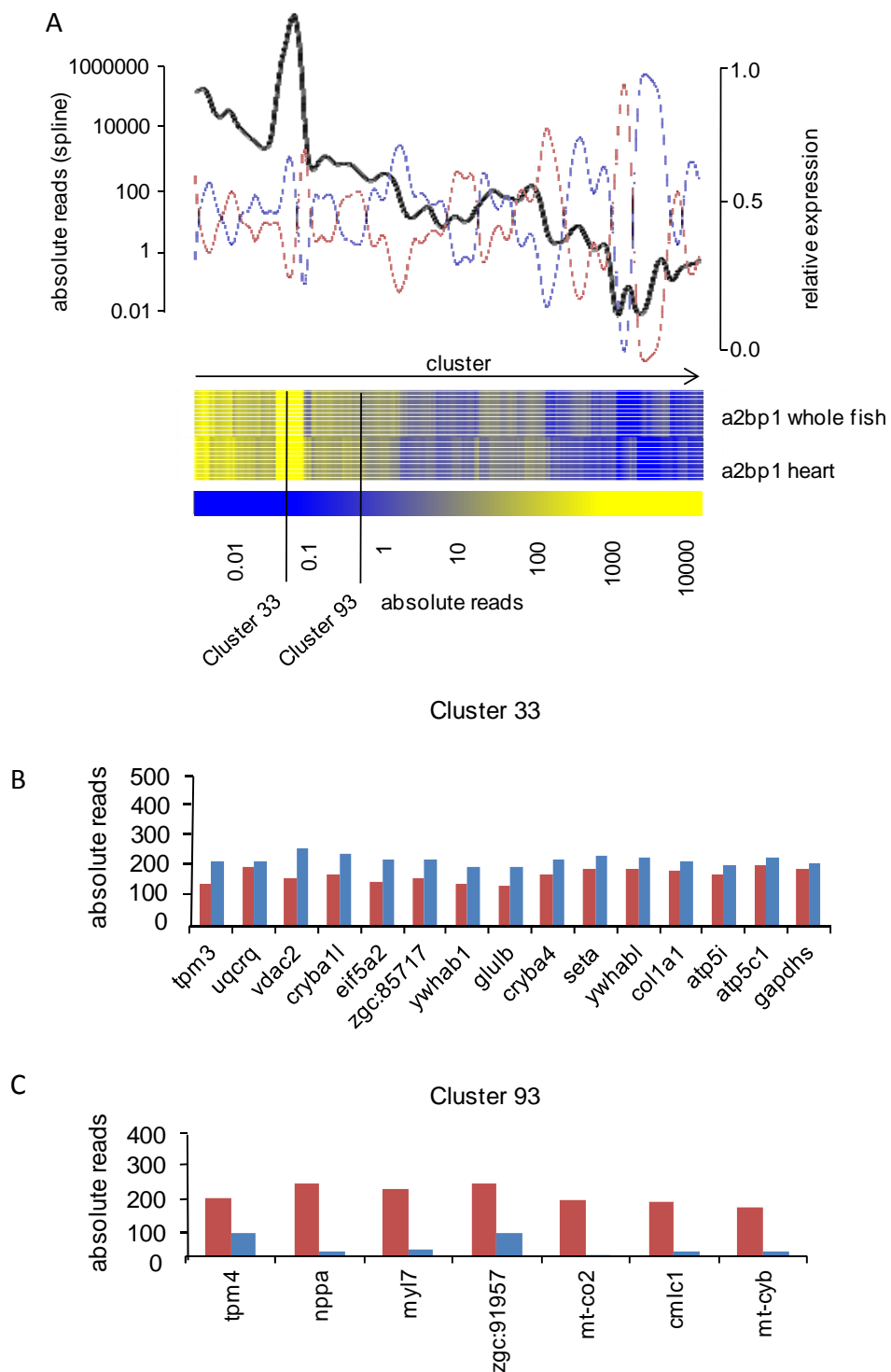
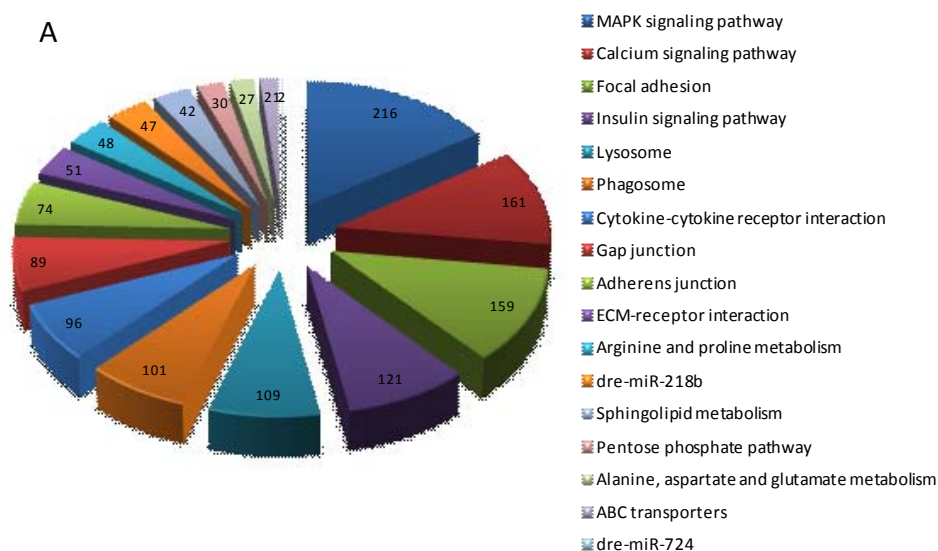


Abb. 18: Bestimmung des genomweiten Transkriptoms. (A) Schematische Darstellung der absoluten *reads* und relative Expression der identifizierten Transkripte aus Herz- (rote Linie), Gesamtembryogewebe (blaue Linie) und der insgesamt identifizierten Transkripte (schwarze Linie). (B-C) Nach hierarchischem Clustering konnten Profildaten in jeweils verschiedene Cluster getrennt werden. Die Cluster 33 und 93 zeigen exemplarisch Gene die im Herzgewebe (rote Balken) oder in ganzen Embryonen (blaue Balken) höher exprimiert gefunden wurden. Die Genbezeichnungen sind im Abkürzungsverzeichnis aufgeführt.

Aus diesen Analysen ist ein direkter Vergleich der Expressionslevel eines festgelegten Transkripts in beiden Geweben möglich. Dieser Ansatz ist aber weniger geeignet, um die hier vorgestellten, sehr komplexen Datensätze überschaubar zu vergleichen. Um dies zu erreichen, wurden die Transkripte, die als spezifisch für jeweils eines der beiden untersuchten Gewebe identifiziert wurden, näher betrachtet. Mittels einer *gen set enrichment analyse* (GSEA) wurde untersucht für welche molekularen Funktionen (z.B. Stoffwechselweg oder Bioprozess) auffällig viele oder wenige Transkripte im Herzwewebe im Vergleich zum Gesamtfischgewebe gefunden wurden (siehe Methodenteil 5.4.6). Hierbei wurde der Annotationsdatensatz der „Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes“ (KEGG), Transfac und miRNA eingesetzt.

Die Abbildung 19A zeigt dass Transkripte die im MAPK *signaling pathway* (Regulation der MAPK Aktivität), *calcium and insulin signaling pathway* (Kalzium- und Insulin-Signalweg), *focal adhesion* (Zell-Adhäsion), im Herzwewebe signifikant überrepräsentiert sind. Dagegen sind Transkripte des metabolischen Signalweges (*metabolic pathway*), die dre-miR200a, Zellzyklus (*cell cycle*) und einige Mitglieder der miRNA-let7- Familie im Herzwewebe weniger stark exprimiert (Abb. 19B).



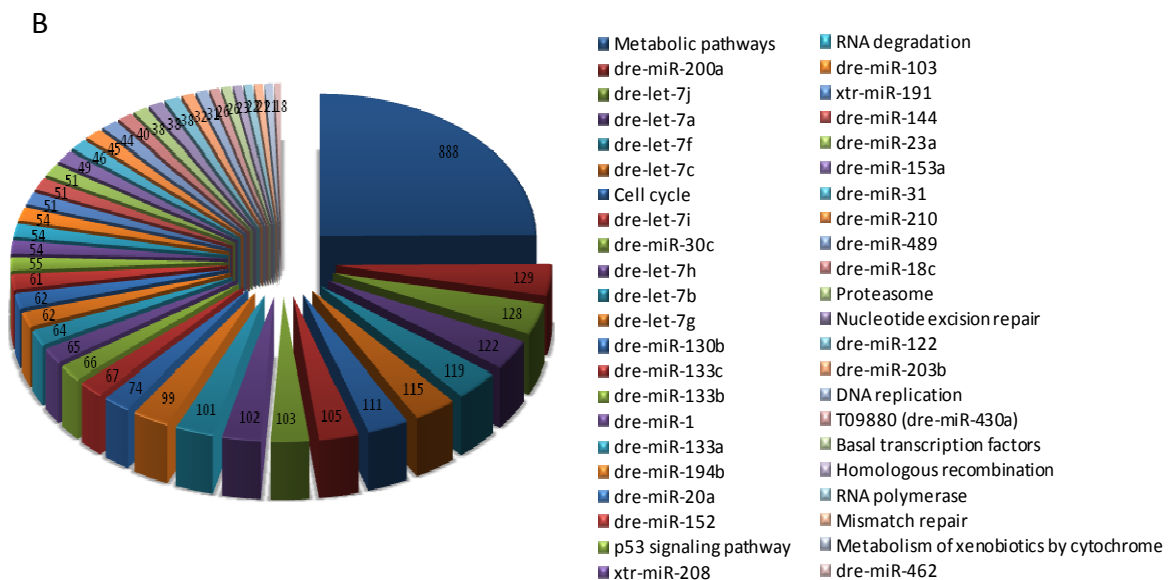


Abb. 19: Gengruppen Anreicherungsanalyse. Die Abbildung 19A gibt einen Überblick über die funktionellen Analyse der hochregulierten Transkripte im Herzgewebe ($p < 0,01$). Abbildung 19B zeigt dagegen die Transkripte die im Herzgewebe weniger stark exprimiert sind.

6.4.2 Identifikation neuer Transkript-Varianten durch RNA-Sequenzierung

Zur Identifikation von Transkript-Varianten und um einen Überblick über die Vielfalt des Transkriptom im Zebrafisch und insbesondere im Zebrafischherzen zu bekommen, wurden alle Sequenzier *reads* welche Exon-Exon-Übergänge repräsentieren analysiert. Dies hat den Nachteil, dass zwar die Frequenz des Auftretens des Exons in den Transkriptvarianten eines Genes geschätzt werden kann, aber Anhand der Abdeckung eines Exons kann keine Aussage getroffen werden, welches die benachbarten Exone im Transkript sind. Daher wurden verschiedene Exonkombinationen eines Transkripts untersucht (Methodenteil Kapitel 5.4.5). Zur Analyse der differentiellen Regulation und zur Identifizierung der häufigsten Transkript-Varianten wurde die Anzahl der „*reads*“ pro Referenzgen RPKM- (reads pro Kilobase Transkript pro Millionen, RPKM) normalisiert (Methodenteil Kapitel 5.4). Dadurch kann sich das Ranking von Genen nach ihrer Expressionsstärke im Vergleich zu den absoluten „*read counts*“ verschieben. Die Verschiebung ist insgesamt jedoch marginal. Durch „*splice-junction mapping*“ wurden in den Proben aus Zebrafischgewebe 86 % der Transkripte mit nur einer Isoform, 11 % mit zwei Isoformen, und 4 % mit drei oder mehr Isoformen gefunden (Abb. 20). Interessanterweise, ergab ein Vergleich der Gewebelbibliotheken aus Gesamt-Zebrafisch und Zebrafischherz, dass sich die Transkriptvielfalt der beiden Proben kaum unterscheiden.

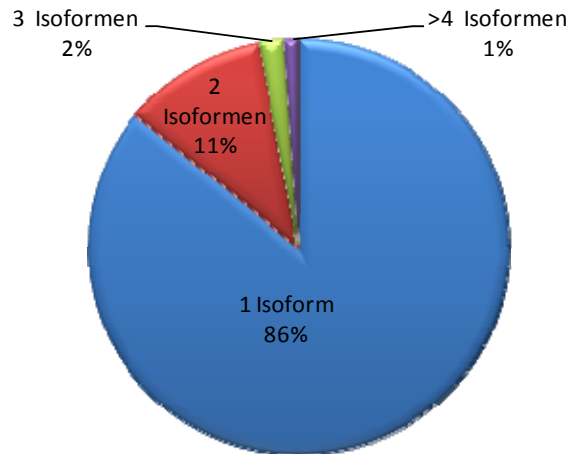


Abb. 20: Isoform-Charakterisierung in Zebrafischembryonen. Es wurden Transkriptvarianten mit einer (86 %), mit zwei (11 %), mit drei (2 %) und mit vier oder mehr (1 %) Isoformen detektiert.

Neben der Genexpression und Transkriptom-Analyse wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal die *a2bp1*-vermittelte Spleißdynamik im Zebrafisch mittels RNA-seq analysiert. Dabei wurden Veränderungen im alternativen Spleißen in *a2bp1* KD Embryonen im Einzel-Exon-Skipping-Modus untersucht.

Die Analyse offenbarte eine große Anzahl an Transkriptvarianten in *a2bp1*-defizienten Zebrafischembryonen. Insgesamt wurden 20 herzspezifische Spleißvarianten identifiziert (Tab. 5). Unter den identifizierten herzspezifischen Spleißvarianten, waren auch Gene zu finden, die bisher nicht als kardial relevant bekannt waren (blau unterlegt).

Tabelle 5: Identifizierte Transkript-Varianten in *a2bp1*-defiziente Zebrafischembryonen.

Gen ID	Exon	Genabkürzung und Genbezeichnung
ENSDART00000056080	19_20_21	<i>sulf1</i> , extracellular sulfatase 1
ENSDART00000104458	2_3_4	<i>alpi</i> , intestinal-type alkaline phosphatase *
ENSDART00000016183	2_3_4	<i>huG</i> , ELAV-like protein 1
ENSDART00000040538	16_17_18	<i>add3a</i> , gamma-adducin
ENSDART00000005682	5_6_7	<i>actn3a</i> , actinin alpha 3a *
ENSDART00000025120	13_14_15	<i>tmem48</i> , Nucleoporin NDC1 *
ENSDART00000060883	4_5_6	<i>ppih</i> , peptidyl-prolyl cis-trans isomerase H isoform 2
ENSDART00000008807	5_6_7	<i>rpl12</i> , ribosomal protein L12
ENSDART00000041447	24_25_26	<i>ktn1</i> , kinectin *
ENSDART00000007555	3_4_5	<i>ctsl</i> , cathepsin L, like *
ENSDART00000022941	9_10_11	<i>tcp1</i> , T-complex protein 1 subunit alpha
ENSDART00000016780	10_11_12	<i>gspt1l</i> , G1 to S phase transition 1, like
ENSDART00000033825	12_13_14	<i>ppp1r12a</i> , Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A

ENSDART00000111409	6_7_8	<i>tbc1d5</i> , TBC1 domain family member 5
ENSDART00000029992	3_4_5	ptpla , protein tyrosine phosphatase-like
ENSDART00000102562	4_5_6	<i>ankrd10b</i> , ankyrin repeat domain 10b
ENSDART00000018545	13_14_15	<i>map3k7</i> , mitogen-activated protein kinase kinase kinase
ENSDART00000110711	2_3_4	<i>mibp</i> , muscle-specific beta 1 integrin binding protein *
ENSDART00000006619	4_5_6	<i>rbpms2</i> , RNA binding protein with multiple splicing 2
ENSDART00000105518	13_14_15	<i>camk2g1</i> , calcium/calmodulin-dependent protein kinase

6.4.3 Validierung von aberranten Spleißmustern in einem *a2bp1*-defizienten Hintergrund und Ermittlung ihrer biologischen Funktion

Die RNA-Seq. Ergebnisse lieferten komplett neue Einblicke in die Transkriptomvielfalt des Herzens und deren Beeinflussung durch Deaktivierung von *a2bp1*. Zur Validierung der RNA-Seq Daten, wurde eine Reihe von differenziell gespleißten Transkripten mittels quantitativer RT-PCR analysiert (siehe Methodenteil 5.2.7). Die Quantifizierung erfolgte unter Verwendung von zwei qPCR Strategien, die im Methodenteil 5.4.7 detailliert beschrieben sind.

Das Spleißmuster von 20 herzspezifischen Spleißvarianten wurde in 2 Tage alten MO-*a2bp1* und MO-*control* injizierten Embryonen analysiert und verglichen. In fünf Genen, *huG*, *actn3a*, *ptpla*, *camk2g* und *ktn1*, konnte ein verändertes Spleißverhalten nach *a2bp1*-Depletion nachgewiesen werden. Die Abbildungen 21-23 zeigen 5 qPCR Validierungen mit Einzel-Exon-Skipping Spleiß-Modus.

Im Falle des *huG*-Transkripts wurden in den untersuchten Geweben von *a2bp1*-Knockdownfischen und Kontrollen verschiedene Transkriptvarianten gefunden. Die längeren Transkripte kamen ausschließlich in den Herzproben vor, während die um Exon 3 verkürzte Isoform überwiegend in dem Material aus ganzen Zebrafischen (*whole fish*) auftraten. In den Herzgewebeproben der *a2bp1-knockdown* Embryonen (Abb. 21B) wurde ein Anstieg der Expression des alternativ gespleißten Exon 3 um das 1,5-fache detektiert. Im Gegensatz dazu wurde in den *whole fish* Proben eine Abnahme dieser Isoform (Abb. 21A) beobachtet (0,80).

Ein ähnliches Bild zeigte sich für das Gen *actn3a*. In Herzzellen der *a2bp1*-defizienten Zebrafische wurden Exon-6-haltige Transkripte um den Faktor 1,6 häufiger detektiert als in den MO-*control* injizierten Embryonen (Abb. 21D). Demgegenüber zeigte die

Analyse ganzer Embryonen, dass diese längere Isoform seltener auftrat als im Herzgewebe (Abb. 21C).

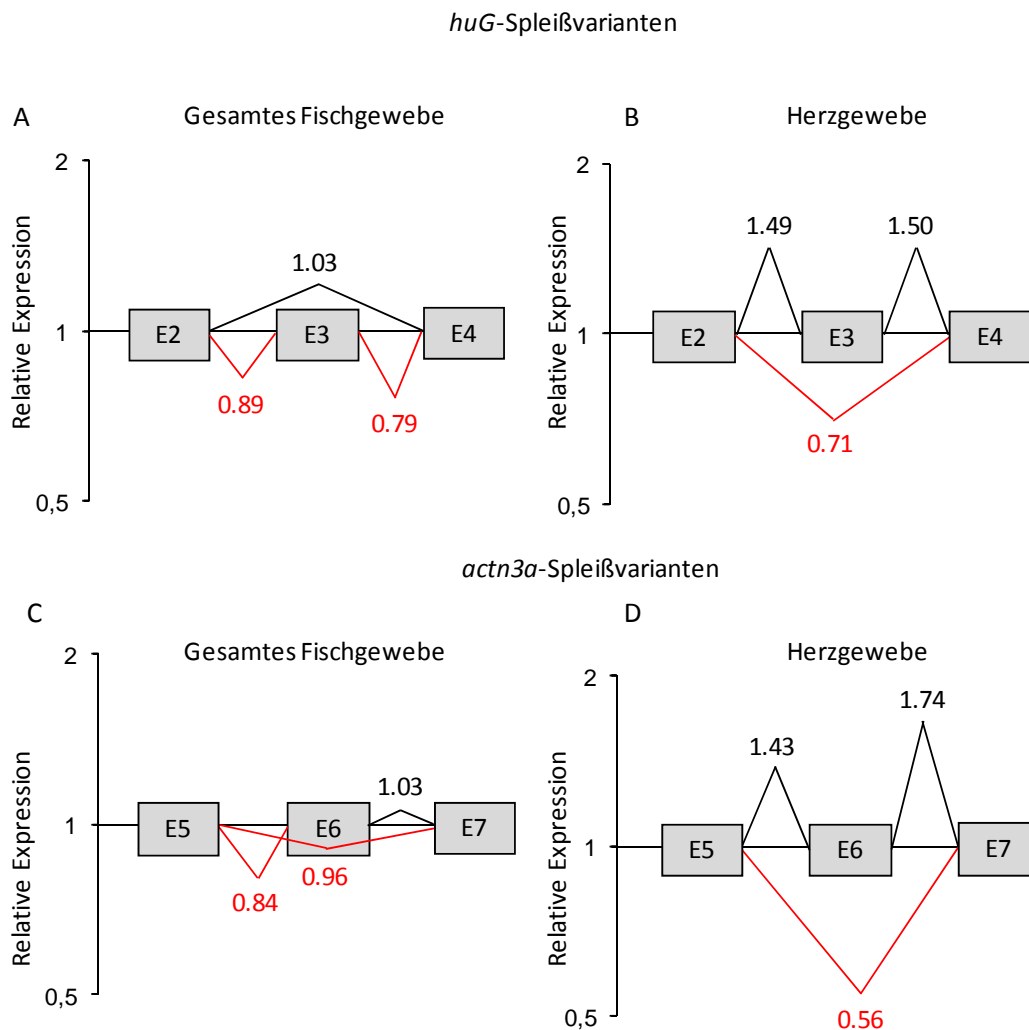


Abb. 21: Darstellung der durch qPCR identifizierte Spleißschemata des *huG*- und *actn3a*-Gens nach *a2bp1*-Inaktivierung. Exone sind in grau dargestellt. Die Expressionsanalyse der alternativ gespleißten *huG*-Isoformen zeigt eine verstärkte Intergration von Exon 3 in Herzzellen. Die Expressionsanalyse der *actn3a*-Transkripte zeigte eine häufigere Expression einer Exon 6-haltigen-Isoform im Herzgewebe, während in ganzen Fischen ein Spleißunterschied kaum zu erkennen war.

Weitere Unterschiede zwischen *a2bp1*-KD und Kontrolle lassen sich bei den Genen *ptpla* und *ktn1* finden. Dabei sah das alternative Exon-Verwendungsmuster der beiden Gene relativ ähnlich aus. Es war eine deutliche Veränderung des Verhältnisses von langen und kurzen Isoformen nach dem *a2bp1*-Knockdown, vor allem im Herzen erkennbar. Nach der *a2bp1* Inaktivierung wurde in Herzzellen eine *ptpla*-Exon 4-enthaltende Isoform seltener detektiert als in den MO-control Fische (Abb. 22B). Diese Isoform wurde bei der Analyse mit Material aus ganzen Embryonen entsprechend hochreguliert gefunden (4-fach). Die qPCR Spleißmuster-Analyse des *ktn1* (kinectin

1/kinesin Rezeptor) ergab eine reduzierte Expression der kurzen Transkriptform in den Zebrafischherzen (Abb. 22D). Im Gegensatz dazu zeigte die Isoform-Analyse in ganzen Embryonen keinen Unterschied in der Exon-Verwendung zwischen *MO-a2bp1* und *MO-control* injizierten Embryonen.

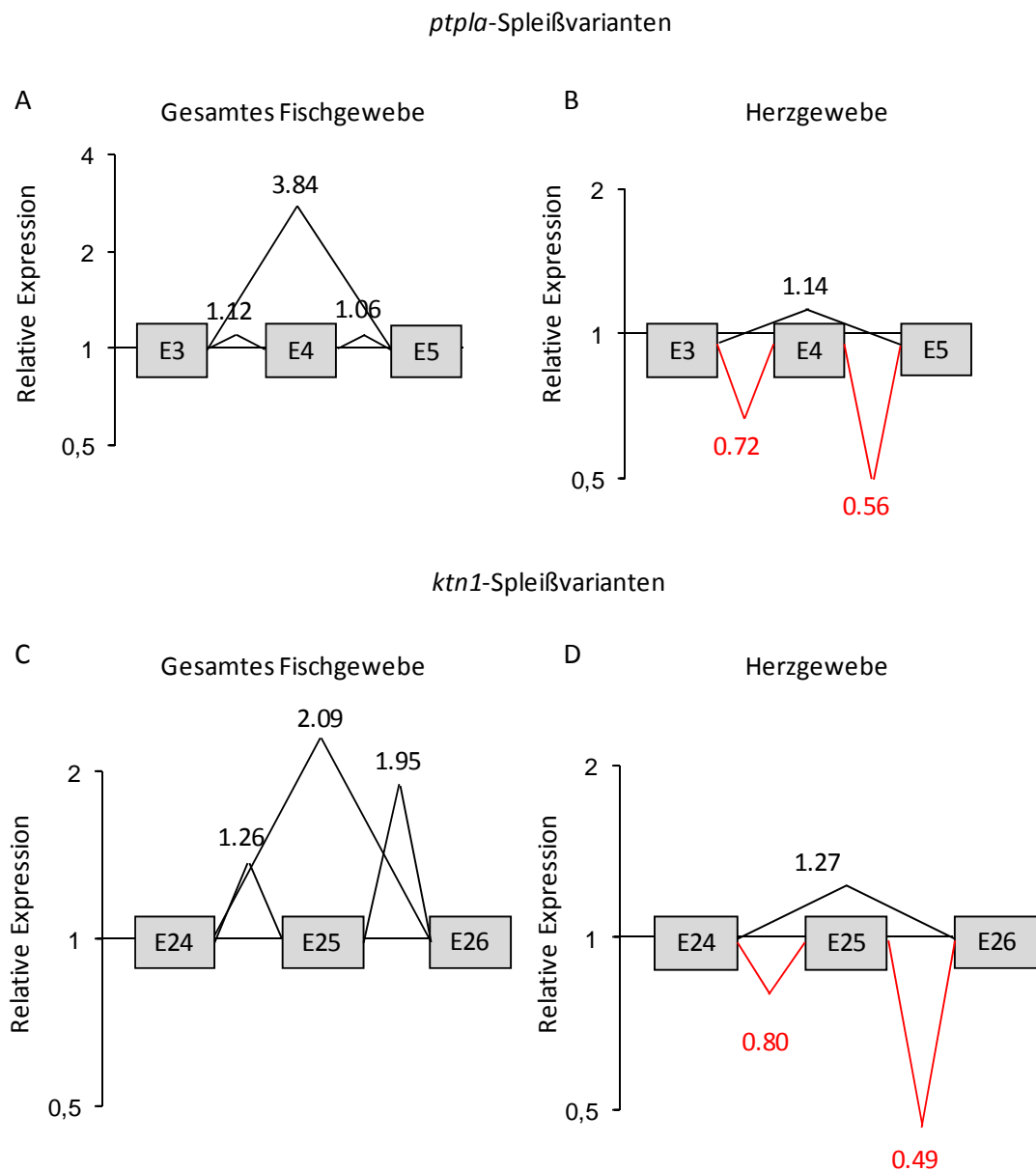


Abb. 22: Darstellung der durch qPCR identifizierte Spleißschemata der Gene *ptpla* und *ktn1* nach *a2bp1*-Inaktivierung. Exone sind in grau dargestellt. Die Expressionsanalyse der *ktn1*- (A-B) und *ptpla*- (C-D) Isoformen zeigte, dass es in Herzzellen seltener zur Integration des alternativ gespleißten Exons kommt.

Auch für das Gen *camk2g1* konnte ein Spleißunterschied nach *a2bp1*-Inaktivierung nachgewiesen werden. Allerdings zeigt der Vergleich zwischen *a2bp1*-KD und Kontrolle in Herzproben und *whole fish* Proben nur geringfügige Unterschiede. In *a2bp1*-Defizienten Zebrafischherzen kommt es zu einer 0,63-fach geringeren Integration des

AS-Exon 14 im Vergleich zu *MO-control* injizierten Herzen (Abb. 23B). In ganzen Embryonen wurde dagegen eine verminderte Integration für das gesamte Exon Triplet-Set (Abb. 23A) beobachtet, was auf eine mögliche Einschränkung der hier verwendeten „Exon-Triplett-Strategie“ hindeutet, da auch andere Spleißmuster vorliegen können die mit der angewandte Methode nicht eindeutig klassifiziert werden können.

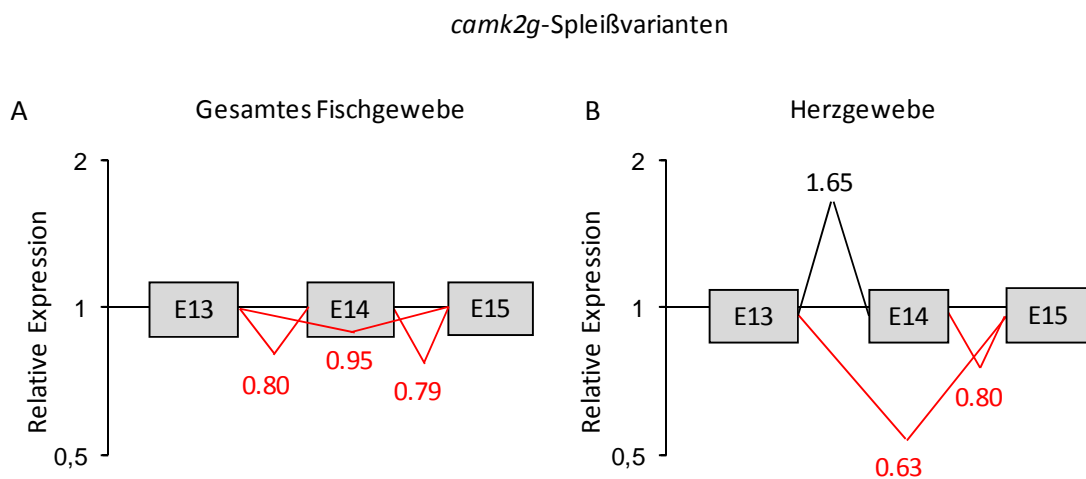


Abb. 23: Schematische Darstellung der durch qPCR identifizierte *camk2g*-Isoformen nach *a2bp1*-Inaktivierung. Exone sind in grau dargestellt. Die Expressionsanalyse der alternativ gespleißten *camk2g*-Isoformen zeigt eine reduzierte Integration der Exon 14 in den Herzproben.

6.4.4 Funktionelle Analyse der validierten aberrant-gespleißten Transkripte

Um den funktionellen Effekt der identifizierten und validierten aberrant gespleißten Transkripte zu untersuchen wurde als nächstes ein *reverse* genetischer Ansatz gewählt, der Spleiß-Ereignisse *in vivo* nachstellt. Die Morpholinos waren gegen den Exon-Intron-Übergang des alternativ gespleißten Exons gerichtet, wodurch selektiv das Herausspleißen unterdrückt wurde. Diese Morpholinos wurden in das Ein-Zell-Stadium von Wildtyp Embryonen injiziert. Als Kontrolle wurde ein Standard Kontroll Morpholino (*MO-control*) injiziert.

Unter den Untersuchten Genen sind wie in Abb. 24 dargestellt, ER-assoziierte Proteine wie die Kinasen *ptpla* und *camk2g1* und das *ktn1*, sowie Sarkomer-assoziierte Proteine wie das *actn3a* und letztlich das *huG* Gen welches bei der RNA-Prozessierung eine wichtige Rolle spielt.

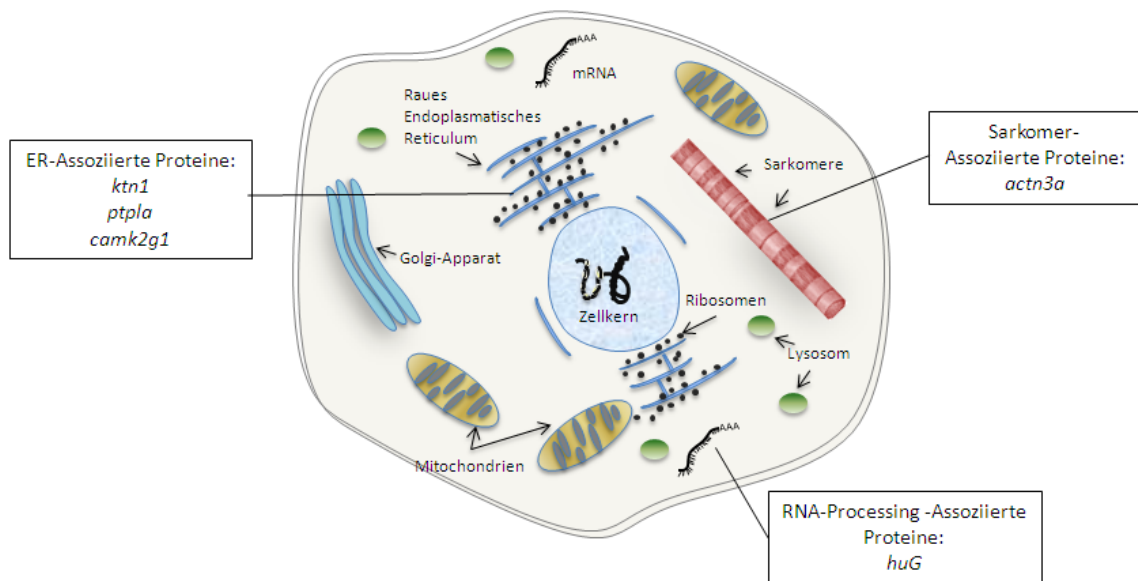


Abb. 24: Schematische Darstellung der zellulären Lokalisation der untersuchten *a2bp1*-Ziel-Gene .

Die Induktion von aberranten Spleißmustern der fünf Gene erzeugte jeweils einen robusten kardialen Phänotyp mit sukzessiver Einschränkung der kardialen Kontraktilität. Interessanterweise zeigten die ER-assoziierte Proteine *ptpla*, *camk2g1* und *ktn1* den stärksten Kontraktilitätsverlust (Abb. 25).

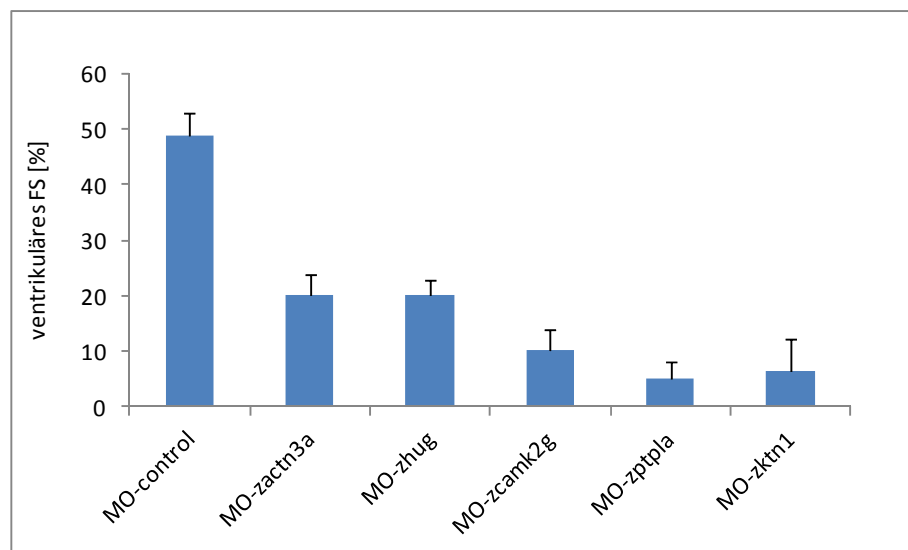


Abb. 25: Einfluss abnormer Isoformsimulation auf die systolische Herzkraft bei 96 hpf.

In Detail führte der *camk2g1*-Knockdown zwei Tage nach der Injektion zu leicht vergrößerten Herzkammern. Die kardiale Kontraktilität war stark verringert (bei 48 hpf von 19 ± 4 % bis 10 ± 4 % bei 96 hpf). Darüber hinaus zeigten die MO-*camk2g1* injizierten Embryonen keine offensichtliche Abnormitäten in der Unterteilung des

Gehirns und eine reduzierte Blutzirkulation (Abb. 26A). Das *missplicing* des *ptpla*-Transkriptes führte zu einem sukzessiven Kontraktilitätsverlust des Ventrikels. Ventrikel und Atrium waren in einem 90° Winkel zueinander angeordnet (Abb. 26B). Häufig konnte zudem eine zeitliche Verzögerung der Systole im Ventrikel beobachtet werden, bevor es in den normalen 1:1 Rhythmus überging. Im weiteren Entwicklungsverlauf zeigten die MO-*ptpla* injizierten Embryonen eine verminderte Durchblutung, ein Perikardödem und zum Teil eine Blutkongestion vor dem Einflußtrakt infolge der Herzinsuffizienz (Abb. 26B). Wie in Abbildung 25 dargestellt kollabierte der Ventrikel nach 96 Stunden fast vollständig. Die MO-*ktn1* injizierten Fische zeigten bereits nach 24 hpf einen kardial spezifischen Phänotyp, zunächst beobachtet durch die Ausbildung eines Perikardödems. Im Laufe der Entwicklung ließ sich bei den MO-*ktn1* injizierten Embryonen ein dilatiertes Atrium erkennen. Das auftretende Perikardödem vergrößerte sich zusehends und infolge der verminderten Durchblutung kam es auch in diesen Embryonen zur Blutkongestion. Auch hier war die ventrikuläre Kontraktilität nach 96 Stunden enorm eingeschränkt (Abb. 25).

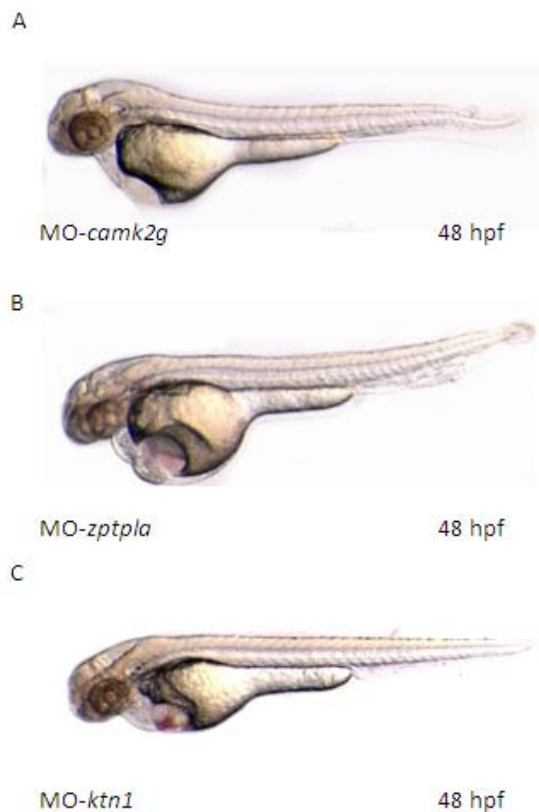


Abb. 26: Knockdown der ER-assoziierte Proteine *camk2g*, *ptpla* und *ktn1* führen zu einem starken Kontraktilitätsverlust. (A) Die MO-*camk2g* injizierten Zebrafischembryonen zeichnen sich schon zu einem frühen Zeitpunkt durch eine kardiale Dysfunktion aus. Beide Herzkammern sind drastisch vergrößert. (B) MO-*ptpla* injizierte Embryonen entwickelten 48 hpf ein dilatiertes Atrium sowie ein stark

ausgeprägtes Perikardödem und Blutkongestion infolge einer verminderten Durchblutung. (C) Bereits nach 48 hpf wiesen die *MO-ktn1* injizierten Embryonen eine deutliche Herzinsuffizienz, ein Perikardödem und eine Ansammlung roter Blutzellen vor dem Einflusstrakt aufgrund der verlangsamten Blutzirkulation auf. Die allgemeine Entwicklung ist im Vergleich zu den *MO-control* Embryonen offensichtlich nicht verändert.

Die *MO-actn3a* injizierten Zebrafischembryonen zeigten bereits 24 hpf eine reduzierte Kontraktilität des Ventrikels, die in der weiteren Entwicklung progressiv abnahm (FS = $35 \pm 3 \%$ bei 72 hpf und $20 \pm 3 \%$ bei 96 hpf). Als Folge der verminderten Herzfunktion war der Blutfluss stark reduziert und es kam zum Blutstau vor dem Herzen (Abb. 27A). Neben dem kardialen Phänotyp wiesen die injizierten Embryonen eine leichte Beeinträchtigung der Skelettmuskulatur auf, die sich in Form einer reduzierten Fluchtreaktion (touch response) zeigte. *MO-huG* injizierten Embryonen zeigen eine progressive Herzinsuffizienz mit Dilatation beider Kammern und einem stark ausgeprägtem Perikardödem (Abb. 27B). Im weiteren Entwicklungsverlauf nahm die Kontraktilität des Ventrikels kontinuierlich ab. Bei 48 hpf lag die ventrikuläre Kontraktilität bei etwa $42 \pm 4 \%$ und sank auf $20 \pm 3 \%$ bei 96 hpf. Zusätzlich zum kardialen Phänotyp wurde in den *huG*-injizierten Embryonen ein leichtes Ödem im Vorder-, Mittel- und Hinterhirn beobachtet.



Abb. 27: *MO-ktn1*, *ptpla* und *camk2g* injizierte Embryonen zeigten einen kardialen Kontraktilitätsdefekt. (A) Die *MO-actn3a* injizierten Zebrafischembryonen zeigten eine starke kardiale Funktionsstörung was ebenfalls durch eine progressiv verschlechternde Verkürzungsfraction deutlich wurde. Auch die Skelettmuskulatur war durch die Manipulation der Isoformen beeinträchtigt. (B) *MO-huG* injizierten Embryonen zeigten 48 hpf eine Dilatation beider Kammern und ein stark ausgeprägtes Perikardödem.

Somit konnte das *a2bp1*-vermittelte alternative Spleißen für fünf Gene experimentell bestätigt und ihre biologische Funktion ermittelt werden.

7 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe eines *reverse genetics* Ansatzes die Funktion des Spleißregulators *a2bp1* und dessen Spleißfunktion *in vivo* zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde das Gen *a2bp1* durch Morpholino-Injektionen inaktiviert und molekularbiologisch analysiert. Des Weiteren wurde eine genomweite Analyse des Transkriptoms im gesamten Zebrafisch sowie des Zebrafischherzens mittels mRNA-Sequenzierung durchgeführt und anschließend das *a2bp1*-vermittelte Spleißen analysiert.

7.1 Der Spleißfaktor *a2bp1* spielt eine essentielle Rolle für die Herzfunktion im Zebrafisch

Der Spleißfaktor A2BP1 ist ein Mitglied der RBFOX-Proteinfamilie, welche durch ein hoch konserviertes RNA-Erkennungsmotiv (RRM) gekennzeichnet ist. Bei Säugetieren gibt es drei RBFOX Paraloge: RBFOX-1 (Ataxin2-bindendes Protein 1, A2BP1), RBFOX-2 (RNA-Bindungsmotiv 9, RBM9) und RBFOX-3 (Hexaribonucleotide-bindendes Protein 3, HRNBP3, NeuN) (Kuroyanagi 2009). RBFOX-Proteine binden spezifisch an (U)GCAUG Elemente und regulieren das alternative Spleißen abhängig von der Position dieser Erkennungssequenzen auf positive oder negative Weise (Jin et al. 2003; Nakahata and Kawamoto 2005; Underwood et al. 2005; Zhang et al. 2008). Tatsächlich fördern abwärts der 5'-Spleißstelle gelegene (U)GCAUG Elemente das Spleißen wohingegen aufwärts gelegene Motive das Spleißen reprimieren (Auweter et al. 2006; Tang et al. 2012). Im Menschen wurden mehrere Mutationen in diesem Locus identifiziert, welche zu schweren neurologischen Entwicklungsstörungen führen, einschließlich geistiger Behinderung, Epilepsie und Autismus-Spektrum-Störungen (Barnby et al. 2005; Bhalla et al. 2004; Martin et al. 2007; Sebat et al. 2007). Darüber hinaus konnte eine Fehlregulation von *a2bp1* mit Fallot-Tetralogie und angeborenen Herzfehlern bei Kindern (Bittel et al. 2011; Kaynak et al. 2003) in Verbindung gebracht werden.

Frühere Expressionsstudien im Zebrafisch zeigen, dass *a2bp/rbfox1* im Gehirn exprimiert wird. Dagegen wird das *rbfox1*-Paralog *rbfox1-like* ausschließlich in der

Skelett- und Herzmuskulatur exprimiert. In dieser Arbeit zeigt die Analyse der Expression mittels *in situ*-Hybridisierung, dass *a2bp1* sowohl in Neuronalzellen als auch in Skelett- und Herzzellen exprimiert wird. 48 hpf und später wird *a2bp1*, wie erwartet, verstärkt im gesamten Hirnbereich und in Herzzellen, einschließlich der Skelettmuskeln und Brustflossen exprimiert.

Frühere Studien haben gezeigt, dass die *rbfox*-Proteine *rbfox1-like* und *rbfox2* entscheidend für die Herz- und Skelettmuskel-Funktionen im Zebrafisch sind (Gallagher et al. 2011). In dieser Arbeit führte eine *a2bp1*-Inaktivierung durch Morpholino-Injektion zu progressiver Herzinsuffizienz im Zebrafisch. Ähnlich der humanen DCM zeigen MO-*a2bp1* injizierte Embryonen eine sukzessive ventrikuläre systolische Dysfunktion, begleitet von einer Dilatation des Atriums. Die hier gewonnenen Erkenntnisse offenbaren, dass *a2bp1/rbfox1* ebenfalls eine entscheidende Rolle zur Aufrechterhaltung der Herzfunktion im Zebrafisch spielt. Auf molekularer Ebene waren keine strukturellen Entwicklungsstörungen erkennbar, die die Entwicklung einer Herzinsuffizienz in den *a2bp1*-defizienten Embryonen erklären konnten. Vielmehr ist anzunehmen, dass der beobachtete Phänotyp eher auf einen Defekt des Spleißens von wichtigen funktionellen Signalmolekülen als auf strukturellen Anomalien beruht. Daher wurde mit Hilfe der RNA-Sequenzierung das Transkriptom des Zebrafischs und des Zebrafischherzens analysiert um das *a2bp1*-vermittelte-Spleißverhalten zu erforschen.

7.1.1 mRNA Sequenzierung des Zebrafisch-Transkriptoms

Die mRNA-Sequenzierung ist eine schnelle, präzise und relativ kostengünstige Methode um die Expression von Genen zu quantifizieren und gewebespezifische Transkript-Isoformen zu detektieren. Darüber hinaus ermöglicht die mRNA-Sequenzierung, im Vergleich zu herkömmlichen Microarray-basierten Methoden, die Erkennung von Sequenz-Polymorphismen und posttranskriptioneller mRNA-Modifikationen. Daher eröffnet die Transkriptom-Sequenzierung neue Wege, um die dynamische Natur des Transkriptoms während der Entwicklung und Pathogenese zu studieren.

Generell gibt die RNA-Seq. einen guten Überblick über die Genexpressionsmuster in einem Gewebe (Adams et al. 1991). Dabei müssen die nachzuweisenden Sequenzen

nicht unbedingt bekannt sein. Bei der Analyse von Expressions-Veränderungen muss beachtet werden, dass nur die vorliegende Menge an Transkripten detektiert werden kann, jedoch nicht die Menge und Funktionsfähigkeit des bei der Translation synthetisierten Proteins. Veränderungen im Transkript bzw. Inhibition der Translation durch miRNAs kann z.B. nicht durch Expressions-Analysen nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde das erste Mal das Transkriptom embryonaler Zebrafischherzen und ganzer Embryonen mittels *next generation sequencing* analysiert. Die Quantifizierung der Genexpression in den untersuchten Proben zeigt eine gewebespezifische Expression vieler bekannten und unbekanntem Transkripte, wie zum Beispiel der kardialen Myosin-Leicht-Kette-1 (*cmlc1*). Meder et al. konnten zeigen, dass eine Stopp-Mutation im carboxy-terminalen Bereich des *cmlc1* Gens zur Kardiomyopathie im Zebrafisch führt (Meder et al. 2009).

Da die Aussagekraft einzelner differenziell regulierter Gene für die unterschiedliche Identität der untersuchten Gewebetypen teilweise zu gering ist, wurde eine umfangreiche, computergestützte Klassifizierung der Gen-Ontologie durchgeführt. So fanden sich im Herzgewebe signifikante Anreicherungen von Gengruppen mit biologischen Funktionen in den Kategorien *MAPK signaling pathway* (Regulation der MAPK Aktivität), *calcium and insulin signaling pathway* (Kalzium- und Insulin-Signalweg) und *focal adhesion* (Zell-Adhäsion). Einige der angereicherten und hochregulierten Gengruppen, wie der Kalzium-, Insulin oder MAPK-Signalweg, spielen eine wichtige Rolle in der Kardiomyogenese und Funktion von Kardiomyozyten. Dagegen sind Transkripte des metabolischen Signalweges (*metabolic pathway*), die dre-miR200a, Zellzyklus (*cell cycle*) und einige Mitglieder der miRNA-let7-Familie im Herzgewebe weniger redundant.

Obwohl die Zuordnung von Unterschieden in der Expression von bestimmten Transkripten zu verschiedenen biologischen Funktionen neue Einblicke in die Herzentwicklung und in wichtige Signalwege eröffnen, muss beachtet werden, dass *Gene Ontology*-Klassifizierung ebenfalls einige Limitierungen hat. Zum einen sind manche biologische Prozesse noch wenig charakterisiert und daher kaum abgebildet, und zum anderen kann es sein, dass ein biologischer Prozess nicht als solcher in den Datenbankdefinitionen hinterlegt ist. Daher benötigen solche Analysen immer auch eine detaillierte Aufarbeitung und *in vivo* Validierung

Aktuelle genomweite Analysen zu alternativem Spleißen zeigen, dass 40 - 60 % der menschlichen Gene alternative Spleißvarianten haben (Hammond and Wood 2011), was darauf hindeutet, dass das alternative Spleißen eines der wichtigsten Komponenten der funktionellen Komplexität des menschlichen Genoms ist (Modrek and Lee 2002; Q. Xu et al. 2002). Um einen Überblick über die Vielfalt des Zebrafisch-Transkriptoms zu bekommen, wurden alle Sequenzier-*Reads* über Exon-Exon-Übergängen (*splice-junction mapping*) in Zebrafischherzen und in gesamten Zebrafischembryonen analysiert. Allerdings war der Anteil alternativer Spleißereignisse im Zebrafisch bei weitem nicht so hoch wie für das humane Transkriptom angenommen wird (Johnson et al. 2003; E. T. Wang et al. 2008). In den Proben aus ganzen Embryonen wurde für 86 % der Gene nur eine Isoform, für 11 % zwei Isoformen und für 4 % drei oder mehr Isoformen gefunden. Da bei der Evaluierung der alternativen Spleißereignisse allerdings nur ein *exon in the middle*-Muster untersucht (*exon-skipping*) wurde, kann unter Umständen die tatsächliche Vielfalt des Zebrafisch-Transkriptoms wesentlich höher sein, was sich mit neuen Analysenstrategien in den bereits generierten Datensätzen in Zukunft analysieren lässt. Lu J et al. zeigte, dass beim Zebrafisch mit seinem weitgehend dupliziertem Genom (1,7 Gb) nur etwa 17 Prozent aller Gene alternativ gespleißt werden. Im Vergleich dazu beträgt die Rate an alternativen Spleißvorgänge in anderen Fischarten, wie Stichling und Medaka, etwa 32 Prozent (J. Lu et al. 2010). Interessanterweise ist aber das Muster der Spleißvorgänge nicht unterschiedlich. In allen Fischen ist insbesondere das Auslassen eines Exons (*exon skipping*) die häufigste Form. Laut Lu J et al. sind neben den Unterschieden auch die Gemeinsamkeiten interessant. Es fanden sich in vier Spezies (*Danio rerio*, *Oryzias latipes*, *Gasterosteus aculeatus* und *Takifugu rubripes*) 182 Gene die in gleicher Weise alternativ gespleißt werden, was vermuten lässt, dass dahinter eine konservierte Funktion steckt (J. Lu et al. 2010).

Obwohl Transkriptomsequenzierung eine verlässliche und effiziente Methode zur Identifikation von Gen-Isoformen ist, weist die hier durchgeführte Analyse einige Limitationen auf. Im Gegensatz zur statischen Genomsequenz hängt die Zusammensetzung des Transkriptoms vom Entwicklungsstadium, dem Zelltyp und äußeren Einflüssen einer Zelle ab. Daher ist zu berücksichtigen, dass bei der hier durchgeführten Sequenzierung nur die aktiven Gene zu einem bestimmten Zeitpunkt

(48 hpf) erfasst wurden. Diese Arbeit konnte zeigen, dass die Transkriptom-Sequenzierung eine präzise und kostengünstige Möglichkeit bietet funktionelle Zusammenhänge auf mRNA Ebene zu untersuchen.

7.1.2 Die *a2bp1*-Depletion führt zu aberrant gepleißten Transkripten in embryonalen Zebrafischherzen

Die Quantifizierung von mRNA-Transkripten durch RNA-Sequenzierung hängt entscheidend von einer korrekten Zuordnung der sequenzierten *reads* zu den annotierten Sequenzen ab, welche häufig auf Grund ihrer unzureichenden Länge nicht immer eindeutig zugeordnet werden können. Die RNA-Sequenzierung erlaubt Spleißformen, unabhängig von bestehenden Genannotationen, *de novo* aus Sequenzdaten und Referenzgenom zu bestimmen. Dabei werden die Enden eines *reads* jeweils einer Position im Referenzgenom zugeordnet. Anschließend wird geprüft, ob eine Kontinuität besteht oder eine Form des Spleißens vorliegt. Um eine solche Analyse hochwertig durchzuführen, müssen aber beide Enden sicher zugeordnet werden können. Da die read-Länge mit 35 bp in der hier vorliegenden Arbeit evtl. nicht ausreichend ist um alle Übergänge zu identifizieren, wurde auf eine genomweite Zuordnung der *reads* verzichtet und die bestehende Exon-Annotation als Ausgangsposition genutzt.

Die Transkriptomanalyse offenbarte eine große Anzahl an Transkriptvarianten in *a2bp1*-defizienten Zebrafischembryonen. Dabei wurden alternative Spleiß-Veränderungen im Einzel-Exon-Skipping-Modus untersucht. Insgesamt wurden 20 herzspezifische Spleißvarianten identifiziert. Unter den identifizierten herzspezifischen Zebrafisch Spleißvarianten, sind u.a Gene wie *actn3a* und *huG* zu finden, die bisher nicht als kardial relevant bekannt sind. 5 der 20 identifizierten Transkriptvarianten in den *a2bp1*-defiziente Zebrafischembryonen konnten mittels quantitativen real-time PCR (qPCR) validiert werden. Ein relevanter Unterschied im Spleißmuster konnte für die Gene *huG*, *actn3a*, *ptpla*, *ktn1* und *camk2g* experimentell bestätigt und ihre biologische Bedeutung ermittelt werden.

Bei dem HuG-Gen handelt es sich um ein Mitglied der Hu-Proteinfamilie, deren Mitglieder auch als ELAV ("embryonic lethal abnormal visual system")-like Proteine

bezeichnet werden und die ursprünglich als Tumor-spezifische Proteine identifiziert wurden. Hu-Proteine enthalten drei RRM-Domänen und spielen eine Rolle in verschiedenen biologischen Prozessen wie der Regulation des mRNA Umsatzes, der RNA-Stabilität und der Translation (Hinman and Lou 2008). Aktuell sind vier verschiedene Hu-Proteine in Vertebraten bekannt: Hu-B, Hu-C, Hu-D und Hu-R, während ein weiteres Mitglied HuG im Zebrafisch beschrieben wurde (H. C. Park et al. 2000). Alle Hu-Proteine können an AU-reiche Elemente der mRNA binden und die Zellproliferation regulieren (King et al. 1994). Die qPCR-Analyse zeigte, dass der Funktionsverlust des *a2bp1*-Spleißregulators zu einer verstärkten Integration des Exons 3 in Herzzellen im Vergleich zu dem Material aus ganzen Zebrafischen führt. Es kommt zur Entstehung von einer *huG*-Exon-3-haltigen Isoform, welche normalerweise nicht in Herzzellen exprimiert wird. Interessanterweise führte die *in vivo* Evaluation dieses aberranten Spleißmusters durch die Spleißblockierung von Exon 3 zu einem ähnlichen, wenn auch schwächer ausgeprägten Phänotyp als in den *a2bp1*-defizienten Embryonen beobachtet wurde. Die MO-*huG* injizierten Embryonen entwickeln eine progressive Herzinsuffizienz mit Dilatation beider Kammern und einem stark ausgeprägten Perikardödem. Im weiteren Entwicklungsverlauf nahm die Kontraktilität des Ventrikels kontinuierlich ab. Zusätzlich zum kardialen Phänotyp wurde in den *huG*-injizierten Embryonen ein leichtes Ödem im Vorder-, Mittel- und Hinterhirn beobachtet. Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei der Spleißmusteranalyse des Aktin-bindenden Proteins 3A- (*actn3a*) Transkript beobachtet. *actn3a* wird im Zebrafisch überwiegend in der axialen, kranialen und pharyngealen Muskulatur sowie in den Somiten exprimiert (Gupta et al. 2012; Holterhoff et al. 2009). Die Funktion des ACTN3A-Proteins im Herzen war bislang nicht bekannt. In dieser Arbeit wurde eine herzspezifische Isoform nach Funktionsverlust von *a2bp1* detektiert. Die qPCR-Analyse zeigte, dass in *a2bp1*-defizienten Zebrafischherzen eine *actn3a*-Exon-6-haltige Isoform häufiger detektiert wurde als in den MO-*control* injizierten Embryonen. Demgegenüber wurde bei der Analyse ganzer Embryonen diese Isoform seltener detektiert. Diese Ergebnisse weisen auf einen *a2bp1*-abhängigen gewebespezifischen Spleißmechanismus hin. Die Untersuchung der biologischen Funktion dieser aberranten Isoform führte zu einer Dysfunktion der Herz- und Skelettmuskulatur. Die MO-*actn3a* injizierten Zebrafischembryonen zeigten bereits 24 hpf eine reduzierte

Kontraktilität des Ventrikels, die in der weiteren Entwicklung progressiv abnahm. Neben dem kardialen Phänotyp wiesen die injizierten Embryonen eine leichte Beeinträchtigung der Skelettmuskulatur auf, die sich in Form eines reduzierten Reaktionsvermögens (touch response) zeigte. Dies deutet darauf hin, dass das A2BP1 medierte Spleißen in einigen Fällen Herz und Skelettmuskulatur betrifft.

Das alternative Exon-Verwendungsmuster für die Gene *ptpla* und *ktn1* war zwischen diesen beiden Genen relativ ähnlich. Hier wurde eine deutliche Veränderung des Verhältnisses von langen und kurzen Isoformen nach dem *a2bp1*-Knockdown, vor allem im Herzen erkennbar. Im Menschen übernimmt PTPLA eine wichtige Funktion während der Myogenese und Kardiogenese und wird mit ARVD (arrhythmogene rechtsventrikuläre Dysplasie) assoziiert (D. Li et al. 2000). Nach der *a2bp1* Inaktivierung wurde in Herzzellen eine Exon 4-enhaltende Isoform seltener detektiert als in den MO-control injizierten Fischen. Diese Isoform wurde bei der Analyse mit Material aus ganzen Embryonen entsprechend hochreguliert gefunden. Demzufolge wird das *ptpla* Transkript in 48 Stunden alten Zebrafischembryonen nicht gewebespezifisch gespleißt. Die Imitation, wenn auch in verstärktem Ausmaß, des aberranten Spleißmusters des *ptpla* Transkripts durch Morpholino-Injektion führte zu schwerem Herzversagen. Ventrikel und Atrium waren nicht korrekt zueinander angeordnet und die Kontraktilität des Ventrikels nahm sukzessive ab. Mutationen und Varianten des *ptpla*-Gens wurden in verschiedene Studien mit der humanen arrhythmogene rechtsventrikuläre Dysplasie (ARVD) assoziiert (Konishi et al. 2010; D. Li et al. 2000).

Die qPCR Spleißmuster-Analyse des *ktn1* (kinectin 1/kinesin Rezeptor) ergab eine reduzierte Expression der kurzen Transkriptform in den Zebrafischherzen. Das *ktn1* Gen kodiert ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein (MAP) welches an die Membran des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert ist. Die Calcium/Calmodulin-abhängige Protein-Kinase II gamma 1 (*camk2g1*) unterscheidet sich von den anderen untersuchten Transkriptisofomen in ihrem Spleißmuster nach *a2bp1*-Inaktivierung. In *a2bp1*-defizienten Zebrafischherzen kommt es zu einer verminderten Integration des AS-Exon 14 im Vergleich zu den Kontrollen. In ganzen Embryonen wurde dagegen eine verminderte Integration für das gesamte Exon Triplet-Set (Abb. 32A) beobachtet, was auf eine mögliche Einschränkung der hier verwendeten „Exon-Triplet-Strategie“

hindeutet. Der MO-*camk2g1* Knockdown führte zwei Tage nach der Injektion zu leicht vergrößerten Herzkammern, die kardiale Kontraktilität war stark verringert. Darüber hinaus zeigten die MO-*camk2g1* injizierten Embryonen Abnormitäten in der Unterteilung des Gehirns und eine reduzierte Blutzirkulation.

Eine Vielzahl Krankheiten beruhen auf fehlerhaftem Spleißen durch Mutationen in *cis*- und *trans*-Elementen. Wie wichtig das Speißen für die Herzentwicklung ist, wurde bereits in verschiedene Studien gezeigt. Deletion- oder Überexpression von einigen Spleiß-Regulatoren, wie SC35, ASF/SF2, SRp38 und CELF, sowie Mutationen in *splice-sites* oder falsch gespleißte Transkripte führten zu Störungen der Herzfunktion (Ding et al. 2004; Feng et al. 2009; Ladd et al. 2005; X. Xu et al. 2005). Meistens war eine Veränderung in der Spleiß- Dynamik/Verhalten von Sarkomergenen wie Titin, Myosin, Tropomyosin u.a. ursächlich. In der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, dass der *a2bp1*-Verlust nicht zu einem vollständigen Spleiß-Versagen führt, vielmehr wird das Spleißmuster spezifischer Zielgene verändert. Allerdings ist die Anzahl an identifizierten *a2bp1*-Zielgenen recht gering. Eine Erklärung hierfür könnte eine unzureichende Sequenziertiefe sein. Des Weiteren könnte der *a2bp1*-Funktionsverlust durch andere Spleißfaktoren kompensiert werden. *Gehman et al.* konnte bereits in *a2bp1-knockdown* Experimenten in der Maus zeigen, dass nach Inaktivierung des *a2bp1*-Spleißregulators der Proteinlevel des *a2bp1*-Paralog FOX-2 anstieg, um den *a2bp1*-Funktionsverlust zu kompensieren (Gehman et al. 2011; Gehman et al. 2012). Seine Ergebnisse weisen darauf hin, dass einige Transkripte von verschiedenen Spleißfaktoren alternativ gespleißt werden. Das könnte auch im Zebrafisch der Fall sein, sodass die Anzahl der Transkripte die tatsächlich von *a2bp1* reguliert werden nicht richtig erfasst werden konnten. Die durchgeführten molekularen und funktionellen Analysen legen nahe, dass der *a2bp1 knockdown*-Phänotyp nicht durch falsches Spleißen von spezifischen Zielgenen, sondern eher durch die kumulative Wirkung von vielen Spleiß-Anomalien verursacht wird. *De facto* führte die Reproduktion der aberranten Transkripte des *huG*-, *actn3a*-, *ptpla*-, *ktn1*- und *camk2g*-Gene *in vivo* jeweils zu einer abnormen Herzfunktion. Obwohl mehrere Transkripte inkorrekt gespleißt waren, und die *in vivo* Analyse dieser Transkripte zeigte, dass eine korrekte Expression der *huG*-, *actn3a*-, *ptpla*-, *ktn1*- und *camk2g*-Transkripte essentiell

für eine unbeschränkte Funktion der Herzzellen ist, bleibt es eine Herausforderung die komplexe Biologie des alternativen Spleißens komplett zu verstehen.

8 Ausblick

Die Aufklärung der molekularen Ursachen von genetisch bedingten Erkrankungen ist eines der wichtigsten Ziele in der Humangenomforschung. Vor allem multifaktoriell bedingte Erkrankung mit einer hohen Prävalenz, wie Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Diabetes und Krebs stehen dabei im Fokus aktueller Forschung.

Die molekularen Ursachen von Kardiomyopathien sind trotz intensiver Forschungsbestrebungen in den letzten Jahren noch weitgehend ungeklärt. Derzeit sind mehr als 40 Genmutationen in DCM und HCM bekannt (Meder and Katus 2012). Dabei handelt es sich häufig um Mutationen in Proteinen des Sarkomers, des Zytoskelettes und der Zellmembran. Allerdings konnten auch Mutationen in Spleiß-Erkennungssequenzen und in Spleißregulatoren als ursächlich identifiziert werden (Brauch et al. 2009; Hershberger and Siegfried 2011; D. Li et al. 2010; Liew and Dzau 2004).

Aktuelle Schätzungen gehen davon aus, dass sich bis zu 50 % der mit Krankheiten assoziierten Mutationen beim Menschen auf fehlerhafte Vorgänge beim alternativen Spleißen zurückführen lassen (Hammond and Wood 2011). Die vorliegende Arbeit liefert durch eine funktionelle *in vivo* Analyse des Spleißregulators *a2bp1* neue Erkenntnisse zum alternativen Spleißen während der Herzentwicklung und Funktion, sowie die biologische Bedeutung von inkorrekt gespleißten Transkripten im Zebrafisch. Eine genaue Kenntnis des Transkriptoms, der biologischen Rolle des alternativen Spleißens sowie der Funktion von Spleißregulatoren ist notwendig, um neue diagnostische und therapeutische Strategien entwickeln zu können. Erste Gentherapien aus der Zellkultur und klinischen Studien bei der Behandlung von Duchenne-Muskeldystrophie (DMD) zeigen vielversprechende Resultate (Arechavala-Gomeza et al. 2012; Popplewell et al. 2012) (<http://www.treat-nmd.eu/research/clinical-research/overview-current-trials-dmd/>). In den klinischen Studien wird eine Exon-Skipping-Technik eingesetzt und diskutiert. Im Rahmen der Therapie werden die Antisense-Oligonukleotide (AOs) lokal in einen einzigen Muskel oder systemisch in die Blutbahn injiziert. Deletionen und Duplikationen von ganzen oder mehreren Exonen die häufigste genetische Ursache von DMD dar, sodass diese

Therapiestrategie bei einem großen Teil dieser Patienten angewandt werden kann. Die AOs sind so konstruiert, dass sie zum Entfernen des Exons mit der Mutation/Deletion führen. Dadurch kommt es zur Korrektur des translationalen Leserahmens. Bei einer Deletion eines oder mehrerer Exone des Dystrophin-Gens, die zur Verschiebung des Leserahmens führt und die Bildung funktionsfähiger Dystrophinmoleküle verhindert, kann durch die Therapie mit AOs ein trunkiertes, aber funktionales Protein gebildet werden.

Die hier gewonnenen Daten zeigen, dass das A2BP1-Protein und seine Zielgene essentiell für die kardiale Funktion sind und als neue potenzielle Kardiomyopathie Gene betrachtet werden können.

Nach der Entzifferung des Genoms gibt es nun auch Anstrengungen die Gesamtheit der DNA-Modifizierungen, sowie das Transkriptom, Proteom und Metabolom des Menschen zu entschlüsseln. Die vorliegende Arbeit hat massgebend dazu beigetragen, die Bedeutung des alternativen Spleißenprozesses in der Zebrafisch Herzentwicklung und Funktion besser zu verstehen.

9 Literaturverzeichnis

- Allain, F. H., et al. (2000), 'Solution structure of the two N-terminal RNA-binding domains of nucleolin and NMR study of the interaction with its RNA target', *J Mol Biol*, 303 (2), 227-41.
- Allain, F. H., et al. (1996), 'Specificity of ribonucleoprotein interaction determined by RNA folding during complex formulation', *Nature*, 380 (6575), 646-50.
- Arechavala-Gomeza, V., et al. (2012), 'Antisense oligonucleotide-mediated exon skipping for Duchenne muscular dystrophy: progress and challenges', *Curr Gene Ther*, 12 (3), 152-60.
- Ars, E., et al. (2000), 'Mutations affecting mRNA splicing are the most common molecular defects in patients with neurofibromatosis type 1', *Hum Mol Genet*, 9 (2), 237-47.
- Auweter, S. D., et al. (2006), 'Molecular basis of RNA recognition by the human alternative splicing factor Fox-1', *EMBO J*, 25 (1), 163-73.
- Bandziulis, R. J., Swanson, M. S., and Dreyfuss, G. (1989), 'RNA-binding proteins as developmental regulators', *Genes Dev*, 3 (4), 431-7.
- Barash, Y., et al. (2010), 'Deciphering the splicing code', *Nature*, 465 (7294), 53-9.
- Barnby, G., et al. (2005), 'Candidate-gene screening and association analysis at the autism-susceptibility locus on chromosome 16p: evidence of association at GRIN2A and ABAT', *Am J Hum Genet*, 76 (6), 950-66.
- Bhalla, K., et al. (2004), 'The de novo chromosome 16 translocations of two patients with abnormal phenotypes (mental retardation and epilepsy) disrupt the A2BP1 gene', *J Hum Genet*, 49 (6), 308-11.
- Bittel, D. C., et al. (2011), 'Gene expression in cardiac tissues from infants with idiopathic conotruncal defects', *BMC Med Genomics*, 4, 1.
- Black, D. L. (1992), 'Activation of c-src neuron-specific splicing by an unusual RNA element in vivo and in vitro', *Cell*, 69 (5), 795-807.
- Bourgeois, C. F., Lejeune, F., and Stevenin, J. (2004), 'Broad specificity of SR (serine/arginine) proteins in the regulation of alternative splicing of pre-messenger RNA', *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 78, 37-88.

- Brauch, K. M., et al. (2009), 'Mutations in ribonucleic acid binding protein gene cause familial dilated cardiomyopathy', *J Am Coll Cardiol*, 54 (10), 930-41.
- Chen, Mo and Manley, James L. (2009), 'Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10 (11), 741-54.
- Cooper, T. A., Wan, L., and Dreyfuss, G. (2009), 'RNA and disease', *Cell*, 136 (4), 777-93.
- Cork, D. M., Lennard, T. W., and Tyson-Capper, A. J. (2008), 'Alternative splicing and the progesterone receptor in breast cancer', *Breast Cancer Res*, 10 (3), 207.
- Creemers, E. E., et al. (2006), 'Coactivation of MEF2 by the SAP domain proteins myocardin and MASTR', *Mol Cell*, 23 (1), 83-96.
- David, C. J. and Manley, J. L. (2008), 'The search for alternative splicing regulators: new approaches offer a path to a splicing code', *Genes Dev*, 22 (3), 279-85.
- Deardorff, J. A. and Sachs, A. B. (1997), 'Differential effects of aromatic and charged residue substitutions in the RNA binding domains of the yeast poly(A)-binding protein', *J Mol Biol*, 269 (1), 67-81.
- Ding, J. H., et al. (2004), 'Dilated cardiomyopathy caused by tissue-specific ablation of SC35 in the heart', *EMBO J*, 23 (4), 885-96.
- Erlich, H. A. (1989), 'Polymerase chain reaction', *J Clin Immunol*, 9 (6), 437-47.
- Fairbrother, W. G., et al. (2002), 'Predictive identification of exonic splicing enhancers in human genes', *Science*, 297 (5583), 1007-13.
- Faustino, N. A. and Cooper, T. A. (2003), 'Pre-mRNA splicing and human disease', *Genes Dev*, 17 (4), 419-37.
- Feng, Y., et al. (2009), 'SRp38 regulates alternative splicing and is required for Ca(2+) handling in the embryonic heart', *Dev Cell*, 16 (4), 528-38.
- French, P. J., et al. (2007), 'Identification of differentially regulated splice variants and novel exons in glial brain tumors using exon expression arrays', *Cancer Res*, 67 (12), 5635-42.
- Gabut, M., Chaudhry, S., and Blencowe, B. J. (2008), 'SnapShot: The splicing regulatory machinery', *Cell*, 133 (1), 192 e1.

- Gallagher, T. L., et al. (2011), 'Rbfox-regulated alternative splicing is critical for zebrafish cardiac and skeletal muscle functions', *Dev Biol*, 359 (2), 251-61.
- Gehman, L. T., et al. (2011), 'The splicing regulator Rbfox1 (A2BP1) controls neuronal excitation in the mammalian brain', *Nat Genet*, 43 (7), 706-11.
- Gehman, L. T., et al. (2012), 'The splicing regulator Rbfox2 is required for both cerebellar development and mature motor function', *Genes Dev*, 26 (5), 445-60.
- Grabowski, P. J., Padgett, R. A., and Sharp, P. A. (1984), 'Messenger RNA splicing in vitro: an excised intervening sequence and a potential intermediate', *Cell*, 37 (2), 415-27.
- Griffith, M., et al. (2010), 'Alternative expression analysis by RNA sequencing', *Nat Methods*, 7 (10), 843-7.
- Guo, W., et al. (2012a), 'RBM20, a gene for hereditary cardiomyopathy, regulates titin splicing', *Nat Med*, 18 (5), 766-73.
- (2012b), 'RBM20, a gene for hereditary cardiomyopathy, regulates titin splicing', *Nat Med*.
- Hammond, S. M. and Wood, M. J. (2011), 'Genetic therapies for RNA mis-splicing diseases', *Trends Genet*, 27 (5), 196-205.
- Hayakawa, M., et al. (2002), 'Muscle-specific exonic splicing silencer for exon exclusion in human ATP synthase gamma-subunit pre-mRNA', *J Biol Chem*, 277 (9), 6974-84.
- Hershberger, R. E. and Siegfried, J. D. (2011), 'Update 2011: clinical and genetic issues in familial dilated cardiomyopathy', *J Am Coll Cardiol*, 57 (16), 1641-9.
- Higuchi, R., et al. (1993), 'Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions', *Biotechnology (N Y)*, 11 (9), 1026-30.
- Hofmann, Y., et al. (2000), 'Htra2-beta 1 stimulates an exonic splicing enhancer and can restore full-length SMN expression to survival motor neuron 2 (SMN2)', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (17), 9618-23.
- Huh, G. S. and Hynes, R. O. (1994), 'Regulation of alternative pre-mRNA splicing by a novel repeated hexanucleotide element', *Genes Dev*, 8 (13), 1561-74.
- Jin, Y., et al. (2003), 'A vertebrate RNA-binding protein Fox-1 regulates tissue-specific splicing via the pentanucleotide GCAUG', *EMBO J*, 22 (4), 905-12.

- Johnson, J. M., et al. (2003), 'Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays', *Science*, 302 (5653), 2141-4.
- Karen S. Frese, Hugo A. Katus, Benjamin Meder (2013), 'Next-generation sequencing: from understanding biology to personalized medicine', *Biology*, 2 (1), 378-.
- Kaynak, B., et al. (2003), 'Genome-wide array analysis of normal and malformed human hearts', *Circulation*, 107 (19), 2467-74.
- Ke, S., Zhang, X. H., and Chasin, L. A. (2008), 'Positive selection acting on splicing motifs reflects compensatory evolution', *Genome Res*, 18 (4), 533-43.
- Kim, E., Magen, A., and Ast, G. (2007), 'Different levels of alternative splicing among eukaryotes', *Nucleic Acids Res*, 35 (1), 125-31.
- Konishi, H., et al. (2010), 'Characterization of HACD1 K64Q mutant found in arrhythmogenic right ventricular dysplasia patients', *J Biochem*, 148 (5), 617-22.
- Kuroyanagi, H. (2009), 'Fox-1 family of RNA-binding proteins', *Cell Mol Life Sci*, 66 (24), 3895-907.
- Kuroyanagi, H., et al. (2006), 'Transgenic alternative-splicing reporters reveal tissue-specific expression profiles and regulation mechanisms in vivo', *Nat Methods*, 3 (11), 909-15.
- Ladd, A. N. and Cooper, T. A. (2002), 'Finding signals that regulate alternative splicing in the post-genomic era', *Genome Biol*, 3 (11), reviews0008.
- Ladd, A. N., et al. (2005), 'Cardiac tissue-specific repression of CELF activity disrupts alternative splicing and causes cardiomyopathy', *Mol Cell Biol*, 25 (14), 6267-78.
- Lander, E. S., et al. (2001), 'Initial sequencing and analysis of the human genome', *Nature*, 409 (6822), 860-921.
- Li, D., et al. (2000), 'Human protein tyrosine phosphatase-like gene: expression profile, genomic structure, and mutation analysis in families with ARVD', *Gene*, 256 (1-2), 237-43.
- Li, D., et al. (2010), 'Identification of novel mutations in RBM20 in patients with dilated cardiomyopathy', *Clin Transl Sci*, 3 (3), 90-7.
- Li, Q., Lee, J. A., and Black, D. L. (2007a), 'Neuronal regulation of alternative pre-mRNA splicing', *Nat Rev Neurosci*, 8 (11), 819-31.

- Li, Qin, Lee, Ji-Ann, and Black, Douglas L. (2007b), 'Neuronal regulation of alternative pre-mRNA splicing', *Nat Rev Neurosci*, 8 (11), 819-31.
- Lieberman, A. P., et al. (2001), 'Androgens regulate the mammalian homologues of invertebrate sex determination genes *tra-2* and *fox-1*', *Biochem Biophys Res Commun*, 282 (2), 499-506.
- Liew, C. C. and Dzau, V. J. (2004), 'Molecular genetics and genomics of heart failure', *Nat Rev Genet*, 5 (11), 811-25.
- Linke, W. A. and Bucker, S. (2012), 'King of hearts: a splicing factor rules cardiac proteins', *Nat Med*, 18 (5), 660-1.
- Lu, J., et al. (2010), 'Alternative splicing in teleost fish genomes: same-species and cross-species analysis and comparisons', *Mol Genet Genomics*, 283 (6), 531-9.
- Lu, Z. X., Jiang, P., and Xing, Y. (2012), 'Genetic variation of pre-mRNA alternative splicing in human populations', *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 3 (4), 581-92.
- Martin, C. L., et al. (2007), 'Cytogenetic and molecular characterization of A2BP1/FOX1 as a candidate gene for autism', *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 144B (7), 869-76.
- Matlin, A. J., Clark, F., and Smith, C. W. (2005), 'Understanding alternative splicing: towards a cellular code', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6 (5), 386-98.
- Meder, B. and Katus, H. A. (2012), '[Clinical and genetic aspects of hypertrophic and dilated cardiomyopathy]', *Internist (Berl)*, 53 (4), 408-14, 17-8.
- Meder, B., et al. (2009), 'A single serine in the carboxyl terminus of cardiac essential myosin light chain-1 controls cardiomyocyte contractility in vivo', *Circ Res*, 104 (5), 650-9.
- Meder, B., et al. (2013), 'A genome-wide association study identifies 6p21 as novel risk locus for dilated cardiomyopathy', *Eur Heart J*.
- Modrek, B. and Lee, C. (2002), 'A genomic view of alternative splicing', *Nat Genet*, 30 (1), 13-9.
- Mortazavi, A., et al. (2008), 'Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq', *Nat Methods*, 5 (7), 621-8.
- Mullis, K., et al. (1986), 'Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction', *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51 Pt 1, 263-73.

- Nakahata, S. and Kawamoto, S. (2005), 'Tissue-dependent isoforms of mammalian Fox-1 homologs are associated with tissue-specific splicing activities', *Nucleic Acids Res*, 33 (7), 2078-89.
- Neagoe, C., et al. (2002), 'Titin isoform switch in ischemic human heart disease', *Circulation*, 106 (11), 1333-41.
- Pan, Q., et al. (2008), 'Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing', *Nat Genet*, 40 (12), 1413-5.
- Pfaffl, M. W. (2001), 'A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR', *Nucleic Acids Res*, 29 (9), e45.
- Pistoni, M., Ghigna, C., and Gabellini, D. (2010), 'Alternative splicing and muscular dystrophy', *RNA Biol*, 7 (4), 441-52.
- Popplewell, L. J., Malerba, A., and Dickson, G. (2012), 'Optimizing antisense oligonucleotides using phosphorodiamidate morpholino oligomers', *Methods Mol Biol*, 867, 143-67.
- Pozzoli, U. and Sironi, M. (2005), 'Silencers regulate both constitutive and alternative splicing events in mammals', *Cell Mol Life Sci*, 62 (14), 1579-604.
- Refaat, M. M., et al. (2012), 'Genetic variation in the alternative splicing regulator RBM20 is associated with dilated cardiomyopathy', *Heart Rhythm*, 9 (3), 390-6.
- Sachs, A. B., Davis, R. W., and Kornberg, R. D. (1987), 'A single domain of yeast poly(A)-binding protein is necessary and sufficient for RNA binding and cell viability', *Mol Cell Biol*, 7 (9), 3268-76.
- Sanford, J. R., Longman, D., and Caceres, J. F. (2003), 'Multiple roles of the SR protein family in splicing regulation', *Prog Mol Subcell Biol*, 31, 33-58.
- Sebat, J., et al. (2007), 'Strong association of de novo copy number mutations with autism', *Science*, 316 (5823), 445-9.
- Shibata, H., Huynh, D. P., and Pulst, S. M. (2000), 'A novel protein with RNA-binding motifs interacts with ataxin-2', *Hum Mol Genet*, 9 (9), 1303-13.
- Stainier, D. Y., Lee, R. K., and Fishman, M. C. (1993), 'Cardiovascular development in the zebrafish. I. Myocardial fate map and heart tube formation', *Development*, 119 (1), 31-40.

- Tang, Z. Z., et al. (2012), 'Muscle weakness in myotonic dystrophy associated with misregulated splicing and altered gating of CaV1.1 calcium channel', *Hum Mol Genet*, 21 (6), 1312-24.
- Underwood, J. G., et al. (2005), 'Homologues of the *Caenorhabditis elegans* Fox-1 protein are neuronal splicing regulators in mammals', *Mol Cell Biol*, 25 (22), 10005-16.
- Venables, J. P. (2004), 'Aberrant and alternative splicing in cancer', *Cancer Res*, 64 (21), 7647-54.
- Venables, J. P., et al. (2008), 'Multiple and specific mRNA processing targets for the major human hnRNP proteins', *Mol Cell Biol*, 28 (19), 6033-43.
- Vogel, B., et al. (2009), 'In-vivo characterization of human dilated cardiomyopathy genes in zebrafish', *Biochem Biophys Res Commun*, 390 (3), 516-22.
- Wang, E. T., et al. (2008), 'Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes', *Nature*, 456 (7221), 470-6.
- Wang, G. S. and Cooper, T. A. (2007), 'Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery', *Nat Rev Genet*, 8 (10), 749-61.
- Wang, Z. and Burge, C. B. (2008), 'Splicing regulation: from a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code', *RNA*, 14 (5), 802-13.
- Wang, Z., et al. (2004), 'Systematic identification and analysis of exonic splicing silencers', *Cell*, 119 (6), 831-45.
- Westerfield, M (1995), *The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish *Danio rerio**, ed. University of Oregon Press (Eugene, OR).
- Wu, J. Y., et al. (2006), 'SRp54 (SFRS11), a regulator for tau exon 10 alternative splicing identified by an expression cloning strategy', *Mol Cell Biol*, 26 (18), 6739-47.
- Xu, Q., Modrek, B., and Lee, C. (2002), 'Genome-wide detection of tissue-specific alternative splicing in the human transcriptome', *Nucleic Acids Res*, 30 (17), 3754-66.
- Xu, X., et al. (2005), 'ASF/SF2-regulated CaMKII δ alternative splicing temporally reprograms excitation-contraction coupling in cardiac muscle', *Cell*, 120 (1), 59-72.

- Yelon, D., Horne, S. A., and Stainier, D. Y. (1999), 'Restricted expression of cardiac myosin genes reveals regulated aspects of heart tube assembly in zebrafish', *Dev Biol*, 214 (1), 23-37.
- Yeo, G. W., et al. (2009), 'An RNA code for the FOX2 splicing regulator revealed by mapping RNA-protein interactions in stem cells', *Nat Struct Mol Biol*, 16 (2), 130-7.
- Zhang, C., et al. (2008), 'Defining the regulatory network of the tissue-specific splicing factors Fox-1 and Fox-2', *Genes Dev*, 22 (18), 2550-63.
- Zheng, Z. M. (2004), 'Regulation of alternative RNA splicing by exon definition and exon sequences in viral and mammalian gene expression', *J Biomed Sci*, 11 (3), 278-94.

10 Publikationsverzeichnis

Alterations in cardiac DNA methylation in human dilated cardiomyopathy. Jan Haas*, Karen S. Frese*, Yoon Jung Park*, Hugo A. Katus, Benjamin Meder§, EMBO Mol Med. **2013** Jan 22.

Refining Diagnostic MicroRNA Signatures by Whole-miRNome Kinetic Analysis in Acute Myocardial Infarction” Vogel B, Keller A, Frese KS, Kloos W, Kayvanpour E, Sedaghat-Hamedani F, Hassel S, Marquart S, Beier M, Giannitis E, Hardt S, Katus HA, Meder B., Clin Chem. **2013** Feb;59(2)

Next-generation sequencing: from understanding biology to personalized medicine? Karen S. Frese*, Hugo A. Katus, Benjamin Meder§, Biology **2013**, 2(1), 378-398.

Genome-wide association study identifies 6p21 as novel risk locus for dilated cardiomyopathy. Benjamin Meder*, Andreas Hüge*, Tanja Weis*, Jennifer Franke, Frank Rühle, Karen Frese, Jan Haas, Anika Sietmann, Britta Vogel, Christian Zugck, Philipp Ehlermann, Frauke Friedrichs, Justo Lorenzo, Barabara Peil, Georg Homuth, Uwe Völker, Heyo Kroemer, Marcus Dörr, Wolfgang Hoffmann, Bernhard Maisch, Thomas Scheffold, Uwe Kühl, Hans-Peter Schultheiss, Boris Ivandic, Dieter Weichenhan, Nour-Eddine El-Mokhtari, Stefan Schreiber, Stephan Felix, Gerd Hasenfuß, Arne Pfeufer, Stefan Käab, Eloisa Arbustini, Wolfgang Rottbauer, Norbert Frey, Monika Stoll and Hugo A. Katus§. Eur Heart J. **2013** Jul 12.

Multivariate microRNA Signatures as Biomarkers for Non-ischemic Systolic Heart Failure. Britta Vogel*, Andreas Keller*, Karen S. Frese*, Farbod Sedaghat-Hamedani, Elham Kayvanpour, Wanda Kloos, Stefan Hardt, Markus Beier, Hugo A. Katus, Benjamin Meder, Eur Heart J. **2013** Jul 17.

Die Dilatative Kardiomyopathie – Ein Update Benjamin Meder, Karen S. Frese, Hugo A. Katus. **2012**, Aktuel Kardiol 2012; 1(04/05): 276-280

A blood based 12-miRNA signature of Alzheimer patients

Petra Leidinger, Christina Backes, Stephanie Deutscher, Katja Schmitt, Sabine Müller, **Karen Frese,** Jan Haas, Klemens Ruprecht, Cord Stähler, Benjamin Meder, Tamas Bartfai, Eckart Meese and Andreas Keller, *Genome Biology* **2013, 14:**R78

RNA splicing regulated by A2BP1 is essential for cardiac function in zebrafish

Karen S. Frese*, Benjamin Meder*, Andreas Keller, Jan Haas, Britta Vogel, Steffen Just, Mark Matzas, Doreen Köhler, Vladimir Benisch, Hugo A. Katus, Wolfgang Rottbauer (in submission).

The miRNA let-7g/IGFBP1a pathway is necessary for regular heart development

and function. Benjamin Meder, Wanda Kloos, Huda Youssef, Jan Haas, Andreas Keller, Sabine Marquart, **Karen S. Frese,** Steffen Just, Thomas Bredfort, Markus Beier, Hugo A. Katus, Wolfgang Rottbauer (in submission)

The INHERITANCE Sequencing Study: A Comprehensive European Atlas of the Genetics of Human Dilated Cardiomyopathy.

Jan Haas, **Karen S. Frese,** Barbara Peil, Wanda Kloos, Andreas Keller, Zhu Feng, Andreas Kremer, Wei-Keat Lim, Xiaohong Zhao, Dmitriy Fradkin, Jennifer Franke, Simon Fischer, Rouven Nietsch, Sabine Marquart, Sarah Hassel, Elham Kayvanpour, Farbod Sedaghat-Hamedani, Ioana Barb, Philipp Ehlermann, Derliz Mereles, Tanja Weis, Vanessa King, Emil Wirsz, Stellan Mörner, Eleanor Wicks, Abdelaziz Beqquali, Pascale Richard, Justo Lorenzo, Anders Waldenstrom, Lorenzo Monserrat, Jens Mogensen, Yigal Pinto, Philippe Charron, Eric Villard, Perry Elliott, Eloisa Arbustini, Hugo A. Katus, Benjamin Meder (in submission).

PINCH proteins regulate cardiac contractility by modulating ILK-PKB signaling.

Benjamin Meder, Inken Huttner, Farbod Sedaghat-Hamedani, Steffen Just, Tillman Dahme, **Karen Frese,** Britta Vogel, Doreen Köhler, Wanda Kloos, Jessica Rudloff, Sabine Marquart, Hugo Katus, and Wolfgang Rottbauer, *Mol Cell Biol.* **2011 Aug;**31(16).

Protein kinase D2 controls cardiac valve formation in zebrafish by regulating HDAC5 activity .Just S, Berger IM, Meder B, Backs J, Keller A, **Frese SK**, Marquart S, Eva Patzel, Gerd-Jörg Rauch; Tübingen 2000 Screen Consortium; Hugo A. Katus; Wolfgang Rottbauer, Circulation. **2011** Jul 19;124(3).

Poster:

NGFN 2010 Berlin

AHA 2011Orlando

Rotterdam 2009

SAB Sitzung DZHK Berlin 2012

EAPB (European Association of Pharma Biotechnology) Köln 2013

DGJM Heidelberg 2013

11 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der Spleißreaktion.	8
Abb. 2: Schematische Darstellung des alternativen Spleißens	10
Abb. 3: Die fünf häufigsten Typen des alternativen Spleißens	11
Abb. 4: Regulation des alternativen Spleißens durch <i>cis</i> -Elemente (ESE, ESS, ISE und ISS) und <i>trans</i> - agierenden Spleißfaktoren	12
Abb. 5 Mutationen im Spleißfaktor RBM20 führen zur dilatativen Kardiomyopathie durch pathologisches Spleißen von kardialen Proteinen	15
Abb. 6: Multiples Alignment der RRM-Domäne von RBFOX-Proteinen und ausgewählten Homologen..	16
Abb. 7: Schematische Darstellung der alternativen Spleißregulierung durch die Fox-1-Proteine)	17
Abb. 8: mRNA- Sequenzierungsablauf	42
Abb. 9: Schematische Darstellung der Primerbindungsstellen für die Quantifizierung der Isoformen..	47
Abb. 10: Schematische Darstellung der mRNA-Spleißvarianten des A2BP1-Gens.....	49
Abb. 11: Sequenzalignment des A2BP1-Gens zwischen Mensch, Maus und Zebrafisch	50
Abb. 12: Das <i>a2bp1</i> -Gen zeigt eine Expression im Kopfbereich, in der Herz- und der Skelettmuskulatur	51
Abb. 13: Ziel-Region der <i>a2bp1</i> -Morpholinos.....	51
Abb. 14: <i>a2bp1-knockdown</i> führt zu Herzinsuffizienz im Zebrafisch	53
Abb. 15: Die <i>a2bp1</i> -Inaktivierung hat keinen Einfluss auf die strukturelle Herzentwicklung	54
Abb. 16: Die molekulare Kammerdifferenzierung ist in <i>a2bp1</i> -defizienten Embryonen nicht verändert	54
Abb. 17: Die Skelettmuskulatur Sarkomerogenese ist in <i>a2bp1</i> -defizienten Embryonen nicht gestört	55
Abb. 18: Bestimmung des genomweiten Transkriptoms	57
Abb. 19: Gengruppen Anreicherungsanalyse	59
Abb. 20: Isoform-Charakterisierung in Zebrafischembryonen.....	60
Abb.21: Darstellung der durch qPCR identifizierten Spleißschemata des <i>huG</i> - und <i>actn3a</i> -Gens nach <i>a2bp1</i> -Inaktivierung.....	62
Abb. 22: Darstellung der durch qPCR identifizierten Spleißschemata der Gene <i>ptpla</i> und <i>ktn1</i> nach <i>a2bp1</i> -Inaktivierung.....	63
Abb. 23: Schematische Darstellung der durch qPCR identifizierten <i>camk2g</i> -Isoformen nach <i>a2bp1</i> - Inaktivierung	64
Abb. 24: Schematische Darstellung der zellulären Lokalisation der untersuchten <i>a2bp1</i> -Ziel-Gene	65
Abb. 25: Einfluss abnormer Isoformsimulation auf die systolische Herzkraft bei 96 hpf.....	65

Abb. 26: Knockdown der ER-assoziierte Proteine *camk2g*, *ptpla* und *ktn1* führen zu einen starken Kontraktilitätsverlust 66

Abb. 27: MO-*ktn1*, *ptpla* und *camk2g* injizierte Embryonen zeigten einen kardialen Kontraktilitätsdefekt 67

12 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:Verwendete Oligonukleotide	23
Tabelle 2:Verwendete Morpholinos	24
Tabelle 3:Verwendet RNA-Konzentration für die Anreicherung.....	42
Tabelle 4: Verwendete SOLiD-adapter Konzentration	43
Tabelle 5: Identifizierte Transkript-Varianten in <i>a2bp1</i> -defiziente Zebrafischembryonen.....	60
Tabelle 6: Genset Anreicherungsanalyse. Expressionsdaten < p= 0,05.....	100

13 Abkürzungen und Firmenverzeichnis

13.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
%	Prozent
°C	Grad Celsius
3'UTR	3'untranslatierte Region
5'UTR	5'untranslatierte Region
A	AdenosinAdenin
a2bp1	Ataxin-2-binding Protein
a2bp1-like	Ataxin-2-binding Protein-like
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
actn3a	Actinin 3a
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
AS	alternatives Spleißen
ATP	Adenosintriphosphat
atp5c1	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, gamma polypeptide 1
atp5i	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit e,
AV	atrioventrikulär
BCIP	5'-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl-Phosphat-p- Toluidinsalz
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise

c	Centi-
C	Cytosin
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium
camk2g	calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaM kinase) II beta 1
cDNA	komplementäre (engl. complementary) Desoxyribonukleinsäure
cM	centiMorgan
cmcl1	cardiac myosin light chain-1
col1a1	collagen, type I, alpha 1a
cryba1l	crystallin, beta A1, like
cryba4	crystallin, beta A4
d	Day(s) (Tag(e))
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Didesoxynukleosid-5'-triphosphat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eif5a2	eukaryotic translation initiation factor 5A2
ENU	N-Ethyl-Nitrosourea
EST	Expressed sequence tag
et al.	und andere
EtOH	Ethanol
FS	Verkürzungsfraction (<i>fractional shortening</i>)
FCS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
G	Guanin
G	Guanin

gapdhs	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, spermatogenic
GFP	green fluorescent protein
glulb	glutamate-ammonia ligase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde (engl: hour)
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HE	Hämatoxylin-Eosin
hPa	Hektopascal
hpf	Stunden nach der Befruchtung (hours post fertilization)
i.d.R	in der Regel
Ig	Immunglobulin
k	kilo
kb	Kilobasen
ktn1	kinectin 1
l	Liter
LB	Luria Bertani Broth
m	Meter
m	milli
M	Molar
mA	Milliampere
MeOH	Methanol
MESAB	Ethyl-m-Aminobenzoat- Methansulfonat
min.	Minute
MO	Morpholino modifiziertes antisense- Oligonukleotid
MO-control	Kontroll-Morpholino
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
mt-co2	cytochrome c oxidase II, mitochondrial

mt-cyb	cytochrome b, mitochondrial
myl7	cardiac myosin light chain 7
myl7	myosin, light polypeptide 7, regulatory
n	Probenanzahl
Na ⁺ K ⁺	Natrium-Kalium ATPase
NGS	Nexte Generation Sequenzierung (<i>next generation sequencing</i>)
nppa	natriuretic peptide precursor A
p	Piko-
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PFA	Paraformaldehyd
PKC	Protein Kinase C
ptpla	
PTU	1-Phenyl-2-Thiourea (
qPCR	Qualitative Real-Time (Echtzeit) Polymerasekettenreaktion
RBM	RNA binding motif protein 20
RNA	Ribonukleinsäure
RRM	RNA-Erkennungsdomäne (<i>RNA recognition motif</i>)
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
seta	SET translocation (myeloid leukemia-associated) A
SSC	Sodium chloride/Sodium citrate (Natriumchlorid/Natriumcitrat)
SSCT	SSC + Tween-20
T	Thymin
TBE	Tris-Borat-EDTA

TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
tpm3	tropomyosin 3
tpm4	tropomyosin 4
U	Unit
üN	über Nacht
uqcrcq	ubiquinol-cytochrome c reductase, complex III subunit VII
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen (volume per volume)
vdac2	voltage-dependent anion channel 2
w/v	Gewicht pro Volumen (weight per volume)
WT	Wildtyp
ywhab1	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5- monooxygenase activation protein, beta polypeptide a
ywhabl	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5- monooxygenase activation protein, beta polypeptide like
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
α MHC α	Myosin heavy chain (Myh6)
λ	Lambda
μ	mikro

13.2 Firmenverzeichnis

Firmenname	Firmensitz
Abcam Ltd.	Cambridge, UK
ABgene	Germany Hamburg, GER
Adobe Systems	Saggart, IR
Agowa	Berlin, GER
Ambion (Europe)	Ltd. Huntingdon, UK
Amersham Biosciences Europe GmbH	Freiburg, GER
AppliChem GmbH	Darmstadt, GER
Axon Instruments	Foster City, USA
BD Biosciences (Becton Dickinson GmbH)	Heidelberg, GER
Biometra GmbH i. L.	Göttingen, GER
Bio-Rad Laboratories GmbH	München, GER
Carl Roth GmbH + KO. KG	Karlsruhe, GER
Eppendorf AG	Hamburg, GER
Finnzymes Oy	Espoo, Finland
GlaxoSmithKline	London, UK
Greiner Bio-One International AG	Frickenhausen, GER
Invitrogen GmbH	Karlsruhe, GER
Leica Microsystems	Wetzlar, GER
Merck KGaA	Darmstadt, GER
Metabion International AG	Planegg-Martinsried, GER
Molzym GmbH & Co.KG	Bremen, GER
MWG-BIOTECH AG	Ebersberg, GER
Narishige CO. Ltd.	Tokyo, JP
neoLab	Heidelberg, GER
New England Biolabs Inc.	Ipswich, USA
Nunc GmbH & Co. KG	Wiesbaden, GER
Osypka	Rheinfelden-Herten, GER
PEQLAB Biotechnologie GMBH	Erlangen, GER

Promega GmbH	Mannheim, GER
Qiagen GmbH	Hilden, GER
Roche Diagnostics GmbH	Mannheim, GER
Schering	Berlin, GER
SERVA Electrophoresis GmbH	Heidelberg, GER
Sigma-Aldrich Chemie GmbH (inkl. Fluka)	Taufkirchen, GER
Systemec GmbH Labor-Systemtechnik	Wettenberg, GER
World Precision Instruments (Harry Fein)	Berlin, GER
Carl Zeiss AG	Jena, GER

13.3 Anhang

Tabelle 6: Genset Anreicherungsanalyse. Expressionsdaten < p= 0,05

Category	Subcategory	Subcategory alternative name	observed	p-value (fdr)	enrichment
KEGG	Neuroactive ligand-receptor interaction	4080	211	0,00E+00	up
KEGG	Oxidative phosphorylation	190	108	0,00E+00	down
KEGG	Ribosome	3010	80	0,00E+00	down
KEGG	Spliceosome	3040	101	0,00E+00	down
KEGG	Proteasome	3050	38	3,50E-06	down
KEGG	Calcium signaling pathway	4020	161	8,76E-06	up
KEGG	Cell cycle	4110	111	1,73E-04	down
KEGG	Insulin signaling pathway	4910	121	1,73E-04	up
TRANSFAC	T09880 (dre-miR-430a)	T09880	26	8,86E-04	down
KEGG	Focal adhesion	4510	159	1,28E-03	up
KEGG	RNA polymerase	3020	22	3,08E-03	down
KEGG	Basal transcription factors	3022	26	4,23E-03	down
miRNA	dre-miR-133a		64	4,85E-03	down
miRNA	xtr-miR-191		51	4,85E-03	down
KEGG	DNA replication	3030	31	5,44E-03	down
KEGG	MAPK signaling pathway	4010	216	6,06E-03	up
miRNA	dre-let-7f		119	6,42E-03	down
miRNA	dre-miR-133c		67	6,42E-03	down
miRNA	dre-miR-133b		66	7,69E-03	down
KEGG	Arginine and proline metabolism	330	48	8,53E-03	up
KEGG	ABC transporters	2010	21	1,09E-02	up
KEGG	ECM-receptor interaction	4512	51	1,09E-02	up
KEGG	Nucleotide excision repair	3420	38	1,09E-02	down
miRNA	dre-miR-194b		62	1,35E-02	down
KEGG	Cytokine-cytokine receptor interaction	4060	96	1,45E-02	up
KEGG	p53 signaling pathway	4115	55	1,45E-02	down
miRNA	dre-let-7g		99	1,58E-02	down
miRNA	dre-miR-130b		74	1,58E-02	down
miRNA	dre-miR-218b		47	1,58E-02	up
miRNA	dre-miR-489		44	1,58E-02	down
miRNA	dre-miR-203b		32	1,68E-02	down
miRNA	dre-let-7c		115	1,74E-02	down
miRNA	dre-let-7i		105	1,74E-02	down
miRNA	xtr-miR-208		54	1,74E-02	down
KEGG	Metabolic pathways	1100	888	1,75E-02	down
KEGG	RNA degradation	3018	54	1,96E-02	down
miRNA	dre-miR-103		54	1,97E-02	down
KEGG	Mismatch repair	3430	21	2,07E-02	down
miRNA	dre-miR-152		61	2,15E-02	down
miRNA	dre-miR-153a		49	2,15E-02	down
miRNA	dre-miR-462		18	2,15E-02	down
miRNA	dre-miR-724		2	2,15E-02	up
miRNA	dre-let-7a		122	2,38E-02	down
miRNA	dre-miR-122		38	2,38E-02	down
miRNA	dre-miR-31		46	2,38E-02	down
miRNA	dre-miR-144		51	2,40E-02	down

14 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich während der vergangenen Jahre beruflich wie privat unterstützt haben und somit zum erfolgreichen Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Wolfgang Rottbauer für die Möglichkeit diese Arbeit in seinem Labor anfertigen zu können besonders danken. Er hat mich immer motiviert und meine Arbeit mit zahlreichen konstruktiven und kooperativen Diskussionen unterstützt.

Herrn Prof. Dr. Thomas Wieland möchte ich herzlich für die Übernahme des Erstgutachtens, seiner Hilfsbereitschaft, Unterstützung und die vielen aufmunternden Worte, die stets zur richtigen Zeit kamen danken. Ebenso möchte ich Herrn Prof. Dr. Uwe Strähle und Dr. Johannes Backs für den Beisitz bei meiner Prüfung danken. Herrn Prof. H.A. Katus, Ärztlicher Direktor der Abt. Innere Medizin III, danke ich für die freundliche Aufnahme in der Abteilung für Kardiologie, sowie für seine warmherzige Unterstützung.

Insbesondere bei Dr. Benjamin Meder möchte ich mich von Herzen für seine engagierte Betreuung und Hilfsbereitschaft bedanken. Er stand mir jederzeit mit seinen Ideenreichtum und kompetentem Rat zur Seite und hat mich dabei unterstützt, mich sowohl wissenschaftlich als auch persönlich weiterzuentwickeln – vielen Dank dafür!

Des Weiteren danke ich Herrn Dr. Steffen Just für die kompetente Betreuung, sowie den zahlreichen Tipps und Hilfestellungen während meiner Arbeit. Herrn Professor A. Keller danke ich herzlich für seine Unterstützung bei bioinformatischen und statistischen Problemchen.

Ich möchte all meinen Kollegen der Arbeitsgruppe für die Hilfsbereitschaft, das tolle Arbeitsklima und den unglaublichen Teamgeist danken. Dabei möchte ich mich insbesondere bei Sabine Marquart, Britta Vogel, Sarah Hassel, Jan Haas, Rouven Nietsch, Simon Fischer, Doreen Köhler, Nadine Wolf, Farbod Sedaghat-Hamedani, Elham Kayvanpour, Ali Amr Nimer, Zhu Feng, Wanda Kloos, Christiane Heid, Daniel Oehler, Christina Scheiner, Iona Barb, Dominik Menger, Sebastian Zimmermann, Daniel Li und Maria Irawati bedanken. Vielen Dank auch an die Kollegen in Ulm, Ina Berger, Jessica Rudloff, Eva Patzel, Linda Gärtner und John Bührdel.

Aus tiefstem Herzen danke ich Christina Laufer (Christel), Jan Haas (Janny), Sabine Marquart (Blonski), Doreen Köhler (Dory), Nadine Wolf (NaCl), Christian Gerneman (Chrissi) und Jörg Balß (Jory) für ihre Freundschaft, liebevolle Unterstützung und die Erinnerung, dass das Leben nicht nur aus Arbeit besteht.

Nicht zuletzt gebührt mein ganz besonderer Dank meinen Eltern und meinem Bruder, die mich immer unterstützt und an mich geglaubt haben, ohne die ich nicht da wäre wo ich jetzt bin. Estoy orgullosa de tener la mejor familia del mundo.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die hier vorliegende Dissertation selbst verfasst und mich bei keiner anderen als der von mir bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Alle Stellen, die dem Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Werken entnommen sind, habe ich in jedem einzelnen Fall unter genauer Angabe der Quelle deutlich gekennzeichnet.

Ort, Datum

Unterschrift