

# INAUGURAL-DISSERTATION

Zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Naturwissenschaftlich-Mathematischen  
Gesamtfakultät  
der Ruprecht-Karls-Universität  
Heidelberg

vorgelegt von  
Diplom-Biologin Rebecca Veronica Mehringer  
aus Karlsruhe

Tag der mündlichen Prüfung:

Untersuchungen zur Bedeutung  
der Nukleosid Diphosphat  
Kinase B  
für die Expression  
heterotrimerer G Proteine im  
Zebrafischembryo

Gutachter:

Prof. Thomas Wieland

Prof. Wolfgang Rottbauer

Für meine Tochter Lale Mia

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Bedeutung von Nukleosid-Diphosphat-Kinasen für G-Protein vermittelte Signaltransduktion .....	1
1.1.1	Signaltransduktion durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren .....	1
1.1.2	Heterotrimere G-Proteine .....	2
1.1.3	Synthese und Abbau heterotrimerer G-Proteine .....	3
1.1.4	Die Nukleosid Diphosphat Kinasen .....	6
1.1.5	Enzymatische Aktivität und Struktur der NDPK-Familie .....	6
1.1.6	Isoform NDPK A und B .....	8
1.1.7	NDPK bei chronischer Herzinsuffizienz und Hypertrophie .....	10
1.1.8	Komplexbildung der NDPK B mit G $\beta\gamma$ -Dimeren und Rezeptor-unabhängige Aktivierung heterotrimerer G-Proteine .....	10
1.2	Der Zebrafisch .....	13
1.2.1	Modellorganismen in der Entwicklungsbiologie .....	13
1.2.2	Der Zebrafisch als Modellorganismus .....	13
1.2.3	Entwicklung des Zebrafischembryos .....	15
1.2.4	Embryonale Herzentwicklung im Zebrafisch .....	17
1.2.5	Heterotrimere G-Proteine im Zebrafisch .....	19
1.2.6	Nukleosid-Diphosphat-Kinasen im Zebrafisch .....	20
1.3	Zielsetzung der Arbeit .....	21
<b>2</b>	<b>Material</b> .....	<b>22</b>
2.1	Geräte .....	22
2.2	Software .....	23
2.3	Datenbanken .....	23
2.4	Gebrauchsmaterialien .....	24
2.5	Verbrauchsmaterialien .....	24
2.6	Chemikalien .....	25
2.7	Lösungen und Reagenzien .....	26
2.8	Immunologische Materialien .....	27
2.8.1	Mediensupplemente .....	27
2.8.2	Antikörper und Farbstoffe .....	27
2.8.3	Primär Antikörper .....	28
2.8.4	Sekundär Antikörper .....	28
2.9	Molekularbiologische Materialien .....	29
2.9.1	Peptide und (Oligo) Nukleotide .....	29
2.9.2	Morpholinos (MO) (antisense-Oligonukleotide) (Gene-Tools) .....	29
2.9.3	Primer (MWG Biotech): .....	29

## Inhaltsverzeichnis

---

2.9.4	Primer für Light-Cycler (MWG Biotech): .....	29
2.9.5	Primer für In Situ Hybridisationssonden (MWG Biotech):.....	29
2.10	Molekularbiologische Verbrauchsmaterialien .....	30
2.11	Plasmide.....	30
2.12	Kits.....	30
2.13	Puffer und Lösungen .....	31
2.14	Feste Nährböden für Bakterien .....	34
2.15	Fischlinien .....	35
2.15.1	TE4/6 .....	35
2.15.2	Fli-Linie .....	35
<b>3</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>36</b>
3.1	Makroskopische und mikroskopische Methoden .....	36
3.1.1	Fischzucht und Verpaarung.....	36
3.1.2	Foto- und Videodokumentation.....	36
3.1.3	Injektion von Oligonukleotiden (Morpholino) in Zebrafischembryonen.....	37
3.2	Histologische Methoden .....	38
3.2.1	Einbettung von Embryonen in JB4 .....	38
3.2.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	39
3.3	Immunologische Methoden .....	39
3.3.1	In-situ-Hybridisierung .....	39
3.3.2	Doppelimmunfluoreszenzfärbung .....	40
3.4	Proteinbiochemische Methoden .....	41
3.4.1	Präparation von Zebrafisch-Protein-Homogenaten .....	41
3.4.2	Protein-Konzentrationsbestimmung.....	41
3.4.3	Western-Blot .....	42
3.4.4	NDPK-Aktivitätsassay .....	43
3.5	Molekularbiologische Methoden.....	44
3.5.1	RNA-Isolation.....	44
3.5.2	Plasmid-Isolation aus E.coli.....	44
3.5.3	Gelelektrophorese.....	45
3.5.4	Gelextraktion/ DNA-Aufreinigung.....	45
3.5.5	Konzentrationsbestimmung von DNA/RNA .....	45
3.5.6	Reverse Transkription.....	46
3.5.7	Quantitative Real-Time PCR/Light Cyclers .....	46
3.5.8	PCR mit Taq-Polymerase .....	47
3.5.9	PCR Programm.....	48
3.5.10	Restriktionsverdau von DNA.....	48

## Inhaltsverzeichnis

---

3.5.11	Alkalische Dephosphorylierung von Plasmiden.....	48
3.5.12	Ligation von DNA.....	48
3.5.13	Transformation von E.coli.....	49
3.5.14	Herstellung von antisense-RNA-Sonden.....	49
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>51</b>
4.1	Depletion der NDPK A und NDPK B im Zebrafisch.....	51
4.1.1	Zebrafisch als in-vivo-Modell.....	51
4.1.2	Wahl der NDPK-Morpholinos und Injektion.....	52
4.1.3	Nachweise der Morpholino-vermittelten NDPK-Depletion.....	52
4.1.4	Ausmaß der NDPK-Expression auf Proteinebene.....	52
4.1.5	Reduzierte NDPK Aktivität.....	54
4.1.6	Entwicklung der NDPK- <i>Knockdown</i> -Phänotypen.....	54
4.1.7	Kardiale Dysfunktion.....	56
4.1.8	Herzentwicklung des NDPK B- <i>Knockdown</i> -Embryo.....	57
4.1.9	Histologie des NDPK-B- <i>Knockdown</i> -Herzens.....	57
4.1.10	Doppelimmunfluoreszenz an NDPK-B- <i>Knockdown</i> -Herzen.....	58
4.2	Heterotrimere G-Proteine: Depletion der $\beta$ 1-Untereinheit.....	59
4.2.1	Zwei G $\beta$ 1-Isoformen im Zebrafisch: Gen-Duplikationen bei Teleostiern.....	60
4.2.2	G $\beta$ 1- bzw. G $\beta$ 1like-mRNA-Verteilung im Zebrafischembryo.....	61
4.2.3	G $\beta$ 1-in-situ-Hybridisations-Sonden.....	61
4.2.4	Identische Verteilungsmuster der beiden G $\beta$ 1-Gene.....	62
4.2.5	Wahl der G $\beta$ 1-Morpholinos und Injektion.....	63
4.2.6	Nachweise der Morpholino-vermittelten-G $\beta$ 1/1like-Depletion.....	64
4.2.7	Ausmaß des G $\beta$ 1/1like- <i>Knockdown</i> auf Proteinebene.....	64
4.2.8	<i>Knockdown</i> der G $\beta$ 1like-Expression auf mRNA-Ebene.....	65
4.2.9	Entwicklung der G $\beta$ 1/1like- <i>Knockdown</i> -Phänotypen.....	66
4.2.10	Kardiale Dysfunktion.....	67
4.2.11	Herzentwicklung des G $\beta$ 1/1like- <i>Knockdown</i> -Embryo.....	68
4.2.12	Histologie des G $\beta$ 1/1like- <i>Knockdown</i> -Herzens.....	69
4.2.13	Doppelimmunfluoreszenz an G $\beta$ 1/1like- <i>Knockdown</i> -Herzen.....	70
4.3	Auswirkung der NDPK B- und G $\beta$ 1-Depletionen auf die Expression heterotrimerer G-Proteine.....	71
4.3.1	Wechselseitige Regulation der NDPK B und G $\beta$ 1 im <i>Knockdown</i> -Zebrafischembryo.....	71
4.3.2	Reduzierte NDPK Aktivität durch G $\beta$ 1- <i>Knockdown</i> .....	72
4.3.3	Zeitlicher Verlauf der Expressionsregulation von G $\beta$ 1 durch den NDPK B- <i>Knockdown</i> .....	73

# Inhaltsverzeichnis

---

4.3.4	Einfluss der NDPK B- und G $\beta_1$ -Depletion auf die $\alpha$ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine .....	74
4.3.5	Light-Cycler als quantitativer Nachweis auf mRNA-Ebene .....	75
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>77</b>
5.1	<i>Knockdown</i> von NDPK und G $\beta$ im Zebrafisch .....	77
5.2	NDPK B als Komplexpartner heterotrimerer G-Proteine.....	79
5.3	Posttranslationaler Mechanismus .....	81
5.4	Schlussfolgerung: Bedeutung des NDPKB/G $\alpha\beta\gamma$ Komplex <i>in vivo</i> .....	82
5.5	Ausblick .....	82
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>84</b>
6.1	Abstract .....	84
6.2	Zusammenfassung.....	85
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>86</b>

## Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 1): Schematische Darstellung eines G-Protein gekoppelten Rezeptors.....	1
Abbildung 2): Aktivierung heterotrimerer G-Proteine .....	2
Abbildung.3): Die Struktur des hypothetisches 3D-Modell des.....	11
NDPK B-G-Protein-Komplexes. (Webb et al., 1995) .....	11
Abbildung.4): Vergleichendes Modell der klassischen Rezeptor-abhängigen Aktivierung (A), (siehe auch 1.2.) und der alternativen Rezeptor-unabhängtigen Aktivierung heterotrimerer G-Proteine (B). .....	12
Abbildung 5): Entwicklungsstadien des Zebrafischs .....	16
Abbildung 6) Schematische Darstellung der Herzentwicklung im Zebrafisch vom 12 Somiten- Stadium (S) an bis 96 hpf.....	18
Abbildung 7): Sequenzvergleich von NDPK A (A) und NDPK B (B) des Menschen zum Zebrafisch auf Proteinebene. Identische Aminosäuren schwarz unterlegt. Homologie der Isoform A 77%, der Isoform B 85%.....	51
Abbildung 8): Lage der Morpholinos (MO NDPK A/ MO NDPK B) .....	52
Abbildung 9): Immunoblot mit MO-NDPK-A-und MO-NDPK-B injizierten Embryo- Proteinhomogenaten.....	53
Abbildung 10): Relative enzymatische Aktivität der NDPK .....	54
Abbildung 11): Entwicklung der Phänotypen: MO-NDPK (B, D,F) und kontrollinjiziert (A, C, E).....	55
Abbildung 12): Fractional-shortening: NDPK-B- <i>Knockdown</i> -Embryoherzen vs. Kontroll- Embryoherzen .....	56
Abbildung 13): Hämatoxilin-Eosin gefärbte Histologieschnitte an 72hpf alten NDPK-B- <i>knockdown</i> - Zebrafischembryoherzen .....	58
Abbildung. 14): Doppelimmunfluoreszenz: NDPK-B- <i>Knockdown</i> - vs. kontrollinjizierter Embryo .....	59
Abbildung 15): Immunoblot mit 72hpf NDPK-Knockdown-Embryo-Proteinhomogenaten .....	59
Abbildung. 16): Proteinsequenzvergleich von G $\beta$ 1 des Menschen zum G $\beta$ 1 und G $\beta$ 1like des Zebrafisches .....	60
Abbildung 17): Klonierung der in-situ-Sonden in den pCS2+-Vector.....	61
Abbildung 18): <i>In-situ</i> -Hybridisation der G $\beta$ <sub>1</sub> -Gene .....	62
Abbildung 19): Lage der Morpholinos gegen G $\beta$ 1 und G $\beta$ 1like .....	63
Abbildung 20): Immunoblot mit 72hpf G $\beta$ 1-Knockdown- Embryo – Proteinhomogenaten .....	64
Abbildung 21): Lage der Primer zum PCR-Nachweis der MO-G $\beta$ 1like-splice-injizierten Embryonen .....	65
Abbildung 22): Nachweis der spezifischen G $\beta$ <sub>1like</sub> -Depletion .....	66
Abbildung 23): Entwicklung der Phänotypen des G $\beta$ 1/1like-Knockdowns (B, D, F) und kontrollinjiziert (A,C,E) .....	67
Abbildung 24): Fractional-shortening: G $\beta$ 1/1like-Knockdown-Embryoherzen vs. Kontroll- Embryoherzen .....	68

## Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 25): Hämatoxilin-Eosin gefärbte Histologieschnitte an 72hpf $G\beta_{1/1like}$ - <i>Knockdown</i> - Zebrafischherzen .....	69
Abbildung 26): Doppelimmunfluoreszenz: $G\beta_{1/1like}$ - <i>Knockdown</i> - vs. kontrollinjizierter Embryo .....	70
Abbildung 27): Immunoblot mit 72hpf NDPK- <i>Knockdown</i> -Embryo-Proteinhomogenaten .....	71
Abbildung 28): Immunoblot mit 72hpf $G\beta_{1/1like}$ - <i>Knockdown</i> - Embryonen .....	72
Abbildung 29): Relative enzymatische Aktivität der NDPK bei . $G\beta_{1/1like}$ - <i>Knockdown</i> -Embryonen ...	72
Abbildung 30): Immunoblot mit zeitlichem Verlauf des NDPK-B- <i>Knockdown</i> .....	73
Abbildung 31): Immunoblot mit NDPK-B- und $G\beta_{1/1like}$ -Morpholinoinjizierten Proteinhomogenaten .....	75
Abbildung 32): Light-cycler .....	76

# 1 Einleitung

## 1.1 Bedeutung von Nukleosid-Diphosphat-Kinasen für G-Protein vermittelte Signaltransduktion

### 1.1.1 Signaltransduktion durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren bilden den größten Anteil der Zelloberflächenrezeptoren in Eukaryoten. Sie gehören zu einer Familie von siebenfach Membran-durchspannenden Rezeptoren (Abb. 1). Der erste Schritt der Signalübertragung beinhaltet die Bindung von Neurotransmittern, Hormonen oder Pharmaka an diese Moleküle. Nach der Bindung eines solchen Agonisten ändert der Rezeptor seine Konformation und aktiviert heterotrimere G-Proteine an der Innenseite der Plasmamembran. Für diese Aktivierung ist die Interaktion eines Teils der dritten intrazellulären Schleife des Rezeptors mit dem C-terminalen Ende der  $\alpha$ -Untereinheit der G-Proteine verantwortlich (De Lean et al., 1980; Samama et al., 1993)

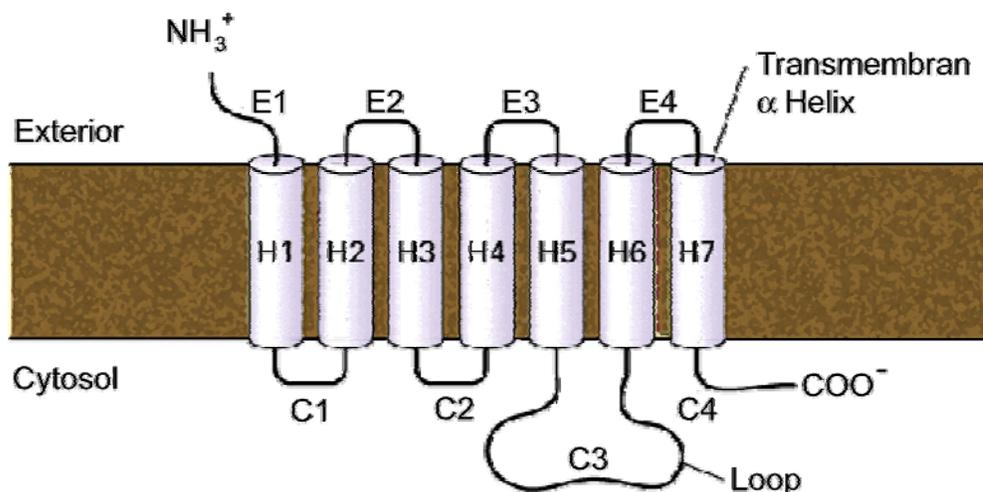


Abbildung 1): Schematische Darstellung eines G-Protein gekoppelten Rezeptors

E = Extrazelluläre Schleife, C = Cytosolische Schleife, H = Transmembran-Helix

### 1.1.2 Heterotrimere G-Proteine

Heterotrimere G-Proteine (Guaninnukleotid-bindende Proteine) setzen sich aus drei Untereinheiten zusammen: aus einer GDP/GTP-bindenden  $\alpha$ -Untereinheit und den  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten (Offermanns, 1996; Hamm, 1998). Die  $\beta$ -Untereinheit (33-45 kDa) zeichnet sich durch eine sieben-blättrige Propellerstruktur aus, die auf dem WD40-Motiv basiert, und bildet zusammen mit der  $\gamma$ -Untereinheit (6-10 kDa) eine funktionelle Einheit, das  $G\beta\gamma$ -Dimer, das nur unter denaturierenden Bedingungen dissoziiert.

Die Aktivierung der heterotrimeren G-Proteine beinhaltet den Austausch des gebundenen GDPs gegen GTP und die Dissoziation der  $\alpha$ -Untereinheit (40-52 kDa) von den Membran-gebundenen  $G\beta\gamma$ -Dimeren (Abb. 2). Die  $\alpha$ -Untereinheiten der G-Proteine können in vier Familien eingeteilt werden,  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_i/G_o$ ,  $G\alpha_q/G\alpha_{11}$  und  $G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ . Diese regulieren verschiedene Effektoren, indem sie deren Aktivität entweder stimulieren oder inhibieren.

Die Inaktivierung erfolgt durch die intrinsische GTPase-Aktivität der  $\alpha$ -Untereinheit, welche das gebundene GTP hydrolysiert und in GDP und Phosphat spaltet. Die inaktivierte  $G\alpha$ -Untereinheit reassoziert daraufhin wieder mit einem  $G\beta\gamma$ -Dimer und bildet ein neues inaktives, heterotrimeres G-Protein.

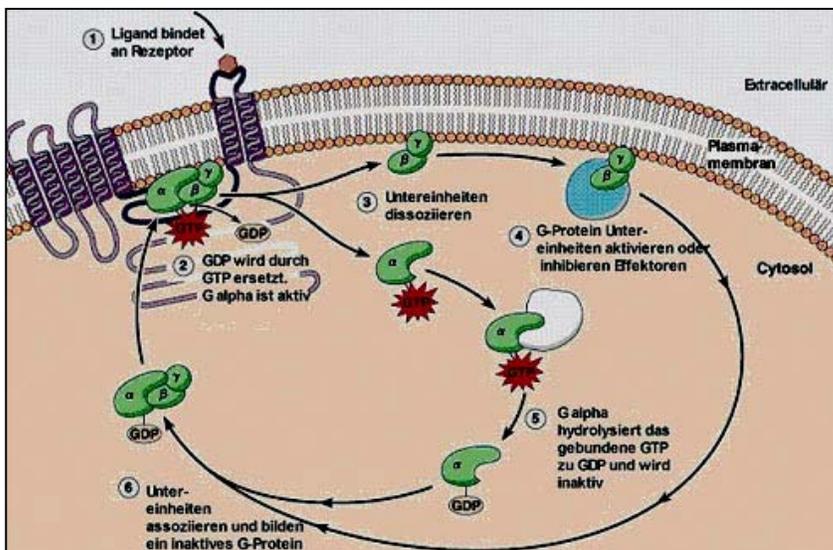


Abbildung 2): Aktivierung heterotrimerer G-Proteine

Langezeit galten die  $G\beta\gamma$ -Dimere der G-Proteine als bloße Andockstelle für die funktionsausübende  $\alpha$ -Untereinheit. Inzwischen ist jedoch bewiesen, dass der  $G\beta\gamma$ -Komplex ebenfalls in der Lage ist Effektoren, wie Isoformen der Adenylyl-Cyclase (Wieland *et al.*, 1991), die  $\beta$ -adrenerge Rezeptorkinase ( $\beta$ ARK) (Pitcher *et al.*, 1992), die Phospholipase C (Morris und Scarlata, 1997) oder Ionenkanäle (Dascal, 2001) zu stimulieren bzw. zu inhibieren. Es ist damit als Signalüberträger mindestens so wichtig wie die  $\alpha$ -Untereinheit.

### 1.1.3 Synthese und Abbau heterotrimerer G-Proteine

Die Proteinbiosynthese gliedert sich in verschiedene Schritte. An erster Stelle findet die so genannte Transkription statt: Transkription ist das Umschreiben von DNA in RNA. Ab einem Startsignal wird der DNA-Strang durch das Enzym RNA-Polymerase blasenartig aufgespalten. Die Information der DNA wird ebenfalls durch die RNA-Polymerase in die sogenannte Boten-RNA (messengerRNA, mRNA) umkopiert, indem ein komplementärer mRNA-Strang synthetisiert wird, der die DNA - bei Eukaryoten den Zellkern nach weiterer Verarbeitung (Splicing) - durch die Kernporen verlässt. Der DNA-Strang schließt sich nach abgeschlossener Transkription wieder. Übersetzt wird die DNA Information im zweiten Schritt der Proteinbiosynthese, der Translation. Dazu wird die Information auf der mRNA zunächst "zwischengespeichert". Diese mRNA verlässt den Zellkern und wird im Cytoplasma an einem Ribosom schrittweise abgelesen und in eine Folge von Aminosäuren umgesetzt. Dies geschieht durch die sog. Transfer-RNAs (tRNA). tRNA-Moleküle besitzen eine Aminosäure-Anheftungsstelle, an die eine spezifische Aminosäure gebunden wird. Am anderen Ende befindet sich das sogenannte Antikodon, ein spezifisches Basentriplett, mit dem sich die tRNA an das komplementäre Triplett der mRNA bindet. Ein Ribosom besitzt drei Bindungsstellen für tRNA - die A-(Aminoacyl-tRNA-Bindungsstelle), die P-Stelle (Peptidyl-tRNA-Bindungsstelle) und die E-Stelle (Exit, Abgangsstelle). Die A-Stelle steht für das, die Aminosäure anliefernde, tRNA-Molekül zur Verfügung. An der P-Stelle wird die Aminosäure an die wachsende Proteinkette gebunden. Die dann entladene tRNA wandert weiter an die E-Stelle, verlässt hier das Ribosom und wird

enzymatisch erneut mit einer Aminosäure beladen. Das Ribosom wandert so lange auf der mRNA entlang, bis das gesamte Protein entsprechend den Anweisung der mRNA synthetisiert wurde- bis es an ein Stoppcodon gelangt, für das es keine passende tRNA gibt. Übertragen werden die Aminosäuren mit tRNAs, die das entsprechende Anticodon tragen, somit an die mRNA gebunden sind und die korrekte Aminosäure, die sie an einer anderen spezifischen Bindestelle tragen, mit der vorhergehenden verknüpft. So wächst die Kette der Aminosäuren bis zum Stoppcodon des Transkripts, das ein Signal für das Ribosom ist, an dieser Stelle aufzuhören. Die Aminosäurekette des Proteins ist damit fertig. Das Protein selber kann nun aber noch weiter modifiziert werden.

Nicht alle Proteine sollen im Cytosol verbleiben, viele zählen zu den sekretorischen Proteinen oder zu den Membranproteinen, wie auch die G $\beta$ -Dimere. Alle diese Proteine, hierzu zählen auch solche, die in membranumhüllten Zellorganellen wie den Mitochondrien, dem endoplasmatischen Retikulum oder dem Golgi-Apparat vorhanden sind, enthalten eine typische N-terminale Signalsequenz, die von einem speziellen Protein, dem signal recognition particle (SRP), erkannt wird. Diese Sequenz ist 16-30 Aminosäuren lang und enthält typischerweise eine oder mehrere positiv geladene Aminosäuren, gefolgt von mehreren hydrophoben Aminosäuren. Ragt diese Sequenz weit genug aus dem Ribosom, was nach der Kopplung der ersten ca. 70 Aminosäuren der Fall ist, lagert sich das SRP an die naszierende Polypeptidkette und das Ribosom an und stoppt so die Translation. An der Oberfläche des (rauen) ER befindet sich ein SRP-Rezeptor, der das Ribosom bindet und in Position an das sog. Translocon bringt. Das SRP wird wiederum abgespalten und kann erneut zur Markierung dienen. Die Polypeptidkette wird nun durch das Translocon in das Lumen des ER weitersynthetisiert, wobei das Enzym Signalpeptidase die Signalsequenz entfernt. Im Translocon bildet sich während dieser Phase eine Schleife, wodurch der N-Terminus der Polypeptidkette zum Cytosol weist. Dies ist wichtig für die korrekte Positionierung von membranständigen Proteinen. Ist die Translation abgeschlossen, wird im ER-Lumen das Protein korrekt gefaltet, Disulfidbrücken bauen sich auf und weitere Modifikationen werden durchgeführt. Entscheidend für

die Sekretion ist die Glykosylierung vieler membranständiger und sekretorischer Proteine. Sie findet sowohl im ER als auch im Golgi-Apparat statt und dient als Zielmarkierung für die Proteine.

In letzter Zeit konnte durch einige Arbeiten in Säugetier-Zellen gezeigt werden, dass für den Zusammenbau von  $G\beta\gamma$ -Dimeren und deren Transport in die Plasmamembran ein weiteres Protein notwendig ist: das Phosducin-like protein-1 (PhLP1) (Lukov et al., 2005; Knol et al., 2005; Lacoste et al., 2006; Seo und Yu, 2006).

So wurde gezeigt, dass eine herunterregulierte PhLP1-Expression in Zellen mit Hilfe spezifischer siRNA, eine Hemmung der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion, sowie eine verminderte Expression von  $G\beta\gamma$ -Dimeren zur Folge hatte. Es wird angenommen, dass PhLP1 in Abwesenheit der  $\gamma$ -Untereinheit an die  $\beta$ -Untereinheit bindet und als Co-Chaperon die Assoziation der  $\gamma$ -Untereinheit an den PhLP1- $\beta$ -Komplex erlaubt. Nach erfolgter  $G\beta\gamma$ -Dimerbildung dissoziierte das PhLP1 wieder (Lukov et al., 2005) in das Cytosol.

Gestützt wurde diese Hypothese auch durch Daten einer weiteren Arbeitsgruppe, bei denen gezeigt wurde, dass in Zellen, bei denen PhLP1 mittels spezifischer siRNA herunterreguliert war, keine  $G\beta\gamma$ -Dimere in der Plasmamembran nachweisbar waren, was die Bedeutung des PhLP1 als Co-Chaperon bei der Dimerbildung und als Transportvermittler des Komplexes zur Membran verdeutlicht (Knol et al., 2005).

In Eukaryonten werden etwa 80-90% aller Proteine durch das Ubiquitin/Proteasom-System in Cytoplasma und Nukleus degradiert (Craiu *et al.*, 1997). Dieser Abbauweg erfordert in der Regel die kovalente Bindung von Ubiquitin, einem hochkonservierten 76 Aminosäuren langem Peptid, an die Proteine, die für den Abbau bestimmt sind. Derart markierte Proteine werden durch das 26S Proteasom, in einem ATP-abhängigen Mechanismus in kleine Peptide und freies Ubiquitin zerlegt.

Der Abbau von G-Proteinen unterliegt nach heutiger Kenntnis, diesem spezifischen Prozess: sowohl  $\alpha$ -Untereinheiten als auch die  $G\beta\gamma$ -Dimere heterotrimerer G-

Proteine werden nach vorangegangener Ubiquitinierung proteasomal abgebaut. Freie  $\alpha$ -Untereinheiten bzw.  $G\beta\gamma$ -Dimere degradierten dabei deutlich schneller als die heterotrimere Form. (Weissman, 2001).

#### 1.1.4 Die Nukleosid Diphosphat Kinasen

Nukleosid-Diphosphat-Kinasen (NDPKs) kommen ubiquitär vor. Sie wurden inzwischen aus Prokaryonten (*Mykoplasmen*, *E. coli*), niederen (*Dictyostelium discoïdium*, Lacombe et al., 1991) und höheren Eukaryonten (*Drosophila*, Maus, Ratte, Mensch) isoliert. DNA- und Aminosäuresequenz sind zwischen diesen Spezies evolutionär hoch konserviert erhalten geblieben (Wallet et al., 1990; Gilles et al., 1991).

Die Familie der NDPKs wird im Menschen durch acht homologe Gene codiert (nm23H1-nm23H8, **non metastatic clone 23 of human**; Lacombe et al., 2000) Diese lassen sich aufgrund ihrer DNA- und Aminosäure-Sequenzen in zwei Gruppen einteilen. Die erste Gruppe bilden nm23H1- nm23H4. Diese vier Gene weisen eine Homologie von 58-88% über die gesamte Länge ihrer kodierenden Sequenzen auf. Ihre Proteine werden als NDPK A-D bezeichnet.

Nm23H5-nm23H8 bilden die zweite Gruppe der Nukleosid Diphosphat Kinasen. Diese Gruppe wurde hauptsächlich durch Homologievergleich in der EST-Datenbank identifiziert (Munier *et al.*, 1998; Mehus *et al.*, 1999). Über Ihre Funktion ist bisher nur wenig bekannt.

#### 1.1.5 Enzymatische Aktivität und Struktur der NDPK-Familie

Ein wesentliches Charakteristikum der ersten Gruppe der NDPK-Familie ist ihre enzymatische Aktivität (Lascu und Gonin, 2000). Diese Aktivität besteht in der Übertragung einer Phosphatgruppe von 5'-Nukleosidtriphosphaten auf 5'-Nukleosiddiphosphate (Tab. 1). Die Reaktion läuft über die Bildung eines NDPK-Phosphointermediats. Die NDPK ist in der Lage diverse Nukleotide, Desoxynukleotide (Schaertl *et al.*, 1998) und in geringerem Ausmaß Didesoxynucleotide (Schneider *et al.*, 1998) umzusetzen. Eine physiologisch wichtige Reaktion ist die Phosphorylierung von GDP zu GTP unter Verbrauch von

ATP (Morera *et al.*, 1995). Für die ATP-Synthese selbst spielt die NDPK keine Rolle. Essentielle Co-Faktoren dieser Phosphattransfer-Reaktion sind zweiwertige Kationen, insbesondere Magnesium (Colomb *et al.*, 1969).

Reaktionsschema der NDPK



Die Aminosäure Histidin (His118) im aktiven Zentrum dient als Phosphatakzeptor und ist Bestandteil eines „NDPK active site motifs“, welches durch die neun Aminosäuren NXXHG/ASD charakterisiert und evolutionär hochkonserviert ist. Die Einführung verschiedenen Punktmutationen hat gezeigt, dass dieses Motiv entscheidend für die Katalyse und die Stabilität des Proteins ist. Zusätzlich besitzen die NDPK-Proteine ein Leucin-Zipper-ähnliches Motiv und eine RGD-Domäne, eine Aminosäuresequenz, die aus den drei Aminosäuren Arginin, Glycin und Asparaginsäure besteht.

Leucin-Zipper-Motive sind typisch für DNA-bindende Transkriptionsfaktoren (Klug, 1995) und RGD-Domänen dienen den Proteinen zur Interaktion mit der Integrin-Superfamilie (Akiyama, 1996). Inzwischen wurde die NDPK als DNA-bindendes und -modifizierendes Enzym identifiziert, sie fungiert auch als Transkriptionsfaktor (Postel *et al.*, 1991; 2002, 2003).

Aufgrund ihrer enzymatischen Aktivität ist die NDPK für die Nukleotid-Homeostase in der Zelle mitverantwortlich. Mit ATP als Phosphatdonor für die Synthese anderer Nucleotide wie GTP, UTP, CTP spielt die NDPK eine wichtige Rolle bei der DNA/RNA-Synthese, der Proteinsynthese und dem Kohlehydrat- und Lipidmetabolismus, zudem bei allen GTP-verbrauchenden Prozessen wie G-Protein-vermittelte Signaltransduktion, Protein-Elongation und Mikrotubulus-Polymerisation (Lacombe *et al.*, 2000).

Die Gene, die für NDPK-Isoformen codieren, wurden als Familie der nm23-Gene als Tumorsupressor bezeichnet. Ihre Expression ist in hochmetastatischen Melanom-Zelllinien reduziert (Steege *et al.*, 1988). In humanen Tumoren fand sich

eine signifikante Korrelation zwischen verminderter nm23-Expression und aggressivem klinischen Verlauf bei Melanomen, Neuroblastomen, Mamma-Karzinomen und Colon-Karzinomen. Auch nach Transfektion von nm23 in Tumorzelllinien zeigte sich eine weniger aggressive Metastasierung und Zellmotilität (Hartsough and Steeg, 2000). Als ein möglicher zugrunde liegender Mechanismus wurde eine Proteinkinase-Aktivität der NDPK diskutiert. Offenbar ist die NDPK in der Lage Proteine an Histidin- (Wagner et al., 1995), Serin/Threonin- (Engel et al., 1995) und Aspartat- (Wagner et al., 1997 and 2000) Resten über die hochenergetische Phosphohistidin-Bindung zu phosphorylieren. Dies ist auch für Geranyl- und Farnesyl-Pyrophosphate (Wagner and Vu, 2000) beschrieben worden.

### **1.1.6 Isoform NDPK A und B**

In Säugetierzellen gibt es zwei Hauptisoformen der Nukleosid Diphosphat Kinasen, NDPK A und NDPK B, die für mehr als 90% der zellulären NDPK-Enzymaktivität verantwortlich sind. Intrazellulär liegt hierbei die NDPK-Konzentration im mikromolaren Bereich. Beide Isoformen kommen ubiquitär vor, dabei ist die NDPK B in Kardiomyozyten die dominante Isoform. Beide Isoformen umfassen 152 Aminosäuren und das Molekulargewicht beträgt ca. 17 kDa (Ishikawa et al., 2003). NDPK A und B werden durch zwei unterschiedliche Gene kodiert, die in einer Tandemkonfiguration auf demselben Chromosom (Locus 17q21) angeordnet sind (Baker 1993). Es wird angenommen, dass sie durch eine Genduplikation aus einem NDPK-Urgen entstanden sind. Sowohl die Aminosäuresequenz, wie auch die DNA-Sequenz der beiden Isoformen A und B zeigen eine Homologie von ca. 88% zueinander. Die starke evolutionäre Konservierung äußert sich in einer Homologie der entsprechenden Sequenzen zwischen Mensch und Ratte von 95-98%.

Im Folgenden werden einige der vielfältigen Funktionen der NDPK A und B in der Zelle aufgeführt, dabei ist eine eindeutige spezifische Zuordnung zu einer der beiden Isoformen nur in Einzelfällen möglich.

Die Proteine NDPK A und B besitzen ähnliche kinetische Eigenschaften (Gonin *et al.*, 1999) und sind in gereinigter Form in der Lage miteinander Hetero-Oligomere zu bilden (Erent *et al.*, 2001). Die wahrscheinlich wichtigste physiologische Form ist die eines Hexamers. Bisher konnte jedoch die genaue Zusammensetzung der „natürlich“ vorkommenden NDPK-Oligomere nicht entschlüsselt werden. Dies hängt vermutlich auch mit ihrer komplexen Verteilung in der Zelle zusammen. Sie wurde bisher im Cytosol, in Mitochondrien und membranständig nachgewiesen. Eine Ausnahme bildet die nukleäre NDPK, die als NDPK B-Homodimer beschrieben wurde (Kraeft *et al.*, 1996; Pinon *et al.*, 1999).

In der Signaltransduktion monomerer G-Proteine wurde die NDPK (nm23-H1) als GTPase-aktivierendes-Protein (GAP) für Rad (Zhu *et al.*, 1999) sowie als Inhibitor von Rac1 über eine Hemmung der Tiam1-GEF-Aktivität identifiziert (Otsuki *et al.*, 2001). Erst vor kurzem wurde erkannt, dass die NDPK eine bedeutende Rolle bei der Dynamin-vermittelten Endozytose spielt, zum einen als GEF für Dynamamin, eine für die Endozytose essentielle GTPase, zum anderen durch das Zusammenspiel mit ARF6, das nm23-H1 an die Zellkontaktdomänen rekrutiert (Palacios *et al.*, 2002). Die NDPK (nm23-H2) bildet einen Komplex mit ICAP-1 $\alpha$ , das die Aktivität der Rac1 und Cdc42 GTPasen während der Integrin-vermittelten Zelladhäsion hemmt und ist damit in die Zelladhäsion und -migration involviert (Fournier *et al.*, 2002). In einem anderen Kompartiment, dem Zellkern, ist die NDPK A als DNA-bindendes und -modifizierendes Enzym identifiziert worden (Postel *et al.*, 1991; 2002). Sie fungiert dabei als Transkriptionsfaktor für c-myc und PDGF-A und ist als Nuklease an DNA-Reperatur-Prozessen beteiligt (Postel *et al.*, 2000). Mit zahlreichen weiteren Proteinen wurde eine Interaktion beschrieben: Phocein (Baillat *et al.*, 2002), KSR (Hartsough *et al.*, 2002), MAPK (Moon *et al.*, 2003), G-Protein regulierten K<sup>+</sup>-Kanälen (Xu *et al.*, 1996; Otero *et al.*, 1999), Prune (Reymond *et al.*, 1999), ROR/RZR nuclear orphan-Rezeptor (Paravicini *et al.*, 1996), ohne dass die Funktion innerhalb dieser Komplexe geklärt wäre.

Genetisch depletierte Mäuse werden häufig als Modellsysteme zum Studium von Genfunktionen eingesetzt. Bisher wurden nur Mäuse mit einer nm23-M1 (NDPK A)-Depletion generiert, die überraschenderweise keine offensichtlichen

gesundheitlichen Defekte entwickelt haben (Arnaud-Dabernat, 2003). Eine generelle, bzw. gewebsspezifische, induzierbare Depletion der NDPK B oder transgene Tiere mit NDPK A bzw. B-Überexpression wurden bisher nicht publiziert.

### **1.1.7 NDPK bei chronischer Herzinsuffizienz und Hypertrophie**

Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz haben im Vergleich zu gesunden Spenderherzen, eine dreifach höhere NDPK-Dichte und -Aktivität im Sarkolemma der Plasmamembran der Kardiomyozyten (Lutz et al., 2001). Diese Erhöhung wurde für drei Isoformen A, B und C nachgewiesen und beruht auf einer vermehrten Assoziation der NDPK mit der Plasmamembran – der Gesamtproteingehalt an NDPK, bzw. der mRNA-Gehalt sind unverändert. Bei Herzinsuffizienzpatienten, die mit einem  $\beta$ -Adrenorezeptorantagonisten behandelt wurden, ist diese Translokation der NDPK an die Plasmamembran deutlich geringer ausgeprägt (Lutz et al., 2001).

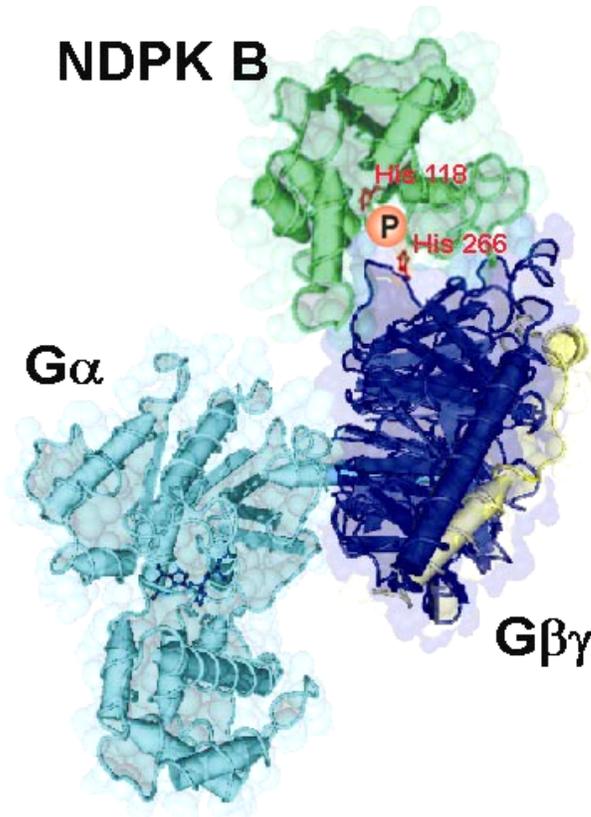
Analog zur Situation am insuffizienten menschlichen Myokard führt die chronische Applikation des  $\beta$ -Rezeptoragonisten Isoproterenol über osmotische Minipumpen für 14 Tage bei Ratten zu einer Hypertrophie des Herzens. In diesem Tiermodell konnte ebenfalls eine vermehrte Translokation der NDPK an die Plasmamembran nachgewiesen werden, die sich durch die Gabe des  $\beta$ -Adrenorezeptorantagonisten Propranolol aufheben ließ (Lutz et al., 2003).

### **1.1.8 Komplexbildung der NDPK B mit $G\beta\gamma$ -Dimeren und Rezeptor-unabhängige Aktivierung heterotrimerer G-Proteine**

Schon in den späten 80er und den frühen 90er Jahren wurden Hinweise darauf gefunden, dass die NDPK mit heterotrimeren G-Proteinen interagiert und Komplexe bildet (Kimura N., 1990). In einer kürzlich publizierten Arbeit (Cuello et al., 2003) wurden durch Co-Reinigungen mit dem, an dem Außensegment der Stäbchenzellen der Rinderretina exprimierten G-Protein Transducin, sowie in G-Proteinen aus Rinderhirn, Komplexe der NDPK mit  $G\beta\gamma$ -Dimeren nachgewiesen. Darüber hinaus wurde diese Komplexbildung in einer weiteren aktuellen Arbeit, durch eine Co-Immunpräzipitation von  $G\beta\gamma$ -Dimeren und NDPK B mit spezifischen

Antikörpern gegen  $G\beta_1$  und NDPK B in immortalisierten, neonatalen Rattenkardiomyozyten (H10-Zellen) bestätigt (Hippe et al., 2003).

In keiner der aufgeführten Arbeiten konnte die Isoform A der NDPK in diesen Komplexen detektiert werden. Dies bestätigte auch eine spezifische Anreicherung der NDPK B mit G-Proteinen aus Pancreas-Zellen von Ratten (Kowluru et al., 2002)



Auf Grund der bekannten Struktur der beteiligten Proteine hatte sich das in Abbildung 3 dargestellte, hypothetische Modell des G-Protein/NDPK B-Komplexes ergeben (Hippe und Wieland 2006; Wieland 2007).

Eine Aktivierung von heterotrimeren G-Proteinen durch die NDPK wurde zuerst durch eine direkte Phosphorylierung von gebundenem GDP sowohl an heterotrimeren (Kikkawa et al., 1990) als auch an kleinen G-Proteinen (Randazzo et al., 1991) vermutet, konnte aber als Artefakt widerlegt werden (Kikkawa et al., 1991; Randazzo et al., 1992).

Abbildung.3): Die Struktur des hypothetisches 3D-Modell des NDPK B-G-Protein-Komplexes. (Webb et al., 1995)

Sie ist aufgrund der dreidimensionalen Struktur der beteiligten Proteine auch kaum vorstellbar (Dumas et al., 1992). Analog zur NDPK hatten frühere Arbeiten eine Aktivierung von G-Proteinen (Wieland et al., 1991, 1993) und eine Regulation der Adenylzyklase (Wieland et al., 1992) über intermediär phosphorylierte  $\beta$ -Untereinheiten gezeigt, die ähnlich Kontrovers diskutiert werden.

Dass die NDPK in diesem Komplex eine wichtige Rolle bei der Phosphotransferreaktion zur Aktivierung von heterotrimeren G-Proteinen spielt, konnte in unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen werden (Hippe et al., 2003). Durch die kombinierte Überexpression der NDPK B (nm23 H2) mit  $G\alpha_s$  konnte erstmals die Aktivierung eines G-Proteins über einen Rezeptor-unabhängigen Signalweg (Abb. 4B) nachgewiesen werden. Diese Aktivierung erfolgt über eine Phosphorylierung der  $G\beta_1$ -Untereinheit durch die NDPK B und einer nachfolgenden Übertragung des energiereichen Phosphatrestes auf GDP.

Auch die phosphorylierte Aminosäure konnte identifiziert werden. Es handelt sich um das Histidin, His-266, das an der Oberfläche des  $G\beta$ -Moleküls leicht zugänglich liegt, so dass ein Phosphattransfer vom His118 der NDPK B auf das His266 am  $G\beta_1$  angenommen werden kann (Abb.3). In Übereinstimmung mit dieser Hypothese konnte eine inaktive, am His118 mutierte Form der NDPK B nicht zur Phosphorylierung von  $G\beta_1$  und der Aktivierung von  $G\alpha_s$  beitragen (Hippe et al., 2003).

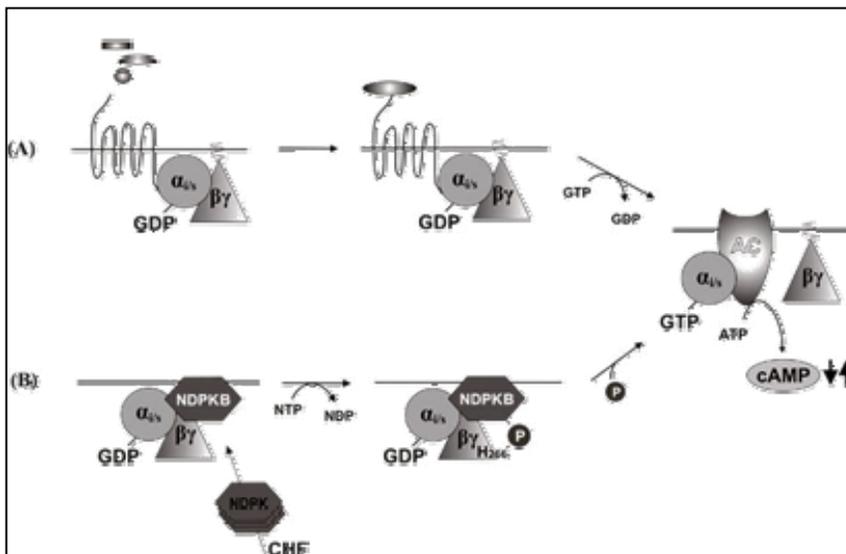


Abbildung.4): Vergleichendes Modell der klassischen Rezeptor-abhängigen Aktivierung (A), (siehe auch 1.2.) und der alternativen Rezeptor-unabhängigen Aktivierung heterotrimerer G-Proteine (B).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Komplexbildung der NDPK B mit heterotrimeren G-Proteinen eine alternative Aktivierung der G-Protein-Untereinheit  $G\alpha_s$  darstellt. Neben der klassischen, in 1.1.2. vorgestellter Weise, der Rezeptor-abhängigen Aktivierung nach Bindung eines Agonisten (Abb. 4A) existiert demzufolge ein zweiter Weg, die Rezeptor-unabhängige Aktivierung der heterotrimeren G-Proteine durch einen Phosphattransfer vom His118 der NDPK B auf das His266 am  $G\beta_1$  (Abb. 4B).

## 1.2 Der Zebrafisch

### 1.2.1 Modellorganismen in der Entwicklungsbiologie

Ein Grundproblem vieler etablierter Modellorganismen in der Entwicklungsbiologie wie der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* oder dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* ist die relativ große entwicklungsgeschichtliche Distanz zum Menschen. Gängige Versuchstierorganismen, wie die Maus oder die Ratte zeigen zwar eine fast vollständige Homologie zum Menschen, können aber nur schwer genetisch manipuliert werden und sind daher nicht zur funktionellen Genomanalyse geeignet. Zudem besitzen sie Nachteile wie, im Vergleich zu Insekten und Amphibien, niedrigere Anzahl von Nachkommen und eine ungleich längere Generationszeit. Außerdem entwickeln sich ihre Nachkommen innerhalb des Mutterleibs. Manipulationen am Embryo *ex utero* sind deshalb technisch aufwendiger, und verursachen Probleme bei der Reimplantation. Größter Vorteil der Maus ist die Möglichkeit „knock-outs“ zu generieren, d.h. Gene im Organismus genetisch auszuschalten. Allerdings sind sehr frühe Entwicklungen nur schwer zu analysieren.

### 1.2.2 Der Zebrafisch als Modellorganismus

Um die Nachteile der genannten Modellorganismen zu umgehen und die Vorteile einer genomischen Analyse dennoch nutzen zu können, wurde der Zebrafisch (*Danio rerio*), ein 3-4 cm großer, tropischer Süßwasserfisch aus der Gruppe der Karpflinge (*Cyprinidae*) als Modellorganismus etabliert. Obwohl sie Vertebraten

sind, haben Zebrafische dennoch die Vorteile der Invertebraten: eine kurze Generationszeit, eine hohe Anzahl von Nachkommen und technisch leicht zugängliche Embryonen, welche sich extrakorporal entwickeln und transparent sind, so dass Organentwicklung und Funktion *in vivo* direkt beobachtet werden können (Metscher et al., 1999).

Bereits zwei Tage nach der Befruchtung ist das kardiovaskuläre System des Zebrafischs nahezu vollständig ausgebildet.

Im Gegensatz zu anderen Vertebratenmodellen, wie der Maus, benötigen Zebrafischembryonen während der ersten 9 Tage ihrer Entwicklung kein intaktes Herz-Kreislaufsystem, da Sauerstoff über Diffusion in den Embryo gelangt (Chen; 1996). Entsprechend kann sich der Zebrafischembryo selbst bei Vorliegen eines schweren kardiovaskulären Defektes und fehlender Blutzirkulation weiterentwickeln und damit eine detaillierte Charakterisierung eines pathologischen Phänotyps zulassen, ohne dass Nebeneffekte des moribunden Embryos berücksichtigt werden müssen (Ackermann, 2003; Driever, 1994; Haffter, 1996; Lohr, 2000). Ein weiterer Vorteil von Zebrafischen im Vergleich zu anderen Vertebratenmodellen liegt in seiner leichten genetischen Manipulierbarkeit.

Neben transienten molekularbiologischen Manipulationstechniken, wie RNA-Überexpression oder siRNA/Morpholino vermittelter antisense Gen *Knockdown*, können leicht transgene oder mutagenisierte Zebrafischlinien erzeugt werden.

Die abgewandelte *antisense*-Methode der Morpholino-Injektion wird erfolgreich angewandt, um im Zebrafisch gezielt Transkripte zu inaktivieren. Sie beruht nicht auf Oligoribonukleotiden (*antisense*-RNAs), sondern auf Morpholino genannten, chemisch synthetisierten RNA-Analoga. Da sie auf Morpholin, anstelle von Ribose, beruhen werden sie Morpholinos genannt.

Im Gegensatz zur gezielten Inaktivierung eines Gens bei "Knock-Outs" dauert die resultierende Inhibition im Idealfall daher nur bis zum dritten Tag der Entwicklung an, weshalb man zur Unterscheidung den Begriff *Knockdown* eingeführt hat; man spricht entsprechend von *Knockdown* oder "morphant-" Phänotypen.

Morpholinos werden mit einer dünnen Glaskapillare in befruchtete Oozyten injiziert, wo sie hybride Doppelstränge mit komplementären mRNA-Einzelsträngen bilden.

Die Nukleotidsequenz des Morpholinos besteht aus 25 Basen und besitzt hundertprozentige Homologie.

Es gibt zwei Strategien zur Wahl des Morpholinos: Idealerweise wird ein Morpholino so gewählt, dass es das Startcodon der Translation (AUG) abdeckt und somit die komplette Translation des Zielgens in das Protein verhindert. Für diese Variante bedarf es aber eines passenden Antikörpers um den *Knockdown* nachzuweisen.

Die zweite Möglichkeit besteht darin, den Morpholino über eine Intron-Exon-Grenze zu legen und damit das gezielte Spleißen eines Transkripts zu verhindern und somit ein inaktives Protein zu produzieren, das die ursprüngliche Funktion nicht mehr ausüben kann.

Der Nachweis erfolgt hierbei über eine PCR, die bei erfolgreichem *Knockdown* ein anderes Bandenmuster (inklusive Intron) zeigt, als nicht injizierte Embryonen.

### **1.2.3 Entwicklung des Zebrafischembryos**

Zebrafisch-Oocyten entwickeln sich innerhalb von 24 Stunden bei 29°C Wassertemperatur zu einem Embryo, welcher bereits alle Organanlagen des späteren adulten Fisches besitzt. Die Schnelligkeit dieser Entwicklungsvorgänge ist einer der Hauptgründe für die Etablierung des Zebrafisches als Modellorganismus. Aus Abbildung 5 ist ersichtlich, dass die Beobachtung der Entwicklung der Embryonen aufgrund der Transparenz des Chorions unter Zuhilfenahme eines Lichtmikroskops ohne Probleme möglich ist.

Die Ausrichtung der Embryonen in ventral-dorsaler, sowie anteriorer-posteriorer Richtung ist zum ersten Mal nach ca. 6 Stunden im so genannten Shield Stadium möglich. Diese Bezeichnung leitet sich von einer Stelle des Keimrings (engl. germ-ring) her, an welcher sich eine Akkumulation von Zellen ausbildet, dem sogenannten Shield, Äquivalent des Spemann-Organisators im Zebrafisch. Dort wird sich in der weiteren Entwicklung die dorsale Seite des Embryos befinden. Das Blastoderm bedeckt zu diesem Zeitpunkt gut die Hälfte des kugelförmigen Embryos, man spricht von 50% oder entsprechend höher-%ualer (Abb. 5) Epiboly, gut sichtbar in der Ansicht auf den Animalpol. Das Blastoderm ist in zwei

unterschiedliche Zell-Lagen differenzierbar, dem äußeren Epi- und inneren Hypoblast. Nach 10 Stunden, dem sogenannten bud-Stadium, bedeckt das Blastoderm bereits fast vollständig den Dotter. Das caudale Ende des Embryos besitzt eine Verdickung (engl. bud). Anterior des Rumpfes (engl. tailbud) befindet sich die verdickte Neuralplatte, deren posteriorer Teil sich zum Rückenmark und den Spinalnerven entwickeln wird.

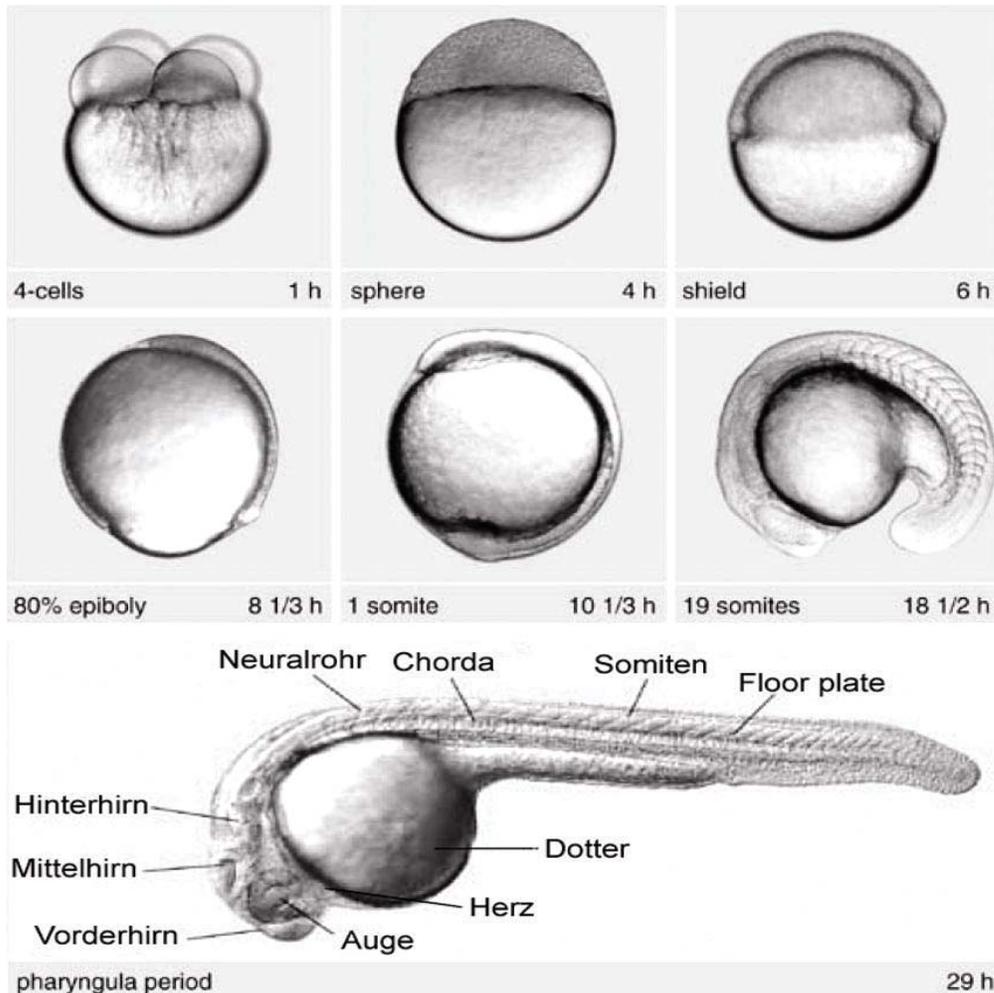


Abbildung 5): Entwicklungsstadien des Zebrafischs (Haffter, P.; 1996). Bei 29 hpf liegt das Herz als peristaltisch kontrahierender Herzschlauch vor, der sich bis 48 hpf zu einem sequentiell kontrahierenden Zweikammerherz entwickelt.

Die ersten 6 Somiten des Embryos sind nach ca. 12 Stunden entwickelt, zur gleichen Zeit sind das Vorläuferorgan der Augen sowie posterior davon das Mittelhirn sichtbar. Die Entwicklung des Rumpfes ist nach 18,5 Stunden (19Somiten) durch Zusammenziehung des Dottersacks gekennzeichnet, welche

den Embryo zu einem relativen Längenwachstum in Bezug zum Durchmesser veranlasst. Die Augenlinse sowie das Gehörvorläuferorgan ist sichtbar und die Dottersackverlängerung klar vom Dottersack abgegrenzt. Das Gehirn ist bereits in seine einzelnen Komponenten (Pros-, Di-, Telencephalon) strukturiert. Nach 24 Stunden (Prim6) schließlich ähnelt der Zebrafischembryo dem menschlichen Embryo in einem vergleichbaren Entwicklungsstadium nach 40-45 Tagen. Die Organanlagen sind vollständig ausdifferenziert, der Embryo außerhalb seines Chorions lebensfähig. Kleinhirn, Epiphyse sowie Hypothalamus im Diencephalon sind unterscheidbar. Das Riechorgan anterior-dorsal des Vorderhirns sowie Otolithen im Gleichgewichtsorgan sind erkennbar. Der letzte Somit ist ausgebildet. Blutbildung, Herz-Kreislauf, Leber und Niere beginnen zu arbeiten. Das schlagende Herz und der pulsatile Blutstrom im Gefäßsystem sind sichtbar. In den folgenden Stunden differenzieren sich die Organe weiter aus, der Embryo streckt sich und der Dotter bildet sich zurück. 72 Stunden nach Befruchtung der Eier befindet sich der Zebrafisch im juvenilen Stadium und entwickelt sich innerhalb der nächsten zwei bis drei Monate zum adulten Männchen oder Weibchen.

### **1.2.4 Embryonale Herzentwicklung im Zebrafisch**

Das Herz des Zebrafischs ist das erste vollständig ausdifferenzierte Organ. Schon 72 Stunden nach Befruchtung der Eizellen (*hours post fertilization*, hpf) ist das kardiovaskuläre System voll ausgereift und entspricht in der Struktur und Funktion dem eines neugeborenen Säugers.

Die Herzvorläuferzellen stammen aus dem anterolateralen Plattenmesoderm (ALPM). Während oder kurz nach der Gastrulation sind diese bilateral entlang der Längsachse organisiert, migrieren zur Mittellinie und verschmelzen zu einem Herzschlauch, der kurz nach seiner Bildung, der sog. kardialen Fusion, beginnt, peristaltisch zu kontrahieren (Abb. 6). Der Herzschlauch besteht aus zwei durch Herzgallert getrennten Zellschichten, dem inneren Endokard und dem umgebenden Myokard, und ist von Beginn an streng organisiert. Von rostral nach kaudal ist der Herzschlauch unterteilt in den *Bulbus arteriosus* oder Ausflusstrakt

(*outflow tract*, OFT), die zukünftige ventrikuläre Kammer, die zukünftige atriale Kammer und den *Sinus venosus* oder Einflusstrakt (*inflow tract*, IFT).

Die zukünftige Position jeder einzelnen Herzzelle im embryonalen Herzen ist bereits im ALPM festgelegt und kann durch spezifische Genexpressionsmuster verfolgt werden. Zusätzlich werden die Vorläuferzellen zwei verschiedenen Zellpopulationen zugeordnet, der ersten und zweiten Herzlinie.

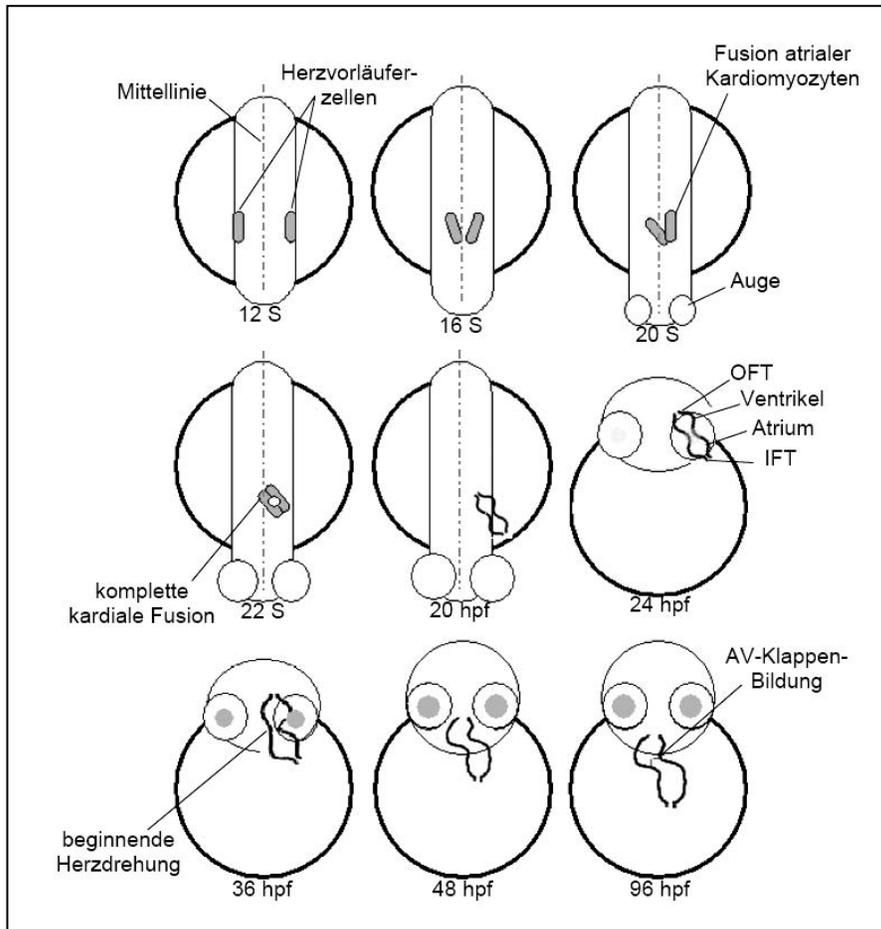


Abbildung 6) Schematische Darstellung der Herzentwicklung im Zebrafisch vom 12 Somiten-Stadium (S) an bis 96 hpf. Dargestellt ist die zeitliche Abfolge der kardialen Fusion, Herzrotation und AV-Klappenbildung

Die Zellen der ersten Herzlinie sind am Aufbau des IFT, des atrioventrikulären Kanals (AVC), des Ventrikels und des Atriums beteiligt, wohingegen die Zellen der zweiten Herzlinie zur Entwicklung des OFT, des Endokards und Teilen des Atriums beitragen (Stennard, F.A; 2005) Wie bei der Entwicklung höherer Vertebraten beginnt sich das Herz des Zebrafischs nach der kardialen Fusion zu drehen, wodurch die spätere Position der Herzkammern festgelegt wird. Parallel zur

Herzdrehung reifen die kontraktile Kardiomyozyten von Atrium und Ventrikel zu Kammerkardiomyozyten heran, entwickeln ein spezialisiertes Erregungsleitungssystem und beginnen zu proliferieren (Stainier, D.Y.; 1992; Weinstein, B.M; 1996)

Das frühembryonale Herz aller Wirbeltiere besteht aus zwei Kammern, einem Atrium mit dünnem Myokard und relativ dicker Herzgallertschicht und einem Ventrikel mit dickem und mehrschichtigem Myokard, bei dem das Herzgallert bereits durch subendokardiales Gewebe ersetzt wurde (Christoffels, V.M.;2004; Serbedzija, G.N., 1998; Stainier, D.Y., 2001; Stainier, D.Y., 1993). Atrium und Ventrikel, die aus venösem Blut mit geringem Blutdruck arterielles Blut mit hohem Druck erzeugen, sind durch den AVC getrennt, der über verschiedene Mechanismen einen unidirektionalen Blutfluss sicherstellt (Hu, N., 2001) Zum einen erzeugt er durch Bündelung und verzögerte Weiterleitung des elektrischen Erregungssignals eine sequentielle Kontraktion beider Kammern ausgehend vom IFT. Dies wird durch die elektrische Isolation der Kardiomyozytenpopulationen von Atrium und Ventrikel durch nichtleitendes Gewebe, dem sog. AV-Ring, erreicht. Das Erregungssignal wird mit Hilfe von Zellen mit verzögerter Erregbarkeit, die im sog. AV-Knoten organisiert sind, überbrückt. Zum anderen werden am AVC flexible AV-Klappen ausgebildet, die bei der ventrikulären Kontraktion den Blutrückfluss ins Atrium verhindern (Lyons, G.E., 1996; Moorman, A.F., 2004; Serbedzija, G.N., 1998; Stainier, D.Y., 2001; Stainier, D.Y., 1992; Trinh le, A., 2004, Yelon, D., 2001). Bis zu diesem Schritt verläuft die embryonale Herzentwicklung in allen Vertebraten gleich. Während das Fischherz an diesem Punkt seine Entwicklung abgeschlossen hat und nur noch durch Zellteilung wächst, entwickeln Vögel und Säugetiere ein weiteres Kreislaufsystem.

### **1.2.5 Heterotrimere G-Proteine im Zebrafisch**

Da der Zebrafisch als sehr junges Modellsystem gilt, und das komplette Genom erst seit kurzem entschlüsselt vorliegt, gibt es bislang keine Forschungsergebnisse, die eine Aussage über komplexe Signaltransduktionswege im Zebrafisch beschreiben. Generell wurden bislang keine biochemischen

Zusammenhänge auf Proteinebene untersucht. So gibt es auch über die Signaltransduktion der heterotrimeren G-Proteine im Zebrafisch bisher keine Veröffentlichungen. Bekannt wurde vor kurzem lediglich, dass ein *Knockdown* der  $\gamma_2$ -Untereinheit Einfluss auf die Angiogenese, bzw. die Ausbildung der Blutgefäße im Zebrafisch hat (Robishaw J.D., 2006).

Sequenzvergleiche der einzelnen G-Protein-Untereinheiten auf Proteinebene zwischen Mensch und Zebrafisch zeigen eine große Homologie zwischen den einzelnen Orthologen.

An  $G\beta_1$ -Untereinheiten sind zwei Kopien im Zebrafisch vorhanden:  $G\beta_1$  (*gnb1* BC\_071277 ) und  $G\beta_{1like}$  (*gnb1l* NM\_213481). Die beiden  $G\beta_1$ -Isoformen des Zebrafisches sind zueinander 99% homolog und zur menschlichen  $G\beta_1$ -Variante jeweils zu 98% auf Proteinebene konserviert. Der  $G\beta_1$ -Dimer-Partner  $G\gamma_2$  ist zu 92% auf Proteinebene zum humanen Ortholog konserviert (homo sapiens (h): NM\_053064; Zebrafisch (z): BC092860).

Alle vier Familien der  $G\alpha$ -Untereinheiten sind im Zebrafisch vertreten. So ist  $G\alpha_s$  zu 81% auf Proteinebene zum menschlichen Ortholog konserviert (h: BC002722; z: NM\_214803),  $G\alpha_{i(3)}$  zu 94% (h: DQ896111; z: NP\_957265),  $G\alpha_{q/11}$  zu 90% (h: NM\_002067; z: NP\_001007774) und  $G\alpha_{12/13}$  zu 85% auf Proteinebene zum menschlichen Ortholog konserviert (h: NM\_007353; z: NP\_001013295)

### 1.2.6 Nukleosid-Diphosphat-Kinasen im Zebrafisch

Wie schon in 1.1.4 beschrieben wird die Familie der NDPKs im Menschen von acht homologen Genen codiert, wobei DNA- und Aminosäuresequenz zwischen den Spezies evolutionär hoch konserviert erhalten geblieben ist. So findet man auch im Zebrafisch alle acht Vertreter. Die beiden Hauptisoformen der ersten Gruppe der NDPK, A und B sind im Zebrafisch am höchsten konserviert: So ist das Ortholog im Zebrafisch zur NDPK A zu 77% (Abb. 9a: *ndpk-Z2* NM\_130927) und das Ortholog zur Isoform B zu 85% (Abb. 9b: *ndpk-Z1* AF\_202052 ) auf Proteinebene zur menschlichen Isoform konserviert. NDPK C ist immerhin noch zu 72% und nm23-H4 ist im Zebrafisch zu 56% auf Proteinebene konserviert.

Die Vertreter der zweiten Gruppe nm23-H5-H8 sind zwischen 30% (nm23-H8) und 64% (nm23-H5) auf Proteinebene konserviert.

### **1.3 Zielsetzung der Arbeit**

In der vorliegenden Arbeit sollte die physiologische Bedeutung des NDPK/G $\beta$  $\gamma$ -Komplexes im *in-vivo*-Modell des Zebrafisches untersucht werden.

Dazu sollte mittels Morpholino-injektion in befruchtete Zebrafischoozyten ein *Knockdown* der Zebrafischorthologen der NDPK A und B, sowie der G $\beta$  $_1$ -Untereinheit durchgeführt werden.

Die Auswirkungen auf die Zebrafischembryonen sollten hinsichtlich der Expression der NDPK, bzw. der G $\beta$  $_1$ -Untereinheit auf Protein- und mRNA-Ebene untersucht werden. Darüber hinaus sollten die Zebrafischembryonen auf einen entstehenden Phänotyp, die Entwicklung und insbesondere auf kardiale Funktionen hin analysiert werden.

Die stark konservierten Homologien der G-Proteine zwischen Mensch und Zebrafisch unterstützen die in dieser Arbeit geplante Forschung, den Mechanismus der heterotrimeren G-Proteine in Funktion, Synthese und Abbau untersuchen zu können.

## 2 Material

### 2.1 Geräte

Autoklav		Systemec
Binokular	MZ 125	Leica
	DM IRB	Leica
	AxioSkop 2 plus	Zeiss
Brutschrank	Bakterieninkubator	Heraeus
	HeraCell	Heraeus
DCD Kamera	DC 500	Leica
	CF 14/4 MC	Kapfa
	Axiocam MRC	Zeiss
Elektroporator		Biorad
Gefrierschränke	Premium	Bosch
Gelelektrophoresekammern,	groß, mittel	PeqLab, Biometra
Agagel Maxi		Biomed. Analytik
GmbH		
Hitzeversiegler		Stratagene
Injektionsapparatur	Femtojet	Eppendorf
Multi Imager		Biorad
Kapillarenzieher	PC-10	Narishige
Konfokalmikroskop		Leica
Kühlschränke		Liebherr
Lightcycler		Roche
Magnetrührer		Omnilab
Mikrotom	RM 2145	Leica
Mikrowelle		Bosch
Multipipetten, elektrisch,	Kainin 250, 1000	Eppendorf
	Mechanisch, Multipette plus	Eppendorf

Pasteurpipetten 5 mL, 10 mL, 25 mL	Neolab
pH-Meter 2001 C	Schwarz
Photometer GeneQuant II Pharmacia	Biotech
Polytron, PT3000)	Kinematica
Schüttler Duomax	Heidolph
Thermoschüttler <i>comfort</i>	Eppendorf
Thermocycler, PTC-100	MJ Research
Videogerät	Grundig
Vortex-Hochgeschwindigkeitsmischer	Werner Hassa GmbH
Waagen     Analysenwaage	Kern
Feinwaage CP 124 S	Sartorius
Wasserbad    Isotemp 2	Fischer Lifesciences
Zentrifugen Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf

## 2.2 Software

ClustalW	EmbNet
Excel	Microsoft
Powerpoint	Microsoft
Photoshop	Adobe
Premiere	Adobe
Primer 3	Whitehead Inst. for Biomedical Research
Word	Microsoft

## 2.3 Datenbanken

Ensemble zV2, zV3, zV4, zV5	<a href="http://www.sanger.ac.uk">www.sanger.ac.uk</a>
Pubmed	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
Zfin	<a href="http://www.zfin.org">www.zfin.org</a>
Vega	<a href="http://vega.sanger.ac.uk">vega.sanger.ac.uk</a> <a href="#">/Danio_erio/blastview</a>

## 2.4 Gebrauchsmaterialien

Drigalski-Spatel/Glasstäbe	Neolab
Duranglasgefäße	Schott
Mehrkanalpipetten 0,5-10 µL, 2,5-25 µL, 25-250 L	Brand
Mikropinzetten, Gr. 1; 55	Neolab
Mikropipetten 0,5-10 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL	Eppendorf
Objekträger	Neolab
Pipettierhilfe acu-jet	Brand
Präparierbesteck	Neolab

## 2.5 Verbrauchsmaterialien

Aluminiumfolie	Neolab
Deckgläschen	Neolab
Dünnschichtchromatographieplatten (PEI Zellulose)	Merck
Elektroporationsküvetten, 2mm	Biorad
Frischhaltefolie	Toppits
Gewebekulturschalen, 15 mm, steril	Greiner Bio-one
Glaskapillaren, dünn, 1,0 mm	World Precision Instruments
Glasplatten, 6 mm	Glas Hlawatsch
Klebefolien für Mikrotiterplatten	Qiagen
Lightcyclerkapillaren	Roche
Nitrocellulose Transfer Membran	Schleicher&Schuell
Objekträger Menzel	Neolab
Pasteurpipetten Plastik	Neolab
Glas	Fischer Lifesciences
PCR-Platten, 96 wells	Steinbrenner
Petrischalen	Greiner bio-one
Pipettenspitzen	Starlab GmbH
Plastikfiltratflaschen 100 mL, 250 mL, 1 L	Nunc Nalgene

Plastikpipetten (5 ml, 25 ml)	Sarstedt
Puderfreie Nitrilhandschuhe	Roth
Puderfreie Untersuchungshandschuhe	BSU, medical
Rasierklingen	Apollo
Reaktionsgefäße 0,2 mL, 1,5 mL, 2 mL	Eppendorf
Skalpelle, Einweg	Feather
Spitzbodenröhrchen 15 mL, 50 mL	Greiner bio-one
Spritzen + Kanüle	Becton & Dickinson
Sterilfilter FP30/0,2 CA-S	Schleicher & Schuell
Verschlussfolie „Parafilm“	Dechney, PlasticPackaging
Versiegelungsfolie Mikrotiterplatte	AB-Gene

## 2.6 Chemikalien

Aceton, p.A.	AppliChem
Agarose	Invitrogen
Ammoniumpersulfat	Sigma
Bis-Acrylamid	Serva
Bromphenolblau	Sigma
Calciumchlorid	Sigma
Calciumnitrat	AppliChem
Chloroform	Sigma
Dimethylformamid	Sigma
Dimethylsulfoxid	Sigma
EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat	Roth
Eisessig, p.A.	AppliChem
Ethanol, p.A.	AppliChem
Ethidiumbromid	Sigma
Formamid I	nvitrogen
Glycerin, wasserfrei	AppliChem
Glycin	Sigma

HEPES	Roth
Isopropanol	Sigma
Kaliumchlorid	Fluka
Kaliumdihydrogenphosphat	Grüssing
LB-Agar	Fluka
LB-Broth	Fluka
Lithiumchlorid	Grüssing
Magnesiumchlorid	Sigma
Magnesiumsulfat	Sigma
MESAB, 3-amino-benzoic acid ethyl ester	Sigma
Methanol	Merck
Methylcellulose	Fluka
Methylenblau	Sigma
Natriumcarbonat	Grüssing
Natriumchlorid	Merck
Natriumhydroxid	Sigma
Paraformaldehyd	Fluka
Phenolrot	Sigma
Phenylthiocarbamid (Phenythiourea, PTU)	Sigma
Polyacrylamid	Serva
Salzsäure, konzentriert (HCl)	Sigma
SDS	Roth
TEMED	Sigma
Triton X-100	Roth
Tris	Roth
Tween-20	Roth
Wasserstoffperoxid, 30% (w/v)	Merck

## 2.7 Lösungen und Reagenzien

Aqua injectabilia	Braun Melsungen AG
Benzoyl Peroxid	Polysciences, Inc.

Biorad Protein Assay	Biorad
Bovine serum albumin, BSA	Sigma
100x BSA	NEB
DMEM	Sigma
Heparin, Natriumsalz	Sigma
IPTG	Sigma
JB-Solution A (Monomer)	Polysciences, Inc.
JB-Solution B (Accelerator)	Polysciences, Inc.
Lipofectamine2000 Reagent	Invitrogen
NBT/BCIP Stock Lösung	Roche
Proteinase Inhibitor Cocktail	Sigma
PMSF	Sigma
SOC-Medium	Invitrogen
Super-Signal-West-Dura-Extended-Duration Substrate	Pierce
Trizol	Invitrogen
10x Roti-Block	Roth

## 2.8 Immunologische Materialien

### 2.8.1 Mediensupplemente

Ampicillin	Sigma
Kanamycin	Sigma

### 2.8.2 Antikörper und Farbstoffe

Methylenblau	Sigma
Digoxigenin-Labeling-Mix	Roche

### 2.8.3 Primär Antikörper

Anti-Digoxigenin, alkal. Phosphatase-gekoppelt	Roche
MF20 (anti-myosin), mouse IgG2b	DSHB
S46 (anti-atrial myosin), mouse IgG	Frank Stockdale
nm23-H2(L-16):sc-17587	Santa Cruz
nm23-H1/2/3 (FL-152):sc-28829	Santa Cruz
G $\beta$ (T-20):sc-378	Santa Cruz
G $\gamma_2$ (A-16); sc-374	Santa Cruz
G $\alpha_s$ (K-20): sc-823	Santa Cruz
G $\alpha_{i3}$ (NEI-801)	Santa Cruz
G $\alpha_{q/11}$ (C-19): sc-392	Santa Cruz
G $\alpha_{12}$	Lab Offermanns, HD
$\beta$ -Actin	Sigma
$\beta$ -Tubulin	Sigma
MAb -GAPDH	Biodesign International
pan Cadherin ( abcam 16505).	abcam

### 2.8.4 Sekundär Antikörper

Anti-rabbit IgG HRP	Amersham
Biosciences	
Anti-mouse IgG HRP	Pierce
Anti-goat IgG HRP sc 2020	Santa Cruz

## 2.9 Molekularbiologische Materialien

### 2.9.1 Peptide und (Oligo) Nukleotide

### 2.9.2 Morpholinos (MO) (antisense-Oligonukleotide) (Gene-Tools)

#### Start-MO: (start Codon Fett)

Zebrafisch *ndpk-Z1* ([AF202052](#)): 5'-GGT GCG CTC GGT CTT AGC AGA **CAT** G-3'

Zebrafisch *ndpk-Z2* ([NM130927](#)): 5'-GGT GCG CTC GGT TTT ACC AGC **CAT** G-3'

Zebrafisch *gnb1* ([BC071277](#)): 5'-CTG GTC GAG TTC GCT **CAT** TTT CTT C-3'

Zebrafisch *gnb1l* ([NM213481](#)): 5'-TGG TCC AGT TCA CTC **ATT** TTC CTC T- 3'

#### Splice MO: (Intron-Sequenz unterstrichen):

Zebrafisch *gnb1*: 5'- AAT TAG GTG GTT AC C TGT GAT AGT-3'

### 2.9.3 Primer (MWG Biotech):

Gnb1splice\_s: 5'-GGC AGT AGG AGA GAG GCA GA-3'

Gnb1splice\_as: 5'-GGC CAA CAG GGT CGA TGT-3'

### 2.9.4 Primer für Light-Cycler (MWG Biotech):

β-Actin\_s 5'-GGC TAC AGC TTC ACC ACC AC-3'

β-Actin as 5'-TAC CGC AAG ATT CCA TAC CC -3'

Gnb1l\_s 5'-GAC GGA CTT ATT CGC TGA CC-3'

Gnb1l\_as 5'-GCT AAC TAG CAG CGG GAG AA -3'

ndpk-z1\_s 5'-CAA GTG CTT GAG AAA AGA CGA G-3'

ndpk-z1\_as 5'-CAG CAT AAG GGC ACA GAA CA -3'

### 2.9.5 Primer für In Situ Hybridisationssonden (MWG Biotech):

Gnb1\_s 5'-CCG AAA GAC GAA AAT CTG GA-3'

Gnb1\_as 5'-AAC AGC GAA CAG AGC TCC AC-3'

Gnb1l\_s 5'-GAC GGA CTT ATT CGC TGA CC-3'

Gnb1l\_as 5'-GCT AAC TAG CAG CGG GAG AA -3'

## 2.10 Molekularbiologische Verbrauchsmaterialien

CybrGreen	Roche
DNA-Größenstandard 100 bp, 1 kb	New England Biolabs
Prestaines Protein Ladder	Fermentas
DNase I	Boehringer Mannheim
dNTP Mix 25 mM	Roche
DTT, 0,1 M	Invitrogen
High-fidelity DNA Polymerase	Stratagene
Protease	Sigma
Proteinase 20 mg/ml	Roche
Restriktionsenzyme	New England Biolabs
RNase-Inhibitor RNA-guard	Amersham
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	Boehringer Mannheim
Sp6-Polymerase	Roche
Superscript II, reverse Transkriptase	Invitrogen
T4-Ligase	Roche
Taq-Polymerase	Qiagen
[8- <sup>3</sup> H]-GDP: 11.3Ci/mmol, 418GBq/mmol	Amersham Pharmacia

## 2.11 Plasmide

pCRII-TOPO Klonierungsvektor	Invitrogen
pCS2plus Expressionsvektor Heidelberg	AG Rottbauer,

## 2.12 Kits

mMessage mMaschine SP6	Ambion
Pure Yield Midi Präp System	Promega
Qiaprep Spin Miniprep kit	Qiagen
PCR Clean-Up System	Promega
Light-Cycler-PCR Kit	Roche
Topo TA Cloning kit	Invitrogen

One Shot Top10 Electrocompetent cells

Invitrogen

### 2.13 Puffer und Lösungen

LB-Medium

1,0% (w/v) Bacto Trypton  
 0,5% (w/v) Bacto Hefeextrakt  
 1,0% (w/v) NaCl  
 ad 1 l H<sub>2</sub>O, pH 7  
 Autoklavieren

5x SDS-PAGE Elektrophorese-Puffer:

0.125 M Tris  
 1.25 M Glycin  
 0.5 % SDS (v/v)

12% SDS-PAGE (15mL)

4,9 mL H<sub>2</sub>O  
 6,0 mL 30% Acrylamid  
 3,8 mL 1,5M tris pH 8,8  
 0,150 mL 10%SDS  
 0,150 mL 10%APS  
 0,006 mL TEMED

5% SDS-PAGE (3mL)

2,1 mL H<sub>2</sub>O  
 0,5 mL 30% Acrylamid  
 3,3 mL 3M Tris/pH6,8  
 0,3%SDS  
 0,066 mL 10%SDS  
 0,066 mL 10%APS  
 0,0066 mL TEMED

15% Tricin Gel (10mL)

0,3 mL H<sub>2</sub>O  
 5,0 mL 30% Acrylamid  
 0,3 mL 2,2%Bisacrylamid  
 3,8 mL 3M TrispH 8,45  
 0,150 mL 10%SDS  
 0,150 mL 10%APS  
 0,006 mL TEMED

## Material

---

Western Blot-Puffer (10x):	38.6 mM	Glycin
	0.479 M	Tris
	0.037 %	SDS (v/v)
Western Blot-Puffer (1x):	500 ml	10x Puffer
	1 L	Methanol
	ad 5L	
Ponceau S-Färbelösung:	0.2 % (w/v)	Ponceau S
	3 % (v/v)	Trichloressigsäure in H <sub>2</sub> O
„Stripping“-Puffer für Western Blot:	2 % (w/v)	SDS
	0.1 M	β-Mercaptoethanol
	62.5 mM	Tris/HCl pH 6.8
10xTBS:	100 mM	Tris/HCl pH 7.4
	1.5 M	NaCl
TBST-Puffer:	10 mM	Tris/HCl pH 7.4
	0.15 M	NaCl
	0.1 % (v/v)	Tween-20
50 x TAE:	2 M	Tris
	5.7 % (v/v)	Essigsäure
	0.05 M	EDTA pH 8
X% iges Agarose Gel	X g	Agarose
	100 ml	TAE (1×)
	0.2 µg/ml	Ethidiumbromid
10 × Ladepuffer	50 %	Glycerin
	100 mM	EDTA pH 8,0
	1 %	SDS
	0,25 %	Bromphenolblau
	0,25 %	Xylencyanol)
Blocking-Puffer 1:	5 %	Schafserum,
	0,2 %	BSA in PBT
Blocking-Puffer 2:	10 %	FCS in PBDT

## Material

---

Blocking-Puffer 3:	1,5	%	FCS in
PBDDanieau´s -Puffer:	58	mM	NaCl 0,7 mM KCl
	0,6	mM	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
	0,4	mM	MgSO <sub>4</sub>
Dent`s-Bleach:	30	%	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30 %
	20	%	DMSO
	50	%	Methanol
Dents-Fix:	80	%	Methanol
	20	%	DMSO
E3-Puffer:	5	mM	NaCl
	0,17	mM	KCl
	0,33	mM	CaCl <sub>2</sub>
	0,33	mM	MgSO <sub>4</sub>
Hybridisierungspuffer:	50	%	Formamid
	25	%	20x SSC
	5	mg/m L	torula RNA,
	50	µg/mL	Heparin
	0,1	%	Tween 20
Infiltrating-Solution:	100	mL	JB4-Solution A
	1,25	g	Benzoylperoxid
Ladepuffer (Agarose):	0,25	%	Bromphenolblau
	0,25	%	Xylencyanol
	30	%	Glycerol
PBDD, 100 mL:	10	mL	10x PBS
	1	mL	DMSO
	100	µL	Tween 20
PBS, 2 L:	16	g	NaCl
	0,4	g	KCl
	2,88	g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	0,48	g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4

## Material

---

PBSBT, 1 L:	100	mL	10x PBS
	1	mL	Tween 20
	2	g	BSA
PBT:	1	x	PBS
	0,1	%	Tween 20
Pronase:	1	g	Protease in 50 mL,
	4		h 37 °C
Proteinase K-Lösung 10 mg/mL:	1	mL	10 % Sarcosyl
	9	mL	0,5 M EDTA pH 8
	10	mg	Proteinase K
PTU, 100x:	20	mM	Phenylthioharnstoff
SSC 20x, 1 L:	175,3	g	NaCl
	88,2	g	Na-Citrat, pH 7,0
TBE, 10x, 1 L:	121,1	g	Tris
	3,72	g	EDTA
51,53 g			Borsäure, pH 8

### 2.14 Feste Nährböden für Bakterien

Zur Herstellung fester Nährböden wird LB-Medium vor dem Autoklavieren mit 1,5% (w/v) Bacto Agar ergänzt. Für Selektion auf Antibiotika-Resistenzen wird das agarhaltige Medium nach dem Autoklavieren auf 60°C abgekühlt, erst dann kann der gewünschte Medienzusatz hinzugefügt werden. Die so hergestellten LB-Platten können bei 4°C 4-8 Wochen gelagert werden.

## **2.15 Fischlinien**

### **2.15.1 TE4/6**

Die verwendeten Zebrafische sind vom Stamm *Danio rerio*. Diese Fischart gehört zur Familie der Cyprinidae, Ordnung Cypriniformes. Bei der Linie TE4/6 handelt es sich um eine Wild-Typ Linie aus der Fischzucht des Max Planck-Instituts in Tübingen. Sie entstanden aus einer Kreuzung der Linieen TL, einer Linie, die getupft ist, einen sogenannten „Leo-Marker“ und lange Flossen hat und TÜ, die ursprünglich aus einer Tübinger Zoohandlung kam, aber schon seit Jahren etabliert ist.

### **2.15.2 Fli-Linie**

Bei der Fli-Linie handelt es sich um eine, durch ein kloniertes 7kb Fragment des Fli 1 Promotors, in den Endothelzellen EGFP-exprimierende transgene Fischlinie (ZFIN: Tg(fli1:nEGFP). Die Embryonen und adulten Fische beider Fischlinien werden am Otto-Meyerhof-Zentrum in Heidelberg in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Wolfgang Rottbauer gezüchtet (Nach Kimmel et al.).

### **3 Methoden**

#### **3.1 Makroskopische und mikroskopische Methoden**

##### **3.1.1 Fischzucht und Verpaarung**

Die Fischzucht erfolgt nach Anleitung des Buches: „THE ZEBRAFISH BOOK- A guide for the laboratory use of zebrafish *Danio\** (*Brachydanio*) *rerio*” (Monte Westerfield, Institute of Neuroscience, University of Oregon)

Zur Verpaarung werden die Fische am Nachmittag zuvor in Verpaarungstanks überführt, in denen Männchen und Weibchen durch ein Sieb vom Boden getrennt und durch eine Trennwand voneinander separiert sind.

Am nächsten Vormittag (zwischen 8h-10h) werden die Trennwände entfernt. Nach max. 30 Minuten können dann die Eier in E3-Puffer gesammelt werden. Die Embryonen werden bei 28,5 °C in E3-Medium mit Methylenblau (fungizid, bakterizid) großgezogen. Zur Unterdrückung der Pigmentbildung zu Dokumentationszwecken wird dem E3-Medium 100x PTU (1:100 verdünnt) zugegeben.

##### **3.1.2 Foto- und Videodokumentation**

Die Embryonen werden zusammen mit 2,5 % Methylzellulose in die Mulde eines Objektträgers gegeben und darin mit Hilfe einer Präpariernadel ausgerichtet. Die Fotodokumentation erfolgt am Leica-Stereomikroskop oder am Zeiss-Stereomikroskop AxioSkop. Je nach Zielsetzung können dabei Durchlichtaufnahmen (meist lebende Embryonen) oder Hellfeldaufnahmen (meist fixierte und gefärbte Embryonen) mit separater Lichtquelle durchgeführt werden. Danach werden lebende Embryonen in E3 und fixierte Embryonen in PBS gewaschen. Zur Videodokumentation werden die Embryonen mit Hilfe der Videokamera Typ CF 15/4 MC von Kafka mindestens 10 Sekunden gefilmt.

### 3.1.3 Injektion von Oligonukleotiden (Morpholino) in Zebrafischembryonen

Der Zebrafisch bietet als Modell den Vorteil, dass sich Gene mittels Morpholino - Injektion ähnlich gut ausschalten lassen, wie beim herkömmlichen „Knock-Out“ in anderen Tiermodellen.

Diese abgewandelte *antisense*-Methode wird erfolgreich angewandt, um im Zebrafisch gezielt Transkripte zu inaktivieren. Sie beruht nicht auf Oligoribonukleotiden (*antisense*-RNAs), sondern auf Morpholino genannten, chemisch synthetisierten RNA-Analogen. Da sie auf Morpholin, anstelle von Ribose, beruhen werden sie Morpholinos genannt.

Im Gegensatz zur gezielten Inaktivierung eines Gens bei *knockouts* dauert die resultierende Inhibition im Idealfall daher nur bis zum dritten Tag der Entwicklung an, weshalb man zur Unterscheidung den Begriff *knockdown* eingeführt hat; man spricht entsprechend von *knockdown* oder "morphant-" Phänotypen.

Morpholinos werden mit einer dünnen Glaskapillare in befruchtete Oozyten injiziert, wo sie hybride Doppelstränge mit komplementären mRNA-Einzelsträngen bilden. Die Nukleotidsequenz des Morpholinos besteht aus 25 Basen und besitzt hundertprozentige Homologie. Es gibt zwei Strategien zur Wahl des Morpholinos: Idealerweise wird ein Morpholino so gewählt, dass es das Startcodon der Translation (AUG) abdeckt und somit die komplette Translation des Zielgens in das Protein verhindert. Für diese Variante bedarf es aber eines passenden Antikörpers um den „Knock-Down“ nachzuweisen.

Die zweite Möglichkeit besteht darin, den Morpholino über eine Intron-Exon-Grenze zu legen und damit das gezielte Spleißen eines Transkripts zu verhindern und somit ein „nonsense“-Protein zu produzieren, das die ursprüngliche Funktion nicht mehr ausüben kann.

Der Nachweis erfolgt hierbei über eine PCR, die bei erfolgreichem *knockdown* ein anderes Bandenmuster (inklusive Intron) zeigt, als nicht injizierte Embryonen.

Zur Vorbereitung der Mikroinjektion werden aus 3 % Agarose in E3 Injektionsrampen hergestellt. Die Injektionsrampen bestehen aus 6 asymmetrischen, 3 mm breiten und 5 cm langen Rinnen, welche durch eine Plastikmatrize in der erstarrenden Agarose erzeugt werden.

Die Injektionsnadeln werden aus Glaskapillaren mit Hilfe des PC-10 in einem 2-Schritt-Programm gezogen, wobei Schritt 1 bei 85 °C und Schritt 2 bei 75°C durchgeführt wird. Vor Gebrauch müssen die Injektionsnadeln mit Hilfe einer feinen Pinzette geöffnet werden.

Die Embryonen werden in den Injektionsrampen aufgereiht und im 1-8-Zellstadium mit Hilfe des Femtojet injiziert. Die typischen Injektionseinstellungen sind: Injektionsdruck 400 hPa, Injektionsdauer 0,1 s, Kapillardruck 3 hPa. Je nach Öffnung der Injektionsnadel können diese Angaben aber stark variieren. Die Injektion erfolgt in den Dotterstrom bzw. besser, zur gleichmäßigeren Verteilung, direkt in die erste entstehende Zelle, wobei das injizierte Volumen maximal 1/8 des Dottersackvolumens betragen darf. Die injizierten Eier werden in eine mit E3 gefüllte Petrischale übertragen und 6 h bei 28,5 °C inkubiert. Danach werden die abgestorbenen Embryonen weggesammelt, die Übrigen mit E3-Puffer mit Metylenblau und PTU über Nacht bei 28,5 °C inkubiert.

Nach 24h können gegebenenfalls die Chorions mit Hilfe von zwei feinen Pinzetten entfernt werden. Das Medium wird alle 24h erneuert.

### **3.2 Histologische Methoden**

#### **3.2.1 Einbettung von Embryonen in JB4**

Für histologische Analysen werden die Embryonen in 4 % PFA über Nacht bei 4 °C oder für 2-3 h bei RT fixiert und anschließend in einer aufsteigenden Ethanolreihe in 100 % Ethanol überführt, in welchem die Embryonen über mehrere Monate bei -20 °C gelagert werden können. Danach werden die Embryonen 12 h bei 4 °C in frisch hergestellter Infiltrationslösung inkubiert, welche dabei mehrmals gewechselt wird. Zur Einbettung werden 1,5 mL Infiltrating-Solution mit 60 µl JB4-Lösung B vermischt und zusammen mit den Embryonen in eine Einbettungsform gegeben, in

welcher die Embryonen dann mit Hilfe einer Präpariernadel ausgerichtet werden (dem Kopf stehend für Transversal- und auf der Seite liegend für Sagittalschnitte). Nach etwa 10 min beginnt die Lösung zu erstarren. Die Blöcke werden nach einem Tag aus der Form gelöst und für weitere 2-3 Tage ausgehärtet.

### **3.2.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Die Blöcke mit den in JB4 eingebetteten Embryonen werden mit dem Mikrotom RM 2145 von Leica je nach Anwendung in 4–15 µm dicke Scheiben geschnitten, welche auf unbehandelte Objektträger aufgezogen werden. Die Färbung erfolgt durch 10 min Inkubation in Hämatoxylin und Eosin, jeweils gefolgt von einem Waschschrift von 10 min mit fließendem Wasser.

## **3.3 Immunologische Methoden**

### **3.3.1 In-situ-Hybridisierung**

Die PFA-fixierten und in Methanol gelagerten Embryonen werden bei RT in einer absteigenden Methanolreihe (75 % MeOH/25 % PBT, 50% MeOH/50 % PBT, 25 % MeOH/75 % PBT) je 5 Minuten rehydriert und anschließend 4x für 5 min in PBT gewaschen. Embryonen ab dem 24 hpf-Stadium werden jetzt mit 10 µg/ml Proteinase K bei RT für 20 min (24 hpf), 30 min (36 hpf), 40 min (48 hpf) bzw. 50 min (72 hpf) verdaut. Embryonen älterer Entwicklungsstadien werden mit entsprechend höherer Proteinase K-Konzentration verdaut. Danach werden die Embryonen 2x mit PBT gewaschen, 20 min mit 4 % PFA refixiert und nochmals 2x mit PBT gewaschen. Zur Prähybridisierung der Embryonen, d.h. zur Absättigung der unspezifischen DNA- und RNA-Bindestellen, werden diese anschließend in Hybridisierungspuffer bei 70 °C für 4-5 h inkubiert. Danach werden die Embryonen in Hybridisierungspuffer mit der RNA-Sonde über Nacht bei 70 °C inkubiert.

Am nächsten Tag werden die Sonden zur Wiederverwendung gesammelt und die Embryonen bei 70 °C für je 10 min mit 75 % Hybridisierungspuffer/25 % 2x SSC, 50 % Hybridisierungspuffer/50 % 2x SSC, 25 % Hybridisierungspuffer/75 % 2x SSC, 100 % 2x SSC gewaschen. Danach werden die Embryonen 2x 30 min bei

70 °C mit 0,2x SSC gewaschen. Dann werden die Embryonen bei RT für 5 min mit 75 % 0,2x SSC/25 % PBT, 50 % 0,2x SSC/50 % PBT, 25 % 0,2x SSC/75 % PBT und 100 % PBT gewaschen und 2 h mit Blockingbuffer 1 inkubiert, wobei unspezifische Antikörperbindestellen abgedeckt werden. Die Antikörperreaktion mit 1:2000 in Blockingbuffer 1 verdünnten Alkalische Phosphatase-konjugierten, anti-Digoxigenin- Fab-Fragmenten erfolgt bei 4 °C über Nacht.

Am nächsten Tag werden die Embryonen bei RT 4x kurz und 4x für je 30 min mit 2 mg/ml BSA in PBT gewaschen. Anschließend werden die Embryonen 3x für 5 min in frisch hergestelltem NTMT-Puffer äquilibriert und in 24-Loch-Zellkulturschalen überführt. Die Färbereaktion erfolgt bei RT mit 20 µL NBT/BCIPLösung/ mL NTMT im Dunkeln unter leichtem Schütteln und muss in regelmäßigen Abständen kontrolliert werden. Das Abstoppen der Färbereaktion erfolgt durch mehrmaliges Waschen mit PBT. Der Dotter kann durch Waschen der Embryonen mit 100 % Ethanol aufgeklärt werden, wodurch eine erheblich bessere Dokumentation ermöglicht wird, ein schwaches Signal aber auch verloren gehen kann.

### **3.3.2 Doppelimmunfluoreszenzfärbung**

Für Doppelimmunfärbungen werden die Embryonen bei RT 12 h in Dent's Fix fixiert und 24 h mit Dent's Bleach gebleicht. Die gebleichten Embryonen werden in 100 % Methanol überführt und können so bei -20 °C gelagert werden. Die so fixierten Embryonen werden erst in einer absteigenden Methanolreihe (75 % MeOH/25 % PBT, 50 % MeOH/50 % PBT, 25 % MeOH/75 % PBT und 100 % PBT) je 5 min rehydriert und anschließend 3x mit PBDT gewaschen. Danach wird bei 4 °C 90 min mit Blockingbuffer 2 geblockt und über Nacht mit dem ersten primären Antikörper in Blockingbuffer 3 inkubiert (1:50-1:200). Am nächsten Tag werden die Embryonen bei 4 °C 4x 30 min mit Blockingbuffer 3 gewaschen und über Nacht mit dem zweiten primären Antikörper in Blockingbuffer 3 inkubiert. Am nächsten Tag werden die Embryonen erneut bei 4 °C 4x 30 min mit Blockingbuffer 3 gewaschen und anschließend bei RT 3 h mit dem ersten sekundären Antikörper in Blockingbuffer 3 inkubiert (1:100). Danach werden die Embryonen erneut 4x 30

min mit Blockingbuffer 3 gewaschen und 3 h mit dem zweiten sekundären Antikörper inkubiert. Die Embryonen werden 3x 2 min in PBSBT gewaschen und bei 4 °C gelagert.

### **3.4 Proteinbiochemische Methoden**

#### **3.4.1 Präparation von Zebrafisch-Protein-Homogenaten**

Die Embryonen müssen zum Zeitpunkt, an dem sie abgesammelt werden ohne Chorion sein, d.h. es sollte vorher entfernt worden sein, da im Western-Blot die Dotterproteine bei der Detektion stören. Oder die Embryonen sind alt genug (nach 48hpf) und sind selbständig geschlüpft.

Die Embryonen werden mit Hilfe von einer Pipette abgesammelt und in ein 2mL Eppendorfgefäß überführt.

Zur Proteingewinnung werden die Embryonen mit 1mL „Deyolking“-Puffer vom Dotter befreit, indem sie mit einer 1000µl Pipette auf- und abpipettiert werden bis sich der Dotter vollständig gelöst hat. Anschließendes zweimaliges Waschen mit 1mL „Washing“-Puffer und zwischenzeitliches pelletieren bei 3000rpm reinigt die Embryonen ausreichend, so dass sie in Lyse-Puffer (1x PBS mit 1mM Proteinase Inhibitor Cocktail, 1mM PMSF und 1% Triton) homogenisiert werden können. Pro Embryo setzt man ca. 5µl ein.

Das Homogenisieren erfolgt ab 100µL Endvolumen mit einem elektrischen Polytron (Kinematica AG), bei geringeren Volumina mit Hilfe einer feinen Kanüle.

Anschließend werden noch die ungelösten Zellbestandteile bei 10 000 rpm für 5min anzentrifugiert.

#### **3.4.2 Protein-Konzentrationsbestimmung**

Die Proteinkonzentrationen werden nach dem Verfahren von Bradford mit einer 5-fach konzentrierten Gebrauchslösung der Firma Biorad bestimmt. Für die Protein-Standardreihe wurden 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 und 2µg BSA in 250µl Gesamtvolumen in einer Mikrotiterplatte verwendet. Dazu wird das jeweilige Probenvolumen mit H<sub>2</sub>O auf 50µL aufgefüllt und 200µL des 1:4 in H<sub>2</sub>O vor verdünnten BioRad-Reagenz

zugegeben. Alle Proben werden dreifach angesetzt und nach einer kurzen Inkubationzeit bei 595nm im ELISA-Reader gemessen.

### **3.4.3 Western-Blot**

5-10µg Protein wird nach Zugabe von 4fach SDS-PAGE Probenpuffer 5min bei 95°C, oder 10 min bei 80°C schonender, denaturiert. Der prozentuale Anteil der Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung des Trenngels, bei der anschließenden diskontinuierlichen SDS-PAGE variierte mit der Größe des nachzuweisenden Proteins von 8-15%. Die Gelelektrophorese wird in einer Mini-Gelapparatur von BioRad nach Laemmli (1970) durchgeführt. Anschließend werden die Proteine in einem Nass-Blot-Verfahren auf eine Nitrocellulose-Membran (NC) transferiert. Die Transferzeit beträgt 1h bei 100V.

Nach dem Transfer wird mit einer 0.2%-igen PonceauS-Lösung eine Färbung aller Proteine durchgeführt. Überschüssiges PonceauS wird mit Wasser entfernt und anschließend die Intensität der Färbung mit dem BioRad-MultImager dokumentiert. Danach werden die Membranen in TBST entfärbt und die freien Bindungsstellen der Membran mit 5% BSA in TBST für 30min blockiert. Anschließend wird die NC-Membran mit dem jeweiligen spezifischen Primärantikörper in der angegebenen Verdünnung für 1h bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht in TBST inkubiert, dreimal mit TBST für je 10min gewaschen und anschließend mit entsprechenden in TBST verdünnten Sekundärantikörper für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für je 10min in TBST erfolgt der Nachweis der Primär-Sekundärantikörperkomplexe über die an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase durch die Zugabe des Chemilumineszent-Substrates LumiLight (ROCHE). Die Bandenintensitäten werden mit dem BioRad-MultImager aufgenommen.

Zur Entfernung der gebundenen Antikörper von der Blot-Membran werden die Blots für 60 min bei 60°C mit Stripping-Puffer unter leichtem Schütteln inkubiert, anschließend für 3x5 min mit TBST gewaschen. Vor der erneuten Antikörperfärbung wird die Blot-Membran erneut mit 5% BSA für 30min blockiert.

### 3.4.4 NDPK-Aktivitätsassay

Die Messung der Aktivität der Nucleosid Diphosphat Kinase in Zebrafisch-Homogenaten erfolgt in einem radioaktiven Versuchsansatz und beruht auf der Phosphorylierung von  $[8\text{-}^3\text{H}]\text{-GDP}$  zu  $[8\text{-}^3\text{H}]\text{-GTP}$  unter Verbrauch von ATP.

Der Assay wird als Dreifachbestimmung in einem Gesamtvolumen von je  $100\mu\text{L}$  durchgeführt. Davon werden  $50\mu\text{L}$  als Reaktionsansatz mit folgender Zusammensetzung vorbereitet:

Reaktionsansatz:

Substanz	Endkonzentration (in $100\mu\text{l}$ )
TEA pH 7,5	50mM
cAMP	0,1mM
EDTA	1mM
DTT	1mM
ATP	0,1mM
$\text{MgCl}_2$	3mM
GDP	$100\mu\text{M}$
$[8\text{-}^3\text{H}]\text{-GDP}$	$10^6\text{cpm}^* = 1\mu\text{Ci}$

\*  $0,1\text{ Ci/mmol GDP}$

Die empirisch ermittelte, optimale Proteinmenge für Zebrafisch-Homogenate liegt bei  $3\mu\text{g}$  pro  $50\mu\text{L}$  Ansatz.

Das Protein wird in  $50\mu\text{L}$  mit 50mM TEA, pH 7,5 in den Reaktionsgefäßen vorgelegt. Vor Reaktionsbeginn wird das Protein bei  $4^\circ\text{C}$  mit Alamethicin im Verhältnis 1:1 (w/w) für 20min vorinkubiert. Alamethicin erhöht die Durchlässigkeit von Membranvesikeln und gewährleistet somit einen verbesserten Zugang der Substrate an die Innenseite der Membranen.

Als Leerwert dient ein Reaktionsansatz ohne Protein. Die enzymatische Reaktion wird durch Zugabe des Reaktionsansatzes gestartet, für 10min bei  $37^\circ\text{C}$  im Wasserbad inkubiert, danach durch Zugabe von  $10\mu\text{L}$  5%iger SDS-Lösung gestoppt. 10% des Reaktionsvolumens werden in  $2\mu\text{L}$  Schritten auf eine Dünnschichtchromatographie-Platte (PEI cellulose, Merck) aufgetragen. Zur besseren Auftrennung der Guanin-Nucleotide im Reaktionsansatz werden zuvor

2µl einer je 3mM GMP/GDP/GTP-Lösung aufgetragen. Die Auftrennung der Nukleotide im Laufmittel (1M LiCl und 2M Ameisensäure im Verhältnis 1:1) für 20-30min kann mittels UV-Licht überprüft werden. Anschließend werden die einzelnen Nukleotid-Spots ausgeschnitten und die Radioaktivität in 4mL Szintillationsflüssigkeit gemessen.

Die NDPK-Aktivität ergibt sich dann aus dem Verhältnis der [<sup>3</sup>H]-GTP-Aktivität zur Gesamt-Aktivität aller [<sup>3</sup>H]-Guaninnukleotide.

### **3.5 Molekularbiologische Methoden**

#### **3.5.1 RNA-Isolation**

Für die RNA-Isolation werden ca. 50-100 Zebrafischembryonen benötigt, die nach Entfernung des Mediums in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und bei -80°C bis zur Verwendung gelagert werden. Nach Zugabe von 1mL Trifast-Gold (PeqLab) werden die Embryonen mit dem Polytron homogenisiert. Danach werden 200µL Chloroform zugegeben und die Phasen für 15s kräftig vermischt. Die Mischung wird für 2-3 min bei RT inkubiert und dann für 15min in einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die farblose wässrige Phase wird vorsichtig in ein frisches Gefäß überführt und mit 500µL Isopropanol vermischt. Der Ansatz wird für 10min bei RT inkubiert und anschließend bei 13.000 rpm und 4°C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Sediment mit 1mL 75 % Ethanol gewaschen. Das Sediment wird für 20min getrocknet. in 50µL ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und 5min bei 50°C gelöst. Nach photometrischer Konzentrationsbestimmung der RNA wird diese bei -80°C gelagert.

#### **3.5.2 Plasmid-Isolation aus E.coli**

Die Isolation von Plasmiden aus *E.coli* erfolgt mit dem „GenElute™ HP Plasmid Midiprep Kit“ (Promega) nach den Angaben des Herstellers und basiert auf der Bindung von DNA an Silikatoberflächen unter chaotrophen Pufferbedingungen. Die Elution erfolgte je nach Ansatzgröße in 50µL oder 100µL dd H<sub>2</sub>O.

### **3.5.3 Gelelektrophorese**

Die Gelelektrophorese dient der Identifizierung und Trennung von DNA-Fragmenten bzw. Gesamt-RNA und beruht auf der Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld. Als Referenz für das Molekulargewicht diente ein DNA-Längenstandard (100bp Marker), der zusammen mit den Proben elektrophoretisch aufgetrennt wurde. Die Elektrophorese erfolgte in horizontalen Gelen mit 1% Agarose, die durch Kochen in 1xTAE-Puffer gelöst wurde. Nach Abkühlung auf ca. 40°C wurden 0,5µl Ethidiumbromid (10mg/mL) zugesetzt, das in dsDNA interkaliert, die dadurch im UV-Licht fluoresziert.

Je 10µL der Proben wurden mit 2µL 6x Lade-Puffer gemischt und in die Slots pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei RT unter einer konstanten Spannung von 2-9 V/cm. Die Gele wurden unter UV-Licht (302 nm) analysiert und zur Dokumentation durch den BioRad-MultImager aufgezeichnet.

### **3.5.4 Gelextraktion/ DNA-Aufreinigung**

Die Extraktion von DNA aus Agarosegelen nach dem Ausschneiden der Fragmente, sowie die Aufreinigung von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten nach PCR oder Restriktionen erfolgt mit Hilfe des „Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System“ (Promega) nach Herstellerangaben.

### **3.5.5 Konzentrationsbestimmung von DNA/RNA**

Anhand der Extinktion wird die Konzentration der DNA mit einem Spektralphotometer (LKB Ultrospec III, Pharmacia, Freiburg) bestimmt. Es wird eine Quarzküvette mit 1cm Schichtdicke verwendet. Nach Eichung des Photometers mit H<sub>2</sub>O wird die in H<sub>2</sub>O gelöste DNA bei den Wellenlängen 260 und 280 nm gemessen. Eine OD<sub>260</sub> von 1 entspricht bei einer Schichtdicke von 1 cm 47,5µg/mL doppelsträngiger DNA, 40µg/mL einzelsträngiger DNA/RNA und etwa 30µg/mL einzelsträngiger Oligonukleotide. Das Verhältnis zwischen den Extinktionen bei 260 und 280 nm gibt Aufschluss über mögliche Verunreinigungen mit Proteinen, wobei die Zielwerte zwischen 1,5 und 2 liegen sollten.

### **3.5.6 Reverse Transkription**

Es wird pro Ansatz 2µg RNA in 2µL eingesetzt. Die RNA wird für 5min auf 68°C erwärmt, danach auf Eis gestellt und kurz zentrifugiert. Dazu wird ein Mastermix nach Herstellerangaben (Invitrogen) zugegeben. Der Ansatz wird kurz zentrifugiert und für 50min bei 37°C inkubiert, anschließend für 5min bei 95°C denaturiert, auf Eis gestellt und abzentrifugiert. Die Lagerung der cDNA erfolgt bei -20 °C.

### **3.5.7 Quantitative Real-Time PCR/Light Cycler**

Das Light Cycler System erlaubt eine quantitative und qualitative PCR mit Hilfe des Farbstoffes Sybr Green I. Dieser fluoresziert nur, wenn er an Doppelstrang DNA (dsDNA) gebunden ist.

Der Beginn der exponentiellen Produkt-Zunahme, der linearen Logphase der PCR, wird aufgrund der Fluoreszenzzunahme bestimmt und entspricht dem sogenannten crossing point. Dieser korreliert mit der Anfangskonzentration der zu amplifizierenden cDNA-Sequenz und kann deshalb zur Quantifizierung der Transkripte herangezogen werden.

Im Anschluss an die letzte Elongationsphase der PCR wird jeweils eine Schmelzkurvenanalyse zur Identifizierung des spezifischen Produktes durchgeführt. Jedes PCR-Produkt besitzt eine charakteristische Schmelztemperatur  $T_M$ , die sowohl von seiner Länge als auch vom GC-Gehalt abhängig ist. Durch die Ermittlung der  $T_M$  einer Probe ist die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte (post PCR Schritt) überflüssig. Vom Mastermix, nach Herstellerangaben angefertigt, wird jeweils 18µl in den speziell für den Light Cycler konzipierten Glaskapillaren vorgelegt. Hinzu kommen je 2µL cDNA bzw. H<sub>2</sub>O für die Wasserkontrolle. Um zu vermeiden, dass auftretende Primerdimere bei der Fluoreszenzmessung der Marker-Transkripte mit erfasst werden, wird die Messung bei einer Temperatur oberhalb des Schmelzpunktes der Primerdimere und unterhalb des  $T_M$  der von den spezifischen cDNAs generierten PCR-Produkte vorgenommen.

**Light-Cycler:**

Zeit	Temperatur	Anzahl der Zyklen
10sec	95°C	50 x
10sec	55°C	
20sec	72°C	

**3.5.8 PCR mit Taq-Polymerase**

Zur Synthese von DNA-Sonden und zur gerichteten Klonierung wird die PCR-Technik (Mullis *et al.*, 1986) mit der thermostabilen Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Saiki *et al.*, 1988) angewendet.

Menge	Reagenz	Volumen
10x	PCR-Puffer (Roche)	10µl
10mM	je dNTP	2µl
10pmol/µl	Primer A	4µl
10pmol/µl	Primer B	4µl
5U/µl	Taq DNA-Polymerase (Roche)	0.5µl
10-500ng	Template-DNA	xµl
xµl	H <sub>2</sub> O	ad 100µl

**PCR:**

Zeit	Temperatur	Anzahl der Zyklen
4min	95°C	1x
30sec	95°C	35 x
30sec	55°C	
1min	72°C	
5min	72°C	1x
∞	4°C	-

### 3.5.9 PCR Programm

Die Möglichkeit einer Fehlpaarung der Primer mit der Template-DNA wird durch Ansetzen der Reaktion auf Eis reduziert. Der gesamte Reaktionsansatz wird daraufhin in die auf Denaturierungstemperatur vorgeheizte PCR-Maschine gestellt („vereinfachter Heißstart“).

Die PCR-Produkte werden anschließend nach Protokoll in den pCR2.1TOPO-Vektor (TopoTA Cloning Version K, Invitrogen), pCS2+ (MT) kloniert oder einem Restriktionsverdau unterzogen.

### 3.5.10 Restriktionsverdau von DNA

Der Restriktionsverdau von DNA wird zur Analyse in 20-30µl und zur Präparation in 50-200µl Ansätzen durchgeführt. In der Regel werden dabei 1µg DNA mit 1-10U Enzym 1-4h bei 37°C in dem vom Hersteller angegebenen Reaktionspuffer inkubiert. Analytische Restriktionen werden für 30 min und präparative Restriktionen für 3 h bei 37°C inkubiert.

### 3.5.11 Alkalische Dephosphorylierung von Plasmiden

Um die Religation von Plasmiden bei der Ligation zu verhindern, werden die Enden der linearen Plasmide durch Alkalische Phosphatase dephosphoryliert. Dazu werden 26µL Plasmid mit 3µL SAP-Puffer und 1µL Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP) versetzt und 1h bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die SAP für 20min bei 65 °C hitzeinaktiviert.

### 3.5.12 Ligation von DNA

Die Ligation von DNA-Fragmenten mit linearen Vektoren erfolgt im molekularen Verhältnis von 6:1 bei einem Temperaturgradient von 37 °C bis 4 °C. Ein typischer Ligationsansatz besteht aus

x	µl	Vektor
x	µl	Insert
2	µl	T4 DNA-Ligase-Puffer
1	µl	T4-Ligase (400U)
x	µl	H <sub>2</sub> O ad 20µl

Der Reaktionsansatz wurde ON bei 4°C (kohesiv) oder RT (Blunt-End) inkubiert.

### 3.5.13 Transformation von E.coli

Für die Transformation in elektrisch kompetente Zellen durch Elektroporation werden zuerst 50µL kompetente Zellen auf Eis aufgetaut. Danach werden 1-5µL DNA zu den Zellen gegeben, diese gemischt und 30 s auf Eis inkubiert. Danach werden die Zellen in auf Eis vorgekühlte Elektroporationsküvetten (2mm) überführt und in der Elektroporationskammer für 0,1s mit 2,5kV elektroporiert. Die Zellen werden anschließend in 500µL SOC-Medium aufgenommen, 1h bei 37 °C inkubiert und auf Selektionsplatten ausgestrichen.

### 3.5.14 Herstellung von antisense-RNA-Sonden

Die Herstellung von *antisense*-RNA-Sonden, sog. Hybridisierungs sonden für ISH, umfasst die Amplifikation und Klonierung eines mRNA-Fragments des Zielgens, dessen Sequenzierung und Herstellung einer spezifischen *antisense*-RNA aus dem Plasmid. Die mRNA-Fragmente werden so gewählt, dass sie eine möglichst geringe Homologie zu anderen Genen haben, wobei oft auf die 5'- und 3'-untranslatierten Regionen zurückgegriffen wird.

Nach Amplifikation, Klonierung, Sequenzierung und Orientierung dieser Fragmente im Plasmid werden 5µg des Plasmids hinter dem Insert in *antisense*- Richtung durch Restriktionsverdau linearisiert. Nach 3 h Inkubation bei 37°C wird das linearisierte Plasmid mit dem „Qiagen nucleotide removal Kit“ nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt und in 23µL ddH<sub>2</sub>O eluiert, wovon 20µL in der anschließenden *in vitro*-Transkription eingesetzt werden. Je nach Orientierung des Gens im Plasmid und Art des Plasmids werden zur Transkription der *antisense*-RNA die T7-, T3- oder SP6-Polymerase verwendet. Zu 20µL Plasmid werden dazu 3µL 10x Transkriptionspuffer, 3µL Digoxigenin- oder Fluorescein-RNA Labeling Mix (Roche), 1,5µL RNase-Inhibitor und 2,5µL der jeweiligen Polymerase zugegeben. Nach 2 h Inkubation bei 37°C wird die DNA durch Zugabe von 3µL DNase und 15 min Inkubation bei 37°C degradiert. Die Fällung der RNA erfolgt durch Zugabe von 3µL 0,2 M EDTA, 3,75µL 4M LiCl und 112,5µL Ethanol (-80 °C vorgekühlt) und Inkubation für mindestens 2h bei -20°C. Die RNA wird anschließend bei 14.000 rpm und 4°C 20 min sedimentiert und das Pellet mit 70 %

Ethanol gewaschen. Das Sediment wird 20 min bei RT getrocknet, in 100µL Hybridisierungspuffer aufgenommen und bei –80 °C gelagert. Die Sonden werden in Verdünnungen von 1:10 bis 1:100 eingesetzt. Zur Entfernung überschüssiger Nukleotide oder unspezifischer Produkte kann die Sonde an Embryonen bei 70 °C über Nacht zwei bis dreimal vorinkubiert oder über eine Sepharex-Säule aufgereinigt werden.



Injektion, neue Erkenntnisse über die physiologische Bedeutung dieses Enzyms zu erhalten.

#### 4.1.2 Wahl der NDPK-Morpholinos und Injektion

Um eine Depletion der beiden NDPK A und B-Orthologe im Zebrafisch zu erreichen, wurden Morpholino-antisense-Oligonukleotide (MO-NDPK-A; MO-NDPK-B) gegen den jeweiligen Translationsstart hergestellt. Die Morpholinos beginnen im 3'- untranslatierten Bereich (Abb. 8), wenige Basenpaare vor dem Start (fett gedruckt) und verhindern somit die Translation des Proteins. Die Isoformen der NDPK unterscheiden sich auf Nukleotidebene ausreichend, in Abbildung 8 durch gelbe Balken unterlegt, so dass die Spezifität der Morpholinos gegen die jeweilige Isoform gewährleistet ist.

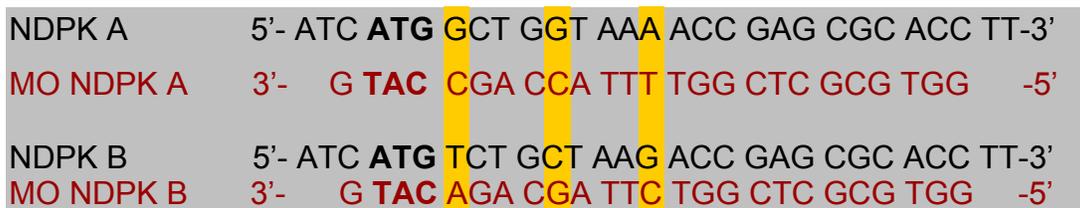


Abbildung 8): Lage der Morpholinos (MO NDPK A/ MO NDPK B): über den Bereich des Start-Codons

Die so gewählten Morpholinos gegen die NDPK-Isoformen A und B des Zebrafisches wurden in einer Versuchsreihe mit unterschiedlichen Konzentrationen auf ihre Wirkung getestet und mit der so ermittelten Konzentration von jeweils 250µM in befruchtete Zebrafisch-Oozyten im 1-4-Zellstadium des Wildtyp-Stammes TE4/6 injiziert. Da Morpholino-Injektionen die Entwicklung der Embryonen etwas verzögern, wurde ein Kontroll-Morpholino (Ktr.MO), der eine Region blockierte, die sich nicht störend auf die Entwicklung des Fisches auswirken würde parallel mitinjiziert.

#### 4.1.3 Nachweise der Morpholino-vermittelten NDPK-Depletion

#### 4.1.4 Ausmaß der NDPK-Expression auf Proteinebene

Da für den *Knockdown* der NDPK-Isoformen Morpholinos gegen den Translationsstart gewählt worden waren, wurde das Ausmaß des *Knockdown*, bzw.

der Verlust der Proteine mittels Immunoblot in den Zebrafischembryonen (Abb. 9) bestimmt.

Dazu wurden Embryonen 72 Stunden nach Befruchtung und Injektion der Morpholinos abgesammelt und Protein-Homogenate hergestellt. Je 10µg Protein wurden für die Western-Blot-Analyse eingesetzt. Die NDPK-Expression wurde mit einem Antikörper nachgewiesen, der beide Isoformen der NDPK und damit den Gesamt-NDPK Gehalt erkennt, sowie einem weiteren, spezifischen Antikörper, der nur das NDPK B-Ortholog detektiert. Als Referenz und Beladungskontrolle wurde ein Antikörper gegen  $\beta$ -Actin gewählt.

Der Immunoblot zeigte, dass die Isoformen der NDPK durch die Morpholino Injektionen jeweils bis unter die Nachweisgrenze herunterreguliert worden waren.

In der, in Abbildung 9 dargestellten Repräsentation des gesamt NDPK-Gehalt wird deutlich, dass die NDPK B durch den *Knockdown* der Isoform A nahezu unbeeinflusst bleibt, was auch die Detektion mit dem spezifischen Antikörper gegen das B-Ortholog bestätigt. Dagegen führt die Depletion der NDPK B bei der Isoform A zu einem fast vollständigen Verlust.

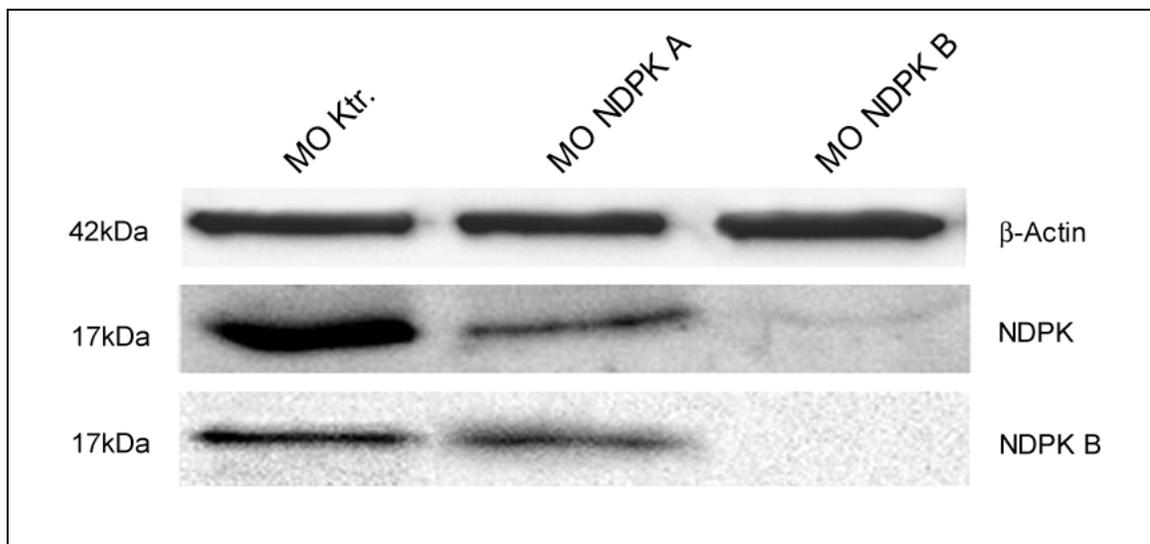


Abbildung 9): Immunoblot mit MO-NDPK-A-und MO-NDPK-B injizierten Embryo-Proteinhomogenaten.

Links: Kontrollinjiziert; mitte: MO-NDPK-A-injiziert; rechts: MO-NDPK-B-injiziert; Antikörper: Oben:  $\beta$ -Actin, mitte: gesamt NDPK; unten: NDPK B

#### 4.1.5 Reduzierte NDPK Aktivität

Ein funktioneller Nachweis der Herunterregulation der NDPK-Orthologe A und B im Zebrafisch, ist die Abnahme der enzymatischen Aktivität.

Der NDPK-Aktivitäts-Assay wurde 72 Stunden nach Injektion der Morpholinos gegen NDPK A (MO NDPK A), NDPK B (MO NDPK B), sowie des Kontroll-

Morpholinos durchgeführt.

In beiden Fällen zeigte sich eine Abnahme der NDPK-Aktivität um ca. 65% im Vergleich zu den kontrollinjizierten Fischen (Abb. 10).

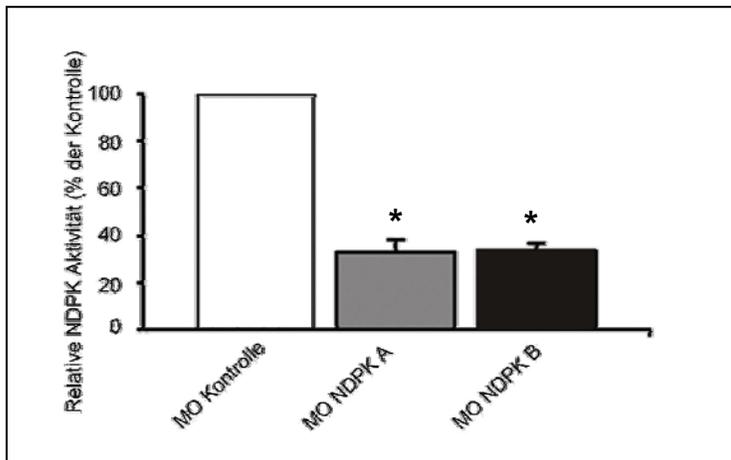


Abbildung 10): Relative enzymatische Aktivität der NDPK.

#### 4.1.6 Entwicklung der NDPK-Knockdown-Phänotypen

Embryonen, bei denen die Isoform A der NDPK durch Morpholino-Injektion herunterreguliert worden war, zeigten nach Injektion keine phänotypische Veränderung gegenüber den, mit einem Kontroll-Morpholino injizierten Embryonen (Abb. 11A, C, E). Dagegen war bei Embryonen, bei denen die NDPK B mittels Morpholino ausgeschaltet worden war, nach 48 Stunden erste phänotypische Veränderungen zu beobachten, die sich nach weiteren 24 Stunden noch verstärkten (Abb. 11B, D, F) Auffällig war die abnehmende Kontraktilität des Herzens im Atrium und im Ventrikel, die 48 Stunden nach Injektion einsetzte. Weitere 24 Stunden später war im Ventrikel so gut wie keine Kontraktion mehr wahrzunehmen. Die Embryonen bildeten durch den auftretenden Blutstau ein ausgeprägtes Perikardödem aus, wodurch das Herz schlauchförmig in die Länge

gezogen wurde. Bei einigen Embryonen konnte auch eine Dilatation des Atriums beobachtet werden.

Neben diesen auffälligen kardialen Veränderungen wurden zudem noch ein Hirnödem und kleinere Augen als bei den Kontroll-injizierten-Embryonen beobachtet. Weiterhin unterblieb die, im Laufe der Embryonalentwicklung stattfindende Dotterwanderung (*Yolk-Extension*). Insgesamt wirkte das gesamte Abdomen schmaler und weniger muskulär-strukturiert als bei Kontroll-injizierten-Fischen.

Zur besseren Visualisierung wurden die Morpholinos gegen NDPK A und B in eine transgene Fischlinie injiziert. Bei dieser Linie, der Fli-Linie wird spezifisch in den

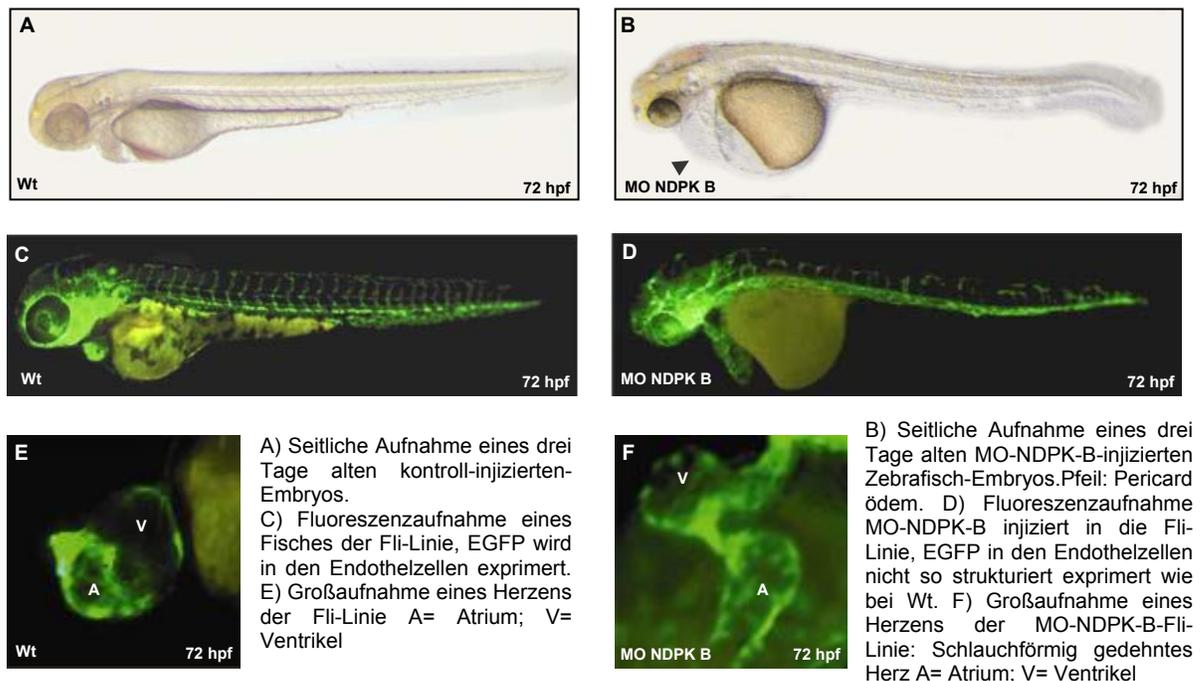


Abbildung 11): Entwicklung der Phänotypen: MO-NDPK (B, D, F) und kontrollinjiziert (A, C, E)

Endothelzellen EGFP-exprimiert, wodurch sich verschiedene Gewebereiche besser darstellen lassen. Speziell das Herz-Kreislaufsystem ist unter UV-Licht gut sichtbar. Wieder zeigte sich, dass der *Knockdown* der NDPK A keinen Phänotyp hervorrief. Die Depletion der NDPK B erzeugte den gleichen kardialen Phänotyp, wie bei der Wildtyp-Fischlinie TE4/6. Dank der besseren Visualisierung der

Endothelzellen unter UV-Licht, war zu erkennen, dass die Endothelzellen der Blutgefäße weniger strukturiert waren (Abb. 11D, 11C) und dadurch, dass das Herz deutlich vom restlichen Embryo abgehoben war (Abb. 11E, 11F), besonders gut die, durch das Pericardödem verursachte, schlauchförmig gestreckte Form sichtbar wurde.

#### 4.1.7 Kardiale Dysfunktion

Um das Ausmaß der kardialen Funktionseinschränkung bei den NDPK-B-*Knockdown* Embryonen zu quantifizieren, wurde das „*Fractional shortening*“ als Maß für die Stärke der Kontraktilität von Atrium und Ventrikel bestimmt. Um Differenzen in der Kontraktilität gegenüber den Kontrollembryonen feststellen zu können, werden hierbei die Verkürzungsfractionen von Atrium und Ventrikel gemessen. Das Verhältnis aus größtem (Diastole) und kleinstem (Systole) Kammerdurchmesser ergibt den Vergleichswert.

Als Zeitpunkt der Messung wurde 48 und 72 Stunden nach Injektion gewählt.

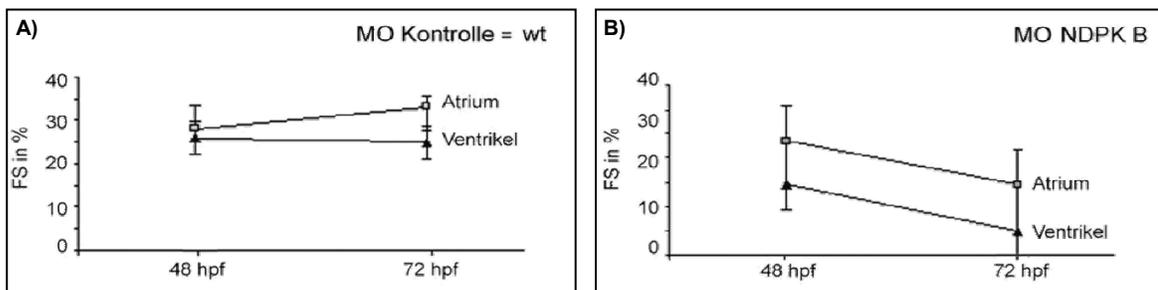


Abbildung 12): Fractional-shortening: NDPK-B-*Knockdown*-Embryoherzen vs. Kontroll-Embryoherzen

A) Verkürzungsfractionen an Kontroll-Embryoherzen, 48hpf und 72hpf.

B): Verkürzungsfractionen an NDPK-B-*Knockdown*- Embryoherzen, 48 und 72hpf

Nach 48 Stunden betrug die Verkürzungsfraction der Kontroll-Herzen im Atrium 28% (Abb. 12A), die des Ventrikels 26%. In den NDPK-B-*Knockdown*-Embryonen war eine Abnahme der Kontraktilität des Ventrikels zu erkennen (Abb. 12B): sie lag bei 16%. Die Kontraktilität des Atriums war zu diesem Zeitpunkt noch weitgehend unbeeinflusst.

Nach 72 Stunden lagen die Kontraktionsmessungen der Atrien der Kontrollinjizierten Fische bei 33% und den Ventrikeln bei 25%. Die Verkürzungsfraction der NDPK-B-*Knockdown*-Embryonen war im Atrium um ca. 10% auf 18% gesunken,

die Kontraktilität des Ventrikels ging fast gänzlich verloren. Nach 72 Stunden war außerdem deutlich zu sehen, dass der gesamte Blutkreislauf zum Erliegen kam.

#### **4.1.8 Herzentwicklung des NDPK B-*Knockdown*-Embryo**

Die Depletion der NDPK B hatte einen ausgeprägten Phänotyp mit kardialer Dysfunktion im Zebrafischembryo verursacht. Daher war zu klären, ob diese Veränderung auf eine allgemeine Entwicklungsstörung in der Herzentwicklung zurückzuführen war.

Zur Feststellung eventueller morphologischer Abweichungen wurden Zebrafischembryonen 72 Stunden nach Morpholino-Injektion fixiert, geschnitten und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt (Abb.13). Anschließend wurden die Schnitte histologisch analysiert. Außerdem wurde anhand einer Doppelimmunfluoreszenzfärbung (Abb.14) untersucht, ob die Expression einzelner, an der Herzentwicklung beteiligter Gene in den Kardiomyozyten des Ventrikels und des Atriums bei NDPK-B-*Knockdown*-Embryonen verändert sind.

#### **4.1.9 Histologie des NDPK-B-*Knockdown*-Herzens**

Die ventrikuläre und atrikuläre Gewebemasse schien bei den NDPK-B-*Knockdown*-Embryonen unverändert im Vergleich zu Kontroll-injizierten-Embryonen zu sein. Um auszuschließen, ob eine verringerte Zellgröße (Hypotrophie) oder einer verringerte Zellzahl (Hypoplasie) vorlag, wurde die Kardiomyozytenzahl in histologischen, mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten, Serienschnitten ausgezählt.

Die Anzahl der ventrikulären Kardiomyozyten ergab bei den NDPK-B-*Knockdown*-Embryonen keine signifikante Veränderung zu den Kontroll-injizierten-Embryonen (MO-NDPK B:  $335 \pm 29$  (n = 9) vs. Wt:  $358 \pm 23$  (n = 8)). Die Anzahl der atrialen Kardiomyozyten ergab ebenfalls keine signifikant veränderten Werte: (MO-NDPK B:  $127 \pm 15$  (n = 9) vs. Wt:  $143 \pm 26$  (n = 4)).

Struktur und Aufbau der Zebrafischherzen schien durch den *Knockdown* der NDPK B nicht beeinflusst worden zu sein: Die histologischen Schnitte zeigten bei 72 Stunden alten Embryonen, dass sich die NDPK-B-*Knockdown*-Herzen (Abb. 13B), sowie die Kontroll-injizierten-Herzen (Abb. 13A), aus der üblichen endokardialen

und myokardialen Zellschicht zusammensetzten. Zusätzlich konnte in beiden Fällen eindeutig zwischen atrialem und ventrikulärem Gewebe unterschieden werden. Auch war bei beiden Herzen die Einschnürung in der atrioventrikulären (AV-)Region zu erkennen.

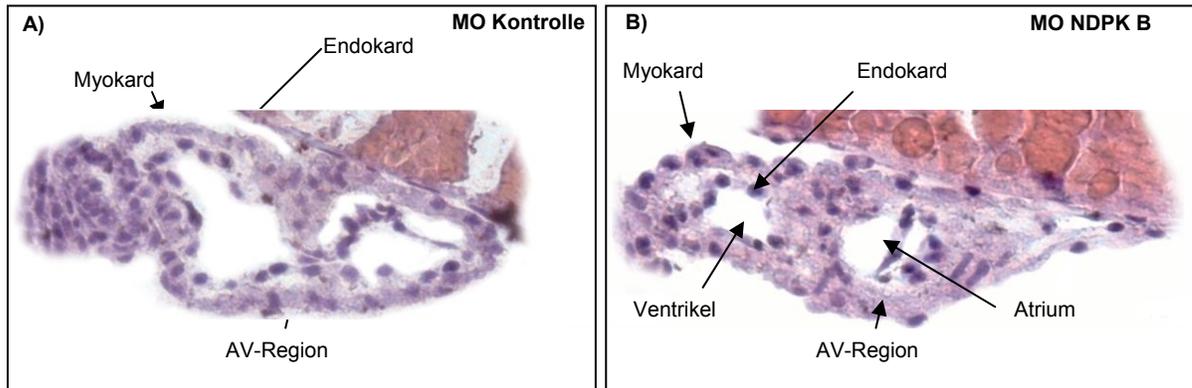


Abbildung 13): Hämatoxylin-Eosin gefärbte Histologieschnitte an 72hpf alten NDPK-B-*knockdown* - Zebrafischembryoherzen  
 A) Herz eines kontroll-injizierten Zebrafischembryos B) Herz eines NDPK-B-*knockdown*-Zebrafischembryos

den Kontroll-injizierten Zebrafischen keine Differenzen. Ob sich die Expression von atrialem und ventrikulärem Myosin in den Kardiomyozyten bei NDPK-B-*Knockdown*-Herzen im Vergleich zu Kontroll-injizierten Embryoherzen verändert, sollte eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung zeigen.

Diese wurde am ganzen, drei Tage alten Embryo durchgeführt. Dazu wurden Kontroll-injizierte- und NDPK-B-*Knockdown*-Embryonen mit einem Antikörper gegen atriales und ventrikuläres Myosin (vmhc: MF20; rot) und einem Antikörper gegen atriales Myosin (amhc: S46; grün) fluoreszenzmarkiert.

Bei der Expression des atrialen und des ventrikulären Myosin in den Kardiomyozyten der NDPK-B-*Knockdown*-Embryonen war keine Abnahme zu beobachten (vgl. Abb. 14 A-D). Der NDPK-B-*Knockdown* hatte im Vergleich zu den Kontroll-injizierten-Embryonen keinen Einfluss auf die Expression des kardialen Myosin.

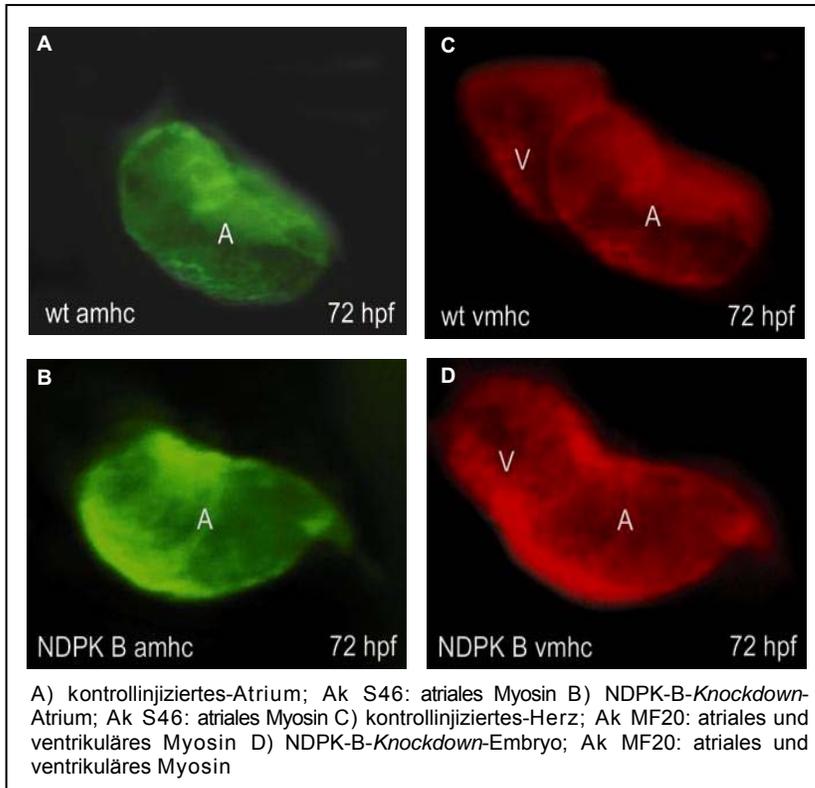
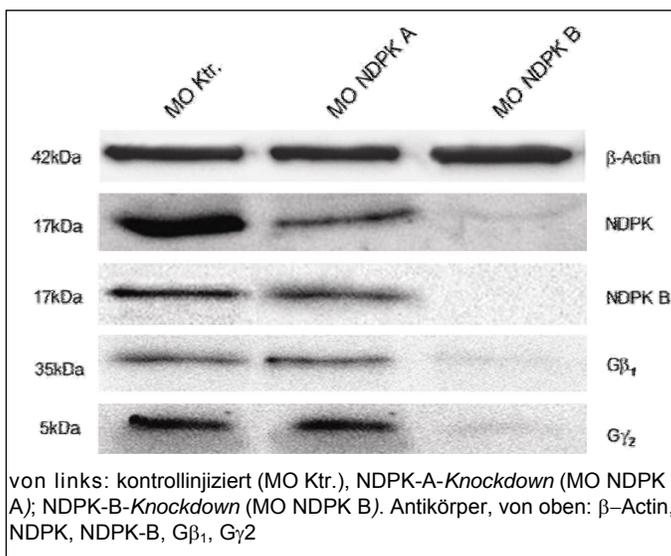


Abbildung. 14): Doppelimmunfluoreszenz: NDPK-B-Knockdown- vs. kontrollinjizierter Embryo

#### 4.2 Heterotrimere G-Proteine: Depletion der $\beta 1$ -Untereinheit

Frühere Arbeiten hatten gezeigt, dass die Rezeptor-unabhängige Aktivierung der heterotrimeren G-Proteine eine Komplexbildung von  $G\beta\gamma$ -Dimeren mit der NDPK B



voraussetzt (Kimura N., 1990; Cuello et al., 2003; Hippe et al., 2003). Da sich die kardiale Dysfunktion des NDPK-B-Knockdown-Phänotyps nicht auf eine Entwicklungsstörung in der Herzentwicklung zurückführen ließ, stellte sich die Frage, ob das Zusammenspiel der NDPK B mit

Abbildung 15): Immunoblot mit 72hpf NDPK-Knockdown-Embryo-Proteinhomogenaten

der  $\beta_1$ -Untereinheit der G-Proteine etwas mit dem aufgetretenen kardialen Phänotyp zu tun hatte.

Eine Überprüfung der NDPK-*Knockdown*-Proteinhomogenate auf die Expression des  $G\beta\gamma$ -Dimers mittels Immunoblot zeigte einen deutlichen Verlust durch die Depletion der Isoform B (Abb. 15). Der *Knockdown* der NDPK A hatte keinen Einfluss auf die Expression des  $G\beta\gamma$ -Dimers. Aus diesem Grund sollte mittels Morpholino-Injektion gegen die  $\beta_1$ -Untereinheit im Zebrafisch untersucht werden, ob hier ein direkter Zusammenhang besteht, bzw. ob ein Phänotyp durch  $\beta_1$ -Depletion entstehen würde.

#### 4.2.1 Zwei $G\beta_1$ -Isoformen im Zebrafisch: Gen-Duplikationen bei Teleostiern

Im Zebrafisch gibt es zwei Isoformen der  $\beta_1$ -Untereinheit. Viele in Säugern einmalig vorkommende Gene findet man in Teleostiern dupliziert oder sogar in mehreren Kopien vorliegen. Es ist bis dato unklar, ob der Grund dafür in einer kompletten Genom-Duplikation zu finden ist, oder ob es sich um lokale Prozesse zwischen den einzelnen Allelen handelt (Meyer, Schartl, 1999; Winkler, 2003).

Beide Isoformen der  $\beta_1$ -Untereinheit,  $G\beta_1$  (*gnb1* BC\_071277 ) und  $G\beta_{1like}$  (*gnb1l* NM\_213481), des Zebrafisches sind zueinander zu 99% homolog und zum menschlichen  $G\beta_1$  jeweils zu 98% auf Proteinebene konserviert (Abb. 16).

Zebrafisch $G\beta_1$	MSELDQLRQEAEQLKNQIRDARKACADATLSQITWNI DPVGRIQMRTRRLAGHLAKIYA	60
Zebrafisch $G\beta_{1like}$	MSELDQLRQEAEQLKNQIRDARKACADATLSQITWNI DPVGRIQMRTRRLAGHLAKIYA	60
Mensch $G\beta_1$	MSELDQLRQEAEQLKNQIRDARKACADATLSQITWNI DPVGRIQMRTRRLAGHLAKIYA	60
Zebrafisch $G\beta_1$	MHWGTD SRLLV SASQDGKLI IWD SYTTNKVHAIPLRS SWVMTCAYAPSGNYVACGGLDNI	120
Zebrafisch $G\beta_{1like}$	MHWGTD SRLLV SASQDGKLI IWD SYTTNKVHAIPLRS SWVMTCAYAPSGNYVACGGLDNI	120
Mensch $G\beta_1$	MHWGTD SRLLV SASQDGKLI IWD SYTTNKVHAIPLRS SWVMTCAYAPSGNYVACGGLDNI	120
Zebrafisch $G\beta_1$	CSIYMLKTRREGNVRVSRRELAGHTGYLSOCRF LDDNQIVTSSGDTTCALWD IETGQQTTTF	180
Zebrafisch $G\beta_{1like}$	CSIYMLKTRREGNVRVSRRELAGHTGYLSOCRF LDDNQIVTSSGDTTCALWD IETGQQTTTF	180
Mensch $G\beta_1$	CSIYMLKTRREGNVRVSRRELAGHTGYLSOCRF LDDNQIVTSSGDTTCALWD IETGQQTTTF	180
Zebrafisch $G\beta_1$	AGHTGDMVMSLSLAPDTRLFVSGACDASAKLNDVRS GNCRCQTFPGHESDINAI CFFPNGNA	240
Zebrafisch $G\beta_{1like}$	AGHTGDMVMSLSLAPDTRLFVSGACDASAKLNDVRS GNCRCQTFPGHESDINAI CFFPNGNA	240
Mensch $G\beta_1$	AGHTGDMVMSLSLAPDTRLFVSGACDASAKLNDVRS GNCRCQTFPGHESDINAI CFFPNGNA	240
Zebrafisch $G\beta_1$	FATGSDDATCRLFDLRADQELNWSHDNI KCGITSVSFSKSGRLLLAGYDDFNQVWDL	300
Zebrafisch $G\beta_{1like}$	FATGSDDATCRLFDLRADQELNWSHDNI KCGITSVSFSKSGRLLLAGYDDFNQVWDL	300
Mensch $G\beta_1$	FATGSDDATCRLFDLRADQELNWSHDNI KCGITSVSFSKSGRLLLAGYDDFNQVWDL	300
Zebrafisch $G\beta_1$	KADRAGVLAGHDNRVSCLSGVTDDGMAVATGSWDS FLKIWN	340
Zebrafisch $G\beta_{1like}$	KADRAGVLAGHDNRVSCLSGVTDDGMAVATGSWDS FLKIWN	340
Mensch $G\beta_1$	KADRAGVLAGHDNRVSCLSGVTDDGMAVATGSWDS FLKIWN	340

Abbildung. 16): Proteinsequenzvergleich von  $G\beta_1$  des Menschen zum  $G\beta_1$  und  $G\beta_{1like}$  des Zebrafisches

### 4.2.2 G $\beta$ <sub>1</sub>- bzw. G $\beta$ <sub>1</sub>like-mRNA-Verteilung im Zebrafischembryo

Um zu untersuchen, ob es im Expressionsmuster der beiden im Zebrafisch vorkommenden G $\beta$ <sub>1</sub>-Gene Unterschiede gibt, bzw. ob eines der Gene eine dominante Form ist oder ein Pseudo-Gen darstellt, wurden *anti-sense*-Sonden hergestellt, mit denen an 48hpf alten Zebrafischembryonen durch *In-situ*-Hybridisation die Verteilung der jeweiligen G $\beta$ <sub>1</sub>-mRNA gezeigt werden sollte.

### 4.2.3 G $\beta$ <sub>1</sub>-in-situ-Hybridisations-Sonden

Um die Spezifität der jeweiligen Sonde aufgrund der großen Homologie der beiden G $\beta$ <sub>1</sub>-Gene zu gewährleisten, waren als Sonden Abschnitte im 5'-untranslatierten Bereich gewählt worden, da sich die beiden Isoformen dort stark unterscheiden. Die G $\beta$ <sub>1</sub>-Sonde war 184bp, die G $\beta$ <sub>1like</sub>-Sonde 160bp lang.

Die amplifizierten Sonden wurden in den pCS2+-Vector zur In-vitro-Transkription kloniert (Abb. 17). Zur Detektion der G $\beta$ <sub>1</sub>-mRNA-Verteilung wurden die Sonden in antisense-Richtung kloniert (Abb. 17 A), als Kontrolle wurden die Sonden in sense-Richtung kloniert (Abb.17B).

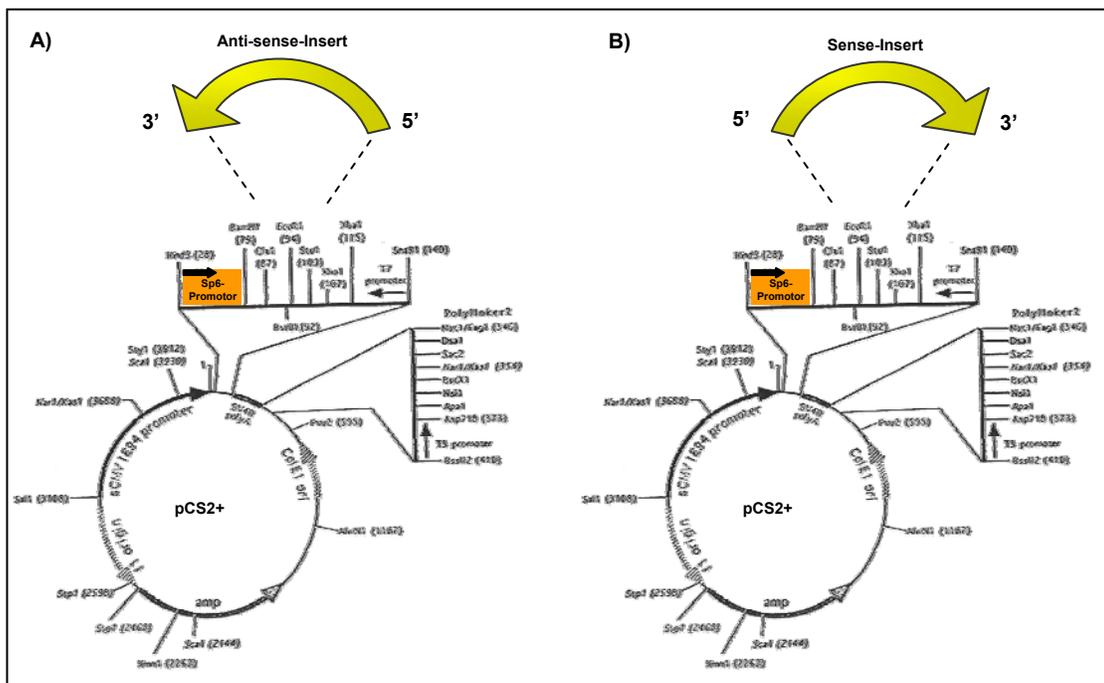


Abbildung 17): Klonierung der in-situ-Sonden in den pCS2+-Vector A) *antisense-in-situ*-Sonde B) *sense-in-situ*-Sonde

#### 4.2.4 Identische Verteilungsmuster der beiden $G\beta_1$ -Gene

Obwohl die  $G\beta_1$ - und  $G\beta_{1like}$ -Sonden so gewählt worden waren, dass sich keine Kreuzreaktionen ergeben konnten, war das Verteilungsmuster bei beiden  $G\beta_1$ -Genen identisch. Die oberen Zebrafische in Abbildung 18A und B sind Kontroll-Embryonen, die mit den entsprechenden *sense*-Sonden markiert worden waren um Hintergrundfärbungen auszuschließen. Beide Isoformen von  $G\beta_1$  wurden ubiquitär, aber hauptsächlich im Kopfbereich (Abb. 18A, B unten) der Zebrafischembryonen detektiert. Am auffälligsten gefärbt waren die Bereiche des gesamten Gehirns, sowie die Linse des Auges. Dies ist in Abbildung 18C gut zu erkennen.

Dieses Ergebnis zeigte für den weiteren Versuchsaufbau, dass ähnliche mRNA-Verteilungsmuster existieren und keine der beiden  $G\beta_1$ -Isoformen ein Pseudo-Gen ist. Aus diesem Grund wurden für den *Knockdown* der beiden  $G\beta_1$ -Isoformen unterschiedliche Morpholinos gewählt, die erlauben die jeweilige Isoform allein und beide zusammen durch Co-Injektion herunterzuregulieren, um damit eine vollständige Reduktion des „Gesamt- $G\beta_1$ “ im Zebrafisch zu erreichen.

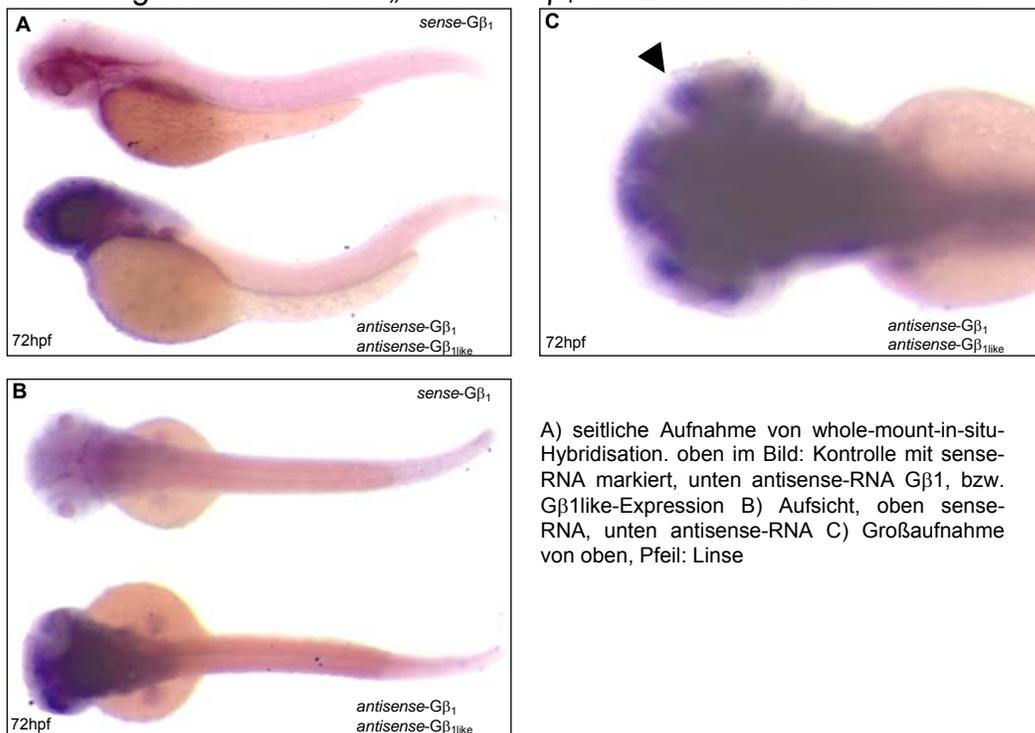


Abbildung 18): *In-situ*-Hybridisation der  $G\beta_1$ -Gene

A) seitliche Aufnahme von whole-mount-in-situ-Hybridisation. oben im Bild: Kontrolle mit sense-RNA markiert, unten antisense-RNA  $G\beta_1$ , bzw.  $G\beta_{1like}$ -Expression B) Aufsicht, oben sense-RNA, unten antisense-RNA C) Großaufnahme von oben, Pfeil: Linse

#### 4.2.5 Wahl der G $\beta$ <sub>1</sub>-Morpholinos und Injektion

Für den spezifischen *Knockdown* der beiden G $\beta$ <sub>1</sub>-Untereinheiten im Zebrafisch wurden geeignete Morpholinos gegen den Translationsstart gewählt (Abb. 19A). Um die Spezifität des *Knockdowns* zu bestätigen und eine Kreuzreaktion der Inhibition zwischen den beiden Isoformen auszuschließen, wurde zusätzlich für die G $\beta$ <sub>1like</sub>-Isoform ein *Splice*-Morpholino generiert (Abb. 19B). Der *Splice*-Morpholino gegen G $\beta$ <sub>1like</sub> lag über der Grenze des ersten Exon zum ersten Intron und blockierte somit das Spleißen der mRNA.

Die Zielsequenz des *Splice*-Morpholinos war für eine Exon-Intron Grenze bestimmt worden, welcher nur ein relativ kleines Intron folgte, so dass der Größenunterschied des Spleißproduktes nachgewiesen, bzw. das größere „nicht-gespleißte,, Produkt mittels PCR sichtbar gemacht werden konnte.

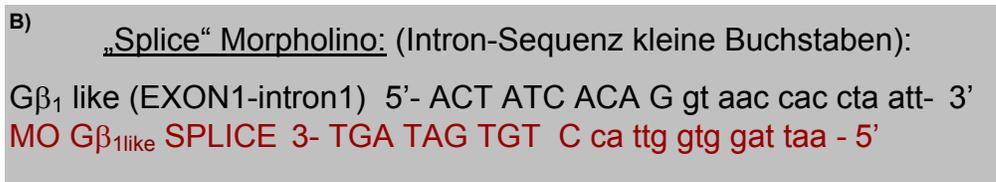
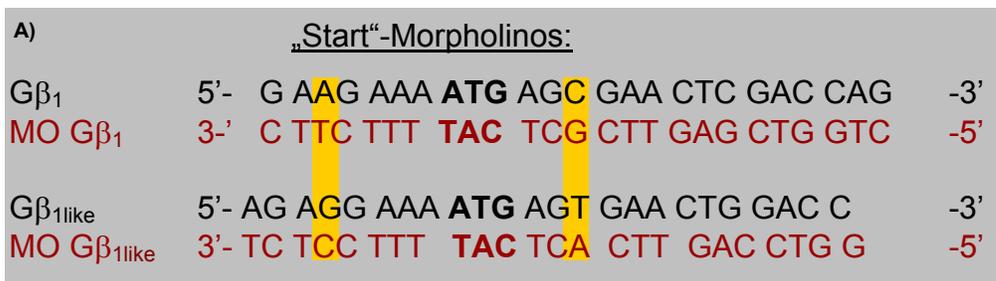


Abbildung 19): Lage der Morpholinos gegen G $\beta$ <sub>1</sub> und G $\beta$ <sub>1like</sub> A) Start-Morpholinos gegen G $\beta$ <sub>1</sub> und G $\beta$ <sub>1like</sub>  
 B) Splice-Morpholino gegen G $\beta$ <sub>1like</sub>

Die so gewählten Morpholinos gegen die G $\beta$ <sub>1</sub>-Isoformen des Zebrafisches wurden wieder in einer Versuchsreihe mit unterschiedlichen Konzentrationen auf ihre Wirkung getestet und mit der so ermittelten Konzentration von jeweils 350 $\mu$ M in befruchtete Zebrafisch-Oozyten im 1-4-Zellstadium des Wildtyp-Stammes TE4/6 injiziert. G $\beta$ <sub>1</sub> und G $\beta$ <sub>1like</sub> wurden einzeln und coinjiziert. Es wurde wieder ein unspezifischer Morpholino als Kontrolle mitinjiziert (Ktr.MO).

#### 4.2.6 Nachweise der Morpholino-vermittelten-G $\beta$ <sub>1</sub>/1like-Depletion

#### 4.2.7 Ausmaß des G $\beta$ <sub>1</sub>/1like-*Knockdown* auf Proteinebene

Um die erfolgreiche Depletion der G $\beta$ <sub>1</sub>-Isoformen im Zebrafisch nachzuweisen, wurde die Expression der G $\beta$ <sub>1</sub>-Proteine, sowie der  $\gamma$ <sub>2</sub>-Untereinheit, welche mit der  $\beta$ <sub>1</sub>-Untereinheit ein stabiles Dimer bildet, im Immunoblot (Abb. 20) untersucht.

Dazu wurden wiederum Embryonen 72 Stunden nach Injektion abgesammelt und Protein-Homogenate hergestellt. Für die Analyse wurden je 10 $\mu$ g Protein eingesetzt. Es wurde ein Antikörper verwendet, der beide G $\beta$ <sub>1</sub>-Varianten aufgrund der großen Homologie mit vergleichbarer Selektivität detektiert und ein weiterer Antikörper gegen die  $\gamma$ <sub>2</sub>-Untereinheit des Zebrafisches. Als Beladungskontrolle wurde ein Antikörper gegen  $\beta$ -Actin verwendet.

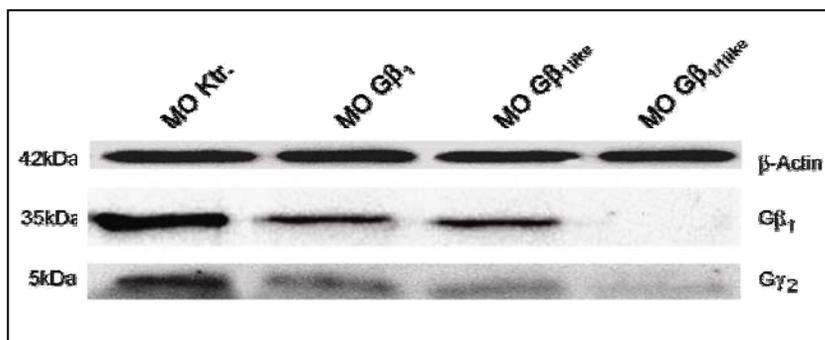


Abbildung 20): Immunoblot mit 72hpf G $\beta$ <sub>1</sub>-Knockdown- Embryo – Proteinhomogenaten von links nach rechts: kontrollinjiziert, MO- G $\beta$ <sub>1like</sub>, MO- G $\beta$ <sub>1/1like</sub> coinjiziert . Antikörper: Obere Reihe:  $\beta$ -Actin mitte: G $\beta$ <sub>1</sub>; unten: G $\gamma$ <sub>2</sub>

Im Vergleich zu den Kontrollembryonen verblieb bei den Einzelinjektionen ein vergleichbar starkes, um ca. 50% reduziertes Signal. Beide Isoformen scheinen demnach im Verhältnis von 1:1 im Zebrafisch vertreten zu sein. Beim Doppel-*Knockdown* war kein G $\beta$ <sub>1</sub>-Protein mehr detektierbar. In Abhängigkeit der Menge an  $\beta$ <sub>1</sub>-Untereinheiten wurden die  $\gamma$ <sub>2</sub>-Untereinheiten ebenfalls um 50% reduziert, bzw. verschwinden beim Doppel-*Knockdown* ganz.

#### 4.2.8 Knockdown der G $\beta$ <sub>1like</sub>-Expression auf mRNA-Ebene

Mit Hilfe einer RT-PCR konnte die Effektivität des *Splice*-Morpholinos für den G $\beta$ <sub>1like</sub>-*Knockdown* nachgewiesen werden.

Hierfür wurde aus 72hpf alten Embryonen RNA präzipitiert und daraus cDNA-generiert. Die Oligonukleotide für die PCR waren so gewählt worden, dass die durch den Morpholino blockierte *splice-site* zwischen den Primern lag (Abb. 21). Der *forward*-Primer lag in Exon 1 und der *reverse*-Primer in Exon 2. Das PCR-Produkt der Kontroll-injizierten-Embryonen hatte eine Größe von 201 Basenpaaren. Das Produkt der MO-G $\beta$ <sub>1like</sub>-*splice*-injizierten Embryonen sollte inklusive Intron eine Größe von 323bp aufweisen.

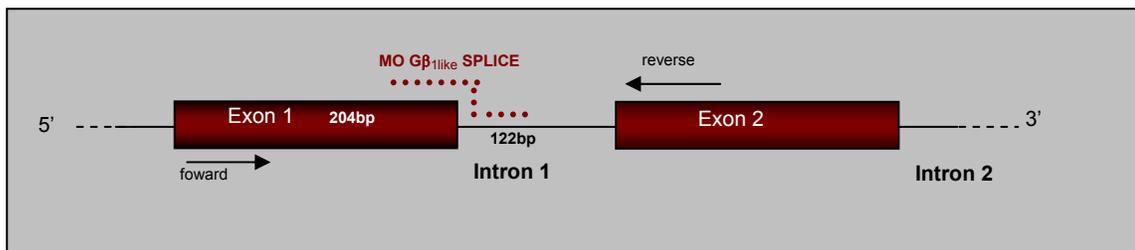
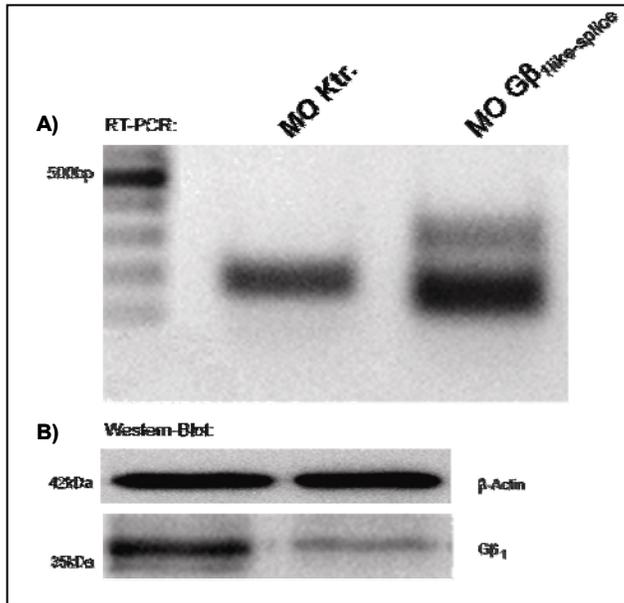


Abbildung 21): Lage der Primer zum PCR-Nachweis der MO-G $\beta$ <sub>1like</sub>-splice-injizierten Embryonen: *forward* Primer in Exon 1, *reverse* Primer in Exon 2. Bei erfolgreicher Injektion wird das Spleißen zwischen Ex 1 und Intron1 durch den Morpholino (rot gepunktet) blockiert, das Amplifikat ist 122pb (Größe des Intron) länger als das gespleißte Produkt.

Wie in Abbildung 22A) gezeigt ist, entsprach das PCR-Produkt der Kontrollgruppe der vorhergesagten Größe von 201bp. Die obere Bande der cDNA, der mit dem *Splice*-Morpholino injizierten Embryonen, entsprach der erwarteten Größe von 323bp. Bei der unteren Bande handelte es sich vermutlich um eine unvollständige Amplifikation.

Der Immunoblot (Abb. 22B) zeigte, dass kein funktionales G $\beta$ <sub>1like</sub>-Protein mehr vorhanden war. Das vom G $\beta$ <sub>1</sub>-Antikörper detektierte Signal nahm deshalb um mindestens 50% ab.



A) PCR an Kontroll- und MO-G $\beta_{1like}$ -*splice*-injizierten Embryonen. Links: Kontrolle, rechts: Amplifikat der MO-G $\beta_{1like}$ -*splice*-injizierten Embryonen

B) Immunoblot mit Kontroll- und MO-G $\beta_{1like}$ -*splice*-injizierten Proteinhomogenaten. Links: Kontrolle, rechts die MO-G $\beta_{1like}$ -*splice*-injizierten

Abbildung 22): Nachweis der spezifischen G $\beta_{1like}$ -Depletion

#### 4.2.9 Entwicklung der G $\beta_{1like}$ -Knockdown-Phänotypen

Alle drei Morpholinos gegen die G $\beta_1$ -Isoformen erzeugten in den Embryonen nach 48 Stunden identische phänotypische Veränderungen, welche sich wiederum nach weiteren 24 Stunden verstärkten (Abb. 23B, D, F). Die Veränderung des Phänotyps war in der Einzelinjektion etwas schwächer ausgeprägt, als beim Doppel-*Knockdown* der G $\beta_1$ -Gene. Die Injektion des MO-G $\beta_{1like}$  und des MO-G $\beta_{1like}$ -*Splice* verursachten bei ca. 80% der Embryonen phänotypische Veränderungen. (Abb. 23A, C, E), wogegen die Injektion des MO-G $\beta_1$  nur eine Effizienz von ca. 25% zeigte. Beim Doppel-*Knockdown* beider G $\beta_1$ -Gene waren insgesamt bei ca. 95% der Embryonen phänotypische Veränderungen auszumachen.

Auffällig war wieder die abnehmende Kontraktilität der Herzen nach 48 Stunden. Weitere 24 Stunden später war auch bei den G $\beta_1$ -*Knockdown*-Embryonen im Ventrikel so gut wie keine Kontraktion mehr wahrzunehmen. Die Embryonen bildeten durch den auftretenden Blutstau ebenfalls ein ausgeprägtes Perikardödem aus.

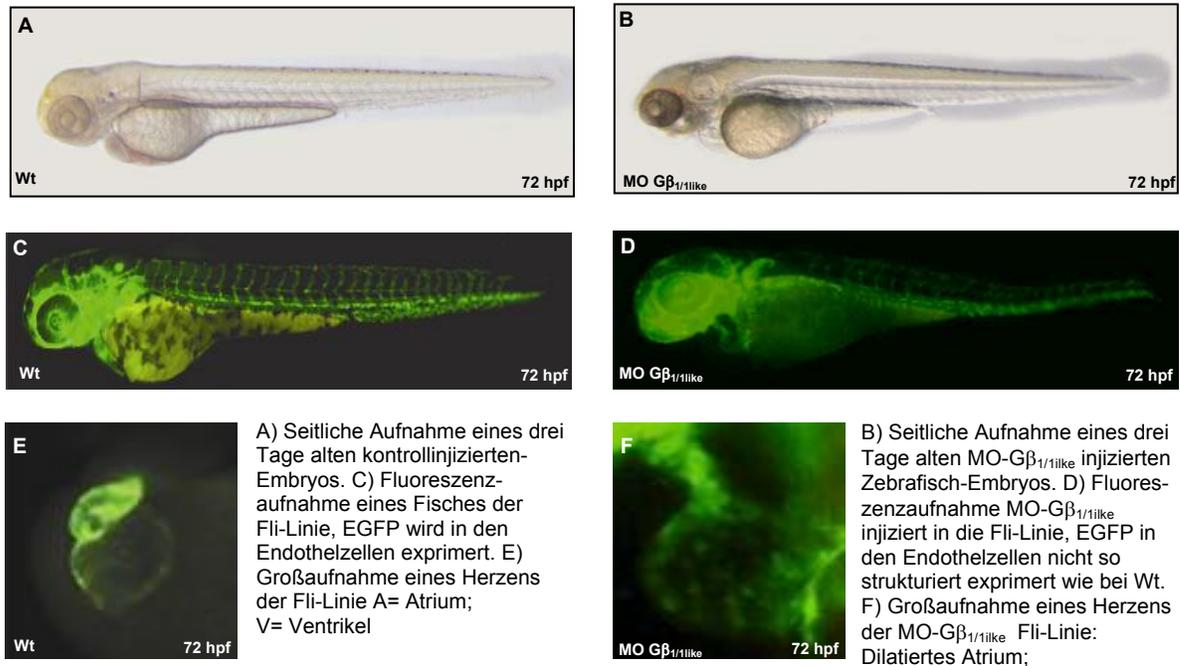


Abbildung 23): Entwicklung der Phänotypen des G $\beta_{1/1like}$ -Knockdowns (B, D, F) und kontrollinjiziert (A,C,E)

Das Herz wurde dadurch entweder schlauchförmig in die Länge gezogen oder es war eine Dilatation des Atriums zu beobachten. Insgesamt glich der entstandene Phänotyp sehr stark dem der NDPK B-Knockdown-Embryonen. Die Injektion der Morholinos gegen G $\beta_1$  in die Fli-Linie ergab den identischen, kardialen Phänotyp.

#### 4.2.10 Kardiale Dysfunktion

Um bei den G $\beta_1$ -Knockdown-Embryonen ebenfalls das Ausmaß der kardialen Funktionseinschränkung zu quantifizieren, wurde wiederum das „Fractional shortening“ als Maß für die Stärke der Kontraktilität von Atrium und Ventrikel bestimmt. Als Zeitpunkt der Messungen wurde gleichfalls 48hpf und 72hpf gewählt, da auch bei G $\beta_{1/1like}$ -Depletion der kardiale Phänotyp nach 48 Stunden erstmals deutlich wurde und sich nach weiteren 24 Stunden verstärkt zeigte.

Bei den Kontroll-injizierten-Embryonen (Abb. 24A) lag die Verkürzungsfraction des Atriums bei 35%, die des Ventrikels bei 26%. Bei den G $\beta_{1/1like}$ -injizierten Embryonen (Abb. 24B) war schon nach 48 Stunden eine Abweichung in der

Kontraktilität des Ventrikels zu erkennen: sie lag bei 8%. Die Kontraktilität des Atriums war zu diesem Zeitpunkt noch bei 20%.

Nach 72 Stunden lag die Verkürzungsfraction des Atriums der Kontroll-injizierten-Embryonen bei 35% und des Ventrikel bei 24%. Die Verkürzungsfraction der  $G\beta_{1/1like}$ -*Knockdown*-Embryonen war im Atrium auf 15% gesunken und die Kontraktilität des Ventrikels ging wie bei den NDPK-B-*Knockdown*-Embryonen fast gänzlich zurück. Auch bei den  $G\beta_{1/1like}$ -*Knockdown*-Embryonen kam nach 72 Stunden der gesamte Blutkreislauf zum Erliegen.

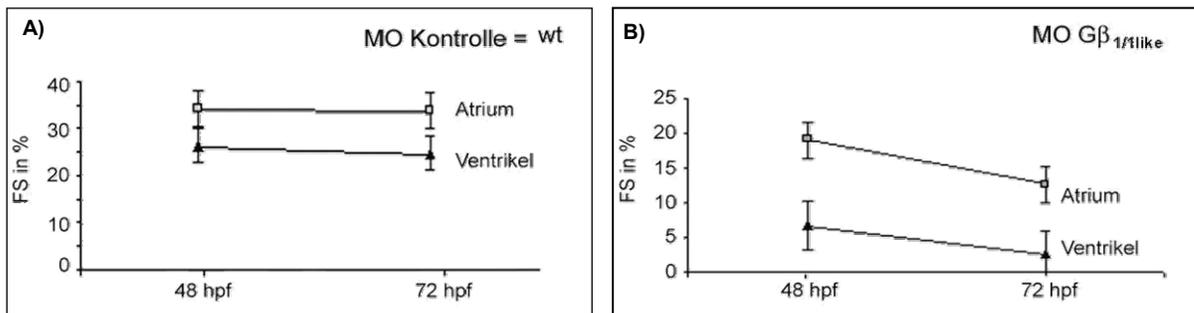


Abbildung 24): Fractional-shortening:  $G\beta_{1/1like}$ -Knockdown-Embryoherzen vs. Kontroll-Embryoherzen

A) Am Kontroll-Embryoherzen gemessene Verkürzungsfractionen nach 48hpf und 72hpf B) Am *-knockdown*-Embryoherzen gemessene Verkürzungsfractionen nach 48 und 72hpf:

#### 4.2.11 Herzentwicklung des $G\beta_{1/1like}$ -*Knockdown*-Embryo

Der *Knockdown* der  $G\beta_1$ -Isoformen verursachte im Zebrafisch einen Phänotyp mit kardialer Dysfunktion, der dem der NDPK-B-*Knockdown*-Embryonen sehr stark ähnelte. Daher sollte auch bei der  $G\beta_{1/1like}$ -Depletion untersucht werden, ob das Herz der  $G\beta_{1/1like}$ -*Knockdown*-Embryonen im Vergleich zu den kontrollinjizierten Zebrafischen strukturell intakt ist.

Dazu wurden wieder Zebrafischembryonen 72hpf nach Morpholino-Injektion fixiert, mit Hämatoxilin-Eosin gefärbt und in Schnitten histologisch analysiert.

Außerdem wurde ebenfalls anhand einer Doppelimmunfluoreszenzfärbung untersucht, ob die Myosin-Expression in den Kardiomyozyten des Ventrikels und des Atriums im Vergleich zu kontrollinjizierten Zebrafischen Unterschiede aufwiesen.

#### 4.2.12 Histologie des $G\beta_{1/1like}$ -*Knockdown*-Herzens

Bei den  $G\beta_{1/1like}$ -*Knockdown*-Embryonen schien die ventrikuläre und atrikuläre Gewebemasse im Vergleich zu den kontrollinjizierten-Embryonen ebenfalls nicht verändert. Die Anzahl der Kardiomyozyten wurde in histologischen, mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten Serienschnitten ausgezählt. Der Vergleich der ventrikulären Kardiomyozyten ergab bei den  $G\beta_{1/1like}$ -*Knockdown*-Herzen keine signifikant veränderte Zellzahl (MO- $G\beta_{1/1like}$ :  $345 \pm 22$  (n = 6) vs. Wt:  $348 \pm 28$  (n = 5)). Die Auszählung der atrialen Kardiomyozyten ergab ebenfalls keine signifikant veränderten Werte: (MO- $G\beta_{1/1like}$ :  $137 \pm 13$  (n = 7) vs. Wt:  $123 \pm 29$  (n = 4)). Die morphologische Untersuchung bei 72 Stunden alten Embryonen ergab, dass sich die  $G\beta_{1/1like}$ -*Knockdown*-Herzen (Abb. 25B) sowie die Herzen der kontrollinjizierten Embryonen (Abb. 25A) aus einer endokardialen und einer myokardialen Zellschicht zusammensetzten. Zusätzlich konnte auch eindeutig zwischen atrialem und ventrikulärem Gewebe unterschieden werden. Die Einschnürung in der atrioventrikulären (AV-)Region war ebenfalls erkennbar.

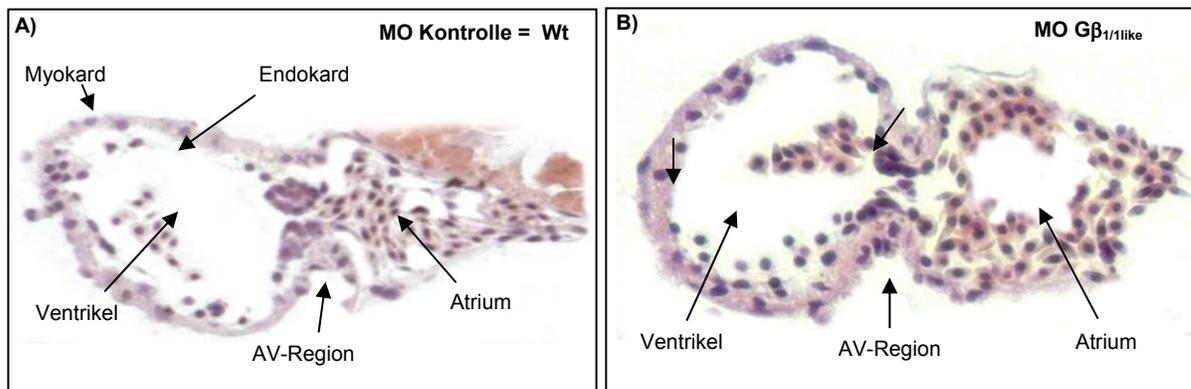


Abbildung 25): Hämatoxylin-Eosin gefärbte Histologieschnitte an 72hpf  $G\beta_{1/1like}$ -*Knockdown*-Zebrafischherzen

A) Kontrollinjizierte-Embryoherzen B)  $G\beta_{1/1like}$ -*Knockdown*-Embryoherzen

#### 4.2.13 Doppelimmunfluoreszenz an $G\beta_{1/1like}$ -*Knockdown*-Herzen

Um bei den  $G\beta_{1/1like}$ -*Knockdown*-Embryonen zu untersuchen, ob sich die Myosin-Expression in den Kardiomyozyten verändert hatte, wurde wieder eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung vom drei Tage alten Embryo durchgeführt. Dazu wurden wiederum Kontrollinjizierte- und  $G\beta_{1/1like}$ -*Knockdown*-Embryonen mit den gleichen Antikörpern, S46 und MF20 analog zur Doppelimmunfluoreszenzfärbung

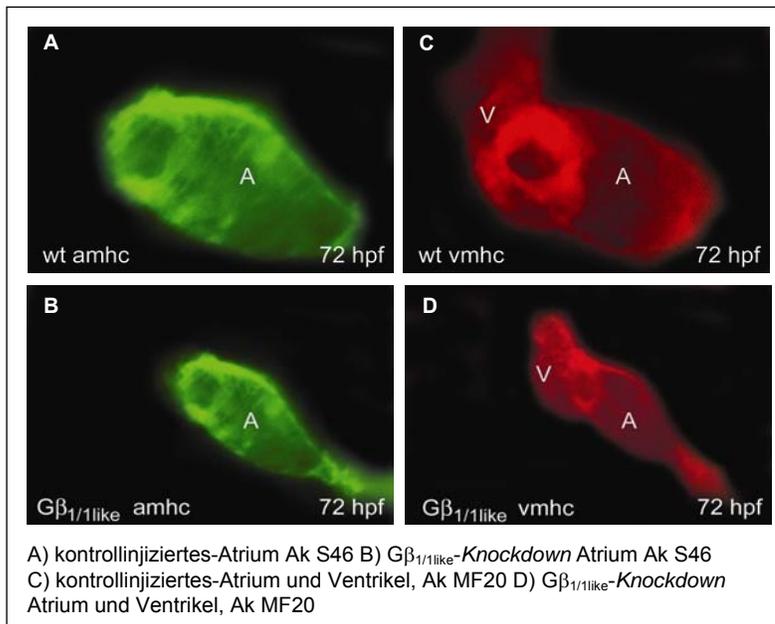


Abbildung 26): Doppelimmunfluoreszenz:  $G\beta_{1/1like}$ -*Knockdown*- vs. kontrollinjizierter Embryo

der NDPK-B-*Knockdown*-Embryonen gefärbt:

Ebenso wie bei den NDPK-B-*Knockdown*-Embryonen war bei der Expression des atrialen bzw. des ventrikulären Myosin in den Kardiomyozyten keine Veränderung festzustellen (Abb. 26A-D).

### 4.3 Auswirkung der NDPK B- und G $\beta$ <sub>1</sub>-Depletionen auf die Expression heterotrimerer G-Proteine

Der *Knockdown* der G $\beta$ <sub>1</sub>-Untereinheiten rief einen Phänotyp hervor, der nicht nur im äußeren Erscheinungsbild, sondern auch in funktioneller Weise sehr dem Phänotyp des NDPK B-*Knockdown* glich. Da die NDPK B bei der Rezeptor-unabhängigen Aktivierung mit den G-Proteinen einen Komplex bildet und direkt mit den G $\beta$ <sub>1</sub>-Untereinheiten in Interaktion tritt wurden die Depletionen der NDPK B und G $\beta$ <sub>1</sub>-Untereinheiten auf ihren wechselseitigen Einfluss hin untersucht.

#### 4.3.1 Wechselseitige Regulation der NDPK B und G $\beta$ <sub>1</sub> im *Knockdown*-Zebrafischembryo

Die Auswirkung des NDPK-*Knockdowns* (Abb.27) auf die  $\beta$ <sub>1</sub>-Untereinheiten und ihre korrespondierende  $\gamma$ <sub>2</sub>-Untereinheit war mittels Immunoblot analysiert worden (s. 4.7, Abb.15).

Beim NDPK-A-*Knockdown*, der ja keinen Phänotyp gezeigt hatte, war keine Abnahme der  $\beta$ <sub>1</sub>- bzw.  $\gamma$ <sub>2</sub>-Untereinheiten erkennbar gewesen. Beim NDPK-B-*Knockdown* dagegen war ein deutlicher Verlust des G $\beta\gamma$ -Dimers beobachtet worden.

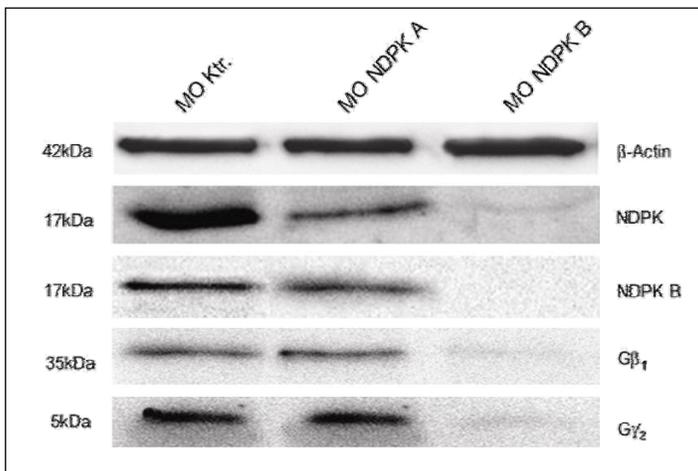


Abbildung 27): Immunoblot mit 72hpf NDPK-*Knockdown*-Embryo-Proteinhomogenaten

von links: kontrollinjiziert (MO Ktr.), NDPK-A-*Knockdown* (MO NDPK A); NDPK-B-*Knockdown* (MO NDPK B). Antikörper, von oben:  $\beta$ -Actin, NDPK, NDPK-B, G $\beta$ <sub>1</sub>, G $\gamma$ <sub>2</sub>

Vice versa wurde bei Embryonen, 72 Stunden nach  $G\beta_{1/1like}$ -Morpholino-Injektion die Auswirkung auf die NDPK B-Expression ebenfalls mittels Immunoblot analysiert (Abb.28). Gefärbt wurde mit Antikörpern gegen NDPK B und  $G\gamma_2$ , als Ladekontrolle diente wiederum  $\beta$ -Actin.

Der  $G\beta_{1/1like}$ -*Knockdown* führte fast zum vollständigen Verschwinden der NDPK B. Einzelinjektionen der Morpholinos gegen die beiden  $\beta_1$ -Untereinheiten führten jeweils zu einer 50%igen Reduktion der NDPK B.

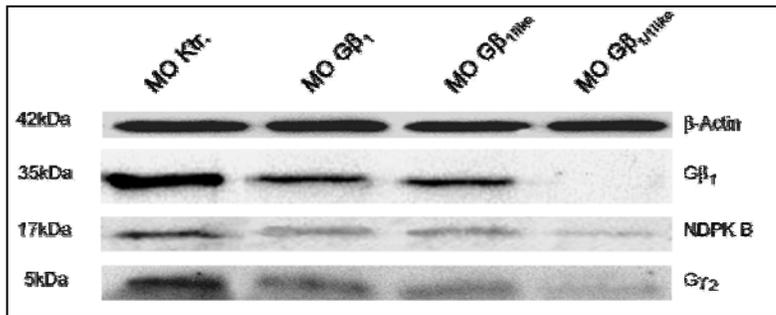


Abbildung 28): Immunoblot mit 72hpf  $G\beta_{1/1like}$ -*Knockdown*- Embryonen

von links: kontrollinjiziert (MO Ktr),  $G\beta_1$ -*Knockdown* (MO- $G\beta_1$ ),  $G\beta_{1like}$ -*Knockdown* (MO- $G\beta_{1like}$ ),  $G\beta_{1/1like}$ -*Knockdown* (MO- $G\beta_{1/1like}$ ). Antikörper, von oben:  $\beta$ -Actin,  $G\beta_1$ , NDPK B,  $G\gamma_2$

#### 4.3.2 Reduzierte NDPK Aktivität durch $G\beta_1$ -*Knockdown*

Im Immunoblot konnte gezeigt werden, dass der  $G\beta_{1/1like}$ -*Knockdown* fast vollständig zum Verschwinden der NDPK B führte. Dies sollte sich ebenfalls in einer verringerten Enzymaktivität äußern. Im NDPK-Aktivitäts-Assay zeigte sich 72 Stunden nach Injektion der Morpholinos gegen  $G\beta_{1/1like}$  in den Protein-Homogenaten eine Abnahme der NDPK-B-Aktivität um ca. 52% im Vergleich zu den kontroll-injizierten Fischen (Abb.29).

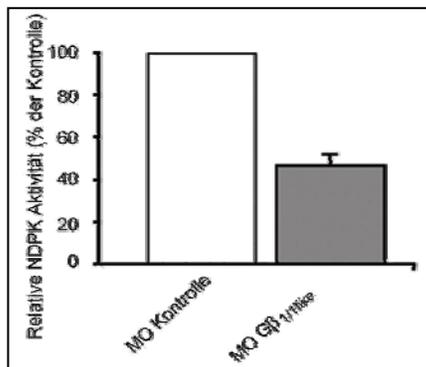


Abbildung 29): Relative enzymatische Aktivität der NDPK bei  $G\beta_{1/1like}$ -*Knockdown*-Embryonen

Der NDPK-Assay wurde 72h nach Injektion der MOs gegen  $G\beta_{1/1like}$  (MO  $G\beta_{1/1like}$ ) und des Kontroll-MOs durchgeführt.

### 4.3.3 Zeitlicher Verlauf der Expressionsregulation von $G\beta_1$ durch den NDPK B-Knockdown

Der kardiale Phänotyp des NDPK-B-*Knockdown* war bereits nach 48 Stunden gut von den Kontroll-injizierten Embryonen zu unterscheiden. Da sich außerdem herausgestellt hatte, dass der NDPK-B-*Knockdown* nach 72 Stunden zum Verschwinden der  $\beta_1$ -Untereinheiten führte, sollte der zeitliche Ablauf dieser Herunterregulation geklärt werden. Dafür wurden Fische während der ersten drei Tage der Embryonalentwicklung abgesammelt (nach 24h, 30h, 48h, 72h). Es wurde dann mittels Immunoblot analysiert, wie sich das Expressionsniveau von  $G\beta_1$  im Laufe der Entwicklung bei NDPK-B-*Knockdown*-Embryonen im Vergleich zu Kontroll-injizierten Fischen veränderte. Dabei wurden Antikörper gegen  $G\beta_1$ , NDPK und  $\beta$ -Actin verwendet.

In Abbildung 30 ist der zeitliche Verlauf der Embryonalentwicklung im Immunoblot dargestellt. Bereits nach 24 Stunden war der NDPK-B-*Knockdown* auf Proteinebene zu detektieren. Zu diesem Zeitpunkt war die Expression von  $G\beta_1$  noch nahezu unbeeinflusst. Ab der 30. Stunde nach Befruchtung der Zebrafisch-Oozyten und Injektion des Morpholinos zeigte sich eine, durch den NDPK-B-*Knockdown* verursachte Abnahme der  $\beta_1$ -Untereinheiten. In den nächsten zwei Tagen verringerte sich die  $G\beta_1$ -Expression bis unter die Nachweisgrenze.

Dieses Ergebnis bestätigte, dass die nach 48 Stunden aufgetretenen Veränderungen des NDPK-B- bzw.  $G\beta_{1/1like}$ -*Knockdown* vergleichbar waren.

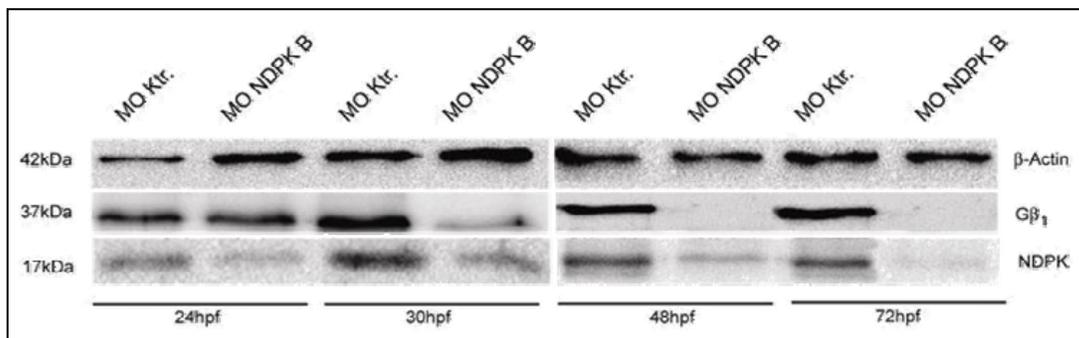


Abbildung 30): Immunoblot mit zeitlichem Verlauf des NDPK-B-*Knockdown* von links in abwechselnder Reihenfolge: kontrollinjiziert (MO Ktr), NDPK-B-*Knockdown* (MO-NDPK B), Antikörper, von oben:  $\beta$ -Actin,  $G\beta_1$ , NDPK

#### 4.3.4 Einfluss der NDPK B- und $G\beta_1$ -Depletion auf die $\alpha$ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine

Die  $G\alpha_s$ -Untereinheit ist wesentlicher Bestandteil der positiv inotrop wirkenden Signalkaskade über  $\beta$ -Adrenozeptoren am Herzen. Die Stabilität ihrer Expression in Kardiomyozyten wird wesentlich über membranständige  $G\beta\gamma$ -Dimere bestimmt (Mühlhäuser et al. 2006). Daher stellte sich die Frage, wie sich das Verschwinden der  $G\beta\gamma$ -Dimere auf die  $\alpha$ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine auswirkt.

Dazu wurden NDPK-B- bzw.  $G\beta_{1/1like}$ -Morpholino-injizierte Embryonen wiederum mittels Immunoblot bezüglich ihres Einflusses auf das Expressionsniveau der  $\alpha$ -Untereinheiten analysiert. Es wurden Antikörper gegen  $G\alpha_s$ -,  $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_{q/11}$ - und  $G\alpha_{12}$  verwendet (Abb. 31A, B)

In Abbildung 31A ist der Einfluss des *Knockdowns* von  $G\beta_{1/1like}$  auf die  $\alpha$ -Untereinheiten dargestellt. Alle vier Familien der  $\alpha$ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine wurden vom Verschwinden des  $G\beta\gamma$ -Dimers in ihrer Expression beeinflusst: Sowohl  $G\alpha_s$ -,  $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_{q/11}$ - als auch  $G\alpha_{12}$  wurden durch den  $G\beta_{1/1like}$ -*Knockdown* nahezu vollständig herunterreguliert.

Die Depletion der NDPK B erzeugte das gleiche Resultat: sie führte zum fast vollständigen Verlust der Expression der  $\alpha$ -Untereinheiten (Abb. 31B).

Um einen unspezifischen Verlust von Proteinen auszuschließen, wurden die Expressionen verschiedener Markerproteine herangezogen: pan Cadherin kommt Membran gebunden in der Zelle vor und wird häufig als Plasma-Membran-Marker eingesetzt. Es ist ein calciumabhängiges Zell-adhäsions-Molekül, welches eine wichtige Rolle beim Wachstum und der Entwicklung der Zelle spielt.  $\alpha$ -Tubulin, ein in den Mikrotubuli vorkommendes Molekül, eignet sich als Marker für cytoskelettäre Proteine. GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphatdehydrogenase) ist ein cytosolisches Enzym, das unter anderem in die Membranfusion und die Bündelung der Mikrotubuli involviert ist.

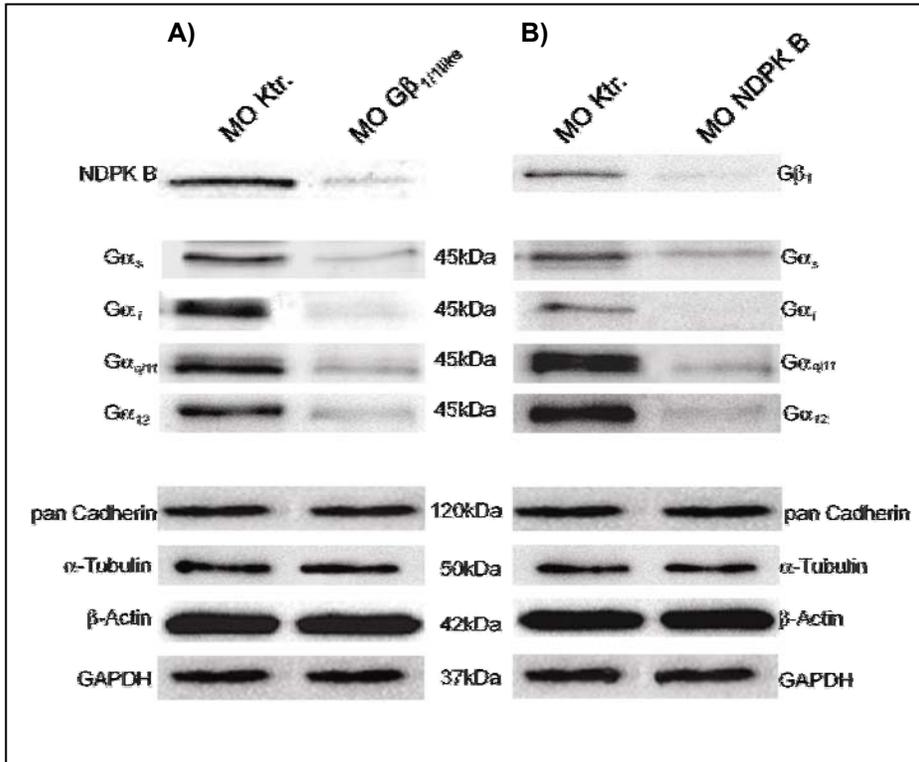


Abbildung 31): Immunoblot mit NDPK-B- und Gβ<sub>1/1like</sub>-Morpholinoinjizierten Proteinhomogenaten

A): von links: Kontroll-injiziert (MOKtr.), Gβ<sub>1/1like</sub>-*Knockdown* (MO Gβ<sub>1/1like</sub>); Antikörper, von oben: Gα<sub>5</sub>, Gα<sub>1</sub>, Gα<sub>q/11</sub>, Gα<sub>12</sub>, pan Cadherin, α-Tubulin, β-Actin und GAPDH (Glycerinaldehyde-3-phosphatdehydrogenase). B) von links: kontrollinjiziert (MOKtr.), NDPK B-*Knockdown* (MO-NDPK-B); Antikörper siehe A)

β-Actin, ein ubiquitär exprimiertes Muskelprotein, war schon in den vorangegangenen Immunoblots als Referenz, bzw. Ladekontrolle verwendet worden.

Alle diese Markerproteine blieben in ihrer Expressionsstärke unverändert.

Es blieb zu klären, ob der beobachtete wechselseitige Verlust der G-Proteine und der NDPK B bereits auf transkriptioneller Ebene oder erst nach Translation auf Proteinebene stattfand. Eine quantitative Analyse des mRNA-Gehalts mittels Light-Cycler für NDPK A bzw. B und Gβ<sub>1/1like</sub> sollte diese Fragestellung klären.

#### 4.3.5 Light-Cycler als quantitativer Nachweis auf mRNA-Ebene

Als Matritze für die Real-Time PCR im Light-Cycler wurde aus mRNA von 72hpf alten NDPK-B, Gβ<sub>1/1like</sub>-*Knockdown* Embryonen sowie kontrollinjizierten- und nichtinjizierten Embryonen cDNA synthetisiert. Da es nicht sicher war, ob sich der

G $\beta$ <sub>1</sub>-mRNA-Gehalt bei den NDPK-B-*Knockdown* Embryonen überhaupt veränderte, wurde für die beiden G $\beta$ <sub>1</sub>-Isoformen des Zebrafisches nur ein Primerpaar gegen eine der beiden Isoformen gewählt (G $\beta$ <sub>1like</sub>), da sich beide Varianten in ihrem Verhalten auf Proteinebene glichen (Abb. 32A) und das Ergebnis des Light-cyclers somit für die andere Isoform höchstwahrscheinlich ebenfalls gültig wäre.

Zur Analyse der G $\beta$ <sub>1/1like</sub>-*Knockdown* Embryonen auf mRNA-Ebene wurde ein Primerpaar gegen NDPK B gewählt (Abb. 32B).

Nach PCR-Optimierung der Primerpaare und Ermittlung der Standard-Kurve mit Primer gegen  $\beta$ -Actin wurde der Gehalt der mRNA auf die mRNA für  $\beta$ -Actin standardisiert und quantitativ ausgewertet.

Ein Pool aus mRNA von nichtinjizierten Embryonen wurde als 100% Standard verwendet. Wie auch die Verwendung einer Anzahl mRNAs der bestehenden Kontrollgruppen verdeutlichte, lag die Schwankungsbreite der Messungen bei ca. 20%. Weder in NDPK B- noch G $\beta$ <sub>1/1like</sub>-Morpholino-injizierten Embryonen konnten signifikante Veränderungen auf mRNA-Ebene beobachtet werden, was somit eine wechselseitige Beeinflussung der G-Proteine und der NDPK B auf transkriptioneller Ebene ausschloss.

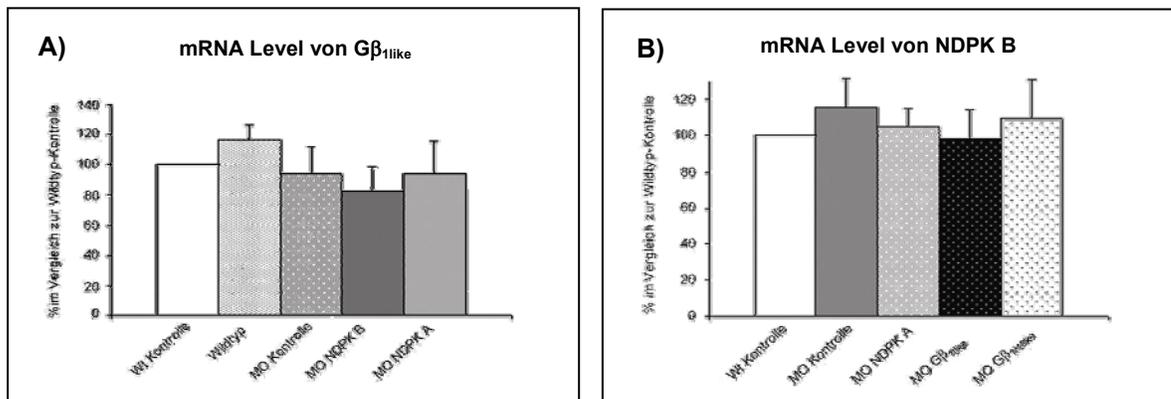


Abbildung 32): Light-cycler

A) G $\beta$ <sub>1like</sub>-mRNA-Level: (von links nach rechts) Standard 100%(Wt Kontrolle), Wildtyp117%, Kontrollinjiziert 94% (MO Kontrolle), NDPK-B-*Knockdown* 83% (MO NDPK B ), NDPK-A-*Knockdown* 94% (MO NDPK A).  
 B) NDPK-B-mRNA-Level: (von links nach rechts): Standard 100% (WtKontrolle), kontrollinjiziert 116% (MO Kontrolle), NDPK-A-*Knockdown* 105% (MO NDPK A), G $\beta$ <sub>1like</sub>-*Knockdown* 99% (MO G $\beta$ <sub>1like</sub>), G $\beta$ <sub>1/1like</sub>-*Knockdown* 110% (MO G $\beta$ <sub>1/1like</sub>),

## 5 Diskussion

Schon in den Jahren 1988 bis 1990 legten biochemische Daten einer japanischen Arbeitsgruppe (Kimura & Shimada 1988, 1990) nahe, dass eine Komplexbildung der NDPK mit heterotrimeren G-Proteinen stattfindet, die zur Aktivierung von G-Proteinen durch GTP-Bildung beitragen könnte. Obwohl auch in Membranpräparationen aus anderen zellulären Systemen (Jakobs & Wieland 1989, Wieland et al. 1992) Hinweise auf eine solch enge Assoziation der NDPK mit G-Proteinen gab, wurde eine Funktion der NDPK, der über den Ersatz des durch G-Proteine verbrauchten GTPs durch Nachbildung aus GDP und ATP hinausgeht, in Frage gestellt (Otero, 1990). Weitere biochemische *in-vitro*-Daten sowie Untersuchungen in verschiedenen Zelltypen haben inzwischen ergeben, dass spezifisch die NDPK B-Isoform mit einer G $\beta\gamma$ -Untereinheit einen Komplex bildet und innerhalb dieses Komplexes G-Proteine über eine Phosphattransferreaktion Rezeptor-unabhängig aktiviert werden können (Hippe, 2003, Cuello, 2003). Neueste Untersuchungen zeigten, dass dieser Mechanismus zur Regulation der basalen Kontraktilität in isolierten Rattenkardiomyozyten beiträgt (Hippe 2007). In dieser Arbeit sollte daher im Zebrafisch-Modell erstmals die Bedeutung des NDPK/G $\beta\gamma$ -Komplexes *in vivo*, insbesondere im Hinblick auf die Herzfunktion, untersucht werden.

### 5.1 *Knockdown* von NDPK und G $\beta$ im Zebrafisch

Der Zebrafisch bietet die Möglichkeit, Signaltransduktionswege der kardiovaskulären Physiologie und Pathophysiologie *in vivo* zu analysieren (Rottbauer, G&D 2005; Rottbauer, G&D 2007). Für viele Proteine besteht eine ausgeprägte Homologie zwischen humanen und den jeweiligen orthologen Zebrafisch-Proteinen. So sind die im Mittelpunkt dieser Arbeit stehenden NDPK und G $\beta$  jeweils zu ~80% bzw. ~98% identisch zum humanen Ortholog. Dies deutet auf ähnliche Proteininteraktionen und -funktionen hin. Mittels Morpholinos lässt sich die Translation einzelner Gene spezifisch abschalten und damit die

Expression des jeweiligen Proteins im Zebrafisch spezifisch verringern. Vorteilhaft für die Analyse ist, dass Zebrafischembryonen auch ohne funktionierendes Herz eine Woche lebensfähig sind (Fishman/Stainer, 1994). Die Transparenz der Zebrafischembryonen erlaubt zudem, dass die Herzfunktion am lebenden Fisch optisch bestimmt und quantifiziert werden kann (Briggs, 2002; Fishman, Stainer, 1994; Paxton, 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst mittels Injektion spezifischer Morpholinos das erste Tiermodell mit einem *Knockdown* der NDPK B generiert. Der Verlust der NDPK B verursachte einen ausgeprägten kardiovaskulären Phänotyp, der durch eine hochgradig eingeschränkte Pumpfunktion des Herzens und einen Defekt in der Blutgefäßbildung gekennzeichnet ist. Dagegen wirkt sich der NDPK A *Knockdown* trotz vergleichbarer Reduktion der Expression und NDPK-Aktivität nicht nachteilig auf den Zebrafisch aus. Dies deckt sich mit kürzlich publizierten Daten, wonach der NDPK A-*Knockout* in Mäusen keinen offensichtlichen Phänotyp hervorruft (Arnaud-Dabernat, 2003). Zur Untermauerung der Spezifität der erhobenen Daten wurde der *Knockdown* in verschiedenen Zebrafischlinien mit unterschiedlichem genetischen Background (TE4/6, Tü-AB, Tg(fli:egfp)) mit jeweils gleichem Ergebnis wiederholt. Zusätzlich wurden mehrere Markerproteine aus verschiedenen Zellkompartimenten überprüft; alle Markerproteine blieben in ihrer Expressionsstärke unverändert.

Der spezifische *Knockdown* des Komplexpartners der NDPK B, der  $G\beta_1$ -Untereinheit, im Zebrafisch lieferte ebenfalls das erste Wirbeltiermodell, das die Untersuchung der kardiovaskulären Physiologie nach dem Verlust einer G-Protein- $\beta$ -Untereinheit erlaubt. Bisherige Daten waren an Zellkulturmodellen, dem Wurm *Caenorhabditis elegans* oder dem Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* gewonnen worden (Hwang, 2005; Krumins, 2006; Peracino, 1998; Zwaal, 1996). Im Gegensatz zu höheren Organismen, die nur über ein Gen für die  $G\beta_1$ -Untereinheit verfügen, exprimiert der Zebrafisch offenbar zwei Isoformen,  $G\beta_1$  und  $G\beta_{1like}$ , die von unterschiedlichen Genen kodiert werden. Sowohl der *Knockdown* von  $G\beta_1$  als auch von  $G\beta_{1like}$ , insbesondere aber der *Knockdown* beider  $G\beta_1$ -Isoformen des Zebrafisch verursachte einen sehr ähnlichen Phänotyp wie der NDPK B

*Knockdown* mit deutlich eingeschränkter kardialer Pumpfunktion und vaskulären Defekten. Auch hier wurden die *Knockdowns* in verschiedenen Zebrafischlinien mit unterschiedlichem genetischen Background (TE4/6, Tü-AB, Tg(fli:egfp)) mit jeweils gleichem Ergebnis durchgeführt. Für  $G\beta_1$  wurden die Ergebnisse zusätzlich mit einem weiteren Morpholino, das nicht die Translation sondern das Spleissen der RNA an einer Exon/Introngrenze unterbindet (Splice-Morpholino Lit.) reproduziert. Dies war wegen fehlender Introns im Zebrafisch-NDPK-Gen für NDPK B nicht möglich.

## 5.2 NDPK B als Komplexpartner heterotrimerer G-Proteine

Die folgenden Befunde legen nahe, dass der Verlust des NDPK B/ $G\beta\gamma$  Komplexes tatsächlich für die beobachteten Phänotypen verantwortlich ist: 1) Die NDPK B und  $G\beta_{1/1like}$  *Knockdown*-Embryos entwickelten denselben Phänotyp mit Verlust der kardialen Kontraktilität und beeinträchtigter Gefäßausbildung. 2) Die Depletion der NDPK B-Isoform, aber nicht der NDPK A, war mit einem Verlust der Expression von  $G\beta_1\gamma$ -Dimeren verbunden. 3) Umgekehrt verursachte der  $G\beta_{1/1like}$ -*Knockdown* einen nahezu vollständigen Verlust der NDPK B-Expression. 4) Sowohl der *Knockdown* der NDPK B als auch der der  $G\beta_1$ -Untereinheiten reduzierte die Expression der  $\alpha$ -Untereinheiten aller vier G-Protein-Subfamilien. 5) Dabei wurde der mRNA-Gehalt der untersuchten Proteine nicht verändert und auch die Expression verschiedener Markerproteine nicht beeinflusst.

Neben den erstmals erhobenen *in vivo*-Daten zur Bedeutung der NDPK B für die Herzfunktion und Gefäßbildung, hat die vorliegende Arbeit als unerwartetes und wichtigstes Ergebnisse erbracht, dass die Depletion des NDPK B/ $G\beta\gamma$ -Komplexes den Verlust der Expression der  $\alpha$ -Untereinheiten aller 4 G-Protein-Subfamilien zur Folge hatte, was exemplarisch für  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_{q/11}$ ,  $G\alpha_{12}$  gezeigt wurde. Es ist schon seit einiger Zeit bekannt, dass sich  $G\alpha$ -Untereinheiten und  $G\beta\gamma$ -Dimere im trimeren Komplex gegenseitig stabilisieren (Wang/Robishaw, 1999; Hwang, 2004; Gilman, 1987). In aktuellen Arbeiten wurde dies mit Hilfe der siRNA-Technologie

erneut in Maus-Makrophagen (Hwang und Simon, 2004/2005) und HeLa-Zellen (Krumins, 2006) demonstriert. Zudem wurde kürzlich gezeigt, dass eine Beeinträchtigung der Membranverankerung von  $G\beta\gamma$ -Dimeren in Kardiomyozyten zu einem Verlust der  $G\alpha_s$ -Untereinheit und damit einer Abnahme der über  $\beta$ -Adrenozeptoren induzierten Kontraktilität in den Myozyten führt (Mühlhäuser/Eschenhagen, 2006). Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde deuten auf ähnliche Mechanismen im Modellorganismus des Zebrafisches hin, wobei allerdings die NDPK B als notwendiger, zusätzlicher Interaktionspartner im Komplex identifiziert werden konnte. Wurde die Expression eines der notwendigen Partner im Komplex (hier gezeigt für NDPK B bzw.  $G\beta_{1/1like}$ ) herunterreguliert, so führte dies zum Verlust der Expression heterotrimerer G-Proteine und der NDPK B. Der nahezu vollständige Verlust an heterotrimeren G-Proteinen ist wahrscheinlich auch für die starke Einschränkung der Pumpfunktion des Herzens in den NDPK B- bzw.  $G\beta_{1/1like}$ -*Knockdown* Embryonen verantwortlich. Sowohl bei der Depletion der NDPK B als auch bei Depletion von  $G\beta_1$  war die Entwicklung des Zebrafischherzens selbst nicht gestört. Wie die histologischen und immunhistologischen Färbungen zeigten, waren aller Herzen strukturell intakt. Dies steht im auffallenden Gegensatz zu einer Depletion einer ganzen Reihe von Genen (Raeker et al., 2006), NXT2 (Huang et al., 2005), SmyD1 (Tan et al., 2006),  $Na^+/K^+$  ATPase  $\alpha 1B$  (Cibrian-Uhalte et al., 2007), deren *Knockdown* zu kardialen Defekten in Zebrafischembryonen aufgrund von Entwicklungsdefekten des Herzens führte. Der Verlust der G-Proteine könnte den kardialen Phänotyp erklären, da die Wirkung der positiv inotrop und chronotrop wirkenden Hormone und Neurotransmitter fast ausschließlich über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren erfolgt. Unter Einbeziehung der kürzlich beschriebenen Rezeptor-unabhängigen Stimulation von kardialen  $G_s$ -Proteine über die NDPK B und deren Beteiligung an der Regulation der basalen Kontraktilität isolierter Kardiomyozyten (Hippe, 2007), ergibt sich damit ein Bild, das heterotrimeren G-Proteinen eine zentrale Rolle in der Regulation der Kontraktilität des Wirbeltierherzens zuweist. Die Störung der Gefäßbildung konnte in einer transgenen Fischlinie, der Tg(fli:egfp)-Linie, bei der die Endothelzellen EGFP exprimieren, visualisiert

werden. Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt wäre, dass es sich hier um einen sekundären Effekt aufgrund des reduzierten Blutflusses handelt. Eine kürzlich erschienene Publikation legt allerdings nahe, dass es sich hierbei ebenfalls um einen direkten Effekt aufgrund des Verlustes von heterotrimeren G-Proteinen handeln könnte. (Leung/Robishaw, 2006) und Kollegen konnten zeigen, dass der *Knockdown* der  $G_{\gamma 2}$ -Untereinheit im Zebrafisch, die auch in den hier vorgelegten Untersuchungen nach *Knockdown* der NDPK B in ihrer Expression stark vermindert war, an der VEGF-induzierten Angiogenese in Zebrafischembryonen beteiligt ist.

### 5.3 Posttranslationaler Mechanismus

Zur Klärung der Frage, über welchen Mechanismus NDPK B und die G Protein-Untereinheiten sich gegenseitig stabilisieren, wurde in dieser Arbeit der Gehalt an mRNA, die für die betroffenen Proteine kodieren, mittels Real-time PCR quantitativ bestimmt. In Übereinstimmung mit den Daten aus den Zellkultur-Untersuchungen (Hwang und Simon, 2004/2005, Krumins, 2006) ließen sich keine signifikanten Änderungen im RNA-Gehalt nach *Knockdown* der NDPK B oder  $G\beta_{1/1like}$  im Zebrafisch feststellen. Dies deutet auf einen posttranslationalen Mechanismus der Regulation des Proteingehaltes hin. Dabei könnte zum Beispiel der proteolytische Abbau der G-Protein-Untereinheiten beschleunigt sein, wenn NDPK B oder  $G\beta_1$  als wichtiger Komplexpartner fehlen. Es gibt derzeit eine Reihe von Hinweisen, dass G-Proteine, bevorzugt freie  $G\alpha$ -Untereinheiten bzw.  $G\beta\gamma$ -Dimere, nach Ubiquitinierung durch proteasomale Degradation abgebaut werden (Obin et al., 2002; Hamilton et al., 2003; Ogasawara et al., 2004). Ein weiterer möglicher Mechanismus wäre eine Störung im Zusammenbau (Assembly) des Proteinkomplexes, falls eines der beteiligten Proteine fehlt. In kürzlich veröffentlichten Arbeiten wurde gezeigt, dass für den Zusammenbau von  $G\beta\gamma$ -Dimeren und deren Transport in die Plasmamembran in Säugetier-Zellen das Phosducin-like protein-1 (PhLP1) als Chaperon für  $G\beta$  essentiell ist (Lukov et al., 2005). Zusätzlich wurde DRiP78 (Dopamin Receptor interacting protein 78) als ein ER-membran-gebundenes Chaperon für  $G\gamma$  beschrieben (Hérbert, 2007).

Vorstellbar wäre, dass die NDPK B als Co-Faktor ebenfalls zum Zusammenbau des Komplexes benötigt wird und der Verlust der G-Protein-Untereinheiten dadurch verursacht wird, dass NDPK B als wichtiger Co-Faktor fehlt. Auf der Grundlage der vorliegenden Ergebnisse ist derzeit keine eindeutige Abschätzung möglich, ob das Fehlen der NDPK B bzw. von  $G\beta_1$  im Zebrafisch den G-Protein-Abbau beschleunigt, den Zusammenbau beeinträchtigt oder gar beides beeinflusst.

#### **5.4 Schlussfolgerung: Bedeutung des NDPKB/ $G\alpha\beta\gamma$ Komplex *in vivo***

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit begründen eine neue Rolle der NDPK B als essentieller Komplexpartner heterotrimerer G-Proteine. Die Interaktion der NDPK B mit G-Proteinen ist offenbar notwendig für die wechselseitige Stabilität der beteiligten Proteine. Die NDPK B beeinflusst danach über zwei verschiedene Mechanismen die G Protein-vermittelte Signaltransduktion: Einerseits trägt die NDPK B über die Phosphorylierung der  $G\beta$ -Untereinheit zur G Protein-Aktivität bei (Cuello, 2003, Hippe, 2003, 2007), andererseits scheint die NDPK B, wie in dieser Arbeit gezeigt, den Gehalt an G Proteinen in der Zelle zu regulieren und dadurch die kardiale Kontraktilität und eventuell angiogenetische Prozesse im Zebrafisch zu beeinflussen.

#### **5.5 Ausblick**

Auf der Grundlage der Ergebnisse dieser Arbeit sollte in weiteren Versuchen der Mechanismus der posttranslationalen Regulation des G-Proteingehaltes untersucht werden. Dazu könnten z.B. die Proteasom-Inhibitoren MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-H) und Epoxomicin (Teckman et al., 2001 J) im Zebrafisch eingesetzt werden, um die Rolle des proteasomalen Abbauweges zu klären. Die Bedeutung des G Protein-Zusammenbaus könnte mit Hilfe des *Knockdowns* verschiedener Chaperone, z.B. PHLP1 (als mögliche Interaktionspartner der NDPK B), im Zebrafisch untersucht werden. Die wichtige Frage nach der Allgemeingültigkeit des in dieser Arbeit beschriebenen Phänomens der Stabilisierung heterotrimerer G-Proteine durch NDPK B/ $G\beta\gamma$ -Komplexe könnte z.B. mittels siRNA-vermitteltem *Knockdown* der

NDPK B und G $\beta$  in verschiedenen Säugetierzellen verifiziert werden. Letztendlich kann diese Frage allerdings nur durch einen konditionellen *Knockout* der NDPK B in der Maus endgültig geklärt werden.

## 6 Zusammenfassung

### 6.1 Abstract

In human heart failure, nucleoside diphosphate kinase (NDPK) is elevated by 300% at the plasma membrane. Specifically, the NDPK B isoform is complexed with G protein  $\beta\gamma$  ( $G\beta\gamma$ ) dimers. However, the role of this NDPK B/ $G\beta\gamma$  complex in heart function remains unclear.

Zebrafish embryos were used in this study as an *in vivo* model, to assess the cardiac function resulting from a selective *knockdown* of zebrafish orthologs of the dominant NDPK isoforms A and B as well as the both  $G\beta_1$ -subunits  $G\beta_1$  and  $G\beta_{1\text{like}}$  by injection of morpholino antisense oligos compared to control-injected wild-type embryos. Reduced expression of the highly conserved NDPK or  $G\beta$  proteins was confirmed 72 hours after injection by immunoblot and NDPK activity analysis of zebrafish lysate. Depletion of NDPK B, but not NDPK A, led to severely compromised atrial and ventricular cardiac function associated with pericardial edema, insufficient blood flow and impaired vasculogenesis. Histology (HE stain) and immunofluorescence staining revealed intact development and no structural defects in the *knockdown* hearts. As a consequence of the NDPK B depletion, a nearly complete loss of  $G\beta_1$  and  $G\gamma_2$  proteins as well as  $\alpha$ -subunits of  $G_s$ ,  $G_i$ ,  $G_q$  and  $G_{12}$  proteins was detected, whereas the mRNA content of all non targeted proteins remained unaffected.

Depletion of the zebrafish  $G\beta$ -subunits  $G\beta_1$  and  $G\beta_{1\text{like}}$  caused a similar phenotype with comparable impaired cardiac contractility. Like the depletion of NDPK B, the knockdown of  $G\beta_{1/1\text{like}}$  was associated with a loss of  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_q$ ,  $G\alpha_{12}$ ,  $G\gamma_2$  and, most importantly, NDPK B.

Taken together, the data show an essential role for the interaction of NDPK B with  $G\beta\gamma$  dimers to maintain G protein expression and thus normal cardiac contractility *in vivo*. Thus, an increased membranous NDPK level in the failing heart is likely to have important functional implications.

## 6.2 Zusammenfassung

Der Gehalt des Enzyms Nukleosid-Diphosphat-Kinase (NDPK) ist in Plasmamembranen aus chronisch insuffizienten Herzen um 300% höher als in Plasmamembranen gesunder Herzen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die NDPK B-Isoform des Enzyms in der Plasmamembran Komplexe mit G-Protein- $\beta\gamma$ -Dimeren ( $G\beta\gamma$ ) bildet, die heterotrimere G-Proteine über eine Phosphattransfer-Reaktion aktivieren können. Unklar ist jedoch, welche Rolle diese Komplexbildung aus NDPK B und  $G\beta\gamma$  für die Funktion des Herzens spielt. In dieser Arbeit wurde deshalb im *in-vivo*-Modell des Zebrafischembryos die Expression der im Herzen dominanten NDPK-Isoformen, NDPK A und B sowie der human Orthologen der  $G\beta_1$ -Untereinheiten,  $G\beta_1$  und  $G\beta_{1like}$ , mittels Morpholino-Injektion ausgeschaltet und die Herzfunktion im Vergleich zu Wildtyp- bzw. kontrollinjizierten Zebrafischembryonen untersucht. Die Abnahme der NDPK- bzw.  $G\beta_1$ -Expression wurde 72 Stunden nach Morpholino-Injektion im Immunoblot und NDPK-Aktivitäts-Assay nachgewiesen. Die Depletion der NDPK B, nicht aber der Isoform A, verursachte einen kardialen Phänotyp, der durch eine deutlich verminderte Pumpfunktion, verminderten Blutfluss und einen Defekt in der Gefäßbildung gekennzeichnet war. Dabei zeigten histologische Färbungen und Immunhistologie eine strukturell intakte Entwicklung des Herzens. Als Folge des Knockdowns der NDPK B konnte eine deutliche Reduktion der Expression der  $G\beta_1$ - und  $G\gamma_2$ -Untereinheiten, sowie der  $\alpha$ -Untereinheiten von  $G_s$ -,  $G_i$ -,  $G_q$ - und  $G_{12}$ -Proteinen beobachtet werden. Der Gehalt an mRNAs, die für die untersuchten Proteine kodieren, war dagegen unbeeinflusst. Der Morpholino-induzierte *Knockdown* der  $G\beta$ -Untereinheiten  $G\beta_1$  und  $G\beta_{1like}$  zeigte einen ähnlichen hypokontraktilen Phänotyp. Wie beim NDPK B-*Knockdown* konnte ein Verlust von  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_q$ ,  $G\alpha_{12}$ ,  $G\gamma_2$  sowie der NDPK B beobachtet werden.

Die Daten dieser Arbeit belegen deshalb erstmalig die essentielle Rolle des NDPK B/ $G\beta\gamma$ -Komplexes für eine normale Kontraktilität des Herzens *in vivo*. Der erhöhte Plasmamembrangehalt an NDPK im chronisch insuffizienten Herzen könnte deshalb von erheblicher physiologischer Bedeutung sein.

## 7 Literaturverzeichnis

Ackermann, G.E. and B.H. Paw, *Front Biosci*, 2003. 8: p. d1227-53.

Akiyama SK. *Hum Cell*. 1996 9(3):181-6. Review.

Arnaud-Daubernat S, Bourbon PM, Dierich A, Le Meur M, Daniel JY. *J Bioenergetics Biomembranes* 2003 35: 19-30.

Backer JM, Mendola CE, Kovesdi I, Fairhurst JL, O'Hara B, Eddy RL Jr., Shows TB, Mathew S, Murty VVVS and Changanti RSK. *Oncogene* 1993 8: 497-502.

Baillat G, Gaillard S, Casets F, Monneron A. *J. Biol. Chem.* 2002 277: 18961-18966.

Bendig G, Grimmeler M, Huttner IG, Wessels G, Dahme T, Just S, Trano N, Katus HA, Fishman MC, Rottbauer W. *Genes Dev.* 2006;20(17):2361-2372.

Briggs, J.P., *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2002. 282(1): p. R3-9.

Busconi L, Guan J, Denker BM.. *J Biol Chem.* 2000;275(3):1565-1569.

Chen, J.N., P. Haffter, J. Odenthal, E. Vogelsang, M. Brand, F.J. van Eeden, M. Furutani-Seiki, M. Granato, M. Hammerschmidt, C.P. Heisenberg, Y.J. Jiang, D.A. Kane, R.N. Kelsh, M.C. Mullins, and C. Nusslein-Volhard. *Development*, 1996. 123: p. 293-302.

Christoffels, V.M., J.B. Burch, and A.F. Moorman, *Cardiovasc Med*, 2004. 14(8): p. 301-7.

Cibrián-Uhalte, E., Langenbacher, A., Shu, X., Chen., J., Abdelilah-Seyfried,S., 2007; *JCB*, 176(2), 223-230

Colomb MG, Cheruy A, Vignais PV. *Biochemistry* 1969 8: 1926-1939.

Craiu A, Akopian,T., Goldberg A., and Kenneth L. Rock, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 September 30; 94(20): 10850–10855.

Cuello F, Schulze RA, Heemeyer F, Meyer HE, Lutz S, Jakobs KH, Niroomand F, Wieland T. . J Biol.Chem.2003 278: 7220-7226.

Dascal N. Trends Endocrinol Metab. 2001 12(9):391-8. Review.

De Lean A, Stadel JM, Lefkowitz RJ. J. Biol. Chem. 1980 255: 7108-7117.

Driever, W., D. Stemple, A. Schier, and L. Solnica-Krezel, Trends Genet, 1994. 10(5): p. 152-9.

Dumas C, Lascu I, Morera S, Glaser P, Fourme R, Wallet V, Lacombe ML, Veron M, Janin J. EMBO J 1992 11: 3203-3208.

Dupre DJ, Robitaille M, Richer M, Ethier N, Mamarbachi AM, Hebert TE. J Biol Chem. 2007;282(18):13703-13715.

Engel M, Veron M, Thesinger B, Lacombe ML, Seib T, Welter C., Eur. J. Biochem. 1995;234: 200-207.

Erent M, Gonin P, Cherfils J, Tissier P, Raschella G, Giartosio A, Agou F, Sarger C, Lacombe ML, Konrad M, Lascu I. Eur J Biochem. 2001 268(7):1972-81.

Fischer T, De Vries L, Meerloo T, Farquhar MG.. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(14):8270-8275.

Fishman MC, Stainier DY. Circ Res. 1994;74(5):757-763.

Fournier HN, Dupet-Manet S, Bouvard D, Lacombe ML, Block MR, Albiges-Rizo C. J Biol Chem. 2002 277: 20895-20902.

Gilles AM, Presecan E, Vonica A and Lascu I. J. Biol. Chem. 1991 266: 8784-8789

Haffter, P. and C. Nusslein-Volhard, Int J Dev Biol, 1996. 40(1): p. 221-7.

Gilman AG. Annu Rev Biochem. 1987;56:615-649.

Hamilton MH, Cook LA, McRackan TR, Schey KL, Hildebrandt JD. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003.;100(9):5081-6.

- Hamm HE, J. Biol. Chem. 1998 273: 669-672.
- Hartsough MT, Steeg PS. J. Bioenerg. Biomembr. 2000 32: 301-308.
- Hartsough MT, Morrison DK, Salerno M, Palmieri D, Steeg PS. J. Biol. Chem. 2002 277: 32389-32399.
- Hébert, TE., Dupré, DJ, Robitaille M, Richer M, Ethier N, Mamarbachi AM, J Biol Chem. 2007 May 4;282(18):13703-15.
- Hippe HJ, Lutz S, Cuello F, Knorr K, Vogt A, Jakobs KH, Wieland T, Niroomand F. J Biol Chem. 2003;278(9):7227-7233.
- Hippe HJ, Wieland T, J Bioenerg Biomembr. 2006 Aug;38(3-4):197-203
- Hippe HJ, Luedde M, Lutz S, Koehler H, Eschenhagen T, Frey N, Katus HA, Wieland T, Niroomand F. Circ Res. 2007;100(8):1191-1199.
- Huang, H., Zhang, B., Hartenstein, PA., Chen, J., Lin, S., BMC Dev Biol. 2005; 5: 7.
- Hu, N., H.J. Yost, and E.B. Clark, Anat Rec, 2001. 264(1): p. 1-12.
- Hwang JI, Choi S, Fraser ID, Chang MS, Simon MI. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(27):9493-9498.
- Hwang JI, Fraser ID, Choi S, Qin XF, Simon MI. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(2):488-493.
- Ishikawa N, Shimada N, Fukuda M, Ishijima Y, Miyazaki H, Ishii A, Takagi Y, Kimura N. J Bioenergetics Biomembranes 2003 35(1): 7-18.
- Jakobs KH, Wieland T. Eur. J. Biochem. 1989 183: 115-121.
- Kikkawa S, Takahashi K, Takahashi KI, Shimada N, UI M, Kimura N, Katada T. J. Biol. Chem. 1990 258: 21536-21540.
- Kimura N, Shimada N. J. Biol. Chem. 1988 263: 4647-4653.
- Kimura N, Shimada N. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1990 151: 248-256.
- Klug A. Ann N Y Acad Sci. 1995 758:143-60. Review.

- Knol JC, Engel R, Blaauw M, Visser AJ, van Haastert PJ. *Mol Cell Biol.* 2005;25:8393-840.
- Kowluru A, Amin R, *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord.* 2002 Jul;2(2):129-39. Review.
- Kraeft SK, Traincart F, Mesnildrey S, Bourdais J, Veron M, Chen LB. *Exp. Cell Res.* 1996 227: 63-69.
- Krumins AM, Gilman AG. *J Biol Chem.* 2006;281(15):10250-10262.
- Lacombe ML, Milon, L, Munier A, Mehus JG, Lamberth DO. *J. Bioenerg. Biomembr.* 2000 32: 247-258.
- Lacombe ML, Wallet V, Troll H, Veron M. *J Biol Chem.* 1990 265: 10012-18.
- Lacoste C, Barthaux V, Iborra C, Seagar M, Erard-Garcia M. *Dev Biol.* 2006;294:181-191.
- Lascu I, Gonin P. *J. Bioenerg. Biomembr.* 2000 32: 237-246.
- Leung T, Chen H, Stauffer AM, Giger KE, Sinha S, Horstick EJ, Humbert JE, Hansen CA, Robishaw JD. *Blood.* 2006;108(1):160-166.
- Lohr, J.L. and H.J. Yost,. *Am J Med Genet,* 2000. 97(4): p. 248-57.
- Lukov GL, Baker CM, Ludtke PJ, Hu T, Carter MD, Hackett RA, ThulinCD, Willardson BM. *J Biol Chem.* 2006;281(31):22261-22274.
- Lutz S, Mura R, Baltus D, Movsesian M, Kubler W, Niroomand F. *Cardiovasc Res.* 2001 49(1): 48-55.
- Lutz S, Mura RA, Hippe HJ, Tiefenbacher C, Niroomand F. *Br J Pharmacol* 2003 140: 1019-1026
- Lyons, G.E., *Curr Opin Genet Dev,* 1996. 6(4):p. 454-60.
- Mehus JG, Deloukas P, Lambeth, DO. *Hum. Genet.* 1999 104: 454-459.
- Metscher BD, Ahlberg PE, *Dev Biol.* 1999 Jun 1;210(1):1-14. Review.
- Moon H, Lee B, Choi G, Yun DJ. *PNAS* 2003 100: 358-363.

Moorman, A.F., A.T. Soufan, J. Hagoort, P.A. de Boer, and V.M. Christoffels, *Ann N Y Acad Sci*, 2004. 1015:p. 171-81.

Morera S, Lascu I, Dumas C, Janin J. *Biochemistry* 1994 33: 459-467.

Morris AJ, Scarlata S. *Biochem Pharmacol.* 1997 54(4): 429-35. Review.

Mühlhäuser U, Zolk O, Rau T, Munzel F, Wieland T, Eschenhagen T.. *Faseb J.* 2006;20(6):785-787.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 1986 1: 263-273.

Munier A, Feral C, Milon L, Pinon VP, Gyapay G, Capeau J, Guellaen G, Lacombe ML. *FEBS Lett.* 1998 434: 289-294.

Naviglio S, Pagano M, Romano M, Sorrentino A, Fusco A, Illiano F, Chiosi E, Spina A, Illiano G. *Cell Signal.* 2004;16(11):1229-1237.

Obin M, Lee BY, Meinke G, Bohm A, Lee RH, Gaudet R, Hopp JA, Arshavsky VY, Willardson BM, Taylor A.. *J Biol Chem.* 2002; 277(46):44566-44575.

Offermanns S, and Simon MI. *Cancer Surv.* 1996 27, 177-198.

Ogasawara J, Sakurai T, Rahman N, Kizaki T, Hitomi Y, Ohno H, Izawa T. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Oct 22;323(3):1109-15.

Otero, A. D. *Biochem.Pharmacol.* 1990 39, 1399-1404.

Otero AS., Xu L, Ni Y, Szabo G. *J. Biol. Chem.* 1998 273: 28868-28872.

Otsuki Y, Tanaka M, Yoshii S, Kawazoe N, Nakaya K, Sugimura H. *PNAS* 2001 98: 4385-4390.

Paravicini G, . Steinmayr M, André E; *Biochemical and Biophysical Research Communications* 227, 1996, 82-87.

Palacois F, Schweitzer JK, Boshans RL, D'Souza-Schorey C. *Nat Cell Bio* 2002 4: 929-926.

- Paxton, C., H. Zhao, Y. Chin, K. Langner, and J. Reecy, Gene, 2002. 283(1-2): p.117-24.
- Peracino B, Borleis J, Jin T, Westphal M, Schwartz JM, Wu L, Bracco E, Gerisch G, Devreotes P, Bozzaro S. J Cell Biol. 1998;141(7):1529-1537.
- Pinon VP, Millot G, Munier A, Vassy J, Linares-Cruz G, Capeau J, Calvo F, Lacombe ML. Exp Cell Res. 1999 246(2): 355-67.
- Pitcher JA, Inglese J, Higgins JB, Arriza JL, Casey PJ, Kim C, Benovic JL, Kwatra MM, Caron MG, Lefkowitz RJ. Science. 1992 257(5074): 1264-7.
- Postel EH, Flint SJ, Kessler DJ, Hogan ME. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991 88: 8227-8231.
- Postel EH, Berberich SJ, Rooney JW, Kaetzel DM. J Bioenerg. Biomembr. 2000 32(3): 277-84.
- Postel EH; J Bioenerg Biomembr. 2003;35(1):31-40.
- Raeker, MS., Su, F., Geisler, S., Borisov, AB., Kontrogianni-Konstantopoulos, A., Lyons, SE., Russell, MW.; Dev Dyn 2006; 235 (8), 2018 – 2029.
- Randazzo P, Northup J, Kahn R. Science 1991 254: 850-853.
- Randazzo P, Northup JK, Kahn RA. J. Biol. Chem. 1992 267: 18182-18189.
- Robishaw JD; Blood. 2006 Jul 1;108(1):160-6.
- Rottbauer W, Just S, Wessels G, Trano N, Most P, Katus HA, Fishman MC. Genes Dev. 2005;19(13):1624-1634.
- Rottbauer W, Wessels G, Dahme T, Just S, Trano N, Hassel D, Burns CG, Katus HA, Fishman MC. Circ Res. 2006;99(3):323-331.
- Saiki RK; Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Science 1988 239: 487-491.
- Samama P, Cotecchia S, Costa T, Lefkowitz RJ. J Biol Chem. 1993 268(7):4625-36.
- Schaertl S, Konrad M, Geeves MA. J. Biol. Chem. 1998 273: 5662-5669.

Schneider B, Xu YW, Janin J, Veron M, Deville-Bonne D. J Biol Chem. 1998 273(44): 28773-8.  
Seo JA, Yu JH. Eukaryot Cell. 2006;5:400-441.

Serbedzija, G.N., J.N. Chen, and M.C. Fishman, Development, 1998. 125(6): p. 1095-101.

Stainier, D.Y. and M.C. Fishman, Dev Biol, 1992. 153(1): p. 91-101.

Stainier, D.Y., R.K. Lee, and M.C. Fishman, Development, 1993. 119(1): p. 31-40.

Stainier, D.Y., Nat Rev Genet, 2001. 2(1): p. 39-48.

Stennard, F.A., M.W. Costa, D. Lai, C. Biben, M.B. Furtado, M.J. Solloway, D.J. McCulley, C. Leimena, J.I. Preis, S.L. Dunwoodie, D.E. Elliott, O.W. Prall, B.L. Black, D. Fatkin, and R.P. Harvey,. Development, 2005. 132(10): p. 2451-62.

Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L, Thorgeirsson UP, Talmadge JE, Liotta LA, Sobel ME. J Natl Cancer Inst. 1988 80(3): 200-4.

Steeg PS, Bevilacqua G, Pozzatti R, Liotta LA, Sobel ME. Cancer Res. 1988 48(22): 6550-4.

Tan, X., Rotllant, J., Li, H., De Deyne, P.; PNAS, 2006, 103(8), 2713-2718.

Teckman J, Burrows J, Hidvegi T, Schmidt B, Hale PD, Perlmutter D; J. Biol. Chem. 2001, Vol. 276, Issue 48, 44865-44872.

Trinh le, A. and D.Y. Stainier, Methods Cell Biol, 2004. 76: p. 455-73.

Wagner P, and Vu N. J. Biol. Chem. 1995 270: 21758-21764.

Wagner P, Steeg PS, Vu N. PNAS 1997 94: 9000-9005

Wagner P, and Vu N. Biochem J. 2000 346: 623-630.

Wagner P, and Vu N. J. Biol. Chem. 2000 275: 35570-35576.

Wallet V, Mutzel R, Troll H, Barzu O, Wurster B, Veron M, Lacombe ML. J. Natl. Cancer Inst. 1990 82: 1199-1202.

Wang Q, Mullah BK, Robishaw JD. J Biol Chem. 1999;274(24):17365-17371.

Weinstein, B.M. and M.C. Fishman, Cardiovasc Res, 1996. 31 Spec No: p. E17-24.

Weissman AM; Nat Rev Mol Cell Biol. 2001;2:169-178.

Wieland T, Ronzani M, Jakobs KH. J. Biol. Chem. 1992 267: 20791-20797.

Wieland T, Nürnberg B, Ulibarri I, Kaldensberg-Stasch S, Schultz G, Jakobs KH. J. Biol. Chem. 1993 268: 18111-18118.

Wieland T, Ronzani M, Jakobs KH. J. Biol. Chem. 1992 267: 20791-20797.

Wieland T; Ulibarri I, Gierschick P, Jakobs KH. Eur. Biochem. 1991 196: 707-716.

Wieland T, Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2007 Feb;374(5-6):373-83.

Xu L, Murphy JM, Otero AS. J. Biol. Chem. 1996 271: 2120-21125.

Yelon, D. Dev Dyn, 2001. 222(4): p. 552-63.

Zhu J, Tseng YH, Kantor JD, Rhodes CJ, Zetter BR, Moyers JS, Kahn CR. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999 96: 14911-14918.

Zwaal RR, Ahringer J, van Luenen HG, Rushforth A, Anderson P, Plasterk RH., Cell. 1996;86(4):619-629.

## Danksagung

Ich möchte an erster Stelle Prof. Thomas Wieland danken, dafür, dass er mich „übernommen“ hat, als es einen Arbeitgebewechsel während der Arbeit gab. Dafür, dass er immer mit Rat und Ideen zu Stelle war und dafür, dass er mich auch während meines Elternjahres weiterhin so gut unterstützt hat.

Ich danke Prof. Feraydoon Niroomand für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seinem damaligen Labor begonnen habe zu dürfen.

Ich möchte mich auch bei meinem Kollegen Hans-Jörg Hippe bedanken, der immer bereit war Ergebnisse zu diskutieren, neue Ideen mitzuentwickeln und mir während seiner Laborzeit mit Tipps und Methodik zur Seite stand.

Danke auch an Tina Stephan-Schnatz, die mich im ersten Jahr tatkräftig unterstützt hat, sowie an Mechthild Samer, die mich das zweite Jahr begleitet und mir eine große Hilfe war.

Ein großer Dank geht auch an das Labor Rottbauer, an alle die mich unterstützt und beraten haben, besonders Jörg Rauch, ohne dessen Fisch-„Know-how“ die ganze Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen wäre.

Ein großer Dank gebührt natürlich Wolfgang Rottbauer, für die großzügige Möglichkeit in seinem Labor viele essentielle Versuche durchgeführt zu haben.

Danke auch an das Mannheimer Labor, besonders an Susanne Lutz für die Hilfe und Unterstützung während der Light-Cycler Zeit.

Dann möchte ich mich noch bei meinem Mann Davut bedanken, der all meinen Launen und Stimmungen mit Ruhe und Gelassenheit begegnete und mich wo und wann er konnte unterstützt hat.