Universitätsklinikum Ulm, Klinik für Innere Medizin II

Prof. Dr. med. Wolfgang Rottbauer

Generierung eines CRISPR/Cas9-Knockouts des Kardiomyopathie-Gens Nexilin im Zebrafisch und Untersuchungen zu Nexilin-Interaktoren

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

Magdalena Huber

Landau an der Isar

2020

amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Steffen Just

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Karin Danzer

Tag der Promotion: 15.07.2021

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis III

1. Einleitung 1

1.1 Kardiomyopathien 1

1.1.1 Hypertrophe Kardiomyopathie 1

1.1.2 Dilatative Kardiomyopathie 2

1.2 Zebrafisch als Modellorganismus 4

1.3 Das Genmodifikationssystem CRISPR/Cas9 5

1.4 Nexilin 9

1.4.1 Allgemeine Informationen 9

1.4.2 Klinische Aspekte in Mensch und Tier 10

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit 12

2. Material und Methoden 13

2.1 Material 13

2.2 Methoden 28

3. Ergebnisse 41

3.1 Generierung einer stabilen Nexilin-Knockout-Zebrafischlinie mittels CRISPR/Cas9 41

3.1.1 Erzeugung der F_0- und F_1-Generation durch Mikroinjektion und anschließendem Auskreuzen mit Wildtypen 41

3.1.2 Charakterisierung der Fischlinie mit induzierter 32 Basenpaar-Deletion in Exon 2 von Nexilin 43

3.1.3 Charakterisierung der Fischlinie mit induzierter 5 Basenpaar-Deletion in Exon 7 von Nexilin 50

3.1.4 Zusammenfassende Betrachtung 55

3.2 Transgene Nexilin-Fischlinie 56

3.2.1 Klonierung eines Transgenese-Vektors, Injektion ins Ein-Zell-Stadium und weitere Vorgehensweise 56

3.2.2 Schwierigkeiten bei der Generierung einer transgenen Nexilin-Zebrafischlinie 57

3.3 Interaktion von Nexilin mit anderen Proteinen in der Zellkultur 59

3.3.1 Interaktion von Nexilin mit dem Aktinzytoskelett 59

3.3.2 Validierung potenzieller Nexilin-Interaktionspartner im Zellkultursystem 63

4. Diskussion 68

4.1 Nexilin-Knockout-Fischlinie 68

4.1.1 Unterschiedliche Phänotypen nach Knockout und entsprechendem Knockdown als bekanntes Phänomen 69

4.1.2 Erklärungsansätze für fehlenden Phänotyp von mutanten Zebrafischen 70

4.1.3 Missinterpretation eines Phänotyps durch Knockdown-Off-Target-Effekte als mögliche Ursache der beschriebenen Diskrepanz 73

4.1.4 Zusammenfassende Beurteilung für die hier generierte Nexilin-Knockout-Zebrafischlinien und Ausblick 74

4.2 Potenziell toxische Effekte von Nexilin bei der Generierung einer transgenen Nexilin-Fischlinie 75

4.3 Verifikation der bekannten Interaktion mit Aktin und Ermittlung unbekannter Interaktionspartner von Nexilin in der Zellkultur 77

4.4 Schlussfolgerung und Ausblick 80

5. Zusammenfassung 81

6. Literaturverzeichnis 83

Danksagung 94

Lebenslauf 95

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABD	Aktin-bindende Domäne
ABP1	Auxin-binding protein 1
AID	aktivierungsinduzierte Cytidin-Desaminase
ARVC	Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy)
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
Cas	CRISPR assoziiert (CRISPR associated)
CC	Coiled-coil-Region
cDNA	Copy-Desoxyribonukleinsäure
CoIP	Koimmunpräzipitation
CRISPR(i)	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (interference)
crRNA	CRISPR-RNA
CTNNBL1	Catenin beta like protein 1
DAPI	4', 6-Diamidin-2-phenylindol
DCM	Dilatative Kardiomyopathie (dilated cardiomyopathy)
ddH_20	zweifach destilliertes H_2O
del	Deletion
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Didesoxynukleosid-5'-triphosphat

DSB	Doppelstrangbruch
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFL7	EGF-like domain multiple 7
(E)GFP	(verbessertes) grün fluoreszierendes Protein ((enhanced) green fluorescent protein)
EKG	Elektrokardiographie
ESC	European Society of Cardiology
FCS	Fetales Kälberserum (fetal calf serum)
Fmr1	Fragile-X-Mental-Retardation-Protein 1
GID1	Gibberellin-insensitive dwarf 1
gRNA	guide-RNA
HCM	Hypertrophe Kardiomyopathie (hypertrophic cardiomyopathy)
hpf	Stunden nach Befruchtung (hours post fertilization)
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)
ICD	implantierbarer Kardioverter-Defibrillator
IF	Immunfluoreszenz
IGcam	Immunglobulin-Zelladhäsionsmolekül (immunoglobulin-type cell adhesion molecule)
InX	In-Cross, Verpaarung von Fischen einer Linie untereinander
kb	Kilobasen
KHK	Koronare Herzkrankheit

LB	Lysogeny broth, Bakteriennährmedium
MO	Morpholino modifiziertes antisense-Oligonukleotid
mRNA	Messenger-RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OutX	Auskreuzen (Out-Cross), Verpaarung einer Fischlinie mit einer WT-Linie
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
Pak4	P21-aktivierte Kinase 4
PAM	dem Protospacer benachbartes Motiv (protospacer-adjacent motif)
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PrP(c)	(zelluläres) Prion-Protein
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RCM	Restriktive Kardiomyophathie (restrictive cardiomyopathy)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
SDS	Natriumlaurylsulfat
siRNA	small interfering RNA
SPRN	Shadow of prion protein
TALEN	Transcription activator-like effector nuclease
TBE	Tris-Borat-EDTA
Tris	2-Amino-2(hydroxymethyl)-1,3-propanediol

UV	ultraviolett
WT	Wildtyp
ZFIN	Zebrafish Information Network

1. Einleitung

1.1 Kardiomyopathien

Der Begriff Kardiomyopathie umfasst eine heterogene Gruppe verschiedener Erkrankungen des Myokards. Sah man Kardiomyopathien zunächst als Herzmuskelerkrankungen unbekannter Ursache an, sind heute zahlreiche Ätiologien und Pathomechanismen bekannt. Die European Society of Cardiology (ESC) definiert Kardiomyopathien als Erkrankungen, „bei denen der Herzmuskel strukturelle und funktionelle Abnormitäten aufweist, die sich nicht durch eine koronare Herzerkrankung, Hochdruck, eine Herzklappenerkrankung oder kongenitale Herzerkrankung erklären lassen“ [55]. Die Krankheitsgruppe der Kardiomyopathien lässt sich nach der ESC anhand der klinischen Präsentation von Morphologie und Funktion in folgende fünf Typen gliedern: Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM), Dilatative Kardiomyopathie (DCM), Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC), Restriktive Kardiomyopathie (RCM) und nicht-klassifizierbare Kardiomyopathien. Ergänzend werden sie jeweils in die Subtypen familiär und nicht-familiär subklassifiziert. [23]

Nachfolgend werden die Klassen HCM und DCM detaillierter dargestellt. Bei beiden Typen sind familiäre Formen mit Mutationen von Nexilin – dem in dieser Arbeit behandelten Protein – bekannt [36,103].

1.1.1 Hypertrophe Kardiomyopathie

Die Hypertrophe Kardiomyopathie ist gekennzeichnet durch eine Hypertrophie der Herzmuskelzellen mit einer auf das Septum interventriculare betonten Wandverdickung und einem somit verringerten Lumen des linken Ventrikels [23].

In etwa 60 % der Fälle liegt der HCM eine autosomal-dominant vererbte Mutation von Proteinen des Sarkomers, insbesondere der β-Myosin-Schwerkette und des Myosin-bindende Proteins C, zugrunde [87]. Weitere 5-10 % der Fälle sind mit anderen genetischen Syndromen oder Chromosomenaberrationen wie der lysosoma-

len Speicherkrankheit Morbus Fabry [24], dem Noonan-Syndrom [92] oder der neurodegenerativen Friedreich-Ataxie [18] assoziiert. Bei etwa 25-30 % sei die Ursache unbekannt. [22]

Aufgrund der Ventrikelhypertrophie und einer teilweise damit einhergehenden Obstruktion des linksventrikulären Ausflusstraktes können Symptome wie Dyspnoe, Angina pectoris oder Synkopen auftreten. Zudem sind Arrhythmien oder ein plötzlicher Herztod mögliche Folgen der HCM. Die Diagnose wird überwiegend klinisch und bildgebend (vor allem durch MRT und Echokardiographie) gestellt und sollte nur in Zweifelsfällen mittels Myokardbiopsie gesichert werden. Wichtige Parameter stellen die diastolische (Dys-) Funktion, die Größe des linken Atriums sowie das Vorliegen einer Obstruktion des linksventrikulären Ausflusstraktes dar. Zusätzlich können EKG-Veränderungen oder Arrhythmien beobachtet werden. Ohne ausreichende Erklärung durch nicht-genetische Ursachen kann eine genetische Testung indiziert sein. Die Therapie der HCM erfolgt momentan lediglich symptomatisch mit Vermeidung schwerer körperlicher Belastung und Therapie der Herzinsuffizienz entsprechend den gültigen Leitlinien. Teilweise können interventionelle Therapieansätze sowie ein implantierbarer Defibrillator (ICD) indiziert sein. Bei schweren Verläufen oder Versagen der medikamentösen Therapie kann eine Herztransplantation in Erwägung gezogen werden. [22] Einer Studie zufolge beträgt die 10-Jahres-Überlebensrate 80,3 % mit einem jährlichen Risiko eines Plötzlichen Herztodes von etwa 1 % [21].

1.1.2 Dilatative Kardiomyopathie

Charakteristisch für eine Dilatative Kardiomyopathie ist eine Dilatation und relative Wandverdünnung des linken Ventrikels (und teilweise des rechten Ventrikels) sowie einer damit einhergehenden systolischen Dysfunktion [23].

In bis zu 30-35 % der Fälle liegt Schätzungen zufolge eine familiäre Form mit überwiegend autosomal dominantem Erbgang vor [33,76]. Mittlerweile wurden Mutationen in über 40 Genen als Ursache identifiziert. Betroffen sind unter anderem Proteine des Zytoskeletts beziehungsweise der Sarko-/Costamere wie beispielsweise Dystrophin [79,98], Titin [31] und Aktin [83]. Mutationen der

β-Myosin-Schwerkette [37,54] oder dem Myosin-bindenden Protein C [37] können neben einer HCM auch eine DCM zur Folge haben. Als nicht-genetische Ursache einer DCM werden vor allem Myokarditiden insbesondere viraler Genese, autoimmune Prozesse, Medikamenten- oder Alkohol-assoziierte Toxizität, Eisenüberladung bei Hämochromatose oder eine Schwangerschaft (als peripartale Kardiomyopathie) in Betracht gezogen [23].

Infolge der Linksherzinsuffizienz aufgrund der systolischen Dysfunktion sind Belastungsdyspnoe und Organ-Minderperfusionen mögliche klinische Symptome. Die verminderte kardiale Kontraktionsfähigkeit und assoziierte Arrhythmien können zudem thrombembolische Ereignisse begünstigen. Die Diagnose wird überwiegend bildgebend (Echokardiographie oder MRT) bei verminderter linksventrikulärer Kontraktionsfähigkeit in Kombination mit einem erhöhten enddiastolischen linksventrikulären Durchmesser gestellt. Des Weiteren können Myokardbiopsien, die Suche nach Autoantikörpern gegen kardiale Antigene oder ein EKG indiziert sein. [10,74,75,86] Die Therapie der DCM orientiert sich teilweise an der Ätiologie. So kann bei einer DCM nach viraler Myokarditis oder bei nachgewiesenen Autoantikörpern eine kausale Therapie versucht werden. Bei Versagen dieser beziehungsweise bei anderer Genese bleibt lediglich eine symptomatische Behandlung mit entsprechender Therapie der Herzinsuffizienz. Zudem können bei Rhythmusstörungen Antiarrhythmika, ein ICD oder Herzschrittmacher sowie eine prophylaktische Antikoagulation indiziert sein. Wie auch bei der HCM gilt als Ultima Ratio in schweren Fällen die Herztransplantation. [10,74] Die 5-Jahres-Überlebensrate wird mit etwa 54 % angegeben, wobei insbesondere das Ausmaß der Linksherzinsuffizienz als negativer Prädiktor identifiziert wurde [76].

Aufgrund noch bestehender Unklarheiten bezüglich zugrundeliegender Pathomechanismen sowie Therapiemöglichkeiten von Kardiomyopathien bedarf es weiterer Forschung. Hilfreich kann dabei der Vergleich mit Tiermodellen wie dem Zebrafisch sein.

1.2 Zebrafisch als Modellorganismus

Der meist als Zebrafisch bezeichnete Zebrabärbling (*Danio rerio*) ist ein häufig verwendeter Modellorganismus. Der 4-5 cm große Süßwasserfisch gehört zur Familie der Karpfenfische (*Cyprinidae*) und ist in tropischen Gewässern Asiens beheimatet. Seine geringen Umweltansprüche machen eine Haltung relativ einfach [104]. Nach Erreichen der Geschlechtsreife nach etwa zwei bis drei Monaten kann das Weibchen bis zu 300 Eier pro Woche legen. Innerhalb weniger Stunden bis Tage entwickeln sich daraus *ex utero* transparente Larven, die ihren Sauerstoffbedarf in den ersten Tagen durch bloße Diffusion decken können [94]. Aufgrund dieser temporären Unabhängigkeit von einem funktionierenden Kreislauf lassen sich beim Zebrafisch essenzielle Gene und Proteine der Herz-Kreislauffunktion untersuchen. Zudem findet der Zebrafisch Verwendung in der Tumor-, Infektions- oder Regenerationsforschung sowie der Entwicklung von Pharmaka [64]. Im mittlerweile vollständig sequenzierten Genom des Zebrafisches findet sich für rund 70 % der humanen Gene mindestens eine orthologe Sequenz [38]. Dies erlaubt eine gewisse Übertragbarkeit der Erkenntnisse vom Modellorganismus auf den Menschen.

Das Genom des Zebrafisches lässt sich relativ leicht genetisch modifizieren und eignet sich deshalb für sogenannte *forward-* und *reverse-genetics*-Strategien. Das *forward-genetics*-Vorgehen charakterisiert sich durch eine zunächst unspezifische Mutagenese beispielsweise durch die chemische Substanz 1-Ethyl-1-Nitrosoharnstoff (ENU) [34] und einer nachfolgenden Isolierung und Charakterisierung der entstandenen mutanten Fischlinien. Das Grundprinzip ist hier also die Suche der ursächlichen Mutation eines vorhandenen Phänotyps. Demgegenüber zeichnet die *reverse-genetics*-Vorgehensweise eine zunächst spezifische Veränderung eines gewünschten Gens aus. In einem nächsten Schritt werden dann die Auswirkungen dieser Knockdowns, Knockouts oder Knockins beobachtet. Es können also gezielt potenzielle Genkandidaten für humane Erkrankungen verändert und deren Effekte beobachtet werden. [64]

1.3 Das Genmodifikationssystem CRISPR/Cas9

Zur effektiven Nutzung des Zebrafisches in der Forschung bedarf es also Systemen, die eine gezielte Modifikation der Genexpression gewährleisten. Eine etablierte Methode zum Knockdown stellt die Injektion von Morpholino-Antisense-Oligonukleotiden dar [80,85]. Zum Knockout werden insbesondere ZFN (*Zincfinger-nucleases*) [16], TALEN (*Transcription activator-like effector nucleases*) [41] und wie in dieser Arbeit CRISPR/Cas9 genutzt.

CRISPR/Cas-Systeme sind Teil der Immunität von Bakterien und Archeen [3,4,69,78]. CRISPR steht dabei für *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, also in Clustern auftretende, regelhaft durch kurze Abschnitte unterbrochene, palindromische Sequenzwiederholungen (siehe Abb. 1). Als Cas werden CRISPR-assoziierte Gene und deren Produkte bezeichnet [48].

In Bakterien und Archeen kommen solche Abfolgen von homologen, etwa 30 Basenpaare (bp) langen Nukleotidsequenzen und dazwischenliegenden nicht-homologen Sequenzen im Genom regelhaft vor [32,45,47]. Die intermittierenden, nicht-homologen Sequenzen, die sogenannten *Spacer*, sind dabei beispielsweise identisch zu Gensequenzen von Bakteriophagen oder Plasmiden [4,78]. Durch die Integration fremder DNA-Sequenzen etwa viralen Ursprungs ins Bakteriengenom wird der Zelle eine gewisse Resistenz gegen eine Infektion des jeweiligen Virus verliehen [3,4,78]. Die Degradierung der fremden Nukleinsäuren wird dabei durch die CRISPR-assoziierten Enzyme (Cas) katalysiert [3,68,69]. Nach einer Klassifikation von Makarova *et al*. werden drei CRISPR/Cas-Typen unterschieden, wobei Typ II mit Cas9 lediglich ein essenzielles Cas-Enzym benötigt [70]. Basierend auf dem nachfolgend erläuterten Mechanismus wurde die Methode CRISPR/Cas9 zur Genmodifikation entwickelt.

Das Transkript eines CRISPR-Abschnittes wird zunächst in sogenannte CRISPR-RNAs (crRNA) geschnitten, die jeweils aus einer *Spacer*-Region und der angrenzenden *Repeat*-Sequenz bestehen. Eine sogenannte *trans-activating* CRISPR-RNA (tracrRNA) bindet über einen zur *Repeat*-Sequenz komplementären Abschnitt an die crRNA. Beide zusammen wiederum bilden einen Komplex mit Cas9. [14] In diesem Komplex kann Cas9 einen Doppelstrangbruch in der fremden

Ziel-DNA im Bereich der zur *Spacer*-Region komplementären Sequenz, dem sogenannten *Protospacer*, verursachen und so deren Degradierung bewirken [28]. Essenziell für die Bindung des Komplexes an die Ziel-DNA ist dabei eine an den *Protospacer* angrenzende PAM-Sequenz (= *Protospacer-adjacent motif*) [77]. Diese PAM-Sequenz besteht aus wenigen Nukleotiden und dient vermutlich der Entwindung und Stabilisierung des Ziel-DNA-Doppelstrangs sowie der Differenzierung zwischen Ziel-DNA und CRISPR-Lokus [29,51].

Für die Verwendung des CRISPR/Cas9-Systems in der Forschung ist das Vorhandensein einer PAM-Sequenz an der gewünschten Zielsequenz die einzige primäre Anforderung [50,77]. Mit Hilfe einer spezifisch entworfenen crRNA (in Kombination mit einer Standard-tracrRNA) oder gRNA (als Kombination aus crRNA und tracrRNA) wird die Zielregion gebunden [11,29,51,52]. Die ebenfalls als mRNA oder bereits als Protein zugegebene Cas9 führt dann zu einem Doppelstrangbruch in der gewünschten *Protospacer*-Sequenz [51]. Abb. 1 zeigt die eben erläuterte Funktionsweise der CRISPR/Cas9-Methode.

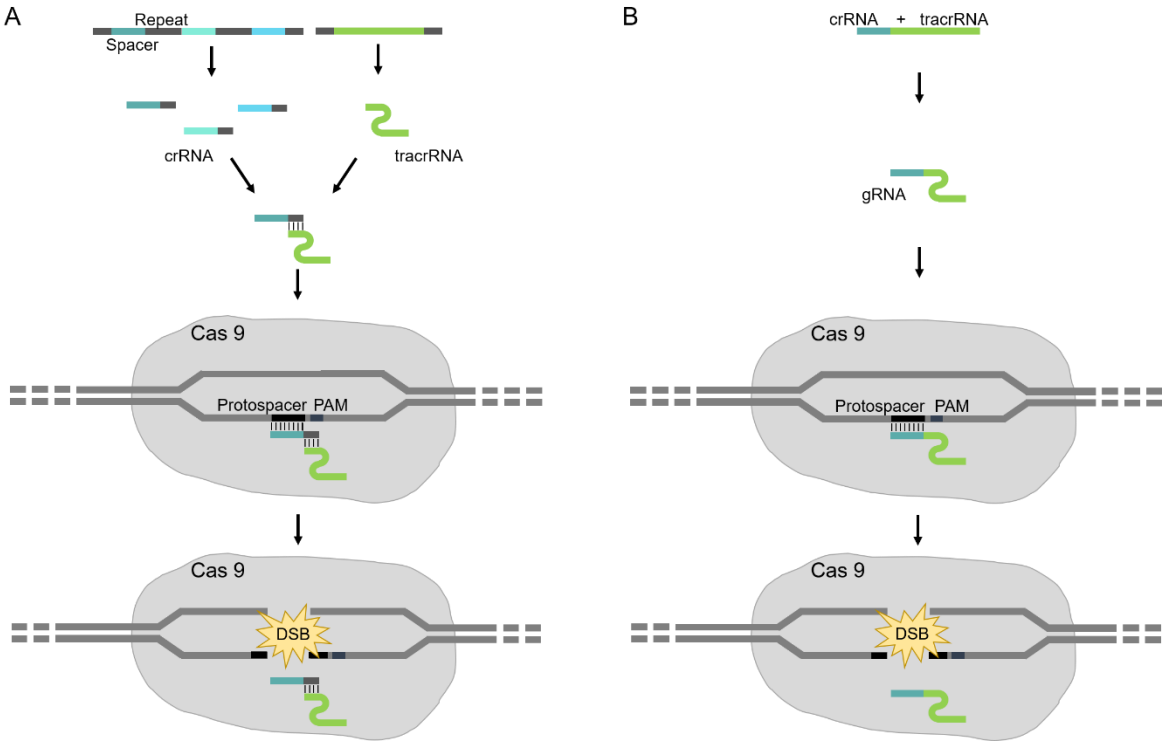

Abb. 1: Funktionsweise der *Genome-Editing* Methode CRISRP/Cas9 nach Vorbild des Bakteriums *Streptococcus pyogenes*. Das Transkript der CRISPR-Region (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat*) wird in verschiedene crRNA (CRISPR-RNA), jeweils bestehend aus einer integrierten Genomsequenz (*Spacer*) und einer Wiederholungssequenz (*Repeat*) geschnitten. crRNA und tracrRNA (*trans-activating* CRISPR RNA) bilden gemeinsam mit dem Cas9-Protein (*CRISPR associated protein 9*) einen Komplex. Dieser bindet über die *Spacer*-Sequenz der crRNA die *Protospacer*-Region der Ziel-DNA angrenzend an die obligat vorhandene PAM-Sequenz (*protospacer adjacent motif*). Cas9 verursacht schließlich einen DSB (Doppelstrang-bruch) im Bereich der *Protospacer*-Region. Dargestellt ist die Funktionsweise von CRISPR/Cas9 im Bakterium und der analogen Verwendung zur gezielten DNA-Modifikation mittels synthetisch produzierter crRNA und tracrRNA (A). Alternativ kommt eine adaptierte Variante mit einer gRNA (*guide*-RNA) als Fusionsprodukt aus crRNA und tracrRNA zur Anwendung (B). DNA = Desoxyribonkleinsäure. RNA = Ribonukleinsäure. Abbildung angelehnt an [91].

Nach Möglichkeit versucht der Organismus im Anschluss eine Reparatur des entstandenen Doppelstrangbruches (vergleiche Abb. 2). Der überwiegend verwendete Mechanismus der nicht-homologen End-zu-End-Verknüpfung führt zu fehlerhaften neuen Sequenzen und damit zu Mutationen in Form von Insertionen oder Deletionen im Bereich des Bruches [9,11,44].

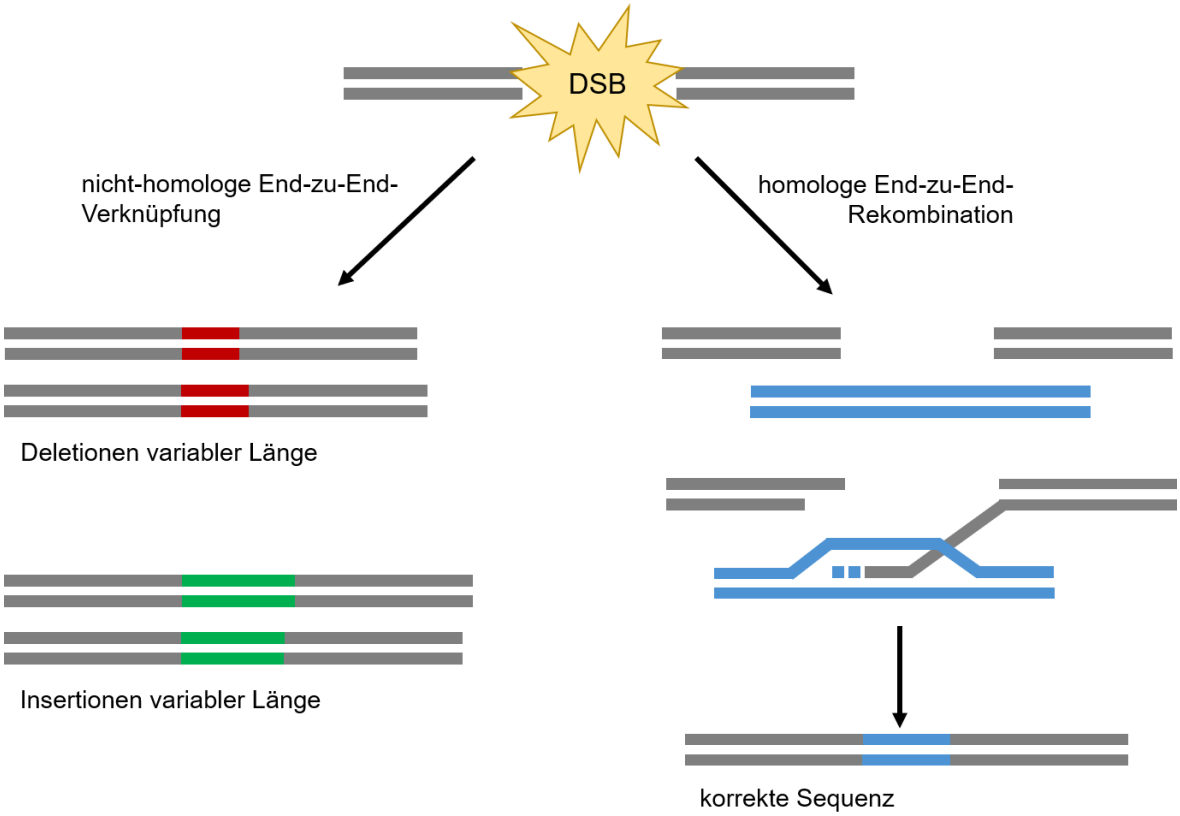

Abb. 2: DNA-Doppelstrangbrüche und anschließende Reparaturmechanismen. DSB (Doppelstrangbrüche), wie sie beispielsweise durch CRISPR/Cas9 verursacht werden (vergleiche Abb. 1), werden über homologe und nicht-homologe End-zu-End-Verknüpfung repariert. Nicht-homologe End-zu-End-Verknüpfung führt aufgrund einer fehlenden homologen Vorlage in der Regel zu kleinen Insertionen (grün) und Deletionen (rot) im Bereich des DSB. Bei der homologen End-zu-End-Rekombination wird eine homologe Sequenz (blau), beispielsweise das Schwester-Chromatid, als Vorlage für eine exakte Reparatur des DSB verwendet. DNA = Desoxyribonukleinsäure. CRISPR = *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat*. Cas = CRISPR assoziiert. Abbildung angelehnt an [91].

CRISPR/Cas9 wird zur Genmodifikation in vielen Modellorganismen und Zellkultursystemen erfolgreich angewendet so beispielsweise in humanen Zelllinien [11,52,72], Bakterien [50], Mäusen [11,93,102] oder Zebrafischen [9,39,44,49]. Insbesondere im Zebrafisch gelingt damit eine effiziente Modifikation der Keimzellen und so eine Transmission der entstandenen Mutation in die Nachkommen [39,43,49]. Diese Methode hat sich in der Forschung vor allem aufgrund der einfachen und kostengünstigen Erzeugung der benötigten gRNA oder crRNA + tracrRNA und der hohen Effizienz durchgesetzt [9,11,39,44]. Durch Zugabe einer spezifischen DNA-Sequenz als Matrize ist zudem die Initiierung der homologen Rekombination mit Integration dieser vorgegebenen Sequenz ins Genom im Bereich des Bruches möglich. Dies erlaubt die gezielte Generierung einer spezifischen Mutation in der Ziel-DNA [43,72,102].

1.4 Nexilin

Wie eingangs beschrieben können Genmutationen und dadurch veränderte Proteine einer Kardiomyopathie ursächlich zugrunde liegen. Eines dieser Gene ist das für das Protein Nexilin codierende Gen NEXN.

1.4.1 Allgemeine Informationen

Nexilin wurde erstmals 1998 von Ohtsuka *et al*. als Aktin-bindendes Protein beschrieben und der Name vom lateinischen Ausdruck *nexilis* (zusammengeknüpft) abgeleitet. Das Protein wurde zunächst mittels F-Aktin-Blotts aus Rattengehirnen und -fibroblasten isoliert und konnte im Anschluss in einer humanen cDNA-Bank identifiziert werden. In Immunfluoreszenzfärbungen einer Rattenzelllinie zeigte sich eine intrazelluläre Lokalisation von Nexilin an Zell-Matrix-Kontakten sowie eine Kolokalisation mit den bekannten Fokal-Kontakt-Proteinen Vinculin, Talin oder Paxillin. Die F-Aktin-bindende und teils quervernetzende Funktion wurde auf zwei Aktin-bindende Domänen (ABD) zurückgeführt. [82]
Als weitere funktionelle Domänen wurden eine C-terminale IGcam (eine Form aus der Immunglobulin-Superfamilie) und eine zwischen den beiden ABDs gelegene *Coiled-Coil-Region* ermittelt [36,82]. RNA-Analysen zeigten eine überwiegende Expression von Nexilin in quergestreifter Skelett- und Herzmuskulatur sowie in glatten Muskelzellen [36,109,110]. Die subzelluläre Lokalisation des Proteins wurde dabei im Bereich der Z-Scheiben der Sarkomere in quergestreifter Muskulatur beziehungsweise den *dense bodies* als deren Pendant in glatter Muskulatur gesehen [36,110]. Jüngste Untersuchungen sehen Nexilin am ehesten als Teil des Verbindungskomplexes zwischen T-Tubuli (eingestülpte Zellmembran) und Sarkoplasmatischem Retikulum [65]. Dieser zentrale Bestandteil der elektro-mechanischen Kopplung liegt in der Herzmuskulatur auf Höhe der Z-Scheiben.

Das Protein Nexilin wird auch im Zebrafisch exprimiert und weist dort eine Übereinstimmung von 73 % mit der humanen Variante auf [36]. Eine schematische Darstellung von Nexilin im Zebrafisch ist in Abb. 3 gezeigt.

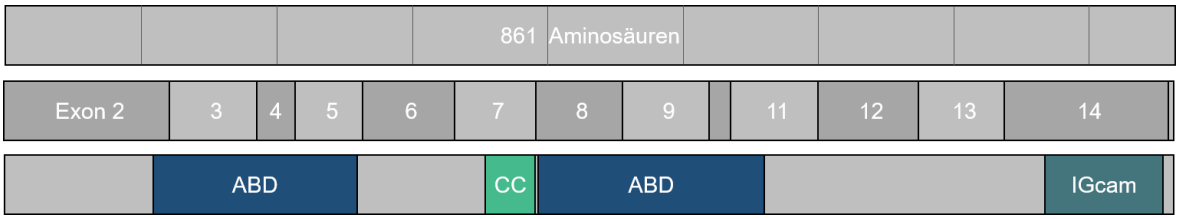

Abb. 3: Das Protein Nexilin im Zebrafisch. Gezeigt ist eine schematische Darstellung des Proteins Nexilin, welches im Zebrafisch eine Länge von 861 Aminosäuren (obere Zeile) und insgesamt 15 Exons (mittlere Zeile) aufweist (wobei der offene Leserahmen mit Exon 2 beginnt). In der unteren Zeile sind die bekannten funktionellen Domänen ABD (Aktin-bindende-Domäne), CC (*Coiled-coil-Region*) und IGcam (*immunoglobulin-type cell adhesion molecule*) dargestellt.

1.4.2 Klinische Aspekte in Mensch und Tier

Seit der Entdeckung von Nexilin konnte das Protein sowohl in Tierversuchen als auch in humanen Patientenkollektiven mit verschiedenen kardiologischen Krankheitsbildern assoziiert werden.

Allen voran wäre hier die Dilatative Kardiomyopathie zu nennen. So konnten Hassel *et al*. beim Morpholino-vermittelten Knockdown von Nexilin im Zebrafisch einen Phänotyp beobachten, welcher der humanen Dilatativen Kardiomyopathie ähnelt. Die Fischembryonen zeigten dabei anfangs in der Phase der Herzdifferenzierung eine völlig normale Entwicklung. Ab einem Alter von etwa 48 Stunden entwickelten die Nexilin-defizienten Fische eine zunehmende Dilatation der Herzräume, eine Verschlechterung der kardialen Auswurfleistung und einer damit einhergehenden Reduktion der systemischen Perfusion. Ein anschließendes genetisches Screening von Kardiomyopathie-Patienten erbrachte den Nachweis dreier verschiedener Nexilin-Mutationen. Alle drei gefundenen Mutationen lokalisieren dabei in der hoch-konservierten C-terminalen IGcam-Domäne. Zudem ließ sich keine dieser Varianten in einem gesunden Kontroll-Kollektiv nachweisen. Eine nachfolgende Injektion eben dieser Nexilin-Varianten als mRNA in wildtypische Zebrafischembryonen führte zu dem gleichen Phänotyp wie zuvor der Morpholino-induzierte Knockdown. Elektronenmikroskopisch wiesen sowohl die Nexilin-defizienten Fische als auch die humanen Nexilin-Mutationsträger eine Zerstörung der Z-Scheiben in den Kardiomyozyten ohne Beteiligung der Skelettmuskulatur auf.

Folglich postulierte man eine essenzielle Rolle von Nexilin in der Aufrechterhaltung der Sarkomerintegrität während hoher kardialer Kontraktionsbelastung. [36]
Eine Knockout-bedingte Nexilin-Defizienz in Mäusen führte analog dazu ebenfalls zu einem DCM-Phänotyp. Die betroffenen Mäuse entwickelten sich ähnlich zu den Fischen anfangs völlig unauffällig. Innerhalb der ersten Lebenstage zeigte sich dann eine zunehmende kardiale Dysfunktion mit linksventrikulärer Dilatation und Wandverdünnung. Mit dieser rasch progredienten DCM ging ein deutlich reduziertes Überleben einher. Eine Integritätszerstörung der Sarkomere konnte in den Mäusen jedoch nicht nachgewiesen werden. [1] Eine weitere Arbeitsgruppe konnte später die Entwicklung einer progredienten DCM beim Knockout von Nexilin in Mäusen bestätigen und sah eine Beeinflussung der elektromechanischen Kopplung und Ca^{2+}-Homöostase als potenziellen Trigger dafür [65].

Neben dieser Assoziation mit der Dilatativen Kardiomyopathie konnten Wang *et al*. Mutationen von Nexilin auch in einem humanen Kollektiv mit Hypertropher Kardiomyopathie nachweisen. Die gefundenen *Missense*-Mutationen lokalisierten dabei im Vergleich zur DCM in der N-terminalen ABD sowie der CC-Region. Sie führten zu einer veränderten intrazellulären Lokalisation von Nexilin und einer teilweise eingeschränkten Aktinbindungskapazität. [103]

Zudem wurde eine reduzierte Nexilin-Expression mehrfach mit dem Auftreten atherosklerotischer Plaques und der KHK in Verbindung gebracht [40,105,110]. Bei einer Nexilin-Überexpression hingegen, beispielsweise durch sogenannte *Gain-of-function*-Mutationen, konnte ein vermehrtes Auftreten von Vorhofseptumdefekten beobachtet werden [106].

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Wie eben beschrieben können Mutationen von Nexilin zu derzeit lediglich symptomatisch therapierbaren und mit teils erheblich verminderter Lebensqualität und -erwartung einhergehenden familiären Formen von Kardiomyopathien führen. Dennoch kennt man bisher lediglich einige strukturelle Eigenschaften und nur wenige interagierende Proteine. Die zelluläre Funktion von Nexilin oder die globale Bedeutung ist nach wie vor unbekannt. Ziel dieser Arbeit ist eine genauere Charakterisierung des Proteins Nexilin sowie seiner Funktion und Interaktion mit anderen Proteinen. Neue Erkenntnisse über das Protein sollen einem besseren Verständnis der Pathomechanismen in der Entstehung von Kardiomyopathien dienen. Hierfür wurden unterschiedliche Herangehensweisen genutzt. Zum einen wurden über den Modellorganismus Zebrafisch die Auswirkungen eines kompletten Genausfalles untersucht, um Rückschlüsse auf die Funktion des Gens / Proteins zu ziehen, zum anderen wurde mit Hilfe eines Zellkultursystems die Interaktion von Nexilin mit anderen Proteinen beleuchtet.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Technische Ausstattung

Kameras:

AxioCam HRc	Carl Zeiss AG; Oberkochen, Deutschland
AxioCam MRc	Carl Zeiss AG; Oberkochen, Deutschland
Leica DFC400	Leica Camera AG; Wetzlar, Deutschland
Olympus DP72	Olympus K.K.; Tokio, Japan

Mikroskope:

Axio Zoom. V16	Carl Zeiss AG; Oberkochen, Deutschland
Axioskop2 plus	Carl Zeiss AG; Oberkochen, Deutschland
Konfokalmikroskop TCS SP8	Leica Microsystems GmbH; Wetzlar, Deutschland
Konfokalmikroskop DMi8	Leica Microsystems GmbH; Wetzlar, Deutschland
Leica DM IL LED	Leica Microsystems GmbH; Wetzlar, Deutschland
Nikon TMS	Nikon Corporation; Tokio, Japan
Olympus SZX16	Olympus K.K.; Tokio, Japan

UV/Fluoreszenzlampen:

Illuminator HXP 120V	Carl Zeiss AG; Oberkochen, Deutschland
Illuminator HXP 200C	Carl Zeiss AG; Oberkochen, Deutschland
X-Cite® 120Q	Excelitas Technologies Corp.; Waltham, USA
Externe Lichtquelle Leica EL6000	Leica Microsystems GmbH; Wetzlar, Deutschland

Inkubatoren:

Inkubator Typ B6200 (Fische)	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA
Inkubator Typ B12 (Bakterien)	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA
Inkubator Heracell™ (Zellkultur)	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA

Zentrifugen:

Zentrifuge 5417 R	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland
Varifuge 3.0 R	Heraeus I Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA
Megafuge 1.0 R	unity lab services | Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA
Multifuge 3 S-R	unity lab services | Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA
Tischzentrifuge MiniStar silverline	VWR International; Radnor, USA

Absaugpumpe	KNF Neuberger GmbH; Freiburg, Deutschland
BioPhotometer®	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland
Drucker Thermal Printer DPU 414	Seiko Instruments K.K.; Chiba, Japan
Eisbad	neolab Migge GmbH; Heidelberg, Deutschland
Eismaschine Scotsman AF103	Hubbard Systems; Great Blakenham; Großbritannien
Elektroporator MicroPulser™	Bio-Rad Laboratories Inc.; Hercules, USA
Fischtanks	Tecniplast S.p.A.; Buguggiate, Italien
Fischverpaarungstanks	Tecniplast S.p.A.; Buguggiate, Italien
Gelelektrophorese-Entwickler BioDoc Analyze (Dunkelhaube und UV-Tisch)	Biometra GmbH | Analytik Jena AG; Göttingen, Deutschland

Gelkammern und -kämme	PeqLab Biotechnologie GmbH | VWR; Erlangen, Deutschland
Glaswaren	Schott AG; Mainz, Deutschland
Heizofen OV5	Biometra GmbH | Analytik Jena AG; Göttingen, Deutschland
Homogenisator Precellys Evolution	Bertin Instruments; Montigny-le-Bretonneux, Frankreich
IKA Roller 10 basic	IKA® Works, Inc.; Wilmington, USA
Injektionapparat FemtoJet®	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland
Injektionsnadelabziehvorrichtung Capillary puller PC-10	Narishige CO. Ltd.; Tokio, Japan
Kühl- und Gefrierschränke	Liebherr; Biberach a.d. Riß, Deutschland
Kühlakku	VWR International; Radnor, USA
Magnetischer Reaktionsgefäß-ständer DynaMag™-2	Life Technologies | Thermo Fisher Scientific Inc.; Carlsbad, USA
Magnetrührer	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG; Schwabach, Deutschland
Mikrowelle Micromat	AEG | Daimler-Benz; Berlin, Deutschland
MultiRotator PTR 35	Grant Instruments Ltd; Shepreth, UK
Netzteil peqPower 300	PeqLab Biotechnologie GmbH | VWR; Erlangen, Deutschland
Netzteil Power pac 300	Bio-Rad Laboratories Inc.; Hercules, USA
PCR Mastercycler® pro	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland
PCR-Cooler	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
PCR-Platten-Versiegler Sealer 4s3	4titude® Ltd.; Wotton, Großbritannien
Pinzetten	neolab Migge GmbH; Heidelberg, Deutschland
Pipetten Eppendorf Research® plus	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland
Pipettenkarussell	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland
Pipettierhelfer accu-jet® pro	Brand GmbH & Co. KG; Wertheim, Deutschland
Präpariernadel	VWR International; Radnor, USA
Rasierklingen	Germany Solingen; Cebu, Philippinen

Schüttelinkubator MaxQ 8000	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA
Schüttel-Wasserbad sw23	JULABO GmbH; Seelbach, Deutschland
Sicherheitswerkbank Herasafe™ (HS12)	unity lab services | Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA
Spektralphotometer NanoDrop™ 2000	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA
Spritzflaschen	VWR International; Radnor, USA
Stickstoffbehälter	KGW-Isotherm Karslruher Glastechnisches Werk – Schieder GmbH; Karlsruhe, Deutschland
Thermomixer® comfort	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland
Vortex-Schüttler VV3	VWR International; Radnor, USA
Waage Precisa 1600C	Precisa Gravimetrics AG; Dietikon, Schweiz
Western Blot-Entwickler ImageQuant LAS 4000 Mini	GE Healthcare | GE Corp.; Chalfont St Giles; Großbritannien
Western Blot-Kammern und -Einspannvorrichtung	Bio-Rad Laboratories Inc.; Hercules, USA
Wippplatte Duomax 1030	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG; Schwabach, Deutschland
Wippplatte Standard Analog Shaker	VWR International; Radnor, USA

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Agarose	Biozym Scientific GmbH; Hessisch Oldendorf, Deutschland
Ampicillin	AppliChem GmbH | Illinois Tool Works Inc.; Darmstadt, Deutschland
Bradford Protein Assay	Bio-Rad Laboratories Inc.; Hercules, USA
Cas9-Protein	Eupheria Biotech GmbH; Dresden, Deutschland
Cytochalasin D	Sigma-Aldrich | Merck KGaA; St. Louis, USA

dNTP	GE Healthcare Life Sciences | GE Corp.; Little Chalfont; Großbritannien
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich | Merck KGaA; St. Louis, USA
Fetales Kälberserum	Biochrom GmbH | Merck KGaA; Berlin, Deutschland
Formaldehyd-Lösung	Otto Fischar GmbH & Co. KG; Saarbrücken, Deutschland
Kanamycin	AppliChem GmbH | Illinois Tool Works Inc.; Darmstadt, Deutschland
Magnetische GFP-Beads GFP-Trap®	ChromoTek GmbH; Planegg-Martinsried
One Shot™ TOP10 Electrocomp™ E. coli	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA
PBS	Gibco® | Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA
Penicillin-Streptomycin	Gibco® | Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA
Protease Inhibitor	F. Hoffmann-La Roche AG; Basel, Schweiz
Proteinase K, rekombinant	F. Hoffmann-La Roche AG; Basel, Schweiz
Q5®-DNA-Polymerase, -Puffer und -Enhancer	New England Biolabs; Ipswitch, USA
Restore Western Blot Stripping Buffer	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA
Restriktionsenzyme und -Puffer	New England Biolabs; Ipswitch, USA
SDS-Laufpuffer	Bio-Rad Laboratories Inc.; Hercules, USA
SDS-Transferpuffer	Bio-Rad Laboratories Inc.; Hercules, USA
Skim Milk Powder	Sigma-Aldrich | Merck KGaA; St. Louis, USA
Taq-DNA-Polymerase und Puffer	QIAGEN N.V.; Venlo, Niederlande
Transposase-mRNA	Eigenproduktion
TBE-Puffer	Sigma-Aldrich | Merck KGaA; St. Louis, USA

Trypsin/EDTA	PAN-Biotech GmbH; Aidenbach, Deutschland
VECTASHIELD Mounting-Medium mit DAPI	Vector Laboratories, Inc.; Burlingame, USA
Zellkulturmedium DMEM	Gibco® | Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA
Zellkulturmedium Opti-MEM™	Gibco® | Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA
Zeocin	Invitrogen | Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA

6-Loch Zellkulturplatten	Falcon® | Corning Life Science; Tewksbury, USA
8-Kammer-Zellkultur-Objektträger	SPL Life Sciences Co., Ltd.; Pocheon-Si, Korea
96-Loch-Platte Nunc™ Microwell™	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA
96-Loch-Platten für PCR	Starlab International GmbH; Hamburg, Deutschland
Artemien-Eier	Sanders; South Ogden, USA
Deckglas	VWR International; Radnor, USA
DNA Gel Loading Dye (6x)	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA
ECL-Lösung Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare Life Sciences | GE Corp.; Little Chalfont; Großbritannien
Einwegpinzette	Seidel Medizin GmbH; Gauting, Deutschland
Elektroporation-Küvetten	Bio-Rad Laboratories Inc.; Hercules, USA
Eppendorf Microloader™	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland
Eppendorf Safe-Lock Tubes (2,0 ml; 1,5 ml)	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland
Fischfutter Gemma Micro	Skretting; Stavanger, Norwegen
Gel-Blotting-Papier	VWR International; Radnor, USA

GeneRuler DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA
Glaskapillaren	World Precision Instruments; Sarasota, USA
Glasperlen	VWR International; Radnor, USA
Immersionsöl	Carl Zeiss AG; Oberkochen, Deutschland
Kulturröhrchen, 14ml	Greiner Bio-One International GmbH; Kremsmünster, Österreich
Matrizen für Injektionsrampen	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland
Meersalz	Red Sea Deutschland; Düsseldorf, Deutschland
Objektträger mit Vertiefung	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA
Pasteurpipetten, Glas	VWR International; Radnor, USA
Pasteurpipetten, Plastik	Brand GmbH & Co. KG; Wertheim, Deutschland
Petrischalen	VWR International; Radnor, USA
Pipettenspitzen TipOne®	Starlab International GmbH; Hamburg, Deutschland
Polyethylen-Schlauchfolie	Rische + Herfurth GmbH; Hamburg, Deutschland
PVDF-Membran	Millipore I Merck KGaA; Billerica, USA
ratiolab® Makro-Küvetten	ratiolab GmbH; Dreieich, Deutschland
Schutzhandschuhe Micro-Touch® Nitra-Tex™	Ansell; Yarra City, Australien
SDS-Gele	Bio-Rad Laboratories Inc.; Hercules, USA
Serologische Pipetten	Falcon® | Corning Life Science; Tewksbury, USA
Skalpell	B. Braun Melsungen AG; Melsungen, Deutschland
Spritzen	Becton Dickinson Corp.; Franklin Lakes, USA
Sterilfilter	Millipore I Merck KGaA; Billerica, USA

Trockenfischfutter	Tetra GmbH; Melle, Deutschland
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One International GmbH; Kremsmünster, Österreich
Zellkulturschalen	Greiner Bio-One International GmbH; Kremsmünster, Österreich
Zellschaber	Falcon® | Corning Life Science; Tewksbury, USA
Zentrifugenröhrchen	Falcon® | Corning Life Science; Tewksbury, USA

2.1.3 Software

ApE	ApE – A plasmid Editor; M. Wayne Davis
AxioVision	Carl Zeiss AG; Oberkochen, Deutschland
BioDoc Analyze	Biometra GmbH | Analytik Jena AG; Göttingen, Deutschland
cellSens Entry	Olympus Europa SE & Co. KG; Hamburg, Deutschland
CHOPCHOP	Harvard University, Cambridge, USA
GraphPad Prism	GraphPad Software Inc.; La Jolla, USA
ImageJ	National Institutes of Health; Bethesda, USA
ImageQuant LAS 4000	GE Healthcare Europe GmbH; Freiburg, Deutschland
LAS V3.7	Leica Microsystems GmbH; Wetzlar, Deutschland
LAS X	Leica Microsystems GmbH; Wetzlar, Deutschland
Microsoft Office 2015	Microsoft Corporation; Redmond, USA
Photoshop	Adobe Systems Inc.; San José, USA
Refworks	ProQuest LLC; Ann Arbor, USA
Zen 2010 Software	Carl Zeiss AG; Oberkochen, Deutschland

2.1.4 Datenquellen

Ensembl	https://www.ensembl.org/index.html
NCBI	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
UniProt	https://www.uniprot.org/
ZFIN	https://zfin.org/

2.1.5 Statistik

Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels GraphPad Prism. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem T-Test für normal verteilte Daten und Wilcoxon-Mann-Whitney-Test für nicht normal verteilte Daten bestimmt.

2.1.6 Chemikalien-Liste

Die folgende Liste gibt einen Überblick über allgemeine Puffer, Lösungen und Medien. Die chemischen Reagenzien werden von folgenden Firmen bezogen:

GE Healthcare Life Sciences | GE Corp.; Little Chalfont, Großbritannien ▪ AppliChem GmbH | Illinois Tool Works Inc.; Darmstadt, Deutschland ▪ Fluka | Sigma-Aldrich | Merck; Buchs, Schweiz ▪ Invitrogen | Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA ▪ Lonza Group AG; Basel, Schweiz ▪ Merck KGaA; Darmstadt, Deutschland ▪ New England Biolabs; Ipswitch, USA ▪ Polysciences Inc.; Warrington, USA ▪ QIAGEN N.V.; Venlo, Niederlande ▪ F. Hoffmann-La Roche AG; Basel, Schweiz ▪ Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe, Deutschland ▪ Sigma-Aldrich | Merck KGaA; St. Louis, USA ▪ Stratagene California | Agilent Technologies; La Jolla, USA ▪ Vector Laboratories | Maravai LifeSciences; Burlingame, USA ▪ VWR International; Radnor, USA ▪ Otto Fischar GmbH & Co. KG; Saarbrücken, Deutschland ▪ Boehringer Ingelheim AG & Co. KG; Ingelheim, Deutschland ▪ Serva Electrophoresis GmbH; Heidelberg, Deutschland

LB-Agar	30 g LB-Agar in 1 l ddH_2O
LB-Medium	20 g LB-Broth in 1 l ddH_2O

Fisch

2,5 % Methylcellulose	1,25 g Methylcellulose in 50 ml E3
DNA-Lysepuffer	10 mM Tris-HCl (pH 8.3); 50 mM KCl; 0,3 % Tween20; 0,3 % Non-idet-P40
E3	5 mM NaCl; 0,17 mM KCl; 0,33 mM $CaCl_2$; 0,33 mM $MgSO_4$
MESAB	4 mg/ml Ethyl-m-Aminobenzoat Methansulfonat; 1 % Na_2HPO_4; pH 7,0-7,5
Proteinextraktion „*Deyolking-buffer*“	55 mM NaCl; 1,8 mM KCl; 1,25 mM $NaHCO_3$
Proteinextraktion TNN-Stock	50 mM Tris-Cl (pH 7,5), 120 mM NaCl), 5 mM EDTA (pH 8,0), 0,5 % NP-40, 10 mM $Na_4P_2O_7$ in ddH_2O
Proteinextraktion Waschpuffer	110 mM NaCl; 3,5 mM KCl; 27 mM $CaCl_2$; 10 mM Tris-HCl (pH 8,5)
Proteinextraktionspuffer	95,6 % TNN-Stock; 4 % Proteinase-Inhibitor; je 0,1 % PMSF (200 mM), Na_3VO_4 (1 M), NaF (1 M) und DTT (0,1 M)
Stock B, 1 l	22,1 g $NaHCO_3$; 6,1 g Na_2SO_4

Zellkultur

CoIP-Lysepuffer	150 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,5 mM EDTA; 1 mM PMSF; Protease-Inhibitoren; 0,5 % Nonidet P-40
CoIP-Verdünnungspuffer 1	150 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,5 mM EDTA; 1 mM PMSF; Protease-Inhibitoren
CoIP-Verdünnungspuffer 2	500 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,5 mM EDTA; 1 mM PMSF; Protease-Inhibitoren
IF-Blockierlösung 1	0,2 % Triton in PBS

IF-Blockierlösung 2	1 % BSA in PBS
Zellkulturmedium	89 % DMEM, 10 % FCS, 1 % Penicillin-Streptomycin
PBS+	1,0 g $MgCl_2$ x $6H_2O$ + 1,3 g $CaCl_2$ x $3H_2O$ in 100 ml H_20 → 1:100 in PBS

Proteinnachweis

Lämmli-Puffer 3x, 1 l	2,4 ml 1 M Tris HCl (pH 6,8); 3 ml 20 % SDS; 3 ml Glycerol (100 %); 1,6 ml β-Mercaptoethanol; 0,006 g Bromphenol-blau in ddH_2O
TBS 20x, 1 l	175,32 g NaCl; 121,1 g Tris in ddH_2O; pH 7,4
TBST	0,05 % Tween20 in TBS
Western Blot-Blockierlösung	5 % Milchpulver in TBST

2.1.7 Kits

Isolate II Plasmid Mini Kit	Bioline Reagents Limited; London, Großbritannien
Lipofectamine™ 3000 TransfectionReagent	Invitrogen | Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA
Lipofectamine™ LTX Reagent	Invitrogen | Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA
Polyethylenimine PEI 25K	Polysciences Inc.; Warrington, USA
QIAfilter® Plasmid Maxi Kit	QIAGEN GmbH; Hilden, Deutschland
QIAquick® Gel Extraction Kit	QIAGEN GmbH; Hilden, Deutschland
Gateway® LR-ClonaseII®	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA
Gateway® BP-Clonase® Enzyme Mix	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA

Gateway® LR-Clonase® Enzyme Mix	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA
TOPO™ TA Cloning™ Kit	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA
Precellys Lysing Kit VK05	Bertin Instruments; Montigny-le-Bretonneux, Frankreich

2.1.8 Plasmide

pCDNA 3.1/nV5-DEST	Gateway®-Klonierung Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA
pCRII-TOPO-TA	Klonierung eines PCR-Produktes zur Sequenzierung Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA
pDEST Tol2 pA2	MultiSite Gateway, Tol2 kit [59]
p3E-EGFPpA	MultiSite Gateway, Tol2 kit [59]
p5E-unc45b^{min}	MultiSite Gateway [90]
pDEST47 (GFP)	Gateway®-Klonierung Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, USA
pDONR221 (Entry)	Gateway®-Klonierung Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA
pDONRzeo (Entry)	Gateway®-Klonierung Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA

2.1.9 Restriktionsenzyme

Alle verwendeten Restriktionsenzyme und Puffer wurden von New England Biolabs in Ipswitch, USA bezogen und gemäß Anbieterangaben verwendet.

2.1.10 DNA-Oligonukleotide/Primer

Alle Primer wurden von Eurofins Genomics in Ebersberg, Deutschland synthetisiert.

NEXN_Exon2	5‘-3	ATGACTGAAGTGATGAGCATGG
	3‘-5‘	TGGTGTCTTCCTCTTTCGTTTT
NEXN_Exon7	5‘-3	CCAAAGAGAAAGAGCAGGTGAC
	3‘-5‘	AACCCTTTAAATCCCCAAATGT
Glomulin_ Gateway®	5‘-3	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGG CTCTAGATCAGCTCAGTGA
	3‘-5‘	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCGAC TGAGGTCTGTCTTTAGCC
CTNNBL1_ Gateway®	5‘-3	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGG ATGTTGGAGAGCTGCT
	3‘-5‘	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCGAAG TTTTCAAGTAGTTCCATAATCCT

2.1.11 gRNAs für die CRISPR/Cas9-Methode

Die aufgeführten gRNAs für die Durchführung einer Mutationsgenerierung mittels des CRISPR/Cas9-Systems wurden bei Eurofins Genomics in Ebersberg, Deutschland bestellt und in einer Konzentration von 400 $^{ng}/_{µl}$ verwendet.

gRNA_NEXN_Exon2_antisense	AAACCGCTGTTCATCTCCACCTCT
gRNA_NEXN_Exon2_sense	TAGGAGAGGTGGAGATGAACAGCG
gRNA_NEXN_Exon7_antisense	AAACAGCTTGGCCTCTTCAAAAG
gRNA_NEXN_Exon7_sense	TAGGCTTTTGAAGAGGCCAAGCT

2.1.12 Sequenzierung

Alle in dieser Arbeit erfolgten Sequenzierungen wurden in Form von Sanger Sequenzierungen durch Eurofins Genomics in Ebersberg, Deutschland ausgeführt.

2.1.13 Antikörper

Die folgenden Primärantikörper wurden für verschiedene Anwendungen gebraucht und dementsprechend in unterschiedlichen Medien verdünnt: zum Proteinnachweis bei Western Blots in Western Blot-Blockierlösung und zur Immunfluoreszenzfärbung der Zellkultur in IF-Blockierlösung 2.

Antigen	**Spezies**	**Anwendung**	**Verdünnung**	**Firma**
Aktin	Phalloidin, Konjugat an Alexa Fluor 568	IF Zellkultur	1:200	Molecular Probes I Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA A12380
β-Aktin	Maus IgG	Western Blot	1:2.000	Sigma-Aldrich | Merck KGaA; St. Louis, USA A5441
GFP	Kaninchen	IF Zellkultur Western Blot	1:400 1:2.000	Invitrogen | Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA A-11122
Nexilin 151-581	Kaninchen	Western Blot	1:1.000	Institut für Zellbiologie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Tubulin	Maus IgG2a	IF Zellkultur	1:1.000	GeneTex, Inc.; Irvine, USA GTX628802
V5	Maus IgG2a	IF Zellkultur Western Blot	1:200 1:5.000	Invitrogen | Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA R960-25
V5	Kaninchen	IF Zellkultur	1:200	Millipore I Merck KGaA; Billerica, USA #AB3792

Für die Western Blots wurden folgende HRP-konjugierte Sekundärantikörper der Ziege gegen Maus- oder Kaninchen-IgG in TBST verdünnt.

Sekundärantikörper	Verdünnung	Firma
Anti-Maus-HRP	1:2.000 - 1:3.330	Cell signaling Technology; Cambridge, Großbritannien #7076
Anti-Kaninchen-HRP	1:2.000	Cell signaling Technology; Cambridge, Großbritannien #7074

Für die Fluoreszenzfärbungen in der Zellkultur wurden folgende Sekundärantikörper verwendet und in PBS verdünnt.

Antikörper	Anwendung	Verdünnung	Firma
Anti-Maus IgG2a Alexa Fluor 555	IF Zellkultur	1:1.000	Invitrogen | Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA A-21137
Anti-Maus IgG2a Alexa Fluor 488	IF Zellkultur	1:1.000	Invitrogen | Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA A-21131
Anti-Kaninchen Alexa Fluor 488	IF Zellkultur	1:200 - 1:1.000	Invitrogen | Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA A-11034

2.2 Methoden

2.2.1 Zebrafisch

2.2.1.1 Verwendete Linien und Genehmigung

In der vorliegenden Arbeit wurde die *Danio rerio* Wildtyplinie Tü für Injektionen von CRISPR/Cas9- und Tol2-Konstrukten verwendet.

Eine Genehmigung zur Verwendung von Zebrafischen für Tierversuche dieser Arbeit wurde durch das zuständige Regierungspräsidium Baden-Württemberg/ Tübingen unter den Tierversuchsnummern *1243* und *1351* erteilt.

2.2.1.2 Aufzucht und Haltung

Sowohl die adulten Zebrafische als auch deren Embryonen wurden bei 28,5 °C unter Standardbedingungen gemäß *The Zebrafishbook – A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)* [104] gehalten. Die Fischaufzuchtanlage enthielt insgesamt etwa 10.000 l deionisiertes, also vollentsalztes Wasser. Optimale Wasserbedingungen wurden durch Zugabe von Stock B und Meersalz zur pH-Einstellung im Bereich 7,2-7,4 und einer Leitfähigkeit von 200-400 µS/cm erreicht. Die Systemwasserbedingungen wie Nitrat, Nitrit und Ammoniak wurden laufend dokumentiert. Mittels Zeitschaltuhr wurde der natürliche Tag-Nacht-Rhythmus mit 13 h Helligkeit und 11 h Dunkelheit imitiert. Morgens wurden die Fische mit zwei Tage alten, entkapselten Artemien und nachmittags mit Trockenfutter gefüttert. Zur Vorbereitung der Artemien wurden 20-25 g der Eier in einen 10 l deionisiertes Wasser fassenden Tank unter Zugabe von 360 g Seesalz gegeben und bei einer Temperatur von 28 °C sowie konstantem Luftzustrom aufgezogen. Nach Ablösen der Kapsel nach zwei Tagen und mehrmaligem Waschen mit deionisiertem Wasser wurden die Artemien an die Fische verfüttert.

Die Fische wurden in speziellen Tanks mit herausnehmbarem Sieb und Trennscheibe zur Separation der Geschlechter verpaart. Am Folgetag konnte die Trennscheibe bis maximal 3 h nach Beginn der Helligkeitsphase entfernt werden, da Licht allein bereits ein Stimulus zur Verpaarung ist. Innerhalb von 15-20 min

legten die Weibchen befruchtete Eier ab, die durch den Siebeinsatz zum Tankboden fielen. Das Sieb diente zum Schutz vor den adulten Fischen. Die Eier wurden anschließend mit Hilfe eines feinmaschigen Siebes abgesammelt, gewaschen und in eine Petrischale mit E3-Puffer überführt. Im Ein-Zell-Stadium konnten Substanzen wie RNA, Plasmide und Proteine in die Zebrafischeier injiziert werden.

Zur optimalen Entwicklung der Embryonen wurden diese in einem Inkubator mit einer konstanten Temperatur von 28,5 °C bis zu fünf Tage gehalten. Entwicklungsstadien werden dabei in hpf (*hours post fertilization*), also der Zeit ab Befruchtung, angegeben. Aufzuziehende Embryonen wurden bis zur Ausbildung einer Schwimmblase im Inkubator gehalten. Im Anschluss wurden die fünf bis sieben Tage alten Larven in einen gering mit Systemwasser befüllten Tank überführt. Der Anschluss ans System erfolgte nach zehn Tagen mit anfangs nur tropfendem Wasser. Die Larven wurden zunächst mit speziellem Futter und nach einem Monat analog zu den adulten Fischen gefüttert. Nach etwa drei Monaten erreichte der Zebrafisch seine Geschlechtsreife und wurde fortan als adult angesehen.

2.2.1.3 Mikroinjektionen

Zunächst wurden Injektionsrampen und -Nadeln vorbereitet. Für die Rampen zur Positionsstabilisierung der Eizellen während der Injektion wurden Petrischalen etwa zur Hälfte mit 3 %iger Agarose (mit E3-Medium) befüllt. In noch flüssigem Zustand wurde eine Plastikmatrize zur Erzeugung von sechs 3 x 50 mm großen Einkerbungen auf die Oberfläche gelegt und nach dem Abkühlen wieder entfernt. Die Injektionsnadeln wurden aus 0,75 mm dicken Glaskapillaren mit Hilfe des Capillary Puller gezogen. Nach Öffnung der Nadeln mittels Rasierklingen wurde die zu injizierende Substanz über Microloader-Pipettenspitzen in die Nadel gefüllt und diese im FemtoJet Microinjector fixiert. Abhängig von der Nadel-Öffnungsweite wurden weitere Injektionsparameter wie Kapillardruck, Injektionsdruck und Injektionsdauer individuell eingestellt. Die Injektion von CRISPR/Cas9-Konstrukten sowie Plasmiden und mRNA zur Generierung einer transgenen Linie erfolgte ausschließlich ins Ein-Zell-Stadium. Nach erfolgter Mikroinjektion wurden die Eier

in Petrischalen mit E3-Medium mit Methylenblau überführt und im Inkubator bei Standardbedingungen gehalten. Täglich erfolgte ein Medium-Wechsel.

Für die CRISPR/Cas9-Injektion wurde 2 $^{\mu g}/_{\mu l}$ Cas9-Protein mit 400 $^{ng}/_{\mu l}$ gRNA in 1M KCl verdünnt verwendet.

Zur Generierung der transgenen Nexilin-Linie wurde das pDESTTol2pA2-Konstrukt mit Transposase-mRNA in gleicher Konzentration (mehrfache Durchführung mit 15-18 $^{ng}/_{\mu l}$) in 200 mM KCl verdünnt und in die Eizelle koinjiziert.

2.2.1.4 Video- und Bilddokumentation

Zur Bildgebung wurden die Embryonen in 2,5 %ige Methylcellulose auf Objektträger mit Vertiefungen gelegt. Eine korrekte Positionierung und Ausrichtung wurde mit Hilfe einer Präparationsnadel erreicht. Die Bilddokumentation erfolgte mit Zeiss Axio V.16, die Videodokumentation mit invertierter Stereomikroskopie des Leica DM IL LED. Digitalisiert wurden die Videos mit der Software Leica LAS.

2.2.1.5 Funktionelle Analysen von Zebrafischembryonen

Mittels ImageJ, Excel und GraphPad Prism wurde die Ventrikelkontraktionsfähigkeit ermittelt. Hierfür wurden in den prozessierten Bildern der Videos jeweils der Herzdurchmesser zum Zeitpunkt der Diastole sowie der darauffolgenden Systole gemessen. Zu jedem Entwicklungszeitpunkt (48, 72, 96, 120 hpf) wurden etwa 10-15 Individuen pro Gruppe gefilmt und pro Fisch ein Mittelwert aus sechs Kontraktionszyklen verwendet. Die Kalkulation der Ventrikelkontraktionsfähigkeit erfolgte anhand der Formel:

$$\text{Ventrikelkontraktionsfähigkeit} = \frac{\text{Durchmesser Diastole - Durchmesser Systole}}{\text{Durchmesser Diastole}}$$

2.2.1.6 DNA-Extraktion

Die DNA-Isolation erfolgte aus Fischembryonen oder den abgetrennten Schwanzflossen von adulten Fischen, welche durch eine dafür autorisierte Person entnommen wurden. Zunächst wurden in jedes Loch einer 96-Lochplatte etwa 100 µl 100 % Methanol vorgelegt, in welches der Embryo, beziehungsweise die Schwanzflosse gelegt und für mindestens 1 h bei -80 °C fixiert oder alternativ bei -20 °C gelagert wurde. Anschließend wurde das Methanol durch Abpipettieren entfernt und Überreste bei 70 °C im Heizofen verdampft. Auf die trockenen Proben wurden nun 50-75 µl DNA-Lysepuffer + Proteinase K (1 ml: 965 µl Lyse-Puffer + 35 µl Proteinase K) gegeben und über Nacht bei 50 °C inkubiert. Gestoppt wurde die Reaktion durch ein Erhitzen auf 98 °C für 10 min. Das Lysat wurde im Anschluss für 3 min bei 3000 g zentrifugiert und gegebenenfalls bei -20 °C gelagert.

2.2.1.7 Proteinextraktion

Die Proteinexpression in Zebrafischembryonen wurde anhand von Western Blots analysiert. Hierfür wurden je etwa 50-100 betäubte Embryonen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gesammelt und die gesamte Flüssigkeit entfernt. Die Gefäße wurden dann kurz in Flüssigstickstoff gehalten und konnten anschließend bei -80 °C gelagert werden. Zu Beginn der Proteinextraktion wurden die Dottersäcke durch Auf- und Abpipettieren von 1 ml *Deyolking-buffer* entfernt. Nach 15 s Vortexen wurden die Proben für 30 s bei 4 °C mit 3000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet zweimal mit je 1 ml Waschpuffer gewaschen und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in je 50-100 µl TNN-Arbeitspuffer resuspendiert und die Probe mit Hilfe des Precellys Evolution Homogenisators homogenisiert. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis wurde die Probe bei 4 °C 10 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Protein-enthaltende Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C gelagert.

2.2.1.8 Prinzipieller Arbeitsablauf zur Generierung einer CRISPR/Cas9-Zebrafischlinie

Die Etablierung einer stabilen Knockout-Fischlinie mittels CRISPR/Cas9 beinhaltete die in Abb. 4 dargestellten Arbeitsschritte. Zunächst wurde eine spezifische gRNA gemeinsam mit dem Enzym Cas9 in befruchtete Eizellen des Zebrafisches injiziert. Diese erste Generation der primär injizierten Fische wurde als F_0-Generation bezeichnet. Im adulten Alter wurden diese Fische zur Erzeugung heterozygoter Träger einer einzelnen Mutation mit WT-Fischen gekreuzt, was man als Out-Cross, also Auskreuzen bezeichnet. Die Nachkommen, also die zweite Generation (F_1) erhielten jeweils ein WT-Allel vom WT-Elternteil und ein weiteres, gegebenenfalls mutiertes Allel vom primär injizierten Elternteil. Da die CRISPR/Cas9-induzierte Mutagenese auch die Zellen der Keimbahn der Zebrafische betrifft, konnten die entstandenen Mutationen (Insertionen und Deletionen) an die Nachkommen weitergegeben werden. Die Mutationen ließen sich mittels Sequenzierung exakt charakterisieren und meist gut in der PCR voneinander unterscheiden. Im Anschluss wurden adulte F_1-Fische mit identischer Mutation auf je einem Allel untereinander verpaart. Unter diesen Nachkommen, der dritten Generation (F_2), sollte sich eine Mendelsche Verteilung von 25 % Wildtypen, 50 % heterozygoten Trägern und weiteren 25 % homozygoter Träger der Mutation ergeben. Die homozygoten Mutationsträger sollten dabei aufgrund einer Beteiligung beider Allele das gewünschte Protein im Sinne eines Knockouts des codierenden Gens nicht exprimieren können.

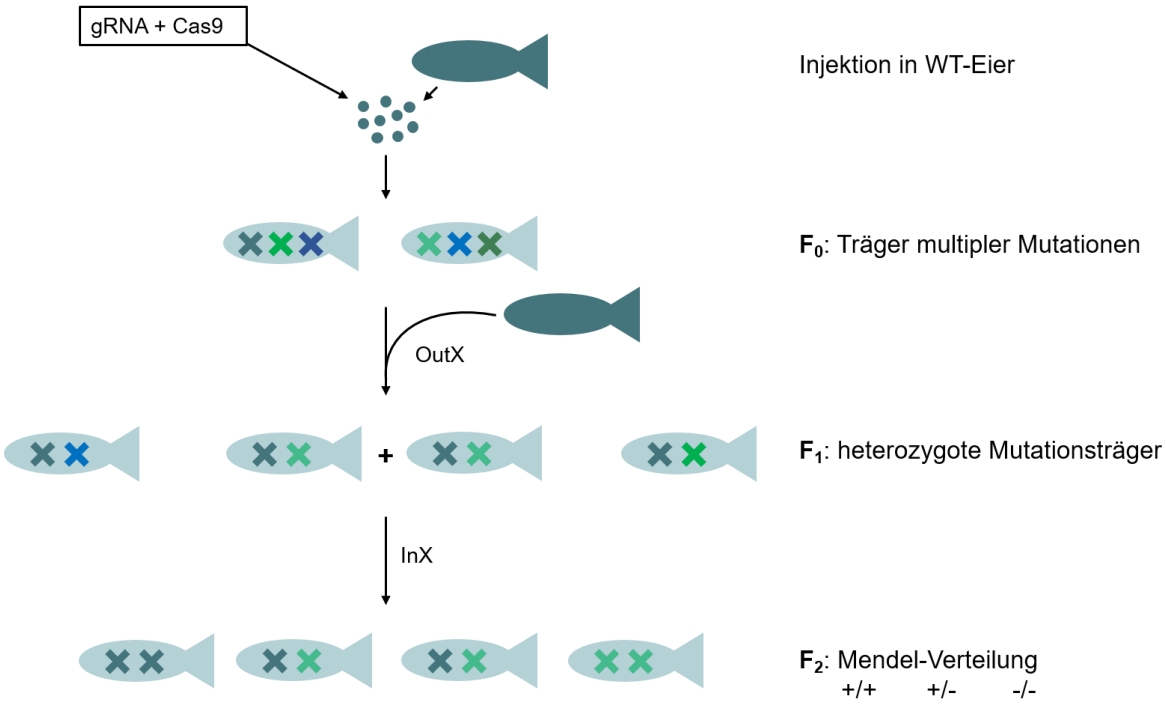

Abb. 4: Arbeitsablauf bei der Generierung einer Zebrafisch-Knockout-Linie mittels CRISPR/Cas9. Zunächst wurde ein Gemisch aus einer gRNA (*guide-RNA*) und Cas9 in Wildtyp (WT)-Zebrafischeier injiziert. Die injizierten Fische – als F_0-Generation bezeichnet – waren Träger multipler Mutationen in der gewünschten Genregion. Im adulten Alter wurden sie mit WT-Fischen gekreuzt (OutX, Auskreuzen). Die Individuen der Nachkommen-Generation F_1 waren heterozygote Träger einer Mutation (oder Wildtypen). Das WT-Allel stammte vom WT-Elternteil des OutX, das gegebenenfalls mutierte Allel vom primär injizierten Fisch der F_0-Generation. Eine Identifikation dieser Mutationen war mittels Sequenzierung möglich. F_1-Fische mit identischer Mutation wurden untereinander gekreuzt (InX, Einkreuzen). Diese Nachkommen – die F_2-Generation – sollten nach einer Mendel-Verteilung zwei WT-Allele (+/+), ein WT- und ein mutiertes Allel (heterozygote Mutationsträger, +/-) oder zwei mutierte Allele aufweisen (homozygote Mutationsträger, -/-). Letztere zeigen (abhängig von der genauen Sequenz) potenziell einen kompletten Knockout des gewünschten Gens. CRISPR = *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat*. Cas = *CRISPR associated*. RNA = Ribonukleinsäure.

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Verwendete Zellkulturlinie und deren Kultivierung

Jegliche Versuche zur Untersuchung einer möglichen Interaktion von Nexilin mit anderen Proteinen wurden an der etablierten Zelllinie HEK-293T durchgeführt.

Diese Zellen wurden in Zellkulturmedium, bestehend aus 89 % DMEM + 10 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin, bei 37 °C und 5 % CO_2-Gehalt kultiviert und je nach Bedarf gesplittet.

2.2.2.2 Transfektion

Zur Transfektion der Zellen wurde das Kit Lipofectamine™ 3000 Transfection-Reagent gemäß Herstellerangaben auf etwa 80 % konfluente Kulturen verwendet. Für eine höhere Ausbeute an transfizierten Zellen für die Koimmunpräzipitations-versuche wurde die Transfektion mit Polyethylenimin vorgenommen.

2.2.2.3 Proteinextraktion und Koimmunpräzipitation

Ziel der Koimmunpräzipitation war ein Interaktionsnachweis zwischen Proteinen. Hierfür wurden HEK-293T-Zellen in 10 cm-Kulturschalen gemäß Herstellerprotokoll transfiziert. Nach einer Inkubation von 24 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend zur Proteinextraktion mit je 200 µl eiskaltem CoIP-Lysepuffer lysiert. Die Proben wurden dann bei 14.000 rpm für 10 min bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand enthielt dabei das Lysat. Im Anschluss wurde die Protein-konzentration mittels Bradford-Reaktion ermittelt und die Proben auf eine Konzent-ration von 1,875 µg/µl mit CoIP-Verdünnungspuffer verdünnt. Zum Binden und Extrahieren der Zielproteine wurde GFP-Trap®_MA verwendet. Zunächst wurden 25 µl der magnetischen *Beads* in 400 µl Verdünnungspuffer äquilibriert und dreimal gewaschen, bevor dann je 400 µl des verdünnten Zelllysats zugegeben wurden und eine Inkubation in einem Rotator über Nacht bei 4 °C erfolgte. Die eingesetzte Proteinmenge entsprach somit jeweils 750 µg. Am nächsten Tag wurden die *Beads* magnetisch separiert und jeweils dreimal mit Verdünnungspuffer 2 gewaschen. Im

Anschluss wurden den *Beads* 90 µl 2xLämmli-Puffer zugegeben und der Ansatz für 10 min bei 98 °C zur Lösung der Immunkomplexe und Proteindenaturierung inkubiert. Zum Proteinnachweis erfolgte ein Western Blot.

2.2.2.4 Cytochalasin-Behandlung

Eine Behandlung mit Cytochalasin als Inhibitor der Aktinpolymerisation [7] wurde zur genaueren Lokalisationsanalyse von Nexilin durchgeführt. Die Zellen wurden hierfür mit dieser Substanz in einer Konzentration von 5 µM für 2 h inkubiert. Direkt anschließend wurde mit dem Protokoll zur Immunfluoreszenzfärbung begonnen. DMSO diente als Kontrollsubstanz.

2.2.2.5 Immunfluoreszenzfärbung transfizierter HEK-293T-Zellen

Die gewünschten Zellen wurden zunächst auf speziellen Zellkultur-Objektträgern mit jeweils acht einzelnen Kammern ausgesät und kultiviert. Nach dem Ablauf der Transfektion und/oder Behandlung wurden die Zellen nach einem fakultativen kurzen Waschschritt mit PBS+ für 15 min in 3,7 %igem Paraformaldehyd fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS folgte eine Inkubation mit Blockierlösung 1 für 5 min bevor die Zellen nach erneutem Waschen für 1 h in Blockierlösung 2 verblieben. Die Inkubation mit den Erstantikörpern erfolgte in ebendieser Blockierlösung 2 über Nacht bei 4 °C in dunkler und feuchter Umgebung. Im Anschluss an zwei Waschschritte mit PBS wurde unter ständiger Lichtprotektion der in PBS verdünnte Zweitantikörper für 2 h bei Raumtemperatur zugegeben. Nach erneutem Waschen wurde die Flüssigkeit komplett abgenommen. Eingedeckelt wurde mit dem *Mounting*-Medium mit DAPI von Vectashield. Etwa 70 µl davon wurden auf ein Deckglas gegeben und dieses vorsichtig auf den Objektträger gelegt. Das Aushärten und die Lagerung erfolgten gekühlt und lichtgeschützt.

2.2.2.6 Analysen von DMSO- und Cytochalasin-behandelter Zellfärbungen

Zum einen wurde die Kolokalisation von Nexilin mit Aktin beziehungsweise mit Tubulin anhand von doppelt gefärbten Zellkulturen ausgewertet. Verwendet wurde hierfür das Konfokalmikroskop DMi8 sowie die Software LAS X von Leica. Hierfür wurde eine 8 µm lange Linie durch eine repräsentative Zelle gelegt, die Intensitäten der beiden Fluoreszenzkanäle gemessen und normalisiert dargestellt.

Zum anderen wurden die Auswirkungen einer Cytochalasinbehandlung der Zellen beziehungsweise einer Kontrollbehandlung mit DMSO (Dimethylsulfoxid) in Abhängigkeit einer positiven Transfektion mit Nexilin analysiert. Hierfür wurden die Zellen standardmäßig transfiziert, behandelt und gefärbt. Anschließend wurden Bilder dieser Färbungen mit dem Mikroskop Axioskop 2plus und der Kamera AxioCam MRc aufgenommen und mit Hilfe von ImageJ ausgewertet. Hierbei wurde in der Nexilin/V5-Fluoreszenzfärbung anhand der Farbintensität ermittelt, ob die Zellen erfolgreich transfiziert wurden oder nicht. Als Grenzwert wurde dafür ein Wert von 15,00 *calibrated units* festgelegt, wobei zur Normalisierung eine Subtraktion des jeweiligen Hintergrund-Wertes erfolgte. Gleichzeitig wurde in der Phalloidin-Färbung das Aktinzytoskelett bewertet und als intakt oder zerstört eingestuft. Insgesamt wurden drei unabhängige Experimente mit jeweils rund 100-150 Zellen ausgewertet und deren Mittelwert ermittelt.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Amplifikation eines Genabschnittes erfolgte mittels einer PCR mit Taq-Polymerase. Die PCR zur Gateway® Klonierung wurde mit Q5® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase durchgeführt. Optimiert auf die jeweiligen Primer wurden folgende Zyklusabfolgen verwendet:

- Amplifikation von Exon 2 des NEXN-Gens:
  94 °C, 1:00 min; [94 °C, 0:50 min; 57 °C, 0:50 min; 72 °C, 0:50 min] x 35 Zyklen; 72 °C, 10:00 min; 4 °C

- Amplifikation von Exon 7 des NEXN-Gens:
  94 °C, 5:00 min; [94 °C, 0:50 min; 58 °C, 0:50 min; 72 °C, 0:50 min] x 50 Zyklen; 72 °C, 10:00 min; 4 °C

- Gateway®-Klonierung von CTNNBL1
  98 °C, 1:00 min; [98 °C, 0:20 min; 52-65 °C, 0:20 min; 72 °C, 1:10 min] x 40 Zyklen; 72 °C, 10:00 min; 4 °C

- Gateway®-Klonierung von Glomulin:
  98 °C, 0:30 min; [98 °C, 0:10 min; 61 °C, 0:20 min; 72 °C, 3:30 min] x 12 Zyklen; [98 °C, 0:10 min; 58,3 °C, 0:20 min; 72 °C, 3:30 min] x 35 Zyklen; 72 °C, 10:00 min; 4 °C

2.2.3.2 Agarose-Gelelektrophorese und DNA-Gelextraktion

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach Größe und Ladung genutzt. Abhängig von der Fragmentgröße wurden 1 % oder 2 % Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde in 1xTBE-Puffer aufgekocht, abgekühlt, mit Ethidiumbromid versetzt und in die vorgesehenen Formen gegossen. Den Proben wurde vor dem Auftragen *Loading-Dye* zugegeben. Als Standard diente eine 1 kb DNA-Leiter. Die Elektrophoresen liefen rund 90 min bei 120 V und wurden anschließend mittels BioDoc Analyze dokumentiert.

Zur weiteren Verwendung von PCR-Produkten für die Gateway®-Klonierungen wurde die korrespondierende Bande ausgeschnitten und die DNA mittels QIAquick Gel Extraction Kit extrahiert. Die Extraktion erfolgte nach Herstellerangaben.

2.2.3.3 Klonierung

Der Erfolg einer Klonierung wurde nach Transformation und Plasmidpräparation durch einen Testverdau überprüft und teilweise durch Sequenzierung gesichert.

2.2.3.3.1 TOPO pCRII

Zur nachfolgenden Sequenzierung wurde ein gewünschtes PCR-Produkt mittels TOPO™ TA Cloning™ Kit nach Herstellerangaben in den pCR™II-TOPO™-Vektor kloniert und anschließend in elektrokompetente *E. coli* transformiert.

2.2.3.3.2 Gateway®-Klonierung

Zur Transfektion von Zellen wurden mit der Gateway®-Methode Vektoren kloniert, die eine Expression getaggter Proteine vermittelten. Eine schematische Darstellung der Vektoren ist in Abb. 5 gezeigt. Die gewünschten Gene wurden dabei mit Gateway®-Überhängen aus Zebrafisch-cDNA amplifiziert und durch eine BP-Reaktion in Entry-Vektoren eingebracht. Als *Entry*-Vektor dienten pDONRzeo und pDONR221. Durch eine LR-Reaktion wurde das Gen dann in die Endvektoren pDEST47 und pCDNA3.1/nV5-DEST überführt. Die Ansätze inkubierten jeweils über Nacht bei 25 °C. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von Proteinase K für 10 min bei 37 °C abgestoppt. Die Transformation des jeweiligen Plasmids erfolgte ebenfalls in elektrokompetenten *E. coli*. Vor Verwendung wurden die Vektoren sequenziert und auf einen korrekten Leserahmen überprüft.

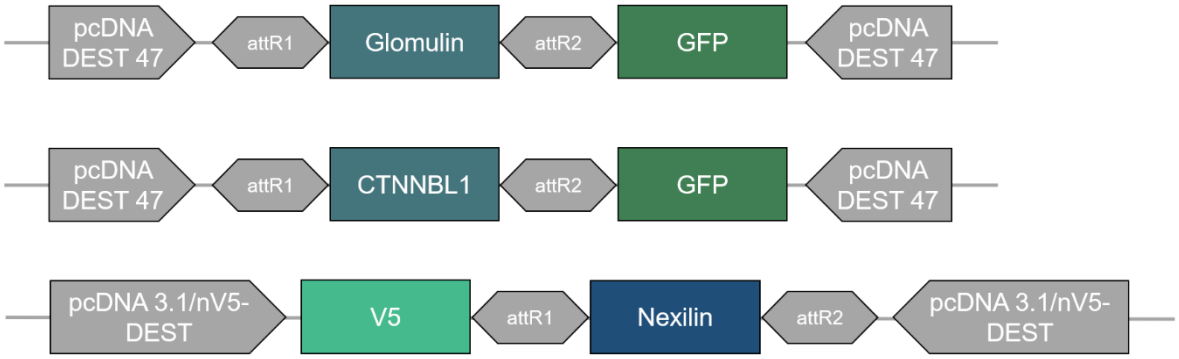

Abb. 5: Klonierte Endvektoren zur Transfektion von Zellen. Die gezeigten Vektoren wurden mittels Gateway®-Klonierung erzeugt. Sie dienten der Transfektion von Zellen und vermitteln die Expression von Fusionsproteinen (Glomulin-GFP, CTNNBL1-GFP, V5-Nexilin). Die Zebrafisch Gensequenz für Glomulin, CTNNBL1 und Nexilin wurden über eine Zwischenreaktion in den jeweiligen Endvektor (pcDNA DEST47 oder pcDNA3.1/nV5-DEST) kloniert, wobei attR1 und attR2 die Rekombinationsstellen darstellen. GFP = *green fluorescent protein*. CTNNBL1 = Catenin beta like protein 1.

2.2.3.3.3 MultiSite-Gateway-Klonierung

Mittels MultiSite-Gateway-Klonierung wurde ein Plasmid zur Generierung einer transgenen Zebrafischlinie erstellt. Hierfür wurde das pDestTol2pA2-Rückgrat mit unc45b^{min}-Promotor an 5‘-Position (p5E-unc45b^{min}), einer *non-stop*-Variante von Zebrafisch-NEXN in mittlerer Position (pDONR221-zNEXN) und EGFP an der 3‘-Position (p3E-EGFPpA) kloniert. Das weitere Vorgehen entsprach dem der Gateway®-Klonierung. Die Integrität des in Abb. 6 gezeigten Vektors wurde mittels Sequenzierung erfolgreich überprüft.



Abb. 6: Tol2-Endvektor zur Injektion in Zebrafischeizellen zur Erzeugung einer transgenen Nexilin-Zebrafischlinie. Der gezeigte Vektor mit Tol2-Rückgrat wurde mittels Multisite-Gateway-Technologie kloniert und enthält die folgenden Bestandteile: den Promotor unc45b^{min}, die Gensequenz für Nexilin sowie EGFP mit einem Poly-A-Schwanz (pA). Der Vektor soll die Expression eines Nexilin-EGFP-Fusionsproteins unter Einfluss des unc45b^{min}-Promotors vermitteln. attB4, attB1, attB2 und attB3 stellen die Rekombinationsstellen der Klonierung dar. EGFP = *enhanced green fluorescent protein*.

2.2.3.4 Transformation von Bakterien

Zur Transformierung der klonierten Plasmidkonstrukte wurden elektrokompetente One Shot™ TOP10 Electrocomp™ *E. coli* nach Herstellerangaben verwendet.

2.2.4 Plasmid-DNA-Präparation und Konzentrationsbestimmung

Die Plasmidextraktion aus *E. coli* erfolgte mittels dem Isolate II Plasmid Mini Kit aus 4 ml Kultur oder dem QIAfilter® Plasmid Maxi Kit aus 100 ml Kultur.
Mit Hilfe des NanoDrop2000® wurde die Konzentration extrahierter DNA bestimmt.

2.2.5 Proteinnachweis mittels Western Blot

Die Proteinkonzentration der Fisch- oder Zelllysate wurde vor Anfertigung eines Western Blots photometrisch mittels Bradford-Reaktion ermittelt.

2.2.5.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteinproben erfolgte mittels SDS-PAGE. Es wurden je 10-20 ng des Proteinlysates mit Lämmli-Puffer gemischt und für 5 min bei 95 °C aufgekocht. Nach kurzer Zentrifugation wurde das SDS-Gel (Gradient 8-16 %) mit den Proben beladen. Die Elektrophorese erfolgte für 35 min bei 35 mA in Laufpuffer. Als Leiter diente PageRuler plus.

2.2.5.2 Western Blot

Nach der Auftrennung durch SDS-PAGE wurden diese für 1 h bei 100 V in Transferpuffer auf eine PVDF-Membran transferiert. Anschließend wurde mit Western Blot-Blockierlösung geblockt, bevor die Membran mit dem in dieser Lösung verdünnten Erstantikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert wurde. Die folgenden Schritte erfolgten allesamt bei Raumtemperatur. Am Folgetag wurde die Membran vier Mal für je 10 min mit TBST gewaschen und anschließend mit dem in 1xTBST verdünnten Zweitantikörper für 75 min inkubiert. Es folgten vier weitere Waschschritte mit TBST. Zur Entwicklung des Western Blots diente ImageQuant Las 4000. Die Membran wurde hierfür kurz mit 1 ml ECL inkubiert. Zur Färbung der Membran mit einem weiteren Antikörper wurde der Restore Western Blot Stripping Buffer verwendet. Die Membran wurde für 30 min inkubiert, anschließend gewaschen und von neuem geblockt.

3. Ergebnisse

3.1 Generierung einer stabilen Nexilin-Knockout-Zebrafischlinie mittels CRISPR/Cas9

In diesem Teilprojekt wurde die Generierung einer stabilen Nexilin-Knockout-Linie im Zebrafisch angestrebt. Im Gegensatz zu Knockdown-Versuchen wird bei Knockout-Versuchen ein direkter Eingriff ins Genom vorgenommen und die Translation und Proteinsynthese an der gewünschten Stelle unmittelbar beeinflusst.

3.1.1 Erzeugung der F_0- und F_1-Generation durch Mikroinjektion und anschließendem Auskreuzen mit Wildtypen

Das prinzipielle Vorgehen zur Etablierung einer Knockout-Linie im Zebrafisch mittels CRISPR/Cas9 wurde bereits unter 2.2.1.8 beschrieben. Zu Beginn der Generierung stand das Entwerfen einer geeigneten gRNA. Hierzu wurde das Programm CHOPCHOP genutzt. In dieser Arbeit wurden Exon 2 und Exon 7 des Gens NEXN als Target-Regionen der CRISPR/Cas9-vermittelten Genmodifikation ausgewählt. Die synthetisierte RNA wurde gemeinsam mit dem Cas9-Protein in befruchtete Fischeizellen im Ein-Zell-Stadium injiziert. Die daraus heranwachsenden Fische der ersten, also F_0-Generation sind in der Regel Träger multipler Mutationen. Dies ist in der Aktivitätszeit des CRISPR/Cas9-Systems begründet, die länger anhält als das Ein-Zell-Stadium der Eizellen, sodass in verschiedenen Zellen unterschiedliche Mutationen entstehen können. Außerdem sind meist nicht alle Zellen betroffen – es lässt sich neben mutierten Formen auch die Wildtypvariante (WT) nachweisen. In einer angefertigten PCR der betroffenen Region zeigte sich bei diesen Fischen ein verwaschenes und bei jedem Individuum anderes Bandenmuster (vergleiche Abb. 7 A).

Zur Generierung der F_1-Generation wurde ein ausgewählter Fisch der F_0-Generation mit einem WT ausgekreuzt. Die Fische der F_1-Generation waren dann heterozygote Träger einer spezifischen Mutation. In der Gelelektrophorese nach PCR zeigte sich dies als klares Bandenmuster mit je mindestens einer WT-Bande.

Exemplarisch zeigt Abb. 7 PCR-Analysen von Fischen der ersten beiden Generationen F_0 und F_1 mit einer CRISPR/Cas9-vermittelten Genmodifikation von Exon 2 des NEXN-Gens. In der ersten Generation (F_0), also den primär injizierten Fischen, wiesen die Individuen ein Mosaik multipler Mutationen sowie dem Wildtypgen auf. Ein zufällig ausgewählter Fisch (*) wurde mit einem Wildtyp ausgekreuzt. Die dabei entstandenen Fische der F_1-Generation waren entweder homozygote Wildtypen oder heterozygote Träger maximal einer Mutation in Abhängigkeit davon, ob die Keimzelle des F_0-Elternteils eine wildtypische oder eine mutierte Variante von Nexilin enthielt.

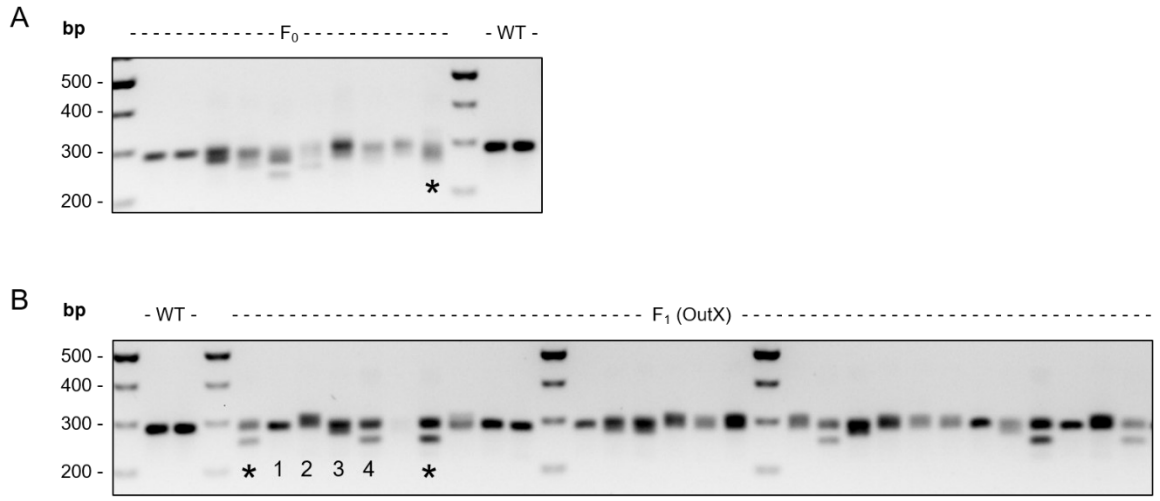

Abb. 7: Amplifikation von Exon 2 von NEXN der F_0- und F_1-Generation. Gezeigt sind die Gelelektrophoresen nach Amplifikation von Exon 2 mittels PCR (Polymerasekettenreaktion) aus DNA-Lysaten adulter Zebrafische. (A) zeigt dabei die primär injizierten Fische (F_0), (B) die durch Auskreuzen (OutX) entstandenen Nachkommen eines zufällig ausgewählten Fisches der F_0-Generation, jeweils im Vergleich zu Wildtypen (WT). Die Gelelektrophorese nach der Amplifikation von Exon 2 von einigen Fischen der F_0-Generation (primär injizierte Fische, A) ließ verwaschenen Banden erkennen, passend zum Vorliegen multipler Mutationen in einem Individuum. Der *-markierte Fisch in F_0 wurde zum Auskreuzen (OutX) mit einem WT-Fisch ausgewählt. Diese Nachkommen (F_1-Generation, B) waren heterozygote Träger maximal einer Mutation. Sie ließen sich in diesem Beispiel in vier Gruppen einordnen und durch Sequenzierung charakterisieren: WT (1), 10 bp-Insertion (2), 14 bp-Deletion (3) und 32 bp-Deletion (4). Die *-markierten Fische in (B) mit 32 bp-Deletion wurden nachfolgend durch Einkreuzen zur weiteren Etablierung einer stabilen Fischlinie verwendet. Die DNA-Amplifikation erfolgte in DNA-Lysaten aus Schwanzflossen adulter Fische. bp = Basenpaare. DNA = Desoxyribonukleinsäure.

3.1.2 Charakterisierung der Fischlinie mit induzierter 32 Basenpaar-Deletion in Exon 2 von Nexilin

Nachfolgend wird exemplarisch eine genauere Charakterisierung der durch Sequenzierung bestimmten 32 bp-Deletion dargestellt. Ein Vergleich dieser Sequenz mit der WT-Variante ist in Abb. 8 gezeigt. Die Deletion befand sich wie gewünscht im Bereich des Protospacers, also der zur crRNA komplementären Region der Zebrafisch-DNA.

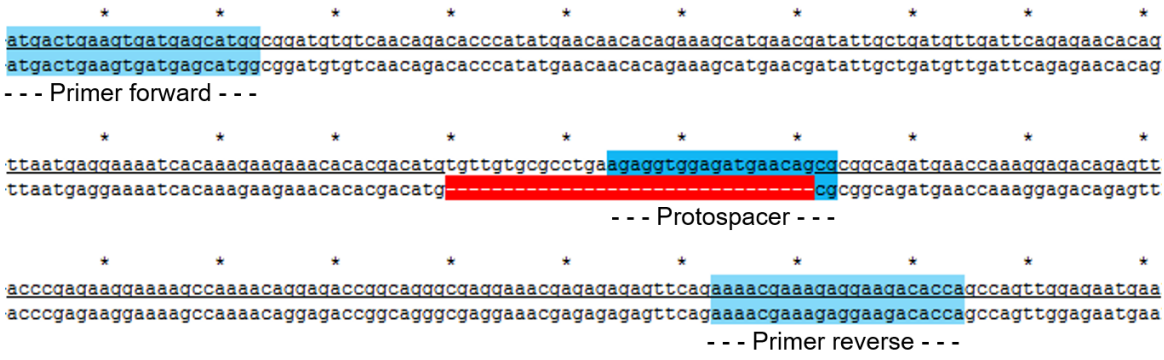

Abb. 8: Sequenzierung von Exon 2 des NEXN-Gens zeigt eine 32 bp-Deletion. Gezeigt ist die Sequenzierung eines ausgewählten Fisches der F_1-Generation im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz. Im Bereich des *Protospacers*, also der zur crRNA (CRISPR-RNA, mittelblau) komplementären Sequenz, wies die mutierte Variante (unten) im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz (oben) eine 32 bp umfassende Deletion (rot markiert) auf. bp = Basenpaare. CRISPR = *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat*. RNA = Ribonukleinsäure.

3.1.2.1 Genotypisierung der Mutationsträger und Verteilung in der F_2-Generation

Bereits in der Gelelektrophorese nach PCR war die 32 bp-Deletion aufgrund ihrer Größe gut zu detektieren. Abb. 9 zeigt dabei die Gelelektrophorese nach Amplifikation von Exon 2 in der F_2-Generation. Nach Kreuzen zweier heterozygoter Mutationsträger der F_1-Generation waren deren Nachkommen entweder WT, ebenfalls heterozygote oder aber homozygote Träger der 32 bp-Deletion.

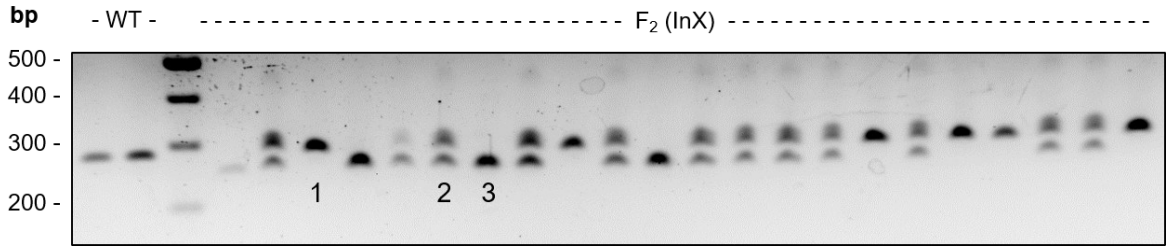

Abb. 9: Amplifikation von Exon 2 von NEXN in der F_2-Generation. Die Gelelektrophorese nach Amplifikation von Exon 2 in DNA-Lysaten von F_2-Embryonen (durch Einkreuzen, InX von F_1-Fischen mit identischer Mutation) zeigte das Vorkommen von Wildtypen (WT, 1) und heterozygoten (2) sowie homozygoten (3) Mutationsträgern der 32 bp-Deletion. Zum Vergleich ist die WT-Bande gezeigt. bp = Basenpaare. DNA = Desoxyribonukleinsäure.

Wie bereits beschrieben, erhält man durch Verpaaren zweier heterozygoter Träger einer Mutation der F_1-Generation theoretisch gemäß der Mendelschen Spaltungsregel in der F_2-Generation je 25 % homozygote Mutationsträger (-/-) und Wildtypen (+/+) sowie 50 % heterozygote Fische (+/-). Abb. 10 zeigt, dass diese Verteilung auch annähernd für die F_2-Generation der durch CRISPR/Cas9-generierten Zebrafische mit einer 32 bp-Deletion in Exon 2 von Nexilin zutreffend war.

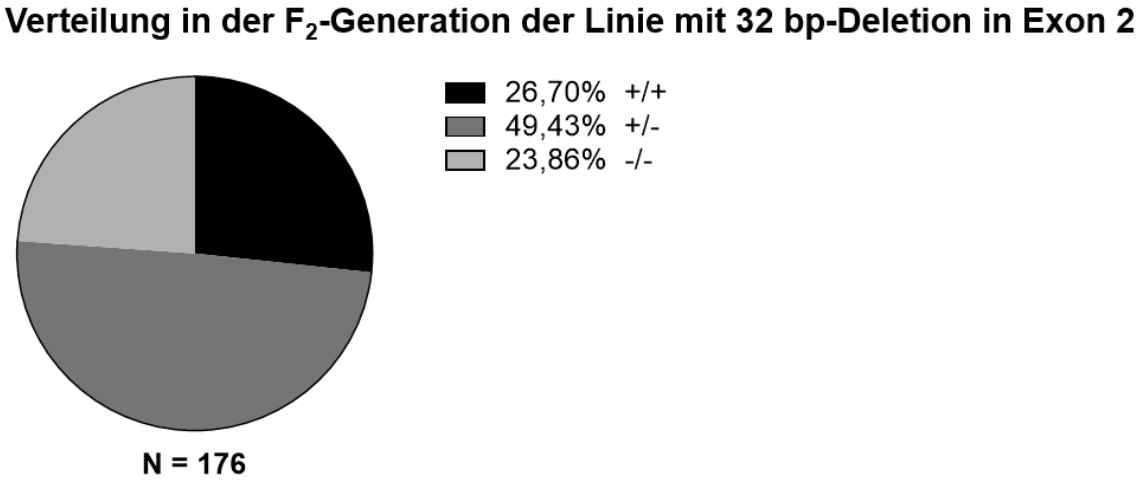

Abb. 10: Die F_2-Generation der 32 bp-Deletion-Linie wies eine Mendel-Verteilung auf. Durch Genotypisierung von Fischembryonen der F_2-Generation wird eine Verteilung von homozygoten Wildtypen (+/+), heterozygoten Mutationsträgern (+/-) und Fischen mit homozygoter 32 bp-Deletion (-/-) in Nexilin nach Mendel-Verteilung ersichtlich. N = Anzahl. bp = Basenpaare.

3.1.2.2 Bedeutung der Deletion auf Proteinebene: Leserahmenverschiebung und Reduktion der Proteinsynthese

Nach genauer Bestimmung der Mutation mittels Sequenzierung, stellte sich als nächstes die Frage nach den Auswirkungen dieser Mutation auf Proteinebene.

Durch Kenntnis der exakten DNA-Sequenz der Mutationsträger konnte zunächst die theoretische Auswirkung dieser Mutation auf Ebene der Aminosäuresequenz bestimmt werden. In diesem Fall führte der Verlust von 32 Basenpaaren in Exon 2 zu einer Verschiebung des Leserahmens und einer dadurch bedingten Entstehung eines neuen Stop-Codons in unmittelbarer Nähe zur generierten Deletion. Dies wird in Abb. 11 gezeigt, wobei die Translation der WT-Variante im Vergleich mit der 32 bp-Deletion-Variante dargestellt ist. Die WT-Variante wies im gezeigten Abschnitt kein Stop-Codon auf, sodass insgesamt ein Translationsprodukt mit einer Länge von 861 Aminosäuren entstand. Die mutierte Variante konnte hingegen nur für ein stark verkürztes, aus 49 Aminosäuren bestehendes Polypeptid codieren.

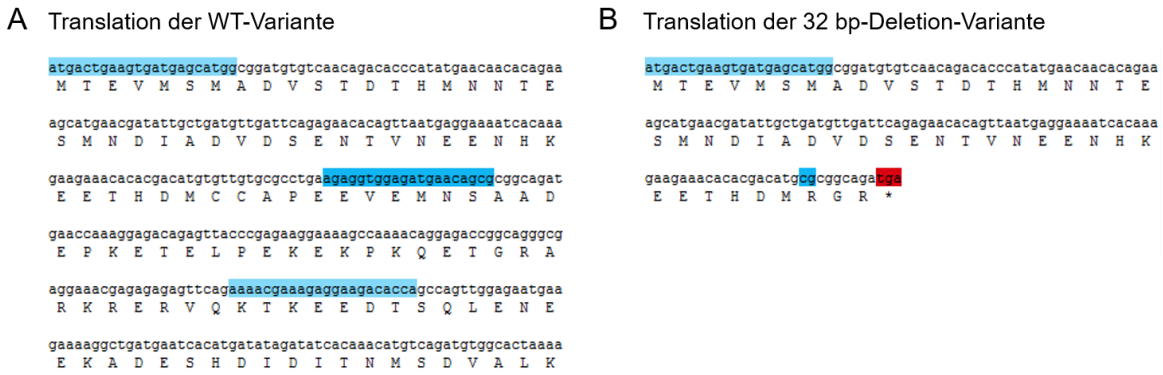

Abb. 11: 32 bp-Deletion in Exon 2 von Nexilin führte zu einem vorzeitigen Stop-Codon. Im Vergleich zum WT- (Wildtyp) Translationsprodukt von Nexilin ab Exon 2 (A) zeigte die 32 bp-Deletion-Variante (B) eine Leserahmenverschiebung und ein daraus folgendes vorzeitiges Stop-Codon (*) wenige Aminosäuren nach der Deletion. Gezeigt ist jeweils die DNA-Sequenz (oben; hellblau = *Primer forward* und *Primer reverse*, mittelblau = crRNA) und die daraus translatierte Aminosäurensequenz (unten). bp = Basenpaare. DNA = Desoxyribonukleinsäure. crRNA = CRISPR-RNA. CRISPR = *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat*. RNA = Ribonukleinsäure

Um aber eine Aussage über die tatsächliche Auswirkung einer generierten Mutation auf die Expression dieses Gens treffen zu können, war eine Analyse auf Protein-

ebene notwendig. Diese wurde mittels Western Blot aus Proteinlysaten von Fischembryonen durchgeführt. Hierbei wurden homozygote Träger der 32 bp-Deletion in Exon 2 mit WT-Fischen verglichen. Der verwendete Antikörper gegen Nexilin interagierte im mittleren Anteil des Proteins im Bereich der CC- und zweiten ABD-Domäne beziehungsweise der Exons 7-11 (vergleiche hierzu Abb. 3). Die Nexilin-Bande sollte bei einem Molekulargewicht von etwa 102 kDa knapp oberhalb der 100 kDa-Marke detektiert werden können.

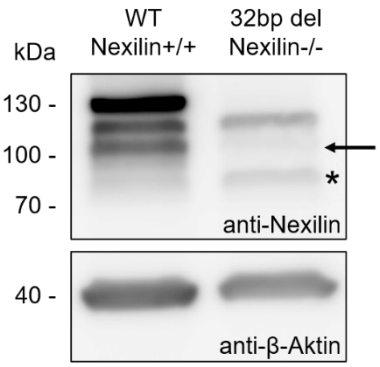

Abb. 12: Die 32 bp-Deletion in Exon 2 von Nexilin führte zu einem verringerten Nachweis von Nexilin im Western Blot. Ein Western Blot aus Proteinlysaten von Zebrafischembryonen zeigte einen verminderten Nachweis von Nexilin in den Fischen mit 32 bp-Deletion (Nexilin$^{-/-}$) im Vergleich zu WT- Fischen (Wildtyp, Nexilin $^{+/+}$). Auffällig war insbesondere ein scheinbar verstärkter Nachweis einer leichteren Bande (*) sowie eine deutliche Abschwächung des Signals der eigentlichen Nexilin-Bande (←) in den Nexilin$^{-/-}$-Fischen. Als Ladungskontrolle diente β-Aktin. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei Experimenten. Da = Dalton. bp = Basenpaare. del = Deletion.

Der in Abb. 12 gezeigte Western Blot ließ eine deutlich verringerte Nexilin-Bande (←) in den mutierten Fischen erkennen. Interessanterweise zeigte sich zudem insbesondere bei den mutierten Fischen ein stärkeres Signal einer leichteren Bande (*) mit einem Molekulargewicht zwischen 70 und 100 kDa. Es ergab sich die Hypothese, dass in diesen Fischen eine verkürzte Nexilin-Variante exprimiert wird. Dies wäre beispielsweise aufgrund eines alternativen Start-Codons möglich, welches von der generierten Mutation unbeeinflusst bleibt und dennoch eine Expression des Proteins ermöglicht. Recherchen in entsprechenden Datenbanken ergaben tatsächlich eine Expression zweier Nexilin-Varianten im Zebrafisch. Bei der längeren Variante (NCBI: NM_001083855.2) handelt es sich um das in Abb. 3 gezeigte 15 Exon und 861 Aminosäuren lange sowie 102 kDa schwere Protein. Die kürzere Variante (NCBI: DQ464901.1) hingegen beginnt mit einem alternativen

Start-Codon bei Exon 3 und weist eine Gesamtlänge von 13 Exons und 748 Aminosäuren sowie ein Molekulargewicht von etwa 89 kDa auf. Bei der im gezeigten Western Blot sichtbaren leichteren Bande handelt es sich möglicherweise um diese beschriebene kürzere Variante des Proteins, was aber nicht endgültig überprüft wurde. Um dennoch einen kompletten Knockout von NEXN im Zebrafisch zu erreichen und die mögliche Expression dieser kürzeren Proteinvariante zu vermeiden, wurde in einem weiteren Ansatz Exon 7 als Ziel-Region der CRISPR/Cas9-Genmodifikation gewählt (vgl. 3.1.3).

Zudem waren im gezeigten Western Blot (Abb. 12) höhere Banden mit einem größeren Molekulargewicht zu erkennen, welche ebenfalls in den Proteinlysaten der KO-Fische vermindert oder nicht nachweisbar waren. Damit sprach dies für eine Detektion von Nexilin und gegen ein unspezifisches Binden der Antikörper an ein anderes Protein. Möglicherweise handelt es sich um posttranslational modifiziertes Nexilin, was jedoch nicht im Rahmen dieser Arbeit behandelt wurde.

3.1.2.3 Keine morphologischen Veränderungen oder funktionelle kardiale Einschränkungen der homozygoten Mutationsträger

In Kenntnis der genauen Mutation und deren Auswirkungen auf die Proteinexpression, war nun von Interesse, inwieweit dieser reduzierte Nachweis von Nexilin in den homozygoten Mutationsträgern morphologische und funktionelle Konsequenzen hat. Wie zuvor beschrieben konnte das Vorkommen von homozygoten Mutationsträgern (Nexilin$^{-/-}$) in der F_2-Generation in normaler Zahl bereits mittels Genotypisierung gesichert werden (vergleiche Abb. 10).

Zur morphologischen Charakterisierung insbesondere im zeitlichen Verlauf der Entwicklung wurden die Fischembryonen zu unterschiedlichen Zeitpunkten beobachtet. Hierbei wurden homozygote Mutationsträger mit Wildtypen verglichen.

Im Falle der 32 bp-Deletion in Exon 2 von Nexilin war kein Unterschied der homozygoten Träger dieser Mutation zum normalen Erscheinungsbild von WT-Zebrafischen erkennbar. Insbesondere waren keine Auffälligkeiten des kardiovaskulären Systems wie eine Dilatation der Herzräume, ein perikardiales Ödem oder eine

Störung der Blutzirkulation ersichtlich. Abb. 13 zeigt exemplarisch Nexilin-/- und WT-Fischembryonen zu den Zeiten 24, 48 und 72 hpf. Auch die weitere Entwicklung zu geschlechtsreifen adulten Tieren verlief unauffällig.

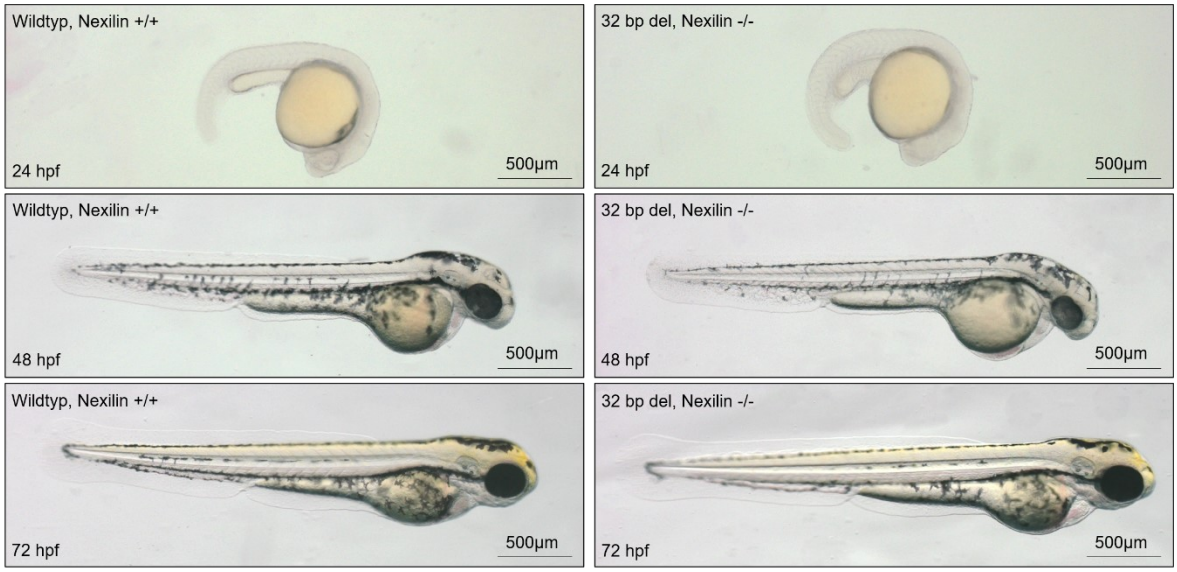

Abb. 13: Homozygote Fische mit 32 bp-Deletion zeigten keinen pathomorphologischen Phänotyp. Zebrafischembryonen mit einer 32 bp-Deletion (32 bp del) auf beiden Allelen (Nexilin -/-) unterschieden sich morphologisch zu den Zeitpunkten 24 hpf, 48 hpf und 72 hpf nicht von Wildtyp-Embryonen (Nexilin +/+). hpf = *hours post fertilization*.

Angesichts der bekannten Assoziation von Nexilin-Mutationen und -defizienz für die Funktionsfähigkeit des Herzens wurde neben der Morphologie auch die Herzfunktion der homozygoten Mutationsträger untersucht. Bereits die unauffällige Morphologie und die normale Entwicklung zu adulten Tieren gaben dabei einen Hinweis auf eine intakte Herz-Kreislauffunktion. Nach Analyse von Herzrate und Ventrikelkontraktionsfähigkeit wurde diese Vermutung bestätigt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Nexilin-Mutationsträgern und den WT- beziehungsweise heterozygoten Geschwistern bezüglich dieser Parameter (vergleiche Abb. 14).

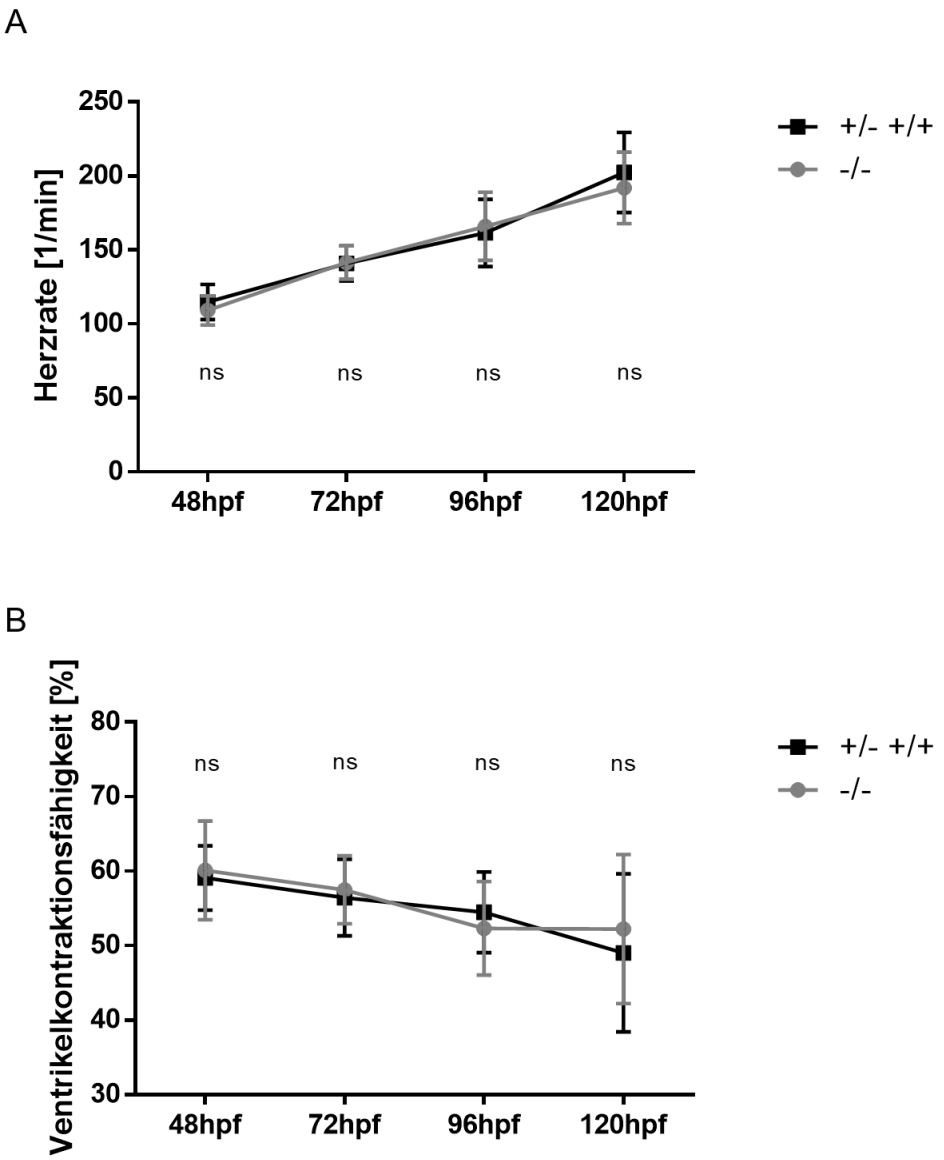

Abb. 14: Keine signifikanten Unterschiede in Herzrate (A) und Ventrikelkontraktionsfähigkeit (B) zwischen homozygoten Mutationsträgern und deren WT- beziehungsweise heterozygoten Geschwistern. Beim Vergleich der Parameter Herzrate und Ventrikelkontraktionsfähigkeit in den ersten 120 Stunden der Embryonalentwicklung zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen homozygoten Trägern der 32bp-Deletion (-/-) und ihren WT- und heterozygoten Geschwistern (+/+, +/-). Pro Zeitpunkt (in hpf = *hours post fertilization*) wurden je 23-50 Embryonen gefilmt und analysiert sowie im Anschluss genotypisiert und so der jeweiligen Gruppe zugeordnet. bp = Basenpaare. ns = nicht signifikant ($p > 0,05$). WT = Wildtyp. Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen.
Herzrate [1/min]: 48 hpf: 109,2 ± 9,9 (-/-) vs. 114,9 ± 11,9 (+/+, +/-). 72 hpf: 141,5 ± 11,3 vs. 141,0 ± 11,9. 96 hpf: 166 ± 23,1 vs. 161,5 ± 22,8. 120 hpf: 192,0 ± 24,3 vs. 202,3 ± 27,1. Signifikanztests: t-Test (72 hpf), Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (24, 96, 120 hpf).
Ventrikelkontraktionsfähigkeit [%]: 48 hpf: 60,1 ± 6,6 (-/-) vs. 59,1 ± 4,3 (+/+, +/-). 72 hpf: 57,5 ± 4,6 vs. 56,5 ± 5,2. 96 hpf: 52,3 ± 6,3 vs. 54,5 ± 5,4. 120 hpf: 52,2 ± 10,2 vs. 49,0 ± 10,6. Signifikanztests: t-Test (72, 96, 120 hpf), Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (48 hpf).

3.1.3 Charakterisierung der Fischlinie mit induzierter 5 Basenpaar-Deletion in Exon 7 von Nexilin

Aufgrund der zwar erfolgreichen Mutationsinduktion in Exon 2 von Nexilin, aber der dennoch fehlenden phänotypischen Auswirkung dieses Knockouts wurde in einem zweiten Versuch Exon 7 als Zielsequenz gewählt. Exon 7 liegt etwa mittig in dem 15 Exon langen NEXN-Gen und codiert zudem für einen Teil einer wichtigen funktionalen Domäne (vergleiche Abb. 3). Im Gegensatz zur zuvor gezeigten Mutation in Exon 2 liegt die Zielregion in Exon 7 hinter dem alternativen Start-Codon zu Beginn von Exon 3. Die Expression der beschriebenen kürzeren Nexilin-Variante wäre somit für einer Mutationsgenerierung in Exon 7 ohne Relevanz.

Die hier exemplarisch ausgewählte Mutation konnte in der Sequenzierung als 5 Basenpaar-Deletion identifiziert werden (vergleiche Abb. 15). Auch sie befand sich wie erwartet im Bereich des Protospacers.

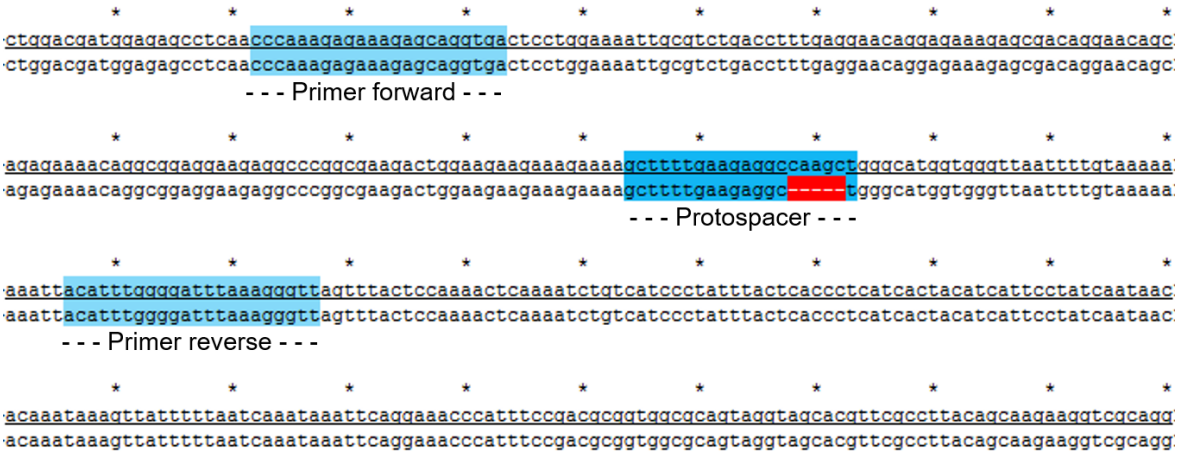

Abb. 15: Sequenzierung von Exon 7 von NEXN zeigte eine 5 bp-Deletion. Im Bereich des *Protospacers*, also der zur crRNA (CRISPR-RNA, mittelblau) komplementären Sequenz, wies die mutierte Variante (unten) im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz (oben) eine 5 bp (Basenpaare) umfassende Deletion (rot) auf. CRISPR = *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat*. RNA = Ribonukleinsäure.

3.1.3.1 Genotypisierung und Mendel-Verteilung in der F_2-Generation

Zunächst sollte auch hier die Differenzierung zwischen Wildtypen und mutierten Fischen mit Hilfe einer Amplifikation des betroffenen Genabschnittes, also Exon 7 und einer anschließenden Gelelektrophorese gezeigt werden. Aufgrund der geringen Länge der generierten 5 bp-Deletion und somit geringen Differenz der Gesamtlängen des Exons von WT zur mutanten Variante wurde hier zur besseren Unterscheidung zusätzlich ein Restriktionsverdau des PCR-Produktes durchgeführt. Das verwendete Enzym konnte lediglich die WT-Variante, nicht jedoch die Deletionsvariante schneiden. Erst im Anschluss erfolgte die Auftrennung mittels Gelelektrophorese, bei der die Varianten dann eindeutig zu unterscheiden waren. Abb. 16 zeigt diese Gelelektrophorese nach Amplifikation von Exon 7 und anschließendem Restriktionsverdau aus Zelllysaten von Fischen der F_2-Generation.

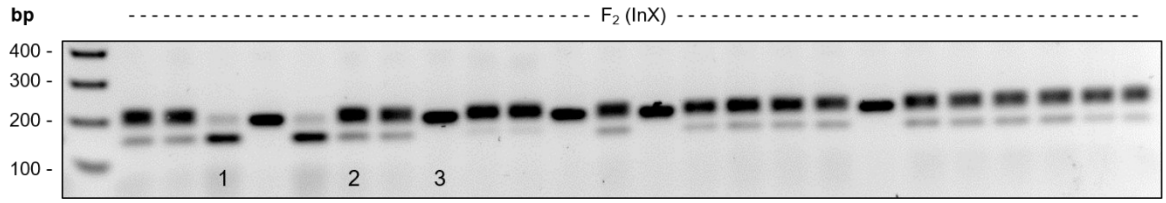

Abb. 16: Amplifikation von Exon 7 in der F_2-Generation. Die Gelelektrophorese nach Amplifikation von Exon 7 und anschließendem Restriktionsverdau mit XcmI ermöglichte die Differenzierung zwischen Wildtyp (1) sowie heterozygoten (2) und homozygoten (3) Trägern der 5 bp-Deletion. Gezeigt ist dies für Individuen der F_2-Generation, die durch Einkreuzen (InX) heterozygoter Mutationsträger der F_1-Generation entstanden. bp = Basenpaare.

Zur Untersuchung, ob auch für diese Fischlinie eine Verteilung nach der Mendelschen Spaltungsregel vorlag, wurden insgesamt 220 Fische der F_2-Generation genotypisiert. Die nahezu normale Verteilung von je etwa 25 % +/+ und -/- sowie ungefähr 50 % +/- ist in Abb. 17 gezeigt.

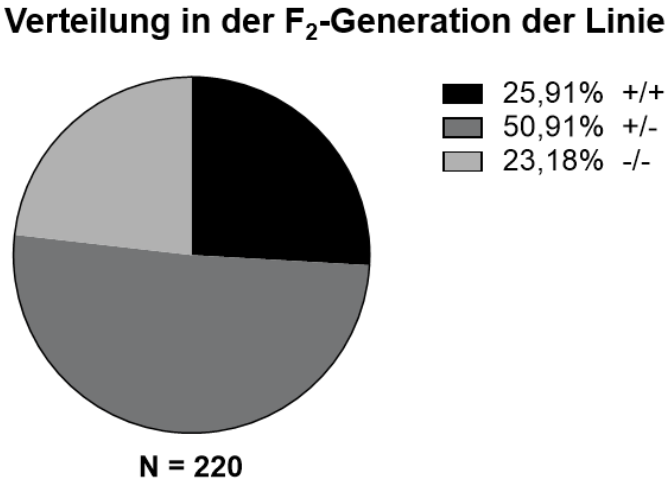

Abb. 17: Mendel-Verteilung in der F_2-Generation der 5 bp-Deletion-Linie. Eine quantitative Auswertung der unterschiedlichen Genotypen in der F_2-Generation zeigte eine Verteilung von Wildtyp (+/+), heterozygot (+/-) und homozygot (-/-) nach der Mendelschen Spaltungsregel. N = Anzahl. bp = Basenpaar.

3.1.3.2 Bedeutung der Deletion auf Proteinebene: Leserahmenverschiebung und Knockout mit Proteinverlust durch die 5 bp-Deletion in Exon 7

Ebenso wie für die Deletion in Exon 2 war auch hier die Auswirkung der Mutation auf die Aminosäuresequenz und Proteinsynthese von entscheidender Bedeutung.

Wie auch die 32 bp-Deletion führte die 5 bp-Deletion in Exon 7 zu einem Verschieben des Leserahmens mit anschließender Entstehung eines Stop-Codons (vergleiche Abb. 18). Dies hat theoretisch einen vorzeitigen Abbruch der Aminosäurekette nach insgesamt etwa 393 Aminosäuren im Vergleich zur WT-Variante mit einer Länge von 861 Aminosäuren zur Folge.



Abb. 18: Die 5 bp-Deletion in Exon 7 von Nexilin führte zu einem vorzeitigen Stop-Codon. Im Vergleich zum WT- (Wildtyp) Translationsprodukt von Nexilin im Bereich von Exon 7 (hellblau = *Primer forward*, mittelblau = CRISPR-RNA) zeigte die Variante mit einer 5 bp-Deletion eine Leserahmenverschiebung und ein daraus folgendes vorzeitiges Stop-Codon (*) wenige Aminosäuren nach der Deletion. Gezeigt ist jeweils die DNA-Sequenz (oben) und die daraus translatierte Aminosäurensequenz (unten) im Bereich von Exon 7. bp = Basenpaare. DNA = Desoxyribonukleinsäure. RNA = Ribonukleinsäure. CRISPR = *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat*.

Wie schon zuvor für die Mutation in Exon 2 beschrieben, wurden die tatsächlichen Auswirkungen der Mutation auf die Proteinsynthese durch Analyse von Proteinlysaten mittels Western Blot ermittelt. Der entsprechende Western Blot (Abb. 19) zeigte in diesem Fall einen vollständigen Verlust des Proteins Nexilin durch die 5 bp-Deletion in Exon 7. Eine leichtere Bande, wie sie noch bei den Fischen mit Deletion in Exon 2 zu sehen war, war hier nicht zu erkennen. Scheinbar Nexilin-spezifische Banden mit höherem Molekulargewicht, die in den KO-Fischen verloren gingen waren auch hier zu erkennen, wurden aber in dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Insgesamt konnte ein kompletter Knockout des Gens durch die 5 bp-Deletion in Exon 7 angenommen werden.

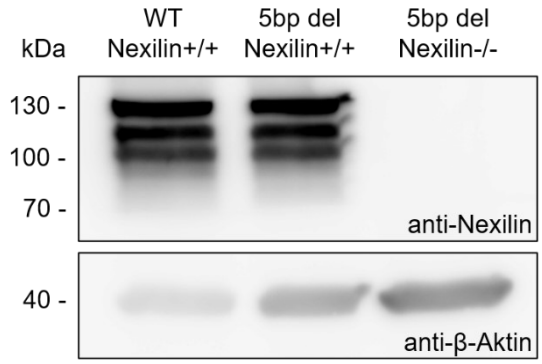

Abb. 19: Vollständiger Proteinverlust durch die 5 bp-Deletion in Exon 7. Im Western Blot war ein kompletter Verlust der Nexilin-Bande in Proteinlysaten von für die 5 bp-Deletion homozygoten Embryonen ersichtlich. Echte WT- (Wildtyp) Embryonen beziehungsweise die WT-Geschwister (5 bp del Nexilin$^{+/+}$) der mutanten Fische (5 bp del Nexilin$^{-/-}$) wiesen eine normale Nexilin-Bande auf. Als Ladekontrolle diente β-Aktin. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten. bp = Basenpaare. Da = Dalton. del = Deletion.

3.1.3.3 Fehlende morphologische Auffälligkeiten der homozygoten Mutationsträger

Nach der erfolgreichen Generierung einer Fischlinie mit einer 5 bp-Deletion in Exon 7 und dem Nachweis, dass diese Mutation tatsächlich zu einem Verlust des Proteins Nexilin führt, sollten in einem folgenden Schritt die Auswirkungen dieses Verlustes untersucht werden.

Hierzu wurden die homozygot mutierten Fische mit 5 bp-Deletion in Exon 7 (Nexilin-/-) mit ihren Geschwistern mit zwei WT-Allelen (Nexilin+/+) im Verlauf ihrer Entwicklung verglichen. Analog zu den zuvor gezeigten Fischen mit einer Mutation in Exon 2 zeigten sich auch hier keine morphologischen Unterschiede der Embryonen (vergleiche Abb. 20). Die Knockout-Fische wiesen zu keinem Zeitpunkt der embryologischen Entwicklung einen spezifischen Phänotyp auf. Insbesondere waren keine Fehlbildungen im Bereich des Herz-Kreislaufsystems oder eine muskuläre Beeinträchtigung zu erkennen. Im weiteren Verlauf entwickelten sie sich unauffällig zu adulten und fertilen Tieren. Aufgrund des fehlenden morphologischen Phänotyps und der regelrechten Entwicklung wurde auf eine funktionelle Analyse der Herzparameter (Herzrate und Ventrikelkontraktionsfähigkeit) verzichtet.

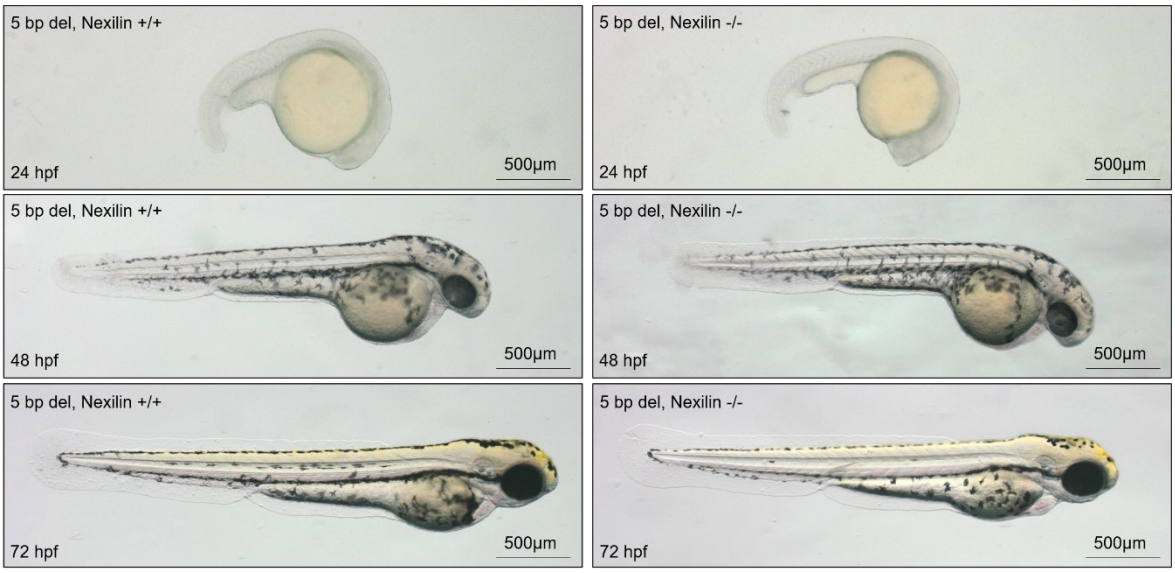

Abb. 20: Unauffällige embryonale Entwicklung der homozygoten Träger einer 5 Basenpaar-Deletion in Exon 7 von Nexilin. Ein Vergleich der Morphologie in den ersten 72 Stunden von homozygoten Mutationsträgern der 5 Basenpaar Deletion (5 bp del, Nexilin -/-) und deren Geschwistern mit zwei Wildtypallelen (5 bp del, Nexilin +/+) wies keine Unterschiede auf. hpf = *hours post fertilization*. bp = Basenpaare.

3.1.4 Zusammenfassende Betrachtung

In einer gemeinsamen Betrachtung aller bisher geschilderten Ergebnisse des Kapitels 3.1 wird ersichtlich, dass mit der Methode CRISPR/Cas9 eine Nexilin-Knockout Zebrafischlinie generiert werden konnte. Sowohl in Exon 2 als auch in Exon 7 konnte eine Mutation induziert werden, die über eine Leserahmen-verschiebung zu einer reduzierten beziehungsweise aufgehobenen Protein-synthese führte. In beiden Fällen wiesen die homozygoten Mutationsträger jedoch keinen pathomorphologischen Phänotyp auf.

3.2 Transgene Nexilin-Fischlinie

Im Folgenden soll das Vorgehen zur Etablierung einer transgenen Nexilin-Fischlinie beschrieben werden, die Nexilin als Nexilin-GFP-Fusionsprotein exprimieren soll. Eine transgene Linie bietet den Vorteil, dass die Expression eines Gens, in diesem Fall NEXN, direkt *in vivo* mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden kann. Eine postmortale Färbung der Fischembryonen ist deshalb nicht notwendig. Neben der genauen Lokalisation des Proteins kann so zudem die Expressionsintensität im zeitlichen Verlauf der Entwicklung beobachtet werden.

3.2.1 Klonierung eines Transgenese-Vektors, Injektion ins Ein-Zell-Stadium und weitere Vorgehensweise

In einem ersten Schritt erfolgte die Klonierung eines geeigneten Vektors. Das hier ausgewählte Tol2-Multisite-Gateway-System ermöglichte die Generierung eines Vektors mit insgesamt drei DNA-Fragmenten. Der finale Vektor trug in seinem Tol2-pA2-Rückgrat einen für die Expression in Muskelgewebe spezifischen unc45b^{min}-Promotor an 5‘Stelle, eine EGFP-polyA an 3’Position und dazwischen das Zielgen NEXN (Zebrafischvariante, also zNEXN). Dieses und GFP waren dabei ohne Unterbrechung des Leserahmens kombiniert, was die Expression eines Fusionsproteins ermöglicht. Eine schematische Darstellung des gesamten Vektors Tg(unc45b^{min}:zNEXN-EGFP) ist in Abb. 6 zu sehen. In einem zweiten Schritt wurde der Vektor gemeinsam mit einer Transposase-mRNA in gleicher Konzentration in Fischembryonen während des Ein-Zell-Stadiums injiziert. Die Transposase sollte die Integration der Vektor-DNA ins Zebrafischgenom vermitteln.

In einigen injizierten Embryonen konnte bereits in frühen Entwicklungsstadien eine GFP-Expression in der quergestreiften Muskulatur der Schwanzflosse nachgewiesen werden. In Abb. 21 werden exemplarisch Embryonen in einem Entwicklungszeitraum von 24 hpf bis 120 hpf gezeigt, in deren Flosse einzelne Muskelzellen GFP exprimieren. Anzumerken ist hier, dass es sich dabei sowohl um eine erfolgreiche Transgenese als auch lediglich um einen transienten Effekt des Vektors handeln kann. Eine Differenzierung mittels Mikroskops ist nicht möglich.

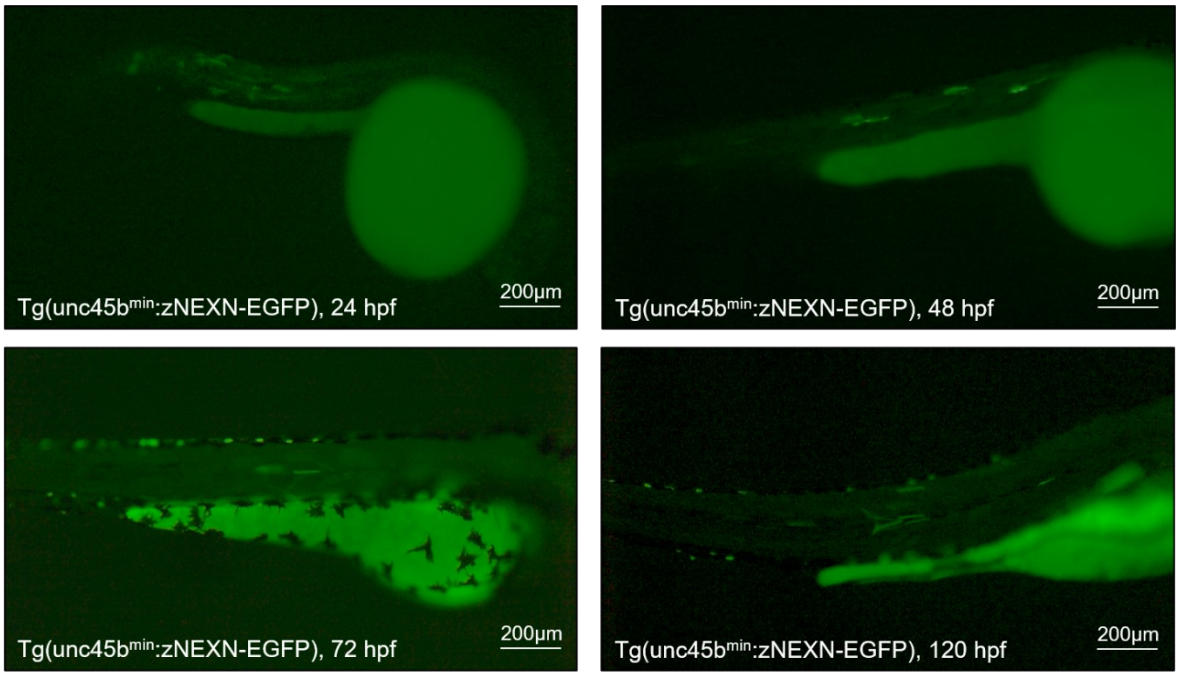

Abb. 21: GFP-Expression in embryonaler Entwicklung von Tol2-injizierten Fischen. Zebrafischembryonen, denen im Ein-Zell-Stadium das Konstrukt Tg(unc45b^{min}:zNEXN-EGFP) gemeinsam mit Transposase-mRNA injiziert wurde, zeigen zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten einzelne fluoreszierende Muskelzellen im Bereich der Schwanzflosse. hpf = *hours post fertilization*. (E)GFP = *(enhanced) green fluorescent protein*. mRNA = *messenger-RNA*. RNA = Ribonukleinsäure.

Sobald die injizierten Fische das adulte Alter erreicht haben, sollten die erfolgreich transfizierten Individuen selektiert werden. Diese tragen das Transgen in ihren Keimzellen und können es somit an die Nachkommen weitergeben. Durch Kreuzen dieser sogenannten *Founder*-Fische untereinander erhält man homozygote Träger dieses Transgens. Diese sollten Nexilin dann regelhaft als Fusionsprotein mit GFP exprimieren können.

3.2.2 Schwierigkeiten bei der Generierung einer transgenen Nexilin-Zebrafischlinie

Nachdem die Vorgehensweise der Generierung einer transgenen Nexilin-Linie sowie die ersten Schritte beschrieben wurden, sollen nun die dabei aufgetretenen Probleme und Schwierigkeiten dargelegt werden.

Wie bereits zuvor beschrieben zeigt Abb. 21 Beispiele für Fischembryonen mit GFP-Expression nach Injektion des Tol2-Plasmids in Kombination mit einer Transposase-mRNA. Insgesamt zeigten jedoch nur wenige injizierte Embryonen überhaupt eine GFP-Expression und diese auch nur in verhältnismäßig geringerem Ausmaß als erwartet. Lediglich einzelne Muskelzellen der Schwanzflosse erschienen grün-fluoreszierend.

Eine weitere Schwierigkeit stellte eine sehr geringe Toleranzbreite der Embryonen gegenüber der Konzentration des injizierten Plasmids und der Transposase-mRNA dar. Die Embryonen tolerierten lediglich eine Injektion von 15-18 ng/µl. Erfolgte die Injektion einer höher konzentrierten Injektionslösung, führte dies zum Tod der Embryonen. Wurde hingegen eine geringere Konzentration für die Injektion verwendet, konnte keinerlei GFP-Expression nachgewiesen werden. Die Toleranzbreite zwischen letaler Dosis und Konzentration ohne jegliche Wirkung erwies sich in diesem Falle also als relativ gering.

Als letzte Problematik ergab sich, dass sich unter den wenigen Fischen mit positiver Expression im Embryonalstadium keine *Founder*-Fische befanden. Nach Verpaarung im adulten Alter wiesen die Nachkommen in keinem der Fälle eine GFP-Expression in Muskelzellen auf. Dementsprechend erlaubt sich die Schlussfolgerung, dass die Integration des Plasmids zur Expression des Nexilin-GFP-Fusionsproteins ins Genom und insbesondere den Keimzellen in keinem Fisch erfolgreich war.

Trotz Überprüfung des injizierten Plasmids mittels Sequenzierung sowie mehrfachen Versuchen unter Optimierung der Bedingungen wie beispielsweise einer temporären Erhöhung der Umgebungstemperatur während der Embryonalperiode war die Generierung einer transgenen Nexilin-Zebrafischlinie im Rahmen dieser Arbeit letztlich nicht möglich.

3.3 Interaktion von Nexilin mit anderen Proteinen in der Zellkultur

In einem letzten Teilprojekt wurde der Fokus auf die zelluläre Bedeutung des Proteins Nexilin und im Speziellen der Interaktion mit anderen Proteinen gelegt. Als Grundlage der durchgeführten Versuche diente ein Zellkultursystem mit HEK-293T-Zellen.

3.3.1 Interaktion von Nexilin mit dem Aktinzytoskelett

In einem ersten Schritt sollte die Interaktion zwischen Nexilin und Aktin validiert und weiter charakterisiert werden. Wie eingangs bereits dargelegt ist Aktin ein bekannter Interaktionspartner von Nexilin. Insbesondere in quergestreifter Muskulatur lokalisiert Nexilin ebenso wie Aktin an den Z-Scheiben der Sarkomere.

Zur Validierung der Interaktion von Nexilin mit dem Zytoskelettprotein Aktin wurde ein Zellkultursystem verwendet. Hierfür wurde Nexilin und ein daran gekoppelter V5-*Tag* als Plasmid mittels Lipofektion in HEK-293T-Zellen eingebracht. (Eine schematische Darstellung des verwendeten Vektors findet sich unter 2.2.3.3.2, Abb. 5) In den Nexilin-transfizierten Zellen wurden im Anschluss Nexilin (via V5-*Tag*) sowie endogene Aktinstrukturen durch Immunfluoreszenz gefärbt. Als Negativkontrolle diente eine Färbung von endogenem Tubulin, einem weiteren Element des Zytoskeletts mit einer von Aktin abweichenden intrazellulären Lokalisation. Hier war eine überwiegende Deckung der Färbung von Nexilin und Aktin, also eine Kolokalisation zu erkennen. Nexilin und Tubulin hingegen wiesen keine übereinstimmende zelluläre Lokalisation auf. Weiter verdeutlicht werden konnte dies durch eine Intensitätsmessung der Fluoreszenz in einer repräsentativen Region. Es zeigten sich übereinstimmende Intensitäts-Peaks bei Nexilin und Aktin, wohingegen dies bei Nexilin und Tubulin nicht der Fall war (vergleiche Abb. 22).

Zur genaueren Charakterisierung der Interaktion von Nexilin und Aktin wurden analog zum vorherigen Versuch die Zellen mit dem Nexilin-enthaltenden Plasmid transfiziert. Im Anschluss wurden die transfizierten Zellen mit Cytochalasin D behandelt. Diese Substanz führt zu einer Zerstörung der typischen Aktinzytoskelettstruktur durch eine Unterbindung der Polymerisation von F-Aktin. Zur Kontrolle

wurden ebenfalls transfizierte Zellen mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Erst im Anschluss erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung. Diese sind in Abb. 22 B/C dargestellt. Die Färbung zeigte eine deutliche Zerstörung des Zytoskeletts in den Cytochalasin D-behandelten Zellen. Beim Vergleich von erfolgreich Nexilin-transfizierten Zellen, also Zellen, in denen mittels V5-*Tag* transfiziertes Nexilin nachweisbar war, mit nicht Nexilin-transfizierten Zellen fiel diesbezüglich folgender Unterschied auf: die Nexilin-transfizierten Zellen wiesen in wesentlich geringerem Umfang eine Zerstörung des Aktinzytoskeletts nach Behandlung mit Cytochalasin D auf. In den nicht-transfizierten Zellen hingegen war das Zytoskelett durch die Cytochalasin D-Behandlung meist sichtlich zerstört. Diese Beobachtung der erhaltenen normalen Lokalisation von Aktin sowie erhaltenen Kolokalisation mit Nexilin trotz Cytochalasin D-Behandlung wird anhand einer graphischen Intensitätsdarstellung eines ausgewählten Bereiches einer erfolgreich Nexilin-transfizierten Zelle in Abb. 22 C‘ demonstriert.

Zur Verdeutlichung der geschilderten Effekte zeigt Abb. 23 jeweils den direkten Vergleich zwischen einer erfolgreich Nexilin-transfizierter Zelle und einer nicht-erfolgreich transfizierten Zelle unter dem Einfluss von DMSO beziehungsweise Cytochalasin D. Die in Abb. 24 dargestellte quantitative Auswertung dieser Beobachtung zeigt, dass das Aktinzytoskelett bei etwa 75 % der erfolgreich Nexilin-transfizierten Zellen erhalten war. Bei nicht-transfizierten Zellen war der Anteil an Zellen mit intaktem Aktinzytoskelett mit etwa 8 % signifikant geringer. Aus diesen Ergebnissen ergibt sich die Hypothese einer stabilisierenden Funktion von Nexilin auf das Aktinzytoskelett.

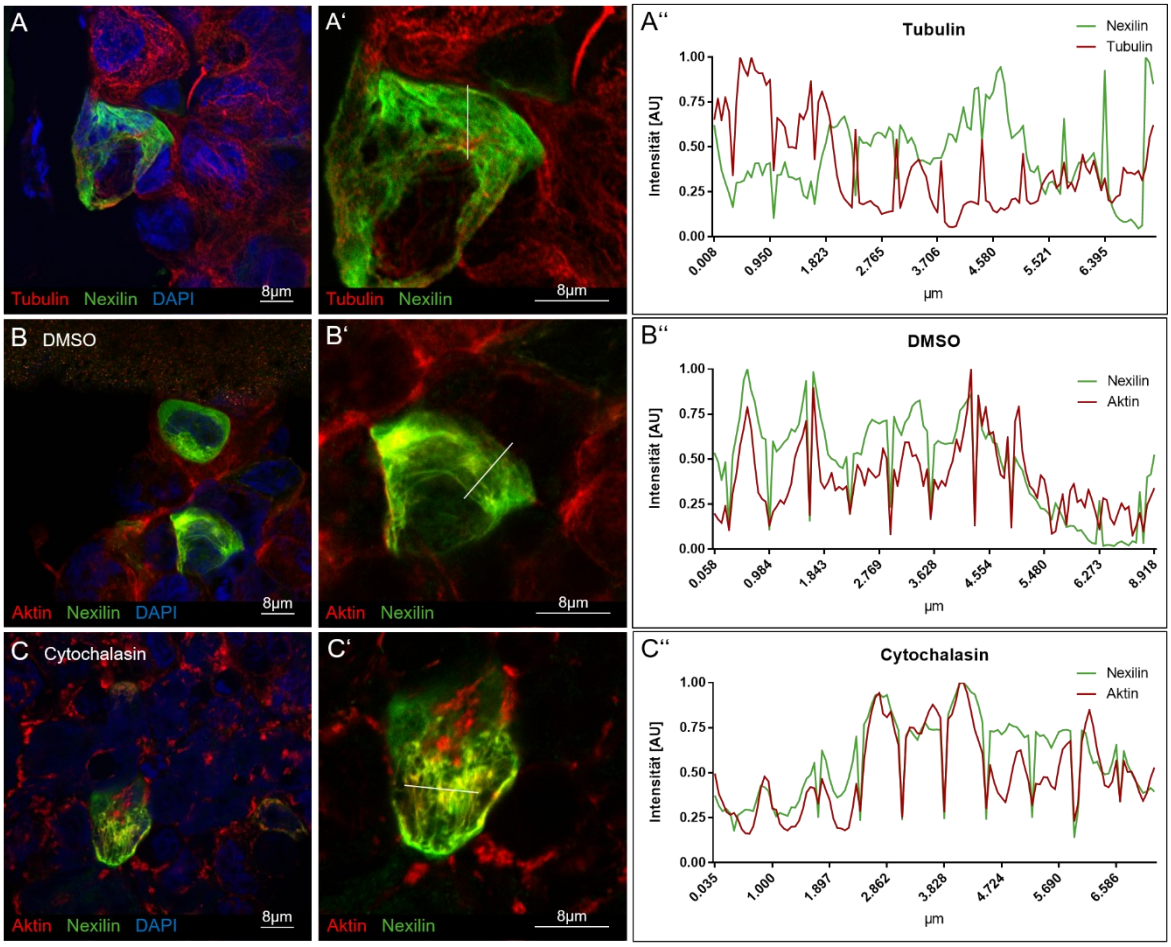

Abb. 22: Nexilin zeigte auf zellulärer Ebene eine Kolokalisation mit Aktin und stabilisierte das Aktinzytoskelett. Gezeigt werden jeweils Nexilin-V5-transfizierte HEK-293T-Zellen mit Fluoreszenzfärbungen gegen Nexilin und Tubulin (A) beziehungsweise Nexilin und Aktin (B, C). Die Bilder der zweiten Spalte (A‘, B‘, C‘) zeigen jeweils einen Ausschnitt des ersten Bildes (A, B, C). Die Grafiken (A“, B“, C“) stellen hingegen den Intensitätsverlauf der beiden Färbungen entlang der in der zweiten Spalte markierten Linie dar. Neben der Transfektion wurden die Zellen der zweiten Zeile (B) mit dem Lösungsmittel DMSO (Dimethylsulfoxid) behandelt. Sie stellten die Kontrolle zur Behandlung mit dem Aktinpolymerisationshemmer Cytochalasin D dar (dritte Zeile, C).
Nexilin und Tubulin zeigten keine Kolokalisation (A, A‘) sowie nicht konkordante Intensitätsverläufe (A“). Nexilin und Aktin (B, B‘) hingegen wiesen eine Kolokalisation auf, die durch die vergleichbaren Intensitätsverläufe (B“) verdeutlicht wird. Wurden die Zellen zusätzlich mit Cytochalasin D behandelt, führte dies zu einer Zerstörung des Aktinzytoskelett, was anhand der fleckigen Verteilung von Aktin (C) ersichtlich ist. Die Nexilin-exprimierende Zelle hingegen zeigte ein weitgehend erhaltenes Aktinzytoskelett. Auch die Intensitätsverteilung (C“) entlang der Linie durch die Zelle zeigte einen ähnlichen Verlauf wie die Kontrolle mit DMSO-Behandlung (B“). DAPI = 4′,6-Diamidin-2-phenylindol.

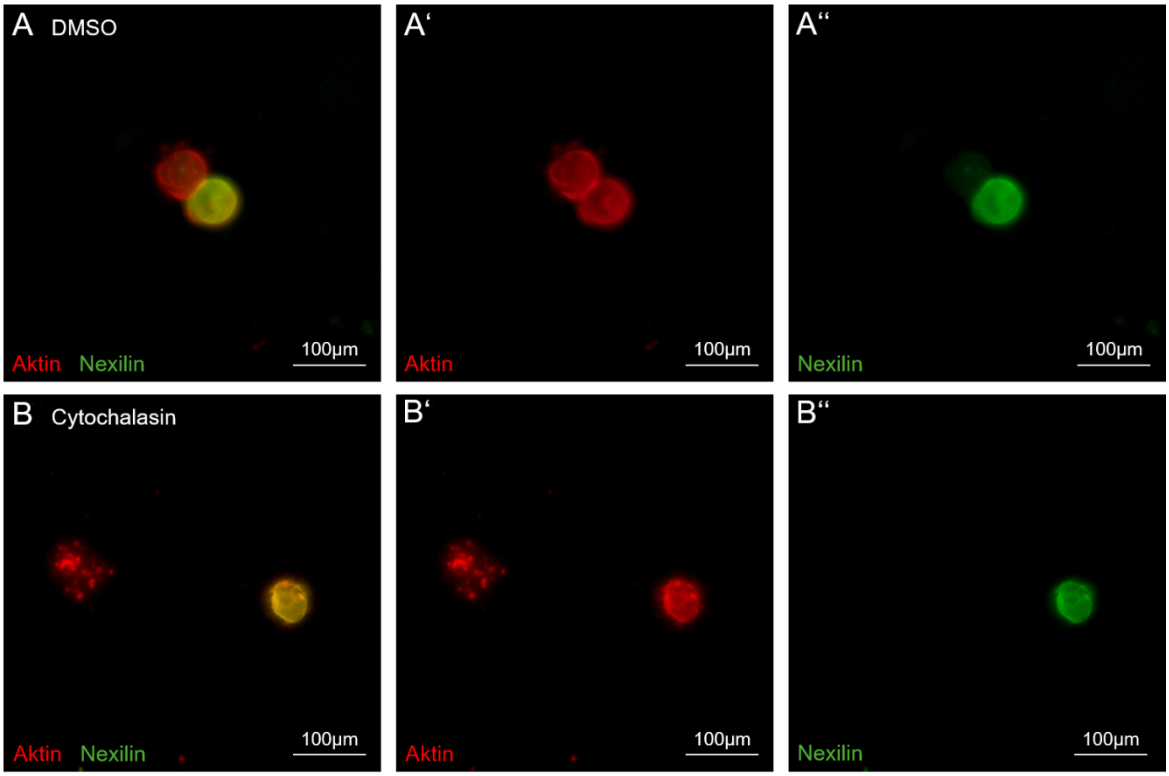

Abb. 23: Effekte einer Cytochalasin D-Behandlung auf das Aktinzytoskelett von Nexilin-transfizierten Zellen. Gezeigt sind Immunfluoreszenzfärbungen gegen endogenes Aktin beziehungsweise getaggtes Nexilin nach Behandlung mit Cytochalasin D im Vergleich zu DMSO (Dimethylsulfoxid). Es ist jeweils eine erfolgreich transfizierte Zelle (grün fluoreszierend) und eine nicht-transfizierte Zelle zu erkennen. Die obere Reihe (A-A“) zeigt hierbei die Zellen nach Behandlung mit DMSO. Die Substanz hatte keine Effekte auf das Aktinzytoskelett (A‘) unabhängig von der Nexilin-Expression. Die untere Reihe (B-B“) hingegen zeigt die Zellen nach Cytochalasin D-Behandlung. Die nicht erfolgreich transfizierte Zelle zeigte hierbei eine Cytochalasin D-bedingte Zerstörung des Aktinzytoskeletts, wohingegen die Nexilin-exprimierende Zelle eine weitgehend unauffällige Aktinfärbung aufwies.

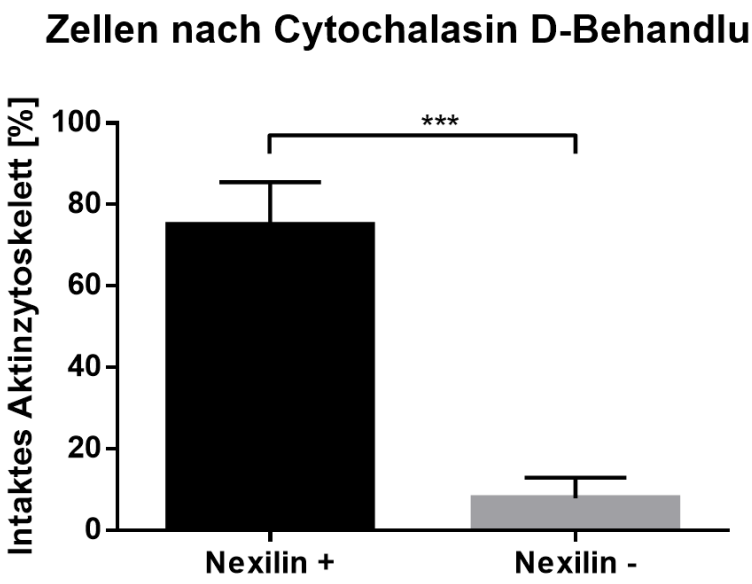

Abb. 24: Erfolgreich Nexilin-transfizierte Zellen wiesen häufiger ein intaktes Aktinzytoskelett trotz Behandlung mit Cytochalasin D auf. Zur quantitativen Analyse der geschilderten Beobachtung wurde das Aktinzytoskelett von insgesamt 406 Zellen nach Cytochalasin D-Behandlung in drei unabhängigen Auswertungen betrachtet und dieses als intakt oder zerstört bewertet. In Abhängigkeit von einer erfolgreichen (Nexilin+) oder erfolglosen (Nexilin-) Nexilin-Transfektion und -Expression ergab sich folgende Verteilung: 75,0 ± 6,0 % der erfolgreich Nexilin-transfizierten Zellen wiesen trotz Cytochalasin D-Behandlung ein intaktes Aktinzytoskelett auf. Im Vergleich dazu war dies bei 7,9 ± 2,9 % der nicht erfolgreich transfizierten Zellen der Fall. Signifikanztestung mittels t-Test ($p = 0,0006$). Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung.

3.3.2 Validierung potenzieller Nexilin-Interaktionspartner im Zellkultursystem

Neben Aktin sind nur wenige andere Interaktionspartner von Nexilin bekannt. In einem weiteren Schritt sollte nach bisher unbekannten mit Nexilin interagierenden Proteinen gefahndet werden.

Zur Ermittlung von weiteren potenziellen Interaktionspartnern wurde ein sogenannter *Yeast-two-Hybrid-Screen* bei der Firma Hybrigenics Services, Paris in Auftrag gegeben. In diesem Verfahren wurde eine Gendatenbank aus embryonaler cDNA des Zebrafisches auf mögliche Interaktionspartner von Nexilin gescreent. Aus dieser Analyse gingen die Proteine Catenin beta like protein 1 (CTNNBL1) und Glomulin als mögliche Interaktoren von Nexilin hervor.

Diese Ergebnisse wurden im Rahmen dieser Arbeit anschließend in der Zellkultur mittels Kolokalisationsanalysen und Immunpräzipitation validiert. Hierfür wurde die jeweilige Gensequenz des Zebrafisches – also Nexilin, Glomulin und CTNNBL1 – mittels Gateway®-Technologie in Endvektoren mit GFP- oder V5-*Tag* eingebracht. Mit diesen Vektoren wurden HEK-293T-Zellen in unterschiedlichen Kombinationen kotransfiziert. Die nach Integration ins Genom synthetisierten Fusionsproteine aus Zielprotein und Marker erlaubten die Färbung mittels Immunfluoreszenz beziehungsweise die sichere Detektion auf Western Blots. (Eine schematische Darstellung der verwendeten Vektoren findet sich in Abb. 5.)

3.3.2.1 Fragliche Kolokalisation von Nexilin und den Interaktionskandidaten

Zur Ermittlung eines ersten Anhaltspunktes für eine Interaktion wurden die Kandidatenproteine auf ihre subzelluläre Lokalisation und einer möglichen Kolokalisation mit Nexilin hin untersucht. Hierfür wurden HEK-293T-Zellen mit dem Nexilin-V5-Vektor und dem jeweiligen GFP-gekoppelten möglichen Interaktionspartner kotransfiziert. Im Anschluss wurden diese Zellen fixiert, gefärbt und analysiert. Abb. 25 zeigt repräsentative Ausschnitte dieser Färbungen. Die Proteine zeigten allesamt eine überwiegend zytoplasmatische Lokalisation, wobei eine rein visuelle Zuordnung zu Kern oder Zytoplasma insbesondere für die potenziellen Interaktionsproteine nicht möglich war. Die Frage nach einer möglichen Kolokalisation von Nexilin mit CTNNBL1 beziehungsweise mit Glomulin konnte anhand dieses Experiments insgesamt nicht sicher beantwortet werden. Dies machte eine weitere Validierung mittels Koimmunpräzipitation, also einer Methode zur Detektion von Proteinbindungen, nötig.

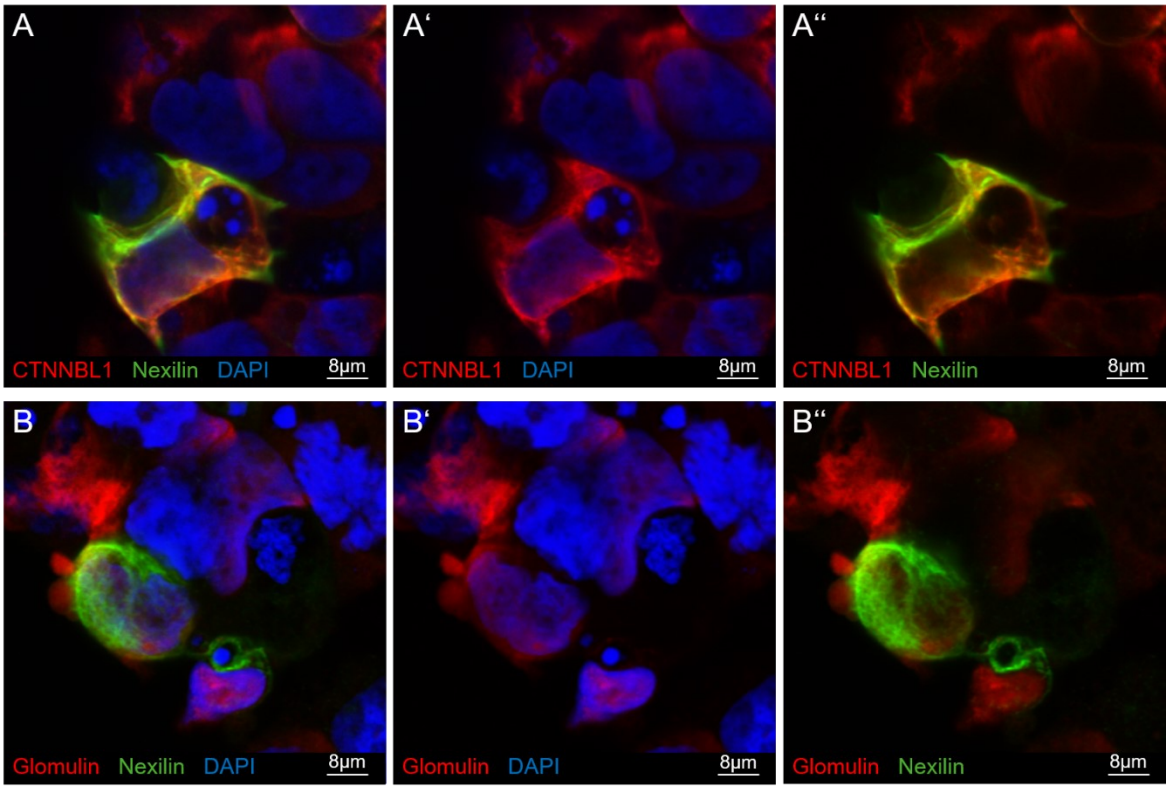

Abb. 25: Kolokalisationsanalysen von Nexilin und den potenziellen Interaktionspartnern Glomulin und CTNNBL1. Gezeigt sind Immunfluoreszenzfärbungen von kotransfizierten HEK-293T-Zellen. Zum einen erfolgte eine Kotransfektion mit Nexilin und CTNNBL1 (A), zum anderen mit Nexilin und Glomulin (B). Die anschließende Färbung der Zellen gegen die transfizierten Fusionsproteine und DAPI (4′,6-Diamidin-2-phenylindol) zur Anfärbung des Zellkerns erlaubte keine eindeutige Aussage bezüglich einer möglichen Kolokalisation der Interaktionskandidaten. Alle Proteine wiesen eine überwiegend zytoplasmatische Lokalisation auf. CTNNBL1 = Catenin beta like protein 1.

3.3.2.2 Erfolgreiche Koimmunpräzipitation der vermuteten Interaktionspartner und Nexilin

Aufgrund der nur eingeschränkten Beurteilbarkeit einer möglichen Kolokalisation von Nexilin und den Interaktionskandidaten anhand der durchgeführten Färbungen wurde zusätzlich eine Koimmunpräzipitation durchgeführt. Grundlegend gilt für eine solche Koimmunpräzipitation: Interagieren zwei Proteine über eine stabile Bindung miteinander, führt die Präzipitation eines Partners – beispielsweise mit Hilfe von Antikörpern – aufgrund der Bindung zum anderen Protein ebenfalls zur Extraktion dieses zweiten Partners aus einem Zelllysat. Es lassen sich also anschließend beide Proteine im Präzipitat detektieren.

Zur Validierung der möglichen Interaktion von Nexilin und den beiden Kandidatenproteinen wurden die HEK-293T-Zellen wie schon für die Lokalisationsanalysen mit getaggten Vektoren mit Nexilin und je einem potenziellen Interaktionsprotein kotransfiziert. Als Negativkontrolle diente hierbei GFP-GID1, das gemeinsam mit Nexilin transfiziert wurde. Die Lysate dieser kotransfizierten Kulturen wurden für die Koimmunpräzipitation verwendet. Dabei wurde mittels magnetischer GFP-*Beads* die GFP-gekoppelten Proteine, also GID1, Glomulin und CTNNBL1 aus den Lysaten präzipitiert, was in allen drei Fällen auch gelang. Zudem konnte Nexilin in den beiden Ansätzen mit den Interaktionskandidaten Glomulin und CTNNBL1 aus den Proben extrahiert werden. Die Kontrolle nach Kotransfizierung mit GFP-GID1 und Nexilin hingegen war negativ, Nexilin ließ sich nicht im Präzipitat nachweisen. Abb. 26 zeigt die nach Präzipitation durchgeführten Western Blots zum Proteinnachweis.

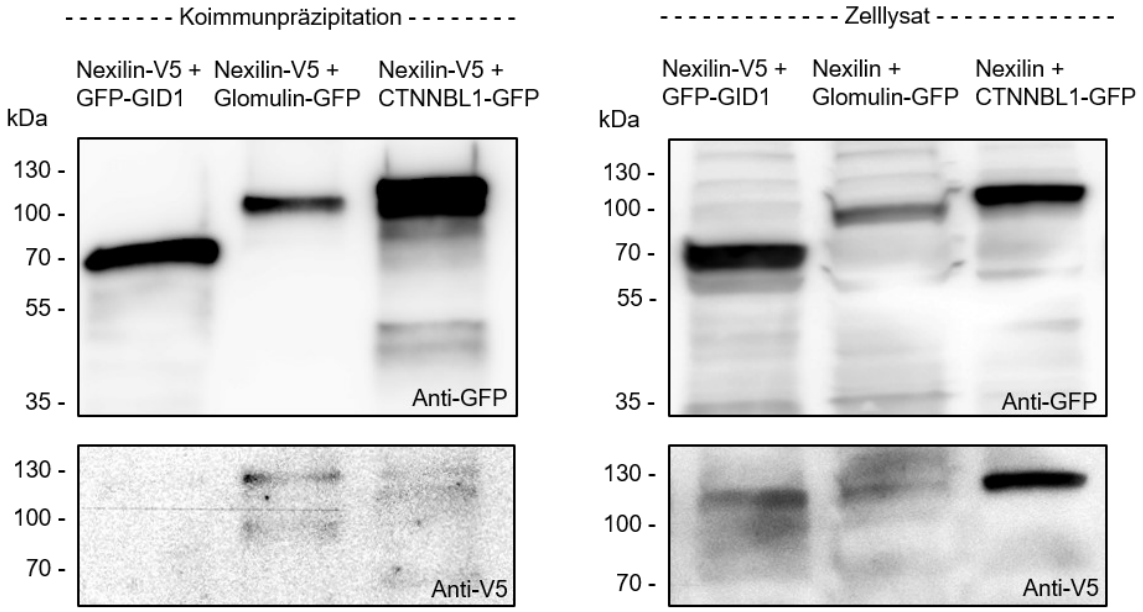

Abb. 26: Erfolgreiche Koimmunpräzipitation von Nexilin und den Interaktionskandidaten. Glomulin und CTNNBL1. Gezeigt sind die Western Blots nach Koimmunpräzipitation (links) sowie der reinen Zelllysate vor Koimmunpräzipitation (rechts) kotransfizierter HEK-293T-Zellen. Die Zellen wurden mit den Kombinationen Nexilin-V5 + GFP-GID1, Nexilin-V5 + Glomulin-GFP oder Nexilin-V5 + CTNNBL1-GFP transfiziert. Für die Koimmunpräzipitation wurden mittels magnetischer GFP-*Beads* die GFP-gekoppelten Proteine GID1, Glomulin und CTNNBL1 gebunden und aus dem Zelllysat präzipitiert. Die GFP-markierten Proteine sind sowohl in den Zelllysaten (rechts) als auch den Präzipitaten (links) mit Hilfe von GFP-Antikörpern nachweisbar (jeweils oberer Blot). Zur Gegenfärbung und Detektion von Nexilin wurden V5-Antikörper verwendet. Nexilin konnte in jedem jeweiligen Lysat der kotransfizierten Zellen nachgewiesen werden (rechts unten). Zudem konnte Nexilin nach der Präzipitation von Glomulin und CTNNBL1 im jeweiligen Präzipitat detektiert werden. Im Kontrollansatz mit GFP-GID1 war Nexilin hingegen nicht im Präzipitat nachweisbar (links unten). Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus zwei unabhängigen Experimenten. Da = Dalton. GFP = *green fluorescent protein*. GID1 = Gibberellin-insensitive dwarf 1. CTNNBL1 = Catenin beta like protein 1.

Aufgrund der erfolgreichen Präzipitation jeweils beider Interaktionspartner – also Nexilin + Glomulin sowie Nexilin + CTNNBL1 – aus dem Zelllysat kotransfizierter Zellen kann man von einer Bindung zwischen den jeweiligen Proteinen ausgehen, die diese Präzipitation ermöglichten.

4. Diskussion

Zielsetzung dieser Arbeit war eine genauere Charakterisierung des myokardialen Proteins Nexilin. Zum einen sollte durch die Generierung und Etablierung einer stabilen Fischlinie mit einem Nexilin-Knockout sowie einer transgenen Nexilin-Linie eine Grundlage für weitere Forschung am Modellorganismus Zebrafisch gelegt werden. Zum anderen wurde auf Zellebene der Fokus auf die Interaktion von Nexilin mit anderen Proteinen gelegt. Dabei konnten bereits bekannte Interaktionen bestätigt und mögliche neuen Interaktionspartnern ermittelt und evaluiert werden.

4.1 Nexilin-Knockout-Fischlinie

Nexilin konnte in den vergangenen Jahren als wichtiges kardiales Strukturprotein identifiziert werden. Beim Menschen wurden Nexilin-Mutationen in Patientenkollektiven mit sowohl Dilatativer [36] als auch Hypertropher Kardiomyopathie [103] als mutmaßliche Ursache der Erkrankung ausgemacht. Im Tiermodell führte ein Knockout von Nexilin in Mäusen [1,65] ebenso wie der Knockdown im Zebrafisch [36] zur Ausbildung einer DCM. Die Injektion einer mRNA mit der bei den DCM-Patienten gefundenen Mutationen in den Zebrafisch führte zum gleichen Phänotyp wie durch den Knockdown [36]. Dieser Phänotyp mit dilatierten Herzräumen, verminderter Ventrikelkontraktionsfähigkeit und Verschlechterung der systemischen Perfusion ließ sich jedoch bei der im Rahmen dieser Arbeit generierten Nexilin-Knockout-Linie im Zebrafisch nicht reproduzieren.

Als Methode zur Generierung einer Nexilin-Knockout-Fischlinie wurde CRISPR/Cas9 gewählt. Dieses System erwies sich in den letzten Jahren als elegante Möglichkeit der Genmodifikation und wurde im Zebrafisch bereits vielfach erfolgreich angewendet [43]. Auch hier konnten Deletionen (und Insertionen) in den gewünschten Genomabschnitten generiert werden. In den durchgeführten PCRs und Sequenzierungen wurde das Fehlen von einigen Basenpaaren in der zur crRNA komplementären Region nachgewiesen. Die entstandenen Nexilin-Mutationen führten jeweils zu einer Leserahmenverschiebung mit Entstehung eines neuen

Stop-Codons, welches dann wiederum einen vorzeitigen Abbruch des Peptides zur Folge hatte. Mittels Western Blot konnte ein (partielles) Fehlen von Nexilin in den homozygot mutierten Fischen nachgewiesen werden. Dennoch zeigten die Fische mit einem definierten Defekt auf Genomebene und entsprechendem Verlust von Nexilin auf Proteinebene keinen pathologischen Phänotyp. Sie wiesen keine morphologischen Unterschiede zu den wildtypischen Geschwisterembryonen auf. Auch im jungen adulten Alter ließen sich keine morphologischen oder funktionellen Defizite der Knockout-Fische gegenüber Wildtypen erkennen. Eine Reproduktion des von Hassel *et al*. [36] beschriebenen DCM-Phänotyps eines Morpholino-induzierten Nexilin-Knockdowns im Fisch war durch den CRISPR/Cas9 generierten Knockout somit nicht möglich.

4.1.1 Unterschiedliche Phänotypen nach Knockout und entsprechendem Knockdown als bekanntes Phänomen

Auf der Suche nach möglichen Erklärungsansätzen dieser Diskrepanz zwischen dem fehlenden Phänotyp der Nexilin-Knockout-Fische und dem 2009 beschriebenen DCM-Phänotyp der Nexilin-defizienten Knockdown-Fische wird klar, dass es sich dabei um ein bekanntes Phänomen handelt. Bereits mit der Einführung der Genmodifikationsmethoden Zinkfingernuklease und TALEN wurden mutante Zebrafischlinien beschrieben, deren meist unauffälliger Phänotyp sich deutlich vom Phänotyp des entsprechenden Knockdowns mit Morpholinos unterschied. Als Beispiele wären hier Pak4 (P21-aktivierte Kinase 4) [61,62], das Fragile-X-Mental-Retardation-Protein Fmr1 [15,100] oder PrP2 als paraloges Zebrafischgen des humanen Prion-Protein-Gens [25,81] zu nennen. Ähnliche Unterschiede wurden auch für Knockdown-Fische und Fische mit einer chemisch-induzierten Mutation im gleichen Gen, wie dem Pak4-Inhibitor Inka1 [61,67] beschrieben. Kok *et al*. [58] zeigten diese Diskrepanz zwischen den Phänotypen von MO-Knockdown und Knockout-Fischen für über zwanzig Proteine und konnten dies für weitere Proteine mittels integrativer Analyse von Daten des Zebrafish Information Network (ZFIN) und des Sanger Zebrafish Mutation Project [56] bestätigen. Sowohl in den eigenen Experimenten als auch in der Datenbank-gestützten Betrachtung wiesen rund 80 % der mutanten Linien einen anderen beziehungsweise meist keinen Phänotypen im

Vergleich zur jeweiligen MO-Linie auf [58]. Neben dem Zebrafisch wurde dieses Phänomen auch in anderen Organismen und Tieren mit den jeweils etablierten Methoden zu Knockdown und Knockout beobachtet. Exemplarisch seien hier der kombinierte Knockdown und Knockout von SPRN (für ein dem Prion-Protein PrPc-ähnlichen Protein codierend) und PrP in Mäusen [13,107] sowie der Knockdown versus Knockout von ABP1 (Auxin-binding protein) in der Pflanze *Arabidopsis* [5,27]) genannt. In beiden Fällen wurden erhebliche Auswirkungen eines Knockdowns beschrieben, wohingegen der Knockout weitgehend folgenlos blieb.

4.1.2 Erklärungsansätze für fehlenden Phänotyp von mutanten Zebrafischen

Als Ursache eines fehlenden Phänotyps in mutanten Zebrafischlinien können mehrere Möglichkeiten in Betracht gezogen und diskutiert werden.

Einen Erklärungsansatz stellt dabei die Theorie der maternal-übertragbaren mRNA in die befruchtete Eizelle dar. Handelt es sich bei der Mutter um ein heterozygotes Individuum, kann normale WT-mRNA produziert und diese teilweise über die Eizelle an die Nachkommen weitergegeben werden. Dieser mRNA-Transfer kann einen -/- Genotyp der Nachkommen relativieren und die Ausbildung eines Phänotyps verhindern [96]. In der vorliegenden Arbeit wurden die phänotypischen Analysen jedoch an Fischen der F_3-Generation, also den Nachkommen von bereits homozygoten Eltern, durchgeführt. Diese Erklärung erscheint hier somit ausgeschlossen.

Alternativ ist denkbar, dass durch eine Mutation wie sie beispielsweise durch CRISPR/Cas9 generiert wird, ein hypomorphes Allel mit lediglich partiellem Funktionsverlust des Gens entsteht. Diesbezüglich sind mehrere Möglichkeiten bekannt. So ist insbesondere bei Translationsabbrüchen durch weit proximal induzierte Stop-Codons eine Reinitiation der Translation durch ein alternatives Start-Codon möglich. [95] Zudem können Mechanismen der RNA-Modifikation wie Spleißen eine Rolle spielen. Eine Mutation könnte beispielsweise ein Herausspleißen des mutierten Exons (sogenanntes *exon-skipping*) oder anderweitiges alternatives Spleißen zur Folge haben und so eine Leserahmenverschiebung mit vorzeitigem Stop-Codon umgehen und die Translation einer intakten Polypeptidkette gewährleisten [2,60].

Dieser Erklärungsansatz ist vor allem in Bezug auf die Mutationsgenerierung in Exon 2 von Nexilin durchaus denkbar. Wie zuvor bereits erwähnt sind in Datenbanken wie der NCBI mehrere Spleißvarianten von Nexilin im Zebrafisch hinterlegt. So existiert eine lange Variante (NCBI: NM_001083855.2, Protein NP_001077324.2) mit insgesamt 15 Exons und einer Proteinlänge von 861 Aminosäuren sowie einem Molekulargewicht von rund 102 kDa. Eine verkürzte, aber ebenfalls im Zebrafisch exprimierte Variante (NCBI: DQ464901.1, Protein ABE97924) ist 748 Aminosäuren lang, etwa 89 kDa schwer und besteht aus nur 13 Exons, wobei im Vergleich zur zuvor genannten längeren Variante die ersten beiden Exons, also Exon 1 und 2 fehlen. Interessanterweise ist das humane Nexilin (NCBI: DQ464902.1, Protein ABE97925.1) ortholog zu dieser kurzen Variante. Es findet sich also keine analoge humane Sequenz zu den ersten beiden Exons der längeren Zebrafischversion. Möglicherweise ist dieser erste Abschnitt lediglich fakultativ, dessen Fehlen keine Relevanz für die Funktionsfähigkeit des Proteins hat. Bei der Analyse des Proteinlysates der Fische mit einer Deletion in Exon 2, konnte lediglich eine verminderte Synthese von Nexilin im Vergleich zu Wildtypen detektiert werden. Im Gegenzug konnte mit dem Nexilin-Antikörper in den mutanten Fischen eine verstärkte Bande eines leichteren Proteins nachgewiesen werden. Es könnte sich hierbei um die kürzere Nexilin-Variante im Zebrafisch handeln. Da der verwendete Antikörper für humanes Nexilin entwickelt wurde und im mittleren Proteinbereich bindet, sollte auch die Detektion der verkürzten Zebrafischform möglich sein. Eine exakte Analyse der Bande wurde jedoch nicht vorgenommen, weswegen darüber keine endgültige Aussage getroffen werden kann.

Die 32 bp-Deletion in Exon 2 ruft also möglicherweise eine Re-Aktivierung der Translation unter Nutzung eines alternativen Start-Codons hervor, womit ein kompletter Genausfall verhindert werden kann. Dennoch wiesen auch die Fische mit einem vollständigen Nexilin-Knockout durch die 5 bp-Deletion in Exon 7 keinen pathologischen Phänotyp oder Anzeichen einer beeinträchtigten Herzfunktion auf. Die Theorie des lediglich partiellen Funktionsverlustes bietet also keine hinreichende Erklärung für die fehlenden fassbaren Auswirkungen des Knockouts.

Einen weiteren Erklärungsansatz stellt in diesem Zusammenhang die genetische Kompensation dar. Diese Theorie besagt, dass die gestörte Genexpression

aufgrund einer Mutation eine kompensatorische Anpassung der Expression anderer Gene und Proteine initiieren kann, wodurch die Auswirkungen des eigentlichen Proteinverlustes relativiert werden [20]. Rossi *et al*. [89] konnten diesen Mechanismus als Grund für den fehlenden Phänotyp einer EGFL7-Knockout-Zebrafischlinie identifizieren. Der Knockdown von EGFL7 (EGF-like domain multiple 7) im Zebrafisch führte zu schweren vaskulären Defekten [84], der Knockout hingegen zu einem wesentlich abgeschwächten oder keinem Phänotyp [89]. Eine ausreichende Spezifität der zuvor eingesetzten Morpholino-Oligonukleotide konnte nachgewiesen und der beobachtete Phänotyp durch Inhibition der Elongation von EGFL7 mittels der CRISPRi-Methode (*CRISPR interference*) reproduziert werden [89]. Die Knockout-Fische wiesen eine starke Reduktion der mRNA sowie des entsprechend veränderten und instabilen Proteins auf. Eine Analyse des gesamten Transkriptoms und Proteoms dieser Fische ergab eine signifikante Überexpression von Emilin 2 und 3 in den Knockout-Fischen, nicht jedoch in Morphanten oder CRISPRi-Fischen. Diese Proteine weisen in Teilen eine funktionelle Übereinstimmung zum EGFL7-Protein auf. Tatsächlich konnten auch die Auswirkungen der EGFL7-Morpholino durch Injektion von Emilin-mRNA erfolgreich relativiert und der Phänotyp verhindert werden. Aus diesen Erkenntnissen folgerten Rossi *et al*., dass der Knockout von EGFL7 im Zebrafisch, also ein Eingriff auf genomischer Ebene, Mechanismen der genetischen Kompensation aktiviere. Diese wiederum würden die Entwicklung eines Phänotyps wie er beim Knockdown, dem Eingriff auf RNA-Ebene, von EGFL7 auftritt verhindern. [89]

Bei der hier generierten Nexilin-Knockout-Zebrafischlinie ergibt sich eine ähnliche Konstellation wie in dem vorgestellten Beispiel. Zebrafische mit Nexilin-Knockdown [36] entwickelten ebenso wie Knockout-Mäuse [1] und Menschen mit Mutationen in Nexilin [36] das klinische Bild einer DCM. Die Knockout-Fische dieser Arbeit hingegen wiesen keinen pathologischen Phänotyp auf. Es sollte unbedingt geklärt werden, inwiefern genetische Kompensation und die Hochregulation anderer Proteine hier eine Rolle spielt. Insbesondere funktionell ähnliche Proteine, zum Beispiel aufgrund gleicher Domänen, könnten in der Lage sein, den Ausfall von Nexilin zu kompensieren.

4.1.3 Missinterpretation eines Phänotyps durch Knockdown-Off-Target-Effekte als mögliche Ursache der beschriebenen Diskrepanz

Die Diskrepanz zwischen dem Phänotyp von Knockdown-Fischen und dem oft fehlenden Phänotyp bei entsprechendem Knockout kann auch durch die fälschliche Annahme eines pathologischen Phänotyps bei Knockdown-Versuchen bedingt sein. Morpholino sind synthetisch hergestellte Oligonukleotide, die durch eine komplementäre Bindung an die Ziel-mRNA deren Translation oder Spleißen verhindern [80]. Sie werden typischerweise im Zebrafisch und Frosch für Knockdown-Versuche verwendet. In den letzten Jahren jedoch, insbesondere durch die Entwicklung neuer Methoden zur Generierung genomischer Mutationen, wurden zunehmend vermeintliche Knockdown-Ergebnisse als *Off-Target*-Effekte der Morpholinos identifiziert [58]. Besonders der Tumorsuppressor p53 scheint eine wichtige Rolle in der Entstehung solcher *Off-Target*-Effekte und der Entwicklung entsprechender Phänotypen innezuhaben. So wurde gezeigt, dass eine MO-induzierte Aktivierung von p53 und der anschließenden Apoptose-Kaskade zum Zelltod führen [88] oder eine Veränderungen der Genexpression zur Folge haben kann [30]. Diese Mechanismen wiederum können in der Ausbildung unspezifischer Phänotypen münden, die dann fälschlicherweise als Effekte des jeweiligen Knockdowns missinterpretiert werden. Zudem kann eine mangelnde Spezifität der Morpholino-Oligonukleotide und deren Bindung an alternative RNA-Sequenzen für solche Effekte verantwortlich sein [53]. Aus diesen Gründen wird eine adäquate Validierung von Ergebnissen aus Morpholino-Knockdown-Studien gefordert. Neben einer Minimierung möglicher *Off-Target*-Effekte durch optimale Anpassung der Dosierung ist eine suffiziente Kontrolle durch *Rescue*-Experimente und der Verwendung mehrerer verschiedener MO für ein Gen sowie einem Kontroll-MO notwendig. Besonders bedeutend für die Überprüfung der Spezifität erscheint der Vergleich der Phänotypen mit einer entsprechenden mutanten Linie und die Anwendung des Morpholinos in diesen Tieren. Ist eine ausreichende Spezifität gegeben, kann ein Phänotyp in den -/- Individuen aufgrund der fehlenden Ziel-mRNA nicht reproduziert werden. [19,96]

Auch die verwendeten Morpholino der Nexilin-Knockdown-Experimente [36] sollten auf ihre Spezifität überprüft werden, um die fälschliche Annahme eines Phänotyps auszuschließen.

4.1.4 Zusammenfassende Beurteilung für die hier generierte Nexilin-Knockout-Zebrafischlinien und Ausblick

Insgesamt konnte mit Hilfe der *Genome-Editing*-Methode CRISPR/Cas9 ein Knockout von Nexilin im Zebrafisch erzielt werden. Der bekannte DCM-Phänotyp aus Nexilin-Knockdown-Versuchen mit dilatierten Herzräumen und beeinträchtigter Funktionalität ließ sich hierbei jedoch nicht reproduzieren.

Die mögliche Schlussfolgerung daraus, Nexilin habe keinen Einfluss auf das Herz-kreislaufsystem, wäre in Anbetracht des Wissens über die Auswirkungen von Mutationen und einer Nexilin-Defizienz für Menschen und im Tiermodell nicht gerechtfertigt. Vielmehr sollte der hier fehlende Phänotyp als Ausgangspunkt weiterer Forschung insbesondere auf dem Feld der genetischen Kompensation genutzt werden. Diese Mechanismen erscheinen derzeit als wahrscheinlichste Ursache für den fehlenden pathologischen Phänotyp der Knockout-Fische. Insbesondere eine genauere Betrachtung der genetischen Kompensation durch Hoch- und Runterregulation anderer Proteine können zu einem weiteren Erkenntnisgewinn der Rolle von Nexilin für die Funktionalität des Herzens und der Entstehung von Kardiomyopathien dienen. Nichtsdestotrotz sollte eine Überprüfung einer ausreichenden Spezifität der verwendeten Morpholinos durch Injektion in die neu generierte Nexilin-Knockout-Linie zur abschließenden Validierung dieser Beobachtungen erfolgen.

Daneben verbleiben weitere vielversprechende Möglichkeiten zur Präzisierung der Generierung einer Nexilin-Knockout-Fischlinie, um den DCM-Phänotypen möglicherweise doch noch reproduzieren zu können: So scheint es neuesten Erkenntnissen zufolge wahrscheinlich, dass die Degradierung mutanter mRNA als Trigger der Aktivierung genetischer Kompensation im Zebrafisch wirkt. Verhindert eine Mutation aber bereits die Transkription von mRNA, fehle dieser Auslöser und eine Kompensation durch Hochregulierung anderer Gene unterbleibe. [20] Es könnte also die Generierung einer Knockout-Linie durch eine gezielte Mutations-Induktion in der Promotor-Region von Nexilin und somit einer Unterbindung der Transkription einer fehlerhaften mRNA versucht werden.

Für eine besonders starke Analogie zum Menschen wäre alternativ die Generierung einer mutanten Linie unter Induktion der bekannten humanen Mutationen im Zebrafisch möglich. CRISPR/Cas9 erlaubt nicht nur die Generierung von zufälligen Mutationen mittels Nicht-homologer-End-zu-End-Verknüpfung, sondern auch die Einbringung von spezifischen Punktmutationen wie Basenaustausche. Durch Zugabe eines DNA-Oligonukleotids als Matrize kann die Homologe-Rekombination und somit die exakte Reparatur der durch CRISPR/Cas9 entstandenen Doppelstrangbrüche induziert werden. [43,72] In den letzten Jahren wurde diese Methode auch für die Anwendung im Zebrafisch optimiert [108] und wäre als Möglichkeit zur Mutationsgenerierung von Nexilin in Betracht zu ziehen.

4.2 Potenziell toxische Effekte von Nexilin bei der Generierung einer transgenen Nexilin-Fischlinie

In einem weiteren Projekt sollte eine transgene Nexilin-Fischlinie generiert werden. Insgesamt war die Etablierung dieser Nexilin-Zebrafischlinie mittels Multisite-Gateway-Klonierung aufgrund mehrerer Schwierigkeiten nicht erfolgreich. Dass es sich dabei grundsätzlich um ein effizientes System zur Transgenese im Zebrafisch handelt, konnte schon vielfach gezeigt werden [59,90]. Der verwendete Promotor unc45b^{min}, der an 5‘-Position kloniert wurde, ist ein verkürztes funktionelles Fragment des unc45b-Promotors, welcher eine gezielte Expression eines Gens in quergestreifter Skelett- und Herzmuskulatur regulieren kann [90]. Für eine regelrechte Translation des gewünschten Fusionsproteins ist ein durchgängiger Leserahmen des gewünschten Gens an mittlerer Position des Multisite-Vektors und der GFP-Sequenz an 3‘-Position von Bedeutung. Mittels Sequenzierung konnte dies nachgewiesen werden und eine ununterbrochene Translation des Fusionsprotein Nexilin-GFP sollte somit gewährleistet sein.

Nach Injektion des Plasmids im Ein-Zell-Stadium zeigten die injizierten Embryonen fluoreszierende Muskelzellen. Im Vergleich mit anderen, ebenfalls mit einem Tol2-Plasmid mit unc45b^{min}-Promotor injizierten Fische [90] zeigten die Nexilin-GFP-exprimierenden Embryonen eine deutlich geringere Fluoreszenz in lediglich

einzelnen Muskelzellen. Dementsprechend wurde auch keine Transmission in die Keimzellen erreicht, welche in der Literatur noch mit über 30 % für dieses Transgenese-System angegeben wird [59].

Zudem tolerierten die Eizellen nur eine sehr geringe Konzentrationsbreite der Injektionslösung von 15-18 $^{ng}/_{\mu l}$, ehe die injizierten Embryonen bei zu hohen Dosen nicht überlebten. Prinzipiell ließe sich dies durch einen möglichen toxischen Effekt des Plasmids erklären. Hinweise auf eine solche toxische Auswirkung sind in bisherigen Publikationen nicht überzeugend zu finden. Eine Arbeitsgruppe beschrieb jedoch bereits einen negativen Einfluss einer Nexilin-Überexpression auf die myokardiale Differenzierung sowie die Entstehung von Atrium-Septum-Defekten beim Menschen durch *Gain-of-Function*-Mutationen von Nexilin [106]. Möglicherweise könnte dies in Zusammenhang mit den hier beschriebenen Beobachtungen stehen, indem die Injektion des Plasmids zu einer Überexpression von Nexilin in frühen Stadien der Entwicklung und somit zu einer Hemmung der Differenzierung und dem Tod des Organismus führt. Interessanterweise wurde uns auch von der Firma Hybrigenics Services, die den *Yeast-two-Hybrid-Screen* zur Identifikation neuer Interaktionspartner von Nexilin durchführten, von toxischen Effekten der Nexilin-Konstrukte in deren Analysen berichtet. Über eine gewisse Toxizität von Nexilin und möglichen zugrundeliegenden zellulären Mechanismen kann also durchaus spekuliert werden, wenngleich zweifelsfrei eingehende weitere Untersuchungen nötig sind.

Um eine potenziell schädliche hohe Nexilin-Konzentration in frühen Entwicklungsstadien zu umgehen, könnte für künftige Generierungsversuche einer transgenen Nexilin-Linie zudem die Nutzung eines induzierbaren Plasmids [57] erwogen werden, welches die gezielte Aktivierung eines Plasmids zu einem späteren Zeitpunkt ermöglicht.

4.3 Verifikation der bekannten Interaktion mit Aktin und Ermittlung unbekannter Interaktionspartner von Nexilin in der Zellkultur

Mit dem Ziel der weiteren Charakterisierung der subzellulären Bedeutung von Nexilin insbesondere in der Interaktion mit anderen Proteinen wurde der Fokus in einem Teil der Arbeit auf die Verifikation bekannter Interaktionen und der Ermittlung unbekannter Bindungspartner gelegt. Als Modell diente hierfür ein Zellkultursystem.

Nexilin wurde 1998 als Aktin-bindendes Protein mit zwei Aktin-bindenden Domänen identifiziert [82]. Die Interaktion zwischen Nexilin und dem Zytoskelettprotein Aktin konnte im Anschluss in weiteren Arbeiten beispielsweise durch Kolokalisationsanalysen und Immunpräzipitationen bestätigt werden [36,103]. Auch in dieser Arbeit wurde zunächst in Immunfluoreszenzfärbungen von Nexilin-transfizierten HEK-293T-Zellen eine Kolokalisation von Nexilin und Aktin nachgewiesen. Dies korreliert mit den bisher bekannten Erkenntnissen bezüglich einer Bindung zwischen Nexilin und Aktin.

Darüber hinaus ergaben sich in dieser Arbeit Hinweise auf eine mögliche Stabilisierungsfunktion von Nexilin auf das Aktinzytoskelett. Unter Behandlung mit Cytochalasin D, einer Substanz zur Inhibierung der Aktinpolymerisation [7], kam es wie erwartet zu einer Destruktion des Aktinzytoskeletts in den HEK-293T-Zellen. Waren die Zellen jedoch mittels Lipofektion erfolgreich mit einem Nexilin-Vektor transfiziert worden, zeigte die Mehrzahl dieser Zellen sowohl eine normale Nexilin-Fluoreszenz als auch eine unauffällige Aktinfärbung. Der Erhalt eines intakten Aktinzytoskeletts erschien hier trotz Behandlung mit Cytochalasin D als sehr wahrscheinlich. Aus dieser Beobachtung ergibt sich die Hypothese, dass Nexilin eine stabilisierende Funktion auf das Aktinzytoskelett ausübt. Bereits Zhu *et al*. postulierten aufgrund einer reduzierten Aktinpolymerisation nach Knockdown von Nexilin in glatten Muskelzellen eine Kontrollfunktion von Nexilin auf die Aktinpolymerisation [110]. Vergleichbar konnten Yang *et al*. eine verstärkte F-Aktinbündelung durch *Gain-of-Function*-Mutationen von Nexilin sowie eine reduzierte F-Aktinbündelung bei Funktionsverlust von Nexilin durch *Loss-of-Function*-Mutationen beobachten [106]. Auch Hassel *et al*. dachten in ihren Knockdown-Experimenten Nexilin eine stabilisierende Funktion auf die Z-Scheiben der Sarkomere zu [36]. Sie konnten zeigen, dass ein Knockdown oder eine Mutation von Nexilin zu einer Destruktion der

Sarkomere in quergestreifter Herzmuskulatur mit Destabilisierung der Z-Scheiben führt. Aufgrund einer normalen Sarkomer-Struktur bei WT-Nexilin folgerten sie eine stabilisierende Funktion von Nexilin auf myokardiale Z-Scheiben [36].

Zur Validierung dieser Hypothese sind nun weiterführende Experimente nötig. In Frage käme beispielsweise ein siRNA-vermittelter Knockdown von Nexilin in einer Zellkultur – vorzugweise von (Herz-) Muskelzellen – und der Betrachtung des Aktinzytoskeletts unter diesen Bedingungen. Ginge ein solcher Knockdown mit Instabilität oder Verlust der normalen Aktinfunktion und -verteilung einher, würde es die Hypothese stützen. Zudem wäre eine Betrachtung des Aktinzytoskeletts in bereits vorhandenen Tiermodellen, wie dem Knockout-Mausmodell [1] oder dem hier generierten Zebrafischmodell, interessant.

Neben Aktin kennt man nur einige wenige weitere Proteine, die mit Nexilin interagieren. Für einen weiteren Erkenntnisgewinn bezüglich der Rolle von Nexilin sollten im Rahmen dieser Arbeit mögliche unbekannte Interaktionspartner ermittelt werden. Der hierfür extern durchgeführte *Yeast-two-Hybrid-Screen* ergab CTNNBL1 und Glomulin als zwei möglicherweise mit Nexilin interagierende Proteine. Sie sollen im Folgenden kurz präsentiert werden.

Catenin beta like protein 1 (CTNNBL1) wurde als hochkonserviertes Protein identifiziert und aufgrund gewisser struktureller Ähnlichkeiten nach β-Catenin benannt. Man erkannte eine nahezu ubiquitäre Expression in allen Geweben, in besonders hohem Ausmaß jedoch in quergestreifter Skelett- und Herzmuskulatur [46]. Mehrere Arbeitsgruppen konnten Interaktionen von CTNNBL1 mit verschiedenen anderen Proteinen und Proteinkomplexen nachweisen. Der Fokus lag hier zum einen auf der Assoziation zum Prp19-CDC5L-Komplex, einem Bestandteil des post-transkriptionellen Spleiß-Apparates [26,71,101]. Zum anderen schien die Interaktion mit AID (aktivierungsinduzierte Cytidin-Desaminase), dem zentralen Enzym der Entwicklung spezifischer Antikörper im adaptiven Immunsystem, von großer Bedeutung [12]. Dennoch herrscht nach wie vor große Unklarheit bezüglich der funktionellen Rolle von CTNNBL1 und sogar dessen Relevanz fürs Überleben eines Organismus [8,12,35]. Klinisch konnten unter anderem Zusammenhänge zu

Adipositas [66] und gegebenenfalls darüber zum Kolorektalen Karzinom [42] sowie zu hochaggressiven Ovarialkarzinomen [63] nachgewiesen werden.

Glomulin hingegen wurde als Ursache der seltenen hereditären Erkrankung Glomuvenöse Malformation identifiziert. Die Expression des lediglich bei höheren Organismen vorkommenden Proteins wird als ubiquitär, vermehrt jedoch in Skelett- und Herzmuskulatur sowie Hirn und Niere beschrieben. [6] Zudem scheint insbesondere während der Embryonalperiode bei Mäusen eine Expression in glatten Muskelzellen der Gefäßwand dominierend [73]. Des Weiteren zeigten verschiedene Arbeitsgruppen eine Assoziation mit dem Ubiquitinierungssystem und einer nachfolgenden Inhibition von Proteasom und Inflammasom [17,97,99].

Eine Assoziation zu Kardiomyopathien oder Nexilin sind bisher weder für CTNNBL1 noch für Glomulin beschrieben.

Die Validierung der Ergebnisse des *Yeast-two-Hybrid-Screens* wurde in HEK-293T-Zellen durchgeführt. Immunfluoreszenzfärbungen von Nexilin und den beiden möglichen Kandidatenproteinen nach Kotransfektion der Zellen erlaubten keine eindeutige Aussage bezüglich einer Kolokalisation. Eine Koimmunpräzipitation mit Zelllysaten kotransfizierter Zellen jedoch ergab eine erfolgreiche Präzipitation von Nexilin an den durch GFP-*Beads* extrahierten Proteinen Glomulin und CTNNBL1. In Zusammenschau mit den Ergebnissen des *Yeast-two-Hybrid* ergeben sich Hinweise auf eine Interaktion von Nexilin mit diesen beiden Kandidatenproteinen.

Zur adäquaten Wertung der gewonnen Ergebnisse sind jedoch einige Aspekte kritisch zu beachten.

Bezüglich der Immunfluoreszenzfärbung, die hier keine klare Kolokalisation aufzeigte, sei anzumerken, dass eine solche Kolokalisationsanalyse nicht die Methode der Wahl zum Nachweis einer möglichen Interaktion zweier Proteine ist. Außerdem könnte die Tatsache, dass Vektoren mit Zebrafischgensequenzen in dem humanen Zellkultursystem HEK-293T-Zellen verwendet wurden, zu einer eingeschränkten Beurteilbarkeit beigetragen haben.

Wenngleich das Ergebnis der Koimmunpräzipitation für eine Interaktion von Nexilin mit CTNNBL1 und Glomulin spricht, sollte dennoch bedacht werden, dass die

beiden Proteine bisher nicht in Zusammenhang zu kardialen Erkrankungen oder speziell Kardiomyopathien gebracht wurden. Es ist zudem unklar, ob die Proteine überhaupt gemeinsam mit Nexilin in Zellen eines lebenden Organismus exprimiert werden oder ob es sich lediglich um eine *in vitro* erzeugte Bindung handelt.

Die Ergebnisse des *Yeast-two-Hybrid* und der Koimmunpräzipitation sollten also als Hinweise auf eine Interaktion zwischen Nexilin und Glomulin beziehungsweise Nexilin und CTNNBL1 gesehen werden, deren tatsächliche Relevanz auf zellulärer Ebene noch vollkommen unklar ist.

4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Das Ziel dieser Arbeit war eine genauere Charakterisierung des kardialen Proteins Nexilin auf genetischer und zellulärer Ebene. Es ist eine Assoziation von Mutationen des Gens NEXN zur Erkrankungsgruppe der Kardiomyopathien, insbesondere der Dilatativen und Hypertrophen Kardiomyopathie bekannt [36,103]. Im Rahmen dieser Arbeit konnten mehrere Erkenntnisse über die Bedeutung des Proteins Nexilin gewonnen werden. Vermutlich ist eine genetische Kompensation die Ursache für einen fehlenden pathologischen Phänotyp der Nexilin-defizienten Knockout-Fische. Weiter ergaben sich Hinweise für einen möglichen toxischen Effekt eines Nexilin-Vektors auf die frühe Entwicklung von Zebrafischembryonen. Zuletzt konnten mit Glomulin und CTNNBL1 potenzielle unbekannte Interaktionspartner von Nexilin identifiziert und die Vermutung einer stabilisierenden Funktion von Nexilin auf das Aktinzytoskelett gestellt werden. All diese Erkenntnisse und Hypothesen können nun als Grundlage einer weiterführenden Charakterisierung von Nexilin und dessen zellulärer Rolle darstellen und so möglicherweise zu einem besseren Verständnis der Entstehung und Pathomechanismen von Kardiomyopathien dienen.

5. Zusammenfassung

Kardiomyopathie ist ein Sammelbegriff für eine heterogene Gruppe an Herzmuskelerkrankungen, die mit einer elektrischen und/oder mechanischen Dysfunktion einhergehen. Es sind multiple Ätiologien und Pathomechanismen bekannt, wobei genetische Ursachen eine zentrale Rolle spielen. Die beiden häufigsten Formen stellen die Dilatative Kardiomyopathie (DCM) und die Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) dar. In beiden Fällen können Mutationen in Genen, die für bedeutende Bestandteile der Herzmuskelzellen codieren, ursächlich für die Erkrankung sein. Eine dieser Komponenten ist das Protein Nexilin. Bei Patienten mit DCM oder HCM wurden Mutationen in dem codierenden Gen NEXN identifiziert. Auch experimentelle Versuche am Zebrafisch zeigten die Entwicklung eines DCM-ähnlichen Phänotyps durch einen Nexilin-Knockdown.

Als Grundlage für eine weitere Erforschung des Proteins Nexilin wurde im Rahmen dieser Arbeit eine stabile Nexilin-Knockout-Zebrafischlinie generiert. Unter Anwendung des von Bakterien abgeleiteten Genmodifikationssystem CRISPR/Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*/ *CRISPR-associated protein 9*) konnten erfolgreich Mutationen im für Nexilin codierenden Gen induziert werden. Diese Mutationen führten über eine Leserahmenverschiebung zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation vermutlich mit Degradierung des fehlerhaften Proteins, was in einem verminderten beziehungsweise aufgehobenen Nachweis von Nexilin im Western Blot sichtbar wurde. Trotz dieses Mangels an Nexilin zeigten die betroffenen Fische keine morphologischen oder funktionellen Auffälligkeiten im Vergleich zu Wildtypfischen wie sie bei den Knockdown-Versuchen zuvor beobachtet worden waren. Diese Diskrepanz zwischen einem pathologischen Phänotyp eines Knockdown-Fisches und einem unauffälligen oder anderen Phänotyp des entsprechenden Knockout-Fisches wird auch von anderen Arbeitsgruppen für verschiedenste Gene beschrieben. Mehrere Erklärungsansätze sind dabei in Betracht zu ziehen. Als aktuell wahrscheinlichste Ursache für den fehlenden Phänotyp der hier generierten Nexilin-defizienten Fische ist die Aktivierung genetischer Kompensationsmechanismen anzusehen. So kann durch einen Gen-Knockout die Expression anderer Gene kompensatorisch angepasst

werden. Diesbezüglich sind nun weitere Untersuchungen wie die Analyse des gesamten Proteoms der Knockout-Fische nötig. Dennoch sollte auch die Spezifität der Morpholinos für die Knockdown-Versuche durch Anwendung in der neuen Knockout-Linie überprüft werden, um *Off-Target*-Effekte als Ursache des beobachteten DCM-Phänotyps auszuschließen.

Die Generierung einer weiteren Zebrafischlinie, einer transgenen Nexilin-Linie, scheiterte. Mit Hilfe eines Multisite-Vektors sollte die Expression eines Nexilin-GFP-Fusionsproteins induziert werden. Da die Eizellen lediglich eine geringe Toleranz gegenüber der Konzentration der Injektionslösung zeigten, ergibt sich der Verdacht auf eine toxische Wirkung des Vektors oder durch eine erhöhte Nexilin-Konzentration, wobei bereits zuvor eine Störung der myokardialen Differenzierung durch Nexilin-Überexpression beschrieben worden ist.

Zur weiteren funktionellen Charakterisierung von Nexilin wurde ein Fokus dieser Arbeit auf die Validierung bekannter und die Ermittlung unbekannter Interaktionspartner von Nexilin mit Hilfe eines Zellkultursystems gelegt. Dabei konnte die Interaktion zwischen Nexilin und Aktin bestätigt und die Vermutung einer stabilisierenden Funktion von Nexilin auf das Aktinzytoskelett gestellt werden. Nach Behandlung mit Cytochalasin D, einer hemmenden Substanz der Aktinpolymerisation, wiesen Nexilin-transfizierte Zellen im Gegensatz zu nicht-Nexilin-transfizierten Zellen ein weitgehend erhaltenes Aktinzytoskelett auf. Zudem lieferten ein extern durchgeführter *Yeast-two-Hybrid-Screen* sowie eine Koimmunpräzipitation Hinweise, dass die Proteine Glomulin und CTNNBL1 (Catenin beta like protein 1) mögliche unbekannte Interaktionspartner von Nexilin darstellen. Diesbezüglich sind weitere Schritte zur Verifikation und zur Ermittlung der tatsächlichen biologischen Relevanz erforderlich.

Die gewonnen Erkenntnisse und Hypothesen stellen eine Basis für eine weitere Charakterisierung von Nexilin dar, was letztlich zum weiteren Verständnis über die Pathomechanismen von Kardiomyopathien beitragen kann.

6. Literaturverzeichnis

1. Aherrahrou Z, Schlossarek S, Stoelting S, Klinger M, Geertz B, Weinberger F, Kessler T, Aherrahrou R, Moreth K, Bekeredjian R, Hrabe de Angelis M, Just S, Rottbauer W, Eschenhagen T, Schunkert H, Carrier L, Erdmann J: Knock-out of nexilin in mice leads to dilated cardiomyopathy and endomyocardial fibroelastosis. Basic research in cardiology, 111: Art.-Nr. 6 (2016)

2. Anderson J L, Mulligan T S, Shen M, Wang H, Scahill C M, Tan F J, Du S J, Busch-Nentwich E M, Farber S A: mRNA processing in mutant zebrafish lines generated by chemical and CRISPR-mediated mutagenesis produces unexpected transcripts that escape nonsense-mediated decay. PLoS Genetics, 13: e1007105 (2017)

3. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero D A, Horvath P: CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. Science, 315: 1709-1712 (2007)

4. Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Dusko Ehrlich S: Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. Microbiology, 151: 2551-2561 (2005)

5. Braun N, Wyrzykowska J, Muller P, David K, Couch D, Perrot-Rechenmann C, Fleming A J: Conditional repression of AUXIN BINDING PROTEIN1 reveals that it coordinates cell division and cell expansion during postembryonic shoot development in Arabidopsis and tobacco. Plant Cell, 20: 2746-2762 (2008)

6. Brouillard P, Boon L M, Mulliken J B, Enjolras O, Ghassibe M, Warman M L, Tan O T, Olsen B R, Vikkula M: Mutations in a novel factor, glomulin, are responsible for glomuvenous malformations ("glomangiomas"). American Journal of Human Genetics, 70: 866-874 (2002)

7. Casella J F, Flanagan M D, Lin S: Cytochalasin D inhibits actin polymerization and induces depolymerization of actin filaments formed during platelet shape change. Nature, 293: 302-305 (1981)

8. Chandra A, van Maldegem F, Andrews S, Neuberger M S, Rada C: Deficiency in spliceosome-associated factor CTNNBL1 does not affect ongoing cell cycling but delays exit from quiescence and results in embryonic lethality in mice. Cell Cycle, 12: 732-742 (2013)

9. Chang N, Sun C, Gao L, Zhu D, Xu X, Zhu X, Xiong J, Xi J J: Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in zebrafish embryos. Cell research, 23: 465-472 (2013)

10. Charron P, Elliott P M, Gimeno J R, Caforio A L P, Kaski J P, Tavazzi L, Tendera M, Maupain C, Laroche C, Rubis P, Jurcut R, Calò L, Heliö T M, Sinagra G, Zdravkovic M, Kavoliūnienė A, Felix S B, Grzybowski J, Losi M, Asselbergs F W,

García-Pinilla J M, Salazar-Mendiguchia J, Mizia-Stec K, Maggioni A P: The Cardiomyopathy Registry of the EURObservational Research Programme of the European Society of Cardiology: baseline data and contemporary management of adult patients with cardiomyopathies. European Heart Journal, 39: 1784-1793 (2018)

11. Cong L, Ran F A, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu P D, Wu X, Jiang W, Marraffini L A, Zhang F: Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science, 339: 819-823 (2013)

12. Conticello S G, Ganesh K, Xue K, Lu M, Rada C, Neuberger M S: Interaction between antibody-diversification enzyme AID and spliceosome-associated factor CTNNBL1. Molecular cell, 31: 474-484 (2008)

13. Daude N, Wohlgemuth S, Brown R, Pitstick R, Gapeshina H, Yang J, Carlson G A, Westaway D: Knockout of the prion protein (PrP)-like Sprn gene does not produce embryonic lethality in combination with PrPC-deficiency. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 109: 9035-9040 (2012)

14. Deltcheva E, Chylinski K, Sharma C M, Gonzales K, Chao Y, Pirzada Z A, Eckert M R, Vogel J, Charpentier E: CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. Nature, 471: 602-607 (2011)

15. den Broeder M J, van der Linde H, Brouwer J R, Oostra B A, Willemsen R, Ketting R F: Generation and characterization of FMR1 knockout zebrafish. PLoS ONE, 4: e7910 (2009)

16. Doyon Y, McCammon J M, Miller J C, Faraji F, Ngo C, Katibah G E, Amora R, Hocking T D, Zhang L, Rebar E J, Gregory P D, Urnov F D, Amacher S L: Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases. Nature biotechnology, 26: 702-708 (2008)

17. Duda D M, Olszewski J L, Tron A E, Hammel M, Lambert L J, Waddell M B, Mittag T, DeCaprio J A, Schulman B A: Structure of a glomulin-RBX1-CUL1 complex: inhibition of a RING E3 ligase through masking of its E2-binding surface. Molecular cell, 47: 371-382 (2012)

18. Durr A, Cossee M, Agid Y, Campuzano V, Mignard C, Penet C, Mandel J L, Brice A, Koenig M: Clinical and genetic abnormalities in patients with Friedreich's ataxia. New England Journal of Medicine, 335: 1169-1175 (1996)

19. Eisen J S, Smith J C: Controlling morpholino experiments: don't stop making antisense. Development, 135: 1735-1743 (2008)

20. ElBrolosy M A, Kontarakis Z, Rossi A, Kuenne C, Gunther S, Fukuda N, Kikhi K, Boezio G L M, Takacs C M, Lai S L, Fukuda R, Gerri C, Giraldez A J, Stainier D Y R: Genetic compensation triggered by mutant mRNA degradation. Nature, 568: 193-197 (2019)

21. Elliott P M, Gimeno J R, Thaman R, Shah J, Ward D, Dickie S, Tome Esteban M T, McKenna W J: Historical trends in reported survival rates in patients with hypertrophic cardiomyopathy. Heart, 92: 785-791 (2006)

22. Elliott P M, Anastasakis A, Borger M A, Borggrefe M, Cecchi F, Charron P, Hagege A A, Lafont A, Limongelli G, Mahrholdt H, McKenna W J, Mogensen J, Nihoyannopoulos P, Nistri S, Pieper P G, Pieske B, Rapezzi C, Rutten F H, Tillmanns C, Watkins H: 2014 ESC Guidelines on diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy: the Task Force for the Diagnosis and Management of Hypertrophic Cardiomyopathy of the European Society of Cardiology (ESC). European Heart Journal, 35: 2733-2779 (2014)

23. Elliott P, Andersson B, Arbustini E, Bilinska Z, Cecchi F, Charron P, Dubourg O, Kuhl U, Maisch B, McKenna W J, Monserrat L, Pankuweit S, Rapezzi C, Seferovic P, Tavazzi L, Keren A: Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. European Heart Journal, 29: 270-276 (2008)

24. Elliott P, Baker R, Pasquale F, Quarta G, Ebrahim H, Mehta A B, Hughes D A, ACES study group: Prevalence of Anderson-Fabry disease in patients with hypertrophic cardiomyopathy: the European Anderson-Fabry Disease survey. Heart, 97: 1957-1960 (2011)

25. Fleisch V C, Leighton P L A, Wang H, Pillay L M, Ritzel R G, Bhinder G, Roy B, Tierney K B, Ali D W, Waskiewicz A J, Allison W T: Targeted mutation of the gene encoding prion protein in zebrafish reveals a conserved role in neuron excitability. Neurobiology of disease, 55: 11-25 (2013)

26. Ganesh K, Adam S, Taylor B, Simpson P, Rada C, Neuberger M: CTNNBL1 is a novel nuclear localization sequence-binding protein that recognizes RNA-splicing factors CDC5L and Prp31. Journal of Biological Chemistry, 286: 17091-17102 (2011)

27. Gao Y, Zhang Y, Zhang D, Dai X, Estelle M, Zhao Y: Auxin binding protein 1 (ABP1) is not required for either auxin signaling or Arabidopsis development. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 112: 2275-2280 (2015)

28. Garneau J E, Dupuis M E, Villion M, Romero D A, Barrangou R, Boyaval P, Fremaux C, Horvath P, Villion M, Moineau S: The CRISPR/cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. Nature, 468: 67-71 (2010)

29. Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V: Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 109: E2579-E2586 (2012)

30. Gerety S S, Wilkinson D G: Morpholino artifacts provide pitfalls and reveal a novel role for pro-apoptotic genes in hindbrain boundary development. Developmental biology, 350: 279-289 (2011)

31. Gerull B, Gramlich M, Atherton J, McNabb M, Trombitas K, Sasse-Klaassen S, Seidman J G, Seidman C, Granzier H, Labeit S, Frenneaux M, Thierfelder L: Mutations of TTN, encoding the giant muscle filament titin, cause familial dilated cardiomyopathy. Nature genetics, 30: 201-204 (2002)

32. Groenen P M A, Bunschoten A E, Van Soolingen D, Van Embden J D A: Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of Mycobacterium tuberculosis; Application for strain differentiation by a novel typing method. Molecular microbiology, 10: 1057-1065 (1993)

33. Grunig E, Tasman J A, Kucherer H, Franz W, Kubler W, Katus H A: Frequency and phenotypes of familial dilated cardiomyopathy. Journal of the American College of Cardiology, 31: 186-194 (1998)

34. Grunwald D J, Streisinger G: Induction of recessive lethal and specific locus mutations in the zebrafish with ethyl nitrosourea. Genetical research, 59: 103-116 (1992)

35. Han L, Masani S, Yu K: Cutting edge: CTNNBL1 is dispensable for Ig class switch recombination. Journal of Immunology, 185: 1379-1381 (2010)

36. Hassel D, Dahme T, Erdmann J, Meder B, Huge A, Stoll M, Just S, Hess A, Ehlermann P, Weichenhan D, Grimmler M, Liptau H, Hetzer R, Regitz-Zagrosek V, Fischer C, Nurnberg P, Schunkert H, Katus H A, Rottbauer W: Nexilin mutations destabilize cardiac Z-disks and lead to dilated cardiomyopathy. Nature medicine, 15: 1281-1288 (2009)

37. Hershberger R E, Norton N, Morales A, Li D, Siegfried J D, Gonzalez-Quintana J: Coding sequence rare variants identified in MYBPC3, MYH6, TPM1, TNNC1, and TNNI3 from 312 patients with familial or idiopathic dilated cardiomyopathy. Circulation.Cardiovascular Genetics, 3: 155-161 (2010)

38. Howe K, Clark M D, Torroja C F, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, Collins J E, Humphray S, McLaren K, Matthews L, McLaren S, Sealy I, Caccamo M, Churcher C, Scott C, Barrett J C, Koch R, Rauch G, White S, Chow W, Kilian B, Quintais L T, Guerra-Assuncao J A, Zhou Y, Gu Y, Yen J, Vogel J, Eyre T, Redmond S, Banerjee R, Chi J, Fu B, Langley E, Maguire S F, Laird G K, Lloyd D, Kenyon E, Donaldson S, Sehra H, Almeida-King J, Loveland J, Trevanion S, Jones M, Quail M, Willey D, Hunt A, Burton J, Sims S, McLay K, Plumb B, Davis J, Clee C, Oliver K, Clark R, Riddle C, Elliot D, Threadgold G, Harden G, Ware D, Begum S, Mortimore B, Kerry G, Heath P, Phillimore B, Tracey A, Corby N, Dunn M, Johnson C, Wood J, Clark S, Pelan S, Griffiths G, Smith M, Glithero R, Howden P, Barker N, Lloyd C, Stevens C, Harley J, Holt K, Panagiotidis G, Lovell J, Beasley H, Henderson C, Gordon D, Auger K, Wright D, Collins J, Raisen C, Dyer L, Leung K, Robertson L, Ambridge K, Leongamornlert D, McGuire S, Gilderthorp R, Griffiths C, Manthravadi D, Nichol S, Barker G, Whitehead S, Kay M, Brown J, Murnane C, Gray E, Humphries M, Sycamore N, Barker D, Saunders D, Wallis J, Babbage A, Hammond S, Mashreghi-Mohammadi M, Barr L, Martin S, Wray P, Ellington A, Matthews N, Ellwood M, Woodmansey R, Clark G, Cooper J D, Tromans A, Grafham D, Skuce C, Pandian R, Andrews R, Harrison E, Kimberley A, Garnett J, Fosker N, Hall R, Garner P, Kelly

D, Bird C, Palmer S, Gehring I, Berger A, Dooley C M, Ersan-Urun Z, Eser C, Geiger H, Geisler M, Karotki L, Kirn A, Konantz J, Konantz M, Oberlander M, Rudolph-Geiger S, Teucke M, Lanz C, Raddatz G, Osoegawa K, Zhu B, Rapp A, Widaa S, Langford C, Yang F, Schuster S C, Carter N P, Harrow J, Ning Z, Herrero J, Searle S M J, Enright A, Geisler R, Plasterk R H A, Lee C, Westerfield M, de Jong P J, Zon L I, Postlethwait J H, Nusslein-Volhard C, Hubbard T J P, Roest Crollius H, Rogers J, Stemple D L: The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. Nature, 496: 498-503 (2013)

39. Hruscha A, Krawitz P, Rechenberg A, Heinrich V, Hecht J, Haass C, Schmid B: Efficient CRISPR/Cas9 genome editing with low off-target effects in zebrafish. Development, 140: 4982-4987 (2013)

40. Hu Y W, Guo F X, Xu Y J, Li P, Lu Z F, McVey D G, Zheng L, Wang Q, Ye J H, Kang C M, Wu S G, Zhao J J, Ma X, Yang Z, Fang F C, Qiu Y R, Xu B M, Xiao L, Wu Q, Wu L M, Ding L, Webb T R, Samani N J, Ye S: Long noncoding RNA NEXN-AS1 mitigates atherosclerosis by regulating the actin-binding protein NEXN. Journal of Clinical Investigation, 129: 1115-1128 (2019)

41. Huang P, Xiao A, Zhou M, Zhu Z, Lin S, Zhang B: Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs. Nature biotechnology, 29: 699-700 (2011)

42. Huhn S, Ingelfinger D, Bermejo J L, Bevier M, Pardini B, Naccarati A, Steinke V, Rahner N, Holinski-Feder E, Morak M, Schackert H K, Gorgens H, Pox C P, Goecke T, Kloor M, Loeffler M, Buttner R, Vodickova L, Novotny J, Demir K, Cruciat C M, Renneberg R, Huber W, Niehrs C, Boutros M, Propping P, Vodicka P, Hemminki K, Forsti A: Original article polymorphisms in CTNNBL1 in relation to colorectal cancer with evolutionary implications. International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics, 2: 36-50 (2011)

43. Hwang W Y, Fu Y, Reyon D, Maeder M L, Kaini P, Sander J D, Joung J K, Peterson R T, Yeh J R J: Heritable and Precise Zebrafish Genome Editing Using a CRISPR-Cas System. PLoS ONE, 8: e68708 (2013)

44. Hwang W Y, Fu Y, Reyon D, Maeder M L, Tsai S Q, Sander J D, Peterson R T, Yeh J-R J, Joung J K: Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. Nature biotechnology, 31: 227-229 (2013)

45. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakatura A: Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isoenzyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product. Journal of Bacteriology, 169: 5429-5433 (1987)

46. Jabbour L, Welter J F, Kollar J, Hering T M: Sequence, gene structure, and expression pattern of CTNNBL1, a minor-class intron-containing gene--evidence for a role in apoptosis. Genomics, 81: 292-303 (2003)

47. Jansen R, Van Embden J D A, Gaastra W, Schouls L M: Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. Molecular microbiology, 43: 1565-1575 (2002)

48. Jansen R, van Embden J D A, Gaastra W, Schouls L M: Identification of a novel family of sequence repeats among prokaryotes. Omics a Journal of Integrative Biology, 6: 23-33 (2002)

49. Jao L E, Wente S R, Chen W: Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 110: 13904-13909 (2013)

50. Jiang W, Bikard D, Cox D, Zhang F, Marraffini L: CRISPR-assisted editing of bacterial genomes. Nature biotechnology, 31: 233-239 (2013)

51. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna J A, Charpentier E: A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science, 337: 816-821 (2012)

52. Jinek M, East A, Cheng A, Lin S, Ma E, Doudna J: RNA-programmed genome editing in human cells. eLife, 2: e00471 (2013)

53. Joris M, Schloesser M, Baurain D, Hanikenne M, Muller M, Motte P: Number of inadvertent RNA targets for morpholino knockdown in Danio rerio is largely underestimated: evidence from the study of Ser/Arg-rich splicing factors. Nucleic acids research, 45: 9547-9557 (2017)

54. Kamisago M, Sharma S D, DePalma S R, Solomon S, Sharma P, McDonough B, Smoot L, Mullen M P, Woolf P K, Wigle E D, Seidman J G, Seidman C E: Mutations in sarcomere protein genes as a cause of dilated cardiomyopathy. New England Journal of Medicine, 343: 1688-1696 (2000)

55. Kaski J P, Elliott P, ESC Working Group: The classification concept of the ESC Working Group on myocardial and pericardial diseases for dilated cardiomyopathy. Herz, 32: 446-451 (2007)

56. Kettleborough R N W, Busch-Nentwich E M, Harvey S A, Dooley C M, de Bruijn E, van Eeden F, Sealy I, White R J, Herd C, Nijman I J, Fenyes F, Mehroke S, Scahill C, Gibbons R, Wali N, Carruthers S, Hall A, Yen J, Cuppen E, Stemple D L: A systematic genome-wide analysis of zebrafish protein-coding gene function. Nature, 496: 494-497 (2013)

57. Knopf F, Schnabel K, Haase C, Pfeifer K, Anastassiadis K, Weidinger G: Dually inducible TetON systems for tissue-specific conditional gene expression in zebrafish. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107: 19933-19938 (2010)

58. Kok F O, Shin M, Ni C, Gupta A, Grosse A S, van Impel A, Kirchmaier B C, Peterson-Maduro J, Kourkoulis G, Male I, DeSantis D F, Sheppard-Tindell S, Ebarasi L, Betsholtz C, Schulte-Merker S, Wolfe S A, Lawson N D: Reverse genetic screening reveals poor correlation between morpholino-induced and mutant phenotypes in zebrafish. Developmental Cell, 32: 97-108 (2015)

59. Kwan K M, Fujimoto E, Grabher C, Mangum B D, Hardy M E, Campbell D S, Parant J M, Yost H J, Kanki J P, Chien C: The Tol2kit: a multisite gateway-based

construction kit for Tol2 transposon transgenesis constructs. Developmental Dynamics, 236: 3088-3099 (2007)

60. Lalonde S, Stone O A, Lessard S, Lavertu A, Desjardins J, Beaudoin M, Rivas M, Stainier D Y R, Lettre G: Frameshift indels introduced by genome editing can lead to in-frame exon skipping. PLoS ONE, 12: e0178700 (2017)

61. Law S H W, Sargent T D: The serine-threonine protein kinase PAK4 is dispensable in zebrafish: Identification of a morpholino-generated pseudophenotype. PLoS ONE, 9: e100268 (2014)

62. Law S H W, Sargent T D: Maternal pak4 expression is required for primitive myelopoiesis in zebrafish. Mechanisms of development, 130: 181-194 (2013)

63. Li Y, Guo H, Jin C, Qiu C, Gao M, Zhang L, Liu Z, Kong B: Spliceosome-associated factor CTNNBL1 promotes proliferation and invasion in ovarian cancer. Experimental cell research, 357: 124-134 (2017)

64. Lieschke G J, Currie P D: Animal models of human disease: Zebrafish swim into view. Nature Reviews Genetics, 8: 353-367 (2007)

65. Liu C, Spinozzi S, Chen J Y, Fang X, Feng W, Perkins G, Cattaneo P, GuimaraesCamboa N, Dalton N D, Peterson K L, Wu T, Ouyang K, Fu X D, Evans S M, Chen J: Nexilin Is a New Component of Junctional Membrane Complexes Required for Cardiac T-Tubule Formation. Circulation, 140: 55-66 (2019)

66. Liu Y, Liu X, Wang L, Dina C, Yan H, Liu J, Levy S, Papasian C J, Drees B M, Hamilton J J, Meyre D, Delplanque J, Pei Y, Zhang L, Recker R R, Froguel P, Deng H: Genome-wide association scans identified CTNNBL1 as a novel gene for obesity. Human molecular genetics, 17: 1803-1813 (2008)

67. Luo T, Xu Y, Hoffman T L, Zhang T, Schilling T, Sargent T D: Inca: a novel p21-activated kinase-associated protein required for cranial neural crest development. Development, 134: 1279-1289 (2007)

68. Makarova K S, Aravind L, Grishin N V, Rogozin I B, Koonin E V: A DNA repair system specific for thermophilic Archaea and bacteria predicted by genomic context analysis. Nucleic acids research, 30: 482-496 (2002)

69. Makarova K S, Grishin N V, Shabalina S A, Wolf Y I, Koonin E V: A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. Biology direct, 1: Art.-Nr. 7 (2006)

70. Makarova K S, Haft D H, Barrangou R, Brouns S J J, Charpentier E, Horvath P, Moineau S, Mojica F J M, Wolf Y I, Yakunin A F, van der Oost J, Koonin E V: Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. Nature Reviews.Microbiology, 9: 467-477 (2011)

71. Makarova O V, Makarov E M, Urlaub H, Will C L, Gentzel M, Wilm M, Luhrmann R: A subset of human 35S U5 proteins, including Prp19, function prior to catalytic step 1 of splicing. EMBO Journal, 23: 2381-2391 (2004)

72. Mali P, Yang L, Esvelt K M, Aach J, Guell M, DiCarlo J E, Norville J E, Church G M: RNA-guided human genome engineering via Cas9. Science, 339: 823-826 (2013)

73. McIntyre B A S, Brouillard P, Aerts V, Gutierrez-Roelens I, Vikkula M: Glomulin is predominantly expressed in vascular smooth muscle cells in the embryonic and adult mouse. Gene Expression Patterns, 4: 351-358 (2004)

74. McMurray J J V, Adamopoulos S, Anker S D, Auricchio A, Bohm M, Dickstein K, Falk V, Filippatos G, Fonseca C, Gomez-Sanchez M A, Jaarsma T, Kober L, Lip G Y H, Maggioni A P, Parkhomenko A, Pieske B M, Popescu B A, Ronnevik P K, Rutten F H, Schwitter J, Seferovic P, Stepinska J, Trindade P T, Voors A A, Zannad F, Zeiher A, Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology, Bax J J, Baumgartner H, Ceconi C, Dean V, Deaton C, Fagard R, Funck-Brentano C, Hasdai D, Hoes A, Kirchhof P, Knuuti J, Kolh P, McDonagh T, Moulin C, Popescu B A, Reiner Z, Sechtem U, Sirnes P A, Tendera M, Torbicki A, Vahanian A, Windecker S, McDonagh T, Sechtem U, Bonet L A, Avraamides P, Ben Lamin H A, Brignole M, Coca A, Cowburn P, Dargie H, Elliott P, Flachskampf F A, Guida G F, Hardman S, Iung B, Merkely B, Mueller C, Nanas J N, Nielsen O W, Orn S, Parissis J T, Ponikowski P, ESC Committee for Practice Guidelines: ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. European Journal of Heart Failure, 14: 803-869 (2012)

75. Mestroni L, Maisch B, McKenna W J, Schwartz K, Charron P, Rocco C, Tesson F, Richter A, Wilke A, Komajda M: Guidelines for the study of familial dilated cardiomyopathies. Collaborative Research Group of the European Human and Capital Mobility Project on Familial Dilated Cardiomyopathy. European heart journal, 20: 93-102 (1999)

76. Michels V V, Driscoll D J, Miller F A, Olson T M, Atkinson E J, Olswold C L, Schaid D J: Progression of familial and non-familial dilated cardiomyopathy: long term follow up. Heart, 89: 757-761 (2003)

77. Mojica F J M, Diez-Villasenor C, Garcia-Martinez J, Almendros C: Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. Microbiology, 155: 733-740 (2009)

78. Mojica F J M, Diez-Villasenor C, Garcia-Martinez J, Soria E: Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. Journal of Molecular Evolution, 60: 174-182 (2005)

79. Muntoni F, Cau M, Ganau A, Congiu R, Arvedi G, Mateddu A, Marrosu M G, Cianchetti C, Realdi G, Cao A: Brief report: deletion of the dystrophin muscle-

promoter region associated with X-linked dilated cardiomyopathy. New England Journal of Medicine, 329: 921-925 (1993)

80. Nasevicius A, Ekker S C: Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. Nature genetics, 26: 216-220 (2000)

81. Nourizadeh-Lillabadi R, Seilo Torgersen J, Vestrheim O, Konig M, Alestrom P, Syed M: Early embryonic gene expression profiling of zebrafish prion protein (Prp2) morphants. PLoS ONE, 5: e13573 (2010)

82. Ohtsuka T, Nakanishi H, Ikeda W, Satoh A, Momose Y, Nishioka H, Takai Y: Nexilin: A novel actin filament-binding protein localized at cell- matrix adherens junction. Journal of Cell Biology, 143: 1227-1238 (1998)

83. Olson T M, Michels V V, Thibodeau S N, Tai Y S, Keating M T: Actin mutations in dilated cardiomyopathy, a heritable form of heart failure. Science, 280: 750-752 (1998)

84. Parker L H, Schmidt M, Jin S, Gray A M, Beis D, Pham T, Frantz G, Palmieri S, Hillan K, Stainier D Y R, De Sauvage F J, Ye W: The endothelial-cell-derived secreted factor Egfl7 regulates vascular tube formation. Nature, 428: 754-758 (2004)

85. Partridge M, Vincent A, Matthews P, Puma J, Stein D, Summerton J: A simple method for delivering morpholino antisense oligos into the cytoplasm of cells. Antisense & Nucleic Acid Drug Development, 6: 169-175 (1996)

86. Rapezzi C, Arbustini E, Caforio A L P, Charron P, Gimeno-Blanes J, Helio T, Linhart A, Mogensen J, Pinto Y, Ristic A, Seggewiss H, Sinagra G, Tavazzi L, Elliott P M: Diagnostic work-up in cardiomyopathies: bridging the gap between clinical phenotypes and final diagnosis. A position statement from the ESC Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. European heart journal, 34: 1448-1458 (2013)

87. Richard P, Charron P, Carrier L, Ledeuil C, Cheav T, Pichereau C, Benaiche A, Isnard R, Dubourg O, Burban M, Gueffet J, Millaire A, Desnos M, Schwartz K, Hainque B, Komajda M, EUROGENE Heart Failure Project: Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy. Circulation, 107: 2227-2232 (2003)

88. Robu M E, Larson J D, Nasevicius A, Beiraghi S, Brenner C, Farber S A, Ekker S C: p53 activation by knockdown technologies. PLoS Genetics, 3: 787-801 (2007)

89. Rossi A, Kontarakis Z, Gerri C, Nolte H, Holper S, Kruger M, Stainier D Y R: Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns. Nature, 524: 230-233 (2015)

90. Rudeck S, Etard C, Khan M M, Rottbauer W, Rudolf R, Strahle U, Just S: A compact unc45b-promoter drives muscle-specific expression in zebrafish and mouse. Genesis: the Journal of Genetics & Development, 54: 431-438 (2016)

91. Sander J D, Joung J K: CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. Nature biotechnology, 32: 347-355 (2014)

92. Sharland M, Burch M, McKenna W M, Paton M A: A clinical study of Noonan syndrome. Archives of Disease in Childhood, 67: 178-183 (1992)

93. Shen B, Zhang J, Wu H, Wang J, Ma K, Li Z, Zhang X, Zhang P, Huang X: Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting. Cell research, 23: 720-723 (2013)

94. Stainier D Y, Fishman M C: Patterning the zebrafish heart tube: acquisition of anteroposterior polarity. Developmental biology, 153: 91-101 (1992)

95. Stainier D Y R, Kontarakis Z, Rossi A: Making sense of anti-sense data. Developmental Cell, 32: 7-8 (2015)

96. Stainier D Y R, Raz E, Lawson N D, Ekker S C, Burdine R D, Eisen J S, Ingham P W, Schulte-Merker S, Yelon D, Weinstein B M, Mullins M C, Wilson S W, Ramakrishnan L, Amacher S L, Neuhauss S C F, Meng A, Mochizuki N, Panula P, Moens C B: Guidelines for morpholino use in zebrafish. PLoS Genetics, 13: e1007000 (2017)

97. Suzuki S, Suzuki T, Mimuro H, Mizushima T, Sasakawa C: Shigella hijacks the glomulin-cIAPs-inflammasome axis to promote inflammation. EMBO reports, 19: 89-101 (2018)

98. Towbin J A, Hejtmancik J F, Brink P, Gelb B, Zhu X M, Chamberlain J S, McCabe E R, Swift M: X-linked dilated cardiomyopathy. Molecular genetic evidence of linkage to the Duchenne muscular dystrophy (dystrophin) gene at the Xp21 locus. Circulation, 87: 1854-1865 (1993)

99. Tron A E, Arai T, Duda D M, Kuwabara H, Olszewski J L, Fujiwara Y, Bahamon B N, Signoretti S, Schulman B A, DeCaprio J A: The glomuvenous malformation protein Glomulin binds Rbx1 and regulates cullin RING ligase-mediated turnover of Fbw7. Molecular cell, 46: 67-78 (2012)

100. Tucker B, Richards R I, Lardelli M: Contribution of mGluR and Fmr1 functional pathways to neurite morphogenesis, craniofacial development and fragile X syndrome. Human molecular genetics, 15: 3446-3458 (2006)

101. van Maldegem F, Maslen S, Johnson C M, Chandra A, Ganesh K, Skehel M, Rada C: CTNNBL1 facilitates the association of CWC15 with CDC5L and is required to maintain the abundance of the Prp19 spliceosomal complex. Nucleic acids research, 43: 7058-7069 (2015)

102. Wang H, Yang H, Shivalila C S, Dawlaty M M, Cheng A W, Zhang F, Jaenisch R: One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/cas-mediated genome engineering. Cell, 153: 910-918 (2013)

103. Wang H, Li Z, Wang J, Sun K, Cui Q, Song L, Zou Y, Wang X, Liu X, Hui R, Fan Y: Mutations in NEXN, a Z-Disc Gene, Are Associated with Hypertrophic Cardiomyopathy. The American Journal of Human Genetics, 87: 687-693 (2010)

104. Westerfield M (Hrsg) The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Brachydanio rerio). 4. Auflage, University of Oregon, Eugene, (2000)

105. Wu C, Yan H, Sun J, Yang F, Song C, Jiang F, Li Y, Dong J, Zheng G, Tian X, Cao H: NEXN is a novel susceptibility gene for coronary artery disease in Han Chinese. PLoS ONE, 8: e82135 (2013)

106. Yang F, Zhou L, Wang Q, You X, Zhao Y, Han X, Chang Z, He X, Cheng C, Wu C, Wang W J, Hu F Y, Zhao T, Li Y, Zhao M, Zheng G Y, Dong J, Fan C, Yang J, Meng X, Zhang Y, Zhu X, Tian X L, Cao H: NEXN inhibits GATA4 and leads to atrial septal defects inmice and humans. Cardiovascular research, 103: 228-237 (2014)

107. Young R, Passet B, Vilotte M, Cribiu E P, Beringue V, Le Provost F, Laude H, Vilotte J: The prion or the related Shadoo protein is required for early mouse embryogenesis. FEBS letters, 583: 3296-3300 (2009)

108. Zhang Y, Zhang Z, Ge W: An efficient platform for generating somatic point mutations with germline transmission in the zebrafish by CRISPR/Cas9-mediated gene editing. Journal of Biological Chemistry, 293: 6611-6622 (2018)

109. Zhao Y, Wei Y, Cao H, Ding J: Molecular Cloning of NELIN, a Putative Human Cytoskeleton Regulation Gene. Shengwu huaxue Yu Shengwu Wuli Xuebao Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 33: 19-24 (2001)

110. Zhu B, Rippe C, Holmberg J, Zeng S, Perisic L, Albinsson S, Hedin U, Uvelius B, Sward K: Nexilin/NEXN controls actin polymerization in smooth muscle and is regulated by myocardin family coactivators and YAP. Scientific Reports, 8: Art.-Nr. 13025 (2018)

Danksagung

Die Danksagung wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.