

UNIVERSITÄTSKLINIKUM ULM

Zentrum für Innere Medizin

Klinik für Innere Medizin II

Ärztl. Direktor: Prof. Dr. W. Rottbauer

Charakterisierung der Mutation FHL 1 C224W im Zebrafisch

Generierung von transgenen Zebrafischlinien aus FHL 1 wt, H123Y, C132F sowie C224W

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der
Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Alexander Sebastian Fuchs, geb. Kieltsch

Stuttgart

Amtierender Dekan:

Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter:

Prof. S. Just

2. Berichterstatter:

Prof. G. Weidinger

Tag der Promotion:

14.07.2017

Inhaltsverzeichnis

Seite

1	Einleitung.....	1
1.1	MFM – progrediente Erkrankungen des Skelettmuskels	1
1.2	Four and a half LIM Domain Protein 1 (FHL 1)	2
1.3	Der Zebrafisch als Modellorganismus	3
1.4	Genfunktionsanalysen im Zebrafisch	5
1.5	Zielsetzung der Doktorarbeit	6
2	Material und Methoden.....	8
2.1	Puffer, Lösungen und Medien	8
2.2	Molekularbiologische Kits.....	10
2.3	Antisense Oligonukleotide (Morpholinos)	11
2.4	DNA Oligonukleotide	11
2.5	Plasmide	12
2.6	Antikörper.....	13
2.7	Laborgeräte.....	13
2.8	Datenbanken.....	14
2.9	Software	14
2.10	Zebrafischspezifische Methoden.....	15
2.11	Präparation, Modifikation, Detektion und Analyse von Nukleinsäuren	23
2.12	Transgenese von Zebrafischen.....	29
3	Ergebnisse.....	32
3.1	Funktionelle Analyse von FHL 1 im Zebrafisch	32
3.1.1	<i>In Situ</i> Hybridisierungen konnten die Lokalisation von FHL1b im Herz darstellen.....	33
3.1.1.1	Histologie der ISH zeigt die Expression von FHL1b im Ausflusstrakt des Herzens	35

3.1.2	FHL <i>Knockdown</i> durch Morpholino Injektionen	37
3.1.2.1	FHL1a Morphanten zeigen kardiale Dysfunktion.....	37
3.1.2.2	FHL1b Morphanten zeigen kardiale Dysfunktion und ausgeprägte Skelettmuskeldeformitäten	39
3.1.3	<i>Touch response</i> Versuche zeigen verlangsamte Reaktionen.....	40
3.1.4	Die Herzfrequenz ist bei den Morphanten verringert	41
3.1.5	Elektronenmikroskopische Bilder zeigen Rarifizierung der Skelettmuskulatur bei FHL1a Morphanten	42
3.2	Charakterisierung der Mutation FHL 1 C224W im Zebrafisch	44
3.2.1	Die Überexpression von FHL 1 C224W hat keine Auswirkungen auf den Phänotyp	44
3.2.2	Mit FHL 1 C224W ist kein Rescue möglich.....	46
3.3	Generierung von transgenen Zebrafischlinien.....	48
4	Diskussion.....	52
4.1	Funktionen und Expressionsmuster von FHL 1.....	52
4.2	Mutation FHL 1 C224W	54
4.3	Transgene Zebrafischlinien	55
5	Zusammenfassung	57
6	Literaturverzeichnis.....	58
Anhang	62	
	Aminosäuren-Einbuchstabencode	62
	Aminosäuren-Codesonne	62
	Tierschutzantrag	63
	Abbildungsverzeichnis	64
	Tabellenverzeichnis	65

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
%	Prozent
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest.	aqua bidestillata (zweifach destilliertes Wasser)
BAG 3	Bcl-2-associated athanogene-3
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CaCl ₂	Calciumchlorid
CIP	Calf Intestinal Phosphatase
cm	Zentimeter
d.h.	das heißt
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNPT	Desoxynukleotide
dNTP	Didesoxynukleosid-5'triphosphat
DTT	Dithioreitol
E.coli	Escherichia coli
EDMD	Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskopie
EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
FCS	Fötales Kälberserum
FHL 1	Four and a Half LIM Domain Protein 1
for	Forward
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
hPa	Hektopascal
hpf	Hours post fertilization (Stunden nach Befruchtung)
IRES	Internal ribosome entry site
ISH	<i>In Situ</i> Hybridisierung
Isl-1	Islet 1
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid

kDa	Kilo Dalton
kDa	Kilo Dalton
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
LB	Luria Bertani Broth
LiCl	Lithiumchlorid
Lin-11	Lineage Protein 11
mA	Miliampere
MFM	Myofibrilläre Myopathien
MgCl_2	Magnesiumchlorid
MgSO_4	Magnesiumsulfat
mM	miliMol
mRNA	Messenger RNA
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
Na_2SO_4	Natriumsulfat
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO_3	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NBT/ BCIP	nitro-blue tetrazolium and 5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NH_4	Ammoniumacetat
nm	Nanometer
NTMT	NaCl + Tris-HCl + Magnesiumchlorid + Tween
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphat- gepufferte Salzlösung
PBT	Polybutylenterephthalat
PCR	Polymerasekettenreaktion
pg	Pikogramm
PTU	Phenylthiourea
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RBM	Reducing Body Myopathy
rev	Reverse
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Reverse Transkriptase
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real Time PCR
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLIM 1	Skeletal muscle LIM protein 1
SSC	Natriumcitrat
SSRI	Selektiver Serotonin Reuptake Inhibitor

TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	1x TBS + 0,05% Tween-20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
Tween	Handelsname für Polysorbat 20
u.a.	unter anderem
V	Volt
VCP	valosin- containing protein
VE Wasser	Vollentionisiertes Wasser
w/v	weight per volume (Gewicht pro Volumen)
wt	Wildtyp
XMPMA	X-Chromosomale Myopathie mit posturaler Muskelatrophie
X-SM	Scapuloperoneale Myopathie
ZASP	Z-band alternatively spliced PDZ-motif protein

Firmenverzeichnis

Firmennamen	Firmensitz
ABgene Germany	Hamburg, GER
Agowa / LGC Genomics	Berlin, GER
Ambion (Europe) Ltd	Huntingdon, UK
Amersham Biosciences Europe GmbH	Freiburg, GER
AppliChem GmbH	Darmstadt, GER
Applied Precision Inc. Isaaquah	Washington, USA
BD Bioscience (Beckton Dickinson GmbH)	Heidelberg, GER
BioGenex	San Ramon, USA
Biometra GmbH i. L.	Göttingen, GER
Carl Roth GmbH + Ko. KG	Karlsruhe, GER
Carl Zeiss AG	Oberkochen, GER
Elma Hans Schmidbauer GmbH + Ko. KG	Singen, GER
Eppendorf AG	Hamburg, GER
Genetex	San Antonio, USA
Gene-tools, LLC	Philomath, USA
Greiner Bio-One International AG	Frickenhausen, GER
Intergen (Europe)	Edinburgh, UK
Imgenex Crop.	San Diego, USA
Invitrogen GmbH (Gibco, Molecular Probes)	Karlsruhe, GER
Kappa opto-electronics GmbH	Gleichen, GER
Leica Camera AG	Solms, GER
Merck KgaA	Darmstadt, GER
Metabion International AG	Planegg-Martinsried, GER
MWG Biotech AG	Ebersberg, GER
neoLab	Heidelberg, GER
Nunc GmbH & Co. KG	Wiesbaden, GER
Olympus Europa SE & CO. KG	Hamburg, GER
PEQLAB Biotechnologie GmbH	Erlangen, GER
Polysciences Europe GmbH	Eppelheim, GER
Promega GmbH	Mannheim, GER
PROXITRONIC Funk GmbH + Ko KG	Bensheim, GER
Qiagen GmbH	Hilden, GER
Roche Diagnostics GmbH	Mannheim, GER
Schering	Berlin, GER
SERVA Electrophoresis GmbH	Heidelberg, GER
Sigma-Aldrich Chemie GmbH (inkl. Fluka)	Taufkirchen, GER
Systec GmbH Labor-Systemtechnik	Wettenberg, GER
World Precision Instruments (Harry Fein)	Berlin, GER

1 Einleitung

1.1 Myofibrilläre Myopathien

– *progrediente Erkrankungen des Skelettmuskels*

Myofibrilläre Myopathien (MFM) sind humane, progressive Skelettmuskelerkrankungen, welche oft eine myokardiale Beteiligung aufweisen. Die Patienten entwickeln meist im Krankheitsverlauf Kardiomyopathien oder eine respiratorische Insuffizienz (Claeys & Fardeau, 2013; Goebel, Fardeau, Olivé, & Schröder, 2008). MFM führen zu einer schweren körperlichen Beeinträchtigung und häufig zu einem vorzeitigen Tod des Patienten. Der Verlauf ist gekennzeichnet durch eine langsam beginnende jedoch im Endstadium schwerwiegend verlaufende Muskelschwäche und -atrophie der Bein- und Armmuskulatur, zum Teil ist auch der Rumpf mit betroffen. Je nach Form beginnt die Muskelschwäche distal oder gleichförmig. Myopathien sind eine Gruppe von Erkrankungen mit heterogenen Erscheinungsbildern, was die Diagnose und die Zuordnung erschwert. Sie treten oft erst im Erwachsenenalter auf, können sich aber auch schon in der Kindheit oder frühen Adoleszenz manifestieren (Goebel et al., 2008; Schröder & Schoser, 2009).

Histopathologisch sind die MFM durch Proteinaggregationen und myofibrilläre Degeneration gekennzeichnet. Während ca. 50% der MFM durch Mutationen in Genen, die für sarkomerische und extrasarkomerische Proteine (Desmin, Filamin C, Plectin, VCP, FHL 1, ZASP, Myotilin, α -B-Kristallin und BAG 3) kodieren, bedingt sind, wird die andere Hälfte dieser Erkrankungen durch bislang unbekannte Gendefekte verursacht (Hayashi, 2013; Schessl et al., 2008a; Schröder et al., 2002; Selcen & Engel, 2004, 2005; Vorgerd et al., 2005). Häufig erfolgt die Vererbung autosomal dominant, jedoch kommen auch rezessive und sporadische Formen vor (Goebel, Fardeau, Olivé, & Schröder, 2008). Die Erforschung der zugrundeliegenden molekularen Pathomechanismen ist von größter Bedeutung, um Zielstrukturen für therapeutische Interventionen zu identifizieren. Zurzeit existiert noch keine spezifische Therapie für diese zahlenmäßig signifikante Gruppe erblicher Muskelerkrankungen.

1.2 Four and a half LIM Domain Protein 1 (FHL 1)

Mutationen im Four and a Half LIM Domain Protein 1 (FHL 1) können zur Ausprägung einer Myofibrillären Myopathie führen. Das humane FHL 1 ist auf dem X Chromosom (Xq26.3) lokalisiert. FHL 1 wird beim Menschen im Skelett- und Herzmuskel exprimiert. Des Weiteren kommt FHL 1 beim Menschen im Gehirn, der Plazenta, der Lunge, der Leber, den Nieren, dem Pankreas und in den Hoden vor (Po-Hsien Chu, Ruiz-Lozano, Zhou, Cai, & Chen, 2000; Morgan & Madgwick, 1999; Ng et al., 2001).

FHL 1 gehört zu der Familie der LIM Proteine und besteht strukturell aus viereinhalb LIM Domänen. Dabei handelt es sich um hochkonservierte doppelte Zinkfinger (Abb. 1), die aus über 50 Aminosäuren bestehen und Cystein reich sind. Die LIM Domänen koordinieren die Zinkatome und wurden nach den drei Proteine Lin-11, Isl-1 und Mec-3, in welchen sie als erstes entdeckt wurden, benannt (Bach, 2000).

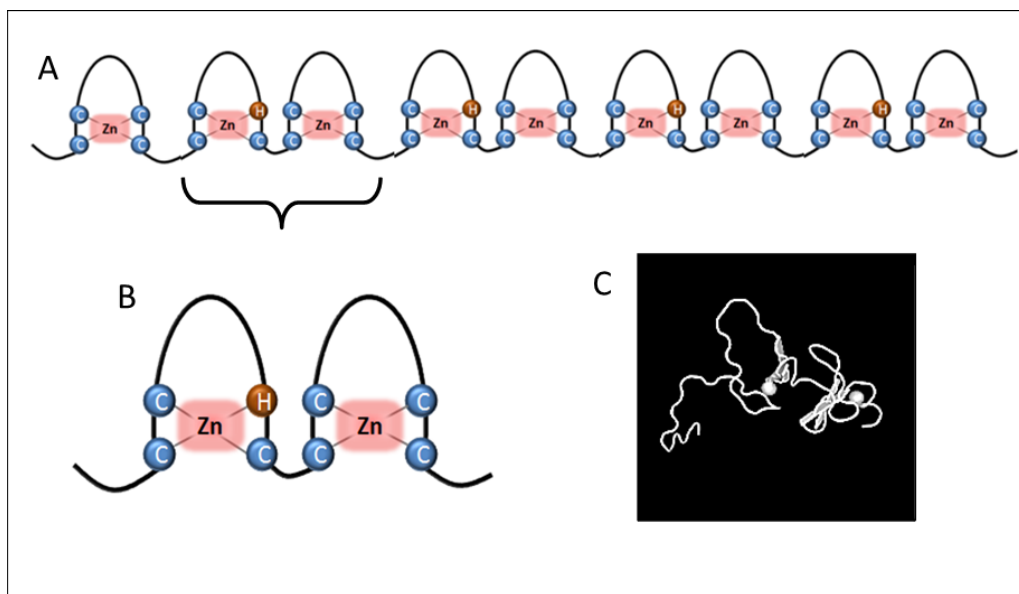


Abb. 1 : Schematische Darstellung der FHL Domänen: A: FHL Protein mit Zink Finger Domänen (Zn) B: einzelnes LIM Protein C: FHL 3D Modell von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?uid=58725> (08.05.2013))

FHL 1 – auch SLIM 1 (*skeletal muscle* LIM protein 1) genannt - ist im Skelettmuskel sowohl in den Sarkomeren als auch im Sarkolemm lokalisiert. Es ist gemeinsam mit anderen Proteinen an der gewebespezifischen Genregulation im Zellkern und im Zytoplasma an der Organisation des Zytoskeletts beteiligt (Pao-Hsien Chu & Chen, 2011). Die genauen Funktionen der FHL 1 Isoformen FHL 2 und FHL 3

bleiben dabei jedoch ungeklärt. Sie spielen wahrscheinlich eine Rolle beim Aufbau der Sarkomere und in der Regulation des Myosin-bindenden Proteins C (McGrath et al., 2006).

Zu den FHL 1 assoziierten Myofibrillären Myopathien (FHL1opathien) gehören nach heutigem Wissensstand die Reducing Body Myopathy (RBM), die X-chromosomale Myopathie mit posturaler Muskelatrophie (XMPMA), die Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy (EDMD) sowie die scapuloperoneale Myopathie (X-SM) an (Schessl et al., 2008a; Schoser et al., 2009; Windpassinger et al., 2008). Alle vier Erkrankungen werden durch Mutationen im FHL 1 Gen hervorgerufen. FHL1opathien folgen einem X-chromosomal dominanten Erbgang (Schessl et al., 2009). Die Isoformen FHL 2 und FHL 3 konnten bislang nicht als krankheitsverursachende Proteine identifiziert werden. Charakteristisch für die Erkrankungen sind Proteinaggregationen, welche auf histologischer Ebene als zytoplasmatische Muskelfasereinschlusskörperchen identifiziert werden können. Es wurden bereits krankheitsverursachende Mutationen beim Menschen identifiziert. Dazu gehören H123Q, H123Y, H123L, C132F, C153R, C153Y (Schessl et al., 2009).

Zur Erforschung der Pathomechanismen, welche für die Entstehung der FHL1opathien verantwortlich sind, wird ein *in vivo* Tiermodell wie das des Zebrafisches benötigt.

1.3 Der Zebrafisch als Modellorganismus

Der Zebrafisch oder auch Zebrafärbling (lat. *danio rerio*, Abb.2) ist in der Genetik und Entwicklungsbiologie ein weit verbreiteter Modellorganismus. Beheimatet ist der Zebrafisch in den Zuflüssen des Ganges, in Indien und Bangladesch sowie in Pakistan. Die zur Familie der Karpfenfische zählenden Zebrafische erreichen eine Maximalgröße von fünf Zentimetern. Zudem ist er als Aquarienzierfisch bekannt. In der Forschung hat sich der Zebrafisch als Modellorganismus etabliert. Ihn zeichnen diesbezüglich einige Vorteile aus. Dazu gehören die schnelle und extra-uterine Embryonalentwicklung, die optische Transparenz der Embryonen bis ins Larvenstadium sowie ein kurzer Generationszyklus (Geschlechtsreife nach 3- 4 Monaten). Da innerhalb kürzester Zeit große Gelege verfügbar sind, (bis zu 300 Eier pro Weibchen/ Woche) kann in Studien eine hohe Fallzahl generiert werden. Die Oozyten sind zugänglich und groß genug für Injektionen (Westerfield, 1993).

Der Zebrafisch zeichnet sich durch eine effiziente genetische Manipulierbarkeit (Mutagenese, Screens, Transgenese) aus (Udvardi & Linney, 2003). Er hat geringe Ansprüche an die Haltung (Wasser, Futter und Beckengröße) und zeigt zuletzt eine große Homologie der Physiologie und der molekularen Signalwege zum Menschen (Barbazuk et al., 2000).



Abb. 2: Adulter Zebrafisch (<http://info.noldus.com/Portals/96806/images/Zebrafish%20-%20Adult%20in%20an%20Aquarium.jpg> (12.05.13) © University of Oregon.)

Der Zebrafisch ermöglicht es demnach systematisch und in großem Maßstab verschiedene Erkrankungen zu untersuchen sowie neue Krankheitsgene zu identifizieren bzw. bereits bekannte weiter zu charakterisieren (Chen et al., 1996; Gibbs, Horstick, & Dowling, 2013). So konnten zum Beispiel die Krankheitsbilder der Hypertrophie und Dilatativen Kardiomyopathien genauer analysiert werden (Hodatsu et al., 2014; Kloos, Katus, & Meder, 2012). Auch die myofibrillären Myopathien können durch das Tiermodell des Zebrafisches charakterisiert werden (Bührdel et al., 2015). Durch die Erforschung im Zebrafisch konnten bereits für viele kardiovaskuläre Erkrankungen zugrunde liegende Pathomechanismen verstanden werden. Die Transparenz der Fische ermöglicht zusätzlich eine gute Darstellung der Skelettmuskulatur, wodurch auch Skelettmuskelerkrankungen in den Fokus der Forschung gerückt sind.

Die Entwicklung des Zebrafisches vom Einzellstadium bis hin zum adulten Zebrafisch erfolgt innerhalb weniger Monate (Abb.3). Bereits 72 Stunden nach der Befruchtung der Eizelle ist das kardiovaskuläre System des Zebrafisches soweit ausgereift, wie das eines neugeborenen Säugers (Stainier, Lee, & Fishman, 1993). Da die Sauerstoffaufnahme durch Diffusion aus dem sie umgebenden Medium erfolgt, sind Zebrafischembryonen im Gegensatz zu Säugetieren in der ers-

ten Woche ihrer Embryonalentwicklung nicht auf ein intaktes Herz-Kreislauf System angewiesen (Burggren & Pinder, 1991). Somit können selbst schwere phänotypische Veränderungen am Herzen, die zu dessen Funktionsverlust führen, untersucht werden (Chen et al., 1996).

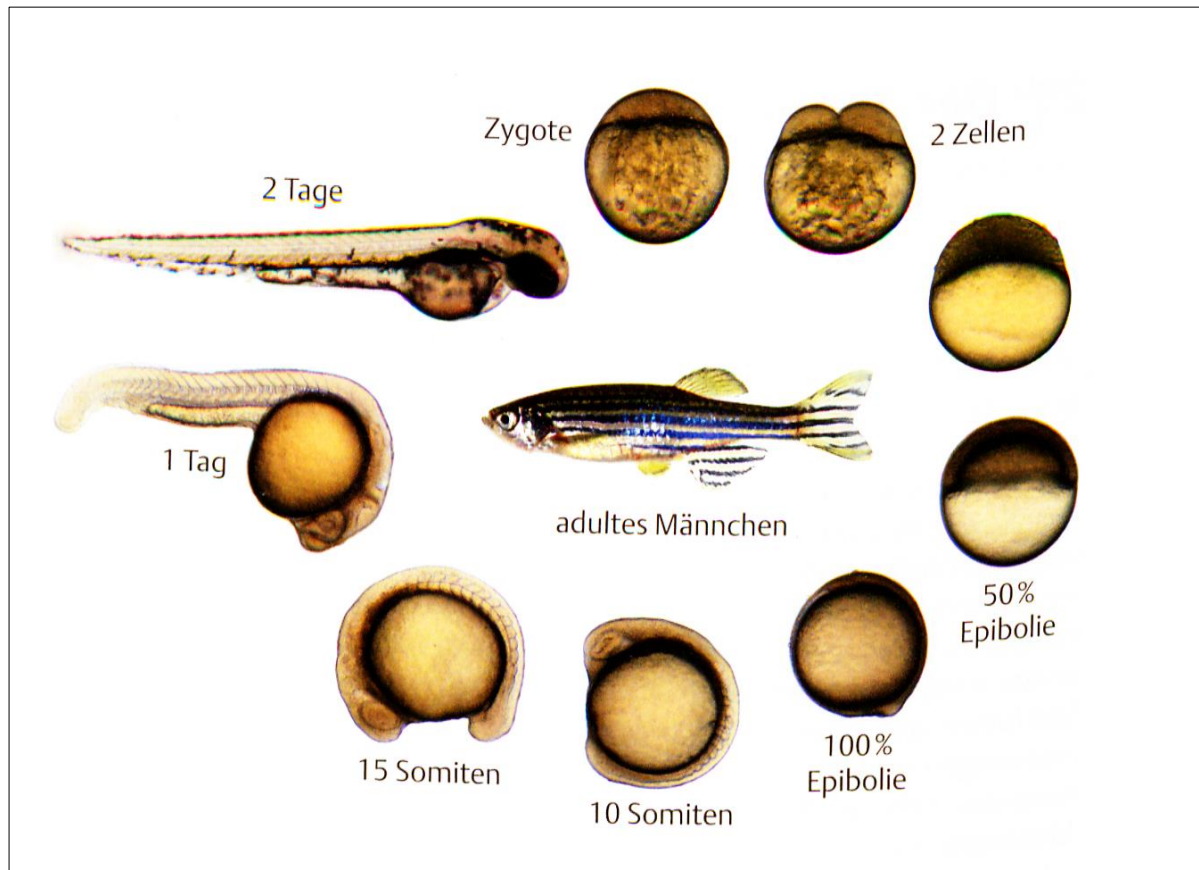


Abb. 3: Stadien der Zebrafischentwicklung: Von der befruchteten Zygote bis hin zu 48 hpf (*hours post fertilization*) alten Zebrafischembryonen, mittig ein adultes Männchen (Janning, Wilfried; Knust, Elisabeth: Genetik. - 2. Aufl. - Stuttgart : Thieme, 2008. - S. 450)

1.4 Genfunktionsanalysen im Zebrafisch

Um humane Erkrankungen und die involvierten Signalkaskaden im Modellorganismus Zebrafisch näher zu analysieren und zu charakterisieren, wird unter anderem der *reverse genetics* Ansatz angewendet.

Hierbei wird auf Grundlage einer Hypothese die Funktion eines Gens untersucht. Es werden Kandidatengene im Modellorganismus, welche bereits mit humanen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden konnten, auf ihre genaue Genfunktion hin näher untersucht. Für die Analyse der Genfunktion gibt es verschiedene Techniken, die derzeit Anwendung finden. So kann der Funktionsverlust des Gens

mittels Morpholino vermitteltem Gen *knockdown*, oder Zinkfinger-nukleasen, erzeugt und untersucht werden (Ekker, 2000; Nasevicius & Ekker, 2000; Summerton, 1999; Lawson & Wolfe, 2011). Eine Überexpression beschreibt dagegen die stark erhöhte Expression eines Gens. Diese bewirkt eine erhöhte Transkription und Translation des Proteins, welches durch das überexprimierte Gen codiert wird. Dieser Vorgang kann transient durch Injektion von mRNA (messenger RNA) oder stabil durch verschiedene Transgenesemethoden erreicht werden (Jao, Maddison, Chen, & Burgess, 2008).

Bei der Transgenese wird fremde DNA in einen Organismus eingeführt. Beim Zebrafisch geschieht dies durch Mikroinjektion in befruchtete Oozyten (Culp, Nüsslein-Volhard, & Hopkins, 1991). Ziel ist dabei eine Integration in die Keimbahn zu bewirken, sodass die injizierte DNA mit der Mutation an die Nachkommen weitergegeben wird und somit eine stabile transgene Linie entsteht. Wird die injizierte DNA ins Genom integriert, werden dementsprechend die darauf kodierten Gene (z.B. mit Gendefekt) transkribiert und zu Proteinen translatiert. Bei den Nachkommen der so gentechnisch veränderten Fische, werden die eingeführten Gendefekte durch verschiedene Promoter gewebespezifisch dauerhaft exprimiert.

Wird die injizierte DNA zwar von der Zelle aufgenommen aber nicht in das Genom integriert, wird sie nur transient in den Fischen exprimiert. Die dadurch transkribierten und translatierten Proteine sowie die injizierte DNA unterliegen den natürlichen Abbauprozessen der Zelle, sodass eine transiente Injektion nur einen temporären Effekt besitzt.

1.5 Zielsetzung der Doktorarbeit

Durch genetische Untersuchungen wurden bei Patienten mit Myofibrillären Myopathien Mutationen im FHL 1 Gen als ursächlich für die Erkrankungen identifiziert (Schessl et al., 2009). Beim Zebrafisch sind aufgrund einer Genomduplikation zwei orthologe Gene des humanen FHL 1 vorhanden: FHL1a und FHL1b. Diese Proteine genauer zu analysieren und ihre Lokalisation sowie ihre Funktionen im Zebrafisch darzustellen, ist eines der Hauptziele der vorliegenden Arbeit.

Nachdem die Wildtypvarianten FHL1a und FHL1b im Zebrafisch dargestellt wurden, soll untersucht werden, inwieweit die bei Patienten identifizierten Mutationen im Zebrafisch nachzustellen sind und welche Zusammenhänge zu den Erkrankun-

gen beim Menschen gezeigt werden können. Bei den krankheitsverursachenden Mutationen des humanen FHL handelt es sich unter anderem um H123Y und C132F, sowie um die Mutation C224W. In der vorliegenden Dissertation sollen diese ausgewählten Mutationen mit Hilfe des Modellorganismus Zebrafisch genauer charakterisiert werden (Schessl et al., 2009).

Eine Generierung von transgenen Zebrafischlinien von FHL 1 wt, H123Y, C132F sowie C224W ist eine weitere Zielsetzung der vorliegenden Dissertation. Da Myofibrilläre Myopathien beim Menschen oft erst im Alter auftreten und nur stabile transgene Zebrafische eine Expression über Monate bis Jahre aufweisen, kann durch diesen Versuchsansatz diese Entwicklungsdynamik und der beeinflussende Zeitfaktor untersucht werden.

2 Material und Methoden

Im folgenden Kapitel werden die molekulargenetischen Methoden, welche in dieser Dissertation angewandt wurden, näher erläutert. Des Weiteren werden die dafür benötigten Materialien aufgelistet und beschrieben. Verwendete Chemikalien wurden in der Qualitätsstufe „analysenrein“ bezogen. Genauere Angaben zu Herstellern und Lieferanten sind im Anhang zu finden.

2.1 Puffer, Lösungen und Medien

Sofern nicht anders erwähnt, wurden alle Puffer und Lösungen in *aqua bidest.* hergestellt, im Folgenden als ddH₂O bezeichnet.

Blockingpuffer 1:	5% Schafserum 0,2% BSA in PBT
Blockingpuffer 2:	10% FCS in PBDT
Blockingpuffer 3:	1,5% FCS in PBDT
Dents-Bleach:	50% Methanol 30% H ₂ O ₂ 20% DMSO
Dents-Fix:	80% Methanol 20% DMSO
Deyolking-Puffer:	55mM NaCl 1,8mM KCL 1,25mM NaHCO ₃
DNA Ladepuffer, 6x:	30% Glycerol 0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylencyanol
E3-Puffer:	4mM NaCl 0,33mM CaCl ₂ 0,33mM MgSO ₄ 0,17mM KCl
Fixing Solution	3% Sucrose 1,5% Glutaraldehyd 1% Paraformaldehyd 70mM Phosphatpuffer pH = 7,2
Hybridisierungspuffer:	50% Formamid 25% 20x SSC 5mg/ml Torula RNA 50µg/ml Heparin

	0,1% Tween 20
Infiltrating-Solution:	100ml JB-4 Embedding Solution A 1,25g Benzoyl Peroxid
Ladepuffer (Agarose), 6x:	30% Glycerol 0,25% Bromophenolblau 0,25% Xylencyanol
Ladepuffer (PAA), 6x:	50% Formamid 0,25% Bromophenolblau 0,25% Xylencyanol
LB-Agar:	30g LB-Agar in 1 Liter ddH ₂ O lösen und autoklavieren
LB-Medium:	20g LB-Broth in 1 Liter ddH ₂ O lösen und autoklavieren
Lower-Buffer, 4x:	1,5M Tris-HCl pH: 8,8 0,4% SDS
Mesab:	4mg/ml Ethyl-m-Aminobenzoat-Methansulfonat 1% Na ₂ HPO ₄ pH: 7,0-7,5
NTMT, 1x 50ml:	5ml 1M Tris HCl pH: 9,5 2,5ml 0,2M MgCl ₂ 1ml 5M NaCl 50µl Tween 20
PBDT:	1% DMSO in PBS
PBDT, 100 ml:	10ml 10x PBS 1ml DMSO 100µl Tween 20
PBS:	137mM NaCl 10mM Na ₂ HPO ₄ 2,68mM KCl 1,8mM KH ₂ PO ₄ pH: 7,4
PBST:	0,1% Tween 20 in PBS
PBT, 1x:	1x PBS + 0,1% Tween 20
Pronase:	1g Pronase in 50 ml ddH ₂ O, 4 h bei 37°C Inkubieren, Aliquots bei -20°C aufbewahren
Proteinase K Lösung:	10mg/ml Proteinase K
PTU, 100x:	3g 1-Phenyl-2-Thiourea in 1 Liter E3 lösen und Lichtgeschützt aufbewahren
SSC, 20x:	175,3g NaCl 88,2g Na- Citrat pH: 7,0

Stock B:	22,1g NaHCO ₃ 6,1g Na ₂ SO ₄
TBE, 10x:	121,1g Tris 51,53g Borsäure 3,72g EDTA pH: 8 (NaOH)
TBS, 20x:	175,32g NaCl 121,1g Tris- Base
TBST, 1x:	1x TBS 25ml 1M Tris-Cl, pH: 7,5 0,05% Tween 20
Upper-Buffer, 4x:	0,5M Tris-HCl, pH: 6,8 0,4% SDS
Washing-Buffer:	110mM NaCl 27mM CaCl ₂ 10mM Tris-Cl, pH: 8,5 3,5mM KCl

2.2 Molekularbiologische Kits

Die folgende Auflistung beinhaltet alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Kits mit Handelsnamen, Hersteller und dem Verwendungszweck.

Quiaprep Spin MiniPrep Kit (Fa. Qiagen)

Dieses Kit wurde nach Herstellerangaben dazu verwendet, Plasmid-DNA aus E.coli Bakterien zu isolieren. Es basiert auf der Bindung von DNA an Silikatoberflächen unter chaotropen Pufferbedingungen. Die Elution erfolgte je nach Anwendung in 50 oder 100µl ddH₂O.

Quiaquick Gel Extraction Kit (Fa. Qiagen)

Nach erfolgter Auftrennung von der DNA durch Gel-Elektrophorese wurde die zu extrahierende DNA aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Dieses Kit wurde dazu verwendet die gewünschten Fragmente aus dem Gel zu isolieren. Anwendung gemäß Herstellerangaben.

Topo TA Cloning Kit (Fa. Invitrogen)

Nach Herstellerangaben wurden mit diesem Kit Standard-Klonierungen von PCR Produkten hergestellt.

mMessage mMaschine SP6, T3, T7 (Fa. Ambion)

Die mRNA- Herstellung durch *in vitro*-Transkription erfolgte mit Hilfe des „mMessage mMaschine Kits“ von Ambion nach Herstellerangaben.

2.3 Antisense Oligonukleotide (Morpholinos)

Die Antisense Oligonukleotide (Morpholinos) Stocks gegen FHL1a und FHL1b wurden in ddH₂O aufgenommen (5mM). Für die Morpholino Injektion in das 1-4 Zellstadium von Zebrafischoozyten wurde der Stock mit 200mM KCL auf die entsprechende Konzentration verdünnt. Die notwendige Konzentration um einen optimalen Phänotyp herzustellen, wurde durch Injektionen mit verschiedenen Verdünnungen ermittelt. Die verwendeten Morpholinos wurden von der Firma GeneTools bezogen und sind im Folgenden aufgeführt.

MO1-FHL1a-splice: 5'-ATTGTCGTTTAACTCGTACCTTTGC-3'

(gegen Spleiß-Donor Stelle von Exon 2)

MO2-FHL1a-splice: 5'-TCCTCTTATCCTTAACTGACCTCTT-3'

(gegen Spleiß-Donor Stelle von Exon 4)

MO1-FHL1b-splice: 5'-ATAAATATCTGTCCCCTCACCTGGC-3'

(gegen Spleiß-Donor Stelle von Exon 2)

MO2-FHL1b-splice: 5'-ATGGGCTGGAGGAACAAGGCCAAAA-3'

(gegen Spleiß-Akzeptor Stelle von Exon 4)

2.4 DNA Oligonukleotide

Für die Benutzung in der PCR wurden die DNA Oligonukleotide mit ddH₂O auf eine Konzentration von 50mM verdünnt. Die hier aufgeführten Primer wurden von der Firma MWG biotech bezogen. Blau gekennzeichnet ist jeweils das Basen-triplett, welches für den Aminosäurenaustausch der Mutation verantwortlich ist. (siehe Codesonne und Aminosäuren-Einbuchstabencode)

PCR-Mutagenese Primer FHL 1:

FHL1 C132F for : CTGTAGTAACTTCAAGCAAGTCA

FHL1 C132F rev: TGACTTGCTTGAAGTTACTACAG

FHL1 C224W for: GTGTGCTGGATGGAAGAACCCCA

FHL1 C224W rev: TGGGGTTCTTCCATCCAGCACAC

PCR-Mutagenese Primer FHL1a:

FHL1a C132F for: CTGCTTTGAGTTC AAGCAGCCTA

FHL1a C132F rev: TAGGCTGCTTGAAGCTCAAAGCAG

FHL1a C224W for: GTGCTCTGGATGG CAAAATCCCA

FHL1a C224W rev: TGGGATTTTGCCATCCAGAGCAC

PCR-Mutagenese Primer FHL1b:

FHL1b C132F for: ATGCTATCAGTTT CAAAAGCCAA

FHL1b C132F rev: TTGGCTTTTGAAAGCTGATAGCAT

FHL1b C224W for: ATGCAGCGGTGG CAGAACCCCA

FHL1b C224W rev: TGGGGTTCTGCCAACCGCTGCAT

FHL 1 Primer für no-stop Variante:**Gateway-Enden:**

For: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCC

Rev: GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCAAGCTTTTGGCACAGTCGG

Start Primer:

GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCGGAGAAGTTTGACTG

2.5 Plasmide

Für die Klonierung und Expression von FHL1a, FHL1b sowie FHL 1 wurde das Gateway Klonierungssystem von Invitrogen genutzt. Die Vektoren, die hierbei zum Einsatz kamen waren pDON221 als Entry-Vektor und pDEST-CSII als Destination-Vektor, d.h. Expressionsvektor. Die BP- und LR-Klonasen dienen dazu, die DNA Fragmente in Gateway kompatible Vektoren in entsprechende Rekombinationsstellen zu inserieren.

2.6 Antikörper

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper aufgelistet.

- Monoklonaler Anti-Myc Antikörper (Fa. Sigma)
- Polyklonaler Anti-FHL 1 Antikörper (Fa. Abcam)
- Anti-rabbit IgG-Alexa (Fa. Sigma)
- Anti-mouse IgG2b-TRITC (Fa. Southern Biotech)

2.7 Laborgeräte

Geräte, welche spezifisch für einzelne Experimente verwendet wurden, sind in den einzelnen Kapiteln als Material gelistet. Nachstehende Liste vervollständigt die in der Arbeit zum Einsatz gekommenen Laborgeräte.

Bunsenbrenner Fireboy plus	IBS Integra Bioscience
Feinwaage ED124S	Sartorius AG
Magnetrührer RCTbasic	IKA Labortechnik
Mikrowelle Micromat	AEG
pH-Meter Microprocessor pH Meter pH357	WTW
Pipetierhilfe AccuJetPro	Brand
Sonifikator Sonopuls	Bandelin
Tischzentrifuge Combi Spin FVL 2400N	Lab4you
Ultraschallbad Transsonic T570/4	Elma
Waage Adventurer	OHAUS
Wasserbad Barnstead Lab-line AquaBath	Thermo Scientific
Zentrifuge 5418	Eppendorf

2.8 Datenbanken

Ensembl	http://www.ensembl.org/index.html
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Pubmed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
Tol2kit	http://chien.neuro.utah.edu/tol2kitwiki/index.php/Main_Page
Zfin	http://zfin.org/

2.9 Software

Folgende Software wurde zur Erstellung der vorliegenden Doktorarbeit benötigt und angewandt:

Ape	M. Wayne Davis
CellSens Entry	Olympus
ClustalΩ	Conway Institute UCD Dublin
EndNote X7	Thomson Reuters
Excel	Microsoft
FinchTV	Geospiza Inc.
FS Programm	B. Meder
Image Quant LAS 4000	G&E Healthcare
LC480	Roche
LAS V3.7	Leica
Photoshop 7.0	Adobe
Powerpoint	Microsoft
Primer 3	Whitehead Inst. for Biomedical Research
PVR Plus	Ulead
VirtualDub	Avery Lee
Word	Microsoft Office

2.10 Zebrafischspezifische Methoden

2.10.1 Aufzucht und Haltung von Zebrafischen

Die Aufzucht, Haltung und Verpaarung der Zebrafische erfolgte wie in „The Zebrafish Book“ von Westerfield et al. Beschrieben (Westerfield, 1993). Die Wassertemperatur betrug konstant 28°C bei einem pH von 7,2-7,5. Das Systemwasser wurde in einem 2000 Liter Vorratswassertank aus VE Wasser und 8 Liter Stock B sowie 160g Meersalz angesetzt. Der definierte Tag-Nacht Rhythmus beinhaltete 13h Helligkeit (8⁰⁰-21⁰⁰Uhr) sowie 11h Dunkelheit (21⁰⁰-8⁰⁰Uhr). Zweimal täglich wurde mit Lebendfutter (Artemien) gefüttert. Für die Verpaarung wurden am Vortag die Zebrafischpärchen jeweils in Verpaarungstanks überführt und darin mit einer Trennwand separiert. Am folgenden Vormittag wurde diese entfernt und die Tiere konnten sich paaren. Nach 15 Minuten wurden die Eier der Fische mit einem Sieb abgesammelt und die Embryonen bei 28,5°C in E3 Medium großgezogen. Sollten sie der Aufzucht zugeführt werden, erfolgte dies nach sieben Tagen im Inkubator. Zur Dokumentation experimenteller Analysen wurde im Alter von 24 hpf dem E3 Medium 100x PTU (1:100 verdünnt), zur Unterdrückung der Farbpigmentierung bei den Embryonen, zugesetzt.

2.10.2 Fischlinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Wildtyp Fischlinien waren TE sowie TüAB.

2.10.3 Foto- und Videodokumentation

Die Zebrafischembryonen wurden zu bestimmten Entwicklungsstadien (24, 48, 72 und 96 hpf) auf 2,5% Methylcellulose/E3-Puffer auf einem Mulden-Objektträger eingebettet und mit Hilfe einer Präpariernadel ausgerichtet. Richtig positioniert wurden die Embryonen dann durch das Stereomikroskop (Olympus: SX16) mit der Digitalkamera Typ DC 500 der Firma Olympus fotografiert. Aufgenommene Bilder wurden mit Adobe Photoshop nachbearbeitet. Filme wurden mit dem Programm LAS von Leica und einer Videokamera von Leica angefertigt.

Zur Dokumentation von Antikörper-Färbungen an histologischen Schnitten wurde das Konfokal-Mikroskop der Firma Leica (DM IRE2) verwendet.

2.10.4 Mikroinjektion

Benötigte Materialien:

- Agarose (Fa. Invitrogen)
- Injektionsrampenmatrizen
- Petrischalen (Fa. Greiner bio-one)
- Plastikpipette
- Glaskapillaren Ø 0,75 - 1,0mm (Fa. World Precision Instruments)
- Kapillarenzieher PC- 10 (Fa. Narishige)
- Injektionsapparatur Femtojet (Fa. Eppendorf)
- Rasierklinge
- E3 Medium

Um DNA, RNA oder Morpholino- modifizierte Oligonukleotide in Zebrafischembryonen einzubringen, wurden Mikroinjektionen in die Zebrafischoozyten vorgenommen. Zur Herstellung der Injektionsrampen wurde 3%ige Agarose in eine Petrischale gegossen und beim Erhärten die Plastikmatrize mit 6 asymmetrischen Rinnen, 5cm lang und 3mm breit, eingebracht. Darin wurden die Zebrafischeier vor der Injektion mit Hilfe der Plastikpipette aufgereiht. Die Injektionsnadeln wurden mit dem Kapillarenzieher in einem 1-Schritt Programm (60,4°C) hergestellt. Geöffnet wurde die Kapillarspitze der Nadel unter dem Mikroskop durch vorsichtiges Anschneiden mit einer Rasierklinge. Der Injektionsdruck wurde der Größe der Nadelöffnung angepasst und variierte zwischen 100 und 900hPa. Die Injektionsdauer betrug 0,2sec. Die Injektion erfolgte im Ein- bis Vierzellstadium der befruchteten Zebrafischembryonen. Nach dem Aufreihen wurde mit Hilfe der Injektionsapparatur entweder in den Dotterstrom oder direkt in die Zelle injiziert. Danach wurden die Oozyten in eine neue Petrischale mit E3 Medium überführt und bei 28,5°C inkubiert. Nach fünf Stunden wurden die überlebenden Embryonen in eine neue Petrischale transferiert und falls gewünscht, am nächsten Tag mit 1x PTU die Pigmentbildung unterdrückt. Die Fotodokumentation erfolgte nach 24, 48, 72 und 96 hpf.

2.10.5 *In Situ* Hybridisierung (ISH)

Benötigte Materialien:

- 4% Paraformaldehyd/PBT (PBT= 1x PBS, 0,1% Tween 20)
- 10µg/ml Proteinase K/PBT (Fa. Roche)
- Blockingpuffer 1
- mRNA spezifische antisense- RNA- Sonden (s.u.)
- Alkalische Phosphatase konjugierte, anti-Digoxigenin Fab-Fragmente (Fa. Roche)
- NTMT Puffer
- NBT/BCIP-Lösung (Fa. Roche)
- Hybridisierungssofen (Fa. Heraeus)
- Methanol
- BSA/PBT
- Primer für full-length-Sonde (Digoxin markierte antisense RNA-Sonde): (1390 bp)
 - FHL-probe-F: GGCTGGACAGACACAAGAGG
 - FHL-probe-R: GCATTAACGATAACGTATAAGTAAGGA

Die *In Situ* Hybridisierung dient dem Nachweis von Nukleinsäuren in Geweben. Es wird eine Digoxigenin markierte antisense RNA-Sonde dazu verwendet, über Basenpaarung an die nachzuweisenden exprimierten RNA-Abschnitte zu hybridisieren. So wird die Expression eines Genes im Gewebe zu bestimmten Zeitpunkten dokumentiert. Für die Reaktion wurden die gesammelten Zebrafischembryonen über Nacht in 4% Paraformaldehyd bei 4°C fixiert. Nach vier bis fünfmaligem Auswaschen des PFA mit Methanol können die Embryonen in 100% Methanol bei -20°C mehrere Monate aufbewahrt werden. Zum Rehydrieren müssen sie dann bei Raumtemperatur für je fünf Minuten eine absteigende Methanolreihe durchlaufen und dann vier mal für fünf Minuten in 100% PBT gewaschen werden. Der anschließende Proteinase K Verdau dient dazu, das Gewebe der Embryonen permeabler für die Sonden zu machen. Die optimale Zeit dafür richtet sich nach dem Entwicklungsstadium der Embryonen und ist in der folgenden Liste zusammengefasst:

- 1 Zellstadium bis 24 hpf Embryonen → kein Proteinase K Verdau nötig
- 24- 36 hpf Embryonen → 15 Minuten Proteinase K Verdau

- 48 hpf Embryonen → 35 Minuten Proteinase K Verdau
- 60 hpf Embryonen → 40 Minuten Proteinase K Verdau
- 72 hpf Embryonen → 50 Minuten Proteinase K Verdau
- 96 hpf Embryonen → 60 Minuten Proteinase K Verdau
- 120 hpf Embryonen → 90 Minuten Proteinase K Verdau

Nach der Proteinase K Behandlung folgte ein zweimaliger Waschschrift der Embryonen mit PBT zur Entfernung des Enzyms. Die erneute Fixierung bei Raumtemperatur erfolgte für 20 Minuten mit 4% PFA. Nach dieser wurden die Embryonen fünfmal für fünf Minuten in PBT gewaschen. Um unspezifische DNA- und RNA-Bindestellen zu sättigen, wurden die Embryonen nun für mindestens eine Stunde in Hybridisierungspuffer bei 70°C prä- inkubiert. Anschließend erfolgte die Hybridisierung mit der 1:100 verdünnten mRNA-spezifischen antisense-RNA-Sonde über Nacht bei 70°C. Die Sonde wurde dann am nächsten Tag zur Wiederverwendung abgenommen und folgende Waschschriffe durchgeführt:

- 10 Minuten 75% Hybridisierungspuffer + 25% 2x SSC bei 70°C
- 10 Minuten 50% Hybridisierungspuffer + 50% 2x SSC bei 70°C
- 10 Minuten 25% Hybridisierungspuffer + 75% 2x SSC bei 70°C
- 10 Minuten 100% 2x SSC bei 70°C
- 2x 30 Minuten 100% 0,2x SSC bei 70°C
- 5 Minuten 75% 0,2x SSC + 25% PBT bei RT
- 5 Minuten 50% 0,2x SSC + 50% PBT bei RT
- 5 Minuten 25% 0,2x SSC + 75% PBT bei RT
- 5 Minuten 100% PBT bei RT

Unspezifische Antikörperbindestellen wurden durch mindestens einstündige Inkubation bei Raumtemperatur in Blockingbuffer 1 (2mg/ml BSA, 5% sheep serum in PBT) abgesättigt. Anschließend wurden alkalische Phosphatase konjugierte, anti-Digoxigenin Fab-Fragmente (1:2000 in Blocking-Puffer 1 verdünnt) zugegeben und die Embryonen damit über Nacht bei 4°C inkubiert. Zur Entfernung des Antikörpers wurden die Embryonen am nächsten Tag viermal in Blocking-Puffer minus Schafserum (2mg/ml BSA in PBT) für je 15 Minuten ausgewaschen. Sie wurden dann nach dreimal fünf Minuten Äquibrierung mit frisch hergestelltem und steril filtriertem NTMT-Puffer in 12- oder 24-Loch-Zellkulturschalen überführt. Die Färbereaktion erfolgte bei Raumtemperatur mit 20µl NBT/BCIP-Lösung/ml NTMT

im Dunkeln unter leichtem Schütteln. Bei Erreichen der gewünschten Intensität wurde die Färbereaktion durch mehrmaliges Waschen mit PBT gestoppt. Die Lagerung der Embryonen erfolgte bei 4°C.

2.10.6 Histologische Schnitte

Benötigte Materialien:

- 4% Paraformaldehyd/PBT
- 50% Ethanol/PBT
- JB4-Lösung B (Fa. Polysciences)
- Infiltratingsolution (Fa. Polysciences)
- Einbettungsform
- Präpariernadel
- Objektträger (Fa. Neolab)
- Mikrotom (Fa. Leica)
- Hämatoxylin/Eosin
- Stereomikroskop

Die Zebrafischembryonen wurden im gewünschten Entwicklungsstadium in 4% Paraformaldehyd/PBT über Nacht bei 4°C fixiert und anschließend mit 50% Ethanol/PBT sowohl äquilibriert und anschließend gelagert. Durch eine aufsteigende Ethanolreihe (70- 100%) wurden die Embryonen dann dehydriert und für 12 Stunden über Nacht bei 4°C in einer Infiltratingsolution inkubiert. Die Einbettung erfolgte in 1,5ml Infiltratingsolution mit 60µl JB4-Lösung B. Mit Hilfe der Präpariernadel wurden die Fische für Sagital- oder Transversalschnitte ausgerichtet. Nach dem Aushärten der Blöcke wurden mit dem Mikrotom 4µm dicke Schnitte angefertigt und auf unbehandelte Objektträger gegeben. Die Färbung erfolgte durch 10 Minuten Inkubation in Hämatoxylin und Eosin, gefolgt von je einem Waschschrift unter fließendem Wasser. Die Färbungsschritte wurden verkürzt, wenn es sich um Embryonen aus *In Situ* Hybridisierungen handelte, sonst wären die Embryonen überfärbt worden.

2.10.7 Elektronenmikroskopische Analyse

Für die Analyse wurden Embryonen ausgewählt, die Skelettmuskeldefekte aufwiesen, also in den *touch response* Versuchen pathologische Schwimmmuster aufzeigten oder in der Fotodokumentation eine deformierte Schwanzmuskulatur hatten. In gewünschten Entwicklungsstadien wurden sie in der Fixing Solution ge-

sammelt und zur Aufbereitung in die zentrale Einrichtung der Elektronenmikroskopie der Universität Ulm gegeben. Dort fertigten die Mitarbeiter elektronenmikroskopischen Schnitte an. Analysiert wurden diese dann mit dem Jeol 1400 Transmissions-Elektronenmikroskop.

2.10.8 Immunfluoreszenzfärbung

Für Antikörperfärbungen wurden die Zebrafischembryonen bei Raumtemperatur für jeweils 12 Stunden über Nacht in Dent's Fix fixiert und mit Dent's Bleach gebleicht. Anschließend wurden sie in 100% Methanol bei -20°C gelagert. Zur Rehydrierung diente eine absteigende Methanolreihe wie bei der ISH und ein darauf folgendes viermaliges je fünfminütiges Waschen in PBST. Es folgte ein 90 minütiger Blockierungsschritt bei 4°C mit Blocking-Puffer 1 um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Danach wurden die Embryonen über Nacht mit dem primären Antikörper in Blocking-Puffer 2 bei 4°C inkubiert (1:10 bis 1:50). Am nächsten Tag wurden sie bei 4°C vier Mal mit Blocking-Puffer 2 für jeweils 30 Minuten gewaschen. Danach wurde entweder der zweite Primärantikörper oder der mit dem Fluoreszenzfarbstoff markierte Sekundärantikörper dazu gegeben, jeweils wieder in Blocking-Puffer 2 bei einer 1:100 Verdünnung. Die Embryonen wurden bei 4°C über Nacht inkubiert, bei Raumtemperatur drei Stunden. Danach wurden die Embryonen zweimal für fünf Minuten mit PBSBT gewaschen und direkt mit einem Fluoreszenzmikroskop analysiert sowie dokumentiert. Die Lagerung der gefärbten Embryonen erfolgte abgedunkelt bei 4°C.

2.10.9 Proteingewinnung aus Zebrafischembryonen

Embryonen des gewünschten Stadiums wurden aus dem Chorion präpariert und in ein 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 1ml Deyolking Puffer sowie Auf- und Abpipettieren wurden die Dottersäcke entfernt. Die Embryonen wurden danach 30 Sekunden gevortext und für 30 Sekunden bei 3000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und dann das Pellet erneut mit Washing Puffer gelöst. Zum Pelletieren wurde anschließend für 30 Sekunden bei 3000 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt. Die Resuspendierung erfolgte in TNN-Working Puffer (ca. 5µl pro Embryo). Die Homogenisierung erfolgte vorsichtig durch eine Kanüle unter Vermeidung von Luftblasen. Die Lösung wurde anschließend für 15 Minuten auf Eis inkubiert und dann bei 4°C für zehn Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues

Eppendorf Reaktionsgefäß überführt, die Proteinkonzentration gemessen und bei -20°C gelagert.

2.10.10 Western Blot Analyse

Der Western Blot dient zur Übertragung (= Blotting) von Proteinen auf eine Trägermembran. Die Glasplatten wurden vor der Benutzung mit 70% Ethanol gereinigt und in die Gießvorrichtung (Fa. Biorad) gespannt. Das Trenngel setzte sich je nach Proteingröße unterschiedlich zusammen. Je kleiner das Protein, desto höher wurde die Acrylamidkonzentration gewählt. Die Gelmatrix wurde dadurch feiner, was zu einer höheren Trenneigenschaft führte.

Tab. 1: Trenngel Western Blot

	6%	7%	8%	9%	10%	11%	12%	13%
Lower Buffer 4x [ml]	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Acrylamid 30% [ml]	2,0	2,3	2,7	3,0	3,3	3,7	4,0	4,3
ddH ₂ O [ml]	5,5	5,1	4,8	4,5	4,1	3,8	3,5	3,1
APS 10% [μl]	50	50	50	50	50	50	50	50
TEMED [μl]	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0

Die Gießvorrichtung wurde zu etwa dreiviertel mit dem Trenngel gefüllt und mit einer dünnen Schicht Propanol übergossen. Nach 30 Minuten Aushärten bei Raumtemperatur wurde das Propanol mit einem Whatman Papier abgenommen und das Sammelgel über das feste Trenngel gegeben. Das Sammelgel setzte sich wie folgt zusammen.

Tab. 2: Sammelgel Western Blot

	2%	3%	4%	5%	6%
Upper Buffer 4x [ml]	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25
Acrylamid 30% [ml]	0,33	0,55	0,65	0,82	0,98
ddH ₂ O [ml]	3,3	3,2	3,0	2,8	2,7
APS 10% [μl]	25	25	25	25	25
TEMED [μl]	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0

Die Taschen darin entstanden durch einlegen eines Gelkammes, der nach erneutem Aushärten von 30 Minuten bei Raumtemperatur wieder entfernt wurde. Bevor das Gel beladen wurde, wurden die Proben mit Lamkli-Ladepuffer versetzt und

für fünf Minuten bei 95°C aufgekocht und kurz auf Eis gestellt. Die Gelkammer wurde mit 1x SDS Running Buffer beladen. Anschließend wurden die Proben in die Geltaschen aufgetragen. Es sollten alle Taschen des Gels gefüllt werden. Bei 35mA bis maximal 45mA wurden unter ständiger Kontrolle die Proteine im Gel für ca. zwei Stunden aufgetrennt. Zum Blotten wurde PVDF-Membran auf die Größe des Gels zurecht geschnitten und für eine Minute in 100% Methanol inkubiert. Bevor der Blotting Rahmen zusammengebaut wurde, mussten die PVDF Membran, ein Whatman-Papier sowie die Blotting Pads in 1x Blotting Buffer inkubiert werden. In folgender Reihenfolge wurde der Blotting Rahmen zusammengestellt: auf die weiße Seite kam zuerst ein Blotting Pad, auf welches ein Whatman-Papier und die PVDF-Membran aufgetragen wurden. Mittig wurde das Gel möglichst luftblasenfrei angebracht. Die Gegenseite wurde dementsprechend aufgebaut. Die Konstruktion kam in die Blotting Kammer (Fa. Biorad), welche bereits mit einem Kühl Akku gekühlt wurde. Nachdem die Kammer mit 1x Blotting Buffer aufgefüllt wurde, konnte für zwei Stunden bei 200mA geblottet werden. Die Kontrolle des Gellaufs geschah mit der Ponceau-S-Färbung. Dazu wurde die Membran einige Sekunden mit Ponceau-S-Lösung inkubiert und anschließend mit ddH₂O gespült. Zum Blocken wurde die Membran für 15 Minuten in 5% Milchpulver in TBST inkubiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (1:1000- 1:2000) erfolgte bei 4°C erneut in 5% Milchpulver in TBST über Nacht. Am nächsten Tag wurde die Membran in TBST einmal für zehn und zweimal für fünf Minuten gewaschen bevor der Sekundärantikörper in einer 1:2000 Verdünnung in TBST hinzugegeben wurde. Nach zwei Stunden bei Raumtemperatur erfolgten wieder die gleichen Waschschrte wie oben beschrieben. Für die Entwicklung wurde die Membran dann auf eine Klarsichtfolie gelegt und das restliche TBST durch ein Whatman-Papier abgenommen. ECL (Fa. Amersham) wurde durch mischen von 1ml Reagenz A und 1ml Reagenz B hergestellt und für eine Minute auf die Membran gegeben. Die Lösung wurde wieder mit einem Whatman-Papier abgenommen und die Membran blasenfrei auf eine neue Klarsichtfolie überführt. Zur Dokumentation wurde die G&E Fotodokumentationsanlage eingesetzt.

2.11 Präparation, Modifikation, Detektion und Analyse von Nukleinsäuren

2.11.1 DNA Isolation aus Zebrafisch-Gewebe

Für die Isolation von DNA aus Gewebe wurden die ganzen Embryonen oder das Ende der Schwanzflosse von adulten Zebrafischen in einer 96-well-PCR Platte (Fa. Abagene) für mindestens zwei Stunden in Methanol bei -80°C eingefroren. Nach Entfernung des Methanols wurden die Gewebe für 12 Stunden mit Proteinase K bei 50°C lysiert. Die Deaktivierung des Enzyms erfolgte anschließend als zehnminütiger Denaturierungsschritt bei 98°C. Die genomische DNA wurde dann 1:25 verdünnt und weiter für PCR- Analysen eingesetzt.

2.11.2 RNA Isolation aus Geweben

Für die RNA Isolation wurden den jeweiligen Geweben 1ml Trizol (Fa. Invitrogen) hinzugegeben und anschließend homogenisiert. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 160µl Chloroform zugegeben und nach 15 Sekunden kräftigem Schütteln erneut drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein 15 minütiger Zentrifugationsschritt bei 4°C und 14000 rpm. Die farblose wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und anschließend zur Fällung mit 400µl Isopropanol vermischt. Der Ansatz wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann erneut bei 4°C und 14000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, konnte die gewonnene RNA mit 250µl 70% Ethanol in DEPC H₂O gewaschen, erneut zentrifugiert und dann das RNA Pellet luftgetrocknet werden. Letztendlich wurde die RNA in 25µl RNase freiem H₂O aufgenommen und bei 55°C für zehn Minuten darin gelöst. Nach der Konzentrationsbestimmung mittels Photometer (NanoDrop, Fa. PeqLab) wurde diese dann bei -80°C gelagert.

2.11.3 Konzentrationsbestimmungen von DNA/ RNA

Für die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurde das Spektralphotometer NanoDrop verwendet. Mit ddH₂O wurde das Gerät auf einen Nullwert geeicht und anschließend die Extinktion der Proben bei den Wellenlängen 260 und 280nm gemessen. Das Verhältnis hieraus gibt Aufschluss über mögliche Verunreinigung mit Proteinen, wobei der Wert zwischen 1,5 und 2 liegen sollte. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht bei einer Schichtdicke von 1 cm 47,5µg/ml doppelsträngi-

ger DNA, 40µg/ml einzelsträngiger DNA/RNA und etwa 30µg/ml einzelsträngiger Oligonukleotide.

2.11.4 Agarose-Gelelektrophorese

Benötigte Materialien:

- Agarose (Fa. Invitrogen)
- Ethidiumbromid (Fa. Sigma)
- 1x TBE Puffer (Fa. Sigma)
- 0,5x TBE Laufpuffer (Fa. Sigma)
- 6x Ladepuffer
- 100bp oder 10kb Leiter (*generuler*) (Fa. Fermentas)
- Elektrophoresekammer und Gelkämme (Fa. PeqLab, Fa. Phamacia)
- Spannungsquelle EPS 600 (Fa. Biometria, Fa. Phamacia)
- Geldokumentationseinheit (Fa. Heiser)

Die Agarose wurde mit 1x TBE in der Mikrowelle aufgeköcht und abgekühlt. Daraufhin wurde Ethidiumbromid zu einer Endkonzentration von 0,5µg/ml zugegeben, in die Gelkammer mit eingesetztem Gelkamm gegossen und ausgehärtet. So konnte man Agarosegele von 0,5- 2,0% (w/v) herstellen. Die Proben wurden mit 1x Ladepuffer versetzt und in die Taschen des Gels eingebracht. Die DNA Fragmente aus PCR-Reaktionen, Restriktionsverdauen und RT-PCRs wurden dann über die Gele bei einer Stromstärke von 5V/cm in 0,5x TBE Laufpuffer aufgetrennt. Die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld hängt dabei von ihrer Größe, der angelegten Spannung und der Agarosekonzentration des Gels ab (Sambrook, 1989). Um die Größen der Fragmente später einordnen zu können, wurde auch immer als molekularer Massenstandard eine 100bp oder 10kb Leiter aufgetragen. Die Banden wurden dann sichtbar gemacht, indem die Ethidiumbromid-Fluoreszenz im UV-Licht bei $\lambda = 254\text{nm}$ gewählt wurde. Das Gel konnte bei $\lambda = 315\text{nm}$ auf dem Leuchttisch fotografiert und die Banden exzidiert werden. Für präparative Zwecke konnte die DNA aus der geschnittenen Bande mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen nach Herstellerangaben extrahiert werden.

2.11.5 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription diente der Herstellung von cDNA aus RNA. Die hierfür eingesetzte RNA musste zuerst bei 68°C für fünf Minuten denaturiert, dann auf Eis gestellt und kurz abzentrifugiert werden. Der Transkriptionsansatz setzte sich zusammen aus:

- 5µg denaturierte RNA
- 4µl 5x RT-Puffer (Fa. Invitrogen)
- 2µl 0,1 M DTT (Fa. Invitrogen)
- 1µl 4 mM dNTP (Fa. Roche)
- 1µl RNase Inhibitor (1:3 in ddH₂O verdünnt) (Fa. Roche)
- 1µl oligo(dT) (Fa. Metabion)
- 1µl Superscript II Reverse Transkriptase (Fa. Invitrogen)

Dieser Ansatz wurde mit 5µl Nuklease-freiem H₂O bei 37°C für eine Stunde inkubiert und anschließend bei 95°C für fünf Minuten erhitzt, sofort auf Eis gestellt und abzentrifugiert. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20°C.

2.11.6 In Vitro-Transkription von mRNA

Die Synthetisierung von RNA aus DNA erfolgte mit dem mMessage mMachine Kit von der Firma Ambion. Zuerst wurde der Verdau angesetzt. Dabei mussten je nach Vektor 2µl des passenden Enzyms gewählt werden (für pDest meistens Not I) und sowohl 2µl von Puffer 4 des Kits als auch 2µl 10x BSA und ddH₂O auf einen Ansatz von 20µl gemischt werden. Der Verdau dauerte bei 37°C zwei Stunden. Die Fällung fand dann mit 10µl NH₄ und 75µl EtOH für 30 Minuten bei -80°C statt. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 14000 rpm und 4°C, wurde das Pellet mit 70% EtOH (DEPC) gewaschen und anschließend erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und nachdem das Pellet getrocknet war, wurde mittels dem sp6 Kit translatiert. 10µl 2x NTP/CAP, 6µl DNA (Pellet in RNase freiem Wasser gelöst), 2µl 10x Reaction Buffer und 2µl Enzyme Mix wurden dafür bei 37°C drei Stunden inkubiert. Als nächster Schritt folgte die Reinigung mit 1µl DNase I bei 37°C für 15 Minuten um die restlichen DNA Fragmente zu entfernen sowie 30µl LiCL und 30µl H₂O (RNase frei) über Nacht bei -80°C. Es folgten wieder zwei fünfzehnminütige Zentrifugationen mit 14000 rpm und dazwischengeschaltetem Reinigungsschritt mit 70% EtOH (DEPC). Nachdem das Pellet wieder bei Raum-

temperatur getrocknet war, wurde es in 25µl RNase freiem H₂O bei 55°C für 10 Minuten gelöst und bei -80°C gelagert.

2.11.7 mRNA für Überexpressionsexperimente

Bei Überexpressionsexperimenten wird eine zusätzliche Menge an mutiertem Protein zu dem funktionstüchtigen normal exprimierten Protein hinzugefügt. Bei einem *gain of function* würde das mutierte Protein zu einem krankheitsverursachenden Funktionsgewinn führen. Bei einem dominant negativen Effekt würde die alleinige Injektion von mutierter mRNA oder mutiertem Protein einen Phänotyp erzeugen. Hierfür wurde von FHL1a und FHL1b die Mutation C224W jeweils in einen Destination Vektor transformiert. Anschließend wurde das Konstrukt mit einem Myc-Polypeptid getaggt. Daraus wurde mRNA hergestellt und in verschiedenen Konzentrationen in befruchtete Zebrafischembryonen injiziert. Der Vergleich mit KCL injizierten Zebrafischen wurde gewählt um einen etwaigen pathologischen Einfluss der Injektion an sich darzustellen. Da der Destination Vektor mit einem Myc-Polypeptid getaggt wurde, konnte die Expression über einen Western Blot mit einem Antikörper gegen das Myc nachgewiesen werden, sodass mit Sicherheit davon ausgegangen werden kann, dass die mRNA sowohl richtig injiziert als auch translatiert wurde.

2.11.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR= *polymerase chain reaction*) ist ein *in vitro* Verfahren zur exponentiellen Amplifikation und Modifikation von DNA Abschnitten bestimmter Länge und definierter Sequenz aus einem Gemisch von Nukleinsäuren (Mullis et al., 1986). Die Reaktion bestand aus drei sich wiederholenden Schritten. Als Erstes erfolgte die Hitzedenaturierung der doppelsträngigen Ausgangs-DNA (*template*) bei 94°C. Dann wurden beim Annealing zwei Oligonukleotide als Primer verwendet. Sie hybridisierten mit der Zielsequenz. Die Annealing-Temperaturen wurden aus den Schmelztemperaturen der Primer ermittelt. Als Letztes folgte die Elongation, bei welcher der Komplementärstrang durch eine thermostabile DNA-abhängige DNA-Polymerase bei 72°C synthetisiert wurde. Durch vielfaches durchlaufen der drei Schritte mit dem Thermocycler wurde der ausgewählte DNA-Abschnitt exponentiell amplifiziert. Der Standard PCR Ansatz von 50µl setzte sich folgendermaßen zusammen:

- 5µl 10x Puffer
- 2x 0,4µl Primer (fwd + rev)
- 2µl DNA (5ng/ µl)
- 1µl DNA-Polymerase
- 1µl dNTP-Mix (dATP + dGTP + dCTP + dTTP)
- 40,2µl dH₂O

Die Zusammensetzung wurde je nach verwendeter Polymerase (Taq/ Phusion/ Pfu) modifiziert.

2.11.9 Gerichtete Mutagenese

Die gerichtete *in vitro* Mutagenese von Plasmiden wurde mittels PCR durchgeführt. Das Ausgangsplasmid (Entry Vektor), in welches die Mutation eingefügt werden sollte, diente dabei als Matrize für die Synthese des neuen mutagenisierten Plasmids. Die verwendeten Oligonukleotid-Primer waren zueinander komplementär und enthielten bei einer sonst richtigen Basensequenz von 23 Nukleotiden mittig die gewünschte Sequenzänderung. Ein Reaktionsansatz von 50µl war folgendermaßen zusammengesetzt:

- 50ng Ausgangs DNA (entspr. 2µl Plasmid aus einer 1:100 Verdünnung)
- 0,4µl je Primer (z.B. C224W fwd und C224W rev)
- 5µl Pfu Turbo-Polymerasepuffer
- 1µl Pfu Turbo-Polymerase
- 1µl dNTP-Mix
- 40,2µl dH₂O

Die PCR erfolgte nach dem Mutagenese Programm: Nach einer initialen Inkubation von 30 Sekunden bei 95°C durchlief der Reaktionsansatz 25 Zyklen. Diese bestanden jeweils aus einer Denaturierungsphase von 30 Sekunden bei 95°C, einer Hybridisierungsphase von einer Minute bei 63°C und einer Synthesephase von einer Minute pro 1kb des zu amplifizierenden Plasmids bei 68°C. Die Elongationszeit wurde so gewählt, dass sowohl das Insert als auch das komplette Plasmid amplifiziert wurden. Nach einer Abschließenden Amplifikation für zehn Minuten bei 68°C folgte ein selektiver Verdau der methylierten Ausgangs-DNA mittels Dpn I für eine Stunde bei 37 °C. Da die neusynthetisierten Plasmide unmethyliert sind, werden sie nicht verdaut. Nach der Aufreinigung erfolgte die Transformierung in elektrisch kompetente Zellen.

2.11.10 Restriktionsverdau von DNA

Um DNA Fragmente bzw. DNA Konstrukte aus Plasmiden zu isolieren, wurden Restriktionsenzyme der Firma New England Biolabs nach den Vorgaben des Herstellers verwendet. Ein typischer Reaktionsansatz enthielt 2µl (~ 1µg) Plasmid, 1µl 10x Puffer, 0,1µl 100x BSA, 1µl Restriktionsenzym sowie 5,9µl dH₂O. Der Puffer war dabei abhängig von der Art des jeweiligen Enzyms. Der Ansatz wurde bei 37°C für mindestens eine Stunde inkubiert und anschließend die Restriktion per Gelelektrophorese überprüft.

2.11.11 Aufreinigung von DNA

Für die Aufreinigung von DNA wurde entweder das „QIAquick PCR Purification Kit“ nach Herstellerangaben verwendet oder eine Ammoniumacetat-Fällung durchgeführt. Hierfür wurde der DNA Lösung ½ Volumen 7,5M Ammoniumacetat sowie 2½ Volumen eiskaltes Ethanol (100%) zugegeben. Diese Mischung wurde für mindestens 30 Minuten bei -80°C gelagert und die DNA dann bei 14000 rpm und 4°C für 15 Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wurde in kaltem Ethanol (70% in H₂O) aufgenommen und wieder bei gleichen Einstellungen für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet bei 37°C für ca. 30 Minuten getrocknet und dann in 5 µl dH₂O aufgenommen.

2.11.12 Ligation von DNA Fragmenten

Die Ligation von DNA Fragmenten (Inserts) mit linearisierten Vektoren/ Plasmiden erfolgte für mehrere Stunden bei Raumtemperatur. 5 µl Insert DNA (100ng Plasmid), 1µl linearisierter Destination Vektor, 2µl TE-Puffer (Fa. Roche), 1µl T4 Ligase 2 plus sowie 2µl dH₂O wurden dabei inkubiert. Um die Reaktion zu beenden wurde 1µl Proteinase K hinzugegeben. Die Plasmide wurden anschließend in chemisch oder elektrisch kompetente E.coli Zellen transformiert.

2.11.13 Transformation von E.coli

Die Elektroporation diente der Transformation von Plasmiden in elektrisch kompetente Zellen (Fa. Invitrogen). Den auf Eis aufgetauten Zellen wurde 1µl der DNA hinzugegeben und vorsichtig eingemischt. In einer Elektroporationsküvette (Fa. Biorad) wurde dann für 0,1 Sekunden bei 1,8kV mit dem Elektroporator (Fa. Biorad) die Transformation durchgeführt. Die Zellen wurden in 250µl SOC Medium aufgenommen, für eine Stunde bei 37°C und 200rpm inkubiert und dann auf bereits vorgewärmten Agarplatten ausgestrichen. Bei der Transformation in che-

misch kompetente Zellen (Fa. Invitrogen) wurde 1µl der DNA hinzugegeben, der Ansatz für 30 Minuten auf Eis gestellt und dann in einem 42°C heißen Wasserbad für 30 Sekunden aktiviert. Nach erneuten zwei Minuten Abkühlen auf Eis erfolgte die Aufnahme in SOC Medium und danach das gleiche Procedere wie bei den elektrisch kompetenten Zellen.

2.11.14 Antibiotika und Selektionsplatten

Die in dieser Arbeit verwendeten Selektionsmedien wurden aus Stammlösungen der Antibiotika Ampicillin (100mg/ml), Kanamycin (50mg/ml) bzw. Chloramphenicol (25 mg/ml) angesetzt. Sie wurden dazu autoklaviert, nach dem Abkühlen im Verhältnis 1:1000 mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt und steril in Petrischalen gegossen. Die Lagerung der Platten fand bei 4°C statt. Für die Herstellung der Suspensionskulturen wurden 5ml flüssiges Selektionsmedium mit einer Bakterienkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert und dabei mit 200rpm geschüttelt.

2.11.15 Präparation von Plasmid DNA aus E.coli

Die Isolation der Plasmid DNA erfolgte unter Verwendung des „QIAprep Spin Miniprep Kit“ bzw. des „Qiagen Plasmid Maxi Kit“ nach Herstellerangaben.

2.11.16 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Plasmide wurden dephosphoryliert, um die Re-Ligation von durch Restriktionsverdau geöffneten Plasmidenden zu verhindern. Hierzu wurden zu dem in 17µl ddH₂O gelösten Plasmid 2µl 10x CutSmart® Puffer und 1µl alkalische Calf Intestinal Phosphatase (CIP) (Fa. NEB) hinzugegeben. Nach einer Stunde bei 37°C folgte eine Ammoniumacetat-Fällung.

2.12 Transgenese von Zebrafischen

2.12.1 Klonierung der Multiside Gateway Vektoren/Tol 2 Kit

Die Insertion von DNA-Fragmenten in Gateway kompatible Vektoren, welche entsprechende Rekombinationsstellen beinhalten, erfolgte mit Hilfe der Gateway Rekombinase BP-Klonase (Fa. Invitrogen) für die Entry Vektoren, sowie der LR-Klonase (Fa. Invitrogen) für die Destination Vektoren, jeweils nach Herstellerangaben. In dieser Arbeit wurde zu der Transgenese der Zebrafische das Tol 2 Kit verwendet. Es dient einer zielgerichteten Integration in das Genom. Genutzt wurde hierfür der Destinationsvektor pDestTol2pA2 (Tol2-394-2) (Kwan et al., 2007). Als

Donorvektor diente pDONR221 (Fa. Invitrogen). Aus diesem wurde ein Entry Vektor generiert und dann jeweils in einer Multiside Gateway Reaktion die unterschiedlichen Genvarianten FHL1 wt, H123Y, C132F sowie C224W einkloniert. Das 5' Element war ein muskelspezifischer Unc 45 Promoter, als mittleres Element wurde die jeweilige Genvariante von FHL1 eingefügt. Die Integration der FHL1 Varianten wurde per Sequenzierung überprüft. Als 3' Element wurde ein GFP-Tag gewählt. Mit Hilfe einer integrierten *internal ribosome entry site* (IRES) wurde hierbei kein Fusionsprotein hergestellt, sodass das Reporterprotein die Funktion von FHL1 nicht beeinträchtigen konnte. Die IRES bewirkte über eine externe Ribosomenanlagerung eine getrennte Translation von FHL1 und dem GFP Reportermolekül. Durch Testverdaue mit den Enzymen Hind III und Xba I und Abgleichen der Ergebnisse mit den Banden aus den theoretischen Schnittmusterergebnissen wurde die Struktur und Vollständigkeit der einzelnen Gateway Vektoren jeweils nach der Klonierung überprüft.

Folgende Vektoren wurden für die Injektion hergestellt:

- pD unc45: FHL1wt_IRESGFP
- pD unc45: FHL1H123Y_IRESGFP
- pD unc45: FHL1C132F_IRESGFP
- pD unc45: FHL1C224W_IRESGFP

2.12.2 Mikroinjektionen zur Transgenese von Zebrafischen

Die Injektionen wurden wie in Kapitel 2.10.4 beschrieben durchgeführt. Durch die alleinige Injektion von DNA ist die Integrationsrate sehr gering, sodass in den letzten Jahren Methoden entwickelt wurden, die Erfolgsrate zu erhöhen (Deiters & Yoder, 2006; Teh, Parinov, & Korzh, 2005; Udvardia & Linney, 2003). Diese beinhalten Systeme, die Retroviren (Amsterdam & Becker, 2005; Linney, Hardison, Lonze, Lyons, & DiNapoli, 1999) oder Transposons (Kawakami, 2005; Newman & Lardelli, 2010; Suster, Sumiyama, & Kawakami, 2009) verwenden. In dieser Arbeit wurde zusätzlich wurde mRNA der pCS2FA-Transposase coinjiziert (http://tol2kit.genetics.utah.edu/index.php/List_of_entry_and_destination_vectors). Diese katalysiert jeweils die Transposition der Destinationsvektoren. Laut Literaturangaben kann hierdurch die Rate für die Keimzellintegration auf bis zu 50% gesteigert werden. Bei der Injektion von reiner DNA beträgt sie hingegen lediglich 1-10% (Kwan et al., 2007). Die Konzentration des Plasmids und der Transposase

betrug bei den Injektionen jeweils 20-30ng/ μ l. So wurden in etwa 100-250pg DNA pro befruchtete Eizelle eingebracht. Nach 72 hpf wurde eine Vorselektion der Embryonen unter dem Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. Das Leuchten des GFP Reporter Moleküls diente der Kontrolle der erfolgreichen Injektion, Transkription und Translation. So ließen sich die Zebrafischembryonen aussortieren die keinerlei Expression aufwiesen und nur diejenigen wurden für die Aufzucht ausgewählt, welche schon im 72 hpf Entwicklungsstadium ein GFP Signal in der Skelettmuskulatur oder im Myokard aufwiesen.

3 Ergebnisse

3.1 Funktionelle Analyse von FHL 1 im Zebrafisch

Mutationen im FHL 1 Gen beim Menschen verursachen Myofibrilläre Myopathien. In der Sequenzanalyse (Abb.4) wird dargestellt, dass das Protein FHL 1 des Zebrafisches sowohl zur Maus als auch zum Menschen hochkonserviert ist. Beim Zebrafisch unterscheidet man aufgrund einer Genomduplikation zwei Gene für das humane FHL 1: FHL1a und FHL1b. Alle vier Proteine der verschiedenen Spezies sind in Abbildung 5 als Alignment dargestellt. Dieses zeigt, dass eine Aminosäurehomologie von humanem FHL 1 zum Zebrafisch FHL1a von 69% und zum FHL1b von 62% vorliegt.

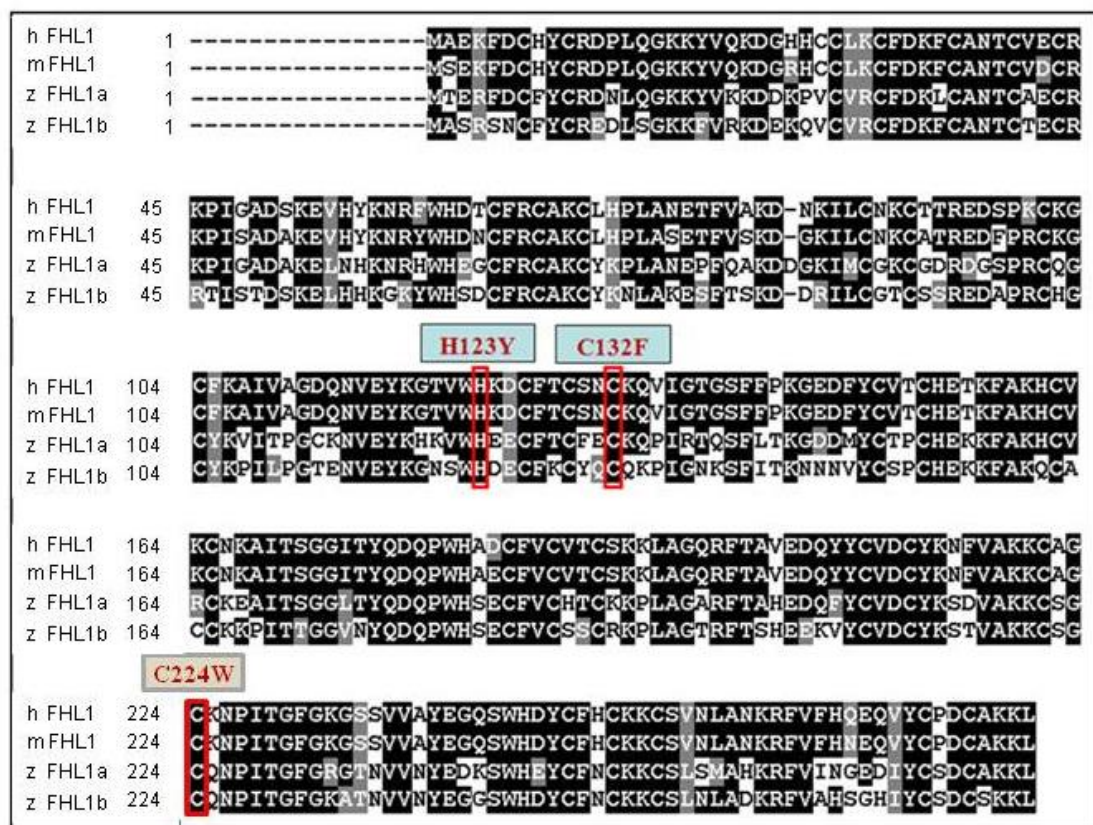


Abb. 4: Alignment von FHL 1: Aminosäure-Sequenzalignment von FHL1 (human, mouse und die beiden Zebrafisch Orthologe) Schwarz markierte Aminosäuren sind identisch, graue besitzen ähnliche Eigenschaften (Einteilung der Aminosäuren in unpolar/ hydrophob, polar/ neutral, basisch und sauer), graue kommen dabei aus der gleichen Gruppe. Bei den weiß markierten Stellen unterscheiden sich die Aminosäuren. Rot markiert sind die Mutationen H123Y, C132F sowie C224W.

3.1.1 *In Situ* Hybridisierungen konnten die Lokalisation von FHL1b im Herz darstellen

Um zu untersuchen, in welchen Geweben im Zebrafisch FHL1b exprimiert wird, wurden *In Situ* Hybridisierungen in verschiedenen Entwicklungsstadien durchgeführt. FHL1b mRNA wurde beim Zebrafisch in frühen Entwicklungsstadien im Neuralrohr exprimiert (Abb. 5, A). Bei 24 hpf und 48 hpf alten Embryonen erkannte man eine Expression von FHL1b mRNA in den Kiemenbögen (Abb. 5, B und C). Hauptsächlich war FHL1b mRNA im Herzen lokalisiert. Besonders deutlich erkennbar war dies bei 72 hpf (Abb. 5, D und E). Im Entwicklungsalter von 96 hpf war die Expression ubiquitär. FHL1b wurde in dieser Entwicklungsstufe im Gehirn, Herz, Gefäßsystems und der Skelettmuskulatur detektiert (Abb. 6, F).

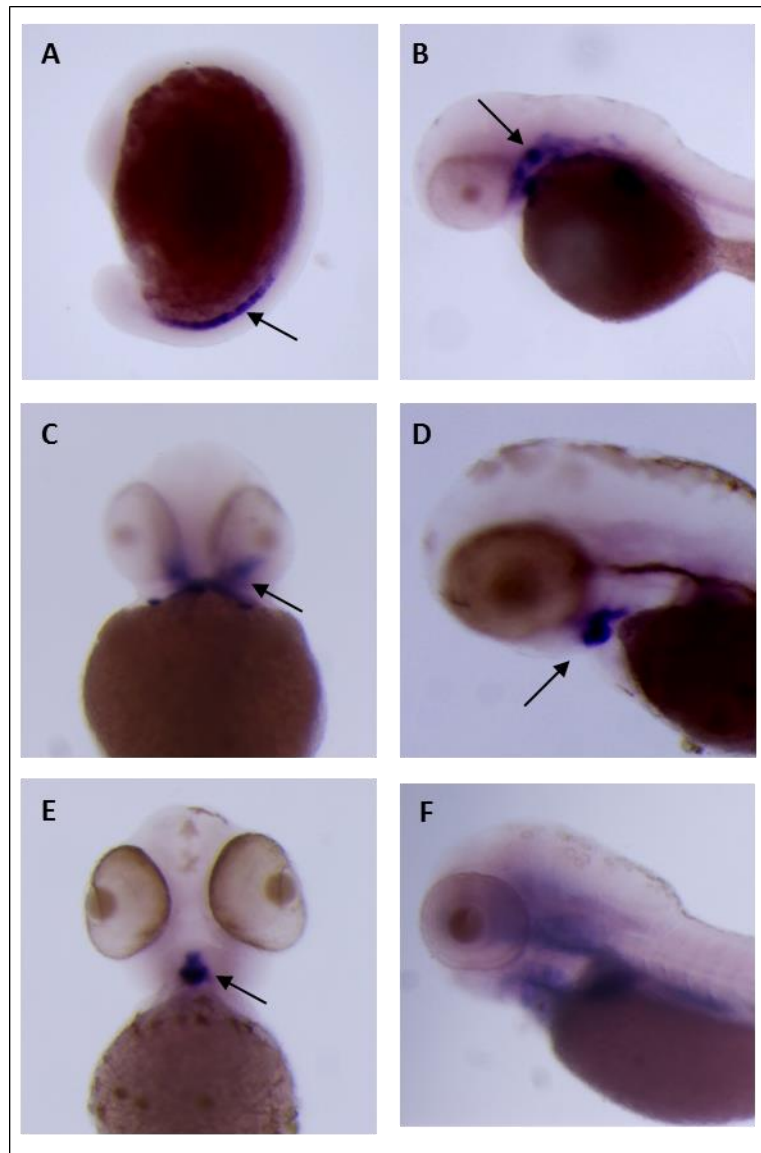


Abb. 5: *In Situ* Hybridisierung FHL1b: Die blaue Anfärbung entsteht durch die Detektion von FHL1b mRNA in den einzelnen Entwicklungsstadien im Wildtyp Zebrafischembryo. Sie weist auf den Expressionsort hin **A:** 18 Somiten, der Pfeil zeigt die Expression von FHL1b mRNA im Neuralrohr **B** und **C:** 48 hpf, der Pfeil zeigt die Expression in den Kiemenbögen **D** und **E:** 72 hpf, der Pfeil zeigt die deutliche Expression von FHL1b mRNA im Herzen **F:** 96 hpf, ubiquitäre Expression.

3.1.1.1 Histologie der ISH zeigt die Expression von FHL1b im Ausflusstrakt des Herzens

Um zu untersuchen, wo im Herzen FHL1b exprimiert wird, sollten die *In Situ* Bilder genauer analysiert werden. Es wurden hierfür von den 72 hpf Fischen histologische Schnittbilder angefertigt. Es wurde zusätzlich eine H.E. Färbung durchgeführt. Dies ließ eine genauere Lokalisationsanalyse bezüglich der angefärbten Herzteile der *In Situ* gefärbten FHL1b Zebrafische zu.

Dabei war zu erkennen, dass die Expression von FHL1b mRNA im Herzen, genauer gesagt im Ausflusstrakt (die dem Bulbus arteriosus nachgeschalteten Gefäße) nachzuweisen war (Abb. 6).

Für FHL1a wurde bereits eine Expression im Herzen und Skelettmuskel gezeigt (Kayvanpour, 2011).

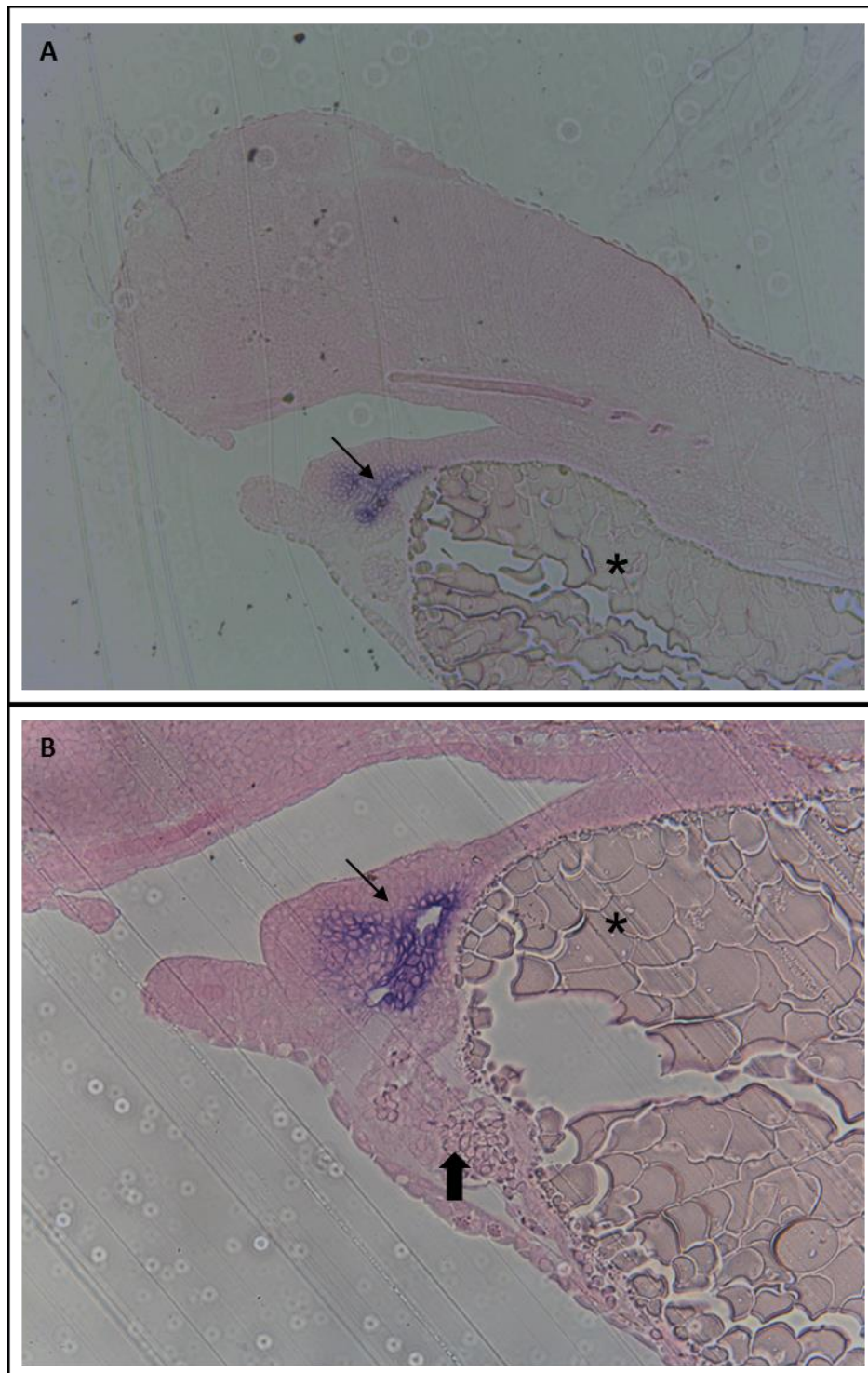


Abb. 6: Histologie, FHL1b *In Situ* 72 hpf: **A:** Übersichtsaufnahme vom Kopf (mittig) und Rumpf (nach rechts abgeschnitten) eines Zebrafisches. Der Stern markiert den Dotter unten rechts. Der Pfeil zeigt auf den Expressionsort (blau) von FHL1b mRNA der *In Situ* Hybridisierung: der Bulbus arteriosus des Herzens. **B:** Nahaufnahme des Herzens. Der Stern markiert den Dotter unten rechts. Der dünne Pfeil zeigt auf den Expressionsort (blau) von FHL1b mRNA der *In Situ* Hybridisierung: die dem Bulbus arteriosus nachgeschalteten Gefäße des Herzens. Der Blockpfeil zeigt auf das Herz und seine Kammern.

3.1.2 FHL *Knockdown* durch Morpholino Injektionen

Um die Funktion der FHL 1 Orthologe darzustellen, wurden jeweils *Knockdown* Versuche durchgeführt. Hierbei wurden *splice* Morpholinos in die befruchteten Zebrafischoozyten im Ein- bis Vierzellstadium injiziert. So konnte der Funktionsausfall der FHL 1 Orthologe dargestellt und untersucht werden. Als Vergleich dienten KCL- injizierte Kontroll-Embryonen.

3.1.2.1 FHL1a Morphanten zeigen kardiale Dysfunktion

Bei den Injektionen von FHL1a *splice* Morpholino kam es bei 65% der Embryonen zur Ausbildung eines Phänotyps (Abb. 7). Dieser stellte sich folgendermaßen dar: Nach 48 hpf kam es zu einem Blutstau vor dem Atrium. Des Weiteren entstand bei den Embryonen spätestens nach 72 hpf ein Perikardödem (Abb. 8 und 9). Bei einigen der Injektionen viel auf, dass das Herz zeitweise für Zwei bis Zehn Sekunden asystol wurde und dann wieder in die ursprüngliche Frequenz umsprang. Es konnte vereinzelt Vorhofflimmern dokumentiert werden.

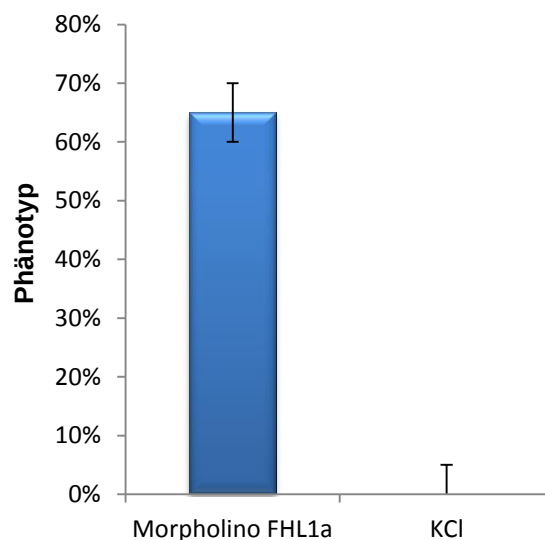


Abb. 7: FHL1a 1mM Morpholino Injektionskonzentration: Nach Injektion von FHL1a 1mM Morpholino zeigen 65% der Embryonen einen stabilen Phänotyp. Mit KCL kontrollinjizierte Embryonen zeigen keinen Phänotyp.

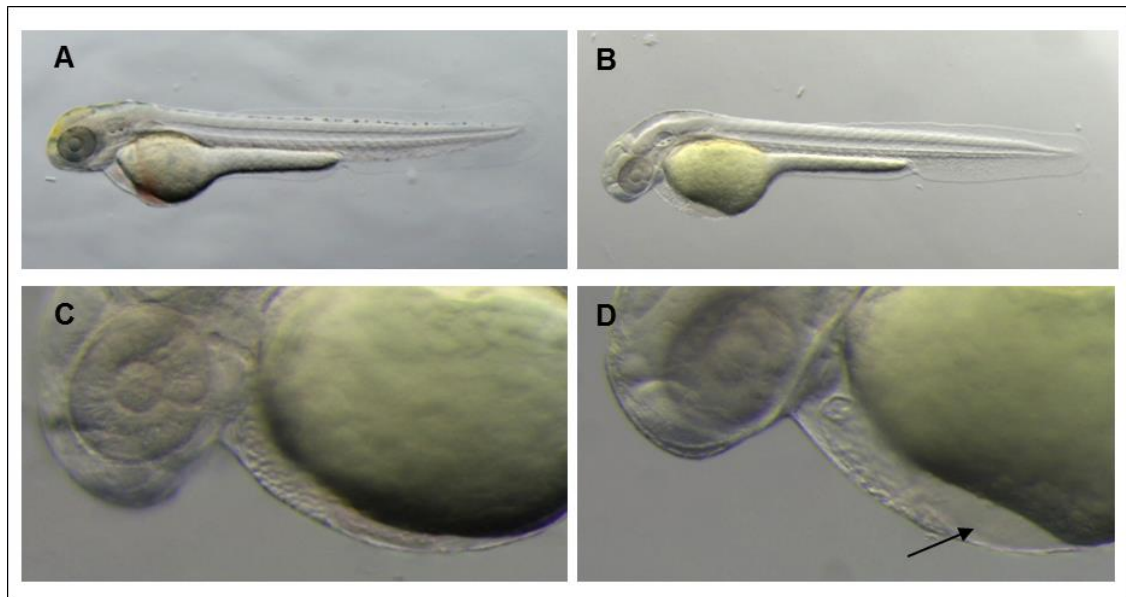


Abb. 8: FHL1a Knockdown 48 hpf: A und C: KCL Kontrollen zum Vergleich B und D: Phänotyp von FHL1a der 1mM Morpholino Injektionen A und B: Übersichtsaufnahmen C und D: Nahaufnahmen des Herzens D: Der Pfeil zeigt auf den beginnenden Blutstau vor dem Atrium.

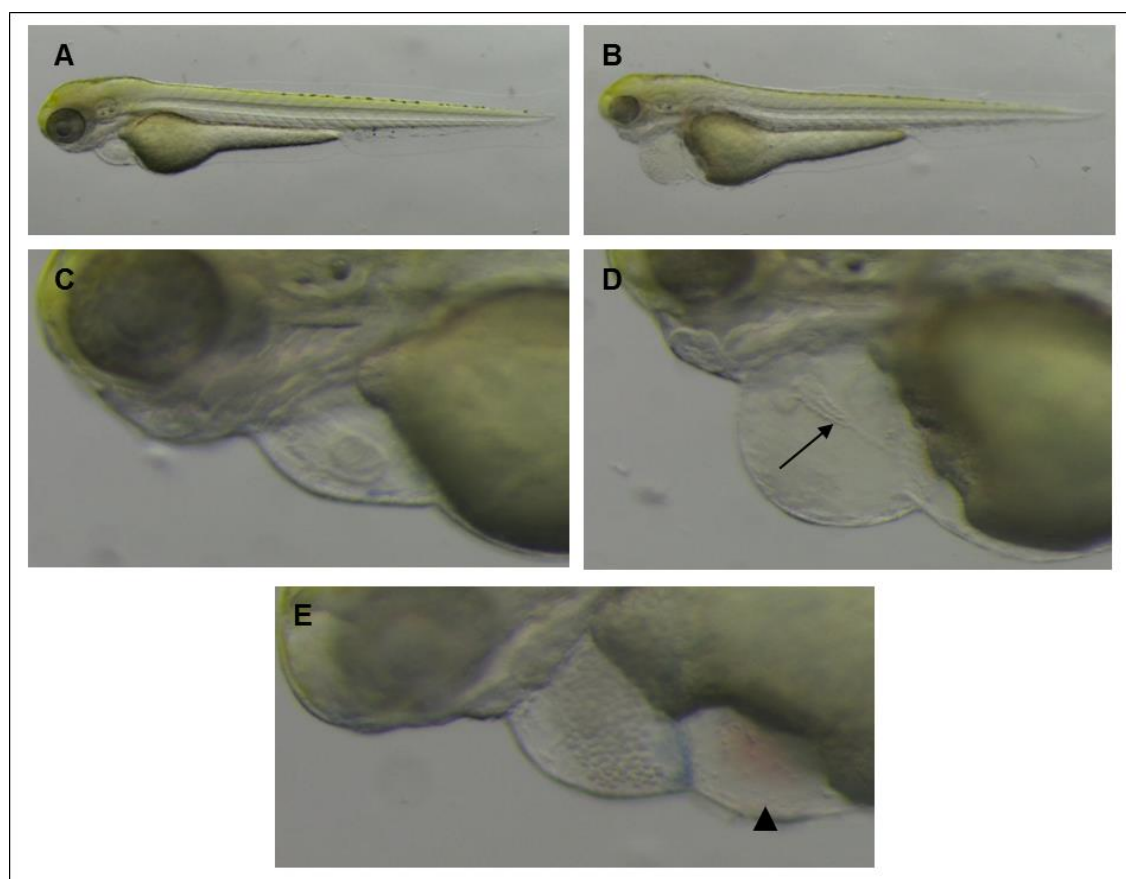


Abb. 9: FHL1a Knockdown 72 hpf: A und C: KCL Kontrollen zum Vergleich B, D und E: Phänotyp von FHL1a der 1mM Morpholino Injektionen A und B: Übersichtsaufnahmen C, D und E: Nahaufnahmen des Herzens D: Der Pfeil zeigt auf das durch das Perikardödem schlauchförmig verdünnte Herz E: der Pfeilkopf zeigt auf den Blutstau vor dem Atrium.

3.1.2.2 *FHL1b* Morphanten zeigen kardiale Dysfunktion und ausgeprägte Skelettmuskeldeformitäten

Die mit *FHL1b splice* Morpholino injizierten Embryonen zeigten phänotypisch starke Veränderungen. Es zeigten 70% der Embryonen einen Phänotyp (Abb. 10). Sie zeigten eine deutliche Veränderung der Skelettmuskulatur, welche sich durch eine Deformierung des Zebrafischschwanzes bemerkbar machte. Des Weiteren zeigte sich bereits nach 48 hpf ein Perikardödem (Abb. 11). Dieses entstand sekundär aufgrund einer nicht ausreichenden Pumpfunktion des Herzens. Es nahm in der weiteren Entwicklung weiter zu (Abb. 12). Ab einem Alter von 72 hpf war keine physiologische Herzkontraktion mehr erkennbar. Genauere Untersuchungen (fractional shortening) in früheren Arbeiten hatten ergeben, dass sich die Funktionseinschränkung vor allem auf den Ventrikel bezieht und das Atrium vergleichsweise unbeeinträchtigt blieb (Kayvanpour, 2011). Eine funktionierende Blutzirkulation wurde bei den Fischen auch zu einem späteren Zeitpunkt nicht mehr erreicht.

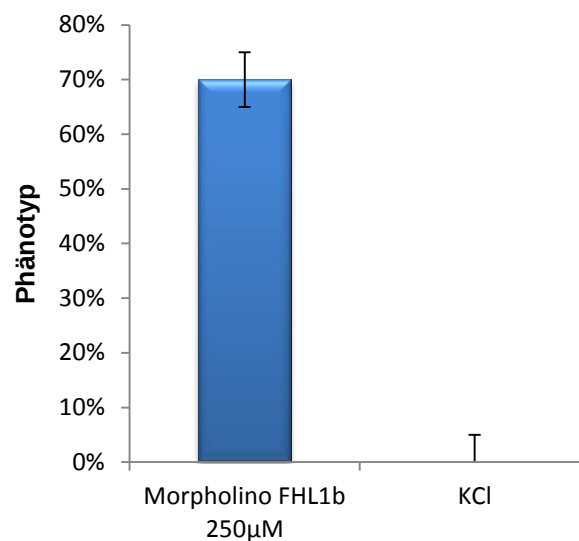


Abb. 10: FHL1b 250µM Morpholino Injektionskonzentration: Nach Injektion von 250µM FHL1b Morpholino zeigen 70% der Embryonen einen stabilen Phänotyp. Mit KCL kontrollinjizierte Embryonen zeigen keinen Phänotyp.

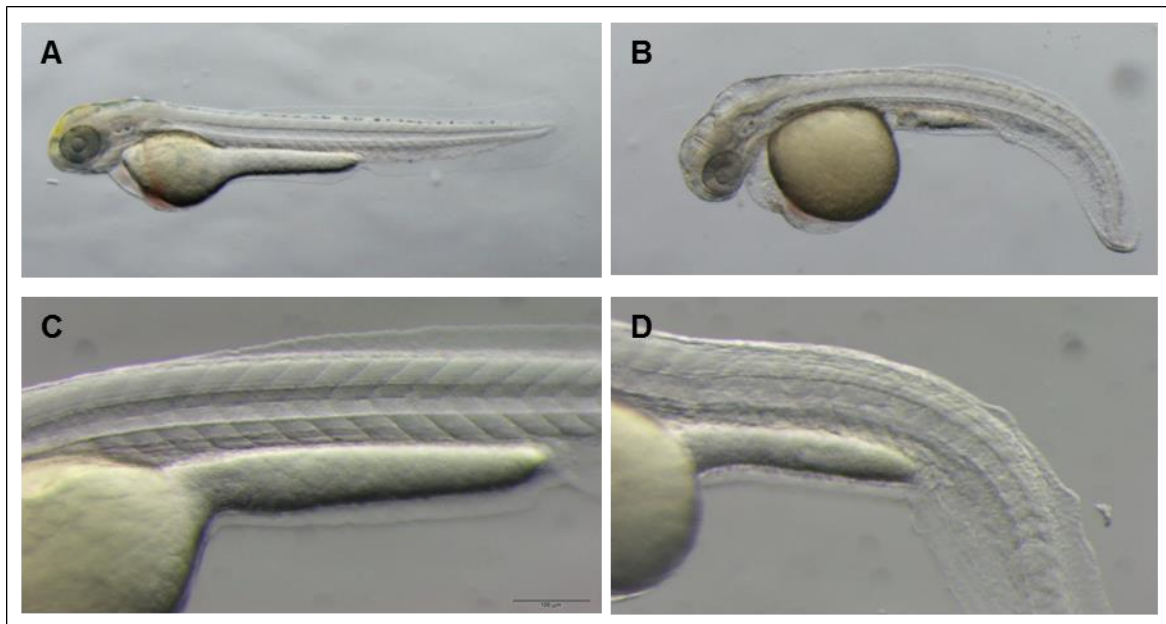


Abb. 11: FHL1b *Knockdown* 48 hpf: **A** und **C:** KCL Kontrollen zum Vergleich **B** und **D:** Phänotyp von FHL1b der 250µM Morpholino Injektionen **A** und **B:** Übersichtsaufnahmen **C** und **D:** Nahaufnahmen der Skelettmuskulatur des Schwanzes **C:** normale Fiederung der Muskulatur **D:** Strukturdefekte der Muskulatur erkennbar.

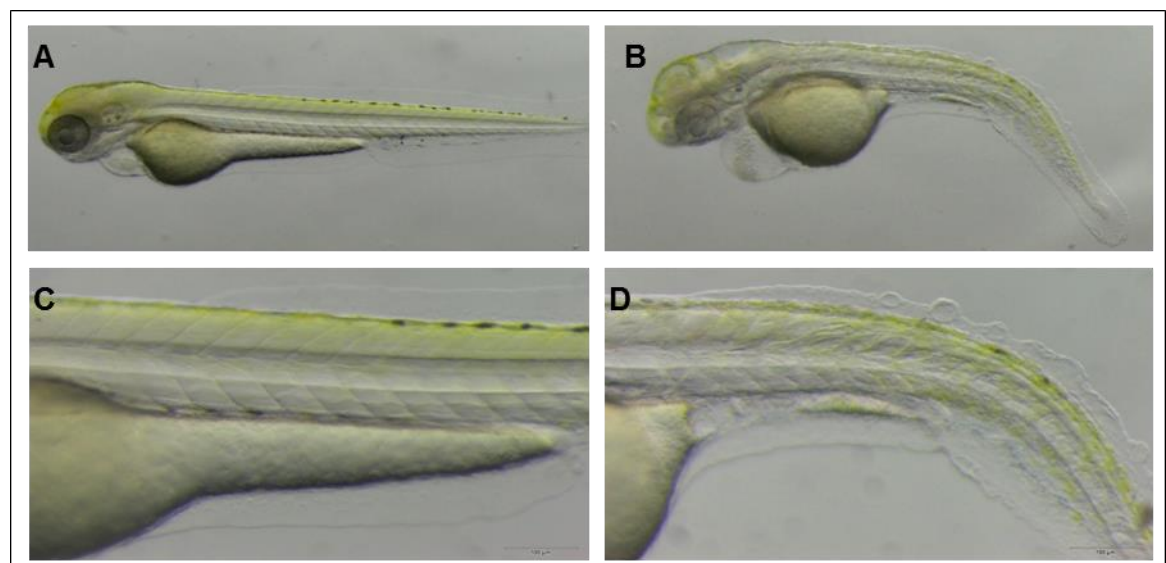


Abb. 12: FHL1b *Knockdown* 72 hpf: **A** und **C:** KCL Kontrollen zum Vergleich **B** und **D:** Phänotyp von FHL1b der 250µM Morpholino Injektionen **A** und **B:** Übersichtsaufnahmen **C** und **D:** Nahaufnahmen der Skelettmuskulatur des Schwanzes **C:** normale Fiederung der Muskulatur **D:** Strukturdefekte der Muskulatur erkennbar.

3.1.3 *Touch response* Versuche zeigen verlangsamte Reaktionen

Da bei den FHL1b Morphanten strukturell eine dysmorphe Skelettmuskulatur auf-
fiel, sollte deren Funktionalität durch *touch-response* Versuche evaluiert werden.
Dabei wurde mit einer stumpfen Präpariernadel dem lebenden Zebrafischembryo

bei 72 hpf ein taktiler Reiz gegeben und seine Reaktion videodokumentiert. Die FHL1b Morphanten zeigten ein deutlich verzögertes Reaktionsvermögen und zusätzlich hierzu ein pathologisches Schwimmverhalten. Sie schwammen nur in einem kleinen Radius und hatten eine sehr geringe Bewegungsweite. Um die Funktionalität der Skelettmuskulatur der FHL1a Morphanten darzustellen, wurden diese daraufhin auch untersucht. Sie zeigten auch eine verzögerte Reaktion auf die Stimuli, schwammen im Gegensatz zu den FHL1b Morphanten jedoch nicht kreisförmig. Als Kontrollgruppe wurden 72 hpf TE Zebrafische untersucht. (Anekdotische Beobachtungen, es wurde keine Quantifizierung durchgeführt)

3.1.4 Die Herzfrequenz ist bei den Morphanten verringert

Da mikroskopisch deutliche Veränderungen an den Herzen der Morphanten dargestellt werden konnten, sollte deren Funktionalität durch Auszählung der Herzfrequenz bestimmt werden. Bei 48 hpf lag sie bei den Wildtypen bei 110 Schlägen pro Minute ($n=10$), bei den FHL1a Morphanten nur bei 74 ($n=20$, 2 Experimente). Die FHL1b Morphanten hatten bei 48 hpf auch eine Herzfrequenz von 74 ($n=20$, 2 Experimente). Bei 72 hpf schlug das Herz eines Wildtypembryos 180 Mal pro Minute ($n=10$), das der FHL1a Morphanten lediglich 111 Mal ($n=20$, 2 Experimente). Bei 72 hpf betrug die Herzfrequenz der FHL1b Morphanten 112 ($n=20$, 2 Experimente). Die Herzfrequenz war also bei beiden Morphanten sowohl bei 48 als auch 72 hpf deutlich niedriger als bei den Wildtypen (Abb. 13). Zwischen den Knock-downs von FHL1a und FHL1b zeigte sich kein Unterschied bezüglich der Herzfrequenz.

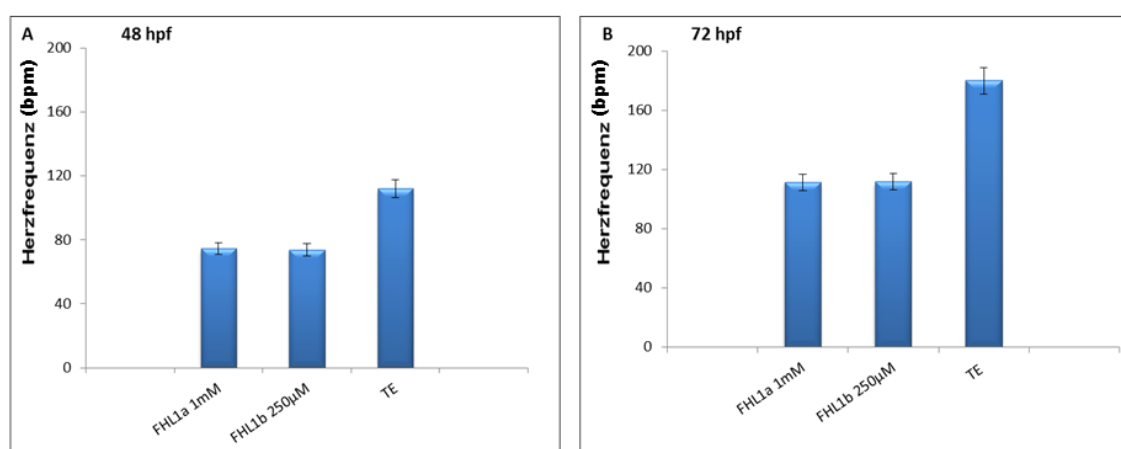


Abb. 13: Herzfrequenz der Morphanten im Vergleich zum Wildtyp: A: Herzfrequenz bei 48 hpf **B:** Herzfrequenz bei 72 hpf. Bei den Morphanten ist sie zu beiden Entwicklungszeitpunkten, sowohl bei FHL1a 1mM als auch bei FHL1b 250µM, geringer als bei den Wildtyp Embryonen.

3.1.5 Elektronenmikroskopische Bilder zeigen Rarifizierung der Skelettmuskulatur bei FHL1a Morphanten

Um zu untersuchen, ob bezüglich der lichtmikroskopisch erkennbaren Deformationen der Zebrafische sowie der pathologischen Ergebnisse aus den *touch response* Versuchen, ultrastrukturelle Korrelate darstellbar sind, wurden elektronenmikroskopische Bilder der Skelettmuskulatur angefertigt. FHL1a Morpholino injizierte Fische wurden bei 72 hpf untersucht. Es zeigten sich massive Veränderungen der Skelettmuskulatur im Vergleich zu Wildtypen. Es kam zu einem Strukturverlust der Myofibrillen sowie zu einer Rarifizierung der Muskulatur. Die Sarkomere sind bei den Morphanten nicht in der Weise geordnet wie beim Wildtyp und in ihrer Anzahl reduziert (Abb. 14).

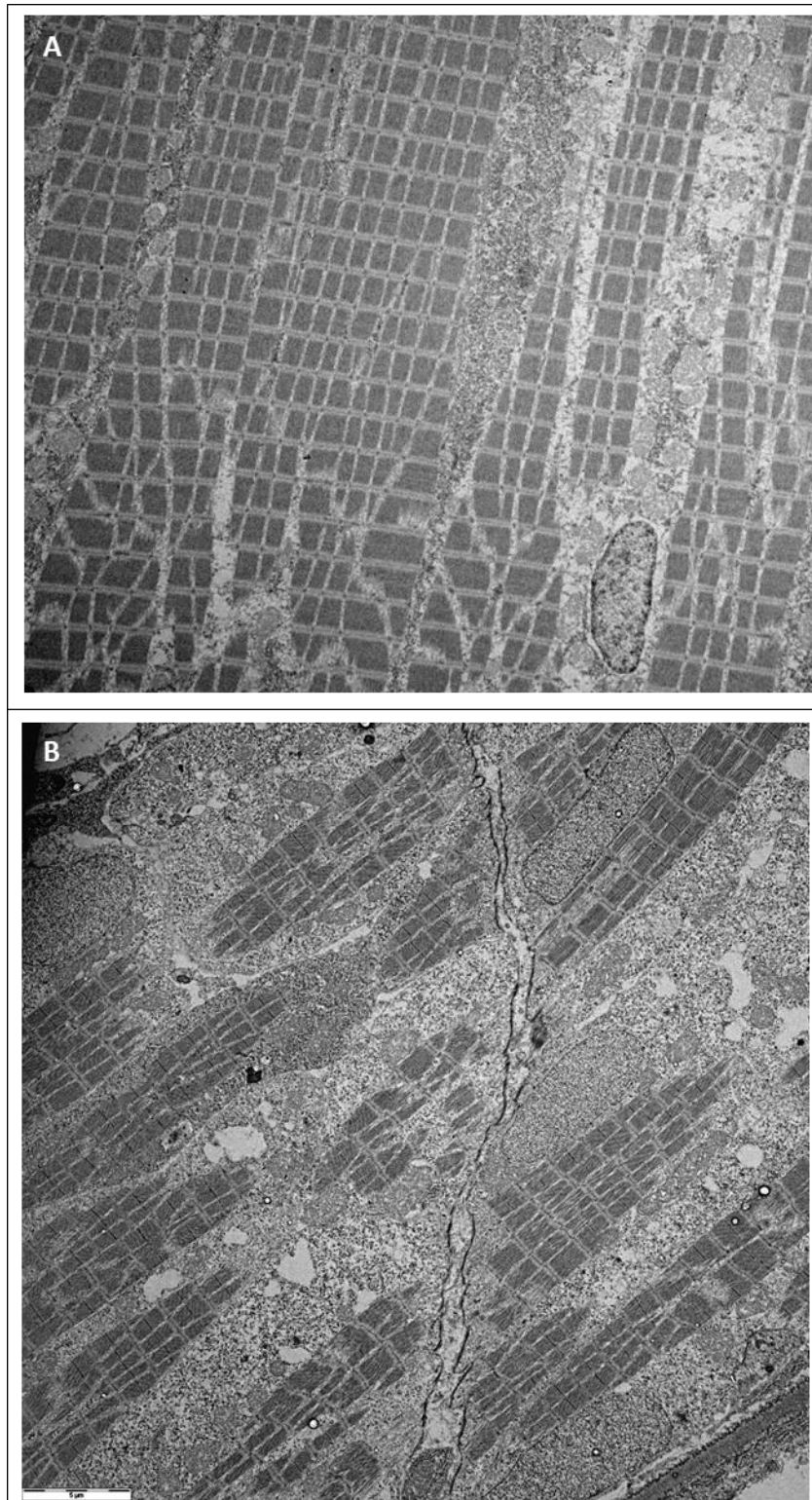


Abb. 14: Zebrafisch, Elektronenmikroskopische Bilder 72 hpf: **A:** Wildtyp, 72 hpf. Erkennbar sind strukturierte und organisierte Myofibrillen **B:** FHL1a, 72 hpf. Im gesamten Bild Strukturverlust und Rarifizierung der Myofibrillen. In der Bildmitte ist eine Somitengrenze erkennbar.

3.2 Charakterisierung der Mutation FHL 1 C224W im Zebrafisch

Durch genetische Analysen bei Personen, die an der Reducing Body Myopathy erkrankt sind, konnten krankheitsverursachende Mutationen im FHL 1 Gen identifiziert werden. In dieser Arbeit wurde die Mutation C224W genauer untersucht. Hierbei war von Interesse, ob die *missense* Mutation zu einem Funktionsverlust (*loss of function*) oder zu einer übermäßigen Aktivität des Proteins (*gain of function*) führt.

3.2.1 Die Überexpression von FHL 1 C224W hat keine Auswirkungen auf den Phänotyp

Es sollte untersucht werden, welche Auswirkungen auf den Phänotyp die Überexpression von FHL 1 C224W hat. Bei Überexpressionsexperimenten wird eine zusätzliche Menge an mutiertem Protein zu dem funktionstüchtigen normal exprimierten Protein hinzugefügt. Es wurde im 1-Zell-Stadium von Wildtyp Embryonen 335ng/μl bzw. 528ng/μl FHL 1 C224W mRNA (jeweils von FHL1a und FHL1b) injiziert. Die Embryonen wurden bei 24, 48, 72 (mit Fotodokumentation) und 96 hpf untersucht. Bei einem *loss of function* zieht eine Mutation einen Funktionsverlust des betreffenden Gens nach sich. Bei einem dominant-negativen Effekt unterdrückt die dominante Mutation die Wirkung des Wildtyp- Allels. Ein strukturell verändertes Protein hat dabei einen stärkeren Effekt auf die Funktion als das vollständige Fehlen des Proteins. Eine dominante Mutation unterdrückt dabei die Wirkung des Wildtyp- Proteins. Es sollte die Hypothese untersucht werden, ob mittels Überexpression von FHL 1 C224W mRNA Phänotypen generiert werden können.

Es konnte gezeigt werden, dass durch die Überexpression von mRNA des mutierten Proteins C224W von FHL1a und FHL1b jeweils keine phänotypisch erkennbaren Veränderungen auftraten (Abb. 15 und 16). Sowohl bei einer mRNA Konzentration von 335ng/μl als auch bei 528ng/μl zeigten die Zebrafische keine Veränderungen im Vergleich zu den Kontrollinjektionen mit FHL1a und FHL1b Wildtyp mRNA (Abbildung 17). Dies zeigt, dass es für C224W beim Zebrafisch keinen dominant negativen Effekt gibt.

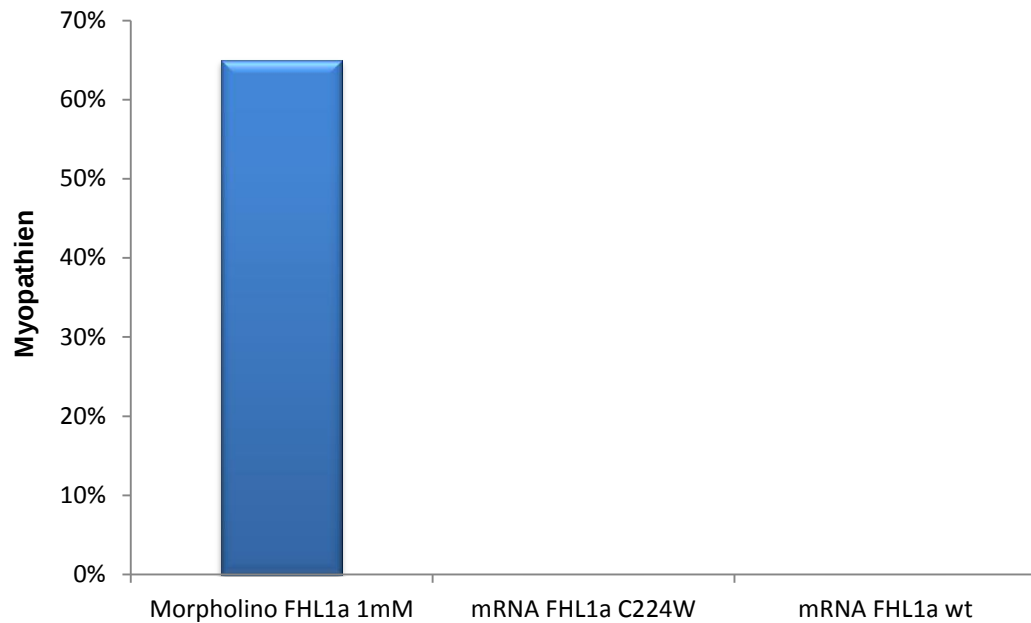


Abb. 15: Überexpression FHL1a C224W: Die linke Säule zeigt die Rate an Myopathien bei der Morpholinoinjektion von FHL1a 1mM. Eine alleinige Injektion von mRNA des FHL1a C224W hat keine Auswirkung auf den Phänotyp. Die Kontrollinjektion von mRNA FHL1a wt erzeugt auch keinen Phänotyp.

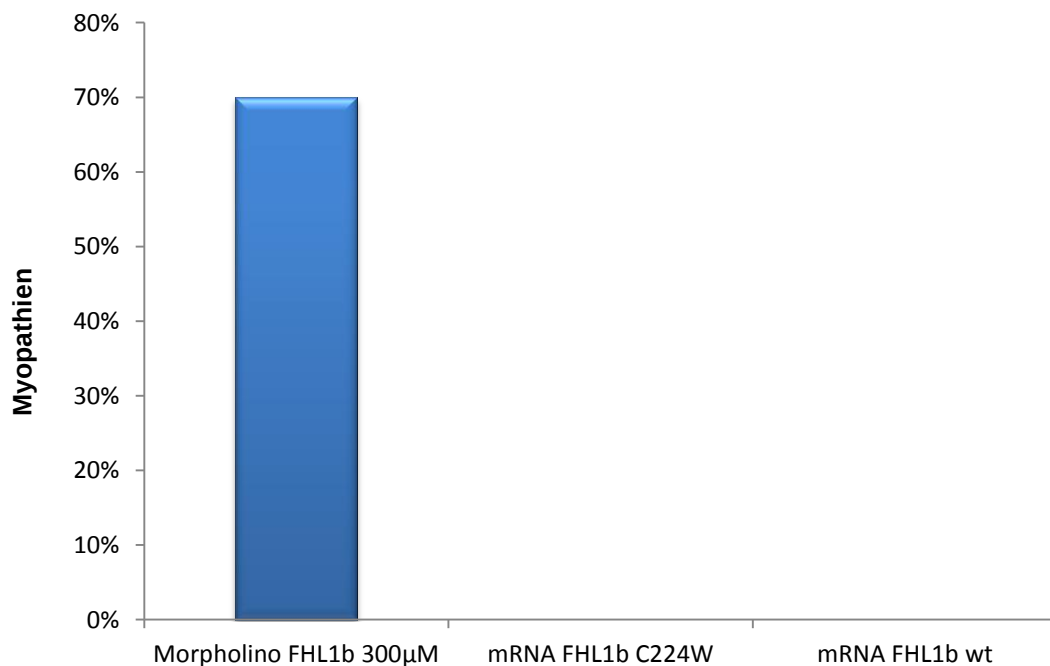


Abb. 16: Überexpression FHL1b C224W: Die linke Säule zeigt die Rate an Myopathien bei der Morpholinoinjektion von FHL1b 300µM. Eine alleinige Injektion von mRNA des FHL1b C224W hat keine Auswirkung auf den Phänotyp. Die Kontrollinjektion von mRNA FHL1b wt erzeugt auch keinen Phänotyp.

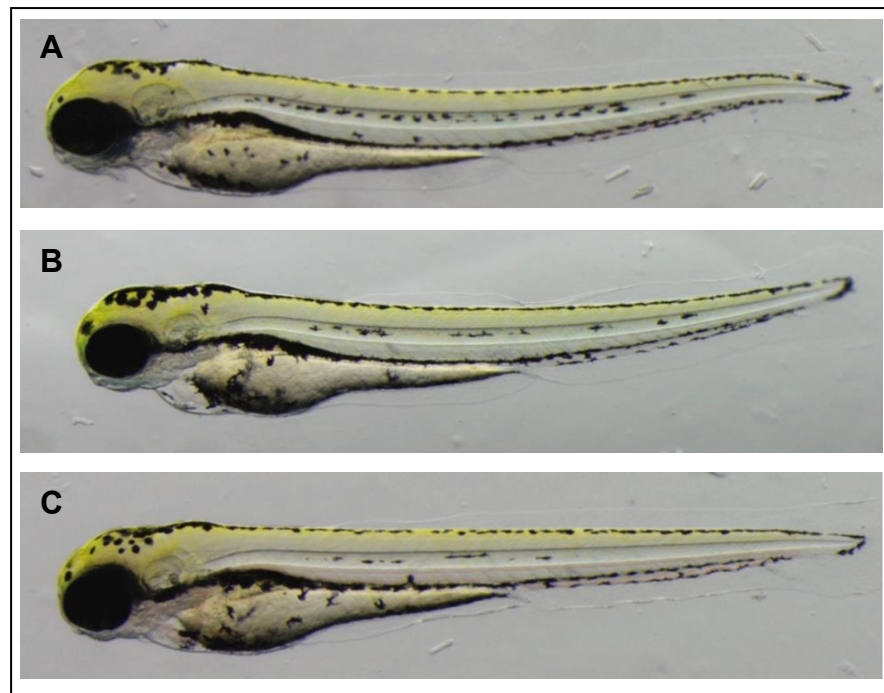


Abb. 17: Überexpressionsanalyse FHL1a C224W: **A:** mRNA wt Kontrolle, 72 hpf **B:** Injektion von FHL1a C224W mRNA bei einer Konzentration von 335ng/μl, 72 hpf **C:** Injektion von FHL1a C224W mRNA bei einer Konzentration von 528ng/μl, 72 hpf. Die Zebrafischembryonen weisen bei beiden Injektionen keine erkennbaren Unterschiede im Vergleich zur KCL Kontrolle auf. Es gibt hierbei also keinen dominant negativen Effekt.

3.2.2 Mit FHL 1 C224W ist kein Rescue möglich

Um zu überprüfen, ob FHL1a C224W bzw. FHL1b C224W in ihrer Funktion der des Wildtyp-Proteins entsprechen, wurden Rescue Analysen durchgeführt.

Zum Vergleich der Rescue Analysen wurden als Ausgangswert für alleinige Injektionen von Morpholino die Rate von zu erwartenden Phänotypen bestimmt. Sie betrug bei FHL1a 1mM 65% sowie bei FHL1b 300μM 70% (Abb. 9 und 10).

Als Kontrolle wurde eine Koinjektion von Morpholino sowie mRNA des Wildtyp-Proteins von FHL1a bzw. FHL1b durchgeführt. Bei FHL1a ließ sich hierdurch eine signifikante Reduktion des Phänotyps von 65% auf 30% (n=28, 2 Experimente, p=0,00146) beobachten, bei FHL1b war die Reduktion von 70% auf 25% ebenfalls signifikant (n=30, 2 Experimente, p=0,00001) (Abb. 18 und 19). Bei den Wildtyp Kontrollinjektionen konnte durch die Reduktion der Phänotypen der Beweis erbracht werden, dass nach dem Ausschalten der FHL1a bzw. FHL1b Proteine, jeweils durch das geeignete Morpholino, die Funktion prinzipiell durch die Injektion von mRNA der Wildtyp Orthologe wieder herstellbar war. Dies bewies zusätzlich die Spezifität des Knockdowns durch Morpholinoinjektionen.

Es sollte für die Mutationen FHL1a C224W bzw. FHL1b C224W untersucht werden, ob mit ihrer Funktion ein Rescue möglich ist. Nach Inaktivierung des Wildtypproteins durch die Injektion von Morpholino wurde die mutierte mRNA FHL 1 C224W von FHL1a bzw. FHL1b injiziert. Ist das Protein trotz Aminosäureaustausch noch funktionsfähig, kann es den Morpholino induzierten Phänotyp aufheben. Ist es jedoch funktionslos, kommt es zur Ausprägung des durch das Morpholino bedingten Phänotyps. So konnte überprüft werden, ob es sich bei der FHL 1 C224W Mutation um einen loss- of- function handelt.

Durch Koinjektionen von Morpholino und mRNA der mutierten Form FHL1a C224W betrug die Rate an Phänotypen 70% (n=30, 2 Experimente). Bei FHL1b C224W betrug sie 75% (n=32, 2 Experimente). Der Unterschied ist im Vergleich zur Phänotyprate der Morpholinoinjektionen nicht signifikant (für FHL1a $p=0,776$, für FHL1b $p=0,676$). Die mutierten Orthologe waren nicht in der Lage den Funktionsverlust zu kompensieren. Es war kein Rescue mit den mutierten Formen möglich. Dies beweist, dass die Mutation FHL 1 C224W einen loss- of- function verursacht. Zusätzlich zeigte sich ein Anstieg der Phänotyprate (Abb. 18 und 19).

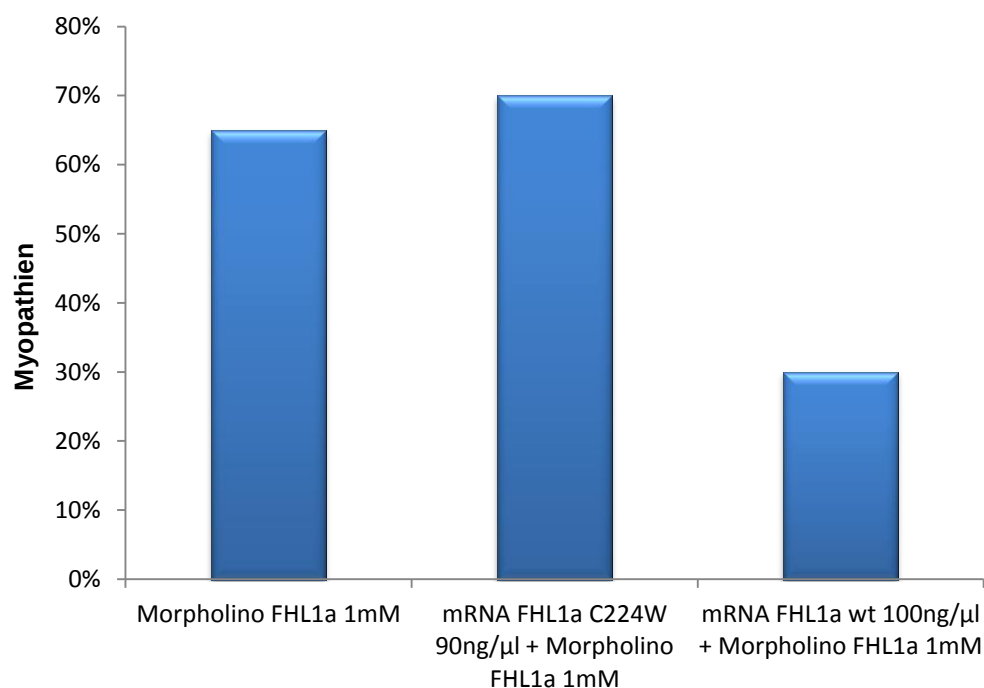


Abb. 18: Rescue FHL1a C224W: Die linke Säule zeigt die Rate an Myopathien bei der Morpholinoinjektion von FHL1a 1mM. Bei der zusätzlichen Injektion von mRNA des mutierten FHL1a C224W wird eine vergleichbare Anzahl an Phänotypen erreicht. Kontrollen mit FHL1a wt mRNA zeigen deutlich weniger Phänotypen mit Myopathien.

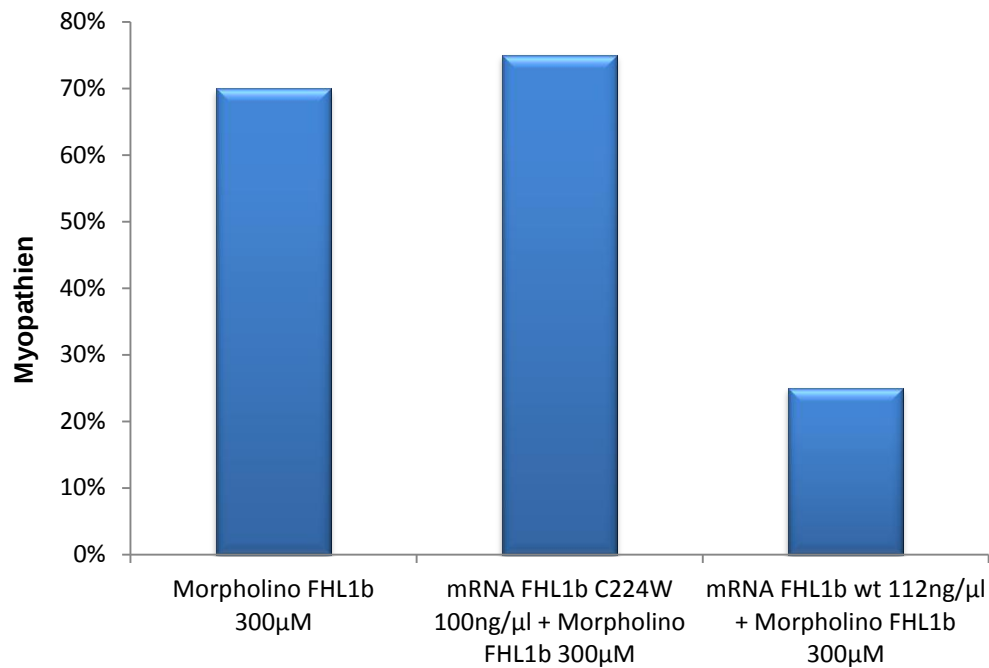


Abb. 19: Rescue FHL1b C224W: Die linke Säule zeigt die Rate an Myopathien bei der Morpholinoinjektion von FHL1b 300µM. Bei der zusätzlichen Injektion von mRNA des mutierten FHL1b C224W wird eine vergleichbare Anzahl an Phänotypen erreicht. Kontrollen mit FHL1b wt mRNA zeigen deutlich weniger Phänotypen mit Myopathien.

3.3 Generierung von transgenen Zebrafischlinien

Die bisherigen Untersuchungen der Mutationen von FHL 1 - H123Y, C132F sowie C224W waren jeweils nur über eine transiente Expression möglich. Es zeigte sich, dass eine transiente Überexpression keinen Effekt hatte. Ein Rescue war nur mit wt RNA möglich, nicht jedoch mit den mutierten Proteinen. Es stellte sich die Frage, ob die beim Menschen auftretende Klinik der Myofibrillären Myopathien möglicherweise erst durch Alterungseffekte auftritt. Der zeitliche Einfluss kann jedoch nicht durch einzelne transiente Untersuchungen geklärt werden. Um diesen Zeiteffekt beim Zebrafisch untersuchen zu können, wurden deshalb transgene Zebrafischlinien generiert, die die Varianten stabil und muskelspezifisch exprimieren.

Der erste Schritt für die Untersuchungen war die Generierung eines Tol-2 Multiside Gateway Vektors (Abb. 20). Das 5' Element war ein muskelspezifischer Unc 45 Promoter, als mittleres Element wurde die jeweilige Genvariante von FHL 1 eingefügt. Die Integration der FHL 1 Varianten wurde per Sequenzierung überprüft. Als 3' Element wurde ein GFP-Tag gewählt. Mit Hilfe einer integrierten *internal ribosome entry site* (IRES) wurde bei der Translation kein Fusionsprotein hergestellt,

sodass das Reporterprotein die Funktion von FHL 1 nicht beeinträchtigen konnte. Die IRES bewirkte über eine externe Ribosomenanlagerung eine getrennte Translation von FHL 1 und dem GFP Reporter. Ein gekoppeltes FHL 1–GFP Protein hätte zu Proteinaggregationen in den Zellen führen können. Diese könnten an sich pathogen sein, da GFP ein großes Protein ist und womöglich FHL 1 sterisch behindert hätte. Diese Fehlerquelle ließ sich schon durch den Ansatz einer getrennten Translation vermeiden. Nach erfolgreicher Injektion des Destination Multiside Vektors kam es bei jeder Translation des Zielproteins FHL 1 auch zu einer Bildung des Reporterproteins GFP. Dies diente der Detektion und Selektion von Zebrafischembryonen, die den Destination Multiside Vektor translatierten. Nach dem GFP folgte die Poly-A Sequenz. Durch gemeinsame Injektion des Vektors mit mRNA eines Transposase Enzyms sollte die Integrationsrate verbessert werden.

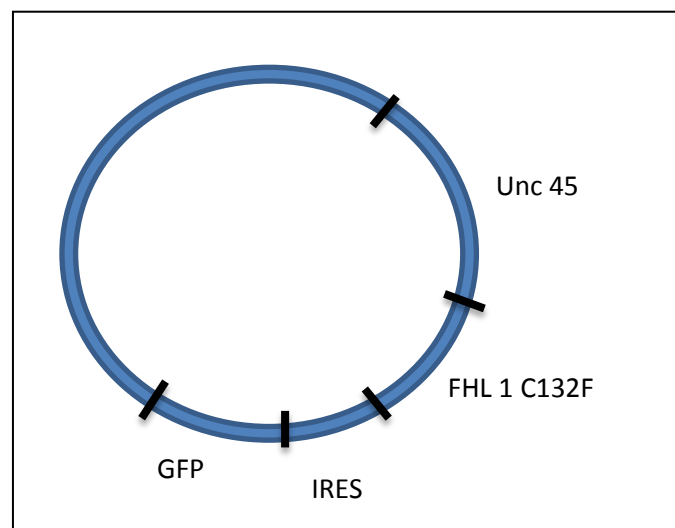


Abb. 20: Vereinfachter Multiside Vektor: Unc 45 Promoter, FHL C132F Mutation als Beispiel, IRES und GFP Reporter (Eigene Darstellung).

Nach 72 hpf wurden die Zebrafischembryonen vorselektiert und nur diejenigen in die Aufzucht gegeben, welche ein GFP Signal zeigten. Dieses war im Herzen als auch in der Skelettmuskulatur der Zebrafische nachweisbar (Abb. 21 und 22). Bei diesen Embryonen konnte davon ausgegangen werden, dass die Injektion erfolgreich war und der Vektor bereits transient abgelesen wurde. Die Rate hierfür entsprach ca. 10- 30% der insgesamt injizierten Fische ($x \approx 1000$). Die Vorselektion diente zur Fokussierung auf die leuchtenden Fische, welche in die Aufzucht gegeben werden sollten.



Abb. 21: GFP Expression in der Herzmuskulatur: Der Pfeil zeigt auf das durch GFP signalgebende Herz. Dort wird FHL 1 transkribiert und translatiert. Der Pfeilkopf zeigt die Fluoreszenz des Dotters, welche jedoch nicht durch eine GFP Expression hervorgerufen wird.

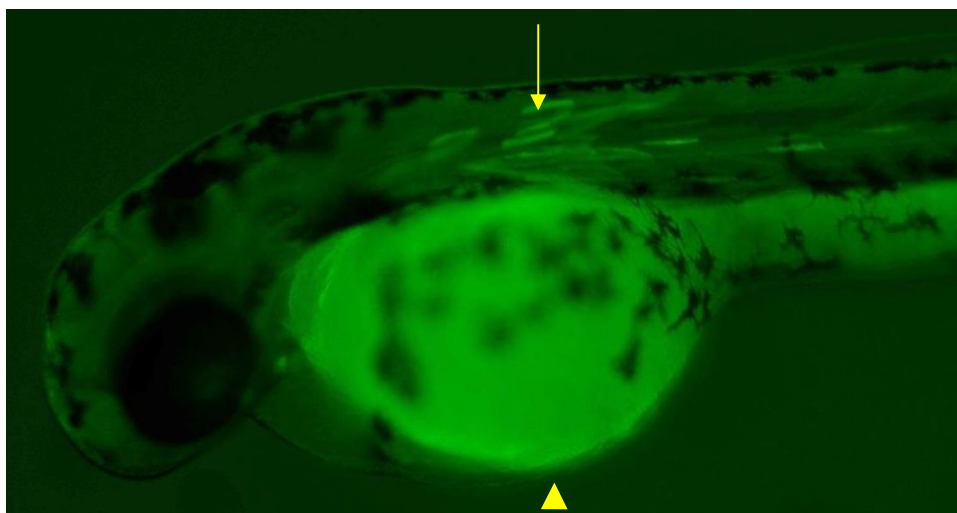


Abb. 22: GFP Expression in der Skelettmuskulatur: Der Pfeil zeigt auf einzelne durch GFP signalgebende Fasern der Skelettmuskulatur. Dort wird FHL 1 transkribiert und translatiert. Der Pfeilkopf zeigt die Fluoreszenz des Dotters, welche jedoch nicht durch eine GFP Expression hervorgerufen wird.

Die so vorselektierten 230 Fische wurden unter standardisierten Bedingungen in die Aufzucht gegeben und bis zum Alter von drei Monaten großgezogen. Sie hatten dann das geschlechtsreife Alter für Testverpaarungen mit Wildtypen erreicht. Für jede der drei Mutationen von FHL1 - H123Y, C132F sowie C224W und für den Wildtyp FHL 1 wt wurde dieses Verfahren angewendet. Die potentiell transgenen Fische wurden zur Identifikation mit Wildtyp Tieren verpaart. Hatte einer der Zebrafische die Mutation in die Keimbahn integriert (Founder), gab er sie an seine

Nachkommen weiter. Diese generierten auch ein GFP-Signal. Dieses war im Vergleich zu den vorselektierten Fischen stärker und auch homogener ausgeprägt. Vor allem die Herzmuskulatur zeigte eine deutliche Expression (Abb. 23).

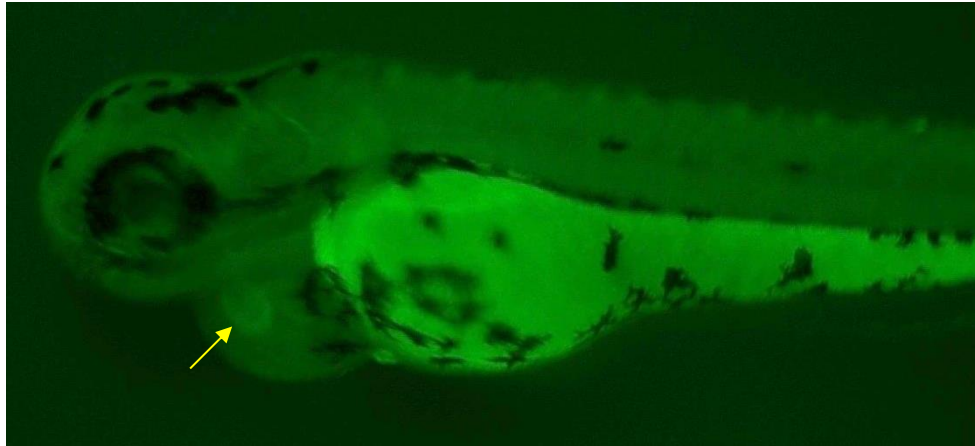


Abb. 23: GFP Expression bei Founder Nachkommen: Homogenes schwaches Signal der Skelettmuskulatur und deutliches Signal der Herzmuskulatur (Pfeil).

Zum jetzigen Stand der Verpaarungen konnte bereits erfolgreich ein Founder identifiziert werden (Tabelle 3). Weitere Verpaarungen sollten demnach noch zur Identifikation weiterer Founder führen.

Tab. 3: Founder nach Testverpaarungen: Die Tabelle zeigt die Ergebnisse nach allen Testverpaarungen, aufgeschlüsselt nach den einzelnen Mutationen.

	FHL 1 wt	FHL 1 H123Y	FHL 1 C132F	FHL 1 C224W
Fische gesamt	20	120	80	10
Bisher identifizierte Founder	0/20	1/120	0/80	0/10

4 Diskussion

4.1 Funktionen und Expressionsmuster von FHL 1

Eines der Kandidatengene für Myofibrilläre Myopathien ist FHL 1. Genmutationen von FHL 1 wurden als pathogen und krankheitsverursachend beschrieben (Schessl et al., 2008b, 2009; Schoser et al., 2009). FHL 1 ist auch an der Entstehung der Hypertrophen Kardiomyopathie beteiligt (Friedrich et al., 2012). Für zukünftige Untersuchungen, Forschungsansätze und weitere Möglichkeiten der Krankheitsentschlüsselung der Myofibrillären Myopathien sollten grundlegende Forschungserkenntnisse über das FHL 1 Protein durch Analysen am Zebrafisch erbracht werden. Das Expressionsmuster der FHL 1 Orthologe im Zebrafisch weiter zu analysieren und darzustellen war Teil dieser Arbeit. Der Zebrafisch dient als geeignetes Forschungsmodell, da er über eine schnelle und extrauterine Embryonalentwicklung verfügt. Die Oozyten sind zugänglich und groß genug für Injektionen. Außerdem sind die Embryonen transparent und lassen sich gut auf vorliegende Strukturdefekte untersuchen. Durch seine genetische Manipulierbarkeit eignet sich der Zebrafisch für den vorliegenden Forschungsansatz sehr gut.

Anhand FHL 1 *Knockdown* durch Morpholino Injektionen und anschließende Auswertungen des Phänotyps konnte die Funktion der FHL 1 Gene dargestellt werden. Bei FHL1a stand die Beeinträchtigung der Herzfunktion im Mittelpunkt. Es kam zu Pumpfehlfunktionen des Atriums und des Ventrikels. Diese waren sowohl durch Vorhofflimmern als auch durch kurze Asystolien gekennzeichnet. Auch die Herzfrequenz war herabgesetzt. Durch die eingeschränkte Kontraktilität des Herzens und der Blutstase vor dem Atrium kam es im Laufe der Entwicklung zu einem Perikardödem. Dieses war häufiger und ausgeprägter als bei den FHL1b Morphanten. In einer vorangegangenen Arbeit hatte sich herausgestellt, dass FHL1a für die Entwicklung der Herzkammern essentiell ist. Darin wurde dargestellt, dass FHL1a die Größe der Herzkammer über die Anzahl der Myozyten reguliert (Xie H., 2013). Auch ist eine veränderte Expression von FHL 1 im Ventrikel bei Mäusen mit dilatativer Kardiomyopathie dokumentiert, welche eventuell zu deren Herzversagen führen könnte (Po-Hsien Chu et al., 2000; Sheikh et al., 2008). Es zeigte sich jeweils eine starke Assoziation des FHL 1 Verlustes zu der auch in der vorliegenden Arbeit herausgefundenen beeinträchtigten Herzfunktion. Patienten mit Mutati-

onen im FHL 1 Gen zeigen klinisch eine diastolische Dysfunktion (Knoblauch et al., 2010; Windpassinger et al., 2008). Der Phänotyp der FHL1b Morphanten zeichnete sich durch Skelettmuskeldeformitäten und Herzmuskelschwäche aus. Es kam auch zu dem oben beschriebenen Perikardödem, jedoch zeigten FHL1b Morphanten weniger Herzpathologien. Die Skelettmuskeldeformitäten bestanden aus einer starken Schwanzkrümmung, die bei FHL1a weniger stark ausgeprägt war. Dies führte zu einer starken Beeinträchtigung der Skelettmuskelfunktion. Die Embryonen waren sowohl bei FHL1a als auch bei FHL1b nicht in normalem Maße zur Fortbewegung befähigt. Dies zeigte sich in den *touch response* Versuchen. Es kann davon ausgegangen werden, dass FHL 1 für die Skelettfunktion in höchstem Maße wichtig ist. Mausmodelle anderer Forschungsgruppen zeigen, dass eine Hypertrophie des Skelettmuskels mit einer Hochregulation des FHL 1 Transkripts einhergeht (Loughna, Mason, Bayol, & Brownson, 2000; Morgan & Madgwick, 1999). Es ist also in synthetische Prozesse der Muskulatur mit eingebunden.

Durch weitere Analysen konnte der makroskopisch erkennbare Phänotyp auch auf ultrastruktureller Weise sichtbar gemacht werden. Sowohl FHL1a als auch FHL1b waren in Skelettmuskulatur und Myokard in unterschiedlichem Ausprägungsgrad exprimiert. Durch die *In Situ* Hybridisierungen sowie deren histologische Detailanalyse konnte gezeigt werden, dass sich die Lokalisation von FHL1b im Laufe der Entwicklung verändert. In frühen Entwicklungsstadien wurde es in der Skelettmuskulatur exprimiert. Dieses Expressionsmuster passte zu den beobachteten Deformationen der Muskulatur die durch Morpholino Injektionen hervorgerufen wurden. Bei 24 und 48 hpf alten Embryonen erkannte man eine Expression von FHL1b mRNA in den Kiemenbögen. Bei 72 hpf wurde die Lokalisation herzspezifisch und genauer zum Bulbus arteriosus lokalisierbar. Dies ließ sich durch eine histologische Detailanalyse ermitteln. FHL 1 war also nicht nur für die beschriebenen Herzpathologien verantwortlich sondern wurde auch am Ausflusstrakt des Herzens exprimiert. Elektronenmikroskopische Schnittbilder der Skelettmuskulatur von FHL1a Morpholino injizierten Zebrafischen zeigten einen ausgeprägten Strukturverlust und eine Rarifizierung der Myofibrillen. Da FHL 1 beim Menschen in den Z-Banden der Muskulatur lokalisiert ist, passt dieses Bild als strukturelles Korrelat hierzu sehr gut (Schessl et al., 2009). Bei FHL 1 *Knockout* Mäusen kommt es im Vergleich zum Wildtyp bei kardialer Stressstimulation zu einer verringerten Hyper-

trophie- Antwort. (Sheikh et al., 2008). Das zeigt, dass FHL 1 wohl für die Funktionalität der kardialen Strukturen einen essentiellen Faktor darstellt.

4.2 Mutation FHL 1 C224W

Bei den an FHL1opathien erkrankten Patienten wurden durch genetische Charakterisierung krankheitsverursachende Mutationen entschlüsselt. Diese liefern Forschungsansätze für genauere Analysen derselben. Der Fokus dieser Arbeit wurde durch eine enge Kooperation mit klinischen Kollegen (Priv.-Doz. Dr. med. J. Schessl, LMU München) auf die Mutation FHL 1 C224W gelegt.

Da sowohl bei FHL1a als auch bei FHL1b die injizierte mRNA mit der Mutation C224W keinen Rescue der zuvor mit dem entsprechenden Morpholino injizierten Zebrafischembryonen bewirken konnte, war gezeigt, dass das mutierte Protein die ursprüngliche Funktion nicht mehr ausführen konnte. Das entscheidende Ergebnis war, dass bei den Rescue Versuchen mit mRNA der Mutationen keine Senkung der Phänotyp Rate, im Vergleich zu der bloßen Injektion von Morpholino, erreicht wurde. Die geringe Steigerung der Rate an Phänotypen war wahrscheinlich bedingt durch die erhöhte Menge an Injektionsvolumen, da zusätzlich zu dem Morpholino noch mRNA injiziert wurde. Die Ergebnisse deuteten auf einen durch die Mutation hervorgerufenen Funktionsverlust des Proteins hin. Bei den Kontrollinjektionen mit mRNA der Wildtyp Orthologe konnte der Beweis erbracht werden, dass nach dem Ausschalten der FHL1a bzw. FHL1b Proteine, jeweils durch das geeignete Morpholino, die Funktion prinzipiell wieder herstellbar war.

Durch die Überexpressionsexperimente konnte gezeigt werden, dass ein Überschuss an FHL1a C224W und FHL1b C224W durch die Injektion von 335ng/µl und 528ng/µl zu keinem Phänotyp führte. Die Zebrafische entsprachen in ihrem Aussehen den Wildtypen. Es handelte sich demzufolge bei der Mutation nicht um ein *gain of function* oder einen dominant negativen Effekt.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Rescue Experimente und Überexpressionen konnten zusammenfassend zeigen, dass es sich bei der Mutation C224W des FHL1a und FHL1b Proteins beim Zebrafisch um einen Funktionsverlust (*loss of function*) handelte. Durch die starke Homologie der FHL 1 Orthologe zum Menschen können durch die Ergebnisse potentielle Rückschlüsse auf die Mutation

beim Menschen gemacht werden, wobei es sich vermutlich auch um einen Funktionsverlust handelt.

4.3 Transgene Zebrafischlinien

Diese Arbeit hatte als weitere Zielsetzung aus FHL 1 wt, sowie den Mutationen H123Y, C132F und C224W transgene Zebrafischlinien zu generieren. Das dafür verwendete Tol 2 Transposon System zeichnet sich laut Literaturangaben durch eine hohe Transgeneserate aus (Kotani & Kawakami, 2004; Kwan et al., 2007). Diese konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Es ließ sich die prinzipielle Durchführbarkeit des Ansatzes durch Identifikation eines Founders zeigen. Nachfolgende Analysen und Versuchsansätze sind notwendig um weitere Founder zu identifizieren. Bei dem Versuch die Transgeneserate über eine höhere Plasmid- und Transposasekonzentration zu steigern, zeigten sich schon bei jeweils 40ng/μl toxische Wirkungen auf die Embryonen. Also waren hier die Steigerungsmöglichkeiten ausgeschöpft. Die Vollständigkeit der Multiside Gateway Vektoren war durch Sequenzierungen und Testverdaue gewährleistet. Die Mikroinjektionen wurden standardisiert in die Eizelle bei richtigen Druckeinstellungen durchgeführt. Möglicherweise war die Ursache für die geringere Transgeneserate eine schlechte Qualität der mRNA. Diese kann durch zusätzliche Waschschrte gesteigert werden. Nicht verifizierbare Mutationen (z.B. in der Transposase Erkennungssequenz) könnten - bei gleichbleibenden Sequenzierungskontrollen - zu einem Funktionsausfall von Bestandteilen der Multiside Gateway Vektoren geführt haben. Möglicherweise haben die Fische mit der Zeit das transgene Konstrukt wieder durch Abbauprozesse verloren und es kam nie zu einer Keimbahnintegration. Ein weiterer Ansatz ist, dass die mutationstragenden Fische nicht überlebensfähig waren und die transgene Expression bei Ihnen zu letalen Defekten geführt hat.

In zukünftigen Projekten müssen weitere Founder identifiziert werden. Mit den dann zur Verfügung stehenden transgenen Linien sollten bezüglich der typischen Proteinaggregate weitere Untersuchungen im Zebrafisch angestellt und so die MFM weiter verstanden werden. Da sich die Krankheiten beim Menschen zum Teil erst in der Adoleszenz manifestieren, wird das Ergebnis weiterer Forschungen an adulten, mutationstragenden Fischen, interessant ausfallen. Zeigen die adulten Fische zum Beispiel ähnliche klinische Zeichen wie die MFM Patienten, ist ein ent-

ferntes Ziel an ihnen auch Medikamententests durchführen zu können und mögliche Therapieansätze zu etablieren. Würden die transgenen Embryonen aufgrund des starken Phänotyps hierfür nicht lang genug überleben bietet sich ein induzierbares Expressionssystem (z.B. Tet-on Tet-off) als alternative Methode an. Bei einem solchen System wird bei den Zebrafischen bis in die Adoleszenz das Wildtyp Protein exprimiert, erst im gewünschten Entwicklungsalter wird dann per externem Trigger die Translation der Mutation induziert.

2014 wurde für die Muskeldystrophie des Typs Duchenne die Medikamentenwirkung im Zebrafischmodell untersucht. Die Forschungsgruppe untersuchte anhand von Zebrafischmodellen mit rezessiven nonsense Mutationen im Dystrophin Gen verschiedene Medikamente in vivo. Es konnten positive Einflüsse von Fluoxetin (ein selektiver Serotonin Reuptake Inhibitor, SSRI) auf die dystrophen Veränderungen dargestellt werden. Dieser Forschungsansatz könnte auch auf Myofibrilläre Myopathien angewandt werden.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich mit der erweiterten Darstellung von FHL 1 im Zebrafisch. Zu Beginn sollte der Expressionsort der Orthologe FHL1a und FHL1b beschrieben werden. Hierfür wurden In Situ Hybridisierungen sowie deren histologische Schnittbilduntersuchungen angefertigt. Es konnte dargestellt werden, dass beide in Skelettmuskulatur und Myokard in unterschiedlichem Maße ausgeprägt sind. Um daraufhin den Funktionsausfall der FHL 1 Orthologe zu untersuchen, wurden Knockdown Morpholino Injektionen durchgeführt. Funktionelle Analysen an den so injizierten Embryonen zeigen Skelettmuskeldeformitäten sowie Herzmuskelschwäche.

Beim Menschen werden durch verschiedene Mutationen Myofibrilläre Myopathien verursacht. Diese zeichnen sich meist durch progressive Skelettmuskelschwäche mit myokardialer Beteiligung aus. Die Mutation im FHL 1 Protein C224W wurde bei Patienten mit FHL1opathien als krankheitsverursachend identifiziert und sollte in dieser Arbeit im Zebrafisch analysiert werden. Bei Injektionsversuchen konnte sowohl gezeigt werden, dass die Überexpression von FHL 1 C224W keine Auswirkungen auf den Phänotyp hat, als auch, dass mit ihr kein Rescue möglich ist. Es ist somit bewiesen, dass die Mutation FHL 1 C224W beim Zebrafisch einen Funktionsverlust des Proteins auslöst.

Um den Krankheitsverlauf beim Zebrafisch weiter in der Adoleszenz untersuchen zu können, sollten adulte, mutationstragende Zebrafische generiert werden. Hierfür war das Etablieren von transgenen Zebrafischlinien aus FHL 1 wt, sowie den krankheitsverursachenden Mutationen H123Y, C132F und C224W vorgesehen. Über das Tol2 Transposon System wurden potentielle Founder generiert, selektiert, großgezogen und zur Identifikation letztendlich testverpaart. Die Durchführbarkeit der Versuchsreihe ist durch die Identifikation eines Founders erfolgreich gezeigt. Die jedoch seither nicht ausreichende Anzahl verhindert bislang die Generierung der transgenen Linien. Zukünftig sollten hierfür noch weitere Founder identifiziert beziehungsweise generiert werden.

6 Literaturverzeichnis

- 1 Amsterdam, A., & Becker, T. S. (2005). Transgenes as screening tools to probe and manipulate the zebrafish genome. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 234, 255–68.
- 2 Bach, I. (2000). The LIM domain: regulation by association. *Mechanisms of Development*, 91, 5–17.
- 3 Bührdel, J. B., Hirth, S., Kessler, M., Westphal, S., Forster, M., Manta, L., Just, S. (2015). In vivo characterization of human myofibrillar myopathy genes in zebrafish. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 461, 217–23.
- 4 Burggren, W. W., & Pinder, A. W. (1991). Ontogeny of cardiovascular and respiratory physiology in lower vertebrates. *Annual Review of Physiology*, 53, 107–35.
- 5 Chen, J. N., Haffter, P., Odenthal, J., Vogelsang, E., Brand, M., van Eeden, F. J., Nüsslein-Volhard, C. (1996). Mutations affecting the cardiovascular system and other internal organs in zebrafish. *Development (Cambridge, England)*, 123, 293–302.
- 6 Chu, P.-H., & Chen, J. (2011). The novel roles of four and a half LIM proteins 1 and 2 in the cardiovascular system. *Chang Gung Medical Journal*, 34, 127–34.
- 7 Chu, P.-H., Ruiz-Lozano, P., Zhou, Q., Cai, C., & Chen, J. (2000). Expression patterns of FHL/SLIM family members suggest important functional roles in skeletal muscle and cardiovascular system. *Mechanisms of Development*, 95, 259–265.
- 8 Culp, P., Nüsslein-Volhard, C., & Hopkins, N. (1991). High-frequency germ-line transmission of plasmid DNA sequences injected into fertilized zebrafish eggs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 7953–7.
- 9 Deiters, A., & Yoder, J. A. (2006). Conditional transgene and gene targeting methodologies in zebrafish. *Zebrafish*, 3, 415–29.
- 10 Friedrich, F. W., Wilding, B. R., Reischmann, S., Crocini, C., Lang, P., Charron, P., Carrier, L. (2012). Evidence for FHL1 as a novel disease gene for isolated hypertrophic cardiomyopathy. *Human Molecular Genetics*, 21, 3237–54.
- 11 Gibbs, E. M., Horstick, E. J., & Dowling, J. J. (2013). Swimming into prominence: the zebrafish as a valuable tool for studying human myopathies and muscular dystrophies. *The FEBS Journal*, 280, 4187–97.

- 12 Goebel, H. H., Fardeau, M., Olivé, M., & Schröder, R. (2008). 156th ENMC International Workshop: desmin and protein aggregate myopathies, 9-11 November 2007, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscular Disorders: NMD*, 18, 583–92.
- 13 Hayashi, Y. (2013). [Myofibrillar myopaathy]. *Rinshō Shinkeigaku = Clinical Neurology*, 53, 1105–8.
- 14 Hodatsu, A., Konno, T., Hayashi, K., Funada, A., Fujita, T., Nagata, Y., Yamagishi, M. (2014). Compound heterozygosity deteriorates phenotypes of hypertrophic cardiomyopathy with founder MYBPC3 mutation: evidence from patients and zebrafish models. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 307, H1594–604.
- 15 Janning, Wilfried; Knust, Elisabeth: Genetik. - 2. Aufl. - Stuttgart : Thieme, 2008. - S. 450
- 16 Kawakami, K. (2005). Transposon tools and methods in zebrafish. *Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 234, 244–54.
- 17 Kayvanpour, E. (2011). Charakterisierung von FHL1 im Zebrafisch, 1–96.
- 18 Kloos, W., Katus, H. A., & Meder, B. (2012). Genetic cardiomyopathies. Lessons learned from humans, mice, and zebrafish. *Herz*, 37, 612–7.
- 19 Knoblauch, H., Geier, C., Adams, S., Budde, B., Rudolph, A., Zacharias, U., Spuler, S. (2010). Contractures and hypertrophic cardiomyopathy in a novel FHL1 mutation. *Annals of Neurology*, 67, 136–40.
- 20 Kotani, T., & Kawakami, K. (2004). [The transposon-mediated gene trap method in Zebrafish]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso. Protein, Nucleic Acid, Enzyme*, 49, 2111–6.
- 21 Kwan, K. M., Fujimoto, E., Grabher, C., Mangum, B. D., Hardy, M. E., Campbell, D. S., Chien, C.-B. (2007). The Tol2kit: a multisite gateway-based construction kit for Tol2 transposon transgenesis constructs. *Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 236, 3088–99.
- 22 Linney, E., Hardison, N. L., Lonze, B. E., Lyons, S., & DiNapoli, L. (1999). Transgene expression in zebrafish: A comparison of retroviral-vector and DNA-injection approaches. *Developmental Biology*, 213, 207–16.
- 23 Loughna, P. T., Mason, P., Bayol, S., & Brownson, C. (2000). The LIM-domain protein FHL1 (SLIM 1) exhibits functional regulation in skeletal muscle. *Molecular Cell Biology Research Communications : MCBRC*, 3, 136–40.
- 24 McGrath, M. J., Cottle, D. L., Nguyen, M.-A., Dyson, J. M., Coghill, I. D., Robinson, P. a, Brown, S. (2006). Four and a half LIM protein 1 binds myosin-

- binding protein C and regulates myosin filament formation and sarcomere assembly. *The Journal of Biological Chemistry*, 281, 7666–83.
- 25 Morgan, M. J., & Madgwick, a J. (1999). The LIM proteins FHL1 and FHL3 are expressed differently in skeletal muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 255, 245–50.
 - 26 Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology (Reading, Mass.)*, 24, 263–273.
 - 27 Newman, M., & Lardelli, M. (2010). A hyperactive sleeping beauty transposase enhances transgenesis in zebrafish embryos. *BMC Research Notes*, 3, 282.
 - 28 Ng, E. K., Lee, S. M., Li, H. Y., Ngai, S. M., Tsui, S. K., Waye, M. M., Fung, K. P. (2001). Characterization of tissue-specific LIM domain protein (FHL1C) which is an alternatively spliced isoform of a human LIM-only protein (FHL1). *Journal of Cellular Biochemistry*, 82, 1–10.
 - 29 Sambrook, J. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* / J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis - Details - Trove.
 - 30 Schessl, J., Taratuto, A. L., Sewry, C., Battini, R., Chin, S. S., Maiti, B., Bönnemann, C. G. (2009). Clinical, histological and genetic characterization of reducing body myopathy caused by mutations in FHL1. *Brain: A Journal of Neurology*, 132 (Pt 2), 452–64.
 - 31 Schessl, J., Zou, Y., Mcgrath, M. J., Cowling, B. S., Maiti, B., Chin, S. S., Bönnemann, C. G. (2008a). Proteomic identification of FHL1 as the protein mutated in human reducing body myopathy. *Journal of Clinical Investigation*, 118.
 - 32 Schessl, J., Zou, Y., Mcgrath, M. J., Cowling, B. S., Maiti, B., Chin, S. S., Bönnemann, C. G. (2008b). Proteomic identification of FHL1 as the protein mutated in human reducing body myopathy, 118.
 - 33 Schoser, B., Goebel, H. H., Janisch, I., Quasthoff, S., Rother, J., Bergmann, M., Windpassinger, C. (2009). Consequences of mutations within the C terminus of the FHL1 gene. *Neurology*, 73, 543–51.
 - 34 Schröder, R., Kunz, W. S., Rouan, F., Pfendner, E., Tolksdorf, K., Kappes-Horn, K., Rolfs, A. (2002). Disorganization of the desmin cytoskeleton and mitochondrial dysfunction in plectin-related epidermolysis bullosa simplex with muscular dystrophy. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 61, 520–30.
 - 35 Selcen, D., & Engel, A. G. (2004). Mutations in myotilin cause myofibrillar myopathy. *Neurology*, 62, 1363–71.
 - 36 Selcen, D., & Engel, A. G. (2005). Mutations in ZASP define a novel form of muscular dystrophy in humans. *Annals of Neurology*, 57, 269–76.

- 37 Sheikh, F., Raskin, A., Chu, P., Lange, S., Domenighetti, A. A., Zheng, M., Chen, J. (2008). An FHL1-containing complex within the cardiomyocyte sarcomere mediates hypertrophic biomechanical stress responses in mice.
- 38 Stainier, D. Y., Lee, R. K., & Fishman, M. C. (1993). Cardiovascular development in the zebrafish. I. Myocardial fate map and heart tube formation. *Development (Cambridge, England)*, 119, 31–40.
- 39 Suster, M. L., Sumiyama, K., & Kawakami, K. (2009). Transposon-mediated BAC transgenesis in zebrafish and mice. *BMC Genomics*, 10, 477.
- 40 Teh, C., Parinov, S., & Korzh, V. (2005). New ways to admire zebrafish: progress in functional genomics research methodology. *BioTechniques*, 38, 897–906.
- 41 Udvardia, A. J., & Linney, E. (2003). Windows into development: historic, current, and future perspectives on transgenic zebrafish. *Developmental Biology*, 256, 1–17.
- 42 Vorgerd, M., van der Ven, P. F. M., Bruchertseifer, V., Löwe, T., Kley, R. a, Schröder, R., Huebner, A. (2005). A mutation in the dimerization domain of filamin c causes a novel type of autosomal dominant myofibrillar myopathy. *American Journal of Human Genetics*, 77, 297–304.
- 43 Waugh, T. A., Horstick, E., Hur, J., Jackson, S. W., Davidson, A. E., Li, X., & Dowling, J. J. (2014). Fluoxetine prevents dystrophic changes in a zebrafish model of Duchenne muscular dystrophy. *Human Molecular Genetics*, 23, 4651–62.
- 44 Westerfield. (1993). The Zebrafish Book. Retrieved September 7, 2013, from http://zfin.org/zf_info/zfbook/zfbk.html
- 45 Windpassinger, C., Schoser, B., Straub, V., Hochmeister, S., Noor, A., Lohberger, B., Quasthoff, S. (2008). An X-linked myopathy with postural muscle atrophy and generalized hypertrophy, termed XMPMA, is caused by mutations in FHL1. *American Journal of Human Genetics*, 82, 88–99.
- 46 Xie H., W. X. (2013). The LIM Protein fh1A is essential for Heart Chamber Development in Zebrafish Embryos. Retrieved April 25, 2014

Anhang

Aminosäuren-Einbuchstabencode

Cystein	Cys	C
Histidin	His	H
Phenylalanin	Phe	F
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y

Aminosäuren-Codesonne

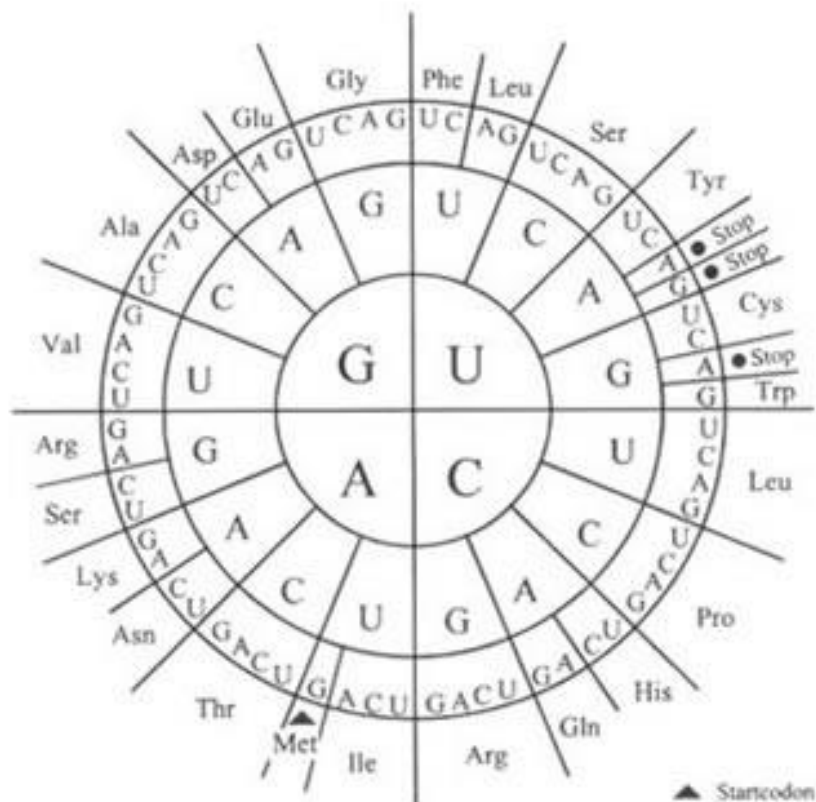


Abb. 24: Aminosäuren-Codesonne

http://www.bioclip.de/content/01_moleklargen/image/gencode-img2.jpg (15.05.2014)

Tierschutzantrag

Tierschutzantrag und Verlängerungsantrag liegen mit Genehmigung vor, sie wurden aus Datenschutzgründen entfernt.

Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abbildung 1: Schematische Darstellung der FHL Domänen	2
Abbildung 2: Adulter Zebrafisch	4
Abbildung 3: Stadien der Zebrafischentwicklung	5
Abbildung 4: Alignment von FHL 1	32
Abbildung 5: <i>In Situ</i> Hybridisierung FHL1b	34
Abbildung 6: Histologie, FHL1b <i>In Situ</i> 72 hpf	36
Abbildung 7: FHL1a Morpholino Injektionsrate	37
Abbildung 8: FHL1a <i>knockdown</i> 48 hpf	38
Abbildung 9: FHL1a <i>knockdown</i> 72 hpf	38
Abbildung 10: FHL1b Morpholino Injektionsrate	39
Abbildung 11: FHL1b <i>knockdown</i> 48 hpf	40
Abbildung 12: FHL1b <i>knockdown</i> 72 hpf	40
Abbildung 13: Herzfrequenz der Morphanten im Vergleich zum Wildtyp	41
Abbildung 14: Zebrafisch, Elektronenmikroskopische Bilder 72 hpf	43
Abbildung 15: Überexpression FHL1a C224W	45
Abbildung 16: Überexpression FHL1b C224W	45
Abbildung 17: Überexpressionsanalyse FHL1a C224W 72 hpf	46
Abbildung 18: Rescue FHL1a C224W	47
Abbildung 19: Rescue FHL1b C224W	48
Abbildung 20: Vereinfachter Multiside Vektor	49
Abbildung 21: GFP Expression in der Herzmuskulatur	50

	Seite
Abbildung 22: GFP Expression in der Skelettmuskulatur	50
Abbildung 23: GFP Expression bei Founder Nachkommen	51
Abbildung 24: Aminosäuren-Codesonne	64

Tabellenverzeichnis

	Seite
Tabelle 1: Trenngel Western Blot	21
Tabelle 2: Sammelgel Western Blot	21
Tabelle 3: Founder nach Testverpaarungen	51