

**Identifikation von  
Kardiomyozyten-Differenzierungs-Genen  
durch einen  
siRNA-basierenden Screeningansatz**

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

An der Justus Liebig Universität Gießen

Fachbereich 08

„Biologie und Chemie“

angefertigt am

Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung

Bad Nauheim

*vorgelegt von*

***Stefanie Köhler-Bachmann***

*aus Hilden*

*März 2011*

***Dekan: Prof. Dr. Volkmar Wolters***

***1.Gutachter: Prof. Dr. Adriaan Dorresteijn***

***2.Gutachter: Prof. Dr. Dr. Thomas Braun***

***Tag der mündlichen Prüfung:***

Unsere Bestimmung verfügt über uns,  
auch wenn wir sie noch nicht kennen;  
es ist die Zukunft,  
die unserm Heute die Regel gibt.

*Friedrich Nietzsche*  
*Menschliches, Allzumenschliches*

<b>Abkürzungen</b>	<b>1</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>3</b>
<b>1.1. Die frühe Entwicklung des Herzens</b>	<b>5</b>
1.1.1. Die Bildung der Keimblätter: Gastrulation in Vertebraten	6
1.1.2. Bildung des kardialen Mesoderms	8
1.1.3. Frühe Morphogenese des embryonalen Herzens	11
<b>1.2. <i>in vitro</i> Differenzierung embryonaler Stammzellen</b>	<b>12</b>
1.2.1. Differenzierung von Kardiomyozyten aus murinen Embryonalen Stammzellen	14
<b>1.3. RNA Interferenz</b>	<b>16</b>
1.3.1. Vektor-basierende Expressions-Systeme für Säugerzellen	21
1.3.2. siRNA Bibliotheken	23
<b>1.4. Fragestellung und Ziel der Arbeit</b>	<b>24</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>25</b>
<b>2.1. Chemikalien, Enzyme, Lösungen</b>	<b>25</b>
<b>2.2. Arbeiten mit Nukleinsäuren</b>	<b>25</b>
2.2.1. Sequenzspezifische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	25
2.2.2. Dephosphorylierung von 5'-Enden der DNA	25
2.2.3. Agarose-Gelelektrophorese	26
2.2.4. Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	26
2.2.5. Paarung komplementärer DNA-Oligonukleotide („Annealing“)	26
2.2.6. Phosphorylierung von DNA-Oligonukleotiden	27
2.2.7. Ligation von DNA-Fragmenten	27
2.2.8. Analytische Plasmid-Isolierung (Mini-Präparation)	27
2.2.9. Präparative Plasmid-Isolierung (Maxi-Präparation)	28
2.2.10. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in Lösung	28
2.2.11. Sequenzierung von DNA	28
2.2.12. Isolation von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen	29
2.2.13. Fällung von RNA	29
2.2.14. cDNA-Synthese mittels reverser Transkription	29
2.2.15. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) nach (Saiki et al., 1986)	30
2.2.16. Aufreinigung von PCR-Produkten	32
2.2.17. $\lambda$ -Exonuklease-Behandlung von PCR-Produkten	33
<b>2.3. Bakterien</b>	<b>33</b>
2.3.1. Bakterienstämme	33
2.3.2. Bakterienmedien	33
2.3.3. Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien	34
2.3.4. Transformation von chemisch-kompetenten Bakterien	34
<b>2.4. Zellkultur</b>	<b>35</b>
2.4.1. Zelllinien	35
2.4.2. Zellkulturmedien, Lösungen und Reagenzien	35
2.4.3. Kultivierung der Zellen	36
2.4.4. Passagieren von Zellen	36
2.4.5. Einfrieren und Auftauen von Zellen	37
2.4.6. Transfektion von Zellen	37
2.4.7. G418-Selektion	38
2.4.8. Puromycin-Selektion	38
2.4.9. <i>in vitro</i> Differenzierung von ES-Zellen	38
<b>2.5. Viren</b>	<b>39</b>
2.5.1. Generierung lentiviraler Partikel	39
2.5.2. Konzentrierung lentiviraler Partikel	40
2.5.3. Bestimmung des Titers	40

2.5.4. Bestimmung der MOI für ES-Zellen _____	40
<b>2.6. Proteine _____</b>	<b>41</b>
2.6.1. Isolation von Proteinen aus eukaryotischen Zellen _____	41
2.6.2. Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Lösung (nach Bradford, 1976) _____	42
2.6.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach (Laemmli, 1970) _____	42
2.6.4. Proteintransfer und -nachweis (Western-Blot (Immunoblot)) _____	43
<b>2.7. Histologische Techniken _____</b>	<b>44</b>
2.7.1. Herstellung von Kryoschnitten _____	44
<b>2.8. Immunhistologische und Immunhistochemische Techniken _____</b>	<b>44</b>
2.8.1. Antikörper-Färbung von Kryoschnitten _____	44
2.8.2. Durchflußzytometrie (FACS-Analyse) _____	46
2.8.3. Affymetrix Gene Chip Expressionsanalyse _____	47
<b>2.9. Photodokumentation _____</b>	<b>47</b>
<b>3. Ergebnisse _____</b>	<b>48</b>
<b>3.1. Charakterisierung der von embryonalen Stammzellen abgeleiteten Kardiomyozyten _____</b>	<b>48</b>
3.1.1. Die <i>in vitro</i> Generierung ESC-abgeleiteter Kardiomyozyten folgt einem spezifischen Muster und ist standardisierbar _____	48
3.1.2. <i>in vitro</i> generierte Kardiomyozytzen zeigen Charakteristika neonataler Herzmuskelzellen _____	50
3.1.3. Die „Cardiac Bodies“ bestehen ausschließlich aus Kardiomyozyten _____	53
<b>3.2. Genomweite siRNA-vermittelte Gensuppression während der <i>in vitro</i> Differenzierung ESC-abgeleiteter Kardiomyozyten _____</b>	<b>55</b>
3.2.1. Die Komplexität der sh/siRNA Bibliothek wurde durch die Amplifikation nicht beeinträchtigt _____	55
3.2.2. Die lentivirale Infektion interferiert nicht mit der Differenzierung _____	55
3.2.3. Inhibition der kardiomyozytären Differenzierung <i>in vitro</i> durch siRNA-vermittelte Suppression von <i>GATA4</i> _____	56
3.2.4. Identifikation kardioessentieller Gene im „batch-Verfahren“ _____	58
3.2.5. Identifikation funktionell relevanter Kandidatengene der frühen Kardiomyogenese mit Hilfe eines komplexen bioinformatischer Algorithmus _____	62
<b>3.3. Der Screen zeigt eine hohe Repräsentanz bekannter kardiogenetisch essentieller Faktoren verschiedenster Proteinklassen und beteiligter Prozesse _____</b>	<b>66</b>
<b>3.4. Interferenz identifizierter individueller siRNAs mit der kardiomyozytären Differenzierung <i>in vitro</i> _____</b>	<b>69</b>
<b>3.5. Isolation und Identifikation angereicherter Knotenpunkte durch Annotationsverknüpfung nach GO (Gene Ontology) _____</b>	<b>70</b>
<b>4. Diskussion _____</b>	<b>77</b>
<b>4.1. <i>In vitro</i> generierte Kardiomyozyten eignen sich für die Identifikation pränatal kardiogenetisch essentieller Faktoren _____</b>	<b>77</b>
<b>4.2. Die genomweite siRNA-vermittelte Gensuppression im „batch- Verfahren“ eignet sich zur Identifikation von Genen, welche die Herzentwicklung beeinflussen _____</b>	<b>79</b>
4.2.1. Die siRNA-vermittelte Suppression von <i>GATA4</i> verhindert die kardiomyozytäre Differenzierung <i>in vitro</i> , aber nicht <i>in vivo</i> _____	79
4.2.2. Die Komplexität der lentiviralen sh/siRNA-Bibliothek bleibt auf zellulärer Ebene erhalten _____	81
4.2.3. Das Stadium der Testpopulationen definiert das entwicklungsbiologische Zeitfenster _____	82

---

<b>4.3. Identifikation von Kandidatengenomen durch einen bioinformatischen Algorithmus</b>	<b>84</b>
4.3.1. Die Identifikation der siRNAs wird durch die komplexe Verrechnung der Hybridisierungssignale erreicht	84
4.3.2. Die Bestimmung der Anzahl der als essentiell identifizierten Kandidatengene ist von der Stringenz abhängig	86
4.3.3. Der Abgleich der Screeningresultate mit Expressionsdaten verbessert die Qualität der Analyse und schließt falsch positive Kandidaten aus	87
<b>4.4. Die Konsistenz des genomweiten Screens wird durch die theoretische und biologische Validierung verbessert</b>	<b>88</b>
4.4.1. Die Identifikation bekannter kardiogenetisch essentieller Gene demonstriert die Validität und die Potenz des <i>in vitro</i> Screens	88
4.4.2. Die erfolgreiche Validierung der Screeningresultate bestätigt die biologische Relevanz der identifizierten Gene für die Herzentwicklung	94
<b>4.5. Die Annotationsverknüpfung nach GO (Gene Ontology) zeigt die Diversität betroffener biologischer Prozesse und ermöglicht die Identifikation angereicherter funktionell assoziierter Gengruppen</b>	<b>94</b>
4.5.1. Der Screen zeigt den Einfluss $\beta$ -Catenin-abhängiger und alternativer Wnt-Signalgebung in der kardiomyozytären Differenzierung <i>in vitro</i>	95
4.5.2. Gene für Reizleitung und Erregbarkeit beeinflussen die kardiomyozytäre Differenzierung <i>in vitro</i>	98
4.5.3. Kalzium: ein Effektor kardialer Differenzierung und funktioneller Regulator	99
<b>4.6. Ausblick</b>	<b>101</b>
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>103</b>
<b>6. Literatur</b>	<b>105</b>
<b>7. Anhang</b>	<b>122</b>
7.1. Oligodesoxynukleotide zu Detektierungszwecken (PCR)	122
7.2. spezielle Oligodesoxynukleotide	123
7.3. Oligodesoxynukleotide zur Klonierung	123
7.4. Plasmide	124
7.5. Identifizierte Gene	124
<b>Danksagung</b>	<b>207</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>208</b>

## Abkürzungen &amp; Einheiten

## Abkürzungen

A	Adenin bzw. Adenosin
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
AHF	engl.: Anterior Heart Field
AK	Antikörper
$\alpha$ MHC	engl.: alpha Myosin Heavy Chain
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AVE	Anteriores Viscerales Entoderm
BSA	Rinderserum-Albumin (engl.: bovine serum albumin)
C	Cytidin bzw. Cytosin
CB(s)	engl.: Cardiac Body/Cardiac Bodies
CB <sub>pl</sub>	engl.: Cardiac Body plated
cDNA	engl.: complementary DNA
CM	engl.: Cardiomyocytes
CMV	Cytomegalievirus
CTP	Cytosintriphosphat
DABCO	1,4-diazobicyclo[2.2.2]octan
ddH <sub>2</sub> O	deionisiertes und destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	"Dulbecco's modified Eagle's medium"
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
dsDNA	engl.: doublestranded DNA
dsRNA	engl.: doublestranded RNA
DTT	Dithiotreitol
DVE	Distales Viscerales Entoderm
EB(s)	engl.: Embryoid Body/Embryoid Bodies
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure x Na <sub>2</sub> -Salz
ES(C)	engl.: Embryonic Stem Cells
esiRNA	engl.: endoribonucleaseprepared siRNA
EtBr	Ethidiumbromid (3,8-Diamino-6-ethyl-5phenylphenatridiumbromid)
Fa.	Firma
FCS	engl.: Fetal-Calf-Serum)
FHF	engl.: First Heart Field
G	Guanidin bzw. Guanosin
GTP	Guanosintriphosphat
H1	Histon 1
HCl	Salzsäure
HEPES	(N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure)
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
ICM	engl.: Inner Cell Mass
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid
LSM	Laser-Scan-Mikroskop
mRNA	engl.: messenger RNA
NaOH	Natronlauge
nCM	engl.: neonatal Cardiomyocytes
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte-Salzlösung (engl.: phosphate buffered saline)
PCP	engl.: Planar Cell Polarity
PCR	engl.: polymerase chain reaction
pH	$-\log [H^+]$
PHF	engl.: Primary Heart Field
Pol	Polymerase
PS	Primitivstreifen

R III	RNase III
RISC	engl.: RNA induced silencing complex
RNA	eng.: ribonucleic acid
RNase	Ribonuklease
RNAi	RNA-Interferenz
RT	Raumtemperatur
SHF	engl.: Second Heart Field
SDS	engl.: sodium dodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
siRNA	engl.: short interfering RNA
siRNP	engl.: siRNA containing Ribo-Nucleo-Proteincomplex
ssDNA	engl.: singlestranded DNA
ssRNA	engl.: singlestranded RNA
T	Thymin bzw. Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetra-methylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTP	Thymintriphosphat
Tween20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	Uracil
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uraciltriphosphat
UV	Ultraviolett
ü.N.	über Nacht
VE	Viscerales Endoderm
v/v	engl.: volume per volume
w/v	engl.: weight per volume
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl $\beta$ -D-galactopyranosid
ZNS	Zentralnervensystem

## Einheiten

A	Ampere
b	Basen
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
Da	Dalton
g	Gramm/ Erdbeschleunigung
h	Stunde
l	Liter
M	molar
min	Minute
sec	Sekunden
U	Unit
V	Volt

## Präfixe

k	kilo ( $10^3$ )
$\mu$	mikro ( $10^{-6}$ )
m	milli ( $10^{-3}$ )
M	mega ( $10^6$ )
n	nano ( $10^{-6}$ )

# 1. Einleitung

Das Verständnis über die Entstehung neuen Lebens und dessen progressiver Veränderung steht seit jeher im Interesse der Wissenschaft. Die komplexe räumliche, sowie zeitlich streng koordinierte Bildung eines multizellulären Organismus aus einer besamten Eizelle erfordert das kontrollierte Zusammenspiel von Zellteilung, Migration und Differenzierung. Obwohl alle Zellen des sich formenden Organismus die gleiche genetische Information enthalten, entwickeln sie sich ihrem positionell, sowie funktionell gefordertem „Schicksal“ entsprechend. Daher ist durchaus verständlich, dass diese hochselektive Informationsverarbeitung den regulatorischen Einfluss von verschiedenen Ebenen, sowohl intra-, als auch interzellulärer Art erfordert. So unterliegen die ablaufenden entwicklungsbiologischen Prozesse der simultanen, sowie sukzedanen Kontrolle epigenetischer, transkriptioneller, posttranskriptioneller, translationaler, posttranslationaler Modulation und Modifikation auf zellulärer Ebene. Desweiteren steuern und beeinflussen zellübergreifende Stimuli über direkten Zell-Zellkontakt, sowie parakrine Faktoren und ebenfalls physikalische und umweltbedingte Parameter synergetisch die progressiven Veränderungen.

Die Embryogenese läuft nicht immer fehlerfrei ab. Angesichts der Komplexität der Vorgänge, die zu der Entwicklung funktionsfähiger Organe führt, erscheint es eher verwunderlich, dass Fehlfunktionen nicht häufiger auftreten.

Die Analyse der oben genannten Einflüsse auf Zellspezifikation, Differenzierung und Organogenese stellt das „Herzstück“ der Erforschung einer Vielzahl genetisch bedingter Erkrankungen dar, mit dem Ziel der Entwicklung neuer Therapie- und Früherkennungsmöglichkeiten. Die häufigste Ursache humaner Geburtsdefekte ist mit annähernd 1% der weltweiten Bevölkerung die genetisch bedingte Missbildung des Herzens, weitere 1-2% weisen leichtere Herzfehler auf, welche erst mit zunehmenden Alter klinisch auffällig werden (Hoffman and Kaplan, 2002). Einen wichtigen Anteil der Herzzellen bilden die Kardiomyozyten, welche durch ihre Kontraktilität für die Pumpleistung des Herzens essentiell sind. Die Anlage dieser Zellen findet bereits im frühen Embryo, lediglich ein paar Tage nach Befruchtung der Eizelle, statt. Der hierfür maßgebliche Prozess bei welchem sich die drei Keimblätter Endo- Ekto- und Mesoderm formieren, wird als Gastrulation bezeichnet. Die hier beginnende Zellspezifikation und folgende Determination unterliegt unter Berücksichtigung der stattfindenden Migrationsvorgänge dem koordinierenden Einfluss mittel- und unmittelbar

angrenzender Zellen, beziehungsweise Zellverbänden. So entwickeln sich die kardialen Vorläufer aus einem Teil des visceralen lateralen Plattenmesoderms, deren weiteres Schicksal den Signalen aus Ento- und/oder Ektoderm, sowie denen des umgebenden Mesoderms unterliegt. Allerdings gestalten sich biochemische Untersuchungen dieser frühen embryonalen Stadien aufgrund der schlechten Zugänglichkeit schwierig, zumal die Anzahl des jeweiligen Zelltyps meist zu gering für Analysen im größeren Maßstab ist.

Mit der Möglichkeit Embryonale Stammzellen (ESCs) erfolgreich als Zelllinien in Kultur zu halten, sowie gezielt in eine Vielzahl verschiedenster Zelltypen, so auch Kardiomyozyten zu differenzieren, wurde der Wissenschaft ein geeignetes *in vitro* Modellsystem für diverse genetische Manipulationen, sowie molekulare Analysen nutzbar gemacht. ESC- abgeleitete Zellen bilden nicht nur einen interessanten wissenschaftlichen Ansatz, es verbindet sich mit ihnen auch die Hoffnung auf die Herstellung therapeutisch nutzbarer Zellmengen. Die Differenzierung von Herzmuskelzellen aus ESCs erfolgt über die Bildung von Embryoid Bodies (EBs) in Suspensionskultur. Zusätzlich bietet sich bei Verwendung transgener Zelllinien, welche zelltypspezifische Resistenzen aufweisen, die Möglichkeit der genetischen Selektion zum Erhalt einer Reinkultur an. So ist die unter der Kontrolle eines  $\alpha$ MHC ( $\alpha$  Myosin Heavy Chain) Promoters erhaltene Population von Kardiomyozyten molekular weitestgehend homogen. Sowohl Aggregate als auch „Monolayer“ (einzellagige Kultur) dieser Zellen können einige Wochen in Kultur gehalten werden. Sie bieten eine leicht zugängliche Möglichkeit für entwicklungsbiologische Untersuchungen, die Rückschlüsse auf die embryonale Kardiomyozytogenese zulassen.

Die umfassende Betrachtung der kardiomyozytären Differenzierung und die Identifikation einer Vielzahl an ihr beteiligter Faktoren, unter Berücksichtigung möglichst vieler dabei Einfluss nehmender Vorgänge, erfordert den Einsatz genomweiter Screening-Verfahren. Diese wurden in den letzten Jahren nach Entschlüsselung des Genoms diverser Organismen entwickelt und der Forschung zugänglich gemacht. Mit der erfolgreichen Anwendung des hochkonservierten Mechanismus der RNA Interferenz (RNAi) zur vergleichsweise einfachen und schnellen spezifischen Gensuppression *in vivo* und *in vitro* konnte eine geeignete Methode für ein Screeningsystem im großen Maßstab nutzbar gemacht werden. So wurden short hairpin/short interfering RNA (sh/siRNA)-Bibliotheken entwickelt. Diese unterdrücken gezielt die Aktivität bestimmter, in einem Prozess oder Signalweg vorkommenden Gene, aber auch ihre

Gesamtheit, in Form einer genomweiten Bibliothek. Der Einsatz solcher Bibliotheken ermöglicht die Identifikation von vielen bisher unbekanntem beteiligten, sowie essentiellen Faktoren und Signalwegen innerhalb des Testsystems mit Hilfe zuvor klar definierter phänotypischer Selektion. Durch den Einsatz vektor-basierender siRNA-Expressionssysteme ist die Generierung stabiler transgener Zellen möglich. Durch geeignete Promotoren, welche die Effektormoleküle konstitutiv exprimieren können auch Langzeitstudien, wie die in dieser Arbeit fokussierte Untersuchung der kardiomyozytären Differenzierung durchgeführt werden. Die Isolation der wirksamen Effektormoleküle, der siRNA-Sequenzen aus einer Zellpopulation, die anschließende Identifikation der entsprechenden Zielgene und deren Strukturierung, erforderte den Einsatz bioinformatischer Hilfsmittel. Die grundlegenden Anforderungen an dieses Programm, sowie die Art und Weise der Datenverarbeitung und Lösung dabei auftauchender Probleme wurden im Rahmen dieser Arbeit definiert. Die informatische Umsetzung ist kein Bestandteil dieser Arbeit und erfolgte im Rahmen einer Projektarbeit (Projektarbeit Ludmila Schulz). Das für die Auswertung generierte Programm wurde als Teil dieser Projektarbeit detailliert erläutert.

## **1.1. Die frühe Entwicklung des Herzens**

Das Herz ist neben dem Gehirn das erste Organ, welches sich während der Säugerembryogenese entwickelt und seine Funktion aufnimmt.

Die Entwicklung des Herzens ist prinzipiell in fünf Stufen unterteilbar und beginnt mit der Spezifikation der kardialen Vorläuferzellen während der Gastrulation (1), gefolgt von deren bilateraler Migration und Fusion der Primordien (2). Nach dem Looping des Herzschlauchs (3) bilden sich die Herzkammern (4). Der Prozeß endet schließlich mit der Septierung des Herzens und der Ausbildung der Herzklappen (5). Diese Prozesse gehen fließend ineinander über und beinhalten die Differenzierung aller beteiligten Herzzelltypen. In der vorliegenden Arbeit wurden vor allem die Kardiomyozyten untersucht. Das für den Screen gewählte entwicklungsbiologische Zeitfenster der Kardiomyozytogenese *in vitro* beginnt mit der positiven Selektion  $\alpha$ MHC-positiver Zellen aus reifen EBs. Die molekulare Identität dieser frühen Kardiomyozyten ist daher etwa mit den Zellen des kardialen Mesoderms vergleichbar, dessen Bildung im Folgenden recht ausführlich beschrieben wird.

### 1.1.1. Die Bildung der Keimblätter: Gastrulation in Vertebraten

Der Prozess der Gastrulation führt zu der Ausbildung der drei Keimblätter - Ekto-, Ento- und Mesoderm. Hierbei kommt es zur Etablierung der dorso-ventralen Körperachsen.

Diese Prozesse werden im Folgenden am Beispiel der Maus dargelegt.

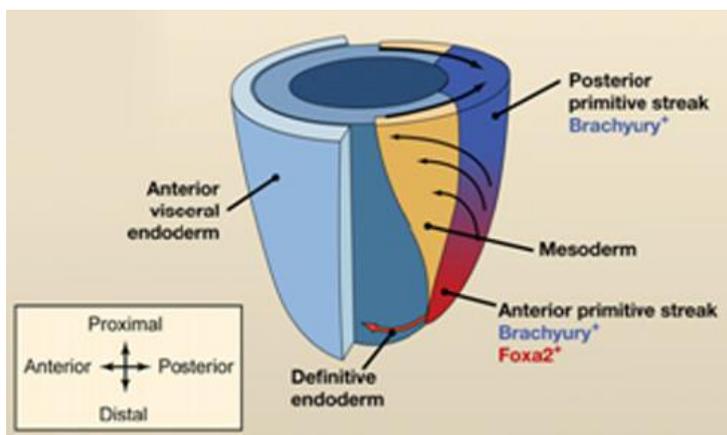
Mit der Implantation der murinen Blastozyste, die am Tag 3.5 postcoitum stattfindet, beginnt eine Reihe zahlreicher Zellteilungen, welche die innere Zellmasse (Innere Cell Mass = ICM) von etwa 15 auf 120 Zellen anwachsen lässt. Diese, sowie das Blastocoel, werden von einer circa 60 Zellen umfassenden, dünnen epithelialen Schicht, dem Trophektoderm umgeben, welcher unter extensiver Proliferation die Invasion in das uterine Stroma und somit den embryonal-maternalen Kontakt gewährleistet.

Kurz nach Implantation der Blastozyste differenziert aus der ICM das primitive Endoderm, welches sich über der inneren Oberfläche des Trophektooderms ausbreitet und in der Formation des parietalen Entoderms resultiert. Dieses formt zusammen mit den Riesen-trophektoderm-Zellen und mit der Reichert-Membran den parietalen Dottersack. Die Zellen des primitiven Entoderms, welche die ICM flankieren, bilden später vermutlich das viscerale Entoderm (Tam and Schoenwolf, 1999).

Die verbleibenden Zellen der ICM beginnen sich in einem pseudogeschichteten Epithel, dem Epiblasten zu organisieren, welcher aufgrund der physikalischen Bedingungen einen Zylinder formt und vom Trophektoderm und dem primitiven Entoderm (Hypoblast) flankiert wird. Im weiteren Verlauf formt das Epithelium des Epiblasten mit dem primitiven Entoderm eine zweischichtige Becherstruktur, die kurz vor Beginn der Gastrulation am Tag 6,5 postcoitum etwa 660 Epiblastenzellen und 300 Zellen des primitiven Entoderms zählt (Tam and Schoenwolf, 1999). Zu diesem Zeitpunkt beginnt die Gastrulation mit der Ausbildung des Primitivstreifens (Primitive Streak = PS) auf einer Seite der Epiblast-extraembryonalen Grenze, welche das posteriore Ende des Embryos markiert. Während dieses Prozesses werden noch nicht determinierte Zellen des Epiblasten mobilisiert und passieren unter epithelialer-mesenchymaler Transition (EMT) den Primitivstreifen. In der Tiefe angekommen werden sie zu meso-, oder entodermalen Zellen und interkalieren zwischen Epiblast und visceralem Entoderm. Dabei ist die Position des Eintritts in den PS von entscheidender Bedeutung für die spätere Identität der migrierenden Zellen (zur Übersicht: Gadue et al., 2005).

Das Expressionsprofil des PS zeigt antero-posteriore Unterschiede, anhand derer eine Unterteilung in posteriore, mittlere und anteriore Regionen vorgenommen werden kann

(Abb. 1.1). Während einige Gene, wie *Brachyury* (T) (Kispert and Herrmann, 1994; Wilkinson et al., 1990) und *Mixl1* (Hart et al., 2002) in dem gesamten PS exprimiert werden, ist der posteriore Anteil des PS durch die Expression von *HoxB1* und *Evx1* (Dush and Martin, 1992; Forlani et al., 2003) und der anteriore Bereich durch *FoxA2* und *Goosecoid* (Kinder et al., 2001; Sasaki and Hogan, 1993) gekennzeichnet. Die Spezifikation distinkter meso-, sowie entodermaler Subpopulationen ist sowohl von der Region des Eintritts in den PS, als auch von dem entsprechenden Eintrittszeitpunkt abhängig. So konnte gezeigt werden, dass aus den ersten Epiblastenzellen, welche in den posterioren PS eintreten, extraembryonales Mesoderm hervorgeht, aus dem sich sowohl das Amnion und die Allantois, als auch hämatopoetische, endotheliale und glatte Gefäßmuskelzellen des Dottersacks entwickeln (Parameswaran and Tam, 1995). Mit fortschreitender Gastrulation migrieren die Zellen zunehmend durch die anterioren Regionen des PS, was in der Formation kranialen und kardialen Mesoderms und schließlich paraxialen und axialen Mesoderms resultiert (Kinder et al., 1999). Die Spezifikation des Entoderms erfolgt durch die Passage der anteriorsten Region des PS (Abb. 1.1). Im Gegensatz zu Mesoderm und Entoderm bildet sich das Ektoderm aus dem anterioren Bereich des Epiblasten, welcher den PS nicht passiert.



**Abb. 1.1: Gastrulation im murinen Embryo**

Gezeigt ist die posteriore Region des Primitivstreifens (PS), welche den Marker *Brachyury* (T) exprimiert (blau) und die anteriore Region des PS, welche durch die Koexpression von T und *Foxa2* gekennzeichnet ist (rot). Die Epiblastenzellen treten in den PS ein (schwarze dicke Pfeile). Die gelbe Region kennzeichnet das gebildete Mesoderm, deren Migration aus dem PS durch dünne schwarze Pfeile angezeigt ist. Die Bewegung des frühen Endoderms ist durch den roten Pfeil gekennzeichnet (aus Murry and Keller, 2008).

Die spatio-temporale Abhängigkeit der Zellspezifikation impliziert den Einfluss der Umgebung. Diese definiert durch aktivierende und inhibierende Modulation intra-, sowie interzellulärer Signaltransduktion entwicklungsregulatorische Domänen und ermöglicht so den Gastrulationsprozess. Die Schlüssel-Signaldomänen, welche die Induktion und Musterbildung der Keimblätter gewährleisten, sind der posteriore Epiblast, das anteriore viscerale Entoderm (AVE), sowie das extraembryonale Ektoderm und der Knoten. Der posteriore Epiblast, aus dem sich die PS zunächst bildet, ist durch die Expression der parakrinen Wachstumsfaktoren *Nodal* und *Wnt3a* gekennzeichnet (Conlon et al., 1994; Liu et al., 1999; Varlet et al., 1997). Noch vor Beginn der Gastrulation differenziert ein Teil des visceralen Endoderms (VE) in das morphologisch unterscheidbare distale VE (DVE), welches unter Expression von *Hex*, *Lefty1* und *Dkk1* entlang der distal-proximalen Achse migriert und oberhalb des späteren anterioren Epiblasten das AVE bildet (zur Übersicht: Srinivas, 2006; Tam and Loebel, 2007). Das AVE exprimiert *Dkk1* (Glinka et al., 1998), sowie die *Nodal*-Antagonisten *Cerberus-like* (Belo et al., 2000) und *Lefty1* (Meno et al., 1997) und wirkt somit der anterioren Ausbreitung des PS entgegen und begrenzt ihn, und demzufolge auch die Induktion des Mesoderms, auf den posterioren Teil des Embryos (Perea-Gomez et al., 2002; zur Übersicht: Rossant and Tam, 2009). Zudem geht man davon aus, dass die AVE die Mobilisation der Epiblastenzellen durch Induktion des Wnt planaren Zellpolaritäts-Signalwegs (PCP) steuert (Voiculescu et al., 2007).

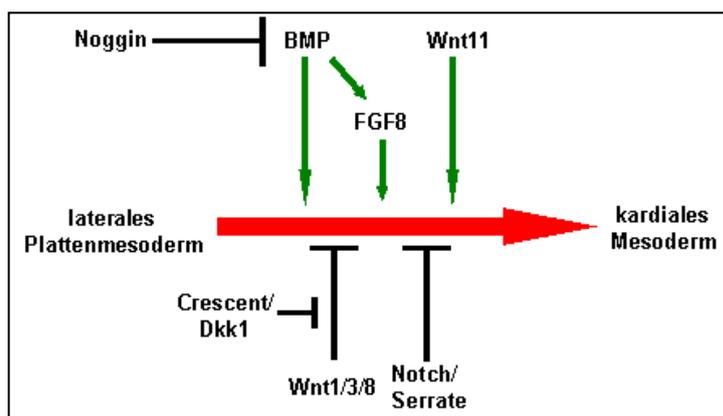
Im späten Stadium des PS bildet sich der Knoten an der anterioren Grenze der PS, ein Signalzentrum, welches durch die Expression von *Nodal* gekennzeichnet ist. Das extraembryonale Ektoderm sezerniert BMP4 welches auf den angrenzenden Epiblasten wirkt (Coucouvanis and Martin, 1999; Lawson et al., 1999).

### 1.1.2. Bildung des kardialen Mesoderms

Die myokardialen Vorläufer passieren während des Gastrulationsprozesses den anterioren Bereich des PS als Teil des sich bildenden Mesoderms, welches sich folgend durch kranio-bilaterale Migration in einer semizirkulären Anordnung formiert. Die myokardialen Vorläuferzellen des ventralen visceralen Plattenmesoderms, welches auch noch einen dorsalen parietalen Bereich besitzt, liegt unter dem Ektoderm, während das viscerale Mesoderm zunächst über dem Entoderm liegt. Der sich ergebende Zwischenraum bildet die Körperhöhle, das Coelom, welches sich in der weiteren

Entwicklung in Pleural-, Pericardial- und Peritonealhöhle unterteilt und Thorax, Herz, sowie Abdomen umgibt (Abu-Issa and Kirby, 2007)

Die molekulare Determination der myokardialen Vorläufer, ist bis heute nicht vollständig geklärt und wird kontrovers betrachtet. Eine wahrscheinliche Induktionsquelle für kardiale Vorläufer ist das kraniale Endoderm und das Ektoderm. Kandidaten für die Kardioinduktion sind Mitglieder der Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGFB)-Superfamilie, Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) und Fibroblast Growth Factors (FGFs). Sonic Hedgehog (SHH) und nicht-kanonisches WNT-Signaling wirken unterstützend. Kanonische WNT- und Notch/Serrate-Signalgebung haben allerdings einen kardioinhibitorischen Einfluß (Foley and Mercola, 2004; Pedrazzini, 2007; Solloway and Harvey, 2003). Die auf die Spezifikation des kardialen Mesoderms Einfluss nehmenden Faktoren sind in Abb. 1.2 dargestellt.



**Abb. 1.2 Induktionsfaktoren des kardialen Mesoderms**

Verschiedene Signalwege sind an der Rekrutierung kardialer Muskelzellen beteiligt. Bislang konnten drei Signalwege identifiziert werden, die an der Spezifikation von Herzmuskelzellen beteiligt sind: BMP 2, FGF8, and Wnt11. Zwei Signalwege: Wnt1/3/8 and Notch/Serrate inhibieren die Bildung von Herzgewebe und sind an der genauen Positionierung kardialer Vorläufer beteiligt.

Alternatives Wnt-signaling, wie an Wnt11 gezeigt, führt einerseits zur Aktivierung der Jun-N-Terminalen Kinase (JNK) und der kleinen GTPase RhoA und andererseits zur intrazellulären Calcium-Freisetzung und Aktivierung der Phospholipase C (PLC) und der Proteinkinase C (PKC) (Pandur et al., 2002; Sheldahl et al., 2003). Die Relevanz der PKC-Aktivierung konnte in murinen ESCs gezeigt werden, deren Differenzierung zu Kardiomyozyten von den PKC Isoformen  $\zeta$  und  $\epsilon$  abhängig ist (Zhou et al., 2003). Während das intrazelluläre Protein dishevelled (dvl) sowohl den  $\beta$ -Catenin abhängigen, als auch alternativen  $\beta$ -Catenin unabhängigen Wnt Signalweg moduliert (Boutros and Mlodzik, 1999) inhibieren Strabismus, Naked Cuticle sowie PKC und das Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  Signalweg Zielmolekül CalmodulinkinaseII (CamKII) kanonisches  $\beta$ -Catenin Signaling (Alvarez-Buylla et al., 2000; Darken et al., 2002; Kuhl et al., 2001; Park and Moon, 2002). Dennoch ist der Einfluß der Aktivierung des alternativen Wnt-

Signalweges auf die Inhibition der kanonischen Wnt-Signalgebung noch weitestgehend ungeklärt.

Der zur TGF $\beta$ -Superfamilie zugehörige Faktor Nodal einschließlich seines essentiellen, membrangebundenen Korezeptors Cripto sind von entscheidender Bedeutung für die Kardioinduktion sowohl in Embryonen, als auch in ESCs. So konnte mit Cripto-defizienten ESCs zwar die Formation von Mesoderm, nicht aber von Kardiomyozyten herbeigeführt werden (Xu et al., 1998). Ähnliche Ergebnisse lieferte die Analyse Cripto-defizienter Embryonen, in welchen zwar Mesoderm gebildet wird, allerdings keine Entwicklung axialer anteroposteriorer Strukturen und keine Differenzierung von Herzmuskelzellen stattfindet (Ding et al., 1998; Xu et al., 1999).

Der phänotypische Vergleich der Cripto- und Nodal-defizienten Embryonen weist auf die Relevanz der Cripto-abhängigen Nodalsignalgebung im Epiblasten, als auch dem darüber befindlichen anterioren visceralen Entoderm (AVE) hin (Beddington and Robertson, 1999). Die konditionelle Deletion von Nodal mit Hilfe des Cre/loxP-Systems in dem zeitlichen, sowie räumlichen Expressionsbereich von Brachyury (T) zeigt, abgesehen von schweren Defekten in der Entwicklung der Links-Rechts-Achse, keine weiteren Anomalitäten in der weiteren Musterbildung der mesodermalen, sowie entodermalen Bereiche, so dass eine essentielle Funktion von Nodal hier ausgeschlossen werden kann (Kumar et al., 2008).

Auch die BMPs wurden als Promotoren der Kardiogenese in Embryonen identifiziert. Zusammen mit FGF-Isoformen bewirken sie die posteriore Ausweitung der kardiogenen Region. Mit der Ankunft der Vorläuferzellen an ihrer lateralen Position, wird das kardiogene Programm durch die vom aufliegenden Ento- und Ektoderm exprimierten BMPs induziert. Das Ektoderm sezerniert BMP4 und BMP7, das Entoderm exprimiert BMP2 und BMP5 (Schultheiss et al., 1997; Somi et al., 2004). Allerdings werden BMP2, 4 und 7 in der Maus auch im anterioren Mesoderm inklusive der herzformenden Region exprimiert (Dudley and Robertson, 1997; Solloway and Robertson, 1999; Zhang and Bradley, 1996). In den Zellen dieses bilateralen Mesoderms kann erstmals die durch oben genannte Faktoren induzierte Expression der kardiospezifischen Transkriptionsfaktoren *Nkx2.5* und *GATA4* detektiert werden. Im weiteren Entwicklungsverlauf folgen *Mef2c*, *SRF*, *Tbx2*, *Tbx5* und *Tbx20* und schließlich die sarkomerischen Proteine (Abu-Issa and Kirby, 2007).

Das bilaterale präkardiale Mesoderm trifft am Tag E7.5 der murinen Embryonalentwicklung an der Mittellinie aufeinander und bildet den sogenannten

kardialen Halbmond. Entsprechend des späteren Beitrags zu unterschiedlichen Teilen des Herzens und der Expression von Markergen-Kombinationen wird es in das primäre und das anteriore Herzfeld, beziehungsweise erste und zweite Herzfeld unterteilt (Abu-Issa and Kirby, 2007).

### 1.1.3. Frühe Morphogenese des embryonalen Herzens

Die Zellen des kardialen Halbmondes bilden unter Fusion an der Mittellinie den frühen Herzschlauch. Dieser formt durch eine Rechtsdrehung und Bewegung seines posterioren Bereichs in anteriore Richtung unter stetiger Expansion des Myokardiums die nunmehr erkennbaren Herzkammern (Kelly et al., 1999). Die Etablierung der regionalen Identität innerhalb des Herzschlauchs wird durch die Zellen der oben genannten Herzfelder bewerkstelligt, deren Definition und Unterscheidung kontrovers diskutiert wird (Buckingham et al., 2005). Das primäre Herzfeld (PHF=Primary Heart Field) definiert so die Vorläuferpopulation des Einfluß-Trakts, während die Zellen des Ausfluß-Trakts von der Population des anterioren Herzfelds (AHF=Anterior Heart Field) abstammen. Diese Einteilung wurde aufgrund der Expression von Fgf8/Fgf10 vorgenommen. Eine weitere Einteilung kann aufgrund der Expression und Funktion von Isl1 in das erste (FHF=First Heart Field) und zweite Herzfeld (SHF=Second Heart Field) vorgenommen werden. Nach dieser Isl1-basierenden Einteilung formt das erste Herzfeld den späteren linken Ventrikel, einen Teil des rechten Ventrikels und der Atrien, die Zellen des zweiten Herzfeldes bilden den Teil des späteren rechten Ventrikels und der Atrien, sowie den gesamten Auswurftrakt (Abu-Issa and Kirby, 2007).

Im Kontext der kardialen Morphogenese werden eine Reihe von evolutionär hochkonservierten Transkriptionsfaktoren exprimiert, welche die zellspezifische Regionalisierung positiv, sowie negativ in einem komplexen Netzwerk regulieren.

Einer der frühesten Marker ist der Homeobox-Transkriptionsfaktor Nkx2.5, dessen Deletion in der Maus aufgrund morphogenetischer Störungen des Herzschlauchs etwa am Tag E9.5 zu embryonaler Letalität führt. Die Deletion von Nkx2.5 führt allerdings nicht zu einem Verlust der Bildung von Kardiomyozyten, da kontraktile Herzmuskelzellen in den Nkx2.5-defizienten Mäusen vorhanden sind (Lyons et al., 1995). Ein weiterer Faktor ist GATA4, dessen Mutation eine *cardia bifida* hervorruft (Kuo et al., 1997; Molkenin et al., 1997) und zusammen mit Nkx2.5 die Expression weiterer herzspezifischer Faktoren,

wie z.B. *Mef2c* induziert und reguliert. *Mef2c* gehört zu der Mef2-Familie von MADS-Box-Transkriptionsfaktoren und wirkt transkriptionsaktivierend auf eine Reihe kontraktiler Proteine. Die Deletion von *Mef2c* in der Maus führt zu Herzkammerdefekten bei dem kein rechter Ventrikel und lediglich ein einzelner hypoplastischer Ventrikel entsteht, der direkt mit einem vergrößertem Atrium fusioniert ist (Lin et al., 1997).

Eine weitere wichtige Gruppe von kardioessentiellen Transkriptionsfaktoren sind die T-Box Faktoren *Tbx5* und *Tbx20*. *Tbx5* wird bereits in frühen kardialen Vorläuferzellen, sowie später in Abhängigkeit von Retinolsäure graduell entlang des Herzschlauchs exprimiert (Bruneau et al., 1999; Liberatore et al., 2000; Niederreither et al., 2001). Das Herz *Tbx5*-defizienter Mausembryonen ist durch schwere Hypoplasie linksventrikulärer, sowie sinoatriale Regionen gekennzeichnet (Bruneau et al., 2001). Murines *Tbx20* wird ebenfalls in kardialen Vorläuferzellen und später unter anderem im gesamten Myokardium des Herzschlauchs exprimiert. Seine Mutation resultiert in einen retardierten, nicht gedrehtem Herzschlauch, in welchem jedoch kleine ventrikelartige Herzkammern erkennbar sind (Kraus et al., 2001; Singh et al., 2005; Takeuchi et al., 2005).

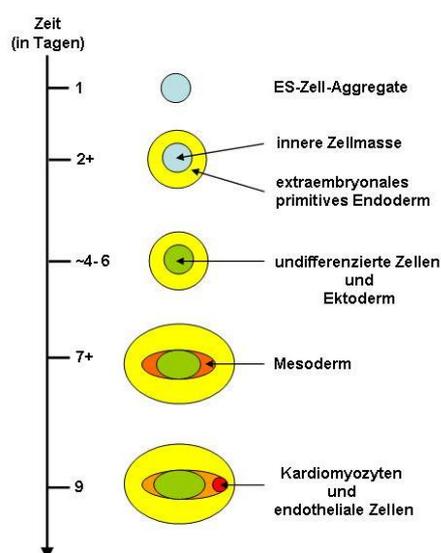
Des Weiteren werden die basischen Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktoren *eHand/Hand1* und *dHand/Hand2* exprimiert, die für die weitere Entwicklung des Herzens essentiell sind. Die Expression von *eHand/Hand1* ist hauptsächlich auf den linken Ventrikel beschränkt und seine Mutation führt zu schweren Störungen der linksventrikulären Differenzierung in der Maus. Konträr zu *eHand* wird *dHand* im rechten Ventrikel exprimiert und führt bei Deletion zu nur leichten Defekten (Srivastava, 1999).

## **1.2. *in vitro* Differenzierung embryonaler Stammzellen**

Die erfolgreiche Isolation embryonaler Stammzellen (ESCs) aus der inneren Zellmasse (ICM) von Blastozysten und deren Kultivierung als permanente Zelllinie Anfang der achtziger Jahre eröffnete neue Perspektiven für die Zell- und Entwicklungsbiologie, sowie Anwendungen in der experimentellen Medizin. Die pluripotenten embryonalen Stammzellen zeichnen sich durch ihre annähernd unbeschränkte Selbst-erneuerungsfähigkeit und Differenzierungskapazität aus. Ihre Rückführung in ein embryonales Umfeld durch Transfer in eine Wirts-Blastozyste, oder die Aggregation mit Embryonen im Blastomerstadium ermöglicht eine Vielzahl genetischer Manipulationen,

insbesondere der „gene targeting“ Technologie, welche die Generierung sogenannter „knock-in/knock-out“-Mäuse ermöglicht.

Die embryonalen Stammzellen können mit Ausnahme trophektodermaler Zellen über die Stufen der Spezifikation und Determination zu allen somatischen Zelltypen ekto-, ento-, sowie mesodermalen Ursprungs und ebenso Keimzellen, *in vivo*, als auch *in vitro* differenzieren. Voraussetzung für eine pluripotente Differenzierungsleistung *in vitro* ist die Aufrechterhaltung des undifferenzierten Stadiums der embryonalen Stammzellen, meist durch Kultivierung auf murinen embryonalen „feeder cells“ und /oder der Zugabe differenzierungs-verhindernder Faktoren wie LIF (Leukemia Inhibitory Factor) zum Nährmedium. Die Initiation der Differenzierung setzt den Entzug von LIF meist einhergehend mit der Generierung dreidimensionaler spheroider zellulärer Aggregate, sogenannter „Embryoid Bodies“ (EBs), voraus. Letzteres erfordert die Kultivierung der ES Zellen entweder in Suspensionskultur auf nicht-adhäsiven Substraten, in „hängenden Tropfen“ („hanging drop“), oder auch in niedrig-adhäsiven Substraten wie Methylzellulose. Nach vier bis acht Tagen haben sich Zellaggregate gebildet, die weitestgehend mit frühen Embryonalstadien vergleichbar sind. Sie durchlaufen einen Prozess ähnlich dem der Gastrulation *in vivo*, welcher in die Bildung exterioren Endoderms, Mesoderms und interiorenen Ektoderms resultiert und in einigen Fällen eine zystische, dottersackartige Höhle umgibt (Abb. 1.3).



**Abb. 1.3 Chronologie der ES Zell Differenzierung innerhalb des Embryoid Body.** Die Differenzierung setzt am zweiten Tag in Suspensionskultur mit der Ausbildung des extraembryonalen primitiven Endoderms ein, aus welchem sich folgend viscerales und parietales Endoderm entwickelt. Nach 4-6 Tagen formiert sich interior das Ektoderm, zwischen dessen tieferen Schichten und der Grenze von extraembryonalen visceralen und parietalen Endoderms sich nach etwa 7 Tagen das Mesoderm entwickelt. Nach weiteren zwei Tagen erkennt man die spontan kontrahierenden Kardiomyozyten, sowie endotheliale Zellen. (modifiziert nach Sauer et al., 2004)

Während der frühen Differenzierung sezerniert jeder entstehende Zelltyp innerhalb des EBs sein für ihn charakteristisches Set an Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, was eine zum Teil chaotische zelluläre Anordnung innerhalb des Aggregats zur Folge hat. Diese ist nicht mit der präzisen, koordinierten räumlichen Organisation des sich entwickelnden frühen Embryos vergleichbar. So kann aufgrund der fehlenden antero-posterioren, sowie dorso-ventralen Positionsinformation innerhalb der EBs kein Rückschluss auf die räumliche Differenzierungsleistung *in vivo* getroffen werden.

Die gezielte Veränderung der Nährmediumzusammensetzung und/oder die Zugabe diverser Differenzierungsagenzien ermöglicht unter Beachtung der Supplementationszeit und -menge innerhalb dieses *in vitro* Differenzierungs-Systems eine gerichtete Verschiebung zu Gunsten eines spezifischen Zell-, oder Gewebetyps. In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von Protokollen zur kontrollierten Differenzierung verschiedenster spezialisierter Zelltypen etabliert, die neben definierten Nährmedien und Seren, einzusetzenden Wachstumsfaktoren und Additiva auch die initiale Zellzahl, sowie die ES-Zelllinie und EB-Formationszeit berücksichtigen. Wie auch im Embryo ist es das Entoderm, welches sich zuerst, direkt nach dem Entzug von LIF, auf der Oberfläche des sich formierenden EBs entwickelt. Es ist durch die Expression von Genen der HNF-Familie (Hepatocyte-Nuclear-Factor) gekennzeichnet. Die Induktion mit Retinolsäure (RA) führt zu der verstärkten Ausbildung visceralen Entoderms, während die kombinatorische Stimulation mit RA und db-cAMP in der Formation parietalen Entoderms resultiert (Sauer et al., 2004).

### 1.2.1. Differenzierung von Kardiomyozyten aus murinen Embryonalen Stammzellen

Das Vertebratenherz ist neben dem Gehirn das erste Organ, welches sich während der Embryogenese entwickelt. Es ist aufgrund seiner geringen Größe in frühen Embryonalstadien für Untersuchungen *in vivo* nur schwer zugänglich. Die Möglichkeit, über die Stufe der Embryoid Body Formation vergleichsweise einfach und zahlreich Kardiomyozyten *in vitro* aus ES-Zellen zu gewinnen und in Kultur zu halten, erlaubt multiple pharmakologische, molekularbiologische, sowie physiologische Analysen. Dieser Ansatz trägt zum Verständnis der frühen Herzentwicklung bei und weist zugleich mit dem Ziel der zelltherapeutischen Anwendung eine große medizinische Relevanz auf. Mit der Bildung des Mesoderms zwischen dem extraembryonalen visceralen, sowie

parietalen Entoderm und den tieferen Schichten des Ektoderms beginnt die kardiomyozytäre Differenzierung in dem Embryoid Body etwa ab dem siebten Tag. Dort entstehen die Kardiomyocyten zwischen einer äußeren epithelialen Schicht mit Charakteristika von visceralem Entoderm und einer basalen Schicht mesodermaler Zellen (Boheler et al., 2002). Für diesen Prozeß der Kardiogenese sind eine Reihe spezifischer Signalmoleküle verantwortlich, welche intrazellulär mit Hilfe gewebespezifische Transkriptionsfaktoren wirken und so progressiv die weitere Spezifikation der Kardiomyozyten aus den mesodermalen Stammzellen vorantreibt. Einige dieser Proteine konnten innerhalb der letzten Jahre bereits als essentiell für die kardiomyozytäre Entwicklung identifiziert werden.

Die kardioinduktive Wirkung des extraembryonalen, sowie embryonalen Entoderms ist dabei von entscheidender Bedeutung (Egea et al., 2008; Hrabchak et al., 2008). Zusätzlich nehmen physikalische Parameter, sowie das Nährstoffangebot Einfluss auf die Differenzierung. So wurde gezeigt, dass die dreidimensionale Struktur des EBs essentiell für die Induktion der Kardiomyogenese ist (Maltsev et al., 1993). Interessanterweise bilden sich jedoch innerhalb der EBs keine erkennbaren Herzstrukturen aus. Letzteres impliziert die Unabhängigkeit der Differenzierung verschiedenster Herzzelltypen von einer strukturellen Organisation. Die entstehenden Herzmuskelzellen erscheinen als spontan kontrahierende Zellgruppen, welche als heterogene Population molekular und elektrophysiologisch sowohl dem sinusnodalen, atrialen, als auch ventrikulären Zelltyp ähneln und weitestgehend die *in vivo* Bedingungen reflektieren, ungeachtet der fehlenden morphogenetischen Prozesse wie Herzkammer- und Klappenbildung (Maltsev et al., 1993). Zudem weist die Population differenzierter Kardiomyozyten eine Diversität in ihrem Reifegrad auf. So konnten Zellen, die denen des embryonalen Herzschlauchs ähneln, neben solchen mit Charakteristika frühem Kammermyokards identifiziert werden (Fijnvandraat et al., 2003a; Fijnvandraat et al., 2003b). Ungeachtet dessen korreliert die zeitliche Abfolge des Differenzierungsprozesses der von Stammzellen abgeleiteten Kardiomyozyten in ihrer Gesamtheit mit der *in utero*. Im murinen Embryonalstadium E8,5 postcoitum sind die ersten kontrahierenden Zellen sichtbar und im EB etwa am siebten Tag der Differenzierung. Ebenso weist die Ableitung der Aktionspotentiale eine dem Differenzierungsstadium entsprechende charakteristische Form auf und geht mit der Expression spezialisierter Ionenkanäle einher. Die *in vitro* terminal differenzierten Kardiomyozyten zeigen den *in vivo* Bedingungen von Säuger Kardiomyozyten vergleichbare positive, sowie negative chronotrope Reaktionen auf entsprechende

Stimuli (Maltsev et al., 1994). So konnte mit Hilfe der  $\beta$ -Adrenorezeptor-Agonisten (-)-Isoprenalin und Clenbuterenol, dem Adenylatzyklase-Aktivator Forskolin, dem Phosphodiesterase-Inhibitor Isobutylmethylxanthin, sowie dem  $\alpha$ 1-Adrenorezeptor-Agonisten (-)Phenylephrin eine frequenzsteigernde Wirkung erzielt werden. Dagegen führte der Einfluß von Agonisten des muscarinen Cholinrezeptors und Inhibitoren des L-type voltage dependent  $\text{Ca}^{2+}$  Channels (VDCC) zu einer negativen Chronotropie (Maltsev et al., 1994). In frühen Stadien der Kardiomyogenese innerhalb der EBs konnte dieses nicht gezeigt werden, so dass von einer sukzedanen funktionellen Kopplung genannter Komponenten im Verlauf der Differenzierung auszugehen ist (Boheler et al., 2002).

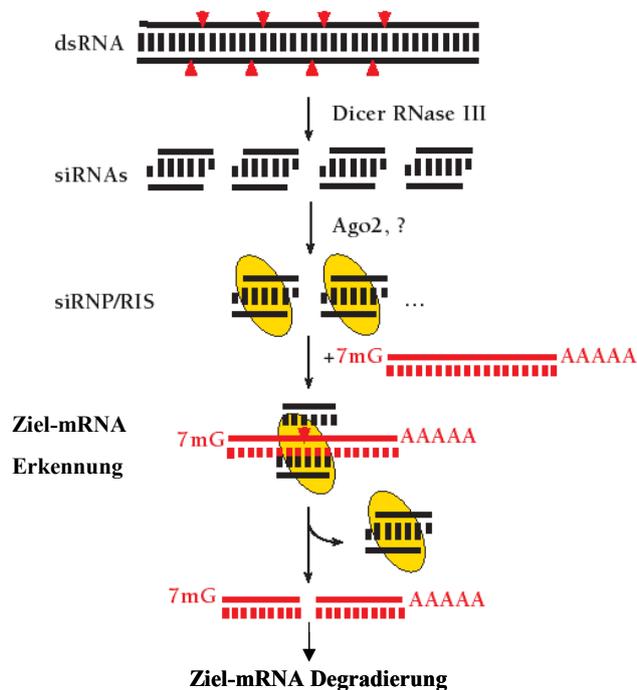
Die beobachteten primitiven Schrittmacher-Aktionspotentiale in frühen Differenzierungsstadien werden durch VDCC, sowie transiente Kaliumkanäle ( $I_{k,t0}$ ) ausgelöst. Hinzu kommen in späteren Stadien eine Vielzahl zusätzlicher Ionenkanäle. Dazu zählen spannungsabhängige  $\text{Na}^+$ -Kanäle, verzögerte einwärts, sowie auswärts gleichgerichtete  $\text{K}^+$ -Kanäle, muscarine Acetylcholin-aktivierte  $\text{K}^+$ -Kanäle und hyperpolarisationsgesteuerte Schrittmacher Kanäle (Maltsev et al., 1993).

### 1.3. RNA Interferenz

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Methode zur Unterdrückung von Genaktivitäten basiert auf dem Mechanismus der RNA Interferenz (RNAi). Dieser Mechanismus bildet die Grundlage für das Verständnis und die Funktionalität des Screens, sowie der erzielten Resultate und wird dementsprechend ausführlich beschrieben.

Mit der Entdeckung des Mechanismus der RNA-Interferenz (RNAi) in dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* (Fire et al., 1998), wurde eines der ältesten und zugleich ubiquitärsten antiviralen Systeme der Forschung zugänglich gemacht. Schon vor der Divergenz des Pflanzen- und Tierreiches wurde mittels PTGS (posttranscriptional gene silencing) die Virusreplikation infizierter Zellen unterbunden. RNA-Interferenz (RNAi) bewirkt, durch doppelsträngige RNA (dsRNA) induziert, die posttranskriptionelle Suppression der Expression von Fremdgenen in den meisten Eukaryonten, ebenso wie die Kontrolle der Expression von Transposons und repetitiven Sequenzen (Ketting et al., 1999; Tabara et al., 1999). Eine genspezifische Wirkung der dsRNA-induzierten PTGS wurde auch in Pflanzengewebe gezeigt (Hamilton and Baulcombe, 1999), in welchen kurze, zu beiden Strängen des Gens komplementäre RNAs von 25 nt Länge

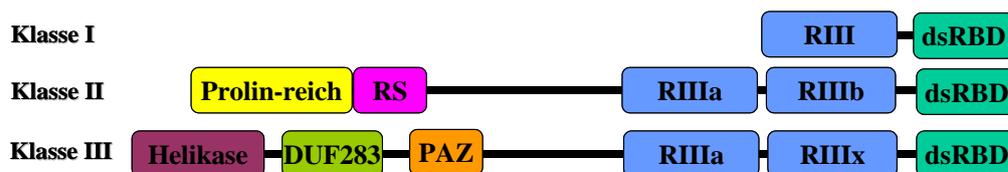
nachgewiesen wurden. Der Mechanismus der RNAi konnte erstmals durch die Verwendung von embryonalen Extrakten aus *Drosophila melanogaster*-Embryonen *in vitro* reproduziert werden (Tuschl et al., 1999). Dem Extrakt zugefügte dsRNA wurde in RNA-Fragmente prozessiert, welche den intervallartigen Abbau der homologen mRNA nach je 21-23 nt bewirkte (Zamore et al., 2000). Die Analyse dieser kurzen RNA-Fragmente zeigte, dass es sich um RNA-Duplexe mit 2-3 nt 3'-Überhängen und 5'-phosphorylierten Enden handelte, die als siRNAs (short interfering RNAs) bezeichnet wurden (Elbashir et al., 2001c). Die biochemische Grundlage des Mechanismus RNAi wurde an *Drosophila*-Embryonen näher erforscht. Aus dsRNA-behandelten *Drosophila* S2-Zellen, einer Standard-Zelllinie von *Drosophila*, wurde ein mit siRNAs kofraktionierter Proteinkomplex isoliert, welcher als RISC (RNA induced silencing complex) bezeichnet wird und die Degradierung der mRNA *in vivo* bewirkte (Hammond et al., 2001). In Abb. 1.4 ist der Mechanismus der RNA-Interferenz schematisch dargestellt.



**Abb. 1.4 Schema der dsRNA-vermittelten RNA-Interferenz.** Die dsRNA wird durch Dicer, einem Enzym der RNase III-Familie sequentiell in 21 nt umfassende siRNAs prozessiert. Diese Duplexe haben einen 19 bp großen Bereich, der von 2-3 nt 3'-Überhängen flankiert wird. Diese siRNAs bilden durch Assoziation mit dsRNA-bindenden Proteinen, wie z.B. Ago2 den siRNA-enthaltenden Ribo-Nukleo-Protein-Komplex (siRNP) und schließlich den RISC (RNA Induced Silencing Complex). Dieser Komplex erkennt die Ziel-mRNA durch Basenpaarung des komplementären siRNA-Stranges und führt zu dem ATP-abhängigen Schnitt der mRNA an einer Position, die gegenüber der Base liegt, welche 10 nt stromaufwärts vom 5'-Ende des siRNA-Stranges lokalisiert ist. Die durch die Endonukleaseaktivität des RISC geschnittene Ziel-mRNA wird daraufhin durch andere, noch nicht identifizierte Ribonukleasen degradiert.

Entstehung der siRNAs

Den initialen Schritt der RNAi bildet die Entstehung der siRNAs aus der dsRNA. Dieser Schritt wird durch Dicer, ein Enzym der RNase III-Familie katalysiert. Die RNase III-Enzyme werden aufgrund der Struktur ihrer Domänen in drei Klassen eingeteilt (Abb. 1.5). Alle Mitglieder der RNase III-Familie enthalten eine N-terminale dsRNA-bindende Domäne (dsRBD). Die erste Klasse bilden die bakteriellen RNase III-Enzyme, welche eine RIII-Domäne (RNase III-Domäne) enthalten. Die Drosha-Nukleasefamilie enthält zwei RIII-Domänen und zwei N-terminale putative Protein-Protein-Interaktionsdomänen, eine Prolin-reiche und eine Serin-Arginin-reiche. Die dritte Klasse, die Dicer-Familie, enthält zwei RIII-Domänen, eine funktionell noch unbekannte Domäne (DUF283), ein PAZ-Motif (Piwi Argonaute, Zwille/Pinhead) und eine N-terminale Helikase-Domäne (Bernstein et al., 2001; Filippov et al., 2000). Letztere erkennt präferentiell die Enden seines Substrates, von welchen ausgehend eine Art sequentieller Abbau stattfindet und so zu Fragmenten definierter Länge von 21-23 nt führt. Es wird vermutet, dass Dicer als Homodimer agiert und die Erkennung des Substrat-Endes von der PAZ-Domäne vermittelt wird (Carmell and Hannon, 2004). Die daraus entstehenden siRNAs zeigen dementsprechend keine Sequenz-Überlappungen (Zhang et al., 2002) und weisen die für den RNase III-katalysierten Abbau typischen phosphorylierten 5'-Enden, sowie 2-3 nt 3'-Überhänge auf.



**Abb. 1.5 Schematische Darstellung der RNase III-Familie.**

Die RNase III-Familie umfasst drei Klassen. Alle Klassen enthalten eine C-terminale dsRNA-Bindende Domäne (dsRBD in türkis). Die Klasse I beinhaltet die bakteriellen RNase III-Enzyme, die nur eine RNase III-Domäne (RIII in blau) besitzt. Die Klasse II wird durch die Drosha-Enzyme repräsentiert. Diese besitzen zwei RIII-Domänen, die zwecks Unterscheidung als RIIIa und RIIIb benannt sind. Sie sind durch eine N-terminale Prolin-reiche Domäne (gelb) und eine Serin-Arginin-reiche Domäne (RS, rosa), welche wahrscheinlich Motife für Protein-Proteininteraktionen darstellen, gekennzeichnet. Die Klasse III umfasst die Dicer-Enzyme, welche eine N-terminale Helikase-Domäne, eine funktionell unbekannte Domäne (DUF283), ein PAZ-Motif (Piwi-Argonaute-Zwille/Pinhead) und zwei RIII-Domänen aufweisen, wovon RIIIx als funktionell inaktiv vermutet wird. Die Größenverhältnisse der Proteine untereinander wurden bei der Darstellung nicht beachtet (nach Carmell und Hannon, 2004).

### Erkennung und Degradierung der Ziel-mRNA

Die Erkennung der Ziel-mRNA wird durch die Dicer-prozessierten siRNAs bewerkstelligt. Diese werden in einen dsRNA-bindenden Multienzymkomplex, den siRNP (siRNA containing Ribo-Nukleo-Protein complex) inkorporiert, welcher dann den RISC formt. Es wird vermutet, dass der RISC aus einer inaktiven, doppelsträngigen siRNA-enthaltenden Form, durch Entwindung des siRNA-Duplexes in den aktiven Zustand überführt werden (Nykanen et al., 2001). Die strukturelle Symmetrie der Duplexe ermöglicht eine Entwindung von beiden Seiten. Andere Daten zeigen, dass die ATP-abhängige Entwindung des siRNA-Duplexes von dem thermodynamisch instabileren 5'-Ende ausgehend bewerkstelligt wird (Schwarz et al., 2003). Der Strang des Duplexes, von dessen 5'-Ende ausgehend die Entwindung stattfindet, wird als Untereinheit des RISC wirksam und vermittelt über Watson-Crick-Basenpaarungen zur homologen Sequenz der Ziel-mRNA deren ATP-abhängige Degradierung. Der andere Strang des siRNA-Duplexes wird abgebaut.

Die beteiligten Enzyme des RISC sind bis heute nicht vollständig identifiziert. Es konnten jedoch aus *Drosophila melanogaster* Schneider-Zellen einige der RISC-Komponenten isoliert werden. Dazu gehören Argonaute2 (Ago2; (Hammond et al., 2001; Liu et al., 2004)), das Vasa intronische Genprodukt (VIG; (Caudy et al., 2002)), das *Drosophila* Homolog des Fragile X Mentale Retardation Protein (FMRP), dFXR (Caudy et al., 2002) und die Tudor *Staphylococcus* Nuklease (Tudor SN; (Caudy et al., 2003)). Die Proteine der Argonaute-Familie besitzen, ebenso wie Dicer, eine PAZ-Domäne und werden als mögliche Kandidaten für die Erkennung der chemischen Struktur der RNAi-vermittelnden RNAs vermutet. So konnte gezeigt werden, dass Ago2 eine geringere Affinität für dsRNS mit glatten Enden („blunt end“), im Vergleich zu den siRNAs mit einzelsträngigen 3'-Enden aufweist (Yan et al., 2003).

Die Erkennung der Ziel-mRNA durch Basenpaarung des siRNA-Stranges des RISC und der homologen Sequenz, führt zur Spaltung der mRNA an dem Nukleotid, welches zu dem 10 nt stromaufwärts von dem 5'-Ende des siRNA-Stranges gelegenen Nukleotid komplementär ist (Elbashir et al., 2001b). Diese hydrolytische Spaltung wird von der RNA-Endonuklease-Aktivität des RISC bewerkstelligt, die Produkte mit 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphomonoester-Termini freisetzt. Gleichzeitig konnte die Mindestlänge der Substrat-mRNA von 15 nt bestimmt werden (Martinez and Tuschl, 2004).

### RNAi –Technologie und reverse Genetik

In den Anfängen der Molekularbiologie wurden Gene durch die sogenannte „Vorwärts-Genetik“ funktionell analysiert. Darunter versteht man die Identifikation eines Gens, welches einen bekannten Phänotyp hervorruft. Doch der Fortschritt der Sequenzierungstechnik und die Entschlüsselung ganzer Genome identifizierte eine Vielzahl von Genen mit unbekannter Funktion. Diese kann mit Hilfe der reversen Genetik ermittelt werden, welche durch die Technik der Genmanipulation ausgehend, den Genotyp verändert und somit die Untersuchung des Phänotyps ermöglicht. Mit der Entdeckung der RNA-Interferenz wurde der Forschung eine Technologie durch Applikation von dsRNA zugänglich gemacht, welche die posttranskriptionelle Suppression der Genexpression zur Folge hat. Die Erfolge in der Genanalyse bei *C.elegans* führten zu vergleichbaren Versuchen in anderen Organismen, wie zum Beispiel Pflanzen und frühen Mäuse-Embryonen (Svoboda et al., 2000; Wianny and Zernicka-Goetz, 2000). Allerdings erwies sich der Einsatz von dsRNA in Säugern als problematisch, da die Applikation von dsRNA in somatischen, nicht aber in embryonalen Zellen zu einem unspezifischen Effekt führte. Dieser wird durch Aktivierung der Typ I-Interferone (IFNs)  $\alpha$  und  $\beta$  herbeigeführt, welche durch die RNA-abhängige Protein Kinase (PKR) die Phosphorylierung von EIF-2 $\alpha$  und infolgedessen einen unspezifischen Translationsarrest bewirken (Gil and Esteban, 2000). Um diesen Effekte zu umgehen, wurden synthetische siRNAs appliziert, welche den endogen prozessierten Dicer-Produkten entsprachen und die spezifische Degradierung der Ziel-mRNA in verschiedenen Säuger-Zelllinien bewirkten (Elbashir et al., 2001a). Die Effizienz der posttranskriptionellen Reduktion der Ziel-mRNA konnte auf die Länge der siRNAs und auf die Länge der 3'-Überhänge, sowie deren Sequenz zurückgeführt werden. So wurde mit RNA-Duplexen von 19 bp mit 2 nt umfassenden „UU“, oder „TT“ 3'-Überhängen die besten Erfolge erzielt (Elbashir et al., 2001a; Tuschl et al., 1999). Allerdings konnte in Säuger-Zellkulturexperimenten auch die Transfektion mit siRNAs einen unspezifischen Effekt hervorrufen, welcher die Suppression von Nicht-Ziel-Genen zur Folge hatte (Bridge et al., 2003; Kim et al., 2004; Moss and Taylor, 2003; Sledz et al., 2003). Einige Effekte ließen sich jedoch auf die Präparations- sowie Applikationsmethodik zurückführen. Demnach stellt die Transfektion mit lipidbasierenden Transportsystemen eine mögliche Ursache für die Interferon-vermittelten Immunantwort dar (Heidel et al., 2004).

### 1.3.1. Vektor-basierende Expressions-Systeme für Säugerzellen

Die Transfektion mit synthetischen siRNAs bewirkt lediglich die transiente posttranskriptionelle Suppression der Genexpression und eignet sich somit nicht für die Analyse einer Genfunktion über einen Zeitraum von mehr als zwei bis maximal vier Tagen. Gerade für entwicklungsbiologisch relevante Gene, die räumlich, sowie temporal unterschiedlich exprimiert werden, ist eine andauernde siRNA-vermittelte RNA-Interferenz

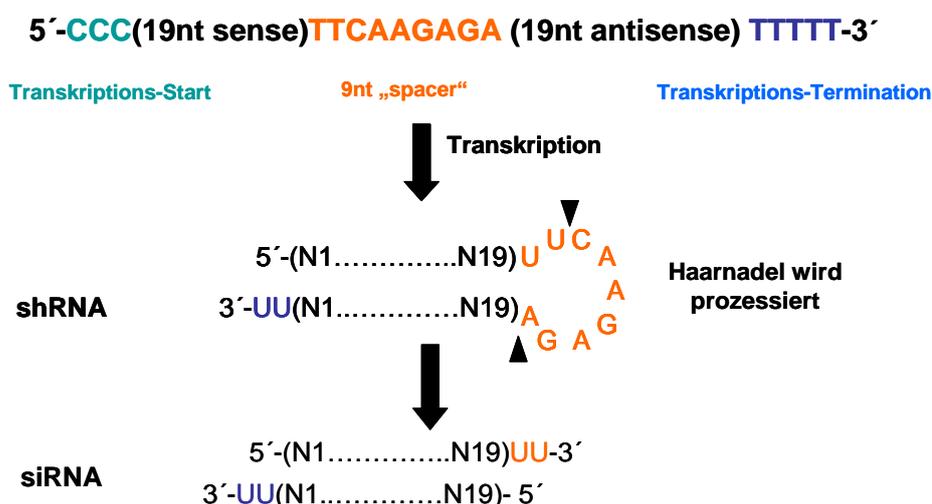
essentiell, damit umfassende funktionelle Analysen durchgeführt werden können. Zu diesem Zweck wurden Vektor-basierende siRNA-Expressionssysteme für Säugerzellen entwickelt, die einen RNA-Polymerase III-Promotor beinhalten und die dauerhafte Synthese der siRNAs bewirken. Diese siRNA-Expressionsvektoren bieten die Möglichkeit stabile transgene Organismen und Zelllinien zu generieren. Sie bilden damit eine Alternative zu der „knock-out“ Strategie. Mit Hilfe dieser Vektoren konnten zahlreiche Gene in Säuger-Zelllinien posttranskriptionell supprimiert werden (Brummelkamp et al., 2002; Lee et al., 2002; Miyagishi and Taira, 2002; Paddison et al., 2002; Paul et al., 2002; Sui et al., 2002; Yu et al., 2002). Die Verwendung RNA-Polymerase III-abhängiger Promotoren hat den Vorteil, dass die Transkripte weder eine 5'-„Kappe“ noch eine 3'-Polyadenylierung aufweisen, wie sie bei RNA-Polymerase II-Transkripten zu finden sind. Zudem hat die RNA-Polymerase III eine definierte Start- und Terminationsequenz. Die RNA-Polymerase III bewirkt normalerweise die Transkription kleiner stabiler RNAs, einschließlich der 5s-ribosomalen RNA und der Transfer-RNA und ist dementsprechend in jeder Zelle aktiv. In Säugerzellen sind etwa 20000 Moleküle RNA-Polymerase III enthalten, wobei die Konzentration, wie die der anderen RNA-Polymerasen der Zellwachstumsgeschwindigkeit entsprechend individuell reguliert wird.

Der in dieser Arbeit verwendete lentivirale Expressionsvektor enthält einen humanen H1-Promotor. Dieser H1-Promotor wird von der RNA-Polymerase III erkannt, welche einen definierten Transkriptionsstart nach drei Cytidinen hat. Die Terminationssequenz der RNA-Polymerase III umfasst eine Folge von vier bis fünf Thymidinen, welche zu dem Abbruch der Transkription nach dem zweiten Uridin am 3'-Ende des Transkripts führt. Diesem Promotor wird ein „Insert“ unterstellt, dessen Transkript nach endogener Prozessierung die funktionelle siRNA bildet und somit die nachfolgende Struktur aufzuweisen hat (Abb. 1.6). Das Oligonukleotid muss die Startsequenz der Transkription

für die RNA-Polymerase III enthalten, direkt gefolgt von einer 19 nt umfassenden Sequenz, die der Zielsequenz des Gens entspricht („sense“-Sequenz). Diese wird durch eine 9 nt lange Sequenz, welche nach Transkription die „Haarnadel“ bildet („spacer“-Sequenz) von der 19 nt umfassenden revers komplementären Zielsequenz („antisense“-Sequenz) separiert. Schließlich muß die Terminationssequenz von fünf aufeinanderfolgenden Thyminiden für die RNA-Polymerase III enthalten sein.

Das Transkript des „si-Inserts“ bildet eine Sekundärstruktur, welche aufgrund ihrer Form als Haarnadelstruktur bezeichnet wird. Durch die Endonuklease-Aktivität von Dicer wird die Haarnadel („hairpin“) wahrscheinlich an der in Abb. 1.6 durch den schwarzen Pfeil markierten Sequenz gespalten, so dass die 21 nt langen, als siRNAs bezeichneten RNA-Duplexe entstehen. Diese sind durch einen 19 bp langen doppelsträngigen Bereich mit flankierenden 2 nt umfassenden 3′-,„UU“- Überhängen gekennzeichnet und entsprechen somit der Form synthetischer siRNAs.

Die Funktionalität der siRNAs hängt zudem von der Zielregion-, sowie der Zielsequenz auf der mRNA ab (Brummelkamp et al., 2002). Die Zielregion sollte 100 bp nach Transkriptionsstart lokalisiert sein, 3′-wärts von „AA“ und 5′-wärts von „TT“ flankiert werden, sowie einen GC-Gehalt von 30 %-60 % aufweisen. Des Weiteren darf die Zielsequenz keine aufeinanderfolgenden Thyminide enthalten, um eine vorzeitige Transkriptionstermination zu vermeiden.



**Abb. 1.6 Schematische Darstellung der endogenen Entstehung von siRNAs aus dem Transkript des Oligonukleotids.**

Am 5′-Ende des Oligonukleotids befindet sich die Transkriptionsstartsequenz von „CCC“ für die RNA-Polymerase III. Es folgt eine 19 nt umfassende Sequenz, welche der Zielsequenz auf der mRNA entspricht. Diese wird von einer 9 nt langen „spacer“-Sequenz von ihrem 19 nt reversen Komplement separiert. Am 3′-Ende befindet sich die Terminations-Sequenz von fünf Thyminiden in Folge. Das Transkript dieses Oligonukleotids bildet eine haarnadelartige Sekundärstruktur, welche als „shRNA“ bezeichnet wird („short hairpin RNA“). Die endonukleäre Spaltung der „spacer“-Sequenz an den mit schwarzen Pfeilen markierten Positionen führt zu der finalen Form der siRNAs. Diese sind gekennzeichnet durch einen 19 bp umfassenden Bereich, welcher von „UU“ 3′-Überhängen flankiert wird

Entscheidend für die Wirksamkeit der siRNA-vermittelten RNA-Interferenz ist die Bildung des RISC ( RNA Induced Silencing Complex), welcher lediglich einen der beiden Stränge des siRNA-Duplexes enthält, die Erkennung der Zielsequenz vermittelt und letztendlich zur Degradierung der mRNA führt. Der verbleibende, nicht in den RISC integrierte Strang des siRNA-Duplexes wird degradiert. Dieser Prozeß setzt voraus, dass der siRNA-Strang in dem RISC komplementär zu der Zielsequenz der mRNA, dem „antisense“-Strang ist. Aufgrund dieser unterschiedlichen Wirksamkeit der beiden siRNA-Stränge werden diese als funktionell asymmetrisch bezeichnet. Die Integration eines siRNA-Stranges in den RISC setzt die Entwindung des siRNA-Duplexes voraus und kann aufgrund der strukturellen Symmetrie von beiden Seiten geschehen. Es wurde jedoch gezeigt, dass die Seite, von welcher die Entwindung initial katalysiert wird, abhängig von der Art der Basenpaarung am 5'-Ende der siRNA-Stränge ist. Begünstigt wird die thermodynamisch energieärmere Basenpaarung (Schwarz et al., 2003), so dass die A/T- Paarung der stabileren G/C-Paarung und schwachen Fehlpaarungen („mismatch“-Paarungen) vorgezogen wird. Der Strang, welcher an seinem 5'-Ende die schwächere Bindung zu seinem Komplement aufweist, wird in den RISC inkorporiert. Somit nehmen die 5'-Endsequenzen des siRNA-Duplexes entscheidenden Einfluß auf die selektive Integration des „sense“-, b.z.w. „antisense“-Stranges und infolgedessen auch auf die Wirksamkeit des RISC.

### 1.3.2. siRNA Bibliotheken

Mit Entschlüsselung des murinen und humanen Genoms eröffnete sich die Möglichkeit der Durchführung funktioneller Studien auf genomweiter Ebene, so auch durch die Generierung von genomweiten siRNA-Bibliotheken. Der durch den Mechanismus der RNAi vermittelte Funktionsverlust durch posttranskriptionelle Gensuppression bietet eine effiziente Basis für funktionelle Untersuchungen im großen Maßstab. Die für Langzeitstudien ungeeignete transiente Applikation von siRNAs erforderte die Generierung Vektor-basierender sh/siRNA-Expressionssysteme, um eine stabile genspezifische Unterdrückung zu gewährleisten. Um die Transduktion einer großen Anzahl verschiedenster teilungsaktiver und -inaktiver Zelltypen, sowie Stammzellen und Zygoten zu ermöglichen, wurden lentiviral-basierende Expressionssysteme, auch für sh/siRNAs, als Transfektionsvektoren entwickelt (Abbas-Terki et al., 2002; Adjali et al., 2009; Dull et al., 1998; Frka et al., 2009; Pfeifer et al., 2002; VandenDriessche et al.,

2002; Zufferey et al., 1998). Lentivirale Expressionssysteme wurden dementsprechend auch für die Generierung von sh/siRNA-Bibliotheken genutzt (Meacham et al., 2009; Paddison et al., 2004; Zheng et al., 2004).

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete, kommerziell erhältliche lentiviral-basierende Bibliothek kodiert einen „pool“ verschiedenster biologisch nicht validierter siRNAs mit einer Komplexität von etwa 178.000 verschiedenen Viren, welche in ihrer Gesamtheit alle Gene der Maus, inklusive ESTs (Expressed Sequences Tags) durch jeweils 3 bis 5 entsprechende siRNAs abdecken. Die Verwendung einer „gepoolten“ Bibliothek setzt die Möglichkeit der phänotypischen Selektion innerhalb des Testsystems voraus und bietet eine komplexe simultane Identifikation der auf den betrachteten Prozess Einfluss nehmenden Faktoren. Des Weiteren ermöglicht die Kompatibilität der Bibliothek mit dem Affymetrix –Gene Chip Mouse 430.2 die Identifikation der siRNA-Sequenzen.

#### **1.4. Fragestellung und Ziel der Arbeit**

Im Rahmen dieser Arbeit sollten mit Hilfe einer genomweiten lentiviral-basierenden sh/siRNA-Bibliothek essentielle Faktoren der frühen kardiomyozytären Differenzierung während der *in vitro*- Generierung ESC-abgeleiteter Herzmuskelzellen identifiziert werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Chemikalien, Enzyme, Lösungen

Die in der Arbeit verwendeten, Chemikalien, Enzyme und Lösungen wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen Invitrogen, Merck, Roche, Roth, New England Biolabs (NEB), Jena Bioscience, Sigma, Gibco und MWG bezogen.

### 2.2. Arbeiten mit Nukleinsäuren

#### 2.2.1. Sequenzspezifische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zu analytischen Zwecken wurde 1 µg Plasmid-DNA mit 1-10 U Restriktionsendonuklease von Jena Bioscience oder NEB in dem vom Hersteller entsprechend mitgelieferten Puffer in einem Gesamtvolumen von 20 µl für 1-2 h bei der vom Hersteller angegebenen Reaktionstemperatur gespalten. Für präparative Zwecke wurden 5 µg Plasmid-DNA in einem 50 µl Ansatz 2-4 h enzymatisch gespalten. Die zugegebene Menge der Restriktionsendonuklease wurde dem Maßstab des Ansatzes angepasst, war jedoch nie größer als 10 % des Gesamtvolumens. Somit wurde sichergestellt, dass die Enzymaktivität nicht durch eine zu hohe Glycerolkonzentration gehemmt wurde. Die Produkte der sequenzspezifischen Spaltung wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt.

#### 2.2.2. Dephosphorylierung von 5'-Enden der DNA

Um eine Religation des Vektors und damit den nichtrekombinanten Hintergrund zu verringern, wurde der zur Religation notwendige 5'-Phosphatrest des Vektors hydrolytisch abgespalten. Dazu wurde der Restriktionsansatz 30 min vor Beendigung der Restriktionsreaktion mit 0,5 U/µg DNA Alkalischer Phosphatase aus Krabben (SAP, 1 U/µl, Roche #11758250001) versetzt. Nach 30 min wurden die DNA-Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Nukleospin Extract II (Macherey-Nagel # 740609) aufgereinigt.

### 2.2.3. Agarose-Gelelektrophorese

Endonuklease-verdaute DNA, PCR-Fragmente und RNA wurden in horizontalen Agarosegelen aufgetrennt. Je nach DNA-Fragmentgröße wurden 0,8-2,0 %-ige (w/v) Gele verwendet. Für die Auftrennung von RNA wurden 4% (w/v) Agarose eingesetzt. Als Gel-, sowie Laufpuffer wurde 1x TAE (40 mM Tris/Acetat, 2 mM EDTA pH 8,2) verwendet. Die Agarose wurde in der Mikrowelle bei 900 W in Lösung gebracht und mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versehen. Der aufzutrennenden DNA-, oder RNA-Lösung wurden zwecks Beschwerung 0,2 Volumenanteile DNA Probenpuffer (50 % (w/v) Glycerin, 2 % (w/v) Orange G Merck #14277 in 1x TAE) zugefügt. Die Auftrennung erfolgte bei 100-150 V (ca. 5V/cm) bei Raumtemperatur. Mit Hilfe des in die DNA interkalierenden (partiell interkalierend bei ssDNA und ssRNA) Ethidiumbromids konnten die Nukleinsäuren durch Anregung der Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 254$  nm visualisiert werden. Die Bestimmung der Fragmentgrößen wurde mit Hilfe folgender Größenstandards vorgenommen:

#### Größenstandards

**Gene Ruler 50bp:** Fermentas #SM0371

**pUC-DNA** (Sau3a)

**λDNA** (EcoRI/HindIII)

### 2.2.4. Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die DNA-Fragmente wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung unter UV-Licht mit einem Skalpell aus den Agarosegelen ausgeschnitten. Zur Aufreinigung der Fragmente aus dem Gel wurde der Qiaquick Gel Extraction Kit (Fa. Qiagen) oder Nukleospin Extract II (Macherey-Nagel #740609) verwendet. Die DNA wurde in TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8) aufgenommen.

### 2.2.5. Paarung komplementärer DNA-Oligonukleotide („Annealing“)

Es wurden je 3 µg der komplementären 64 nt umfassenden siRNA-kodierenden Oligonukleotide in 2 x Annealing-Puffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 8, 2 mM

MgCl<sub>2</sub>) gegeben. Das Ansatzvolumen betrug 50 µl. Anschließend wurde der Ansatz in einem Thermocycler (Eppendorf Master Gradient) wie folgt inkubiert: 4 min, 90°C; 10 min 70°C, auf Raumtemperatur abkühlen. Die Lagerung der „Annealing“-Produkte erfolgte bei –20°C und wurden als „Insert“ mit dem siRNA-Expressionsvektor pSIH-H1-copGFP/pSIH-H1-Puro wie im Folgenden beschrieben ligiert.

#### 2.2.6. Phosphorylierung von DNA-Oligonukleotiden

Für die Phosphorylierung der „Annealing“-Produkte wurden 2 µl des Produktes aus 2.2.5 verwendet. Diese wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl unter Verwendung von T4 Polynukleotidkinase (10 U/µl, Fa. NEB #M0201S) den Angaben des Herstellers entsprechend angesetzt und behandelt. Die Aufbewahrung der phosphorylierten Produkte erfolgte bei -20°C.

#### 2.2.7. Ligation von DNA-Fragmenten

In einem Gesamtvolumen von 15 µl wurde Vektor-DNA im molaren Verhältnis von 1 zu 3 mit DNA-Fragment versetzt. Die Reaktion wurde durch 2 µl T4-DNA-Ligase (2 U/µl, Fa. Promega) 1-4 h bei RT, oder bei 14-16°C über Nacht in dem entsprechenden, vom Hersteller mitgelieferten Puffer geleistet.

#### 2.2.8. Analytische Plasmid-Isolierung (Mini-Präparation)

Einzelkolonien wurden in 2-3 ml LB-Medium (+100 µg/ml, Ampicillin) angeimpft und 6 h bis maximal 18 h unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Von den Bakterienkulturen wurden je 1,5-2 ml in Reaktionsgefäße überführt und sedimentiert (3 min, 6000 Upm, Eppendorf Centrifuge 5430). Das Sediment wurde in 150 µl gekühltem Puffer I (10 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl, pH 8, 100 µg/ml RNaseA) resuspendiert. Folgend wurden jedem Ansatz 200 µl Puffer II (0,2 M NaOH, 1 % (w/v) SDS) zugefügt, invertiert und 5 min bei RT zwecks alkalischer Lyse inkubiert. Die Neutralisation erfolgte durch Zugabe von 175 µl kaltem Puffer III (3 M Kaliumacetat mit Essigsäure auf pH 5,5 eingestellt). Nach dessen vollständiger Vermischung mit der Probe und einer Reaktionszeit von 5-10 min auf Eis, wurden die Proben 10 min bei 13200 Upm zentrifugiert. Der in ein neues Reaktionsgefäß überführte Überstand wurde zwecks Fällung der Plasmid-DNA mit 0,7 Volumenanteilen Isopropanol versetzt und invertiert. Nach Sedimentation der Plasmid-

DNA (10 min, 13200 Upm) und Verwurf des Überstandes, erfolgte der Waschschrift mit je 500  $\mu$ l 70 % Ethanol und anschließender Zentrifugation für 5 min bei 13200 Upm. Die dabei pelletierte Plasmid-DNA wurde sorgfältig von dem Überstand befreit, für etwa 5 min getrocknet und in 20-30  $\mu$ l TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8) aufgenommen. Die Kontrolle der isolierten Plasmid-DNA erfolgte restriktionsenzymatisch mit anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung der Fragmente.

### 2.2.9. Präparative Plasmid-Isolierung (Maxi-Präparation)

Zur Gewinnung von aufgereinigter DNA in größeren Mengen wurde der Plasmid Giga/Maxi/Midi Kit der Fa. Qiagen oder Macherey-Nagel verwendet. 100 ml Bakteriensuspension wurden mit der restlichen „Mini“-Kultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Gewinnung der Plasmid-DNA erfolgte den Angaben des Herstellers entsprechend und wurde über Ionenaustauscher-Säulen bewerkstelligt. Nach Resuspension des Pellets in TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8) dienten Spektralphotometrie und Restriktionsanalyse der Beurteilung von Konzentration und Qualität der Plasmid-DNA.

### 2.2.10. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in Lösung

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260$  nm in einer Quarzglasküvette bestimmt. Dazu wurden die DNA 1:100 in bidestilliertem Wasser, die RNA 1:100 in DEPC-Wasser verdünnt. Dabei entsprachen:

1 OD<sub>260</sub> = 50  $\mu$ g /ml für doppelsträngige DNA

1 OD<sub>260</sub> = 40  $\mu$ g /ml für einzelsträngige DNA oder RNA

### 2.2.11. Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierungen wurden mit Hilfe des BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems #4336917) in dem ABI Prism® DNA Sequencer 377 nach Angaben des Herstellers vorgenommen.

### 2.2.12. Isolation von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen

Die RNA-Isolation erfolgte mit dem TRIzol®-Reagenz (Invitrogen #15596-026) den Angaben des Herstellers entsprechend. Die so erhaltene RNA wurde in DEPC-Wasser (1ml/l DEPC in ddH<sub>2</sub>O über Nacht bei RT unter Rühren inkubieren, dann autoklavieren, 121°C, 2 bar, 30 min) aufgenommen und die Konzentration spektralphotometrisch bestimmt. Die zusätzliche gelelektrophoretische Auftrennung diente der Qualitätsbeurteilung der RNA.

### 2.2.13. Fällung von RNA

Die Fällung der RNA erfolgte durch Zugabe von 2,5 µl LiCl (4 M), 2 µl EDTA pH8 (0,5 M) und 75 µl 100 % Ethanol. Der Ansatz wurde durchmischt und für 30 min. bei -20°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz zentrifugiert (10 min.; 14000 Upm; 4°C; Eppendorf Tischzentrifuge), der Überstand verworfen und das Sediment zweimal mit Ethanol (70%) gewaschen. Die gefällte RNA wurde in Wasser aufgenommen.

### 2.2.14. cDNA-Synthese mittels reverser Transkription

#### 2.2.14.1. cDNA-Synthese für anschließende Verwendung in einer RT-PCR

Für die cDNA Synthese wurde 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Die cDNA-Erststrangsynthese, wurde mit der Superskript Reverse Transkriptase II ( Invitrogen #18080044) bewerkstelligt. Mit Ausnahme der speziell aufgeführten Lösungen wurden ausschließlich die vom Hersteller mitgelieferten Reagenzien verwendet.

Für die Erstrangsynthese der cDNA wurde 1 µg Gesamt-RNA mit 200 pmol Oligo-(dT)<sub>15</sub>-Nukleotiden versehen und mit Wasser auf ein Volumen von 10,5 µl aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde 10 min bei 65 °C in einem Thermocycler (Eppendorf Mastercycle Gradient) denaturiert und anschließend auf Eis gelagert. Danach erfolgte die Zugabe der restlichen Komponenten auf ein Gesamtvolumen von 20 µl. Der Ansatz wurde 1 h bei 42 °C im Thermocycler inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8), so dass sich ein Gesamtvolumen von 30 µl ergab. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 2.2.14.2. cDNA-Synthese für anschließende Amplifikation und Biotinylierung in der Nested-PCR

Für diese cDNA-Synthese wurde ein spezieller cDNA-Syntheseprimer (GNH\_cDNA) verwendet, welcher spezifisch das alternative Transkript bindet. Für die Synthese wurden jeweils 10µg Gesamt-RNA eingesetzt und wie unter 2.2.14.1 beschrieben durchgeführt.

### 2.2.15. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) nach (Saiki et al., 1986)

Die PCR-Amplifikationen wurden unter Verwendung von 0,2 ml-Reaktionsgefäßen in der Mastercycle Gradient-PCR-Maschine (Fa. Eppendorf) durchgeführt. Die Reaktionen wurden von der *Taq*-Polymerase (Eppendorf) unter nachfolgend angegebenen Amplifikationsbedingungen katalysiert. Die Ausgangskonzentration der verwendeten Primer betrug in allen Fällen 10µM.

#### 2.2.15.1. PCR-Amplifikation zu Detektionszwecken

**Tab. 2.1 allgemeine Ansatz und Amplifikationsbedingungen der PCR**

Komponente	Endkonzentration	Zyklenzahl	Prozess	Temperatur	Dauer
Template	Individuell	1x	Denaturierung	94°C	2 min
dNTP-Mix	25pmol	individuell	Denaturierung	94°C	30 sec
10xPuffer	1x		Primer - Anlagerung	individuell	30 sec
Primer	Je 10µmol		Elongation	72°C	1 min
Taq	1U	1x	Elongation	72°C	7 min
Wasser	ad 20/50µl				

Die Charakteristika der verschiedenen PCR-Reaktionen sind im Anhang zusammen mit den entsprechend verwendeten Primern aufgeführt.

#### 2.2.15.2. Nested PCR zur Amplifikation und Biotinylierung der siRNA-Sequenzen

Die in die genomische DNA der Zielzellen integrierten Konstrukte produzieren ein primäres Transkript vom CMV-Promoter, welches eine Fusion des Markergens (copGFP oder Puro) darstellt. Dieses dient als Matrize für die Amplifikation des siRNA-Inserts. Die Amplifikation des Inserts erfordert zwei aufeinanderfolgende PCR-Runden. In der

zweiten PCR werden zwei Nested Primer verwendet, wobei der „Vorwärtsprimer“ eine 5'-Biotinylierung aufweist und die so amplifizierten siRNA-Zielsequenzen mit Biotin gekennzeichnet für die Hybridisierung von Affymetrix Gene Chip Arrays verwendet werden können. In der ersten Runde der PCR wurden 5 µl der cDNA (siehe 2.2.14.2) eingesetzt. In beiden PCR-Runden wurde die Titanium *Taq* DNA Polymerase (Clontech/Takara #639209) verwendet.

- PCR: Fwd\_GNH, Rev\_GNH
- PCR NFwd\_GNH\_bio, NRev\_GNH

**Tab. 2.2 Ansatz und Amplifikationsbedingungen der 1. PCR**

Komponente	Menge	Zyklenzahl	Prozess	Temperatur	Dauer
cDNA <sub>GNH</sub>	5µl	1x	Denaturierung	94°C	2 min
10x PCR Puffer	10µl	22x	Denaturierung	94°C	30 sec
50x dNTP-Mix	2µl		Primer-Anlagerung/ Elongation	68°C	1 min
Fwd_GNH	2µl				
Rev_GNH	2µl	1x	Elongation	68°C	3 min
50x Titanium Taq DNA Polymerase	2µl				
Wasser	77µl				

Von jeder Probe aus der 1. PCR wurden 5 Reaktionen für die 2. PCR angesetzt, um eine ausreichende Menge für die spätere Hybridisierung des Affymetrix Gene Chips zu erhalten.

Tab. 2.3 Ansatz und Amplifikationsbedingungen der 2. PCR

Komponente	Menge	Zyklenzahl	Prozess	Temperatur	Dauer
Produkt 1.PCR	1µl	1x	Denaturierung	94°C	2 min
10x PCR Puffer	10µl	2x	Denaturierung	94°C	30 sec
50x dNTP-Mix	2µl		Primer-	50°C	2 min
NFwd_GNH_bio	10µl		Elongation	68°C	1 min
NRev_GNH	10µl	20x	Denaturierung	94°C	30 sec
50x Titanium DNAPolymerase	2µl		Primer-Anlagerung/ Elongation	68°C	1 min
Wasser	66µl	1x	Elongation	68°C	3 min

Ein Aliquot von 1µl des Produktes der 2. PCR wurde gelelektrophoretisch kontrolliert (4% Agarose) und aufgereinigt.

### 2.2.16. Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits (Qiagen #28106). Dabei wurde jeder Reaktionsansatz aus der 2. PCR von 2.2.15.2, welcher 100 µl umfasst, mit einem sechsfachen Volumen des PB Puffers versetzt und auf eine Säule gegeben. Anstatt des vom Hersteller empfohlenen einfachen Waschschrtes, wurden drei Waschschrte mit jeweils 0,5 ml Waschpuffer des Herstellers getätigt. Die Elution erfolgte zweifach mit je 20µl Elutionspuffer des Herstellers gefolgt von der Vereinigung der fünf gleichartigen Proben zu einem Gesamtvolumen von etwa 200 µl.

#### 2.2.16.1. Aufreinigung einzelsträngiger, λ-Exonuklease-behandelter PCR-Produkte

Diese erfolgte ebenfalls mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits (Qiagen #28106). Hier wurde zu jeder, 200µl umfassenden Probe das zehnfache an PB Puffer zugefügt. Von diesem Ansatz wurden je 0,5 ml sequentiell auf zwei Säulen gegeben, gefolgt von zwei Waschschrten mit jeweils 0,5 ml Waschpuffer. Das einzelsträngige Produkt wurde je Säule mit 2x22 µl Elutionspuffer eluiert. Des Weiteren wurde das Volumen jeder

Probe von ca. 80 µl auf 50 µl mittels Vakuumzentrifugation reduziert. Von jeder Probe wurde anschließend ein Aliquot von 1 µl entnommen und die Konzentration des PCR Produktes bestimmt.

### 2.2.17. λ-Exonuklease-Behandlung von PCR-Produkten

Für die Eliminierung des nicht biotinylierten Stranges des aufgereinigten PCR-Produktes aus 2.2.16 wurde eine λ-Exonuklease (NEB #M0262S) verwendet. Dafür wurden 160 µl aufgereinigtes PCR-Produkt aus der 2. PCR mit 20 µl 10x ExoLambda Puffer und 20 µl (100U) der Exonuklease Lambda versetzt und 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Die erfolgreiche Degradierung wurde mittels Gelelektrophorese kontrolliert.

## 2.3. Bakterien

### 2.3.1. Bakterienstämme

*E.coli* XL1 blue (Stratagene # 200249)

*E.coli* Electromax DH10B (Invitrogen # 18290-015)

### 2.3.2. Bakterienmedien

- **LB-Medium:** 1 % (w/v) NaCl, 1 % (w/v) Trypton (Applichem #A1553), 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt (Applichem #A1552) in ddH<sub>2</sub>O, autoklaviert (121°C, 2 bar, 30 min)
- **SOB-Medium:** 2 % (w/v) Trypton (Applichem #A1553), 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt (Applichem #A1552), 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub> pH 6.7-7
- **SOC-Medium:** SOB-Medium, 20 mM α-D-Glukose
- **TB-Medium:** 1,2 % (w/v) Trypton, 2,4 % (w/v) Hefeextrakt, 4 % Glycerin in 900 ml ddH<sub>2</sub>O, autoklaviert (121°C, 2 bar, 30 min), anschließend Zugabe von 100 ml 0,17 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,72 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- **LB-Agar:** 1,5 % (w/v) Bacto-Agar in LB-Medium
- **LB-Ampicillin-Agar:** LB-Agar, 100 µg/ml Ampicillin

### 2.3.3. Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien

Die Herstellung der kompetenten Zellen erfolgte nach dem Protokoll von Inoue, H. et al. (1990). Zunächst wurde mit einer Einzelkolonie eine Vorkultur in 20 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln auf einem Plattformschüttler (120 Upm) inkubiert. Diese Vorkultur diente als Inokkulum für eine 250 ml-Hauptkultur in SOB-Medium. Die Inkubation erfolgte hier bei Raumtemperatur bis eine OD<sub>600</sub> von 0,93 erreicht war. Anschließend wurde die Bakteriensuspension für 10 min auf Eis gestellt, 10 min. bei 2500 g und 4°C (Heraeus, Megafuge 1.0R) zentrifugiert und das erhaltene Bakteriensediment in 80 ml eiskaltem TB-Puffer (10 mM PIPES, 55 mM MnCl<sub>2</sub>, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 250 mM KCl pH 6,7) resuspendiert. Nach erneutem Zentrifugieren wurden die Zellen in 20 ml eiskaltem TB-Puffer aufgenommen und nach Zugabe von DMSO (Dimethylsulfoxid) zu einer Endkonzentration von 7 % (v/v) für 10 min. auf Eis inkubiert. Schließlich wurden die Zellen in 200 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff Schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### 2.3.4. Transformation von chemisch-kompetenten Bakterien

Die chemisch-kompetenten Zellen wurden langsam von -80 °C auf RT erwärmt und aufgetaut. Nach einer 10 minütigen Lagerung der Zellen auf Eis erfolgte die Zugabe der Plasmid-DNA (20-100 µg) und eine weitere Inkubation für 30 min auf Eis. Die Bakterien wurden für 90 sec einer Temperatur von 42 °C (Hitzeschock) ausgesetzt, 3-5 min auf Eis abgekühlt und auf mit 800 µl LB-Medium versehen. Unter Schütteln inkubierten die Ansätze für 30 min bei 37°C. Anschließend wurden die Bakterien sedimentiert, in 100-200 µl LB-Medium resuspendiert und auf LB-Ampicillin-Agar ausgestrichen. Die Bebrütung der beimpften Böden erfolgte bei 37 °C über Nacht. Zwecks Identifizierung transformierter Klone wurden mit Einzelkolonien Flüssigkulturen angesetzt nach der „Mini-Präparation“ restriktionsenzymatisch analysiert.

#### 2.3.4.1. Amplifikation der siRNA-Bibliothek

Die kommerziell erworbene Plasmidbibliothek „*GeneNet Mouse 40K siRNA Lentiviral (HIV) Library in pSIH-H1-Puro*“ ( BioCat#: SI622PB-1-SBI) wurde ihrer Komplexität von ca. 178.000 verschiedenen siRNA kodierenden Plasmiden entsprechend in *E.coli*

Electromax DH10B (Invitrogen # 18290-015) transformiert.

Dabei wurde unter Beachtung der Plasmidgröße von ca. 7 kb eine Anzahl von ca.  $1,3 \times 10^9$  Molekülen/10ng errechnet. Für die Transformation wurde je 1  $\mu$ l Plasmid (10ng/ $\mu$ l) für die Transformation eingesetzt und nach Angaben des Herstellers mit Hilfe des BioRad GenePulser II Elektroporators vorgenommen. Insgesamt wurden 5 Transformationen dieser Art vorgenommen. Die Bakterien wurden in 1ml SOC-Medium aufgenommen und 1 Stunde bei 225 Upm und 37°C geschüttelt. Danach wurden je 200  $\mu$ l Bakteriensuspension auf einer 15cm Schale mit LB-Ampicillin-Agar ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Folgend wurde die Kolonien jeder der 25 Platten mit je 10 ml LB-Medium mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin abgespült, auf ein Volumen von 2,5 Litern aufgefüllt und bis zu einer OD von 0,9 bei 37°C und 225 Upm wachsen gelassen. Danach wurde die Kultur für die präparative Plasmidpräparation sedimentiert.

## 2.4. Zellkultur

### 2.4.1. Zelllinien

**HEK293T**

**ES J1(Klon CM7/1)**

### 2.4.2. Zellkulturmedien, Lösungen und Reagenzien

- **DMEM:** Dulbeccos modified Eagle`s Medium (pH 7,0, 4,5 g/l D Glukose, L Glutamin, (GIBCO #41965-039)
- **ES-Medium:** 425ml DMEM, 75ml FCS, 5ml NEAA, 3,5 $\mu$ l 2-Mercaptoethanol, 50 $\mu$ l LIF
- **Differenzierungs-Medium:** 450 ml DMEM, 50ml FCS, 5ml NEAA, 3,5 $\mu$ l 2-Mercaptoethanol
- **HEK-Medium:** 450ml DMEM, 50ml FCS, 5ml NEAA, 5ml Penicillin/Streptomycin außer bei der Virusherstellung
- **ES-Einfriermedium:** 90 % FCS, 10 % DMSO
- **HEK-Einfriermedium:** 20 % FCS, 70 % DMEM, 10 % DMSO
- **FCS:** (PAA Laboratories), einmalig vor Gebrauch 45 min bei 56 °C Hitze-inaktivieren

- **Penicillin/Streptomycin (100x)** (GIBCO #15140-122)
- **NEAA (100x)** (GIBCO #11140-035)
- **G418-Sulfat** (Geneticin) (GIBCO #11811-031)
- **Puromycin-Dihydrochlorid** (Sigma #P8833)
- **Trypsin (2,5%)** (GIBCO #15090-046)
- **2-Mercaptoethanol** (Sigma #63689)
- **Gelatine** (Sigma #G1890)
- **LIF** (1x10<sup>7</sup> U/ml) (Chemicon#ESG1107)
- **20 x PBS**: 160 g NaCl (2,7 M), 4 g KCl (100 mM), 26,94 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O (200 mM) (oder 21,48 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 1,95 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O (14,1 mM), 4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (40 mM)
- **Hepes-EDTA Puffer** (3l): 21,21g NaCl, 1,2g KCl, 0,18g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,24g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O, 3g Glucose 0,03g Phenolrot, 14,3g Hepes, 0,11g EDTA ad 3l mit ddH<sub>2</sub>O , autoklaviert, pH 7,3

### 2.4.3. Kultivierung der Zellen

Die eukaryontischen Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37 °C unter Begasung mit 5 % CO<sub>2</sub> in wassergesättigter Atmosphäre kultiviert. Die Arbeiten wurden ausnahmslos unter einer Sterilbank durchgeführt. Sämtliche Geräte und Lösungen wurden vor der Benutzung sterilisiert.

Die ES-Zellen wurden ohne Ammenzellen auf 0,2% Gelatine-beschichteten Zellkulturschalen (Nunc) kultiviert.

### 2.4.4. Passagieren von Zellen

#### 2.4.4.1. Passagieren adhärenter Zellen

Zum Passagieren wurde das Kulturmedium von den adhärent wachsenden Zelllinien vollständig abgesaugt, die Zellen einmal mit 1xPBS, oder Hepes-EDTA Puffer gewaschen und durch eine 5-minütige Inkubation mit 0,25%Trypsin in Hepes-EDTA Puffer bei 37°C abgelöst. Die Trypsinisierung wurde durch Zugabe des entsprechenden Mediums gestoppt. Die Zellen wurden für 5 min bei 1000 Upm (SIGMA Tischzentrifuge

4K10) sedimentiert und in frisches Nährmedium aufgenommen. Ein entsprechend gewünschter Anteil der Zellen wurde auf andere Zellkulturschalen (Nunc) verteilt. Wenn für einige Experimente eine bestimmte Zelldichte benötigt wurde, ist die Zellzahl mittels einer Neubauer-Kammer ermittelt worden.

#### 2.4.4.2. Passagieren von EBs und CBs

Hierfür wurden die in Suspension befindlichen Zellaggregate vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt und in ein Sedimentationsröhrchen (Falcon) überführt. Nach etwa 15 min. Sedimentation der Zellen mittels Schwerkraft wurde der Überstand abgenommen, das Sediment durch vorsichtiges Invertieren in neuem Medium resuspendiert und auf eine entsprechende Anzahl neuer bakterieller Kulturschalen verteilt.

#### 2.4.5. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die adhärent wachsenden Zellen wurden nach dem Waschen mit PBS vom Schalenboden mit Trypsin abgelöst und 7 min sedimentiert (800 Upm, Heraeus Multifuge 11). Das Pellet wurde in 1 ml Einfriermedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in einem "*Cryo Tube*" (Nunc) gegeben und bei -80 °C eingefroren. Langfristig wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen der Zellen wurde ein "*Cryo Tube*" im Wasserbad (37 °C) erwärmt, bis der Inhalt komplett aufgetaut war. Die Zellen wurden in entsprechendem Medium aufgenommen, sedimentiert (100 Upm, 5 min Heraeus Multifuge 1 1), der Überstand abgenommen, mit neuem Medium versetzt und auf einer Zellkulturschale ausgesät.

#### 2.4.6. Transfektion von Zellen

##### 2.4.6.1. Transiente Transfektion von Zellen

Für die Transfektion der HEK293T-Zellen für die Virusproduktion wurde ausschließlich Fugene (Invitrogen #11668027) verwendet. Dabei wurden für die Transfektion einer 10 cm Schale 6 µg DNA und 18 µl Fugene verwendet, um ein optimales Transfektionsergebnis zu erhalten. Die weiteren Schritte wurden den Empfehlungen des Herstellers entsprechend durchgeführt.

#### 2.4.6.2. Infektion von Zellen mit lentiviralen Partikeln: stabile Transfektion

Für die Infektion von Zellen mit Lentiviren wurde dem entsprechenden antibiotikafreien zelltypischen Medium Polybrene (Stocklösung 8 mg/ml) (Sigma # 107689) in einem Verhältnis 1:1000 zugefügt. Dieses ist ein kationisches Polymer, welches die Virusinfektion begünstigt und verstärkt. Nach 18-24 Stunden wurde das Medium gewechselt um das zelltoxische Polybrene zu entfernen.

#### 2.4.7. G418-Selektion

Die Trennung der bei der *in vitro* Differenzierung entstehenden Kardiomyozyten von den anderen Zelltypen erfolgt durch die Kultivierung in Selektionsmedium. Diejenigen Zellen, welche keinen aktiven  $\alpha$ MHC-promoter aufweisen und somit G418-sensitiv sind, starben durch den Einfluß von Geneticin. Die für die positive Selektion von Kardiomyozyten mit 400  $\mu$ g/ml in der Literatur beschriebenen ausreichenden Konzentration von G418 wurde mit Hilfe einer Verdünnungsreihe von 300  $\mu$ g/ml bis 1000  $\mu$ g/ml (mit Abständen von 100  $\mu$ g/ml) während der Differenzierung bestätigt (Zweigerdt et al., 2003). Die benötigte Selektionsdauer beträgt bei diesem Versuch mindestens 7 Tage.

#### 2.4.8. Puromyzin-Selektion

Die für die positive Selektion infizierter Zellen benötigte Konzentration von Puromycin-Dihydrochlorid wurde anhand einer Verdünnungsreihe von 0,5 bis 5  $\mu$ g/ml in Stufen von 0,5  $\mu$ g/ml ermittelt und beträgt für die ES-Zellen 1,5  $\mu$ g/ml und erfordert eine Selektionsdauer von etwa 4 Tagen.

#### 2.4.9. *in vitro* Differenzierung von ES-Zellen

Für die *in vitro* Generierung von Kardiomyozyten wurde der Klon CM7/1 der transgenen ES-Zelllinie des Typs J1 (Zweigerdt et al., 2003) verwendet. Der Ablauf der Differenzierung entspricht dabei weitestgehend dem in dieser Literaturangabe von Zweigerdt et al. entwickelten Methode.

Die auf Gelatine-beschichteten Zellkulturschalen kultivierten ES-Zellen wurden vereinzelt und in einer Anzahl von  $1 \times 10^6$  Zellen in 10 ml Differenzierungsmedium in bakterielle Schalen mit 10 cm Durchmesser (Greiner) gegeben. Diese wurden unter

horizontaler Rotation auf einem speziell dafür entworfenen „Schüttler“ in Suspension kultiviert und dadurch die EB-Formation initiiert. Die Bildung der Embryoid Bodies (EBs) erfolgte über neun Tage, wobei alle 48 Stunden ein Mediumwechsel vorgenommen wurde. Am zehnten Tag wurde dem Differenzierungsmedium Geneticin zur positiven Selektion entstehender Kardiomyozyten zugefügt und während der ersten 3 Tage täglich, folgend jeden zweiten Tag gewechselt. Die positive Selektion der Kardiomyozyten erfolgte über einen Zeitraum von neun Tagen und resultierte in einer Population kontrahierender Zellaggregate annähernd gleicher Größe, den Cardiac Bodies (CBs).

Für die Generierung von kardiomyozytären Adhäsivkulturen wurden sieben Tage alte differenzierte EBs vorsichtig durch Verwendung von 0,25% Trypsin in HEPES-EDTA Puffer vereinzelt und auf gelatinisierte Zellkulturschalen ausgesät. Nach zwei Tagen wurde mit der positiven Selektion von Kardiomyozyten begonnen. Die Zellen wurden für weitere 12 Tage unter stetigem Selektionsdruck in Kultur gehalten.

## **2.5. Viren**

Der in dieser Arbeit generierte Lentivirus ist ein der biologischen Sicherheitsstufe 2 (S2) zuzuordnender Virus der dritten Generation. Alle dafür verwendeten Plasmide sind dem Anhang zu entnehmen.

### **2.5.1. Generierung lentiviraler Partikel**

Für die Generierung lentiviraler Partikel wurden HEK293T-Zellen bei 30%-iger Konfluenz mit den vier Plasmiden in dem Verhältnis 3:1:1:1 (pSIH-H1-copGFP/Puro:pMDLg/pRRE:pMD2.G(CMV-VSVG):pRSV-Rev) transfiziert. Einen Tag nach Transfektion wurde das Medium gewechselt und auf ein Volumen von 7 ml reduziert. Drei Tage nach Transfektion wurde der Überstand abgenommen, in ein Zentrifugationsröhrchen überführt (Falcon) und zwecks Beseitigung von Zelldebris 7 min bei 2000 rpm (Heraeus Megafuge 1.0) zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einem Filter mit der Porengröße 0,45µm (Fa. Millipore) gefiltert und für die weitere Verwendung auf Eis gelagert.

### 2.5.2. Konzentrierung lentiviraler Partikel

Für die Aufkonzentration des Virus wurde der gereinigte, virusenthaltende Überstand aus 2.5.1 in Ultrazentrifugenröhrchen (Polyallomer, thinwall, Beckmann #326823) überführt und 90 min bei 25.000 x g und 4°C im Schwingrotor TFT 41.14 in der Ultrazentrifuge (Centricon) zentrifugiert. Folgend wurde der Überstand verworfen, das Pellet mit sterilem 1xPBS versehen und über Nacht bei 4°C gelöst. Danach wurde der Virus entweder direkt verwendet oder aliquotiert und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 2.5.3. Bestimmung des Titers

Der zelltypabhängige und somit relative Titer wurde in HEK293T-Zellen anhand der Anzahl infizierter Zellen unter Berücksichtigung des eingesetzten Volumens bestimmt. Für die Titerbestimmung wurden jeweils  $10^5$  Zellen/10cm-Kulturschale ausgesät und einen Tag später infiziert.

Im Falle der SIH-H1-copGFP-basierenden Viren wurde die Anzahl GFP-positiver Zellen in Relation zu der Gesamtzellzahl ermittelt. Bei den SIH-H1-Puro-basierenden Viren wurde der Titer abgeschätzt. Dabei wurden die HEK-Zellen mit 2µg/ml Puromycin-Hydrochlorid für zwei Tage selektioniert, beginnend mit einem Tag nach der Infektion. Die Anzahl überlebender Zellen wurde ausgezählt und in Relation zu der Anzahl einer nicht selektionierten HEK293T „Referenzplatte“ gesetzt. Die mit diesem viralen System erzielten relativem Titer variierten von etwa  $10^9$ - $10^{10}$  ifu/ml.

### 2.5.4. Bestimmung der MOI für ES-Zellen

Die Infektionsfähigkeit verschiedener Zelltypen/Zelllinien variiert, so dass trotz Einsatz einer großen Anzahl an Viruspartikel lediglich ein geringer Teil der Zellen infiziert werden kann. Das Verhältnis eingesetzter Viruspartikel zu der Gesamtzielzellzahl und Anzahl damit infizierter Zellen ist dabei von entscheidender Bedeutung. Die allgemeine Definition der MOI formuliert sich wie folgt:

Mit der MOI (Multiplicity of infection= Vielfachheit der Infektion) wird in der Virologie das zahlenmäßige Verhältnis von infektiösen Agenzien (Viruspartikeln) zu deren Zielzellen beschrieben. Werden zum Beispiel Zellen, die sich in Zellkultur befinden, mit Viruspartikeln infiziert, dann lässt sich die MOI dieser Kultur berechnen, indem die Zahl der Viren in einem Well (Vertiefung in einer Zellkulturplatte) durch die Gesamtzahl der

Zellen in demselben Well geteilt wird. Bei einer MOI von 1 werden zur Transduktion genau so viele Viruspartikel eingesetzt wie sich Zellen in der Kultur befinden.

In dem Screen sollen die Zellen mit einer statistisch hohen Wahrscheinlichkeit durch lediglich einen Virus infiziert werden, so dass eine MOI von 0,5 als gut geeignet zu betrachten ist. Die Bestimmung der dafür erforderlichen Menge an Viruspartikeln (in HEK293T-Zellen ermittelt) erfolgte durch die Infektion einer definierten Zahl von ES-Zellen mit verschiedenen Virusmengen. Die vereinfachte Beurteilung der MOI in Abhängigkeit des prozentualen Anteils infizierter Zellen erfolgte dabei anhand der vom Hersteller SBI angegebenen Richtwerte:

**Tab. 2.4 Richtwerte zur Ermittlung der MOI**

% infizierte Zellen	10	20	30	40	50	60	70	80	90	>90
MOI	0,1	0,23	0,36	0,51	0,7	0,93	1,22	1,64	2,3	>2,5

Um eine Infektionseffizienz von 40% und demnach eine MOI von 0,5 in den ES-Zellen zu erreichen, musste die 25fache Menge an Viruspartikeln im Vergleich zu den HEK-Zellen eingesetzt werden. Das heißt, für die Infektion von  $10^6$  ES-Zellen mit einer Infektionseffizienz von 40%, wird eine anhand von HEK-Zellen bestimmte Virusmenge von  $10^7$  benötigt.

## 2.6. Proteine

### 2.6.1. Isolation von Proteinen aus eukaryotischen Zellen

- **Extraktionspuffer:** 20ml Tris-HCl 1M pH8,8, 0,74g EDTA, 20g SDS, pH8,0 ad 200 ml ddH<sub>2</sub>O, vor Gebrauch frisch hinzugeben: 2µg/ml Leupeptin-Hemisulfat (Applichem #A2183), 2µg/ml Aprotinin (Fluka #10820), 10µl/ml PMSF 0,2M in 70%EtOH (Sigma #P7626), 20µl/ml NaF (1M), 1µl/ml Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (1M), 2µl/ml Benzamidin 250mg/ml (Sigma #B6506)

Zur Isolierung von Gesamt-Proteinextrakt wurden die Zellen 2 x mit PBS Puffer gewaschen. Anschließend wurde 1 ml Extraktionspuffer zugegeben und kurz geschwenkt. Danach wurde das Lysat in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß unter gelegentlichem Schütteln 5 min auf Eis inkubiert. Der Zellaufschluß erfolgte mittels Ultraschall (5 Impulse von 5sec, 20% Leistung; Badelin Sonoplus). Die Lagerung des Lysats bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 2.6.2. Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Lösung (nach Bradford, 1976)

- **5xBradford-Reagenz:** 500 mg/l Coomassie Brilliant Blue G (Merck #1.02082.0005) in 50 ml 95% Ethanol lösen, 50 % (v/v) 85,7 % (w/v) ortho-Phosphorsäure, ad 200 ml H<sub>2</sub>O

Es wurden jeweils 798 µl H<sub>2</sub>O + 2 µl Proteinlösung mit 200 µl 5x Bradford Reagenz versetzt, 10-30 min bei RT inkubiert und die Extinktion bei 595 nm im Photometer gemessen. Parallel wurde auf gleiche Weise eine Kalibrationskurve erstellt (BSA in H<sub>2</sub>O). Mit Hilfe der Kalibrationskurve konnte die Proteinkonzentration der unbekanntem Lösung bestimmt werden.

### 2.6.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach (Laemmli, 1970)

- **10 % APS-Lösung:** 10 % Ammoniumpersulfat
- **Trenngelpuffer:** 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 0,4 % SDS
- **Sammelgelpuffer:** 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 0,4 % SDS
- **10 x SDS-Laufpuffer:** 1,25 M Tris-Base, 2 M Glycin, 1 % SDS
- **4 x SDS-Probenpuffer:** 62 mM Tris-HCl pH 6,8, 2 % SDS, 10 % Glycerin, 5 % DTT, 5 % β-Mercaptoethanol, 0,025 % Bromphenolblau
- **Rotiphorese Gel30:** 30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid

Die Proteine wurden in diskontinuierlichen, 10 %igen denaturierenden Polyacrylamidgelen elektrophoretisch in einer Mini-Proteingelapparatur aufgetrennt. Alle Proteinproben wurden vorher 5 min bei 95 °C in 4 x SDS-Probenpuffer denaturiert und in 1 x SDS-Laufpuffer bei 20-30 mA ca. 2-4 h aufgetrennt.

#### 2.6.4. Proteintransfer und -nachweis (Western-Blot (Immunoblot))

- **Transfer-Puffer:** 5,82 g/l Tris-Base, 2,93 g/l Glycin, 3,75 ml 10 % SDS, 200 ml Methanol ad 1000 ml bidest Wasser,
- **Blockierlösung:** 2 % Magermilchpulver, 0,05 % Tween 20 in PBS
- **ECL-Entwicklerlösung:** 10 ml/l ECL-A (250 mM Luminol in DMSO), 4,45 ml/l ECL-B (90 mM p-Coumarsiure in DMSO) in 100 ml Tris/HCl pH 8,5, lichtgeschützt bei RT lagern, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1:3000) vor Gebrauch dazugeben

Zum Transfer von Proteinen auf Nylonmembranen wurde das Semi-dry-Verfahren (Transfer-Apparatur der BIO-RAD) angewendet. Dazu wurde auf der (Graphit)-Anode ein Blot in folgender Reihenfolge aufgeschichtet: 3 Whatman 3MM-Papiere angefeuchtet mit Transfer-Puffer, eine Hybond C Membran (Amersham Pharmacia Biotech) mit Transfer-Puffer angefeuchtet, Proteingel und abschließend 3 Whatman 3MM-Papiere mit Transfer-Puffer angefeuchtet. Es wurde 1,5 bis 2 h bei 1.5 mA/cm<sup>2</sup> transferiert. Zur Kontrolle des Transfers wurde die Membran mit PonceauS (0,2 % PonceauS in 0,3 % Trichloressigsäure) angefärbt und anschließend mit PBS oder bidest Wasser wieder entfärbt. Zum Nachweis der Proteine wurden zunächst freie Bindungsstellen auf der Membran mit Blockierlösung abgesättigt (Inkubationszeit 30 min). Anschließend wurde der Blot mit dem 1. AK in Blockierlösung für 1 h bei RT oder ü.N. bei 4 °C inkubiert. Die verwendeten primären Antikörper wurden 1:1000 verdünnt eingesetzt (Troponin I, NEB #4002; Nkx2.5, Santa Cruz #sc-8697; Oct3/4, Abcam #ab27985). Die Membran wurde 4x mit 0,05 % Tween 20 in PBS gewaschen und für 1 h mit einem Meerrettichperoxidase-konjugierten 2. AK (1:5000 verdünnt in Blockierlösung, HRP-markiert Esel  $\alpha$ -Ziege/ Hase IgG (H+L) F(ab)<sub>2</sub>-Fragment (Fa. Dianova) bei RT inkubiert. Nach 4-maligem Waschen mit 0,05 % Tween 20 in PBS wurde der Immunoblot entwickelt. Hierzu wurden 10 ml der ECL Entwicklerlösung mit 3,1  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %) gemischt oder das Lumi-Light-Plus Western Blotting Substrat (Roche) verwendet, der Blot 1 min. in der aktivierten Entwicklerlösung geschwenkt und anschließend in Haushaltsfolie eingeschlagen. Ein Röntgenfilm (Amersham) wurde aufgelegt und nach 30 sek. bis 5 min. entwickelt.

## 2.7. Histologische Techniken

### 2.7.1. Herstellung von Kryoschnitten

Das zu schneidende Gewebe wurde in 4 % PFA (Paraformaldehyd, Sigma #158127) in PBS unter Bewegung für 1-2 h bei 4 °C fixiert. Anschließend wurde das PFA abgesaugt und nach einem Waschschrift mit eiskaltem 1x PBS gegen 30 % (w/v) Saccharose ausgetauscht. Die Inkubation in Saccharose erfolgte über Nacht. Im Anschluß wurden die Embryonen in Tissue TEK (Sakura Finetek) getränkt, in diesem eingebettet und auf Trockeneis eingefroren. Die Lagerung der eingebetteten Embryonen erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei –80 °C.

Die eingebetteten Embryonen wurden der gewünschten Orientierung entsprechend auf den Blockhalter des Kryostaten (LEICA CM 3050 S) aufgebracht und in 15 µm dicke Schnitte zerlegt. Die Schnitte wurden auf Objektträger (Fa. Menzel, SuperFrost Plus) aufgezogen und bei 4 °C über Nacht getrocknet.

## 2.8. Immunhistologische und Immunhistochemische Techniken

### 2.8.1. Antikörper-Färbung von Kryoschnitten

- **Blocking-Reagenz:** 10 % FCS in 1xPBS
- **Mowiol:** 5 g Mowiol4-88 (Roth #0713.1), 20 ml 1x PBS, 16 h rühren, 15 min bei 12000 Upm zentrifugieren, Überstand verwenden
- **DABCO** (Diazobicyclooctan, Roth #0718.1)

Der Nachweis der Proteine erfolgte mit Hilfe von Antikörpern. Dafür wurden die auf den Objektträger befindlichen Schnitte mit einem Fettstift umrandet und 3x 20 min bei RT in 1x PBS gewaschen, mit Blocking-Reagenz beschichtet und 30 min-4 h in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert. Auf diese Weise wurden unspezifische Bindungsstellen abgesättigt. Anschließend wurde das Blocking-Reagenz abgegossen, die Schnitte mit dem entsprechenden Erstantikörper bedeckt und über Nacht bei 4 °C in einer feuchten

Kammer inkubiert. Es folgten drei Waschschritte von je 20 min in 1x PBS, bevor der entsprechende Zweitantikörper auf die Schnitte aufgebracht wurde. Die Inkubationszeit umfasste 4 h bei RT in einer feuchten Kammer im Dunkeln. Im Anschluß wurde der Zweitantikörper abgegossen, die Schnitte 2x 10 min in 1x PBS gewaschen und unter Zugabe von Mowiol (+ DABCO) mit Deckgläsern luftblasenfrei versehen.

**Tab. 2.5** Verwendete Antikörper für die Immunhistochemie

Antikörper	Art	Verdünnung	Hersteller
MF20 (mouse Hybridoma)	Primär monoklonal	1:10	
AuroraB (rabbit)	Primär polyklonal	1:200	Abcam #ab2254
Goat-anti-mouse IgGAlexa 680	sekundär	1:1000	Invitrogen #A21065
Goat-anti-rabbit IgGAlexa488	sekundär	1:1000	Invitrogen #A11008

#### 2.8.1.1. Antikörper-Färbung von Zellen für die FACS-Analyse

Für die Durchflußzytometrie wurden die Zellen mit Trypsin vereinzelt, zweifach mit PBS gewaschen und in 4%PFA (Paraformaldehyd, Sigma #158127) in PBS 30 min bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurden die Zellen dreifach in Lösung 1 (0,1% Triton X-100 (Roth #3051.3)) in PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine 30 minütige Behandlung der Zellen mit Lösung 2 (0,1% Triton X-100, 1% BSA (Sigma #9048-46-8) in PBS), gefolgt von der Inkubation mit dem monoklonalen ersten Antikörper (MF 20 mouse Hybridoma-Überstand, 1:20 in PBS) für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Dieser wurde folgend durch dreimaliges Waschen von je 5 min in Lösung 2, und je zweimaliges Waschen (5 min) in Lösung 1 und PBS entfernt. Danach wurden die Zellen mit dem Alexa488-konjugierten Zweitantikörper (rabbit-anti-mouse-IgG, Invitrogen #A11059, 1:1000 in PBS) versehen und 45 min unter Lichtausschluss bei 4°C inkubiert. Der sekundäre Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und die Zellen für die Analyse in PBS aufgenommen.

### 2.8.2. Durchflußzytometrie (FACS-Analyse)

Die Durchflusszytometrie (FACS= fluorescence activated cell sorting) ist ein optisches Messverfahren zur Analyse von Partikeln, bzw. von Zellen in Suspension. Sie ermöglicht, eine große Anzahl von Zellen in kurzer Zeit zu untersuchen, wobei die Zellen einzeln an einer Lichtquelle in einem Flüssigkeitsstrom vorbeigeleitet werden. Dabei werden die Größe (basierend auf der Vorwärtsstreuung), die interne Komplexität (anhand der Seitwärtsstreuung des Lichts), sowie verschiedene potentielle Zelleigenschaften mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpern gleichzeitig gemessen. Durch geeignete Wahl und Zusammensetzung der einzelnen Marker mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen lassen sich so in einem Färbeansatz theoretisch mehrere Dutzend Subpopulationen unterscheiden.

Das in dieser Arbeit verwendete Gerät ist das Durchflußzytometer FACSCalibur ( Becton Dickinson, Heidelberg). Es wurde für die Bestimmung der „Reinheit“ der *in vitro* generierten Kardiomyozyten genutzt.

Im FACSCalibur kommt ein luftgekühlter Argon-Ionen-Laser mit einer genutzten Wellenlänge von 488 nm zum Einsatz. Der Laserstrahl trifft im rechten Winkel in der Photoküvette auf den Partikelstrom und wird an den Partikeln gestreut. Sammellinsen bündeln die in einem engen Winkel 1°-20° aufgefangene Vorwärtsstreuung (FSC) und die im 90°-Winkel registrierte Seitwärtsstreuung (SSC) sowie emittierte Fluoreszenzsignale. In der Durchflusszytometrie werden Fluoreszenzfarbstoffe zumeist in Form von an Antikörpern konjugierten Markern genutzt. Diese werden eingesetzt, um Zellstrukturen, Immunphänotypisierungen und intrazelluläre Ziele zu markieren. Als zu detektierender Fluoreszenzfarbstoffe wurde hier Alexa 488 verwendet, welcher durch den Argon-Ionenlaser durch eine Wellenlänge von 488nm angeregt wird und sein Emissionsmaximum bei 520 nm hat. Die Umfang analysierter Zellen betrug jeweils 30.000, bei einer maximalen Durchflußrate von maximal 500 Zellen/sec.

Mit Hilfe des Computerprogramms FACS Diva wurde die Auswertung vorgenommen. Durch Setzen von Grenzwerten (Markern) wird der Anteil positiver Partikel gegenüber der Gesamtzahl bzw. deren mittlere Fluoreszenzintensität „mean fluorescence intensity“ (MFI) gemessen. Die mittlere Fluoreszenzintensität ist dabei ein Maß für die Menge gebundenen Fluoreszenzfarbstoffes pro Partikel.

### 2.8.3. Affymetrix Gene Chip Expressionsanalyse

Für die mRNA Expressionsanalyse der Zellpopulationen ES, EB, CB, sowie Herz E8.5 und nCM, als auch die Identifikation von siRNA-Sequenzen in den Proben MS, OS, EB und CB wurde der Affymetrix Gene Chip mouse 430.2 verwendet. Dabei werden biotinylierte DNA-, oder RNA-Fragmente mit dem Chip hybridisiert und mit einem Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugat gefärbt. Die Einlesung der Signale erfolgt mit Hilfe des GeneArray Scanners®, wobei der Umfang des bei 570 nm emittierten Lichtes proportional zu der Menge der gebundenen Probe ist. Die Verarbeitung der primären Hybridisierungssignale aller Chips, sowie die Vergleichende Gegenüberstellung der mRNA-Expressionsanalysen-Ergebnisse oben genannter Proben wurde mit Hilfe der Software GCOS bewerkstelligt.

Alle Arbeitsschritte wurden den Angaben des Herstellers entsprechend durchgeführt.

Die mit Hilfe der Nested-PCR amplifizierten und biotinylierten, durch anschließende Exonuklease-Lambda behandelten einzelsträngigen siRNA-Zielsequenzen, wurden direkt für die Hybridisierung verwendet. Von ihnen wurden 10 µg von jeder Testpopulation eingesetzt.

## 2.9. Photodokumentation

Die Photodokumentation erfolgte mit Hilfe des Laser-Scan Mikroskopes (Leica) und der vom Hersteller gestellten Software. Für die Bildbearbeitung und Erstellung der Graphiken wurden die Programme Photoshop 7.0 und Power Point verwendet.

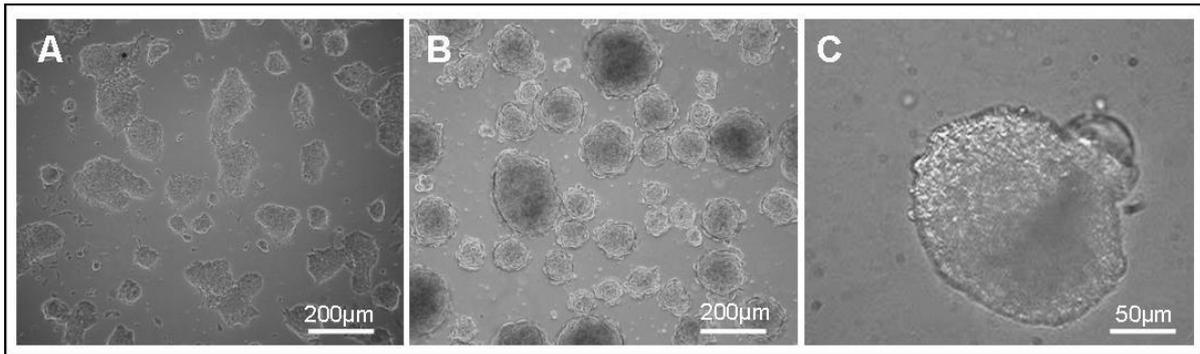
### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Charakterisierung der von embryonalen Stammzellen abgeleiteten Kardiomyozyten

##### 3.1.1. Die *in vitro* Generierung ESC-abgeleiteter Kardiomyozyten folgt einem spezifischen Muster und ist standardisierbar

Die für die Differenzierung verwendeten murinen embryonalen Stammzellen CM7/1 wurden während der Expansion stets als Reinkultur auf Gelatine-beschichteten Zellkulturschalen ohne „feeder cells“, meist mitotisch inaktivierten embryonalen Fibroblasten, gehalten. Infolgedessen wird bei der Initiation der Differenzierung in Einzelzellsuspension eine „Kontamination“ mit Fremdzellen ausgeschlossen und somit die Reproduzierbarkeit gewährleistet. Die ES-Zellen zeigten das für sie charakteristische klonale Wachstum, welches an der Ausbildung deutlich dreidimensionaler Zellverbände erkennbar war. Die äußeren Grenzen der meist oval oder rund geformten Zellklone waren klar definiert. In vereinzelten Fällen kam es zu eintretender Differenzierung der randständigen Zellen, welches an der Abflachung der Zellen und Ausbildung von Zellausläufern erkennbar war.

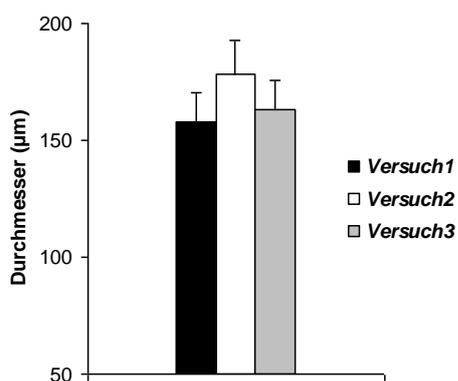
Die Differenzierung der ES-Zellen wurde durch die Kultivierung einer definierten Anzahl einzelner Zellen in Suspension unter horizontaler Rotation initiiert. Innerhalb der ersten zwei Tage bildeten sich kleine sphärische Zellaggregate annähernd gleichen Durchmessers, welche innerhalb der folgenden sieben Tage unter Zunahme der Zellzahl zu meist runden, oder ovalen embryoiden Körpern („Embryoid Bodies“; EBs) heranwuchsen. In vielen dieser reifenden EBs konnte die Ausbildung eines Hohlraums beobachtet werden. Nach acht bis neun Tagen Differenzierung kam es meist in der Marginalzone der EBs zu Gruppen spontan kontrahierender Zellen, in einigen Fällen bildete sich eine Art kugelförmiger Auswuchs solcher Zellen auf der Oberfläche des EBs.



**Abb. 3.1: Die Stadien der Differenzierung in Suspensionskultur**

Die drei Stadien der Differenzierung von ES-Zell abgeleiteten Kardiomyozyten. Die ES-Zellen wachsen in dreidimensionaler Form auf mit Gelatine beschichteten Zellkulturschalen. An der Marginalzone der Klone finden sich zum Teil differenzierende Zellen (A). Innerhalb von neun Tagen in Suspensionskultur bilden sich sphärische Zellaggregate, die EBs, welche an Größe und Zellzahl stetig zunehmen. Gezeigt ist eine heterogene Population von EBs verschiedener Reifestadien (B). Nach neuntägiger Selektion mit G418 bilden sich ebenfalls runde Körperchen, welche aus einer homogenen Population  $\alpha$ MHC-positiver und somit neomycin-resistenter Zellen bestehen (C).

Beginnend mit dem neunten Tag der Differenzierung wurde dem Medium G418 zugefügt, welches in der Anreicherung der Neomycin-resistenten Zellen, und demnach solcher mit aktiven  $\alpha$ MHC Promoter resultierte. Während der Selektionzeit von neun Tagen formten sich unter stetigem Zelltod nicht Neomycin-resistenter Zellen und gleichzeitiger Proliferation überlebender Neomycin-resistenter Zellen, spontan kontrahierende runde Zellaggregate, die kardialen Körperchen („Cardiac Bodies“; CBs). Nach vier bis fünf Tagen Selektion konnte kein weiteres Zellsterben mehr beobachtet werden. Die Zellen innerhalb eines CBs wiesen eine gleichförmige Kontraktion auf, deren Frequenz jedoch in Abhängigkeit der Temperatur teilweise unregelmäßig erschien. Die CBs erreichten nach neun Tagen Selektion eine durchschnittliche Größe von circa 165  $\mu$ m. Diese Größe variierte in drei unabhängig durchgeführten Differenzierungsansätzen nur marginal (Abb. 3.2).



**Abb. 3.2: Durchmesser der CBs nach Beendigung der Selektion**

Die Größe der CBs wurde an ihrem Durchmesser in  $\mu$ m nach neun Tagen Selektionsdruck gemessen. Die Werte wurden in drei unabhängigen Versuchsansätzen (Versuch1-3) mit ES-Zellen unterschiedlicher Passagen ermittelt. Es wurden jeweils 100 CBs/ Versuch vermessen und der Mittelwert, sowie die Standardabweichung berechnet. Die Vermessung der CBs in Versuch1 ergab einen Mittelwert von 158  $\mu$ m, in Versuch2 von 178  $\mu$ m und in Versuch3 von 163  $\mu$ m. Die Standardabweichung betrug für den Durchmesser der CBs in Versuch1 12,3 $\mu$ m, in Versuch2 14,7 $\mu$ m und in Versuch3 12,8 $\mu$ m.

### 3.1.2. *in vitro* generierte Kardiomyozyten zeigen Charakteristika neonataler Herzmuskelzellen

Neben der lichtmikroskopischen Beurteilung der differenzierenden Zellen ist die Analyse der Veränderungen auf transkriptioneller Ebene unerlässlich für einen Vergleich mit der *in vivo* stattfindenden Entwicklung von Herzmuskelzellen. Die Aktivität spezifischer Promotoren der kardiomyozytären Entwicklung und die Deaktivierung stammzellspezifischer Promotoren ermöglicht eine Bestimmung des Differenzierungsgrades der *in vitro* generierten Kardiomyozyten und gibt somit Aufschluss über das entwicklungsbiologische Zeitfenster in dessen Kontext die im weiteren Verlauf dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse einzuordnen sind.

Mit Hilfe von Affymetrix GeneChip® 3' Gene Expression Analysis Arrays des Typs „Mouse 430.2“ wurde das Transkriptom von ES-Zellen, EBs, CBs, plattierten CBs, murinem Herzen des embryonalen Entwicklungsstadiums E8,5 und murinen neonatalen Kardiomyozyten analysiert. In Tabelle 3.1 ist die Anzahl der durchgeführten Versuche, beziehungsweise der angefertigten Hybridisierungen zusammengefasst.

**Tab. 3.1: Anzahl der durchgeführten Affymetrix-basierenden Expressionsanalysen**

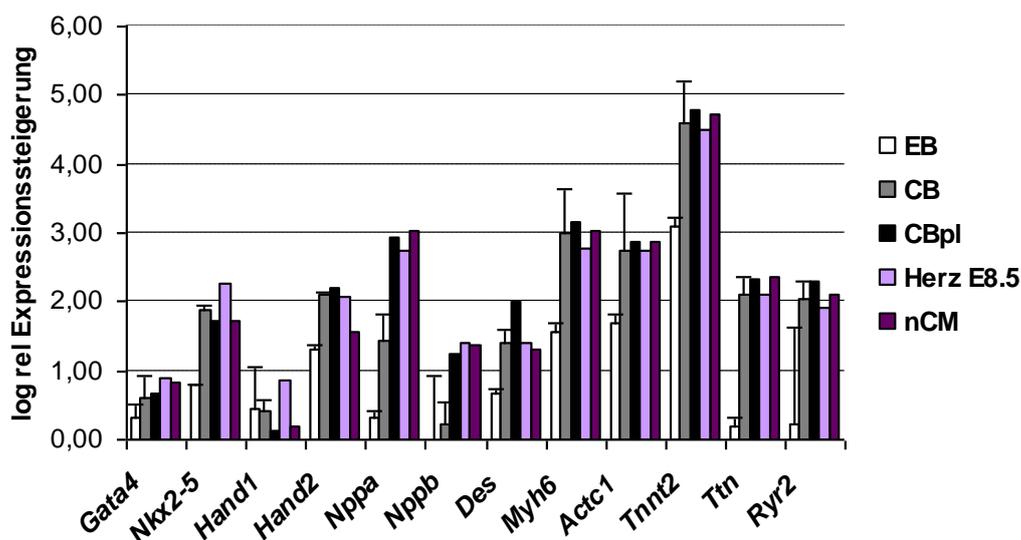
	ES	EB	CB	CB <sub>pl</sub>	Herz E8,5	nCM
<b>Anzahl Chips</b>	2	2	3	1	1	1

Die Verarbeitung der Ergebnisse wurde mit der Affymetrix GeneChip® Operating Software (GCOS) vorgenommen, welche zudem einen Vergleich der individuellen Messwerte durch Festlegung einer Bezugsbasis ermöglicht und eine unter Berücksichtigung statistischer Parameter qualitative, als auch quantitative Aussage über relative Veränderungen von Expressionsleveln zulässt.

Die Bezugspopulation bilden die ES-Zellen, von welcher ausgehend die relative Veränderung der Expression der Gene beurteilt und mit verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Differenzierungsstadien verglichen wurden.

Die ESC-abgeleiteten Kardiomyozyten zeigten eine deutlich gesteigerte Expression früher, sowie auch später kardiospezifischer Gene, welche sowohl Transkriptionsfaktoren, sarkomerische Proteine, Rezeptoren, als auch Ionenkanäle umfasst (Abb. 3.3). Die Expression der Transkriptionsfaktoren *Nkx2.5* und *GATA4* zeigte erwartungsgemäß bereits in den EBs eine Steigerung, welche im Laufe der weiteren Differenzierung zu CBs zunahm und mit der von embryonalen Herz E8.5 und neonatalen

CM vergleichbar war. Die basischen Helix-Loop-Helix (bHLH) Transkriptionsfaktoren *eHAND/HAND1* und *dHAND/HAND2* wiesen ebenfalls einen der *in vivo* Situation ähnlichen Expressionsverlauf auf. Beide Faktoren werden initial im lateralen Plattenmesoderm und präkardialen Mesoderm exprimiert und demnach bereits in den EBs detektiert. Im weiteren Verlauf der Kardiogenese beschränkt sich die Expression von *eHAND* im linearen Herzschlauch auf den anterioren und posterioren Bereich, dem späteren Konotrunkus und der Region, aus welcher sich der linke Ventrikel bildet. Im Gegensatz dazu wird *dHAND* im gesamten Herzschlauch und später im rechten Ventrikel exprimiert. Mit vollendeter Formation des Herzens nimmt die Expression beider Faktoren im Myokardium ab (Harvey und Rosenthal, 1999), welches sich in Abbildung 3.3 im Vergleich von Herz E8.5 und nCM widerspiegelt und analog bei den Populationen CB und CB<sub>pl</sub> im Falle von *eHAND*, nicht jedoch von *eHAND*, zu beobachten war.



**Abb. 3.3: Steigerung der Expression kardiospezifischer Gene während der *in vitro* Differenzierung**

Die relative Steigerung des Expressionslevels einer Auswahl kardiospezifisch exprimierter Gene während der *in vitro* Differenzierung wurde auf das Expressionsprofil der ES-Zell-Population bezogen. Die ermittelten Werte sind dekadisch logarithmiert dargestellt. Um die Vergleichbarkeit mit der *in vivo* Situation zu beurteilen, wurden analog die Expressionsprofile von murinen Herzen des embryonalen Stadiums E8.5 und murinen neonatalen Kardiomyozyten ermittelt. Alle untersuchten Gene zeigen einen deutlichen Anstieg auf transkriptioneller Ebene während der Differenzierung, welcher zudem eine deutliche Übereinstimmung der *in vitro* generierten CBs mit den *in vivo* Vergleichspopulationen aufweist. **EB**: Embryoid Body; **CB**: Cardiac Body; **CBpl**: ausplattierte Cardiac Bodies; **nCM**: neonatale Kardiomyozyten

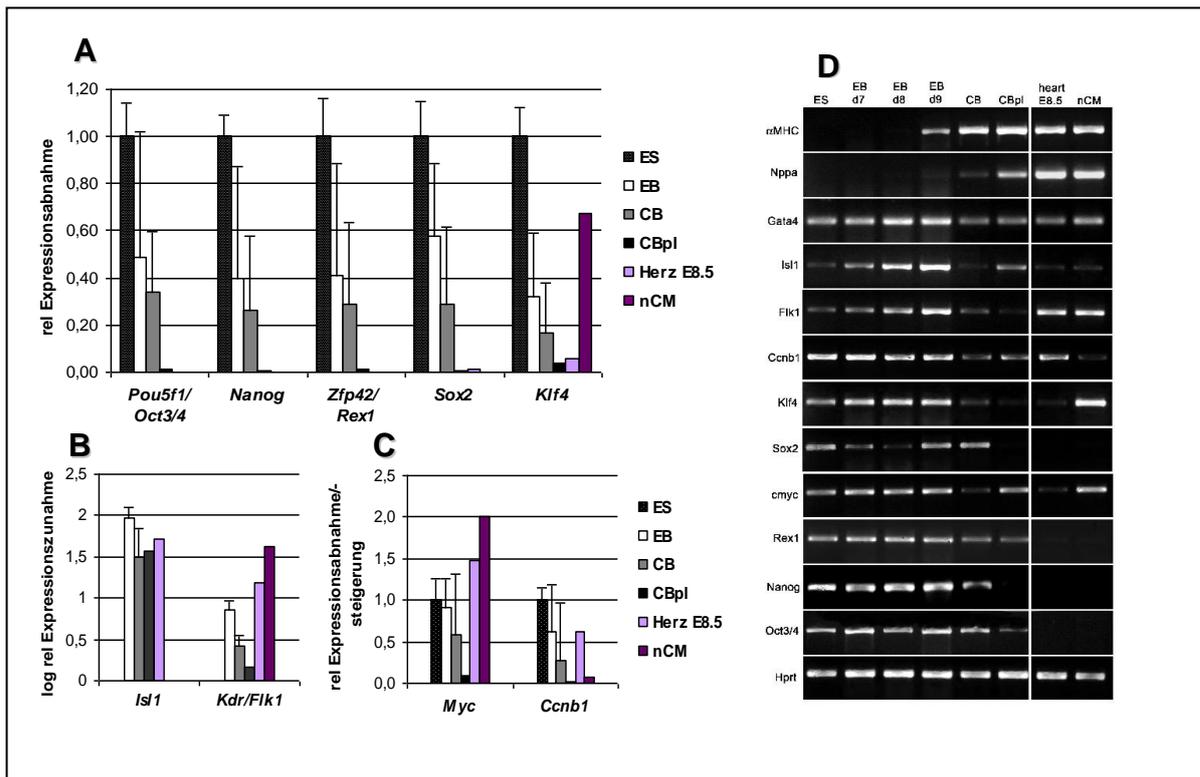
Die vergleichsweise spät exprimierten und häufig als Hypertrophiemarker genutzten Gene *Nppa* und *Nppb* zeigten einen deutlichen Anstieg in der Population CB<sub>pl</sub>, welcher in dem Ausmaß der Steigerung dem von Herz E8.5 und den nCM gleicht, während die CB-Population als unreifer einzustufen war. Die Strukturproteine *Des*, *Myh6*, *Actc1*, *Tnnt2* und *Ttn* weisen eine mit den *in vivo* Populationen analoge Steigerung der

Expression auf, wobei der Anstieg von *Myh6*, welches als Selektionsmarker fungiert, zusätzlich als Kontrolle dient. *Ryr2* ist ein  $\text{Ca}^{2+}$ - Ionenkanal des sarkoplasmatischen Retikulums im Herzen, dessen Expression in den *in vitro* generierten Kardiomyozyten ähnlich wie *in vivo* verlief.

Um den Differenzierungsgrad detaillierter zu erfassen und auch Übergangsstadien, beziehungsweise Vorläuferpopulationen identifizieren zu können, wurde das Expressionsverhalten stammzellspezifischer Marker wie *Oct3/4*, *Nanog*, *Rex1*, *Sox2* und *Klf4*, das der Marker kardialer Vorläuferpopulationen *Isl1* und *Flk1*, sowie der Proliferationsmarker *c-Myc* und *Ccnb* während der Differenzierungsstadien untersucht (Abb.3.4).

Die Expression oben genannter stammzellspezifischer Faktoren ist mit einer relativen Abnahme um circa 40 – 60% in dem Zeitraum der Differenzierung von ESCs bis zu CBs sehr deutlich. Überraschenderweise fand sie sich aber auch in der reiferen Population der ausplattierten CBs eine residuale Expression dieser Marker (Abb. 3.4 A, D). Die Analyse der *Isl1*-Expression zeigt eine deutliche Übereinstimmung der EBs und CBs, sowie  $\text{CB}_{\text{pl}}$  mit embryonalen Herzen am Tag 8.5, während die *Flk1*-Expression während der *in vitro* Differenzierung von EB zu CB/ $\text{CB}_{\text{pl}}$  deutlich abnahm (Abb. 3.4 B,D).

Anhand der *Ccnb1*-, sowie *cmyc*-Expression wird die Abnahme der Proliferationsfähigkeit während der *in vitro* Differenzierung deutlich. Diese ist im Fall von *Ccnb1* vollständig, bei *cmyc* entspricht sie dem Expressionslevel *in vivo*.



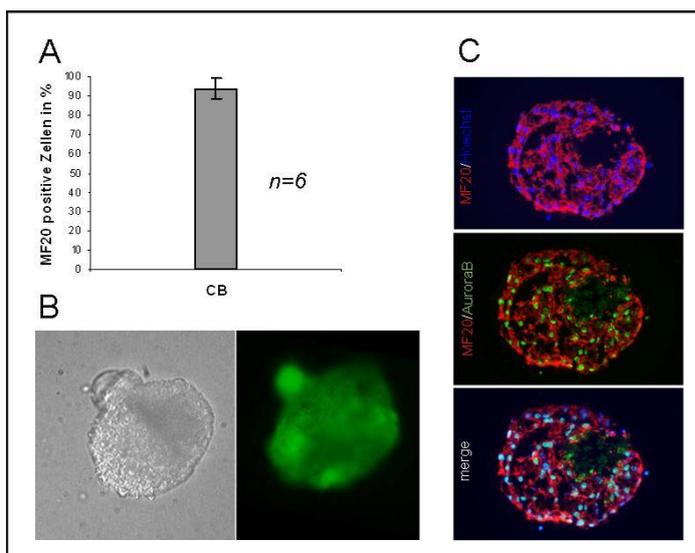
**Abb. 3.4 : Vergleichende Expressionsanalyse und Einordnung der Differenzierungsstadien**

Das relative Expressionsniveau der stammzelltypisch exprimierten Gene *Oct3/4*, *Nanog*, *Rex1*, *Sox2* und *Klf4* nimmt während der *in vitro* Differenzierung deutlich ab, ist aber weiterhin detektierbar. Die Expression von *Klf4* zeigt eine deutliche Steigerung von Herz E8.5 zu nCM (A). Die Expression von *Isl1* verläuft ähnlich zu der *in vivo* Situation, während die von *Flk1* deutlich abnimmt. Die nCM exprimieren mehr *Flk1* als die CM von Herzen an Tag 8.5. Die Expressionszunahme wurde relativ zu dem Expressionslevel von ESCs bestimmt und ist logarithmisch dargestellt (B). Die Expression der Gene *cmyc* und *ccnb1* nimmt während der *in vitro* Differenzierung ab. Der Vergleich zu Herz E 8.5 und nCM zeigt für *ccnb1* ein ähnliches Expressionsverhalten, während bei *cmyc* eine Steigerung von Herz E8.5 zu nCM zu beobachten ist (C). Die Ergebnisse der Affymetrix Gene Chip Analyse wurden für die in A-C gezeigten Gene mit Hilfe einer semiquantitativen RT-PCR bestätigt und zeigen zusätzlich die EB - Differenzierungsstadien nach 7 und 8 Tagen. Hier konnte konträr zu den Ergebnissen der Affymetrix Gene Chip Analyse für *cmyc* eine Expressionssteigerung von CB zu CB<sub>pl</sub> gezeigt werden, welche der von Herz E8.5 zu nCM beobachteten Steigerung entspricht. Die Expression von  $\alpha$ MHC konnte ab dem 8. Tag der Differenzierung detektiert werden und steigert sich deutlich während der Differenzierung. Das Expressionsprofil des häufig als Hypertrophiemarker genutzten *Nppa* verhält sich ähnlich, mit einer am Tag 8 erstmals detektierbaren Expression, welche sich im Verlauf der Differenzierung um ein vielfaches steigerte (D)

### 3.1.3. Die „Cardiac Bodies“ bestehen ausschließlich aus Kardiomyozyten

Ein für die Nutzung der ESC-abgeleiteten Kardiomyozyten essentielles Kriterium ist die Reinheit und Homogenität der generierten Zellpopulation, welches anhand der Transkriptomanalyse nicht zu beurteilen ist. Die Selektion der differenzierenden Herzmuskelzellen ist von der Aktivität des  $\alpha$ MHC Promoters abhängig und erfordert eine vollständige Eliminierung aller  $\alpha$ MHC-negativen Zellen innerhalb des reifenden EBs, beziehungsweise CBs. Da es sich bei der zu selektionierenden Population um multizelluläre Aggregate handelt, mußte eine Varianz zwischen Zentral- und

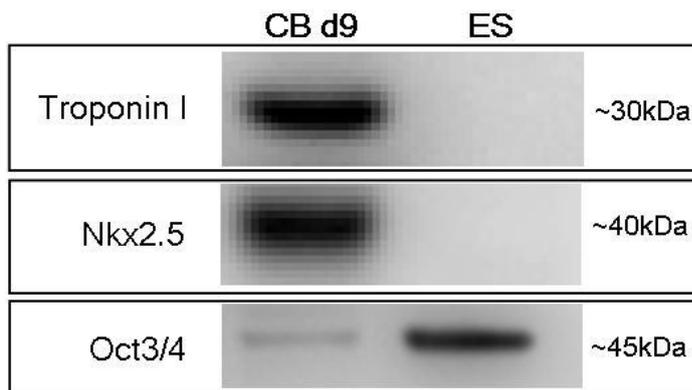
Marginalbereich ausgeschlossen werden. Für die Bestimmung der Reinheit der generierten Zellpopulation wurde die Expression von  $\alpha$ MHC mit Hilfe immunzytoso- sowie histochemischer Techniken analysiert. Die Anzahl der  $\alpha$ MHC-positiven Zellen wurde mit der FACS-Analyse bestimmt und betrug bei sechs unabhängig voneinander generierten Populationen im Mittel 94% mit einer Standardabweichung von etwa 5% (Abb. 3.5 A). Diesem Ergebnis entspricht eine homogene Distribution des mittels eines grün fluoreszierenden Sekundärantikörpers in Abb. 3.5B dargestellte  $\alpha$ MHCs in der Gesamtdarstellung der CBs. Dieses Resultat wurde zusätzlich durch die Beurteilung seriell angefertigter Schnitte der CBs bestätigt, welche die Expression von  $\alpha$ MHC in allen Zellen jeder Schnittebene zeigte und exemplarisch in Abb.3.5C dargestellt ist. Hier wurde zudem die Aktivität von AuroraB nachgewiesen, einem Zytokinesemarker der zur Beurteilung der Teilungsaktivität dient.



**Abb. 3.5 Bestimmung der Reinheit und Homogenität *in vitro* generierter Kardiomyozyten**

Mittels der FACS Analyse wurde die Anzahl  $\alpha$ MHC-positiver Zellen ermittelt, welche bei sechs unabhängig voneinander generierten Populationen im Mittel 93,9% mit einer Standardabweichung von 5,2% betrug (A). Die immunhistochemische Darstellung von  $\alpha$ MHC (grün) zeigt dessen Expression über alle Zellen des CBs (B). Die Anfertigung serieller Schnitte zeigt eine gleichmäßige  $\alpha$ MHC-Expression (rot) im Marginal-, sowie Kernbereich des CB über alle Schnittebenen. Zudem wurde AuroraB (grün) als Zytokinesemarker zur Beurteilung der Teilungsaktivität dargestellt. Die Zellkerne sind blau (C).

Zusätzlich zu  $\alpha$ MHC wurde die Expression von Nkx2.5 als frühes, und Troponin I als vergleichsweise spätes kardiales Markerprotein in der CB-Population mit Hilfe von Westernblots nachgewiesen. Von den jeweiligen Proben wurden äquivalente Gesamtproteinmengen eingesetzt. Des Weiteren wurde aufgrund der zwar stark verminderten, aber dennoch detektierbaren Expression von *Pou5f1* in den CBs dessen Anwesenheit auf Proteinebene ebenfalls im Westernblot untersucht und konnte hier schwach nachgewiesen werden (Abb. 3.6)



**Abb. 3.6 Westernblotanalyse kardialer, sowie stammzelltypisch exprimierter Proteine**

Der Nachweis der kardial exprimierten Proteine Troponin I und Nkx2.5 ist mit Hilfe der Westerblotanalyse in terminal differenzierten CBs nach neun Tagen Selektion mit G418 dargestellt. In der ES-Zell-Population ist erwartungsgemäß keiner der Marker nachweisbar. Das stammzelltypische Protein Oct3/4 ist in den CBs noch schwach detektierbar. Für den Blot wurden von den Vergleichsproben CB d9 und ES gleiche Proteinmengen eingesetzt.

### 3.2. Genomweite siRNA-vermittelte Gensuppression während der *in vitro* Differenzierung ESC-abgeleiteter Kardiomyozyten

#### 3.2.1. Die Komplexität der sh/siRNA Bibliothek wurde durch die Amplifikation nicht beeinträchtigt

Die kommerzielle shRNA Bibliothek wurde in Plasmidform bezogen und nochmalig amplifiziert. Es erfolgte eine Qualitätskontrolle der so erhaltenen Bibliothek mittels Gene Chip Analyse, um die Repräsentanz aller sh/siRNAs und somit die Komplexität der Bibliothek zu prüfen. Tatsächlich konnten siRNAs gegen 39897 ESTs nachgewiesen werden. Des Weiteren wurden die optimalen Bedingungen für die Generierung lentiviraler Partikel ermittelt (Daten nicht gezeigt).

#### 3.2.2. Die lentivirale Infektion interferiert nicht mit der Differenzierung

Die Komplexität der Bibliothek erforderte seitens des Modellsystems eine größtmögliche Stabilität und damit verbundene Reproduzierbarkeit. Dementsprechend mußte eine infektionsbedingte Veränderung der verschiedenen Stadien vor und während des Differenzierungsprozesses ausgeschlossen werden.

Die ESCs CM7/1 wurden in definierter Anzahl mit verschiedenen Titern des Kontrollvirus SIH-H1-copGFP, welcher keine shRNA-Sequenz kodiert, versehen. Die Infektionseffizienz wurde 36 Stunden später anhand der Anzahl grün fluoreszierender Zellen abgeschätzt. Zusätzlich wurden morphologische Veränderungen dokumentiert.

Die infizierten Zellen wurden mit Hilfe eines FACS Sortierers isoliert und erneut 48 Stunden kultiviert. Während dieser Zeit kam es zu keiner morphologischen Veränderung der infizierten ESCs im Vergleich zu den Kontrollzellen (Daten nicht gezeigt). Die Testpopulation wurde in gleicher Weise wie die Kontrollzellen differenziert. Sowohl die Morphologie, als auch die Anzahl der erhaltenen CBs wies keine Unterschiede auf.

Der Versuchsaufbau erforderte den Ausschluss von Mehrfachinfektionen, um funktionelle Kreuzreaktionen verschiedener siRNAs innerhalb einer Zelle zu vermeiden. Zu diesem Zweck wurden ESCs simultan mit vier verschiedenen siRNA-kodierenden Viruspartikeln mit einem MOI von 0,5 infiziert. Nach 36 Stunden wurden willkürlich 10 der grün fluoreszierenden Zellklone vereinzelt und für weitere 48 Stunden expandiert. Nach Isolation der genomischen DNA wurde mittels PCR der Bereich, welcher die sh/siRNA-Sequenz enthält amplifiziert und sequenziert. In den untersuchten Zellklonen wurde jeweils nur eine der vier möglichen siRNA-Sequenzen identifiziert, was beweist, dass unter der gewählten MOI Mehrfachinfektionen selten sind.

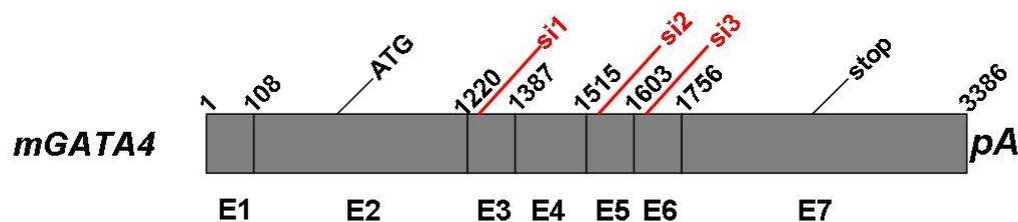
### 3.2.3. Inhibition der kardiomyozytären Differenzierung *in vitro* durch siRNA-vermittelte Suppression von *GATA4*

Die Verhinderung der Differenzierung von ESCs zu CBs durch siRNA-vermittelte Gensuppression bildet die Grundlage für den Screening-Ansatz und bedurfte einer internen funktionellen Kontrolle. Zu diesem Zweck wurden drei shRNA-kodierende Oligonukleotide generiert, welche sich gegen den Transkriptionsfaktor *GATA4* richten. In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass dessen Suppression die Bildung spontan kontrahierender kardialer Muskelzellen in differenzierenden embryonalen Karzinomzellen P19 verhindert (Grepin et al., 1995).

#### 3.2.3.1. Die Effizienz der gegen *GATA4* gerichteten siRNA-kodierenden Oligonukleotide variiert in Abhängigkeit der Zielregion und Sequenz

Für die effiziente Reduktion der Ziel-mRNA mussten verschiedene Kriterien bei dem Design der siRNA-kodierenden Oligonukleotide berücksichtigt werden (Brummelkamp et al., 2002; Schwarz et al., 2003). Diese Kriterien betreffen sowohl die Auswahl der Zielregion, als auch der Zielsequenz der siRNA-kodierenden Oligonukleotide auf der mRNA. Zudem müssen die Voraussetzungen für die Bildung von funktionellen siRNAs aus dem Transkript der siRNA-kodierenden Oligonukleotide erfüllt sein.

In Abb. 3.7 ist das murine *GATA4*-Transkript mit seinen Exon-Grenzen schematisch dargestellt. Diese Grenzen wurden mit Hilfe des Blast-Algorithmus durch den Sequenzvergleich des *GATA4*-Lokus und der *GATA4* mRNA ermittelt. Das *GATA4* Protein wird durch sieben Exons kodiert. Die jeweils 19 bp umfassenden *Gata4*-Zielsequenzen der siRNA-kodierenden Oligonukleotide sind rot gekennzeichnet und als si1, si2 und si3 bezeichnet. Die Sequenzen wurden mit Hilfe des BLAST-Algorithmus auf Sequenzhomologien innerhalb des Mausgenoms überprüft. Alle drei gewählten Sequenzen sind spezifisch für murines *Gata4*. Die genauen Zielregionen sind der Legende von Abb. 3.7 zu entnehmen.

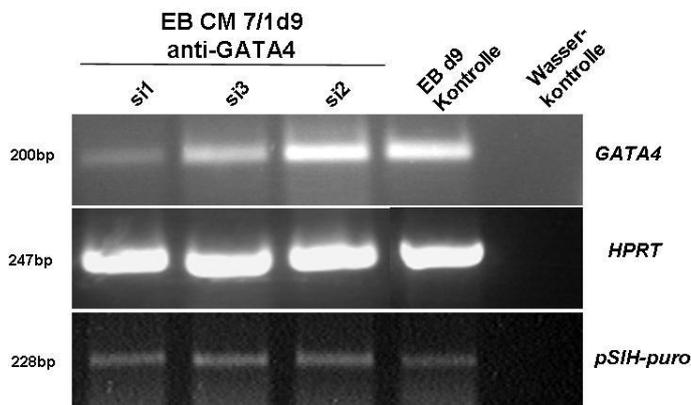


**Abb. 3.7 Schematische Darstellung des *GATA4*-Transkripts und Zielregion der siRNAs**

Das *GATA4*-Gen wird von 7 Exons kodiert, das Startcodon befindet sich im zweiten Exon, das Stoppcodon in Exon 7. Die Zielregion von si1 umfasst den Bereich von 1301-1319 nt im dritten Exon, si2 den Bereich von 1524-1542 nt in Exon 5 und si3 von 1800-1818 nt in Exon 6.

Für die Transfektion der ESCs wurde das gleiche lentivirale System verwendet, wie auch für den Screeningansatz. Die ESCs CM7/1 wurden mit den drei verschiedenen Viren si1, si2 und si3 mit einem MOI von 0,5 infiziert. Nach 48 Stunden wurde die positive Selektion der infizierten Zellen begonnen und für vier Tage, bis kein Zellsterben mehr beobachtet wurde, fortgeführt. Anschließend wurde die Differenzierung unter andauerndem Selektionsdruck mit Puromyzin initiiert. Während der Bildung und der Reifung der EBs konnten in allen drei Testpopulationen im Vergleich zur Kontrollpopulation keine Unterschiede in Anzahl und Morphologie festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Mit beginnender positiver Selektion der Kardiomyozyten wurde in der Testpopulationen si1 ein massives Zellsterben beobachtet, welches schließlich am fünften Tag der CB-Formation in einem nahezu vollständigen Zelltod resultierte. Die Testpopulation si3 zeigte ein verzögertes Auftreten spontaner Kontraktion, sowie eine leicht verringerte Größe der sich formenden CBs. In der Testpopulation si2 konnten keine Veränderungen im Vergleich zu der Kontrollpopulation beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Von jeder Testpopulation, sowie von der Kontrollpopulation wurde am neunten Tag der EB-Formation Total-RNA isoliert und die Expression von *GATA4*,

sowie die des primären Transkripts des viralen Transgens mit Hilfe einer semiquantitativen RT-PCR untersucht (Abb. 3.8)



**Abb. 3.8 siRNA-vermittelte Inhibition von *GATA4***

Die Reduktion der *GATA4* mRNA-level durch siRNA-vermittelte RNAi in einer semiquantitativen RT-PCR nachgewiesen. Der Abgleich der cDNA erfolgte anhand der Expression des *HPRT*-Gens. Im Vergleich zur EB-Kontrolle ist eine deutliche Reduktion des *Gata4*-levels durch si1 erkennbar, si3 zeigt eine geringere Reduktion und si2 zeigt keinen reduktiven Effekt. In allen Populationen konnte die Expression des alternativen Transkriptes pSIH-puro des lentiviralen Transgens nachgewiesen werden

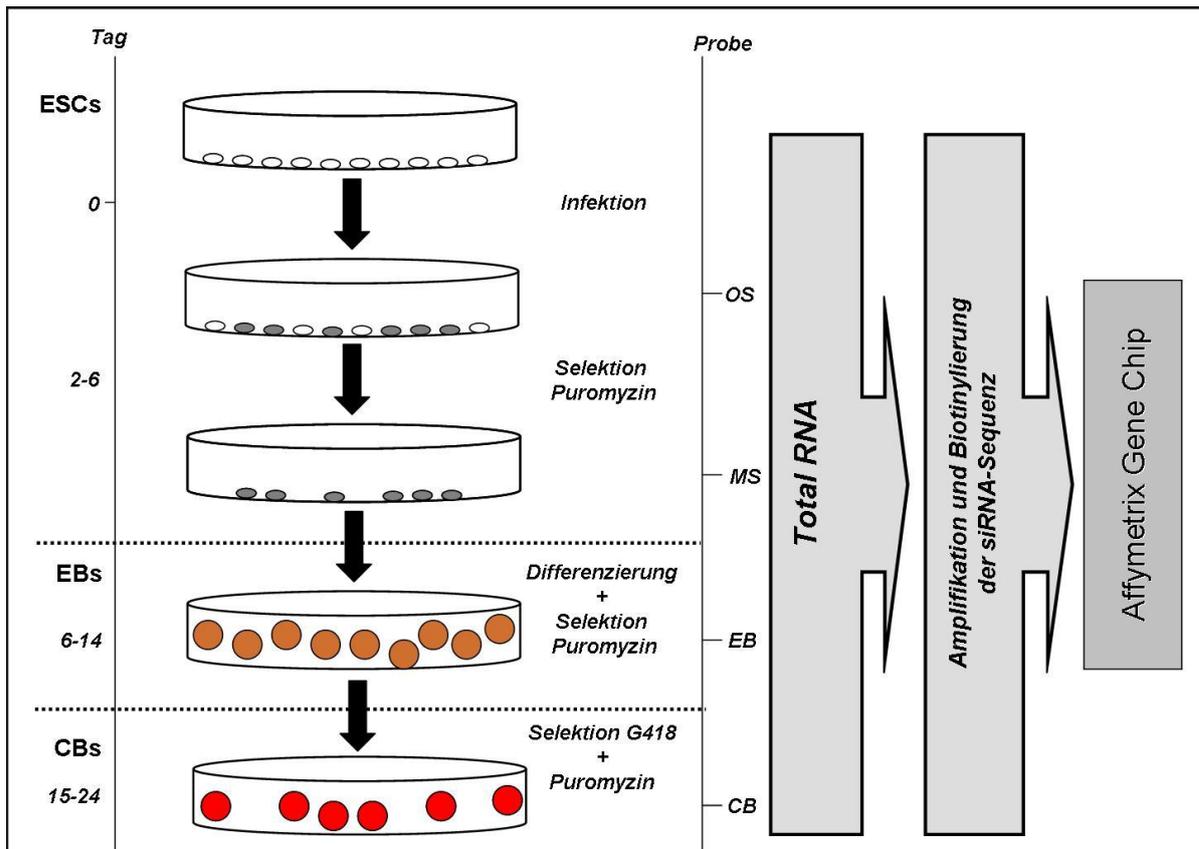
In den Testpopulationen si1, si2 und si3 ist die Expression des alternativen Transkripts deutlich und in der richtigen Größe nachweisbar. Die Expression von *GATA4* ist in der Testpopulation si1 im Vergleich zur Kontrolle deutlich verringert, während sie in der Population si3 eine leichte und in si2 keine sichtbare Suppression aufweist. In der EB-Kontrolle ist die Größe des Transkriptes durch das Fehlen der shRNA-kodierenden Sequenz verringert.

### 3.2.4. Identifikation kardioessentieller Gene im „batch-Verfahren“

Der prinzipielle Versuchsaufbau für die genomweite Identifikation essentieller Gene der frühen Kardiogenese durch den Einsatz einer lentiviralen sh/siRNA Bibliothek ist in Abb.3.9 schematisch dargestellt und wird im Folgenden erläutert. Die embryonalen Stammzellen CM7/1 wurden mit der lentiviralen sh/siRNA Bibliothek so infiziert, dass eine Infektionseffizienz von 40% (MOI 0,5) nicht überschritten wurde, um somit Doppel-, beziehungsweise Mehrfachinfektionen statistisch auszuschließen. Nach 48 Stunden wurde mit der positiven Selektion der infizierten Zellen durch den Einsatz von Puromycin begonnen. Nach einer Dauer von vier Tagen wurde, wie in den Vorversuchen ermittelt, kein Zellsterben mehr beobachtet, so dass die Differenzierung initiiert wurde. Alle resistenten und somit infizierten ESCs wurden vereinzelt und in definierter Anzahl für die Bildung von EBs eingesetzt. In gleicher Weise wurde mit den Kontrollzellen verfahren. Während der Differenzierungsphase von neun Tagen wurde der Selektionsdruck mit Puromycin in der Testpopulation weiterhin aufrecht erhalten, um

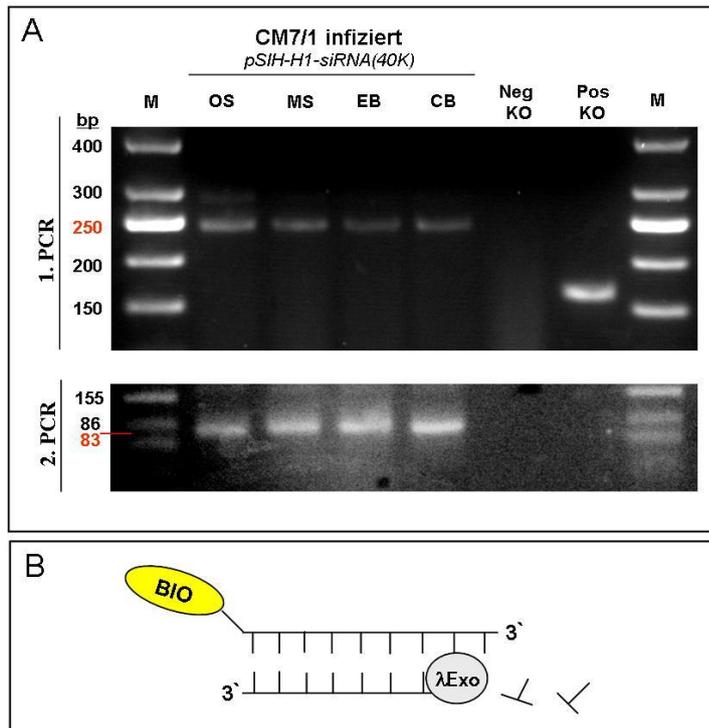
eine „Kontamination“ mit nicht infizierten Zellen auszuschließen. Am zehnten Tag der Differenzierung wurde durch Zugabe von G418/Neomycin eine neuntägige positive Selektion derjenigen Zellen, welche durch die Aktivität des  $\alpha$ MHC-Promoters resistent sind eingeleitet. Während des gesamten Versuchsablaufs wurden für die Kontroll-, sowie Testpopulationen gleiche Bedingungen gewährleistet, welche die verwendeten Medien, Reagenzien, Chargen der Kulturschalen, sowie den Inkubator beinhalten.

Während des Versuchsablaufs wurde zu vier Zeitpunkten aus den jeweiligen Teilpopulationen RNA gewonnen, welche als OS (ohne Selektion), MS (mit Selektion), EB (Embryoid Body) und CB (Cardiac Body) (Abb.3.9) bezeichnet sind. Für die reverse Transkription wurde ein für das alternative Transkript, welches die Sequenz der sh/siRNA-Expressions-cassette enthält, spezifischer Synthesepriemer verwendet, so dass die resultierende cDNA ausschließlich aus den Transkripten des lentiviralen Transgens besteht. Um den Bereich der shRNA-Sequenz, welcher komplementär zu den Affymetrix-Sonden ist, zu amplifizieren und zu biotinylieren, wurde eine Nested-PCR durchgeführt (Abb. 3.10). In der ersten PCR wurde ein 250 bp umfassendes Produkt amplifiziert, welches die Sequenz der gesamten „Haarnadel“ der shRNA umfasst. Dieses PCR-Produkt wurde für die zweite PCR verwendet, bei welcher die Sequenz des „antisense-Strangs“ der shRNA amplifiziert und durch die Verwendung eines 5'-modifizierten Primers biotinyliert wurde. Anschließend erfolgte die Eliminierung des nicht biotinylierten Stranges durch die Behandlung mit  $\lambda$ -Exonuklease. Das finale Produkt umfasst 83 nt, wovon 27 nt die siRNA-Sequenz stellen und äquivalent zu der üblicherweise für die Hybridisierung von Affymetrix Gene Chips verwendeten cRNA komplementär zu der entsprechende Sonde ist. Dieses Amplifikat wurde schließlich in einer definierten Menge von 10  $\mu$ g für die Hybridisierung mit dem Affymetrix Gene Chip Mouse 430.2 eingesetzt.



**Abb. 3.9 Schematische Darstellung des Versuchsablaufs**

Auf der linken Achse ist die Dauer des Testablaufs unter Beachtung der jeweiligen Differenzierungsstadien gezeigt. Der Tag der Infektion wird als Tag 0 bezeichnet. 48 Stunden nach der Infektion der ES-Zellen mit der lentiviralen shRNA Bibliothek wurde die Testpopulation **OS** (=ohne Selektion) entnommen und mit der positiven Selektion infizierter Zellen mittels Zugabe von Puromycin begonnen. Die Selektion der ES-Zellen erstreckte sich über weitere vier Tage, bis kein Zellsterben mehr beobachtet werden konnte. Nach dieser Zeit wurde die Testpopulation **MS** (=mit Selektion) entnommen und die Differenzierung der verbleibenden ES-Zellen in Suspensionskultur initiiert. Nach neuntägiger Differenzierung durch Formation und Reifung der EBs wurde eine weitere Testpopulation **EB** (=Embryoid Body) entnommen, die restlichen Zellen wurden folgend durch Zugabe von G418 positiv auf Kardiomyozyten selektioniert, welche nach weiteren neun Tagen der Differenzierung und Selektion in „reife“ CBs resultierten und die vierte Testpopulation **CB** (=Cardiac Body) darstellt. Während der gesamten Dauer der Differenzierung wurde der Selektionsdruck mit Puromycin aufrechterhalten. Von den vier entnommenen Populationen wurde die Total-RNA isoliert und spezifisch die cDNA des alternativen Transkriptes des lentiviralen Transgens synthetisiert. Mittels einer Nested-PCR wurden die in den Testpopulationen enthaltenen siRNA-Sequenzbereiche amplifiziert und biotinyliert. Nach Eliminierung des nicht biotinylierten Stranges des PCR-Produkts mit Hilfe von  $\lambda$ -Exonuklease wurde die Hybridisierung mit dem Affymetrix Gene Chip Mouse 430.2 vorgenommen.



### Abb. 3.10 Amplifikation und Biotinylierung der siRNA-Sequenzen

In der ersten PCR wird ein 250bp umfassendes Produkt, welches die siRNA-Expressions-cassette enthält im exponentiellen Bereich der Reaktion amplifiziert. Dieses Amplifikat bildet das Ausgangsprodukt der zweiten PCR, in welcher der 83bp umfassende Sequenzbereich der shRNA ebenfalls im exponentiellen Bereich amplifiziert und durch den Einsatz eines 5'-biotinylierten Primers zugleich biotinyliert wird. Als Negativkontrolle dient die cDNA nicht infizierter Zellen, als Positivkontrolle dient die cDNA der mit Kontrollvirus infizierten Zellen, welcher keine shRNA-Sequenz enthält und das Produkt dementsprechend eine Größe von circa 180bp aufweist (**A**). Der nicht biotinylierte Strang des finalen PCR- Produktes der Nested-PCR wird mit Hilfe von  $\lambda$ Exonuklease vom 5'-Ende eliminiert (**B**).

#### 3.2.4.1. Bestimmung der Anzahl der ES-Zellen zur Durchführung eines genomweiten siRNA Screens

Ein wichtiger Aspekt vor Beginn eines Versuchs dieser Komplexität war die sorgfältige Kalkulation der initial einzusetzenden Anzahl an ES-Zellen unter Beachtung aller relevanten Parameter und statistischer Anforderungen, um die größtmögliche Konsistenz der Ergebnisse zu gewährleisten. In diesem Kontext wurden folgende Parameter berücksichtigt:

##### Anteil des Zellverlustes durch positive Selektion der Kardiomyozyten und Probenentnahme

Bei der Differenzierung bildet sich aus einer ES-Zelle ein EB, aus welchem etwa 10 bis maximal 15% Kardiomyozyten hervorgehen (durchflußzytometrische Analyse, Daten nicht gezeigt). Dieser Verlust ist allerdings aufgrund gleichzeitiger Proliferation der Zellen vernachlässigbar. Doch ist die Anzahl der Proben und der Umfang der Probenentnahme, welcher der von Komplexität der Bibliothek abhängig ist, hier als Verlust während des Versuches zu berücksichtigen (Abb. 3.11).

### Anzahl infizierter Zellen unter Beachtung des geforderten MOI

Die Infektionseffizienz darf nicht höher als 40% sein, um eine MOI von 0,5 und somit die Wahrscheinlichkeit einer Einzelinfektion zu gewährleisten (Abb. 3.11; „Faktor MOI=0,5“).

### Komplexität der Bibliothek und statistische Gewährleistung vollständiger Repräsentanz

Die Bibliothek hat eine Komplexität von etwa 178.000 siRNAs. Um eine möglichst konstante Repräsentanz aller dieser siRNAs in dem Versuch zu erzielen und aufrechtzuerhalten, soll nach Empfehlung des Herstellers ein mindestens zehnfacher Umfang (Abb. 3.11; „statistischer Faktor“) der Komplexität, also mindestens  $1,8 \times 10^6$  infizierte Zellen für den Screen initial zugrunde gelegt werden.

Aufgrund der oben genannten Faktoren ergibt sich folgende Berechnung zur Kalkulation der initialen Zellzahl:

$$\begin{array}{ccccccc}
 \boxed{1,8 \times 10^5} & \times & \boxed{10} & \times & \boxed{4} & \times & \boxed{2,5} & = & \sim 2 \times 10^7 \\
 \downarrow & & \downarrow & & \downarrow & & \downarrow & & \\
 \text{Komplexität} & & \text{statistischer} & & \text{Anzahl der Proben} & & \text{Faktor MOI=0,5} & & \\
 \text{der Bibliothek} & & \text{Faktor} & & & & & & 
 \end{array}$$

**Abb. 3.11 Kalkulation des Versuchsumfangs**

Für die Kalkulation wurden die Komplexität der Bibliothek, dem statistischen Faktor (Repräsentanz), die Anzahl der Proben und die MOI gewichtet berücksichtigt.

### 3.2.5. Identifikation funktionell relevanter Kandidatengene der frühen Kardiomyogenese mit Hilfe eines komplexen bioinformatischer Algorithmus

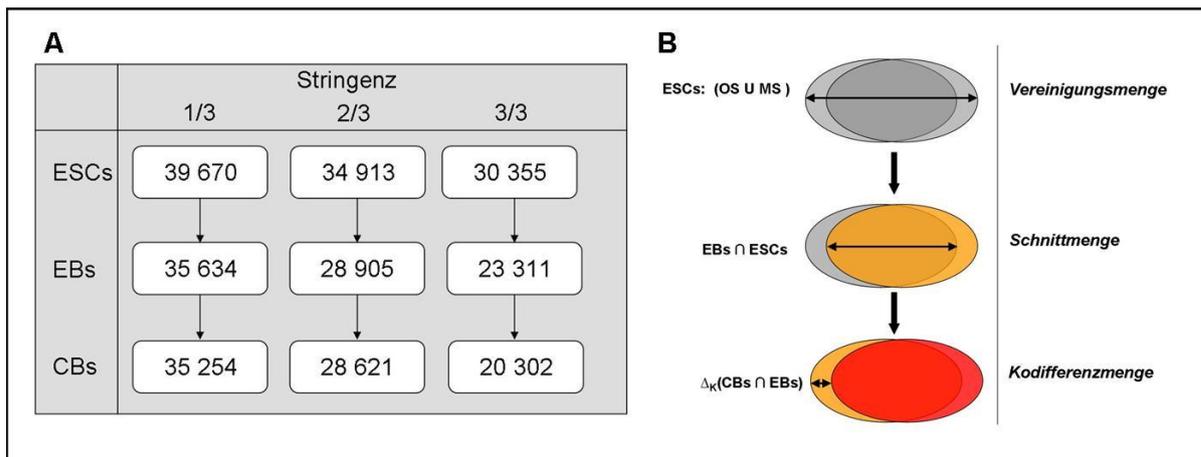
Die primären Hybridisierungssignale wurden mit Hilfe eines eigens dafür erstellten Programmes, welches im Rahmen einer Projektarbeit (Ludmilla Schulz) detailliert beschrieben wurde, ermittelt. Dabei wurden die Signale nach Festlegung eines empirisch ermittelten Schwellenwertes in die Kategorien „Anwesend“ (P = present) und „Abwesend“ (A = absent) eingeteilt. Die als anwesend ermittelten siRNA-Sequenzen wurden den entsprechenden Affymetrix-Gene IDs und somit den Zielgenen zugeordnet. Anschließend wurden die Triplikate jeder Population verglichen, deren Ergebnis in Abb. 3.12A dargestellt ist. Obwohl das Programm die unabhängige Verrechnung jeder Population ermöglicht, wurde hier vorerst die Vereinigungsmenge der ESC-Populationen

OS und MS von jeder Versuchsrunde gebildet, welche im Folgenden die Basispopulation erster Instanz für die weitere Auswertung darstellt.

Die Unterteilung der Gruppen bezieht sich auf die Häufigkeit der übereinstimmenden Affymetrix Gene IDs innerhalb der Triplikate einer Population und repräsentiert damit die Stringenz für die weitere Auswertung. So wurden 39670 Gene IDs in mindestens einer der drei Proben innerhalb der ESC-Population identifiziert, 34913 finden sich in mindestens zwei Proben, 30355 in allen drei Proben wieder. In gleicher Weise sind die Zahlen identifizierter Affymetrix Gene IDs für die Populationen der EBs und CBs angegeben.

Unter Beachtung der Häufigkeit des Vorkommens des identifizierten Zielgens, beziehungsweise der Affymetrix Gene IDs innerhalb der Triplikate jeder Testpopulation kann eine Aussage über die Varianz und dementsprechender Konsistenz der Ergebnisse getroffen werden. Die Spalten in Abb.3.12A zeigen die Anzahl der Affymetrix Gene IDs, welche mindestens einmal (1.Spalte), mindestens zweimal (2.Spalte) und in allen drei unabhängigen Versuchen (3.Spalte) identifiziert wurden. Der zeilenweise Vergleich zeigt, dass mit einem prozentualen Anteil von etwa 77% der in allen drei Versuchen identifizierten Gene IDs („3/3“), gemessen an den insgesamt auf ES-Zellebene („1/3“) identifizierten Gene IDs, eine hohe interne Stabilität herrscht, welche sich bei analoger Betrachtung der EBs auf 65% reduziert und bei den CBs noch 58% beträgt. Bei gleicher Betrachtung der „2/3“-Population nimmt der Anteil von 88% auf ES-Zellebene, auf 81% auf EB-Ebene, sowie auch 81% auf CB-Ebene ab.

Die „Unsicherheit“ jeder einzelnen für die Mengenbildung verwendeten Population mit der Stringenz „2/3“ wird im Falle von ESC und EB als Differenz der prozentualen Anteile der Populationen „2/3“ und „3/3“, im Falle von CB als Differenz der prozentualen Anteile der Populationen „2/3“ und „1/3“ an der Gesamtanzahl der in der entsprechenden Testpopulation identifizierten Gene definiert. So ergibt sich eine Unsicherheit von 11% auf ES-Zellebene (ESC), 16% auf EB-Ebene und 19% auf CB-Ebene. Der Unterschied in der Definition wird durch das Prinzip des „negativen Nachweises“ begründet. In den Basis-, beziehungsweise Referenzpopulationen ist die möglichst hohe Sicherheit einer Anwesenheit gefordert, während in der Vergleichspopulation CB die größtmögliche Sicherheit einer „Abwesenheit“ gewünscht ist.



**Abb. 3.12 Anzahl identifizierter Affymetrix Gene IDs und Schema der Ermittlung kardiogenetisch essentieller Gene**

In jeder Testpopulation wird unter Beachtung der Identifikationshäufigkeit in drei unabhängigen Versuchsabläufen die Anzahl identifizierter Affymetrix Gene IDs bestimmt, welches hier als Stringenz bezeichnet wird. Durch Vereinigung der Testpopulationen **OS** und **MS** ergibt sich hier eine als Basispopulation für weitere Verrechnungen fungierende Population von ESCs. Die Anzahl der Gene IDs, welche mindestens ein Mal identifiziert wurden beträgt in den ESCs 39670 und reduziert sich unter gleichen Stringenzkriterien in den EBs auf 35634 und in den CBs schließlich auf 35254. Unter der Forderung, die entsprechende Gene ID mindestens zwei Mal identifiziert zu haben erniedrigt sich die Anzahl auf 34913 in den ESCs, in den EBs auf 28905 und in den **CBs** auf 28621. Die letzte Spalte zeigt die Anzahl der Gene IDs welche in allen drei Versuchen identifiziert wurden (**A**). Dargestellt ist das Schema der weiteren Datenverarbeitung zwecks Ermittlung kardiogenetisch essentieller Faktoren. Die Vereinigung der Testpopulationen **OS** und **MS** resultiert in der Formation einer Vereinigungsmenge, welche als Basispopulation erster Instanz für die weitere Auswertung fungiert und als ESCs bezeichnet wird. Mit dieser Vereinigungsmenge und der Population der **EBs** wird folgend eine Schnittmenge erstellt, welche wiederum als Basismenge zweiter Instanz fungiert und nur diejenigen Gene IDs enthält, welche in beiden Populationen unter Beachtung der geforderten Stringenz innerhalb jeder Testpopulation (siehe **A**) vorhanden ist. Diese Basismenge zweiter Instanz dient der Bestimmung der Kodifferenzmenge mit der Population der CBs, welche diejenigen Gene IDs enthält, die in der Population der ESCs und EBs vorhanden waren, nicht aber in der Population der CBs und somit die Menge der kardiogenetisch essentiellen Gene darstellt (**B**).

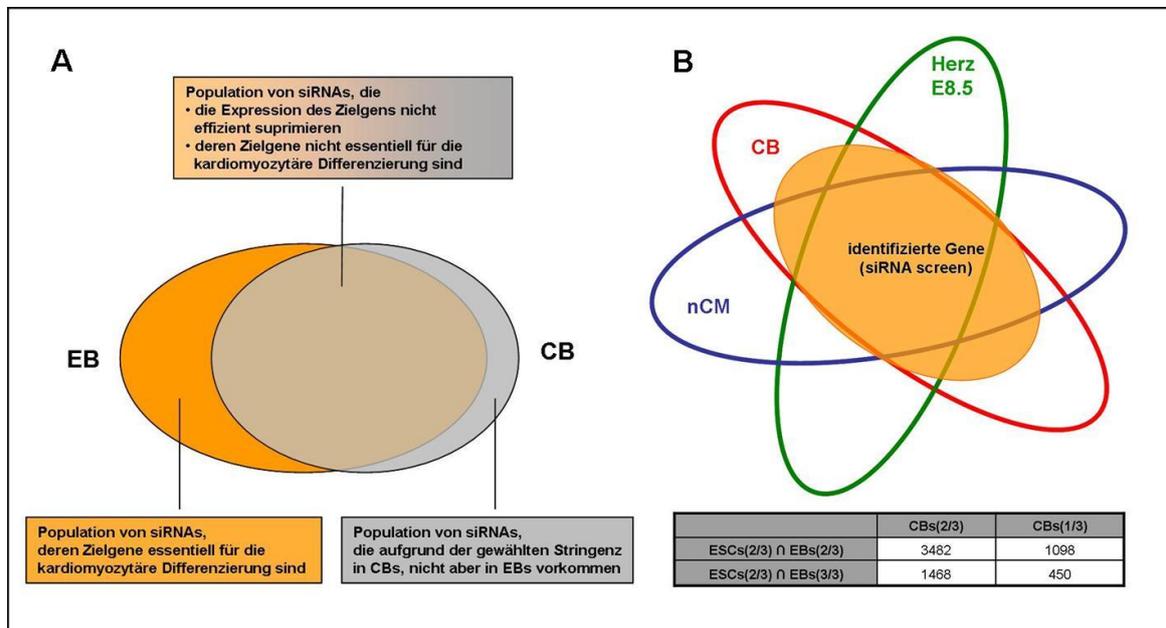
Für die Identifikation derjenigen Gene, welche für die kardiomyozytäre Differenzierung essentiell sind, waren mehrere stochastische Verrechnungsschritte nötig, welche in Abb. 3.12 B schematisch dargestellt sind. Zuerst wurde die Vereinigungsmenge der Populationen OS und MS ermittelt. Dadurch wurde eine weitestgehend stabile Grundgesamtheit der auf ES-Zell-Ebene vorhandenen siRNAs, beziehungsweise deren Zielgenen geschaffen. Diese wurde als Bezugsbasis erster Instanz genutzt. Diese Vereinigungsmenge „ESC“ wurde folgend für die Bildung einer Schnittmenge mit der Population EB verwendet. Innerhalb dieser Schnittmenge befinden sich diejenigen siRNAs, welche über den bisherigen Versuchsablauf unabhängig des Differenzierungsstadiums, der entsprechend stattfindenden Prozesse und schließlich auch der dabei entstandenen Zelltypen stabil nachgewiesen werden konnten. Folglich waren sie bis zu diesem Zeitpunkt entweder nicht essentiell oder funktionell nicht effizient. Diese Menge bildet die Bezugsbasis zweiter Instanz für die Ermittlung der

Kodifferenzmenge ( $\Delta_K(\text{CBs} \cap \text{EBs})$ ) mit der Population CB (Abb. 3.12B). Diese Kodifferenzmenge enthält die siRNAs, welche die kardiomyozytäre Differenzierung vom Stadium des EB zum CB unterdrückt haben und somit in der CB Population nicht mehr vorhanden sind (Abb.3.13A). Die in der Schnittmenge befindlichen Zielgene der siRNAs erfüllen keine essentielle Funktion in der kardiomyozytären Differenzierung, oder die entsprechende siRNA hat zu keiner, beziehungsweise zu einer nur unzureichenden Suppression des Gens geführt. Die Differenzmenge umfasst eine auf die Stringenz der für die Mengenbildung gewählten Populationen zurückzuführende, und somit variable Anzahl von Genen. Das für die Mengenbildung gewählte Kriterium der Stringenz jeder Population ist von entscheidender Bedeutung und führt zu einer unterschiedlichen Anzahl identifizierter Gene (Abb.13B). Für die ESCs, welche die Bezugspopulation für die erste Instanz der Mengenbildung darstellt, wurden die Gen IDs, welche in mindestens 2/3 Proben vorkamen gewählt und umfassen 34913 Gen IDs (Abb. 3.13). Von dieser Population wurde eine Schnittmenge mit den EBs mittlerer Stringenz „2/3“, sowie hoher Stringenz „3/3“ ermittelt. Jede dieser Mengen wurde anschließend mit den CBs mittlerer Stringenz „2/3“ und CBs niedriger Stringenz „1/3“ geschnitten und deren Kodifferenzmengen ermittelt. Die so identifizierten Zielgene der siRNAs wurden nachfolgend mit den Expressionsdaten der CBs abgeglichen, um die Konsistenz und Plausibilität der ermittelten Ergebnisse abzuschätzen. Es erfolgte zudem ein Abgleich der im Screen identifizierten Zielgene der siRNAs mit dem Expressionsprofil von Herz E8,5 und nCM, um einen direkten Bezug zu den *in vivo* Bedingungen herzustellen, (Abb.3.13B). Die Anzahl der dabei ermittelten Gen IDs ist in Abb. 3.13 B aufgeführt und beträgt unter moderaten Stringenzkriterien 3482/3476<sup>1</sup>. Diese Anzahl ergibt sich aus der Forderung, dass die Gen IDs der Basispopulation der zweiten Instanz (EBs) in mindestens zwei von drei, die in der Kodifferenz der Vergleichspopulation (CBs) in maximal ein von drei Testdurchläufen vorhanden sind. Wird die gleiche Basispopulation zugrundegelegt unter der Forderung, dass das Zielgen in der Kodifferenz der CB-Population in keiner der drei Testläufe nachgewiesen wurde, so ergibt sich eine Anzahl von 1098 Gen IDs. Die Veränderung des Stringenzkriteriums bei der EB-Population von 2/3 auf 3/3 fordert den Nachweis der Gen IDs in allen drei Testdurchläufen. Die sich

---

<sup>1</sup> Nach dem neuesten Abgleich konnten 6 der Sonden nicht mehr mit Sicherheit einem Gen zugeordnet werden.

dabei ergebenden Kodifferenzmengen umfassen 1468, beziehungsweise 450 Gen IDs. Die identifizierten Gene der für die weitere Auswertung verwendeten Population  $\Delta_K[(\text{ESCs}(2/3) \cap \text{EB}(2/3)) \cap \text{CB}(2/3)]$  ist dem Anhang zu entnehmen.



**Abb. 3.13 Bedeutung der gebildeten Mengen und Synchronisation der identifizierten Gene mit Transkriptomen.** Die Schnittmenge (grau-orange) der EB Population und der CB Population enthält diejenigen siRNAs, welche entweder keine ausreichende Suppression des Zielgens bewirkt haben, oder deren Zielgene keine essentielle Funktion während der kardiomyozytären Differenzierung ausüben. Die Differenzmenge (grau) umfasst die siRNAs, welche in der CB, nicht aber in der EB Population präsent sind und deren Umfang von den jeweilig gewählten Stringenzkriterien der Einzelpopulationen abhängig ist. Die Kodifferenzmenge (orange) beinhaltet die siRNAs, die in der EB, nicht aber in der CB Population identifiziert wurden und deren Zielgene folglich eine wichtige Funktion in der Differenzierung und Gewährleistung von Vitalität erfüllen (A). Die Synchronisation der identifizierten Gene mit dem Transkriptom von CB dient der Plausibilitätskontrolle und soll sicherstellen, dass alle gefundenen Gene auch exprimiert werden. Der Abgleich mit dem Expressionsprofil von murinem Herz E8.5 und nCM soll den Bezug zu der *in vivo* Situation herstellen. Der Umfang der hier nach Synchronisation mit den Transkriptomen ermittelten Gruppen ist von der geforderten Stringenz der bei der Datenverarbeitung eingesetzten Populationen abhängig und beträgt bei „moderater“ Stringenz  $\Delta_K[(\text{ESCs}(2/3) \cap \text{EBs}(2/3)) \cap \text{CB}(2/3)]$  3482. Die Erhöhung der Stringenz der Basispopulation zweiter Instanz  $\Delta_K[(\text{ESCs}(2/3) \cap \text{EBs}(3/3)) \cap \text{CB}(2/3)]$  verringert die Anzahl identifizierter Gene auf 1468. Die Forderung, dass die in der Kodifferenzmenge vorhandenen siRNAs, beziehungsweise deren Zielgene in keiner der drei unabhängigen Versuchsabläufe in der CB Population identifiziert wurden, reduziert die Anzahl bei  $\Delta_K[(\text{ESCs}(2/3) \cap \text{EBs}(2/3)) \cap \text{CB}(1/3)]$  auf 1098 und bei  $\Delta_K[(\text{ESCs}(2/3) \cap \text{EBs}(3/3)) \cap \text{CB}(1/3)]$  auf 450 (B).

### 3.3. Der Screen zeigt eine hohe Repräsentanz bekannter kardiogenetisch essentieller Faktoren verschiedenster Proteinklassen und beteiligter Prozesse

Um die Konsistenz und Plausibilität der im Screen ermittelten, putativ kardiomyogenetisch essentiellen Gene zu testen, wurde eine Auswahl von Faktoren zusammengestellt, welche im Kontext der Herzentwicklung bereits als notwendig

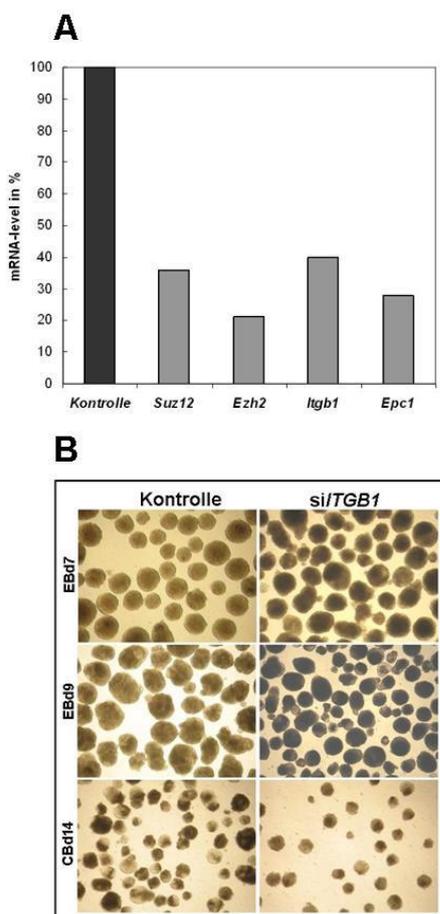
identifiziert und beschrieben wurden. Diese wurden mit den im Screen ermittelten Genen verknüpft. Hier wurde die Forderung  $\Delta_K[(\text{ESCs}(2/3) \cap \text{EB}(2/3)) \cap \text{CB}(2/3)]$  zugrunde gelegt, um möglichst wenig Datenverlust bei einer geringen Fehlerrate durch falsch positiv bewertete Kandidatengene zu erhalten. Faktoren, für die bereits eine Funktion während der Herzentwicklung gezeigt werden konnte, fanden sich tatsächlich in den Resultaten des Screens wieder. Für diese Gene wird in der Spalte „siRNA“ die entsprechende Anzahl als effizient ermittelter siRNAs angegeben. Einige der erwarteten Kandidaten wurden in dem Screen nicht identifiziert, welches für die in Tab. 3.2 aufgelisteten und gelb unterlegten Gene revers zurückverfolgt wurde. Zu diesem Zweck wurde die Präsenz der siRNAs gegen das entsprechende Gen individuell in allen Populationen, sowie unter Beachtung der zugrundeliegenden Stringenz untersucht. Dabei konnten vier mögliche Ursachen für das Fehlen des jeweils betrachteten Gens ermittelt werden. Zum Einen waren keine siRNAs gegen das entsprechende Zielgen in der amplifizierten Plasmidbank vorhanden (Spalte siRNA: „*nicht präsent*“) oder sie wurden in einer der Basispopulationen ESCs und EB, oder auch in beiden unter Beachtung der geforderten Stringenz nicht berücksichtigt (Spalte siRNA: „*Stringenz*“). Eine weitere entscheidende Ursache liegt in der Wahl des betrachteten Zeitfensters des Differenzierungsvorganges. Hier wurden diejenigen Gene fokussiert, welche eine essentielle Funktion während des Vorganges der positiven Selektion der Kardiomyozyten und gleichzeitig progressiver Differenzierung vom EB zum „reifen“ CB erfüllen. Die Bildung der EBs, sowie deren weitere Entwicklung erfordert allerdings ebenfalls die Aktivität einiger kardiogenetisch essentieller Faktoren, so dass diese bereits während der Differenzierung von EBs aus ESCs „weggefallen“ sind. Zu diesem Zweck ist in Tab. 3.2 das entsprechende Stadium des „Wegfalls“ angegeben, wobei „EB“ die Differenzierung von der ES-Zelle zum EB unter der geforderten Stringenz  $\Delta_K(\text{ESCs}(2/3) \cap \text{EB}(1/3))$  bedeutet. Zudem entscheidet die Effizienz der betrachteten siRNA über die Identifikation des Zielgens in dem Screen (Spalte siRNAs: „*nicht effizient*“).

**Tab. 3.2 Repräsentanz bekannter kardiogenetisch essentieller Faktoren bei den im Screen funktionell ermittelten Kandidatengen.** Die gelb unterlegten Gene konnten in dem Screen aus verschiedenen Gründen nicht identifiziert werden

Protein	Name	siRNA	Stadium	Referenz
<b>Signalmoleküle/ Rezeptoren</b>				
Fgf8	fibroblast growth factor 8	Stringenz		(Ilagan et al., 2006)
Bmp4	bone morphogenetic protein 4	nicht präsent		(Winnier et al., 1995)
Wnt11	wingless related MMTV integration site 11	Stringenz		(Nagy et al., 2009)
Itgb1	integrin beta	2	EB	(Fassler et al., 1996)
Tgfb2	transforming growth factor, beta, receptor II	1	CB	(Jiao et al., 2006)
Dll	delta-like 1	1	CB	(Przemeck et al., 2003)
<b>Zelladhäsions- moleküle</b>				
Vcam1	vascular cell adhesion molecule	2	EB	(Kwee et al., 1995)
Alcam	activated leucocyte cell adhesion molecule	1	CB	(Gessert et al., 2008)
<b>Zytoskeletale/ Sarkomerische Proteine</b>				
Des	desmin	3	CB	(Milner et al., 1996)
Vcl	vinculin	1	CB	(Zemljic-Harpf et al., 2007)
Ttn	titin	2	CB	(Gerull et al., 2002)
Myh6	myosin, heavy chain 6, cardiac muscle, alpha	1	CB	(Ching et al., 2005)
Myh7	myosin, heavy polypeptide 7, cardiac muscle, beta	1	CB	(Kaneda et al., 2008)
<b>Ionenkanäle</b>				
Scn5a	sodium channel, voltage gated, type V, alpha	1	CB	(Papadatos et al., 2002)
Ryr2	ryanodine receptor 2	1	CB	(Takeshima et al., 1998)
<b>Transkriptions- faktoren</b>				
GATA4	GATA binding protein 4	1	CB	(Molkentin et al., 1997)
Mef2c	myocyte enhancer factor 2c	1	CB	(Lin et al., 1997)
Hand1	heart and neural crest derivatives expressed 1	1	EB	(Riley et al., 1998)
Hand2	heart and neural crest derivatives expressed 2	1	CB	(Srivastava et al., 1997)
Nrf2f2/COUP-TFII	nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2	1	CB	(Pereira et al., 1999)
Nkx2.5	Nk2 transcription factor related, locus5	nicht präsent		(Lyons et al., 1995)
Tbx5	T-Box5	nicht effizient		(Bruneau et al., 2001)
Tbx20	T-Box20	1	EB	(Singh et al., 2005)

### 3.4. Interferenz identifizierter individueller siRNAs mit der kardiomyozytären Differenzierung *in vitro*

Einige der im Screen identifizierten siRNAs wurden im Einzelansatz getestet. Dafür wurden die Zielsequenzen der funktionell identifizierten siRNAs für die Herstellung von shRNA-kodierenden Inserts verwendet und in den lentiviralen sh/siRNA Expressionsvektor pSIH-H1-Puro kloniert. Nach Generierung der lentiviralen Partikel wurden die ES-Zellen CM7/1 äquivalent zu den Bedingungen im Screen infiziert und nach positiver Selektion transduzierter Zellen differenziert. Die Reduktion des mRNA-levels der betrachteten Gene wurde mittels semiquantitativer RT-PCR in neun Tage differenzierten EBs bestimmt. Die Signalintensitäten der PCR-Produkte der *HPRT*-, sowie Kandidatengen-PCR wurden densitometrisch gemessen und das Verhältnis von Signal/ *HPRT*-Signal errechnet. Diese Werte wurden mit denen der Kontrollen verrechnet und als relatives mRNA-level in Abb.3.14A dargestellt. Die deutlichste Suppression wurde bei *Ezh2* erzielt, gefolgt von *Epc1*, *Suz12* und *Itgb1*. In allen Fällen konnte eine siRNA-vermittelte Reduktion des mRNA-levels um mindestens 60% bewirkt werden (Abb. 3.14A).



**Abb.3.14 Die individuellen siRNAs supprimieren erfolgreich die Aktivität des Zielgens und interferieren mit der Differenzierung.**

Nach neun Tagen wurde der mRNA-Gehalt der Zielgene in % in differenzierten EBs mit der Kontrolle verglichen. Die Reduktion wurde mit Hilfe einer semiquantitativen RT-PCR ermittelt, bei welcher die Signalintensitäten der gelelektrophoretisch aufgetrennten Banden bestimmt und mit den entsprechenden *HPRT*-Signalen und schließlich mit den Kontrollen ins Verhältnis gesetzt wurden. Die siRNAs bewirkten in allen Testpopulationen eine Reduktion des mRNA-levels um mindestens 60%. So wurden folgende relative mRNA-level bestimmt: *Suz12* 36%, *Ezh2* 21%, *Itgb1* 40%, *Epc1* 28% (A). Die Suppression von *Itgb1* hat keinen Einfluß auf die EB-Formation, im Vergleich zu der Kontrolle sind am siebten Tag der Differenzierung keine Veränderungen sichtbar, nach neun Tagen sind in der siITGB1-Population vermehrt kleine Zellaggregate sichtbar, welche mit progressiver Selektion von Kardiomyozyten sterben und einen Verlust der Kontraktilität aufweisen (B).

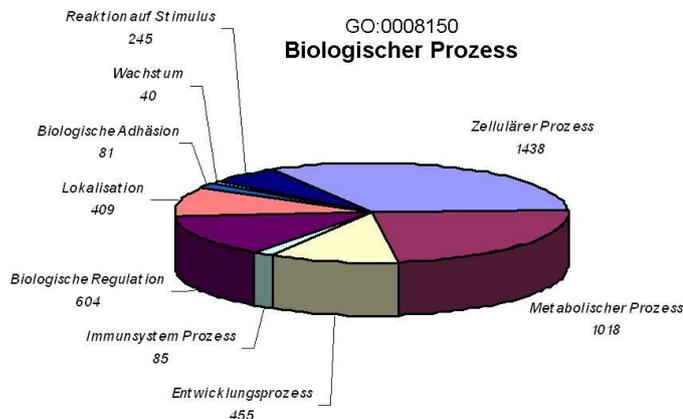
Des Weiteren konnte die kardiomyozytäre Differenzierung durch Reduktion des mRNA-levels von *Ezh2* und *Itgb1* im Einzelansatz verhindert werden. Trotz initial vorhandener CBs mit beginnender Selektion, kam es in beiden Fällen zu einem Zellsterben vor Beendigung der Generierung *in vitro* differenzierter Kardiomyozyten (Abb. 3.14B). Die Suppression von *Itgb1* bewirkte zudem einen Verlust spontaner Kontraktion am vierten Tag der Selektion. Die Unterdrückung der Aktivität von *Suz12* führte zu einer Population weniger auffällig kleiner, aber dennoch kontrahierender CBs mit Beendigung der Differenzierung. Die siRNA-vermittelte Reduktion von *Epc1* hatte keine Veränderungen des Differenzierungsverhaltens, der Größe und des Auftretens spontaner Kontraktionen der CBs zur Folge.

### 3.5. Isolation und Identifikation angereicherter Knotenpunkte durch Annotationsverknüpfung nach GO (Gene Ontology)

Für die Erstellung eines funktionellen Profils der kardiomyozytären Differenzierung wurde eine Klassifikation der identifizierten Gene anhand ihrer Einordnung nach GO (Gene Ontology) Annotationen vorgenommen. Diese ordnet die Genprodukte dem entsprechenden biologischen Prozess, der zellulären Komponente, sowie ihrer molekularen Funktion Spezies-unabhängig zu. Diese drei Hauptontologien gliedern sich in eine Vielzahl verzweigter Subontologien, welche die Identität des betrachteten Genproduktes den verfügbaren Informationen entsprechend zunehmend spezifizieren. Zudem sind die drei „Hauptäste“ untereinander verknüpft.

Für die Klassifizierung wurde die Population  $\Delta_K[(ESC_s(2/3) \cap EB(2/3)) \cap CB(2/3)]$  zugrunde gelegt, welche eine Anzahl von 3482 Genen umfasst und von denen 2739 mit entsprechenden Annotationen verknüpft wurden. Mit Hilfe des Programmes „**GO Tree plus**“ wurde eine Einordnung der Gene vorgenommen. Dieses Programm ermöglicht die selektive Darstellung der „getroffenen“ Knoten, sowie die Identität der ihnen zugeordneten Gene unter Beachtung der Ebenenhierarchie. Dabei ist zu berücksichtigen, dass ein Gen multiplen Knoten zugeordnet werden kann. Demnach sind die im Folgenden angegebenen Zahlen unabhängig von der Gesamtzahl zu betrachten. Zudem können die Gene untergeordneter Knotenpunkte als Gesamtheit in der ihnen übergeordneten fokussierten Ebene vereinigt werden. Zwecks Übersicht wurde eine Klassifikation im Kontext des Hauptknotens „Biologischer Prozess“ (GO:0008150) vorgenommen. Die in dieser Hauptontologie stark angereicherten untergeordneten

Ebenen sind unter Berücksichtigung ihrer quantitativen Repräsentanz in Abb. 3.15 gezeigt.



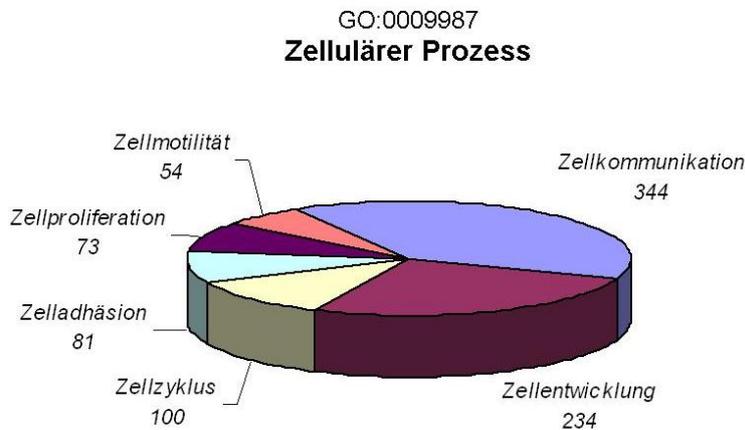
**Abb. 3.15 Angereicherte GO Annotations Knoten der Ebene „Biologischer Prozess“**

Die angereicherten Knotenpunkte wurden direkt der Ebene „biologischer Prozess“ zugeordnet. Der größte Anteil der annotierten Gene findet sich in den Subebenen „Zellulärer Prozess“ und „Metabolischer Prozess“, des weiteren finden sich 604 Gene, welche mit „Biologischer Regulation“ assoziiert werden. 455 Gene sind an Entwicklungsprozessen beteiligt, 409 fungieren unter dem Aspekt der „Lokalisation“. Eine deutliche Anreicherung findet sich zudem bei Genen, welche im Kontext einer „Reaktion auf einen Stimulus“ agieren. Zudem konnten die identifizierten Gene mit „Wachstum“, „Biologischer Adhäsion“ und „Prozessen des Immunsystems“ assoziiert werden.

Aufgrund der fehlenden Einflussnahme anderer mittel- und unmittelbar angrenzender Gewebe und Zelltypen während der *in vitro* Differenzierung der CBs, werden im Folgenden die Subebenen des Knotenpunktes „Zellulärer Prozess“ in den Vordergrund gestellt.

Für eine detailliertere Darstellung und Gruppierung der Gene wurden die angereicherten Knotenpunkte unter der Annotationsebene „Zellulärer Prozess“ (GO:0009987) fokussiert (Abb.3.16), wobei hier die Unterebene „Zellulärer Metabolischer Prozess“ (GO:0044237) vernachlässigt wurde. Hier wird deutlich, dass die getroffenen Knoten dieser Subebene weitestgehend mit denen der Hauptebene übereinstimmen und die Ontologien „Entwicklung“, „Regulation“, „Wachstum“, „Lokalisation“/„Motilität“, sowie „Adhäsion“ die zentralen Bereiche dieser Klassifikation repräsentieren. Von einer detaillierten Darstellung aller identifizierten Gengruppen der aufgeführten Ontologien wird im Rahmen dieser Arbeit aus Übersichts- und aus Platzgründen abgesehen.

Mit einer Anzahl von 344 zugeordneten Genen stellt der Knotenpunkt „Zellkommunikation“ (GO:0007154) eine der größten und interessantesten Gruppen im Kontext der kardiomyozytären Differenzierung dar.



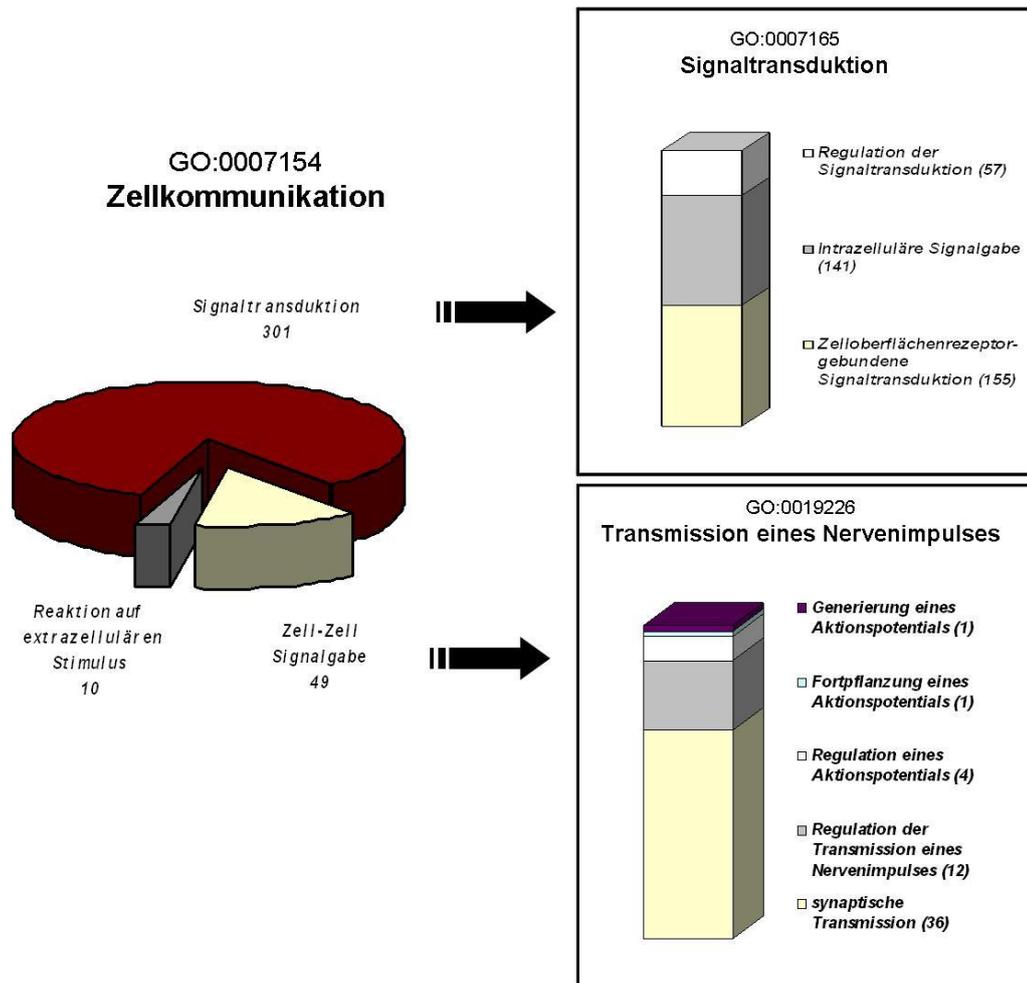
**Abb. 3.16 Angereicherte Knoten unterhalb der Ebene „Zellulärer Prozess“**

Die dem „Zellulären Prozess“ untergeordneten Gene zeigen eine deutliche Anreicherung in den Bereichen „Zellkommunikation“, „Zellentwicklung“, „Zellzyklus“, „Zelladhäsion“, „Zellproliferation“ und „Zellmotilität“. Den größten Anteil mit 344 Genen nimmt hierbei der Bereich „Zellkommunikation“ ein. In dieser Darstellung wurde der Anteil „Zellulärer Metabolischer Prozess“ vernachlässigt.

### 3.5.1.1. Verschiedene Komponenten der Zellkommunikation wurden in dem siRNA-Screen angereichert

Im Rahmen der zellulären Differenzierung stellt die Zellkommunikation eine unerlässliche und wichtige Komponente dar, welche unter Beachtung zeitlicher und räumlicher Parameter das geforderte Schicksal der Zelle individuell steuert und beeinflusst. Dementsprechend wurde dieser Bereich detaillierter betrachtet.

Der Knoten „Zellkommunikation“ zeigte eine Anreicherung der Unterknoten „Signaltransduktion“ (GO:0007165), „Zell-Zell-Signalgabe“ (GO:0007267), sowie „Reaktion auf extrazellulären Stimulus“ (GO:0031668), wobei der letztgenannte in dieser Arbeit nicht berücksichtigt wird (Abb.3.16). Die der Signaltransduktion zugeordneten Gene gliedern sich der Reihenfolge ihres Anteils in „Zelloberflächenrezeptor-gebundene Signaltransduktion“, „intrazelluläre Signalgabe“, sowie die „Regulation der Signaltransduktion, auf“. Um einen Überblick über die beteiligten Signalwege und Kaskaden zu erhalten, wurden die der „Regulation von Signaltransduktion“ zugeordneten Knoten isoliert und in Tab. 3.3 unter Angabe ihres prozentualen Anteils aufgelistet.



**Abb. 3.17 Angereicherte Knoten im Bereich der Zellkommunikation**

Die mit dem Prozess „Zellkommunikation“ assoziierten Gene gliedern sich in die Bereiche „Signaltransduktion“, „Zell-Zell-Signalgabe“ und „Reaktion auf einen externen Stimulus“ auf, wobei letzterer hier vernachlässigt wird. Mit einem Anteil von 301 zugeordneten Genen zeigt die Ebene der Signaltransduktion die stärkste Anreicherung und spaltet sich in „Zelloberflächenrezeptor-gebundene Signaltransduktion“ (155 Gene), „Intrazelluläre Signalgabe“ (141 Gene) und „Regulation der Signaltransduktion“ (57 Gene) auf. Eine mit 49 ebenfalls große Anzahl von Genen findet sich innerhalb der „Zell-Zell-Signalgabe“, welche annähernd vollständig auf die Subebene „Transmission eines Nervenimpulses“ entfallen. In dieser Kategorie können die Gene der „Synaptischen Transmission“, der „Regulation der Transmission eines Nervenimpulses“, sowie der „Generierung, Fortpflanzung und Regulation eines Aktionspotentials“ zugeordnet werden. Die Zahlen geben die Anzahl der jeweils zugeordneten Gene jeder Ontologie an.

Die konkretere Aufschlüsselung der Zell-Zell-Signalgabe (Abb. 3.17) zeigte eine annähernd vollständige Anreicherung auf der Ebene „Transmission eines Nervenimpulses“ (GO:0019226), welche sich aus den Subebenen „synaptische Transmission“, „Regulation der Transmission eines Nervenimpulses“, sowie der „Generierung, Fortpflanzung und Regulation eines Aktionspotentials“ zusammensetzt und unter Angabe der Anzahl der zugeordneten Gene in Abb.3.17 dargestellt ist. Diese auffällige Anreicherung von Kandidatengenen im Bereich der Reizleitung zeigt die

Notwendigkeit der elektrischen Signalübermittlung während der kardiomyozytären Differenzierung. In diesem Kontext stellt sich die Frage nach den funktionell identifizierten Komponenten des Ionentransports, welcher ein essentieller Bestandteil der kardiomyozytären Reizleitung und –generierung ist.

**Tab. 3.3 Regulierte Signalwege und -kaskaden**

<b>Regulierte Signalwege/Kaskaden</b>	<b>%</b>
kleine GTPase vermittelte Signaltransduktion	47
I-kappaB-Kinase/NF-kappaB Kaskade	9
JNK Kaskade	7
MAPKKK Kaskade	5
G-Protein gebundener Rezeptor Protein Signalweg	5
TGFβ Rezeptor Signalweg	5
Smoothened Signalweg	5
BMP Signalweg	2
Activin Rezeptor Signalweg	2
PKB Signalkaskade	2
Zytokin und Chemokin vermittelter Signalweg	2
VEGF Rezeptor Signalweg	2
Kalzium vermittelte Signalgabe	2
Notch Signalweg	2

3.5.1.2. Im Screen konnten viele Komponenten der Wnt-Signalgebung identifiziert werden

Die detailliertere Betrachtung durch manuellen Abgleich der im Screen identifizierten und mit Signaltransduktion assoziierten Gene ergab eine große Anzahl von Komponenten der Wnt-Signalgebung. Dabei fanden sich sowohl Faktoren des β-Catenin-abhängigen, kanonischen Wnt-Signalweges, als auch der beiden alternativen β-Catenin-unabhängigen Wnt-Signalwege (Wnt-Ca<sup>2+</sup>, Wnt/PCP). Die identifizierten Gene sind unter Beachtung ihrer Funktion in Tabelle 3.4 aufgelistet.

**Tab. 3.4 identifizierte Komponenten der Wnt-Signalgebung**

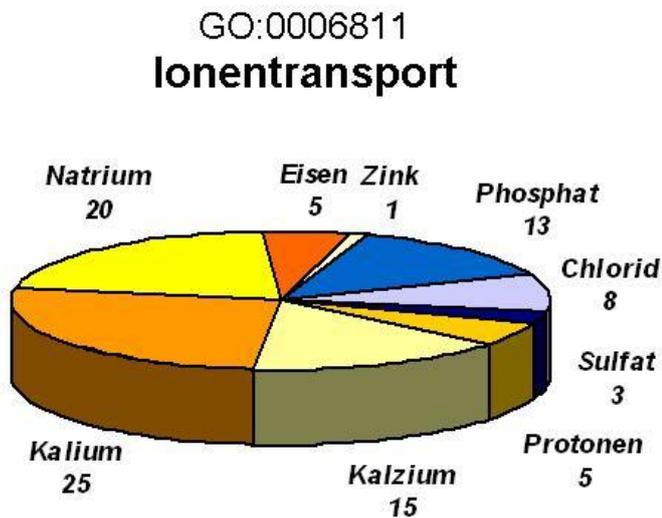
Komponente des Signalwegs (+), keine Komponente des Signalwegs (-), nicht bekannt (nd)

	Wnt/ $\beta$ - catenin	Wnt/Ca <sup>2+</sup>	Wnt/ PCP	Literatur
<b>Rezeptoren</b>				
Fzd1	+	(+)	(+)	(Gazit et al., 1999)
Fzd6	nd	+	+	(Guo et al., 2004)
<b>Liganden</b>				
Wnt5b	-	+	nd	(Freisinger et al., 2010)
Wnt8b	+	nd	nd	(Fotaki et al., 2010)
<b>sezernierte Modulatoren</b>				
Sfrp4	+	nd	+	(Muley et al., 2010)
<b>intrazelluläre Signalmoleküle</b>				
Dvl1	+	-	+	zur Übersicht: (James et al., 2008)
GSK3 $\beta$	+	-	-	
IP3	-	+	-	
PKC	-	+	-	
G $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$	-	+	-	
JNK	-	-	+	
CAMKII	-	+	-	

### 3.5.1.3. Ionentransporter stellen eine distinkte Gruppe der im Screen identifizierten Gene dar

Die physiologische Funktion der Herzmuskelzelle ist unmittelbar an den Transport von verschiedensten Ionen gebunden. Die Besonderheit der autonomen Reizgenerierung, dessen Weiterleitung und die damit verbundene Kontraktilität fordert eine komplexe Ausstattung an Ionenkanälen, welche wiederum ein größtmögliches Maß an Regulation erfordern. Mit Hilfe der GO Annotationen wurden die Gene, welche mit „Ionentransport“ assoziiert sind, identifiziert und in Abb. 3.18 unter Berücksichtigung der quantitativen Verhältnisse dem Transport des entsprechenden Ions zugeordnet. Auffällig ist hier die Anreicherung der Gene, welche den Transport von Kalium, Natrium und Kalzium bewerkstelligen. Ein geringerer Anteil des Kationentransports entfällt auf Eisen und Protonen, sowie schließlich Zink. Bei der mengenmäßigen Verteilung des Anionentransports stellen Phosphat- und Chlorid-Transporter den größten Anteil, gefolgt

von Sulfat-Transportern. Diese Verteilung spiegelt weitestgehend die physiologischen Anforderungen an die Herzmuskelzelle wider.



**Abb. 3.18** Verteilung der mit „Ionentransport“ assoziierten Gene nach Art des Ions

Die Verteilung der im screen funktionell identifizierten Gene können einem transportierten Ion zugeordnet werden. Die Anionen sind in blauen, die Kationen in gelben Farbabstufungen dargestellt. Der Transport von Kationen bildet mit annähernd 75% den größten Anteil und wird hauptsächlich von Kalium, Natrium und Kalzium gestellt. Ein geringerer Anteil entfällt auf den Eisen- und Protonentransport, mit nur einem assoziierten Gen ist der Zinktransport repräsentiert. Bei dem Transport von Anionen stellt Phosphat mit 13, gefolgt von Chlorid mit 8 und Sulfat mit 3 zugeordneten Genen den größten Anteil.

## 4. Diskussion

### 4.1. *In vitro* generierte Kardiomyozyten eignen sich für die Identifikation pränatal kardiogenetisch essentieller Faktoren

Die Nutzung der *in vitro* Differenzierung von Kardiomyozyten aus murinen embryonalen Stammzellen als Modellsystem für die genomweite Identifikation kardioessentieller Gene erfordert eine weitestgehende Äquivalenz zu der *in vivo* Situation. Die Beurteilung der Vergleichbarkeit, sowie die Bestimmung des Entwicklungsstadiums basiert auf der Analyse morphologischer, molekularer, sowie physiologischer Parameter.

Bei der Differenzierung der ES-Zellen in Suspensionskultur ist die vollständige Zellvereinzelung, sowie die Anzahl der Zellen in einer Schale von entscheidender Bedeutung für die Qualität, das Wachstumsverhalten, die Vitalität und die Reproduzierbarkeit der sich formierenden EBs (Zweigerdt et al., 2003). Anders als bei der EB-Formation im „hängenden Tropfen“ kommt es bei der Differenzierung in Suspension häufiger zu geringen Abweichungen in Größe, Form und infolgedessen auch Reife der EBs und schließlich auch CBs (Chen and Chen, 2004). Diese Varianz kann jedoch durch die Generierung großer Mengen statistisch ausgeglichen werden, was anhand der Bestimmung des Durchmessers drei unabhängig voneinander generierter Populationen gezeigt werden konnte (Abb. 3.2).

Mit Hilfe der Affymetrix-Gene-Chips ermittelten Expressionsprofile von ES-Zellen, EBs, CBs, Herz E8.5 und nCM war ein direkter Vergleich der genannten Populationen und eine annähernde Einordnung der CBs entsprechend ihres Entwicklungsstadiums möglich.

Die entwicklungsbiologisch frühesten kardiogenen Zielgene kardiointduktiver Signale sind unter anderem *Nkx2.5* und *GATA4*, deren Expression im präkardialen Mesoderm beginnt und bis zum adulten Herzen aufrecht erhalten bleibt (Cripps and Olson, 2002; Pikkarainen et al., 2004). Der Vergleich der relativen Expressionslevel der in Abb. 3.3 aufgeführten kardiospezifisch exprimierten Gene zeigt die Übereinstimmung der *in vitro* generierten Kardiomyozyten mit der *in vivo* Situation. Die Expression von *Nkx2.5* und *GATA4*, beginnt erwartungsgemäß in den EBs und steigert sich mit fortschreitender Differenzierung auf einen den Populationen Herz E8.5 und nCM äquivalenten Level. Gleichermaßen verhält es sich mit den Transkriptionsfaktoren *eHAND/HAND1* und *dHAND/HAND2*, wobei im Falle von *eHAND* die Expressionssteigerung geringer ist. Die

Expression der Strukturprotein-kodierenden Gene *Des*, *Myh6*, *Actc1*, *Tnnt2* und *Ttn*, sowie des sarkoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$  - Kanals *Ryr2* zeigt ebenfalls eine annähernd vollständig übereinstimmendes Profil mit den *in vivo*-Populationen aus Herz E8.5 und nCM. Die einzig auffällige Abweichung findet sich bei den Hypertrophiemarkern *Nppa* und *Nppb*. Dort steigt erst in der älteren Adhäsivkultur  $\text{CB}_{\text{pl}}$  das Expressionsniveau von *Nppa* und auch *Nppb* deutlich und zu den *in vivo* Populationen äquivalent an. Die früheste Expression von *Nppa* in der Maus findet man am Tag E8 in einer Subpopulation von Kardiomyozyten, während der weiteren Differenzierung vom primitiven zum Arbeitsmyokardium in ventrikulären, sowie atrialen Herzmuskelzellen und beschränkt sich im adulten Herzen auf das atriale (Houweling et al., 2005), der von *Nppb* auf das ventrikuläre Myokard. Der geringere Expressionslevel in den CBs könnte durch die größere Anzahl primitiver embryonaler Kardiomyozyten zu erklären sein, welche den nodalen Herzmuskelzellen ähnlich sind und keine Expression von *Nppa* aufweisen (Hoogaars et al., 2004; Houweling et al., 2002). Dies stimmt mit bisherigen Beobachtungen überein, dass bei der Generierung ESC-abgeleiteter Kardiomyozyten hinsichtlich Reife und Typ eine heterogene Population entsteht (Fijnvandraat et al., 2003a; Fijnvandraat et al., 2003b).

Die Analyse der Expression stammzelltypisch exprimierter Markergene (Abb.3.4) zeigte eine deutliche Abnahme der Expression in den CBs, welche in der Population  $\text{CB}_{\text{pl}}$  gegen Null tendierte. Dennoch war eine Expression detektierbar und deutet auf eine unreife Population hin. Dieses Ergebnis weist entweder auf das simultane Vorkommen verschiedener Differenzierungsstadien innerhalb der generierten Kardiomyozyten hin, oder im Falle einer Koexpression kardialer, sowie stammzelltypischer Gene innerhalb einer Zelle, auf eine unreife, jedoch weitestgehend homogene Zellpopulation.

Das für kardiale Vorläuferzellen typische Markergen *Isl1* zeigte eine der *in vivo* Situation entsprechenden Expressionssteigerung, während *Flk1* ein konträr verlaufendes Profil aufwies. Diese Ergebnisse werden von der nicht zuletzt kontrovers diskutierten These eines gemeinsamen  $\text{Nkx2.5}^+/\text{Isl1}^+/\text{Flk1}^+$  kardiovaskulären Vorläufers gestützt, aus welchem sich im weiteren Verlauf der Differenzierung eine  $\text{Nkx2.5}^+/\text{Isl1}^+$  und eine  $\text{Flk1}^+/\text{Isl1}^+$  Population entwickelt, wobei erstere die Vorläufer der Kardiomyozyten und glatter Muskelzellen, zweitere die Vorläufer endothelialer Zellen und glatter Muskelzellen stellt (Moretti et al., 2006). Dieses Modell stützt sich ebenfalls auf ES-Zell-basierte *in vitro* generierte Resultate, so dass hier ein analoger Differenzierungsablauf denkbar und auch naheliegend ist.

Um die Proliferationsfähigkeit der *in vitro* generierten Kardiomyozyten beurteilen zu können, wurde das Expressionslevel von *Ccnb1* und *myc* analysiert. In beiden Fällen wurde eine Abnahme während der Differenzierung beobachtet, welche ebenfalls bei *Ccnb1* von Herz E8.5 im Vergleich zu nCM auftrat. Die Expression von *myc* zeigt hingegen bei den *in vivo* Populationen eine Steigerung von Herz E8.5 zu nCM. Trotz der Expressionsabnahme dieser Markergene waren diese weiterhin detektierbar und zudem konnte immunhistochemisch der Zytokinesemarker AuroraB in nahezu allen Zellen des CBs nachgewiesen werden, so dass hier von einer der *in vivo* Situation entsprechenden Teilungsaktivität auszugehen ist.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse ein juveniles kardiomyozytäres Differenzierungsstadium der CBs, welches weitestgehend die molekularen kardiospezifischen Charakteristika vergleichbarer *in vivo* Populationen aufweist, aber dennoch eine geringe residuale Expression stammzelltypischer Gene zeigt.

Anhand des oben beschriebenen Expressionsprofils kann lediglich eine Einordnung des Differenzierungsstadiums vorgenommen, nicht aber die Homogenität der generierten Zellpopulation beurteilt werden. Neben der lichtmikroskopischen Beurteilung von Größe, beziehungsweise Durchmesser (Abb. 3.2), Form und Kontraktionsverhalten der *in vitro* hergestellten CBs, ist die Bestimmung der molekularen Homogenität der Population unerlässlich. Bei progressiver Differenzierung und positiver Selektion von Kardiomyozyten durch die  $\alpha$ MHC-Promoter-regulierte Neomyzinresistenz dürfte eine Verunreinigung der generierten Zellpopulation mit anderen Zelltypen durch unzureichenden Selektionsdruck ausgeschlossen sein. Die in Abb. 3.5A-C gezeigten Ergebnisse zeigten eine nahezu vollständig  $\alpha$ MHC-positive Zellpopulation in der FACS-Analyse, sowie den histologischen Präparaten.

## **4.2. Die genomweite siRNA-vermittelte Gensuppression im „batch-Verfahren“ eignet sich zur Identifikation von Genen, welche die Herzentwicklung beeinflussen**

### **4.2.1. Die siRNA-vermittelte Suppression von *GATA4* verhindert die kardiomyozytäre Differenzierung *in vitro*, aber nicht *in vivo***

Eines der vergleichsweise früh exprimierten Gene der Kardiogenese ist *GATA4*, welches zu einer sechs Mitglieder umfassenden GATA Familie von Zink-Finger

Transkriptionsfaktoren gehört. Das Protein stimmt in der Aminosäuresequenz und in überlappenden Expressionsdomänen zusammen mit GATA5 und GATA6 überein, so dass eine Subfamilie erkennbar wird. GATA4 enthält zwei Zinkfinger DNA-bindende Domänen des Typs IV und bindet das Konsensusmotif A/T-G-A-T-A-A/G, welches Namensgeber dieser Genfamilie ist und in einer Vielzahl Transkriptionsregulatorischer Elemente von Promotoren kardiospezifischer Gene identifiziert wurde (Harvey und Rosenthal, 1999).

GATA4-defiziente Mauslinien sind embryonal letal im Embryonalstadium E8.5-E10.5. Sie weisen auffällige kardiale morphogenetische Störung auf, welche in einer *cardia bifida* resultieren. Dennoch ist die initiale kardiomyozytäre Differenzierung nicht betroffen, welches durch die Anwesenheit primitiver Kardiomyozyten in den homozygoten GATA4-defizienten Mäusen gezeigt wurde. Die unter progressiver Differenzierung folgende Morphogenese des Herzens ist jedoch unmittelbar von der Aktivität von GATA4 abhängig (Kuo et al., 1997; Molkentin et al., 1997). Konträr zu dieser Beobachtung *in vivo*, konnte jedoch durch RNAi vermittelte Suppression von *GATA4* die Differenzierung von Kardiomyozyten aus P19 embryonalen Karzinomzellen verhindert werden (Grepin et al., 1995). Dieses Ergebnis zeigt, dass die Ausschaltung, sowie der „knock down“ eines Gens *in vitro* nicht zwangsläufig den *in vivo* erzielten Phänotyp reproduziert, aber dennoch die Relevanz des Gens für die Herzentwicklung reflektiert.

Zwecks interner funktioneller Kontrolle des Testablaufs durch Generierung einer mit der kardiomyozytären Differenzierung interferierenden siRNA, wurden drei gegen *GATA4* gerichtete shRNA-kodierende Lentiviren generiert (Abb. 3.7) und auf ihre Effizienz, sowie kardioinhibitorische Wirkung getestet. Eine der drei siRNAs konnte die fortschreitende Differenzierung, nicht aber die Differenzierungsinitiation effektiv verhindern, so dass mit Beginn der Selektion zwar kontrahierende Zellen vorhanden waren, diese jedoch mit zunehmender Selektionsdauer einem massiven Zellsterben unterlagen. Die in der RT-PCR (Abb. 3.8) ermittelten Signalintensitäten der Banden zeigt eine deutliche Reduktion des *GATA4*-Transkriptes im Vergleich zu der Kontrollpopulation nach Abgleich der cDNA anhand der *HPRT*-Expression. Durch eine moderate Suppression von *GATA4* durch si3 konnte hier ein verzögertes Auftreten spontan kontrahierender Zellen, sowie eine geringere Größe der CBs beobachtet werden.

Die Ergebnisse sind mit den zuvor beschriebenen Resultaten anderer Arbeitsgruppen kompatibel, da die initiale Differenzierung nicht gestört zu sein scheint (Kuo et al., 1997;

Molkentin et al., 1997) die Beibehaltung der Differenzierung jedoch stark gestört ist, was schließlich zum Zelltod führt, wie es Grepin et al. 1995 beschrieben hat. Demzufolge konnte die Unterdrückung von *GATA4* mit „si1“ für die funktionelle Kontrolle des Testablaufs genutzt werden.

#### 4.2.2. Die Komplexität der lentiviralen sh/siRNA-Bibliothek bleibt auf zellulärer Ebene erhalten

Die in Plasmidform kommerziell erworbene genomweite lentiviral basierende siRNA-Bibliothek musste zunächst amplifiziert werden, um eine ausreichende Plasmidmenge für die Generierung der lentiviralen Partikel zu erhalten. Dabei wurde unter Beachtung der Plasmidgröße und der Komplexität der Bibliothek, wie unter Material und Methoden beschrieben, eine annähernd zehnfache Vervielfältigung des Ausgangsproduktes erzielt. Die Qualitätskontrolle der amplifizierten Bibliothek mit Hilfe der Affymetrix Gene Chip-Analyse zeigte eine Repräsentanz der siRNAs mit einer Anzahl von 39897 entsprechenden Zielgenen. Allerdings kann hier keine quantitative Aussage über die relative Menge der einzelnen siRNAs getroffen werden, da die bioinformatische Verarbeitung der Hybridisierungssignale eine Klassifikation der Signalintensitäten, unter Beachtung des gesetzten Schwellenwertes, lediglich in „Anwesend“ (P=present) und „Abwesend“ (A=absent) zulässt was in Abschnitt 4.3.1 ausführlicher diskutiert wird.

Die Qualität der Bibliothek bezüglich ihres Umfangs repräsentierter siRNAs ist entscheidend für die genomweite Abdeckung, aber nicht essentiell für die Qualität der Ergebnisse des Screeningsystems. Somit ist der hier definierte Umfang der Bibliothek lediglich als kalkulierte Limitation zu betrachten, welcher zusätzlich durch die Effizienz der biologisch nicht validierten siRNAs beeinflusst wird.

Des Weiteren wurde bei der Generierung der Lentiviren die Menge der eingesetzten Plasmidbibliothek, die Kapazität der Verpackungszelllinie HEK293T, sowie die Menge des für die Infektion der definierten Anzahl an Zielzellen benötigten Virus mit entsprechend ausreichendem Titer berücksichtigt, um eine möglichst geringe Qualitätsminderung auf der Ebene der Zielzellen über die gesamte Dauer der Differenzierung zu haben. Durch die Kalkulation oben genannter Parameter wurde eine größtmögliche Standardisierung angestrebt, um eine gleichermaßen größtmögliche Konsistenz und interne Stabilität der in drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchsabläufen generierten Daten zu gewährleisten. Die Anzahl identifizierter siRNAs, beziehungsweise deren Zielgenen beträgt auf ES-Zellebene in der Population

„ESCs“ (Abb. 3.12A) 39670 und zeigt damit eine annähernd vollständige Übereinstimmung mit der Plasmidbank. Somit wurde auf Ebene der Zielzellen die Komplexität aufrechterhalten.

Trotz der erreichten Optimierung des Systems gilt es jedoch einige Einschränkungen anzuführen. Die Anzahl der mit den individuellen Viruspartikeln infizierten Zellen ist unterschiedlich und aufgrund der Signalverarbeitung nicht relativ quantifizierbar. Somit variiert die für den Screen verwendete Zahl der für die jeweiligen siRNAs exprimierenden Zellen und kann somit nicht jedes Zielgen gleich repräsentieren.

#### 4.2.3. Das Stadium der Testpopulationen definiert das entwicklungsbiologische Zeitfenster

Der Aufbau des Versuches basiert auf dem Prinzip des „negativen Nachweises“, da die kardiogenetisch essentielle Genpopulation durch die Abwesenheit entsprechender siRNAs in der finalen Zellpopulation bestimmt wird. Der Vorteil dieses Ansatzes liegt in der Möglichkeit, die gesamte Population kardiogenetisch essentieller Gene im „batch-Verfahren“, also gebündelt zu identifizieren und ist somit unter Berücksichtigung der Komplexität der Bibliothek vergleichsweise einfach verglichen mit einer klonalen Analyse. Allerdings ist in diesem Versuchsaufbau die individuelle Beurteilung der siRNA-vermittelten phänotypischen Veränderungen nicht möglich. So kann weder der Zeitpunkt der eintretenden Veränderung, noch deren Art analysiert werden. Letzterer Aspekt beinhaltet neben der kardiogenetischen Inhibition auch die Generierung eines kardiainduktiven Phänotyps, welcher durch Suppression eines kardiogen repressorisch wirksamen Gens hervorgerufen wird. Zudem sind Veränderungen elektrophysiologischer und morphologischer Parameter im „batch-Verfahren“ nicht einfach detektierbar. Dennoch stellt der „negative“ Ansatz im „batch-Verfahren“ unter Berücksichtigung zeitlicher und wirtschaftlicher Aspekte die optimale Strategie mit dem Ziel der Identifikation kardiogenetisch essentieller Faktoren dar.

Der Versuchsansatz bedarf einer stabilen Referenzpopulation (EB), sowie Vergleichspopulation (CB), um die Wahrscheinlichkeit eines „falsch positiv“ bewerteten Kandidatengens auszuschließen. Zu diesem Zweck mußte die Komplexität der Bibliothek über die gesamte Dauer der Differenzierung, mit Ausnahme der gewünschten Limitation kardiogen inhibitorisch wirkender siRNAs, statistisch aufrechterhalten werden. Dieses wurde durch (1) den Einsatz eines vielfach größeren Umfangs der Test-

Zellpopulationen (siehe Material und Methoden), sowie (2) die Durchführung von drei unabhängigen Versuchen gewährleistet.

Die Wahl des Zeitpunktes der Probenentnahme der Referenz- und Vergleichspopulationen war von entscheidender Bedeutung für die Eingrenzung des relevanten entwicklungsbiologischen Zeitfensters. Die unmittelbar nach erfolgter Infektion entnommene Population „OS“ diente zum Einen der Beurteilung der Ausgangskomplexität der Bibliothek auf Zielzellebene, sowie in Verbindung mit der Population „MS“ als Vergleichspopulation und Basis erster Instanz. Die „OS-Population“ ermöglichte zusätzlich, nach Abgleich mit der durch die positive Selektion infizierter Zellen vier Tage „älteren“ Population „MS“ die Identifikation derjenigen Gene, welche für die Viabilität und Proliferationsfähigkeit der embryonalen Stammzellen notwendig sind. Als Referenzpopulation und damit Basis zweiter Instanz wurden die neun Tage in Suspension differenzierten „reifen“ EBs verwendet, die Vergleichspopulation bildeten die positiv selektierten und „final“ differenzierten CBs, so dass ein betrachtetes Zeitfenster von neuntägiger *in vitro* Differenzierung zugrunde gelegt wurde. Dieses entwicklungsbiologische Fenster repräsentiert annäherungsweise die Zeit von der abgeschlossenen Gastrulation und progressiver Spezifikation der verschiedenen Zelltypen, beziehungsweise deren Vorläufern und einem Intermediat primitiver embryonaler, sowie terminal differenzierter perinataler Kardiomyozyten.

Ein weiterer kritischer Faktor für die Identifikation der in den Testzellpopulationen vorhandenen siRNA-Zielsequenzen, stellte deren Amplifikation und Biotinylierung mit Hilfe der Nested – PCR dar. Dabei wurde durch eine geringe Zykluszahl unter Einsatz einer großen Menge cDNA sicher gestellt, dass nur geringe amplifikationsbedingte Veränderungen eintraten. Die Qualität des nach  $\lambda$ -Exonuklease-behandlung erhaltenen einzelsträngigen Produktes wurde mittels Gelelektrophorese und durch Einsatz des Bioanalyzers gewährleistet.

### 4.3. Identifikation von Kandidatengen durch einen bioinformatischer Algorithmus

#### 4.3.1. Die Identifikation der siRNAs wird durch die komplexe Verrechnung der Hybridisierungssignale erreicht

Die Signale der amplifizierten und biotinylierten siRNA-Sequenzen, die an die komplementären Sonden des Affymetrix-Gene Chips hybridisieren, konnten mit Hilfe der Affymetrix-Software GCOS lediglich eingelesen, allerdings nicht ausgewertet werden, so dass ein speziell für diesen Zweck nutzbares Programm entwickelt werden mußte. Die bioinformatische Umsetzung der im Folgenden beschriebenen Forderungen wurde im Rahmen einer anderen Arbeit (Projektarbeit Ludmila Schulz) vorgenommen und beschrieben.

Die grundsätzliche Schwierigkeit lag in der Identifikation positiver, sowie negativer Hybridisierungssignale, da das Sondenset für eine Affymetrix Gene ID 11 sogenannte „match“-Sonden und die gleiche Anzahl „mismatch“-Sonden umfasst, die Bibliothek jedoch lediglich 3 bis 5 siRNAs für jedes Gen/jede Gene ID enthält. Die bei Expressionsanalysen vorgenommene Verrechnung der detektierten Hybridisierungssignale mit Hilfe der GCOS-Software erstreckt sich über alle 11+11 Sonden und resultiert in einem dem Gen zugeordnetem Signal. Für die Detektion putativ gebundener siRNA-Sequenzen innerhalb eines Sondensets müssen die entsprechenden, komplementären Sonden isoliert und zudem individuell betrachtet werden, um im Folgenden die Zielsequenz der identifizierten siRNA und nicht nur die Identität des Zielgens zu erfassen (siehe Material und Methoden). Der sich dadurch ergebende Umstand, ein Zielgen durch den Nachweis einer siRNA durch nur eine entsprechend hybridisierte Sonde als kardio-gen essentiell einzuordnen, birgt das Risiko der Wahrscheinlichkeit eines „zufälligen“ Ereignisses und damit einer „falsch positiven“ und natürlich auch „falsch negativen“ Bewertung. Die Konsequenz einer „falsch negativen“ Bewertung hat dabei lediglich eine Limitation der Gengruppe zur Folge. Dementsprechend ist die Verrechnung der Hybridisierungssignale und eine darauf basierende Einordnung in „positiv“ (P=present) und „negativ“ (A=absent) entscheidend für die Konsistenz der Ergebnisse.

Einige der Sonden innerhalb eines Sets weisen zum Teil Sequenzüberlappungen auf, so dass diese entsprechend ihrer Bindungskapazität mit komplementären siRNAs ebenfalls

starke Hybridisierungssignale zeigten. Die Sonden weisen eine Länge von 25 nt auf und decken verschiedene Bereiche der mRNA-Sequenz des nachzuweisenden Gens ab. Die „mismatch“-Sonden entsprechen in ihren Sequenzbereichen den analogen „match“-Sonden, weisen allerdings einen Basenaustausch des 13. Nukleotids des 25 nt umfassenden Oligonukleotids auf, so dass hier eine lediglich 12 nt umfassende spezifische Bindungskapazität möglich ist und demnach durch das meist schwache Hybridisierungssignal als Hintergrund bewertet und mit dem der „match“-Sonden verrechnet wird.

Wegen dieser Tatsache und nach empirischen Beobachtungen einer Stichprobenpopulation entsprechend wurde eine Schwelle von 17 nt als ausreichende Bindungskapazität festgelegt und die entsprechenden Sonden für die Signalbestimmung genutzt. Dadurch kann eine siRNA durch mehrere Sonden detektiert werden, was die Wahrscheinlichkeit eines als „falsch positive“ bewerteten Signals erheblich senkt. Zudem zeigte die häufig beobachtete „Abstufung“ in der Intensität des Signals bei Abnahme der spezifischen Bindungskapazität der Sonde zusätzlich die Sensitivität des Systems und der vorgenommenen Verarbeitung der Messwerte und spiegelt dementsprechend die Verlässlichkeit der Ergebnisse wider. Eine weitere Kontrollmöglichkeit bot der Ausschluss von Kreuzhybridisierungen, durch den Abgleich der jeweiligen siRNA-Sequenz mit der Gesamtheit der Sonden des Affymetrix Gene Chips.

Der Nachweis mehrerer siRNAs innerhalb eines Sondensets erhöht die Konsistenz eines als kardiogenetisch essentiell identifizierten Gens. Einen ähnlichen Effekt hat der Nachweis von siRNAs in anderen Sondensets einer anderen Affymetrix Gene ID, welche jedoch das gleiche Gen repräsentiert.

Unabhängig von der Verrechnung der „match“- und „mismatch“-Sonden ist die Bestimmung des generellen Hintergrundrauschens innerhalb eines Sondensets von entscheidender Bedeutung für die Sensitivität. So wurde die Schwelle für das Hintergrundrauschen mit Hilfe des Medians der Hybridisierungssignale aller nicht mit einer entsprechenden siRNA hybridisierfähigen Sonden festgelegt.

Die Einordnung der Signale erfolgte in P (present) und A (absent), die Signalintensität wurde nicht berücksichtigt. Die individuelle relative Repräsentanz der einzelnen siRNAs innerhalb der Bibliothek auf (1) Plasmidebene (2) viraler Ebene (3) zellulärer Ebene unterliegt theoretisch starken Veränderungen. Zudem birgt die mittels PCR bewerkstelligte Amplifikation der Zielsequenzen trotz geringer Zyklenzahl (linearer

Amplifikationsbereich), zusätzlich das Risiko einer Veränderung der Relation. Aufgrund dieser Tatsache wurde eine ausschließlich binäre Einordnung der Signale für die Auswertung gewählt.

#### 4.3.2. Die Bestimmung der Anzahl der als essentiell identifizierten Kandidatengene ist von der Stringenz abhängig

Die Wahl des Stringenzkriteriums jeder für die weitere Datenverarbeitung verwendeter Population entscheidet maßgeblich über die Konsistenz der Endergebnisse. Für die Definition der Population der als kardiogentisch essentiell zu bewertenden Gene wurde von jeder der für die weitere Verarbeitung verwendeten Testpopulation eine Stringenz von „2/3“ gefordert. Das heißt die jeweiligen Signale wurden in mindestens zwei von drei Versuchen detektiert. Die Begründung dafür ist komplex und beinhaltet biologische, sowie mathematische Parameter auf verschiedenen Ebenen des Versuchsablaufs und der Datenverarbeitung. Diese werden im Folgenden im Kontext von zwei zentralen Fragen diskutiert:

1. *Wie sind die Schwankungen innerhalb der Triplikate zu erklären?*
2. *Welche Stringenz eignet sich für die weitere Verarbeitung der Daten mit dem Ziel einer möglichst vollständigen Datenausnutzung bei möglichst minimaler „Unsicherheit“?*

##### 4.3.2.1. Unterschiedliche Repräsentanz der siRNAs

Eine der zentralen Fragen bei der Interpretation der Ergebnisse zum Einfluss von siRNAs ist, wie die Abweichungen in den Triplikaten zu erklären sind. Eine mögliche Ursache könnte in Schwankungen begründet liegen, die bei der unabhängigen Generierung infizierter Zellen entstanden sind. Da jedes Viruspartikel nur in einer relativ geringen Kopienzahl innerhalb der verwendeten Menge vorlag, ist es möglich, dass einige Viruspartikel, häufiger als andere, Zielzellen infiziert haben. Eine weitere Erklärung wäre die unterschiedliche Expression der entsprechenden siRNAs innerhalb der infizierten Zielzell-Population. Bei diesen Zellen handelt es sich um eine heterogene Zellpopulation hinsichtlich der Integrationsloci des viralen Transgens eines Typs, so dass ein unterschiedlicher Expressionslevel der shRNAs/siRNAs bedingt durch einen chromosomalen Positionseffekt vorstellbar wäre. Andererseits sollte diese Möglichkeit

durch den Umfang infizierter Zellen, welcher ein kalkuliertes Vielfaches der Komplexität der Bibliothek umfasst, statistisch ausgeglichen werden.

Ein entscheidender Faktor ist allerdings die biologisch bedingte Schwankung der Zielgenexpression während der *in vitro* Differenzierung, welche ebenfalls bei der Analyse des Expressionsprofils mittels Affymetrix Gene Chips bei den Populationen EB und CB beobachtet wurde. Trotz Standardisierung des Differenzierungsablaufs und einer zeitlich definierten Probenentnahme, konnten leichte Unterschiede im Expressionslevel einer Auswahl fokussierter Gene festgestellt werden. Unter Berücksichtigung dieser Beobachtung kann die An-, oder Abwesenheit einer siRNA, deren Zielgen eine essentielle Funktion in dem zeitlichen Bereich der Referenz, sowie Vergleichsprobenentnahme ausübt erklärt werden. Die oben genannten Schwankungen bewirken eine über den Zeitraum der Differenzierung zunehmende Varianz bei dem zeilenweisen Vergleich der identifizierten Affymetrix Gene IDs, unter Forderung einer Stringenz von „3/3“ (Abb.3.12).

Ein Grund für die Schwankungen innerhalb des Datensatzes liegt in dem bei der primären Datenverarbeitung festgesetzten Schwellenwert. Die binäre Einteilung der Signale läßt systembedingt nicht erkennen, ob ein Signal den Schwellenwert nur minimal über-, oder unterschreitet. Theoretisch ist es möglich, gesonderte Berechnungen mit jeweils leicht veränderten Schwellenwerten durchzuführen. Dies ist jedoch sehr aufwendig, weshalb in der vorliegenden Arbeit auf einen solchen Ansatz verzichtet wurde.

#### 4.3.3. Der Abgleich der Screeningresultate mit Expressionsdaten verbessert die Qualität der Analyse und schließt falsch positive Kandidaten aus

Der Abgleich der identifizierten Kandidatengene mit dem Transkriptom der CBs dient der internen Plausibilitätskontrolle. Der weitere Abgleich mit den Transkriptomen der Zellpopulationen Herz E8.5 und nCM bildet die Grundlage für die weitere Analyse der identifizierten Kandidatengene. Die Anzahl der nach dem Abgleich mit den Expressionsdaten erhaltenen Gene hängt von der Stringenz ab. Bei der „moderaten“ Stringenz von „2/3“ ergeben sich nach der Synchronisation mit den Expressionsdaten 3482/3476 Gene und bei der größtmöglicher Stringenz von „3/3“ 450 Gene (Abb. 3.13B).

#### 4.4. Die Konsistenz des genomweiten Screens wird durch die theoretische und biologische Validierung verbessert

##### 4.4.1. Die Identifikation bekannter kardiogenetisch essentieller Gene demonstriert die Validität und die Potenz des *in vitro* Screens

Für die Beurteilung der unter Beachtung der Stringenz ermittelten Gengruppen (nach Synchronisation mit den Transkriptomen) ist der Vergleich mit bereits beschriebenen Faktoren notwendig, die für die kardiale Entwicklung essentiell sind. Dieser Vergleich spiegelt die Zuverlässigkeit und die Potenz des funktionellen Screens wider. Diese Art der theoretischen Validierung schafft zudem einen funktionellen Bezug zu der *in vivo* Situation, weist aber auch die Grenzen des *in vitro* Systems auf. Die für die Validierung ausgewählten Gene (Tab. 3.2) wurden unabhängig von dem entwicklungsbiologischen Zeitpunkt/Zeitraum ihrer kardiogenetischen Relevanz und des entsprechenden Prozesses ausgewählt und decken in ihrer Gesamtheit ein breites Spektrum verschiedenster Proteinklassen und durch deren Defizienz hervorgerufenen phänotypische Veränderungen über ein in weite Grenzen gefasstes Zeitfenster der Herzentwicklung ab.

##### Signalmoleküle und Rezeptoren

Die Identifikation von Signalmolekülen mit dem in dieser Arbeit beschriebenen Screeningansatz nimmt eine besondere Rolle ein. Die Schwierigkeit bei der Identifikation stellt die Differenzierung in Ursprungs- und Wirkungsort des betrachteten parakrinen Faktors dar. Während der positiven Selektion der Kardiomyozyten sterben alle anderen Zelltypen innerhalb des EBs. Dieser Vorgang bewirkt die Bildung einer Reinkultur. Somit fehlt der Einfluss mittelbar und unmittelbar angrenzender nicht-kardialer Gewebe und stellt eine im Vergleich zu den *in vivo* Bedingungen artifizielle Situation dar. Viele der für die Kardiogenese essentiellen Signalmoleküle werden von nicht-kardialen Zellen exprimiert und sezerniert. Da diese Zellen während der Selektion sterben, werden diese Faktoren in dem Screen nicht erfasst. Demzufolge impliziert die Identifikation eines Signalmoleküls in dem Screen dessen autokrine Funktion im Kontext der kardiomyozytären Entwicklung. Somit ist die Kapazität des *in vitro* Screens limitiert und bevorzugt die Identifikation autokriner und juxtakriner Faktoren in dem betrachteten Zeitfenster der Differenzierung vom EB zum CB.

Einer der Faktoren, welcher für die Spezifikation kardialen Mesoderms notwendig ist, ist *Fgf8*, welcher unter anderem im visceralen Mesoderm exprimiert wird und dessen Verlust durch genetische Manipulation in der Maus die Bildung des kardialen „Halbmondes“, sowie später die Proliferation und das Überleben der Zellen des anterioren Herzfeldes (AHF) verhindert (Ilagan et al., 2006; Sun et al., 1999). *Fgf8* wurde in dem Screen unter der gewählten Stringenz weder in dem Zeitfenster der Entwicklung von ES zu EB, noch von EB zu CB identifiziert.

Auch *Bmp4*, dessen Defizienz den nahezu vollständigen Verlust mesodermaler Differenzierung zur Folge hat (Winnier et al., 1995) und dessen AHF-spezifische Deletion schwere Defekte in der Entwicklung des Ausflußtrakts und des Ventrikelseptums bewirkt (McCulley et al., 2008), konnte aufgrund fehlender siRNAs nicht als essentiell identifiziert werden.

Der Faktor *Wnt11*, welcher in und nahe des präkardialen Mesoderms, sowie später in dem Myokard des primitiven Herzschlauchs und den ventrikulären Kardiomyozyten exprimiert wird, wurde als essentielles Signalmolekül für die ventrikuläre Entwicklung *in vivo* und für die Kardioiduktion *in vitro* identifiziert (Nagy et al., 2009; Pandur et al., 2002) und konnte ebenfalls unter der geforderten Stringenz nicht detektiert werden.

Einer der identifizierten Liganden juxtakriner Signalgebung ist Dll1, welcher eine tragende morphogenetische Funktion bei der Etablierung der links-rechts-Symmetrieachse und somit auch des „Herzloopings“ ausübt und unter anderem im linken lateralen Plattenmesoderm exprimiert wird (Przemeck et al., 2003). Die Relevanz dieses Faktors im Kontext der *in vitro* Differenzierung ist allerdings unklar, weist aber auf eine enge Verknüpfung von Differenzierung und Morphogenese hin.

Die beiden Rezeptor-kodierenden Gene *Itgb1* und *Tgfbr2* sind für die frühe embryonale Entwicklung essentiell, ihre Deletion resultiert in frühe embryonale Letalität (Fassler and Meyer, 1995; Oshima et al., 1996). Der Verlust von *Itgb1* im ventrikulären Myokard der Maus führt zu einer postnatalen kardialen Fibrose und zu funktionellen kardialen Störungen (Shai et al., 2002). Zudem konnte gezeigt werden, dass die *in vitro* Differenzierung *Itgb1*-defizienter ES-Zellen zu Kardiomyozyten stark retardiert ist (Fassler et al., 1996). Im Screen konnte *Itgb1* in dem Zeitfenster der Differenzierung von der ES-Zelle zu reifen EBs als essentiell identifiziert werden. Dieses Ergebnis könnte durch eine verzögerten Expression kardialer Gene und somit auch  $\alpha$ MHC erklärt werden (Fassler et al., 1996). Die nach neun Tagen begonnene positive, von der Aktivität des

$\alpha$ MHC-Promoters abhängige Selektion auf Kardiomyozyten könnte zu dem Verlust der verzögert differenzierenden *Itgb1*-supprimierten Zellen geführt haben.

Die Deletion von *Tgfbr2* zeigt schwere Defekte in der Herzentwicklung, darunter gestörte Myokardialisierung des Mesenchyms des atrialen Septums und des ventrikulären Ausflußtraktes, sowie eine gestörte Herzklappendifferenzierung (Bartram et al., 2001). Es konnte allerdings gezeigt werden, dass die myokardspezifische Deletion von *Tgfbr2* im Entwicklungszeitraum E9.5-E10.5 keine, oder lediglich geringe phänotypische und nicht in Letalität resultierende Veränderung zur Folge hat (Jiao et al., 2006). *Tgfbr2* wurde in dieser Arbeit als kardiogen essentiell identifiziert und wird von den von Bartram et al. (2001) gezeigten Beobachtungen gestützt.

### Zelladhäsionsmoleküle

Eine prinzipiell gut mit diesem Screeningsystem identifizierbare Gengruppe stellen die Zelladhäsionsmoleküle dar. Aufgrund der Generierung von dreidimensionalen CBs in Suspensionskultur und methodisch bedingter Eliminierung von Einzelzellen und sehr kleinen Zellaggregaten, blieben für die Analyse lediglich Zellen mit intakter Fähigkeit zur Ausbildung zellulärer Kontakte. Eines der für die Herzentwicklung essentielles Adhäsionsmolekül ist *Vcam1*, welches bei Defizienz zu schweren Entwicklungsstörungen der Plazenta und des Herzens und demzufolge schließlich zu embryonaler Letalität zwischen den Stadien führt (Kwee et al., 1995). Die Herzen *Vcam1*-defizienter Embryonen zeigen eine Reduktion der kompakten Schicht des Ventrikelmyokards und des Ventrikelseptums. Im Kontext dieses Screens konnte *Vcam1* in dem betrachteten Zeitfenster nicht identifiziert werden, fand sich aber als essentielles Gen während der Differenzierung der EBs wieder.

Ein weiteres mit gestörter Herzentwicklung assoziiertes Zelladhäsionsmolekül ist *Alcam*. In *Xenopus laevis* konnte mit Hilfe Morpholino-vermittelter Reduktion von *Alcam* dessen Notwendigkeit für die Aufrechterhaltung der Expression kardialer Gene im ersten Herzfeld und die Initiation terminaler Differenzierung der Zellen des ersten Herzfeldes gezeigt werden (Gessert et al., 2008). Die Identifikation dieses Gens in dem Screen deutet auf eine ähnlich essentielle Funktion bei Säugetieren hin.

### Zytoskeletale und Sarkomerische Proteine

Verschiedene zytoskeletale und sarkomerische Proteine wurden in dem Screen als essentiell identifiziert, obgleich die Defizienz oder Mutation keines der aufgelisteten

Gene embryonale Letalität zur Folge hat. Dennoch führt der Verlust eines jeden der fokussierten Gene zu kardialen Defekten.

Die Deletion von Desmin hat die progressive Degeneration und Nekrose, begleitet von extensiver Kalzifikation des Myokardiums zur Folge (Milner et al., 1996). Die kardiomyozytenspezifisch induzierte Vinculin-defizienz resultiert häufig in spontaner postnataler Letalität infolge ventrikulärer Tachykardie (Zemljic-Harpf et al., 2007). Desweiteren konnte das Auftreten chronischer Herinsuffizienz durch dilatierte, sowie hypertrophe Kardiomyopathie mit Mutationen der Gene *Ttn*, *Myh6* und *Myh7* in Verbindung gebracht werden (Ching et al., 2005; Gerull et al., 2002; Kaneda et al., 2008).

### Ionenkanäle

Eine tragende Rolle für die Funktionalität von Kardiomyozyten spielen die Ionenkanäle, welche die physiologische Funktionalität des sich entwickelnden Herzens maßgeblich beeinflussen. In diesem Kontext ist der kardiale Natriumkanal *Scn5a* zu nennen, dessen Deletion oder auch Blockade in der Maus zu intrauteriner Letalität durch schwere Defekte der ventrikulären Morphogenese führt (Papadatos et al., 2002). Die Unterdrückung der Genaktivität von *Scn5a* mit Hilfe von Morpholinos im Zebrafisch führt zu einer verminderten Anzahl kardialer Vorläuferzellen und einer deutlich geringeren Expression von *Nkx2.5*, *GATA4* und *Hand2* im anterioren lateralen Mesoderm. Daraus resultieren schwere morphogenetische Defekte in der Bildung der Herzkammern und dem „Herzlooping“ (Chopra et al., 2010). Dieser Phänotyp konnte durch die pharmakologische Blockade des Natrium-Stroms nicht kopiert werden. Somit können diese frühen Defekte nicht auf eine elektrophysiologische Veränderung der Membran zurückgeführt werden und legen eine nicht-elektrische Funktion kardialer Natriumkanäle nahe (Chopra et al., 2010).

Einen ebenfalls embryonal letalen Phänotyp hat die Deletion des sarkoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$  induzierten  $\text{Ca}^{2+}$  Freisetzungskanals (CICR) *Ryr2*, welcher mit morphologischen Veränderungen des Herzschlauchs einhergeht. Die Ursache ist wahrscheinlich die gestörte zelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Homeostase in den embryonalen Kardiomyozyten (Takeshima et al., 1998). Beide Kanäle wurden auch in dem Screen als kardiogenetisch essentielle Faktoren identifiziert.

### Transkriptionsfaktoren

Die für die Validierung herangezogenen kardiogenetisch essentiellen Transkriptionsfaktoren wurden weitestgehend im einleitenden Teil dieser Arbeit im zeitlichen und räumlichen Kontext der Herzentwicklung vorgestellt und beschrieben. Unter den im Screen identifizierten Genen finden sich die „klassischen“ Kandidaten *GATA4*, und *Mef2c*, sowie *Hand2* und *Nr2f2/COUP-TFII*, nicht jedoch *Nkx2.5* und *Tbx5*, deren Abwesenheit durch unzureichende Effizienz der siRNAs im Falle von *Tbx5* und das Fehlen entsprechender siRNAs gegen *Nkx2.5* erklärt werden kann. Die Faktoren *Hand1* und *Tbx20* konnten im Rahmen der EB-Bildung und Differenzierung aus ES-Zellen identifiziert werden.

Gegen *GATA4* gerichtete siRNAs führen zur Blockade der kardiomyozytären Entwicklung, was mit den publizierten Ergebnissen von Grepin et al. (1995) übereinstimmt aber konträr zu den *in vivo* Ergebnissen ist. Wie auch im Rahmen einiger Faktoren anderer Proteinklassen beobachtet, interferiert die Deletion der genannten Gene im Mausmodell, wie zum Beispiel auch im Falle von *GATA4*, *Nkx2.5* und *Nr2f2* nicht mit der Ausbildung von primitiven Kardiomyozyten. Die Deletion dieser Gene zeigt ihre essentielle Funktion bei der regiospezifischen Differenzierung im Kontext der Morphogenese des Herzens. Die Identifikation dieser Gene in dem *in vitro* - Modellsystem zeigt die Sensitivität dieses Screening-Systems. Das für die Auswertung gewählte Zeitfenster kardiomyozytärer Differenzierung beginnt unter Beachtung zuvor diskutierter interner Varianz des Reifegrades mit der Differenzierung bereits gebildeter kardiomyozytärer Zellen, da deren Selektion die Aktivität des  $\alpha$ MHC-Promoters voraussetzt. Der von dort an fokussierte Zeitraum von neun Tagen umfasst demnach die Differenzierung der primitiven Kardiomyozyten in ventrikuläre, atriale, sowie sinusnodale Myozyten und erklärt somit den „Verlust“ von Zellen, welche für ein in diesem Kontext essentielles Gen durch siRNA vermittelte Suppression weitestgehend defizient waren.

Im Screen wurden interessanterweise auch Gene identifiziert, deren *in vivo* Deletion nur einen geringen Einfluß auf die Herzentwicklung und dessen Funktion hat. Zu diesen Genen gehören zum Beispiel einige mit Kationentransport assoziierte Gene, welche *in vivo* bei Deletion erst postnatal oder adult zu Arrhythmien führen. Die Identifikation dieser Gene zeigt die Sensitivität des *in vitro* Systems und ermöglicht somit einen quantitativen „Readout“. Ein möglicher Grund dafür kann Konkurrenz in dem *in vitro*

„batch-Screen“ sein. Der Wettbewerb von Zellen, welche durch die Unterdrückung der Aktivität eines bestimmten Gens biologisch benachteiligt gegenüber „stärkeren“ sind, führt im Laufe der Differenzierung zu einer Amplifikation dieses Effektes, welcher durch den Selektionsdruck zusätzlich gesteigert wird. So können auch schwache Effekte mit dem Screen detektiert werden. Des Weiteren müssen die unterschiedlichen Abhängigkeiten *in vitro* und *in vivo* berücksichtigt werden. So nehmen benachbarte Zellen und Gewebe, sowie andere Konzentrationen von Faktoren und Nährstoffen Einfluß auf die Differenzierung, was *in vitro* bei Fehlen der Aktivität eines bestimmten Gens nicht kompensiert werden kann und einen stärkeren Effekt zur Folge hat. Unabhängig von den biologisch bedingten Möglichkeiten kann auch die Stärke der Hybridisierungssignale und der gewählte Schwellenwert eine Ursache für die Detektion solcher Gene sein. Bereits eine Reduktion der Signalstärke detektierter siRNAs im Verlauf der kardiomyozytären Differenzierung *in vitro* könnte signifikant sein und somit ein quantitatives „Readout“ der Chips ermöglichen.

Zusätzlich ist allerdings die Identifikation bekannter, bereits im Mausmodell deletierter und bewiesenermaßen im Kontext der Herzentwicklung nicht essentieller Gene zu nennen. Eine Mögliche Ursache dafür könnte eine kompensatorische Komponente in der *in vivo* Situation sein, welche aufgrund der Homogenität der *in vitro* generierten Zellpopulation und deren Isolation von angrenzenden, maßgeblich Einfluss nehmenden Zelltypen und Geweben nicht möglich ist.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass von den 23 für die Validierung herangezogenen Genen 18 in dem Screen identifiziert wurden (Tab. 3.2), von denen jedoch 4 (*Itgb1*, *VCAM*, *HAND1*, *Tbx20*) schon früher „weggefallen“ und dementsprechend als essentiell für die Formation und Differenzierung der EBs zu werten sind. Lediglich 5 Kandidaten konnten aufgrund nicht repräsentierter siRNAs oder deren unzureichender Effizienz, sowie der gewählten Stringenzkriterien bei der Datenverarbeitung nicht identifiziert werden (Tab. 3.2). Die Heterogenität der für die Validierung verwendeten Moleküle verschiedenster Proteingruppen in zeitlicher, räumlicher und funktioneller Hinsicht impliziert zusätzlich die Potenz des Screens unter Berücksichtigung der schon zuvor diskutierten limitierenden Faktoren des Testsystems.

#### **4.4.2. Die erfolgreiche Validierung der Screeningresultate bestätigt die biologische Relevanz der identifizierten Gene für die Herzentwicklung**

Die Verifikation der im „batch-Verfahren“ erzielten Resultate ist entscheidend für die Verlässlichkeit der ermittelten Ergebnisse und somit die Aussagekraft des Screens. Jede der vier getesteten siRNAs führte zu einer mindestens 60%igen Reduktion des mRNA-Gehaltes des entsprechenden Zielgens. Zudem verhinderten zwei siRNAs die kardiomyozytäre Differenzierung vollständig, eine weitere bewirkte eine deutliche Reduktion der Anzahl und Größe der CBs (Abb. 3.14). Eine der getesteten siRNAs konnte keine phänotypische Veränderung hervorrufen. Die getesteten siRNAs interferierten nicht mit der initialen Bildung von Kardiomyozyten, was durch den Zeitpunkt der Probenentnahme der EBs zu erklären wäre. Obwohl die siRNA gegen *Suz12* die Differenzierung nicht vollständig inhibieren konnte, wurde sie in dem Sreen identifiziert, welches möglicherweise durch mangelnde Repräsentanz entsprechender Zellen in der Gesamtpopulation der CBs im Screen zu erklären ist.

#### **4.5. Die Annotationsverknüpfung nach GO (Gene Ontology) zeigt die Diversität betroffener biologischer Prozesse und ermöglicht die Identifikation angereicherter funktionell assoziierter Gengruppen**

Eine grundsätzliche Schwierigkeit bei der weiteren Analyse großer Datenmengen ist die systematische Klassifikation der identifizierten Gene. Um zu einer überschaubareren und handhabbaren Charakterisierung der identifizierten Gene zu kommen wurde eine Verknüpfung der Kandidatengene mit entsprechenden allgemein definierten Gen - Ontologien, beziehungsweise Annotationen (GO) unter dem Aspekt der biologischen Funktion vorgenommen. Die speziesunabhängige und multiple Zuordnung der Gene ermöglicht dabei eine weitaus komplexere Darstellung der biologischen Funktion oder Funktionen des entsprechenden Gens und darüber hinaus die Entwicklung eines funktionellen Profils der Gengruppe unter sytemischen Gesichtspunkten.

Von den 3482/3476 identifizierten Genen konnten 2739 mit Annotationen verknüpft und den hierarchisch gegliederten Ebenen entsprechend zugeordnet werden. Die Gesamtdarstellung der biologisch funktionellen Zuordnung der Gengruppe war aus Gründen der Komplexität aufgrund großer Diversität getroffener, sowie angereicherter Knoten nicht möglich, so dass lediglich eine Auswahl dargestellt und beschrieben werden konnte. Bei der Identifikation angereicherter Knoten wurde aufgrund der starken „Verzweigung“ der Ebenen in eine Vielzahl von Subebenen das Programm „*GO Tree Plus*“ verwendet, welches die Zusammenfassung aller Subebenen einer fokussierten Ebene/eines Knotens ermöglicht. Der Hierarchie folgend wurde eine Klassifikation der Gene in die Subebenen von „Biologischer Prozeß“ vorgenommen, bei welchem unter Vernachlässigung von „Metabolischer Prozess“, eine starke Anreicherung von annotierten Genen im Kontext von „Zellulärer Prozess“ erkennbar war und der Zielsetzung dieser Arbeit entsprechend einen sinnvollen Fokus darstellte. In diesem Rahmen zeigte sich mit 344 zugeordneten Genen die auffällige Anreicherung unter dem Aspekt der „Zellkommunikation“, welche sich wiederum hauptsächlich in die Knotenpunkte „Signaltransduktion“ und „Zell-Zell-Signalgabe“ aufteilt.

#### 4.5.1. Der Screen zeigt den Einfluss $\beta$ -Catenin-abhängiger und alternativer Wnt-Signalgebung in der kardiomyozytären Differenzierung *in vitro*

Die differenzierte Darstellung identifizierter Komponenten der Signaltransduktion zeigt den Anteil beteiligter Signalwege unter dem Aspekt der „Regulation der Signaltransduktion“. Die Tabelle 3.3 zeigt ein breites Spektrum beteiligter Signalwege, welche im Kontext der Kardiogenese bereits beschrieben wurden (zur Übersicht: Brand, 2003) und auch hier die Konsistenz der ermittelten Ergebnisse in Hinblick auf ihre theoretische Validierung hervorhebt. Interessanterweise wurde eine große Anzahl von Komponenten der  $\beta$ -Catenin-abhängigen, als auch der  $\beta$ -Catenin-unabhängigen Wnt-Signalwege identifiziert (Tab.3.4).

Die entwicklungsbiologische Relevanz der Wnt-Signaltransduktion für die Regulation essentieller Prozesse, wie Proliferation, Zelldifferenzierung, Migration, sowie Morphogenese konnte in einer Vielzahl von Geweben und Organen gezeigt werden. Dennoch ist ihre Funktion in der frühen Kardiogenese weitestgehend ungeklärt und wird insbesondere für den  $\beta$ -Catenin-abhängigen Wnt-Signalweg kontrovers diskutiert

(Gessert and Kuhl, 2010). In *Drosophila* konnte ein positiver Effekt kanonischer Wnt-Signalgebung auf die Kardiogenese gezeigt werden (Park et al., 1996), während in *Xenopus* und Huhn die Aktivierung der kanonischen Wnt-Signalgebung im anterioren Mesoderm die kardiale Differenzierung verhindert. Gleichsam konnte durch Inhibition des kanonischen Wnt-Signalwegs mittels Crescent und Dickkopf 1 (Dkk1) die Kardiogenese begünstigt werden (Marvin et al., 2001; Schneider and Mercola, 2001). Konträr dazu bewirkt allerdings die Unterdrückung des Wnt/  $\beta$ -Catenin Signalwegs in P19 Terratomkarzinomzellen die Reduktion der Expression kardialer Markergene (Nakamura et al., 2003). In murinen ESCs konnte die Bildung mesodermalen Gewebes durch die Unterdrückung des kanonischen Wnt-Signalwegs inhibiert wird (Huelsken et al., 2000; Lindsley et al., 2006; Liu et al., 1999). Diese Ergebnisse stützen die in dieser Arbeit gezeigte Notwendigkeit kanonischer Wnt-Signalgebung in der frühen Kardiogenese. Neben dem vergleichsweise gut charakterisierten Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg offenbart der Screen auch die Notwendigkeit alternativer Wnt-Signalwege. Anders als der kanonische Wnt-Signalweg, welcher einer linearen Signalkaskade folgt, nutzen die  $\beta$ -Catenin-unabhängigen Wnt-Signalwege verschiedene Zweige der Signalübertragung. Der als Wnt/PCP bezeichnete  $\beta$ -Catenin-unabhängigen Wnt-Signalweg bewirkt durch kleine GTPasen und die Jun Kinase (JNK) Signalkaskade unter anderem die Reorganisationen des Zytoskeletts (James et al., 2008). Die essentielle Funktion des Wnt/ PCP in der Kardiogenese konnte an dem Liganden Wnt11 in verschiedenen Modellen demonstriert werden (Afouda et al., 2008; Pandur et al., 2002; Terami et al., 2004; Ueno et al., 2007). Zudem konnte der fördernde Einfluss von Wnt5a, zusammen mit BMP6 und Sfrp1 auf die kardiomyozytäre Entwicklung gezeigt werden (Chen et al., 2008). Interessanterweise kann keiner dieser Faktoren im Einzelnen diese kardiogene Wirkung erzielen (Chen et al., 2008). So resultiert die Deletion von *Wnt5a* in der Maus nicht in eine Störung der kardialen Differenzierung. Unter diesem Aspekt ist für weitere Analysen der im Screen identifizierten Signalwege die kombinierte Unterdrückung von Faktoren notwendig. Der im Screen identifizierte Rezeptor Frizzled 6 (Frz6, Tab. 3.4) interferiert zwar mit der kardiomyozytären Differenzierung *in vitro*, seine Deletion in der Maus hat allerdings keinen offensichtlichen Einfluß auf die Herzentwicklung (Guo et al., 2004). Dieser Rezeptor fungiert im Kontext des Wnt/PCP (Guo et al., 2004), als auch des Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ -Signalwegs (Kuhl et al., 2000) in Abhängigkeit von Liganden und Effektoren. Der Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ - Signalweg moduliert das intrazelluläre Kalziumniveau. Diese Modulation hat die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC), der

Ca-/Calmodulin Proteinkinase II (CamKII) und dem Nuklear Factor of Aktivated T cells (NFAT) zur Folge. Sowohl die PKC, als auch CamKII und NFAT blockieren unabhängig voneinander den kanonischen Wnt-Signalweg (James et al., 2008). Dieser Aspekt bietet einen interessanten Ansatzpunkt weiterführender Untersuchungen im Kontext der frühen Kardiogenese. Der Wnt/Ca<sup>2+</sup> Signalweg wurde hauptsächlich in gastrulierenden Embryonen von *Xenopus* und *Danio rerio* untersucht, in Säugetieren ist bisher wenig über die Funktion und die von ihm gesteuerten Prozesse bekannt. Dieser Signalweg ist in multipler Hinsicht interessant für weitere Analysen. Er reguliert negativ den kanonischen Wnt-Signalweg auf verschiedenen Ebenen und er reguliert das Kalziumniveau, welches für morphogene Prozesse durch Ca<sup>2+</sup>-Signalgebung notwendig ist. Zudem ist eine Einflussnahme des Wnt/Ca<sup>2+</sup> Signalwegs auf die elektrophysiologische Funktionalität denkbar.

Des Weiteren ist die „Wnt-signalweg-übergreifende“ Beteiligung von Transduktionsfaktoren ein wichtiger Aspekt. Im Screen wurde Dishevelled 1 (Dsh1/ Dvl1) identifiziert. Dsh/Dvl ist eine Komponente aller drei Wnt-Signalwege. Seine selektive Aktivität wird durch die Assoziation mit einer Vielzahl von Proteinen, sowie durch molekulare Modulation (Phosphorylierung, Ubiquitinierung, Degradierung) gesteuert (Gao and Chen, 2010). Desweiteren konnte der sezernierte Modulator Secreted Frizzled Related Protein 4 (Sfrp4) als Repressor des Wnt/PCP, aber auch des  $\beta$ -Catenin-abhängigen Wnt-Signalweg identifiziert werden (Muley et al., 2010).

Das Ziel weiterer Untersuchungen ist die Funktion der identifizierten Komponenten (Tab. 3.4) unter dem Aspekt folgender zentraler Fragen aufzudecken:

- 1. Zu welchem Zeitpunkt/Zu welchen Zeitpunkten ist welcher Wnt-Signalweg essentiell für die kardiomyozytäre Differenzierung?*
- 2. Welcher Prozess/ Welche Prozesse wird/werden durch die verschiedenen Wnt-Signalwege reguliert?*
- 3. Wie werden die Wnt-Signalwege reguliert und wie regulieren sie sich untereinander?*

#### 4.5.2. Gene für Reizleitung und Erregbarkeit beeinflussen die kardiomyozytäre Differenzierung *in vitro*

Ein weiterer äußerst interessanter Aspekt ist die differenzierte Darstellung der interzellulären Signalgabe. Ausnahmslos alle der dieser Ebene zugeordneten Gene konnten mit der „Transmission eines Nervenimpulses“ assoziiert werden (Abb. 3.17). Dieses Ergebnis deutet auf eine starke kardiogenetische Relevanz von Komponenten, welche mit der Erregbarkeit assoziiert werden, hin. Interessanterweise wurde eine ebenfalls starke Anreicherung von Komponenten des Ionentransportes identifiziert (Abb. 3.18).

Die Funktionalität des adulten Herzmuskels ist abhängig von der Erregbarkeit der Kardiomyozyten und der ordnungsgemäßen Reizleitung. Im Gegensatz zu adulten ventrikulären Kardiomyozyten zeigen embryonale Kardiomyozyten spontane Kontraktionen, welche durch Kalzium induziert werden. Zudem können die embryonalen Kardiomyozyten, genau wie die adulten, ihre elektrische Aktivität und Kontraktion mit anderen Zellen synchronisieren, um eine koordinierte Kontraktion zu bewerkstelligen (Kamino, 1991). Im weiteren Verlauf der Differenzierung *in vitro* ändert sich das Expressionsprofil der Ionenkanäle und damit auch die Form des Aktionspotentials dem Zelltyp und dem Differenzierungsstadium entsprechend (Maltsev et al., 1994). Eine hormonelle Modulation der kardialen Aktionspotentiale konnte in intermediären und finalen, nicht aber in frühen Differenzierungsstadien der ES-Zell-abgeleiteten Kardiomyozyten nachgewiesen werden. Die Ionenströme der reifen *in vitro* generierten Kardiomyozyten reflektieren diesen Ergebnissen zu Folge die biophysikalischen und pharmakologischen Eigenschaften adulter Kardiomyozyten (Maltsev et al., 1994). Einige der im Screen identifizierten, mit „Ionentransport“ assoziierten Genen konnten bereits mit Kanalopathien in Verbindung gebracht werden. Diese werden in eine Vielzahl von Typen unterschieden, von denen einige kardiale Arrhythmien zur Folge haben. Dazu gehören unter anderem das Brugada-Syndrom und das LQT-Syndrom. Das Brugada Syndrom birgt ein erhöhtes Risiko für den „sudden cardiac death“ (plötzlichen Herztod) verursacht durch ventrikuläres Kammerflimmern und wird deshalb auch als SUDS (Sudden Unexpected Death Syndrome) bezeichnet. Dieses Syndrom wurde bisher mit der Mutation von sechs Genen assoziiert, zu denen auch die im Screen identifizierten *SCN5A*, *CACNB2* und *KCND3* gehören. Die Identifikation dieser Gene zeigt die Potenz des Screens, auch funktionelle Herzdefekte, wie kardiale Arrhythmien zu erfassen. Der Einfluß dieser Gene auf die Entwicklung und Aufrechterhaltung einer funktionellen

Herzmuskelzelle und deren Regulation bildet einen Ansatzpunkt weiterführender Analysen.

#### 4.5.3. Kalzium: ein Effektor kardialer Differenzierung und funktioneller Regulator

Im Kontext der Differenzierung sind die identifizierten Gene hervorzuheben, welche Proteine für den Transport von  $\text{Ca}^{2+}$  kodieren. Die Relevanz von Kalziumionen und die Regulation ihrer intrazellulären homöostatischen Balance für die kardiale Zelldifferenzierung und die Herzentwicklung konnte anhand der Deletion von Calreticulin (Crt) in Mäuse gezeigt werden (Mesaeli et al., 1999). Die Embryonen starben bereits *in utero* aufgrund eines Herzfehlers. Die *in vitro* Differenzierung der Calreticulin-defizienten ES-Zellen zu EBs zeigte eine Störung der Myofibrillogenese. Zudem führt eine mutationsbedingte verminderte  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungskapazität sarkomerischer Proteine zu einer erheblichen Störung des kardialen Transkriptionsprogramms *in vitro* (Grey et al., 2005; Puceat and Jaconi, 2005). Zudem konnte die frühe Kardiomyogenese im posterioren Teil des Herzfeldes von Hühnerembryonen durch die Blockade der L-type  $\text{Ca}^{2+}$  Kanäle inhibiert werden. Die weitere Differenzierung der bereits determinierten Zellen im anterioren Teil des Herzfeldes ist jedoch nicht betroffen (Linask and Linask, 2010). Diese Ergebnisse zeigen die essentielle Funktion von  $\text{Ca}^{2+}$  in der Spezifikation von Kardiomyozyten und legen eine Beteiligung  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelter Signalgebung nahe. In bereits determinierten Kardiomyozyten wechselt  $\text{Ca}^{2+}$  seine Funktion vom morphogenen zum funktionellen Effektor. Die Stimulation des Muscarinen Acetylcholinrezeptors im Hühnerembryo hat die Freisetzung intrazellulären Kalziums, sowie die schnelle Bildung von Phosphatidylphosphat ( $\text{IP}_3$ ) zur Folge. Zudem bewirkt die Langzeitbehandlung mit Lithiumchlorid ( $\text{LiCl}$ ) eine deutliche Steigerung der  $\text{IP}_3$ -Akkumulation in den kardialen Zellen des gastrulierenden Hühnerembryos (Laasberg, 1990). Diese Beobachtung läßt eine Verbindung zwischen der  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration und der  $\text{PIP}_3$ -Signalübertragung vermuten. Phosphoinositol ist als „second messenger“ auch Teil der alternativen Wnt-Signalgebung. Der durch Wnt11 vermittelte PCP konnte bereits als essentieller Signalweg für die Kardiogenese identifiziert werden (Pandur et al., 2002). Zusammen mit den in diesem Screen identifizierten Komponenten des Wnt- $\text{Ca}^{2+}$  Signalwegs und des PCP (Tab.3.4) ist auch in murinen Zellen eine wie im Hühnerembryo vermutete

Regulation des  $\text{Ca}^{2+}$  Flusses durch alternative Wnt-Signalgebung denkbar. In *Xenopus laevis* konnte gezeigt werden, dass Dishevelled (Dsh, Dvl) eine wichtige Funktion in der  $\beta$ -Catenin-abhängigen Wnt-Signalgebung und auch dem PCP hat. Zudem aktiviert Dsh/Dvl Effektoren des Wnt- $\text{Ca}^{2+}$  Signalwegs, welche die Regulation des  $\text{Ca}^{2+}$ -Flusses, der Proteinkinase C (PKC) und der Ca-/Calmodulin-abhängigen Protein Kinase II (CamKII) beeinflussen (Sheldahl et al., 2003). Erste Ergebnisse zeigen, dass die siRNA-vermittelte Suppression der in Tabelle 3.4 aufgeführten Komponenten der alternativen Wnt-Signalgebung im Einzellansatz mit der kardiomyozytären Differenzierung interferiert. Der „knock down“ ausgewählter Gene, welche mit dem Kalziumionentransport assoziiert werden ist ein Bestandteil gegenwärtiger Analysen und soll den Einfluss von  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelter Signalgebung, insbesondere des Wnt- $\text{Ca}^{2+}$  Signalwegs auf die frühe Kardiogenese aufklären.

Das im Screen abgedeckte Zeitfenster (die Differenzierung vom EB zum CB) beinhaltet neben der Spezifikation auch die Determination der kardiomyozytären Differenzierung. Diese geht mit der Aufnahme der Funktion eines erregbaren, kontraktile Gewebes einher. In diesem Kontext muß die Rolle von  $\text{Ca}^{2+}$  und dessen Transport unter funktionellen Aspekten betrachtet werden.

Der Mechanismus der Initiation und Aufrechterhaltung der spontanen Aktivität embryonaler Kardiomyozyten ist noch weitestgehend unklar. Zum Einen wird angenommen, dass spannungsunabhängige Kalziumoszillationen durch spontane Membrandepolarisation der Zelle die Schrittmacheraktivität der sich bildenden Kardiomyozyten initiiert, ohne die Freisetzung von Kalzium aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) (Puceat and Jaconi, 2005). Konträr dazu konnte gezeigt werden, dass spontane SR Kalziumoszillationen die Kontraktion und elektrische Aktivität auslösen (Mery et al., 2005; Sasse et al., 2007; Viatchenko-Karpinski et al., 1999). Es konnte jedoch eine Koexistenz beider Mechanismen *in vitro* gezeigt werden (Rapila et al., 2008). Diese würde die Spontanaktivität und die Fähigkeit zur Synchronisation der embryonalen Kardiomyozyten erklären. Der Einfluss der spontanen Kontraktion und Synchronisation wird als essentiell für die Vitalität der differenzierenden CBs angenommen und ist dementsprechend ein wichtiger Aspekt, welcher durch detailliertere Analysen abgeklärt werden muß.

### Kalziumkanäle als mögliche Transkriptionsregulatoren

In Neuronen konnte ein Mechanismus gezeigt werden, welcher die Kalziumkanäle mit dem Zellkern verbindet. Es wurde demonstriert, dass ein proteolytisch gespaltenes C-terminales Fragment des L-Type Voltage dependent calcium channels (VDCC)  $Ca_v 1.2$  in den Nukleus translokiert und dort die Transkription einer Vielzahl von Genen reguliert, die wichtig die neuronale Signalgebung und Erregbarkeit sind (Gomez-Ospina et al., 2006). Eine analoge Beobachtung konnte bei  $Ca_v 1.1$  in Skelettmuskel gemacht werden (Hulme et al., 2005; Hulme et al., 2006). In Kardiomyozyten konnte eine konstitutive Spaltung von exogenem  $Ca_v 1.2$  gezeigt werden. Hier wird eine Regulation der nukleären Lokalisation und der Transkriptionsaktivität durch den intrazellulären Kalziumlevel vermutet (Gomez-Ospina et al., 2006).

## 4.6. Ausblick

Die in dieser Arbeit funktionell identifizierten Gene spiegeln die Komplexität der auf die Kardiogenese einflußnehmenden Faktoren wider, bedürfen aber in der individuellen Beurteilung der Funktion innerhalb der Herzentwicklung der biologischen Validierung *in vitro* und *in vivo*. Dieses erfordert zunächst die Analyse der Expression fokussierter Kandidatengene im Rahmen der embryonalen Entwicklung des entsprechend gewählten Modellorganismus.

Die Rolle der identifizierten Ionenkanäle in der kardialen Differenzierung und ihr Einfluss auf die Vitalität der Kardiomyozyten steht im Fokus weiterer Untersuchungen. Insbesondere die Regulation des Kalziumniveaus durch Wnt-vermittelte Signalgebung und die dadurch beeinflussten Prozesse sind dabei von Interesse. Die genauere Analyse der in Tab. 3.4 aufgelisteten Komponenten der Wnt-Signaltransduktion sollen Aufschluss über deren Funktion im Kontext der frühen Herzentwicklung geben. Die Bestätigung im Einzelansatz ist die Basis für weitere Versuche und Bestandteil gegenwärtiger Arbeit.

Eine Möglichkeit der funktionellen Validierung der identifizierten Gene *in vivo* bietet die Generierung von „knock down“- Mäusen unter Verwendung des lentiviralen sh/siRNA-Expressionssystems, auf welchem auch die siRNA-Bibliothek basiert. Dabei könnte durch Infektion isolierter muriner Zygoten und deren anschließende Implantation in Leihmütter, transgene „knock-down“- Embryonen produziert werden, die dann für eine weitere Untersuchung genutzt werden können. Die Tetraploidienaggregation bietet einen weiteren methodischen Ansatz zur Herstellung transgener Mäuse. Dieser Ansatz ermöglicht zudem die „Umgehung“ eines vor Beginn der Herzentwicklung auftretenden

letalen Phänotyps durch die Verwendung eines induzierbaren, oder sogar kardiospezifischen siRNA-Expressionssystems.

Eine weitere Option bietet der Einsatz von Morpholino – Antisenseoligonukleotiden zur Translationsinhibition des Zielgens in dem Modellorganismus Zebrafisch (*Danio rerio*). Der Vorteil in diesem System stellt eine vergleichsweise schnelle und einfache Alternative im Vergleich zu der biologischen Validierung im Mausmodell dar, da im Zebrafisch-Modell rasch eine große Anzahl von Embryonen generiert werden können, die durch Injektion von Morpholinos einfach manipulierbar sind.

## 5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein Versuchsaufbau entwickelt werden, der die Identifikation kardiogenetisch essentieller Gene ermöglicht. Als Modell für die kardiomyozytäre Differenzierung wurde eine transgene ES-Zelllinie verwendet, welche die positive Selektion von Kardiomyozyten während der *in vitro* Differenzierung ermöglicht. Die Differenzierung erfolgte über die Bildung von EBs in Suspensionskultur. Mit Hilfe von Affymetrix Gene Chips und immunhisto-, sowie immunzytochemischen Methoden konnte zum Einen die Reinheit der CBs, als auch deren Vergleichbarkeit mit Zellen aus murinen embryonalen Herzen und murinen neonatalen Kardiomyozyten gezeigt werden. Für die genomweite shRNA-vermittelte Unterdrückung der Genaktivität wurde eine kommerzielle shRNAbibliothek in verwendet. Diese konnte ohne Beeinträchtigung ihrer Komplexität auf Plasmidebene amplifiziert werden. Es wurde sichergestellt, dass die Infektion der Zellen mit Viruspartikeln keine morphologischen Veränderungen zur Folge hat. Zudem konnte durch die Ermittlung der entsprechenden MOI das Risiko einer Mehrfachinfektion der ES-Zellen nahezu ausgeschlossen werden. Als interne funktionelle Kontrolle diente die siRNA-vermittelte Reduktion der *GATA4*-Aktivität, welche die Differenzierung der CBs verhinderte. Der Screen wurde nach Kalkulation des Versuchsumfangs im „batch-Verfahren“ in unabhängigen Versuchen dreimalig durchgeführt. Es wurde zu vier verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen und die enthaltenen siRNA-Sequenzen jeder Population mit Hilfe von Affymetrix Gene Chips hybridisiert. Für die Verrechnung der Hybridisierungssignale zur Identifikation der enthaltenen siRNAs wurde ein komplexer bioinformatischer Algorithmus entwickelt, dessen Entwicklung nicht direkter Bestandteil dieser Arbeit war. Die Ermittlung kardiorelevanter Gene erfolgte über die Bildung von Mengen. Die Anzahl identifizierter Gene ist dabei von der Stringenz abhängig. Die Gene, welche in mindestens 2 von 3 Versuchen auftraten (Stringenz 2/3), wurden mit dem Transkriptom von CBs, Zellen aus murinem Herz E8,5 und murinen neonatalen Kardiomyozyten synchronisiert und somit die Qualität der Ergebnisse verbessert. Der Vergleich der identifizierten Gene mit den bereits bekannten kardiogenetisch essentiellen Faktoren leistete die theoretische Validierung und zeigt zudem die Potenz des Screens. Gleichsam wurden die Grenzen des Screens aufgeführt. Anhand der Unterdrückung der Genaktivität von 4 Kandidaten im Einzelansatz konnten die Ergebnisse des Screens weitestgehend bestätigt werden. Die systematische Klassifikation der Gene erfolgte durch die Annotationsverknüpfung nach

GO. Die Zuordnung der Gene zu einem biologischen Prozess zeigte die Diversität der getroffenen Prozesse und erlaubte gleichzeitig die isolierte Darstellung angereicherter funktioneller Gruppen. So konnte eine deutliche Beteiligung einer Vielzahl verschiedener Signaltransduktionswege gezeigt werden. Interessanterweise wurden Komponenten  $\beta$ -Catenin-abhängiger, sowie  $\beta$ -Catenin-unabhängiger Signalgebung als einflußnehmend auf die kardiomyozytäre Differenzierung ermittelt. Des Weiteren waren Gene, welche mit dem Kationentransport assoziiert sind angereichert. Hier konnte insbesondere durch die identifizierten Komponenten des Kalziumtransports eine Verbindung zu der Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung hergestellt werden. Diese Verbindung bildet die Basis zukünftiger Analysen zur weiteren Aufklärung der Rolle von Kalzium, dessen Transport und einflußnehmender Regulationsmechanismen, wie z. B. der Wnt-Signalgebung, im Kontext der kardiomyozytären Differenzierung *in vitro* und *in vivo*.

## 6. Literatur

Abbas-Terki, T., Blanco-Bose, W., Deglon, N., Pralong, W., and Aebischer, P. (2002). Lentiviral-mediated RNA interference. *Hum Gene Ther* 13, 2197-2201.

Abu-Issa, R., and Kirby, M.L. (2007). Heart field: from mesoderm to heart tube. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23, 45-68.

Adjali, O., Montel-Hagen, A., Swainson, L., Marty, S., Vicente, R., Mongellaz, C., Jacquet, C., Zimmermann, V., and Taylor, N. (2009). In vivo and ex vivo gene transfer in thymocytes and thymocyte precursors. *Methods Mol Biol* 506, 171-190.

Afouda, B.A., Martin, J., Liu, F., Ciau-Uitz, A., Patient, R., and Hoppler, S. (2008). GATA transcription factors integrate Wnt signalling during heart development. *Development* 135, 3185-3190.

Alvarez-Buylla, E.R., Liljegren, S.J., Pelaz, S., Gold, S.E., Burgeff, C., Ditta, G.S., Vergara-Silva, F., and Yanofsky, M.F. (2000). MADS-box gene evolution beyond flowers: expression in pollen, endosperm, guard cells, roots and trichomes. *Plant J* 24, 457-466.

Bartram, U., Molin, D.G., Wisse, L.J., Mohamad, A., Sanford, L.P., Doetschman, T., Speer, C.P., Poelmann, R.E., and Gittenberger-de Groot, A.C. (2001). Double-outlet right ventricle and overriding tricuspid valve reflect disturbances of looping, myocardialization, endocardial cushion differentiation, and apoptosis in TGF-beta(2)-knockout mice. *Circulation* 103, 2745-2752.

Beddington, R.S., and Robertson, E.J. (1999). Axis development and early asymmetry in mammals. *Cell* 96, 195-209.

Belo, J.A., Bachiller, D., Agius, E., Kemp, C., Borges, A.C., Marques, S., Piccolo, S., and De Robertis, E.M. (2000). Cerberus-like is a secreted BMP and nodal antagonist not essential for mouse development. *Genesis* 26, 265-270.

Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., and Hannon, G.J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363-366.

Boheler, K.R., Czyz, J., Tweedie, D., Yang, H.T., Anisimov, S.V., and Wobus, A.M. (2002). Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Circ Res* 91, 189-201.

- Boutros, M., and Mlodzik, M. (1999). Dishevelled: at the crossroads of divergent intracellular signaling pathways. *Mech Dev* 83, 27-37.
- Brand, T. (2003). Heart development: molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis. *Dev Biol* 258, 1-19.
- Bridge, A.J., Pebernard, S., Ducraux, A., Nicoulaz, A.L., and Iggo, R. (2003). Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet* 34, 263-264.
- Brummelkamp, T.R., Bernards, R., and Agami, R. (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296, 550-553.
- Bruneau, B.G., Logan, M., Davis, N., Levi, T., Tabin, C.J., Seidman, J.G., and Seidman, C.E. (1999). Chamber-specific cardiac expression of Tbx5 and heart defects in Holt-Oram syndrome. *Dev Biol* 211, 100-108.
- Bruneau, B.G., Nemer, G., Schmitt, J.P., Charron, F., Robitaille, L., Caron, S., Conner, D.A., Gessler, M., Nemer, M., Seidman, C.E., *et al.* (2001). A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-box transcription factor Tbx5 in cardiogenesis and disease. *Cell* 106, 709-721.
- Buckingham, M., Meilhac, S., and Zaffran, S. (2005). Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat Rev Genet* 6, 826-835.
- Carmell, M.A., and Hannon, G.J. (2004). RNase III enzymes and the initiation of gene silencing. *Nat Struct Mol Biol* 11, 214-218.
- Caudy, A.A., Ketting, R.F., Hammond, S.M., Denli, A.M., Bathorn, A.M., Tops, B.B., Silva, J.M., Myers, M.M., Hannon, G.J., and Plasterk, R.H. (2003). A micrococcal nuclease homologue in RNAi effector complexes. *Nature* 425, 411-414.
- Caudy, A.A., Myers, M., Hannon, G.J., and Hammond, S.M. (2002). Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery. *Genes Dev* 16, 2491-2496.
- Chen, V.C., Stull, R., Joo, D., Cheng, X., and Keller, G. (2008). Notch signaling respecifies the hemangioblast to a cardiac fate. *Nat Biotechnol* 26, 1169-1178.
- Chen, W.V., and Chen, Z. (2004). Differentiation trapping screen in live culture for genes expressed in cardiovascular lineages. *Dev Dyn* 229, 319-327.

- Ching, Y.H., Ghosh, T.K., Cross, S.J., Packham, E.A., Honeyman, L., Loughna, S., Robinson, T.E., Dearlove, A.M., Ribas, G., Bonser, A.J., *et al.* (2005). Mutation in myosin heavy chain 6 causes atrial septal defect. *Nat Genet* 37, 423-428.
- Chopra, S.S., Stroud, D.M., Watanabe, H., Bennett, J.S., Burns, C.G., Wells, K.S., Yang, T., Zhong, T.P., and Roden, D.M. (2010). Voltage-gated sodium channels are required for heart development in zebrafish. *Circ Res* 106, 1342-1350.
- Conlon, F.L., Lyons, K.M., Takaesu, N., Barth, K.S., Kispert, A., Herrmann, B., and Robertson, E.J. (1994). A primary requirement for nodal in the formation and maintenance of the primitive streak in the mouse. *Development* 120, 1919-1928.
- Coucouvani, E., and Martin, G.R. (1999). BMP signaling plays a role in visceral endoderm differentiation and cavitation in the early mouse embryo. *Development* 126, 535-546.
- Cripps, R.M., and Olson, E.N. (2002). Control of cardiac development by an evolutionarily conserved transcriptional network. *Dev Biol* 246, 14-28.
- Darken, R.S., Scola, A.M., Rakeman, A.S., Das, G., Mlodzik, M., and Wilson, P.A. (2002). The planar polarity gene *strabismus* regulates convergent extension movements in *Xenopus*. *EMBO J* 21, 976-985.
- Ding, J., Yang, L., Yan, Y.T., Chen, A., Desai, N., Wynshaw-Boris, A., and Shen, M.M. (1998). *Cripto* is required for correct orientation of the anterior-posterior axis in the mouse embryo. *Nature* 395, 702-707.
- Dudley, A.T., and Robertson, E.J. (1997). Overlapping expression domains of bone morphogenetic protein family members potentially account for limited tissue defects in BMP7 deficient embryos. *Dev Dyn* 208, 349-362.
- Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R.J., Nguyen, M., Trono, D., and Naldini, L. (1998). A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 72, 8463-8471.
- Dush, M.K., and Martin, G.R. (1992). Analysis of mouse *Evx* genes: *Evx-1* displays graded expression in the primitive streak. *Dev Biol* 151, 273-287.
- Egea, J., Erlacher, C., Montanez, E., Burtscher, I., Yamagishi, S., Hess, M., Hampel, F., Sanchez, R., Rodriguez-Manzaneque, M.T., Bosl, M.R., *et al.* (2008). Genetic ablation of FLRT3 reveals a novel morphogenetic function for the anterior visceral endoderm in suppressing mesoderm differentiation. *Genes Dev* 22, 3349-3362.

- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001a). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* *411*, 494-498.
- Elbashir, S.M., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001b). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* *15*, 188-200.
- Elbashir, S.M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001c). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J* *20*, 6877-6888.
- Fassler, R., and Meyer, M. (1995). Consequences of lack of beta 1 integrin gene expression in mice. *Genes Dev* *9*, 1896-1908.
- Fassler, R., Rohwedel, J., Maltsev, V., Bloch, W., Lentini, S., Guan, K., Gullberg, D., Hescheler, J., Addicks, K., and Wobus, A.M. (1996). Differentiation and integrity of cardiac muscle cells are impaired in the absence of beta 1 integrin. *J Cell Sci* *109* ( Pt 13), 2989-2999.
- Fijnvandraat, A.C., van Ginneken, A.C., de Boer, P.A., Ruijter, J.M., Christoffels, V.M., Moorman, A.F., and Lekanne Deprez, R.H. (2003a). Cardiomyocytes derived from embryonic stem cells resemble cardiomyocytes of the embryonic heart tube. *Cardiovasc Res* *58*, 399-409.
- Fijnvandraat, A.C., van Ginneken, A.C., Schumacher, C.A., Boheler, K.R., Lekanne Deprez, R.H., Christoffels, V.M., and Moorman, A.F. (2003b). Cardiomyocytes purified from differentiated embryonic stem cells exhibit characteristics of early chamber myocardium. *J Mol Cell Cardiol* *35*, 1461-1472.
- Filippov, V., Solovyev, V., Filippova, M., and Gill, S.S. (2000). A novel type of RNase III family proteins in eukaryotes. *Gene* *245*, 213-221.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* *391*, 806-811.
- Foley, A., and Mercola, M. (2004). Heart induction: embryology to cardiomyocyte regeneration. *Trends Cardiovasc Med* *14*, 121-125.
- Forlani, S., Lawson, K.A., and Deschamps, J. (2003). Acquisition of Hox codes during gastrulation and axial elongation in the mouse embryo. *Development* *130*, 3807-3819.

Fotaki, V., Larralde, O., Zeng, S., McLaughlin, D., Nichols, J., Price, D.J., Theil, T., and Mason, J.O. (2010). Loss of Wnt8b has no overt effect on hippocampus development but leads to altered Wnt gene expression levels in dorsomedial telencephalon. *Dev Dyn* 239, 284-296.

Freisinger, C.M., Fisher, R.A., and Slusarski, D.C. (2010). Regulator of G protein signaling 3 modulates Wnt5b calcium dynamics and somite patterning. *PLoS Genet* 6, e1001020.

Frka, K., Facchinello, N., Del Vecchio, C., Carpi, A., Curtarello, M., Venerando, R., Angelin, A., Parolin, C., Bernardi, P., Bonaldo, P., *et al.* (2009). Lentiviral-mediated RNAi in vivo silencing of Col6a1, a gene with complex tissue specific expression pattern. *J Biotechnol* 141, 8-17.

Gadue, P., Huber, T.L., Nostro, M.C., Kattman, S., and Keller, G.M. (2005). Germ layer induction from embryonic stem cells. *Exp Hematol* 33, 955-964.

Gao, C., and Chen, Y.G. (2010). Dishevelled: The hub of Wnt signaling. *Cell Signal* 22, 717-727.

Gazit, A., Yaniv, A., Bafico, A., Pramila, T., Igarashi, M., Kitajewski, J., and Aaronson, S.A. (1999). Human frizzled 1 interacts with transforming Wnts to transduce a TCF dependent transcriptional response. *Oncogene* 18, 5959-5966.

Gerull, B., Gramlich, M., Atherton, J., McNabb, M., Trombitas, K., Sasse-Klaassen, S., Seidman, J.G., Seidman, C., Granzier, H., Labeit, S., *et al.* (2002). Mutations of TTN, encoding the giant muscle filament titin, cause familial dilated cardiomyopathy. *Nat Genet* 30, 201-204.

Gessert, S., and Kuhl, M. (2010). The multiple phases and faces of Wnt signaling during cardiac differentiation and development. *Circ Res* 107, 186-199.

Gessert, S., Maurus, D., Brade, T., Walther, P., Pandur, P., and Kuhl, M. (2008). DM-GRASP/ALCAM/CD166 is required for cardiac morphogenesis and maintenance of cardiac identity in first heart field derived cells. *Dev Biol* 321, 150-161.

Gil, J., and Esteban, M. (2000). Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action. *Apoptosis* 5, 107-114.

Glinka, A., Wu, W., Delius, H., Monaghan, A.P., Blumenstock, C., and Niehrs, C. (1998). Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* 391, 357-362.

- Gomez-Ospina, N., Tsuruta, F., Barreto-Chang, O., Hu, L., and Dolmetsch, R. (2006). The C terminus of the L-type voltage-gated calcium channel Ca(V)1.2 encodes a transcription factor. *Cell* *127*, 591-606.
- Grepin, C., Robitaille, L., Antakly, T., and Nemer, M. (1995). Inhibition of transcription factor GATA-4 expression blocks in vitro cardiac muscle differentiation. *Mol Cell Biol* *15*, 4095-4102.
- Grey, C., Mery, A., and Puceat, M. (2005). Fine-tuning in Ca<sup>2+</sup> homeostasis underlies progression of cardiomyopathy in myocytes derived from genetically modified embryonic stem cells. *Hum Mol Genet* *14*, 1367-1377.
- Guo, N., Hawkins, C., and Nathans, J. (2004). Frizzled6 controls hair patterning in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 9277-9281.
- Hamilton, A.J., and Baulcombe, D.C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* *286*, 950-952.
- Hammond, S.M., Boettcher, S., Caudy, A.A., Kobayashi, R., and Hannon, G.J. (2001). Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* *293*, 1146-1150.
- Hart, A.H., Hartley, L., Sourris, K., Stadler, E.S., Li, R., Stanley, E.G., Tam, P.P., Elefanty, A.G., and Robb, L. (2002). Mix11 is required for axial mesendoderm morphogenesis and patterning in the murine embryo. *Development* *129*, 3597-3608.
- Heidel, J.D., Hu, S., Liu, X.F., Triche, T.J., and Davis, M.E. (2004). Lack of interferon response in animals to naked siRNAs. *Nat Biotechnol* *22*, 1579-1582.
- Hoffman, J.I., and Kaplan, S. (2002). The incidence of congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol* *39*, 1890-1900.
- Hoogaars, W.M., Tessari, A., Moorman, A.F., de Boer, P.A., Hagoort, J., Soufan, A.T., Campione, M., and Christoffels, V.M. (2004). The transcriptional repressor Tbx3 delineates the developing central conduction system of the heart. *Cardiovasc Res* *62*, 489-499.
- Houweling, A.C., Somi, S., Van Den Hoff, M.J., Moorman, A.F., and Christoffels, V.M. (2002). Developmental pattern of ANF gene expression reveals a strict localization of cardiac chamber formation in chicken. *Anat Rec* *266*, 93-102.

- Houweling, A.C., van Borren, M.M., Moorman, A.F., and Christoffels, V.M. (2005). Expression and regulation of the atrial natriuretic factor encoding gene *Nppa* during development and disease. *Cardiovasc Res* 67, 583-593.
- Hrabchak, C., Ringuette, M., and Woodhouse, K. (2008). Recombinant mouse SPARC promotes parietal endoderm differentiation and cardiomyogenesis in embryoid bodies. *Biochem Cell Biol* 86, 487-499.
- Huelsken, J., Vogel, R., Brinkmann, V., Erdmann, B., Birchmeier, C., and Birchmeier, W. (2000). Requirement for beta-catenin in anterior-posterior axis formation in mice. *J Cell Biol* 148, 567-578.
- Hulme, J.T., Konoki, K., Lin, T.W., Gritsenko, M.A., Camp, D.G., 2nd, Bigelow, D.J., and Catterall, W.A. (2005). Sites of proteolytic processing and noncovalent association of the distal C-terminal domain of CaV1.1 channels in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 5274-5279.
- Hulme, J.T., Yarov-Yarovoy, V., Lin, T.W., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (2006). Autoinhibitory control of the CaV1.2 channel by its proteolytically processed distal C-terminal domain. *J Physiol* 576, 87-102.
- Ilagan, R., Abu-Issa, R., Brown, D., Yang, Y.P., Jiao, K., Schwartz, R.J., Klingensmith, J., and Meyers, E.N. (2006). *Fgf8* is required for anterior heart field development. *Development* 133, 2435-2445.
- James, R.G., Conrad, W.H., and Moon, R.T. (2008). Beta-catenin-independent Wnt pathways: signals, core proteins, and effectors. *Methods Mol Biol* 468, 131-144.
- Jiao, K., Langworthy, M., Batts, L., Brown, C.B., Moses, H.L., and Baldwin, H.S. (2006). Tgfbeta signaling is required for atrioventricular cushion mesenchyme remodeling during in vivo cardiac development. *Development* 133, 4585-4593.
- Kamino, K. (1991). Optical approaches to ontogeny of electrical activity and related functional organization during early heart development. *Physiol Rev* 71, 53-91.
- Kaneda, T., Naruse, C., Kawashima, A., Fujino, N., Oshima, T., Namura, M., Nunoda, S., Mori, S., Konno, T., Ino, H., *et al.* (2008). A novel beta-myosin heavy chain gene mutation, p.Met531Arg, identified in isolated left ventricular non-compaction in humans, results in left ventricular hypertrophy that progresses to dilation in a mouse model. *Clin Sci (Lond)* 114, 431-440.

Kelly R.G., Franco D., Moorman A.F.M., Buckingham M. (1999): Regionalization of Transcriptional Potential in the Myocardium. In: Harvey R.P. and Rosenthal N. (Hrsg.) Heart Development, 1. Auflage, 333-355, Academic Press, London

Ketting, R.F., Haverkamp, T.H., van Luenen, H.G., and Plasterk, R.H. (1999). Mut-7 of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNaseD. *Cell* 99, 133-141.

Kim, D.H., Longo, M., Han, Y., Lundberg, P., Cantin, E., and Rossi, J.J. (2004). Interferon induction by siRNAs and ssRNAs synthesized by phage polymerase. *Nat Biotechnol* 22, 321-325.

Kinder, S.J., Tsang, T.E., Quinlan, G.A., Hadjantonakis, A.K., Nagy, A., and Tam, P.P. (1999). The orderly allocation of mesodermal cells to the extraembryonic structures and the anteroposterior axis during gastrulation of the mouse embryo. *Development* 126, 4691-4701.

Kinder, S.J., Tsang, T.E., Wakamiya, M., Sasaki, H., Behringer, R.R., Nagy, A., and Tam, P.P. (2001). The organizer of the mouse gastrula is composed of a dynamic population of progenitor cells for the axial mesoderm. *Development* 128, 3623-3634.

Kispert, A., and Herrmann, B.G. (1994). Immunohistochemical analysis of the Brachyury protein in wild-type and mutant mouse embryos. *Dev Biol* 161, 179-193.

Kraus, F., Haenig, B., and Kispert, A. (2001). Cloning and expression analysis of the mouse T-box gene *tbx20*. *Mech Dev* 100, 87-91.

Kuhl, M., Geis, K., Sheldahl, L.C., Pukrop, T., Moon, R.T., and Wedlich, D. (2001). Antagonistic regulation of convergent extension movements in *Xenopus* by Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca<sup>2+</sup> signaling. *Mech Dev* 106, 61-76.

Kuhl, M., Sheldahl, L.C., Malbon, C.C., and Moon, R.T. (2000). Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II is stimulated by Wnt and Frizzled homologs and promotes ventral cell fates in *Xenopus*. *J Biol Chem* 275, 12701-12711.

Kumar, A., Lualdi, M., Lewandoski, M., and Kuehn, M.R. (2008). Broad mesodermal and endodermal deletion of *Nodal* at postgastrulation stages results solely in left/right axial defects. *Dev Dyn* 237, 3591-3601.

Kuo, C.T., Morrisey, E.E., Anandappa, R., Sigrist, K., Lu, M.M., Parmacek, M.S., Soudais, C., and Leiden, J.M. (1997). GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. *Genes Dev* 11, 1048-1060.

- Kwee, L., Baldwin, H.S., Shen, H.M., Stewart, C.L., Buck, C., Buck, C.A., and Labow, M.A. (1995). Defective development of the embryonic and extraembryonic circulatory systems in vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) deficient mice. *Development* *121*, 489-503.
- Laasberg, T. (1990). Ca<sup>2+</sup>(+)-mobilizing receptors of gastrulating chick embryo. *Comp Biochem Physiol C* *97*, 9-12.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680-685.
- Lawson, K.A., Dunn, N.R., Roelen, B.A., Zeinstra, L.M., Davis, A.M., Wright, C.V., Korving, J.P., and Hogan, B.L. (1999). Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev* *13*, 424-436.
- Lee, N.S., Dohjima, T., Bauer, G., Li, H., Li, M.J., Ehsani, A., Salvaterra, P., and Rossi, J. (2002). Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. *Nat Biotechnol* *20*, 500-505.
- Liberatore, C.M., Searcy-Schrick, R.D., and Yutzey, K.E. (2000). Ventricular expression of *tbx5* inhibits normal heart chamber development. *Dev Biol* *223*, 169-180.
- Lin, Q., Schwarz, J., Bucana, C., and Olson, E.N. (1997). Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C. *Science* *276*, 1404-1407.
- Linask, K.L., and Linask, K.K. (2010). Calcium channel blockade in embryonic cardiac progenitor cells disrupts normal cardiac cell differentiation. *Stem Cells Dev* *19*, 1959-1965.
- Lindsley, R.C., Gill, J.G., Kyba, M., Murphy, T.L., and Murphy, K.M. (2006). Canonical Wnt signaling is required for development of embryonic stem cell-derived mesoderm. *Development* *133*, 3787-3796.
- Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L., and Hannon, G.J. (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* *305*, 1437-1441.
- Liu, P., Wakamiya, M., Shea, M.J., Albrecht, U., Behringer, R.R., and Bradley, A. (1999). Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation. *Nat Genet* *22*, 361-365.
- Lyons, I., Parsons, L.M., Hartley, L., Li, R., Andrews, J.E., Robb, L., and Harvey, R.P. (1995). Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene *Nkx2-5*. *Genes Dev* *9*, 1654-1666.

Maltsev, V.A., Rohwedel, J., Hescheler, J., and Wobus, A.M. (1993). Embryonic stem cells differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types. *Mech Dev* 44, 41-50.

Maltsev, V.A., Wobus, A.M., Rohwedel, J., Bader, M., and Hescheler, J. (1994). Cardiomyocytes differentiated in vitro from embryonic stem cells developmentally express cardiac-specific genes and ionic currents. *Circ Res* 75, 233-244.

Martinez, J., and Tuschl, T. (2004). RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. *Genes Dev* 18, 975-980.

Marvin, M.J., Di Rocco, G., Gardiner, A., Bush, S.M., and Lassar, A.B. (2001). Inhibition of Wnt activity induces heart formation from posterior mesoderm. *Genes Dev* 15, 316-327.

McCulley, D.J., Kang, J.O., Martin, J.F., and Black, B.L. (2008). BMP4 is required in the anterior heart field and its derivatives for endocardial cushion remodeling, outflow tract septation, and semilunar valve development. *Dev Dyn* 237, 3200-3209.

Meacham, C.E., Ho, E.E., Dubrovsky, E., Gertler, F.B., and Hemann, M.T. (2009). In vivo RNAi screening identifies regulators of actin dynamics as key determinants of lymphoma progression. *Nat Genet* 41, 1133-1137.

Meno, C., Ito, Y., Saijoh, Y., Matsuda, Y., Tashiro, K., Kuhara, S., and Hamada, H. (1997). Two closely-related left-right asymmetrically expressed genes, *lefty-1* and *lefty-2*: their distinct expression domains, chromosomal linkage and direct neuralizing activity in *Xenopus* embryos. *Genes Cells* 2, 513-524.

Mery, A., Aimond, F., Menard, C., Mikoshiba, K., Michalak, M., and Puceat, M. (2005). Initiation of embryonic cardiac pacemaker activity by inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent calcium signaling. *Mol Biol Cell* 16, 2414-2423.

Mesaeli, N., Nakamura, K., Zvaritch, E., Dickie, P., Dziak, E., Krause, K.H., Opas, M., MacLennan, D.H., and Michalak, M. (1999). Calreticulin is essential for cardiac development. *J Cell Biol* 144, 857-868.

Milner, D.J., Weitzer, G., Tran, D., Bradley, A., and Capetanaki, Y. (1996). Disruption of muscle architecture and myocardial degeneration in mice lacking desmin. *J Cell Biol* 134, 1255-1270.

Miyagishi, M., and Taira, K. (2002). U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells. *Nat Biotechnol* 20, 497-500.

Molkentin, J.D., Lin, Q., Duncan, S.A., and Olson, E.N. (1997). Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev* 11, 1061-1072.

Moretti, A., Caron, L., Nakano, A., Lam, J.T., Bernshausen, A., Chen, Y., Qyang, Y., Bu, L., Sasaki, M., Martin-Puig, S., *et al.* (2006). Multipotent embryonic isl1+ progenitor cells lead to cardiac, smooth muscle, and endothelial cell diversification. *Cell* 127, 1151-1165.

Moss, E.G., and Taylor, J.M. (2003). Small-interfering RNAs in the radar of the interferon system. *Nat Cell Biol* 5, 771-772.

Muley, A., Majumder, S., Kolluru, G.K., Parkinson, S., Viola, H., Hool, L., Arfuso, F., Ganss, R., Dharmarajan, A., and Chatterjee, S. (2010). Secreted frizzled-related protein 4: an angiogenesis inhibitor. *Am J Pathol* 176, 1505-1516.

Murry, C.E., and Keller, G. (2008). Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell* 132, 661-680.

Nagy, II, Railo, A., Rapila, R., Hast, T., Sormunen, R., Tavi, P., Rasanen, J., and Vainio, S.J. (2009). Wnt-11 signalling controls ventricular myocardium development by patterning N-cadherin and {beta}-catenin expression. *Cardiovasc Res*.

Nakamura, T., Sano, M., Songyang, Z., and Schneider, M.D. (2003). A Wnt- and beta -catenin-dependent pathway for mammalian cardiac myogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5834-5839.

Niederreither, K., Vermot, J., Messaddeq, N., Schuhbaur, B., Chambon, P., and Dolle, P. (2001). Embryonic retinoic acid synthesis is essential for heart morphogenesis in the mouse. *Development* 128, 1019-1031.

Nykanen, A., Haley, B., and Zamore, P.D. (2001). ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* 107, 309-321.

Oshima, M., Oshima, H., and Taketo, M.M. (1996). TGF-beta receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis. *Dev Biol* 179, 297-302.

Paddison, P.J., Caudy, A.A., and Hannon, G.J. (2002). Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 1443-1448.

Paddison, P.J., Silva, J.M., Conklin, D.S., Schlabach, M., Li, M., Aruleba, S., Balija, V., O'Shaughnessy, A., Gnoj, L., Scobie, K., *et al.* (2004). A resource for large-scale RNA-interference-based screens in mammals. *Nature* 428, 427-431.

Pandur, P., Lasche, M., Eisenberg, L.M., and Kuhl, M. (2002). Wnt-11 activation of a non-canonical Wnt signalling pathway is required for cardiogenesis. *Nature* *418*, 636-641.

Papadatos, G.A., Wallerstein, P.M., Head, C.E., Ratcliff, R., Brady, P.A., Benndorf, K., Saumarez, R.C., Trezise, A.E., Huang, C.L., Vandenberg, J.I., *et al.* (2002). Slowed conduction and ventricular tachycardia after targeted disruption of the cardiac sodium channel gene *Scn5a*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 6210-6215.

Parameswaran, M., and Tam, P.P. (1995). Regionalisation of cell fate and morphogenetic movement of the mesoderm during mouse gastrulation. *Dev Genet* *17*, 16-28.

Park, M., and Moon, R.T. (2002). The planar cell-polarity gene *stbm* regulates cell behaviour and cell fate in vertebrate embryos. *Nat Cell Biol* *4*, 20-25.

Park, M., Wu, X., Golden, K., Axelrod, J.D., and Bodmer, R. (1996). The wingless signaling pathway is directly involved in *Drosophila* heart development. *Dev Biol* *177*, 104-116.

Paul, C.P., Good, P.D., Winer, I., and Engelke, D.R. (2002). Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nat Biotechnol* *20*, 505-508.

Pedrazzini, T. (2007). Control of cardiogenesis by the notch pathway. *Trends Cardiovasc Med* *17*, 83-90.

Perea-Gomez, A., Vella, F.D., Shawlot, W., Oulad-Abdelghani, M., Chazaud, C., Meno, C., Pfister, V., Chen, L., Robertson, E., Hamada, H., *et al.* (2002). Nodal antagonists in the anterior visceral endoderm prevent the formation of multiple primitive streaks. *Dev Cell* *3*, 745-756.

Pereira, F.A., Qiu, Y., Zhou, G., Tsai, M.J., and Tsai, S.Y. (1999). The orphan nuclear receptor COUP-TFII is required for angiogenesis and heart development. *Genes Dev* *13*, 1037-1049.

Pfeifer, A., Ikawa, M., Dayn, Y., and Verma, I.M. (2002). Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 2140-2145.

Pikkarainen, S., Tokola, H., Kerkela, R., and Ruskoaho, H. (2004). GATA transcription factors in the developing and adult heart. *Cardiovasc Res* *63*, 196-207.

Przemeck, G.K., Heinzmann, U., Beckers, J., and Hrabe de Angelis, M. (2003). Node and midline defects are associated with left-right development in Delta1 mutant embryos. *Development* *130*, 3-13.

Puceat, M., and Jaconi, M. (2005). Ca<sup>2+</sup> signalling in cardiogenesis. *Cell Calcium* *38*, 383-389.

Rapila, R., Korhonen, T., and Tavi, P. (2008). Excitation-contraction coupling of the mouse embryonic cardiomyocyte. *J Gen Physiol* *132*, 397-405.

Riley, P., Anson-Cartwright, L., and Cross, J.C. (1998). The Hand1 bHLH transcription factor is essential for placentation and cardiac morphogenesis. *Nat Genet* *18*, 271-275.

Rossant, J., and Tam, P.P. (2009). Blastocyst lineage formation, early embryonic asymmetries and axis patterning in the mouse. *Development* *136*, 701-713.

Saiki, R.K., Bugawan, T.L., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. (1986). Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* *324*, 163-166.

Sasaki, H., and Hogan, B.L. (1993). Differential expression of multiple fork head related genes during gastrulation and axial pattern formation in the mouse embryo. *Development* *118*, 47-59.

Sasse, P., Zhang, J., Cleemann, L., Morad, M., Hescheler, J., and Fleischmann, B.K. (2007). Intracellular Ca<sup>2+</sup> oscillations, a potential pacemaking mechanism in early embryonic heart cells. *J Gen Physiol* *130*, 133-144.

Sauer H., Wartenberg M., Sachinidis A., Hescheler J. (2004): Development of the Cardiovascular System in Embryoid Bodies Derived from Embryonic Stem Cells. In: Sell S. (Hrsg.) Stem Cells Handbook, 1. Auflage, 229-238, Humana Press Inc., Totowa, NJ

Schneider, V.A., and Mercola, M. (2001). Wnt antagonism initiates cardiogenesis in *Xenopus laevis*. *Genes Dev* *15*, 304-315.

Schultheiss, T.M., Burch, J.B., and Lassar, A.B. (1997). A role for bone morphogenetic proteins in the induction of cardiac myogenesis. *Genes Dev* *11*, 451-462.

Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., and Zamore, P.D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* *115*, 199-208.

Shai, S.Y., Harpf, A.E., Babbitt, C.J., Jordan, M.C., Fishbein, M.C., Chen, J., Omura, M., Leil, T.A., Becker, K.D., Jiang, M., *et al.* (2002). Cardiac myocyte-specific excision of the beta1 integrin gene results in myocardial fibrosis and cardiac failure. *Circ Res* 90, 458-464.

Sheldahl, L.C., Slusarski, D.C., Pandur, P., Miller, J.R., Kuhl, M., and Moon, R.T. (2003). Dishevelled activates Ca<sup>2+</sup> flux, PKC, and CamKII in vertebrate embryos. *J Cell Biol* 161, 769-777.

Singh, M.K., Christoffels, V.M., Dias, J.M., Trowe, M.O., Petry, M., Schuster-Gossler, K., Burger, A., Ericson, J., and Kispert, A. (2005). Tbx20 is essential for cardiac chamber differentiation and repression of Tbx2. *Development* 132, 2697-2707.

Sledz, C.A., Holko, M., de Veer, M.J., Silverman, R.H., and Williams, B.R. (2003). Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol* 5, 834-839.

Solloway, M.J., and Harvey, R.P. (2003). Molecular pathways in myocardial development: a stem cell perspective. *Cardiovasc Res* 58, 264-277.

Solloway, M.J., and Robertson, E.J. (1999). Early embryonic lethality in Bmp5;Bmp7 double mutant mice suggests functional redundancy within the 60A subgroup. *Development* 126, 1753-1768.

Somi, S., Buffing, A.A., Moorman, A.F., and Van Den Hoff, M.J. (2004). Dynamic patterns of expression of BMP isoforms 2, 4, 5, 6, and 7 during chicken heart development. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 279, 636-651.

Srinivas, S. (2006). The anterior visceral endoderm-turning heads. *Genesis* 44, 565-572.

Srivastava, D. (1999). HAND proteins: molecular mediators of cardiac development and congenital heart disease. *Trends Cardiovasc Med* 9, 11-18.

Srivastava, D., Thomas, T., Lin, Q., Kirby, M.L., Brown, D., and Olson, E.N. (1997). Regulation of cardiac mesodermal and neural crest development by the bHLH transcription factor, dHAND. *Nat Genet* 16, 154-160.

Sui, G., Soohoo, C., Affar el, B., Gay, F., Shi, Y., and Forrester, W.C. (2002). A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 5515-5520.

Sun, X., Meyers, E.N., Lewandoski, M., and Martin, G.R. (1999). Targeted disruption of Fgf8 causes failure of cell migration in the gastrulating mouse embryo. *Genes Dev* 13, 1834-1846.

- Svoboda, P., Stein, P., Hayashi, H., and Schultz, R.M. (2000). Selective reduction of dormant maternal mRNAs in mouse oocytes by RNA interference. *Development* *127*, 4147-4156.
- Tabara, H., Sarkissian, M., Kelly, W.G., Fleenor, J., Grishok, A., Timmons, L., Fire, A., and Mello, C.C. (1999). The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell* *99*, 123-132.
- Takeshima, H., Komazaki, S., Hirose, K., Nishi, M., Noda, T., and Iino, M. (1998). Embryonic lethality and abnormal cardiac myocytes in mice lacking ryanodine receptor type 2. *EMBO J* *17*, 3309-3316.
- Takeuchi, J.K., Mileikowskaia, M., Koshiba-Takeuchi, K., Heidt, A.B., Mori, A.D., Arruda, E.P., Gertsenstein, M., Georges, R., Davidson, L., Mo, R., *et al.* (2005). Tbx20 dose-dependently regulates transcription factor networks required for mouse heart and motoneuron development. *Development* *132*, 2463-2474.
- Tam, P.P., and Loebel, D.A. (2007). Gene function in mouse embryogenesis: get set for gastrulation. *Nat Rev Genet* *8*, 368-381.
- Tam P.P. and Schoenwolf G.C. (1999): Cardiac Fate Maps: Lineage Allocation, Morphogenetic Movement, and Cell Commitment. In: Harvey R.P. and Rosenthal N. (Hrsg.) *Heart Development*, 1.Auflage, 3-18, Academic Press, London
- Terami, H., Hidaka, K., Katsumata, T., Iio, A., and Morisaki, T. (2004). Wnt11 facilitates embryonic stem cell differentiation to Nkx2.5-positive cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* *325*, 968-975.
- Tuschl, T., Zamore, P.D., Lehmann, R., Bartel, D.P., and Sharp, P.A. (1999). Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev* *13*, 3191-3197.
- Ueno, S., Weidinger, G., Osugi, T., Kohn, A.D., Golob, J.L., Pabon, L., Reinecke, H., Moon, R.T., and Murry, C.E. (2007). Biphasic role for Wnt/beta-catenin signaling in cardiac specification in zebrafish and embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 9685-9690.
- VandenDriessche, T., Thorrez, L., Naldini, L., Follenzi, A., Moons, L., Berneman, Z., Collen, D., and Chuah, M.K. (2002). Lentiviral vectors containing the human immunodeficiency virus type-1 central polypurine tract can efficiently transduce nondividing hepatocytes and antigen-presenting cells in vivo. *Blood* *100*, 813-822.

- Varlet, I., Collignon, J., and Robertson, E.J. (1997). nodal expression in the primitive endoderm is required for specification of the anterior axis during mouse gastrulation. *Development* *124*, 1033-1044.
- Viatchesenko-Karpinski, S., Fleischmann, B.K., Liu, Q., Sauer, H., Gryshchenko, O., Ji, G.J., and Hescheler, J. (1999). Intracellular Ca<sup>2+</sup> oscillations drive spontaneous contractions in cardiomyocytes during early development. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 8259-8264.
- Voiculescu, O., Bertocchini, F., Wolpert, L., Keller, R.E., and Stern, C.D. (2007). The amniote primitive streak is defined by epithelial cell intercalation before gastrulation. *Nature* *449*, 1049-1052.
- Wianny, F., and Zernicka-Goetz, M. (2000). Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nat Cell Biol* *2*, 70-75.
- Wilkinson, D.G., Bhatt, S., and Herrmann, B.G. (1990). Expression pattern of the mouse T gene and its role in mesoderm formation. *Nature* *343*, 657-659.
- Winnier, G., Blessing, M., Labosky, P.A., and Hogan, B.L. (1995). Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev* *9*, 2105-2116.
- Xu, C., Liguori, G., Adamson, E.D., and Persico, M.G. (1998). Specific arrest of cardiogenesis in cultured embryonic stem cells lacking Cripto-1. *Dev Biol* *196*, 237-247.
- Xu, C., Liguori, G., Persico, M.G., and Adamson, E.D. (1999). Abrogation of the Cripto gene in mouse leads to failure of postgastrulation morphogenesis and lack of differentiation of cardiomyocytes. *Development* *126*, 483-494.
- Yan, K.S., Yan, S., Farooq, A., Han, A., Zeng, L., and Zhou, M.M. (2003). Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. *Nature* *426*, 468-474.
- Yu, J.Y., DeRuiter, S.L., and Turner, D.L. (2002). RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 6047-6052.
- Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A., and Bartel, D.P. (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* *101*, 25-33.

Zemljic-Harpf, A.E., Miller, J.C., Henderson, S.A., Wright, A.T., Manso, A.M., Elsherif, L., Dalton, N.D., Thor, A.K., Perkins, G.A., McCulloch, A.D., *et al.* (2007). Cardiac-myocyte-specific excision of the vinculin gene disrupts cellular junctions, causing sudden death or dilated cardiomyopathy. *Mol Cell Biol* 27, 7522-7537.

Zhang, H., and Bradley, A. (1996). Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development. *Development* 122, 2977-2986.

Zhang, H., Kolb, F.A., Brondani, V., Billy, E., and Filipowicz, W. (2002). Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *EMBO J* 21, 5875-5885.

Zheng, L., Liu, J., Batalov, S., Zhou, D., Orth, A., Ding, S., and Schultz, P.G. (2004). An approach to genomewide screens of expressed small interfering RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 135-140.

Zhou, X., Quann, E., and Gallicano, G.I. (2003). Differentiation of nonbeating embryonic stem cells into beating cardiomyocytes is dependent on downregulation of PKC beta and zeta in concert with upregulation of PKC epsilon. *Dev Biol* 255, 407-422.

Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R.J., Bukovsky, A., Quiroz, D., Naldini, L., and Trono, D. (1998). Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J Virol* 72, 9873-9880.

Zweigerdt, R., Burg, M., Willbold, E., Abts, H., and Ruediger, M. (2003). Generation of confluent cardiomyocyte monolayers derived from embryonic stem cells in suspension: a cell source for new therapies and screening strategies. *Cytotherapy* 5, 399-413.

### **Zusätzliche Literatur**

Projektarbeit von Ludmila Schulz (2008) im Fach Bioinformatik an der Fachhochschule Friedberg-Giessen:“ siRNA-basierendes Affymetrix GeneChip<sup>®</sup> Analyseverfahren zur Identifizierung von Genen, die zur Differenzierung von Kardiomyozyten beitragen“

## 7. Anhang

### 7.1. Oligodesoxynukleotide zu Detektierungszwecken (PCR)

Rex-1	Forward: 5'-GATTTCCACTGTGGCTCTG Reverse: 5'-CCTTTCTGGCCACTTGTC	56°C
OCT3/4	Forward: 5'-ATACGAGTTCTGCGGAGGGATG Reverse: 5'-CGGGCACTTCAGAAACATGG	60°C
Nanog	Forward: 5'-TTTCAGAAATCCCTTCCCTC Reverse: 5'-GCTGAGGTACTTCTGCTTCTG	58°C
Cmyc	Forward: GCTGGAGATGATGACCGAG Reverse: 5'-GCTCTTCTTCAGAGTCGCTGC	58°C
Sox2	Forward: 5'-GGCAGCTACAGCATGATGCAGG Reverse: 5'-AGGTACATGCTGATCATGTCC	63°C
Klf4	Forward: 5'-GAGGAACTGCTGAACAGCAGG Reverse: 5'-CGGTAGTGCCTGGTCAGTTCA	60°C
CcnB1	Forward: 5'-TACCTACAGGGTCGTGAAG Reverse: 5'-TGTGCTGCTCGACGTCAACC	58°C
Flk1	Forward: 5'-TTGACAATAGAAAGTGTGACC Reverse: 5'-TTCTTCTAGCTGCCAGTACCA	60°C
Isl1	Forward: 5'-ATCGAGTGTTCGCTGTGTAGC Reverse: 5'-AAGCAGGCTGATCTATGTTCG	60°C
Nkx2.5	Forward: 5'-TTCAAGCCCGAGGCTACTCTG Reverse: 5'-TCTTGACCTGCGTGGACGTG	64°C
GATA4	Forward: 5'-TCAATTGTGGGGCCATGTCCA Reverse: 5'-TGAATCCCCTCCTTCCGCATT	62°C
Nppa	Forward: 5'-ACCTGCTAGACCACCTGGAGGAG Reverse: 5'-CCTTGGCTGTTATCTTCGGTACCGG	65°C
$\alpha$ -MHC	Forward: 5'-GAATGACGGACGCCAGATG Reverse: 5'-ACTGGCAGCCACTTGTAGGG	64°C
HPRT	Forward: 5'-CACAGGACTAGAACACCTGC Reverse: 5'-GCTGGTGAAAAGGACCTCT	56°C
Epc1	Forward: 5'-ATACAGTTTCCAATTCCT Reverse: 5'-CCATCCTAACAGTCTTCC	58°C
Ezh2	Forward: 5'-TAAAGAACTCACGGAGCAGC Reverse: 5'-TGCTTCTCTGTCACTGTCTG	58°C
Suz12	Forward: 5'-ACTCTGAACTGCCGTAAACTG Reverse: 5'-TTCTTCAATTTGAGTAATGG	56°C

Itgb1 Forward: 5'-AAGAGTGCCGTGACAACCTG 60°C  
Reverse: 5'-AGTCATGGTTCAGATGC

## 7.2. spezielle Oligodesoxynukleotide

Fwd\_GNH 5'-TGCATGTCGCTATGTGTTCTGGGA 60°C  
Rev\_GNH 5'-CTCCCAGGCTCAGATCTGGTCTAA 60°C  
NFwd\_GNH\_bio 5' Biotin-CTTCCTGTCAGA 45°C/68°C  
NRev\_GNH 5'-AGAAGCAAAAAGCAGAATCGAAGAA 45°C/68°C  
GNH\_cDNA 5'-ACACACTACTTGAAGCACTCAAGGCAA

## 7.3. Oligodesoxynukleotide zur Klonierung

Gepaarte („annealed“) Oligodesoxynukleotide, Zielsequenz unterstrichen, Basenaustausch in blau.

### Gata4\_si1 GACGGGACACTACCTGTGC

5`GATCCGGACGGGACACTACCTGTGACTTCCTGTCAGAGCACAGGTAGTGTCCCGTCTTTTTG  
GCCTGCCCTGTGATGGACACTGAAGGACAGTCTCGTGTCCATCACAGGGCAGAAAACTTAA 5`

### Gata4\_si2 CCTCTTGCAATGCGGAAGG

5`GATCCGCCTCTTGCAATGCGGAAGACTTCCTGTCAGACCTTCCGCATTGCAAGAGGTTTTG  
GCGGAGAACGTTACGCCTTCTGAAGGACAGTCTGGAAGGCGTAACGTTCTCCAAAACTTAA 5`

### Gata4\_si3 GTGCTGTCTGCTCTGAAGC

5`GATCCGGTGCTGTCTGCTCTGAAGACTTCCTGTCAGAGCTTCAGAGCAGACAGCACTTTTTG  
GCCACGACAGACGAGACTTCTGAAGGACAGTCTCGAAGTCTCGTCTGTGCTGAAAACTTAA 5`

### siItgb1 GCAGCATCTTAGTCACAGTAGGGTAGT

5`GATCCGGCAGCATCTTAGTCACAGTAGGGTAGTCTTCCTGTCAGAACTACCCTACTGTGACTAAGATGCTGCTTTTTG  
CCGTCGTAGAATCAGTGTCTATCCCATCAGAAGGACAGTCTTGATGGGATGACACTGATTCTACGACGAAAACTTAA 5`

### siEzh2 TATATACATGCTTGATTGTGTCTGCAG

5`GATCCTATATACATGCTTGATTGTGTCTGCAGCTTCCTGTCAGACTGCAGACACAATCAAGCATGTATATATTTTTG  
GATATATGTACGAACTAACACAGACGCTCGAAGGACAGTCTGACGCTGTGTGTAGTTCGTACATATATAAAAACTTAA 5`

### siSuz12 GTA AAC CAGAAGATGTCACACCTTGTT

5`GATCCGTA AAC CAGAAGATGTCACACCTTGTTCTTCCTGTCAGAAACAAGGTGTGACATCTTCTGGTTTTACTTTTTG  
GCATTTGGTCTTCTACAGTGTGGAACAAGAAGGACAGTCTTGTTCACACTGTAGAAGACCAAAATGAAAACTTAA 5`

### siEpc1 TAGCTAGCTCATGAATTTCTGTTGTAT

5`GATCCTAGCTAGCTCATGAATTTCTGTTGTATCTTCCTGTCAGAAATACAACAGAAATTCATGAGCTAGCTATTTTTG  
GATCGATCGAGTACTTAAAGACAACATAGAAGGACAGTCTTATGTTGTCTTTAAGTACTCGATCGATAAAAACTTAA 5`

## 7.4. Plasmide

Plasmidbibliothek „GeneNet Mouse 40K siRNA Lentiviral (HIV) Library in pSIH-H1-Puro“

(Fa. BioCat #SI622PB-1-SBI)

pSIH-H1-Puro                      BioCat #SI500A-1-SBI

pSIH-H1-GFP                      BioCat #SI501A-1-SBI

pMDLg/pRRE

pMD2.G (CMV-VSVG)

pRSV-Rev

## 7.5. Identifizierte Gene

Die im Screen identifizierten Gene der Stringenz „2/3“ sind folgend, entsprechend des Gensymbols, alphabetisch geordnet aufgelistet.

	Probe Set ID	Gensymbol	Genname
1	1435818_at	---	Adult male corpus striatum cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:C030020B06 product:unclassifiable, full insert sequence
2	1420189_at	---	---
3	1425421_at	---	MRNA similar to RIKEN cDNA C330014O21 gene (cDNA clone MGC:27967 IMAGE:3594973)
4	1426145_at	---	---
5	1427743_at	---	NF-IL6 3'UTR-specific binding protein (Nbf) mRNA, partial sequence
6	1427795_s_at	---	Mus musculus, clone IMAGE:5068294
7	1428027_at	---	BIC noncoding mRNA, complete sequence
8	1431249_at	---	---
9	1431286_at	---	---
10	1431378_at	---	---
11	1431779_at	---	---
12	1431819_at	---	---
13	1434327_at	---	---
14	1434346_at	---	---
15	1435187_at	---	2 days neonate sympathetic ganglion cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:7120484E16 product:unclassifiable, full insert sequence
16	1435260_at	---	---
17	1435407_at	---	Adult male medulla oblongata cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:6332404K23 product:unclassifiable, full insert sequence
18	1435555_at	---	---
19	1435583_at	---	Adult male corpora quadrigemina cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:B230358D11 product:unclassifiable, full insert sequence
20	1435688_at	---	Adult male testis cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:4933415P20 product:unclassifiable, full insert sequence
21	1436139_at	---	Adult male medulla oblongata cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:6330445K22 product:unclassifiable, full insert sequence
22	1436459_at	---	CDNA clone IMAGE:3667370
23	1436630_at	---	16 days neonate thymus cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:A130039E19 product:unclassifiable, full insert sequence
24	1436748_at	---	---
25	1436829_at	---	Adult male adrenal gland cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:7330443D06 product:unclassifiable, full insert sequence
26	1437400_at	---	Adult male corpus striatum cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:C030044L04 product:unclassifiable, full insert sequence
27	1437577_at	---	16 days neonate thymus cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:A130003H01 product:unclassifiable, full insert sequence
28	1437766_at	---	---
29	1438273_at	---	---
30	1438907_at	---	3 days neonate thymus cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:A630033C13 product:unclassifiable, full insert sequence
31	1438929_at	---	--

32	1439125_at	---	Adult male medulla oblongata cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:6330512I01 product:unclassifiable, full insert sequence
33	1439165_at	---	Adult male hypothalamus cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:A230073L11 product:hypothetical protein, full insert sequence
34	1439291_at	---	Adult male corpus striatum cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:C030002G09 product:unclassifiable, full insert sequence
35	1439625_at	---	6 days neonate skin cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:A030005K07 product:similar to Serine 2 ultra high sulfur protein [Mus musculus], full insert sequence
36	1439744_at	---	---
37	1439789_at	---	---
38	1439877_at	---	---
39	1439887_at	---	16 days embryo head cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:C130025B04 product:unclassifiable, full insert sequence
40	1440040_at	---	---
41	1440121_at	---	0 day neonate kidney cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:D630050A03 product:unclassifiable, full insert sequence
42	1440131_at	---	---
43	1440396_at	---	---
44	1440439_at	---	---
45	1440565_at	---	---
46	1440567_at	---	---
47	1440660_at	---	---
48	1440773_at	---	---
49	1440960_at	---	3 days neonate thymus cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:A630060L04 product:unclassifiable, full insert sequence
50	1441016_at	---	Adult male corpora quadrigemina cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:B230340D10 product:unclassifiable, full insert sequence
51	1441046_at	---	---
52	1441065_at	---	Adult male corpora quadrigemina cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:B230204J04 product:unclassifiable, full insert sequence
53	1441108_at	---	12 days embryo eyeball cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:D230035N06 product:unclassifiable, full insert sequence
54	1441111_at	---	15 days embryo embryonic body below diaphragm cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:8230401F05 product:unclassifiable, full insert sequence
55	1441177_at	---	---
56	1441217_at	---	---
57	1441289_at	---	Transcribed locus
58	1441405_at	---	---
59	1441428_at	---	Adult male liver tumor cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:C730003N19 product:unclassifiable, full insert sequence
60	1441555_at	---	12 days embryo eyeball cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:D230017I19 product:unclassifiable, full insert sequence
61	1441567_at	---	---

62	1441666_at	---	Visual cortex cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:K530010N24 product:unclassifiable, full insert sequence
63	1442068_at	---	Mus musculus, clone IMAGE:5363897, mRNA
64	1442097_at	---	0 day neonate kidney cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:D630011L08 product:hypothetical protein, full insert sequence
65	1442108_at	---	2 days pregnant adult female ovary cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:E330039N10 product:unclassifiable, full insert sequence
66	1442250_at	---	---
67	1442269_at	---	Adult male epididymis cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:9230001K01 product:unclassifiable, full insert sequence
68	1442279_at	---	---
69	1442293_at	---	---
70	1442370_at	---	10 days neonate cortex cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:A830028E23 product:unclassifiable, full insert sequence
71	1442447_at	---	---
72	1442556_at	---	12 days embryo male wolffian duct includes surrounding region cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:6720430M22 product:unclassifiable, full insert sequence
73	1442595_at	---	CDNA, clone:Y1G0114E07, strand:unspecified
74	1442641_at	---	---
75	1442642_at	---	---
76	1442715_at	---	Adult male corpora quadrigemina cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:B230318C15 product:unclassifiable, full insert sequence
77	1442720_at	---	---
78	1442750_at	---	Transcribed locus
79	1442790_at	---	---
80	1442825_at	---	16 days embryo head cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:C130071K15 product:unclassifiable, full insert sequence
81	1442995_at	---	---
82	1442997_at	---	16 days embryo head cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:C130012D05 product:unclassifiable, full insert sequence
83	1443003_at	---	---
84	1443031_at	---	15 days embryo head cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:D930037E02 product:unclassifiable, full insert sequence
85	1443053_at	---	---
86	1443109_at	---	---
87	1443157_at	---	12 days embryo eyeball cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:D230035K05 product:unclassifiable, full insert sequence
88	1443179_at	---	10 days neonate cerebellum cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:B930033J02 product:unclassifiable, full insert sequence
89	1443195_at	---	---
90	1443209_at	---	---
91	1443221_at	---	---
92	1443230_at	---	CDNA clone IMAGE:6514950
93	1443273_at	---	---

94	1443305_at	---	13 days embryo heart cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:D330014J04 product:unclassifiable, full insert sequence
95	1443347_at	---	---
96	1443363_at	---	---
97	1443526_at	---	Adult female vagina cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:9930032B21 product:unclassifiable, full insert sequence
98	1443543_at	---	Adult male olfactory brain cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:6430501N10 product:unclassifiable, full insert sequence
99	1443607_at	---	---
100	1443697_at	---	---
101	1443912_at	---	---
102	1444099_at	---	---
103	1444107_at	---	---
104	1444114_at	---	13 days embryo heart cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:D330001F19 product:hypothetical protein, full insert sequence
105	1444153_at	---	16 days neonate heart cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:D830033B01 product:unclassifiable, full insert sequence
106	1444191_at	---	Adult male aorta and vein cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:A530044F20 product:unclassifiable, full insert sequence
107	1444263_at	---	13 days embryo lung cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:D430023H22 product:unclassifiable, full insert sequence
108	1444292_at	---	---
109	1444351_at	---	0 day neonate thymus cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:A430040B20 product:unclassifiable, full insert sequence
110	1444363_at	---	10 days neonate cortex cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:A830040F21 product:unclassifiable, full insert sequence
111	1444477_at	---	---
112	1444498_at	---	---
113	1444528_at	---	16 days embryo lung cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:8430428I21 product:unclassifiable, full insert sequence
114	1444554_at	---	Mus musculus, clone IMAGE:1282582, mRNA
115	1444578_at	---	3 days neonate thymus cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:A630045B12 product:hypothetical protein, full insert sequence
116	1444586_at	---	---
117	1444704_at	---	7 days neonate cerebellum cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:A730050L22 product:unclassifiable, full insert sequence
118	1444710_at	---	Adult male epididymis cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:9230020K05 product:unclassifiable, full insert sequence
119	1444722_at	---	Activated spleen cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:F830212J19 product:proteasome (prosome, macropain) activator subunit 4, full insert sequence
120	1444741_at	---	---
121	1444762_at	---	---
122	1444939_at	---	---
123	1444963_at	---	---

124	1445202_at	---	0 day neonate cerebellum cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:C230022P04 product:unclassifiable, full insert sequence
125	1445299_at	---	Transcribed locus
126	1445307_at	---	12 days embryo male wolffian duct includes surrounding region cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:6720430F13 product:unclassifiable, full insert sequence
127	1445338_at	---	---
128	1445397_at	---	---
129	1445423_at	---	---
130	1445593_at	---	Adult male testis cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:4930414J05 product:unclassifiable, full insert sequence
131	1445612_at	---	Activated spleen cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:F830035K10 product:unclassifiable, full insert sequence
132	1445621_at	---	16 days embryo lung cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:8430408E23 product:unclassifiable, full insert sequence
133	1445734_at	---	Transcribed locus
134	1445759_at	---	---
135	1445764_at	---	16 days neonate heart cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:D830006O14 product:unclassifiable, full insert sequence
136	1445774_at	---	---
137	1445778_at	---	---
138	1445846_at	---	Adult male adrenal gland cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:7330409L06 product:unclassifiable, full insert sequence
139	1445887_at	---	10 days neonate cerebellum cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:6530409F06 product:unclassifiable, full insert sequence
140	1445900_at	---	---
141	1445965_at	---	---
142	1446022_at	---	---
143	1446069_at	---	---
144	1446128_at	---	---
145	1446151_at	---	---
146	1446155_at	---	11 days embryo head cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:6230415F21 product:unclassifiable, full insert sequence
147	1446176_at	---	---
148	1446200_at	---	12 days embryo spinal ganglion cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:D130001N06 product:unclassifiable, full insert sequence
149	1446216_at	---	Adult male cecum cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:9130202G13 product:unclassifiable, full insert sequence
150	1446255_at	---	---
151	1446312_at	---	10 days neonate cortex cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:A830082H14 product:unclassifiable, full insert sequence
152	1446338_at	---	---
153	1446361_at	---	---
154	1446392_at	---	---
155	1446395_at	---	---
156	1446422_at	---	---

157	1446439_at	---	---
158	1446461_at	---	---
159	1446484_at	---	---
160	1446521_at	---	---
161	1446565_at	---	15 days embryo head cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:D930012I10 product:unclassifiable, full insert sequence
162	1446569_at	---	---
163	1446609_at	---	---
164	1446623_at	---	---
165	1446700_at	---	---
166	1446867_at	---	---
167	1446898_at	---	---
168	1446967_at	---	0 day neonate eyeball cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:E130106L10 product:unclassifiable, full insert sequence
169	1447022_at	---	Adult male testis cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:4930402K03 product:unclassifiable, full insert sequence
170	1447044_at	---	---
171	1447045_at	---	---
172	1447094_at	---	---
173	1447309_at	---	Adult male testis cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:4930539H17 product:unclassifiable, full insert sequence
174	1447313_at	---	---
175	1447322_at	---	---
176	1447337_at	---	---
177	1447342_at	---	---
178	1447378_at	---	Transcribed locus
179	1447457_at	---	---
180	1447459_at	---	---
181	1447558_at	---	---
182	1447589_at	---	CDNA clone IMAGE:6490193
183	1447605_at	---	Adult pancreas islet cells cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:C820020L02 product:unclassifiable, full insert sequence
184	1447706_at	---	---
185	1448047_at	---	Adult male medulla oblongata cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:6330524D21 product:unclassifiable, full insert sequence
186	1451885_at	---	---
187	1451945_at	---	---
188	1452402_at	---	Mus musculus, clone IMAGE:5356448, mRNA
189	1452886_at	---	0 day neonate cerebellum cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:C230071G16 product:unclassifiable, full insert sequence
190	1453615_at	---	---
191	1454016_at	---	---
192	1454105_at	---	---
193	1454275_at	---	---
194	1455270_at	---	---
195	1456760_at	---	CDNA clone IMAGE:6813709
196	1456808_at	---	---
197	1456970_at	---	0 day neonate cerebellum cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:C230088L22 product:unclassifiable, full insert sequence

<b>198</b>	1457053_at	---	12 days embryo male wolffian duct includes surrounding region cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:6720490M24 product:unclassifiable, full insert sequence
<b>199</b>	1457099_at	---	12 days embryo eyeball cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:D230033C15 product:unclassifiable, full insert sequence
<b>200</b>	1457151_at	---	Mus musculus, clone IMAGE:1527712, mRNA
<b>201</b>	1457399_at	---	0 day neonate thymus cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:A430106O20 product:unclassifiable, full insert sequence
<b>202</b>	1457512_at	---	16 days neonate thymus cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:A130094L10 product:unclassifiable, full insert sequence
<b>203</b>	1457547_at	---	Adult male spinal cord cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:A330081M13 product:unclassifiable, full insert sequence
<b>204</b>	1458002_at	---	---
<b>205</b>	1458025_at	---	---
<b>206</b>	1458060_at	---	10 days lactation, adult female mammary gland cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:D730006C24 product:unclassifiable, full insert sequence
<b>207</b>	1458081_at	---	13 days embryo heart cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:D330025O06 product:unclassifiable, full insert sequence
<b>208</b>	1458094_at	---	15 days embryo male testis cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:8030405F19 product:Y box protein 1, pseudogene 2, full insert sequence
<b>209</b>	1458188_at	---	---
<b>210</b>	1458236_at	---	12 days embryo eyeball cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:D230015O18 product:hypothetical protein, full insert sequence
<b>211</b>	1458876_at	---	Transcribed locus
<b>212</b>	1458911_at	---	---
<b>213</b>	1458916_at	---	---
<b>214</b>	1458979_at	---	---
<b>215</b>	1459285_at	---	---
<b>216</b>	1459633_at	---	---
<b>217</b>	1459763_at	---	Adult male testis cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:1700074D10 product:unclassifiable, full insert sequence
<b>218</b>	1419842_at	---	3 days neonate thymus cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:A630024N11 product:unclassifiable, full insert sequence
<b>219</b>	1419902_at	---	---
<b>220</b>	1420153_at	---	---
<b>221</b>	1420234_at	---	---
<b>222</b>	1420256_x_at	---	---
<b>223</b>	1422319_at	---	---
<b>224</b>	1432708_at	---	---
<b>225</b>	1434982_at	---	Transcribed locus
<b>226</b>	1435150_at	---	2 days neonate sympathetic ganglion cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:7120492P10 product:hypothetical protein, full insert sequence
<b>227</b>	1435262_at	---	Transcribed locus

228	1435579_at	---	Adult male spinal cord cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:A330066H24 product:unclassifiable, full insert sequence
229	1436254_at	---	Transcribed locus
230	1436259_at	---	Transcribed locus
231	1436527_at	---	Transcribed locus, moderately similar to NP_001035835.1 insulin-like growth factor 2 [Homo sapiens]
232	1437068_at	---	Transcribed locus
233	1437276_at	---	Mammary gland RCB-0527 Jyg-MC(B) cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:G930008D05 product:unclassifiable, full insert sequence
234	1437727_at	---	---
235	1438084_at	---	Transcribed locus
236	1438301_at	---	Transcribed locus
237	1438848_at	---	Transcribed locus
238	1438926_at	---	Transcribed locus, strongly similar to NP_066357.1 protein L36a [Homo sapiens]
239	1439343_at	---	Transcribed locus
240	1439344_at	---	Transcribed locus
241	1439608_at	---	Transcribed locus
242	1439621_at	---	17 days embryo kidney cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:I920178P20 product:unclassifiable, full insert sequence
243	1439828_at	---	Transcribed locus
244	1440127_a_at	---	Transcribed locus
245	1440136_at	---	Transcribed locus
246	1440184_at	---	Transcribed locus
247	1440366_at	---	Transcribed locus
248	1440433_at	---	---
249	1440492_at	---	---
250	1440527_at	---	Transcribed locus
251	1440592_at	---	Transcribed locus
252	1440631_at	---	---
253	1440712_at	---	---
254	1440742_at	---	Transcribed locus
255	1440807_at	---	---
256	1441004_at	---	Transcribed locus
257	1441067_at	---	---
258	1441116_at	---	---
259	1441126_at	---	---
260	1441267_at	---	Transcribed locus
261	1441283_at	---	---
262	1441292_at	---	Transcribed locus
263	1441299_at	---	Transcribed locus
264	1441343_at	---	Transcribed locus
265	1441364_at	---	---
266	1441389_at	---	Transcribed locus
267	1441399_at	---	---
268	1441475_at	---	---
269	1441530_at	---	---
270	1441556_at	---	Transcribed locus
271	1441636_at	---	Transcribed locus
272	1441678_at	---	---
273	1441769_at	---	---

274	1441797_at	---	0 day neonate eyeball cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:E130307M10 product:unclassifiable, full insert sequence
275	1441818_at	---	Transcribed locus
276	1441943_x_at	---	---
277	1441971_at	---	Transcribed locus
278	1441974_at	---	Transcribed locus
279	1442102_at	---	---
280	1442118_at	---	Transcribed locus
281	1442126_at	---	Transcribed locus
282	1442146_at	---	---
283	1442225_at	---	Transcribed locus
284	1442230_at	---	---
285	1442287_at	---	Transcribed locus
286	1442313_at	---	---
287	1442323_at	---	Transcribed locus
288	1442431_at	---	Transcribed locus
289	1442444_at	---	Transcribed locus
290	1442515_at	---	---
291	1442525_at	---	Transcribed locus
292	1442550_at	---	Transcribed locus
293	1442564_at	---	---
294	1442572_at	---	Transcribed locus
295	1442758_at	---	Transcribed locus
296	1442834_at	---	---
297	1442854_at	---	Transcribed locus
298	1442879_at	---	---
299	1442961_at	---	---
300	1442964_at	---	---
301	1442989_at	---	Transcribed locus
302	1443009_at	---	Transcribed locus
303	1443024_at	---	Transcribed locus
304	1443035_at	---	---
305	1443115_at	---	Transcribed locus
306	1443223_at	---	Transcribed locus
307	1443239_at	---	---
308	1443249_at	---	---
309	1443284_at	---	---
310	1443300_at	---	---
311	1443398_at	---	Transcribed locus
312	1443410_at	---	---
313	1443501_at	---	Transcribed locus
314	1443545_at	---	---
315	1443571_at	---	Transcribed locus
316	1443578_at	---	Transcribed locus, weakly similar to XP_001093876.1 zinc finger, CCHC domain containing 2 [Macaca mulatta]
317	1443610_at	---	Transcribed locus
318	1443626_at	---	Transcribed locus
319	1443647_at	---	---
320	1443673_x_at	---	---
321	1443731_at	---	Transcribed locus
322	1443777_at	---	---
323	1443872_at	---	Transcribed locus
324	1443882_at	---	Transcribed locus

325	1444136_at	---	Transcribed locus
326	1444198_at	---	---
327	1444227_at	---	Transcribed locus
328	1444244_at	---	Transcribed locus
329	1444250_at	---	---
330	1444376_at	---	---
331	1444385_at	---	---
332	1444423_at	---	Transcribed locus
333	1444470_x_at	---	---
334	1444509_at	---	Transcribed locus
335	1444562_at	---	Transcribed locus
336	1444642_at	---	Transcribed locus
337	1444733_at	---	Transcribed locus
338	1444787_at	---	---
339	1444788_x_at	---	---
340	1444800_at	---	---
341	1444808_at	---	---
342	1444810_at	---	---
343	1444831_at	---	10 days neonate cerebellum cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:B930011N23 product:unclassifiable, full insert sequence
344	1444839_at	---	---
345	1444859_at	---	---
346	1444877_at	---	---
347	1444885_at	---	Transcribed locus
348	1444928_at	---	---
349	1444946_at	---	Transcribed locus
350	1444948_at	---	---
351	1444973_at	---	---
352	1444988_at	---	---
353	1444991_at	---	---
354	1444997_at	---	---
355	1445002_at	---	---
356	1445007_at	---	---
357	1445083_at	---	Transcribed locus
358	1445096_at	---	---
359	1445097_at	---	---
360	1445111_at	---	Transcribed locus
361	1445116_at	---	Transcribed locus
362	1445117_at	---	Transcribed locus
363	1445118_at	---	---
364	1445129_at	---	---
365	1445144_at	---	---
366	1445164_at	---	---
367	1445216_at	---	---
368	1445294_at	---	Adult male corpora quadrigemina cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:B230354C23 product:unclassifiable, full insert sequence
369	1445333_at	---	---
370	1445401_at	---	---
371	1445429_at	---	---
372	1445461_at	---	Transcribed locus
373	1445478_at	---	---
374	1445515_at	---	---
375	1445555_at	---	Transcribed locus

376	1445556_at	---	Transcribed locus
377	1445623_at	---	Transcribed locus
378	1445627_at	---	---
379	1445645_at	---	---
380	1445655_at	---	Transcribed locus
381	1445664_at	---	---
382	1445679_at	---	Transcribed locus, moderately similar to XP_001234013.1 similar to bacterial IS-element [Gallus gallus]
383	1445712_at	---	Transcribed locus
384	1445758_at	---	---
385	1445762_at	---	---
386	1445769_at	---	---
387	1445770_at	---	---
388	1445793_at	---	---
389	1445800_at	---	---
390	1445803_at	---	Transcribed locus
391	1445812_at	---	---
392	1445819_at	---	---
393	1445823_at	---	---
394	1445832_at	---	---
395	1445839_at	---	---
396	1445845_at	---	Transcribed locus
397	1445853_at	---	---
398	1445903_at	---	---
399	1445916_at	---	---
400	1445955_at	---	---
401	1445966_at	---	Transcribed locus
402	1445979_at	---	---
403	1445988_at	---	---
404	1446011_at	---	Transcribed locus
405	1446019_at	---	---
406	1446076_at	---	Transcribed locus
407	1446081_at	---	---
408	1446187_at	---	---
409	1446222_at	---	---
410	1446242_at	---	Transcribed locus
411	1446250_at	---	---
412	1446289_at	---	---
413	1446307_at	---	---
414	1446372_at	---	Transcribed locus
415	1446488_at	---	---
416	1446529_at	---	---
417	1446548_at	---	---
418	1446562_at	---	Transcribed locus
419	1446583_at	---	---
420	1446596_at	---	---
421	1446607_at	---	Transcribed locus
422	1446653_at	---	---
423	1446723_at	---	---
424	1446740_at	---	Transcribed locus
425	1446741_at	---	Transcribed locus
426	1446785_at	---	Transcribed locus
427	1446795_at	---	---

428	1446840_at	---	11 days embryo head cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:6230412O08 product:unclassifiable, full insert sequence
429	1446843_at	---	---
430	1446853_at	---	---
431	1446864_at	---	Transcribed locus
432	1446927_at	---	---
433	1446935_at	---	---
434	1446969_at	---	---
435	1446996_at	---	---
436	1447050_at	---	---
437	1447062_at	---	---
438	1447088_at	---	Transcribed locus
439	1447111_at	---	---
440	1447121_at	---	Transcribed locus
441	1447125_at	---	Transcribed locus
442	1447145_at	---	---
443	1447180_at	---	Transcribed locus
444	1447220_at	---	---
445	1447237_at	---	Transcribed locus
446	1447241_at	---	Transcribed locus
447	1447329_at	---	---
448	1447379_at	---	---
449	1447386_at	---	---
450	1447387_at	---	---
451	1447388_at	---	---
452	1447390_at	---	---
453	1447399_at	---	---
454	1447413_at	---	Transcribed locus
455	1447419_at	---	---
456	1447434_at	---	Transcribed locus
457	1447435_at	---	---
458	1447442_at	---	Transcribed locus
459	1447497_at	---	Transcribed locus
460	1447509_at	---	---
461	1447527_at	---	---
462	1447533_at	---	Transcribed locus
463	1447714_x_at	---	Transcribed locus, moderately similar to XP_001099796.1 ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F0 complex, subunit C3 (subunit 9) [Macaca mulatta]
464	1447763_at	---	---
465	1447777_x_at	---	---
466	1447916_at	---	---
467	1447988_at	---	---
468	1448053_at	---	Transcribed locus
469	1449598_at	---	---
470	1449599_at	---	---
471	1449737_at	---	---
472	1449774_at	---	---
473	1449779_at	---	---
474	1449780_at	---	---
475	1451881_at	---	---
476	1454336_at	---	---
477	1455292_x_at	---	Transcribed locus

478	1455744_at	---	Transcribed locus
479	1455961_at	---	Transcribed locus
480	1456157_at	---	---
481	1456160_at	---	Transcribed locus
482	1456376_at	---	Transcribed locus
483	1457055_at	---	Transcribed locus
484	1457201_at	---	---
485	1457207_at	---	---
486	1457362_at	---	Transcribed locus
487	1457549_at	---	---
488	1457610_at	---	---
489	1457653_at	---	---
490	1457872_at	---	---
491	1457885_at	---	---
492	1457934_at	---	12 days embryo head cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:3010054D21 product:unclassifiable, full insert sequence
493	1457949_at	---	Transcribed locus
494	1457988_at	---	Transcribed locus
495	1457998_at	---	Transcribed locus
496	1458092_at	---	---
497	1458263_at	---	Transcribed locus
498	1458280_at	---	Transcribed locus
499	1458298_at	---	Transcribed locus
500	1458312_at	---	Transcribed locus
501	1458360_at	---	---
502	1458477_at	---	3 days neonate thymus cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:A630098N09 product:unclassifiable, full insert sequence
503	1458517_at	---	Transcribed locus
504	1458566_at	---	Transcribed locus
505	1458633_at	---	Transcribed locus
506	1458704_at	---	Transcribed locus
507	1458708_at	---	---
508	1458713_at	---	---
509	1458747_at	---	9 days embryo whole body cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:D030010C06 product:unclassifiable, full insert sequence
510	1458797_at	---	---
511	1458806_at	---	---
512	1458827_at	---	Transcribed locus
513	1458936_at	---	---
514	1459090_at	---	---
515	1459117_at	---	Transcribed locus
516	1459158_at	---	---
517	1459166_at	---	---
518	1459167_at	---	---
519	1459187_at	---	Transcribed locus
520	1459278_at	---	---
521	1459297_at	---	---
522	1459335_at	---	---
523	1459459_at	---	---
524	1459511_at	---	Transcribed locus
525	1459516_at	---	Transcribed locus
526	1459582_at	---	---

527	1459629_at	---	Transcribed locus, weakly similar to XP_424258.2 hypothetical protein [Gallus gallus]
528	1459637_at	---	---
529	1459730_at	---	Transcribed locus
530	1459781_x_at	---	---
531	1459830_at	---	Transcribed locus
532	1459862_at	---	---
533	1459969_x_at	---	Transcribed locus
534	1460096_at	---	---
535	1460115_at	---	Transcribed locus
536	1460577_at	---	Transcribed locus
537	1460632_at	---	Transcribed locus
538	1428544_at	0610007L01Rik	RIKEN cDNA 0610007L01 gene
539	1417055_at	0610009D07Rik	RIKEN cDNA 0610009D07 gene
540	1426467_s_at	0610037L13Rik	RIKEN cDNA 0610037L13 gene
541	1430930_at	0610038B21Rik	RIKEN cDNA 0610038B21 gene
542	1460375_at	0610038D11Rik	RIKEN cDNA 0610038D11 gene
543	1435109_at	0710007G10Rik /// Tmem175	RIKEN cDNA 0710007G10 gene /// transmembrane protein 175
544	1434214_at	0910001L09Rik	RIKEN cDNA 0910001L09 gene
545	1439126_at	1110007A13Rik	RIKEN cDNA 1110007A13 gene
546	1451302_at	1110012L19Rik	RIKEN cDNA 1110012L19 gene
547	1428994_s_at	1110017I16Rik	RIKEN cDNA 1110017I16 gene
548	1430194_at	1110018H23Rik	RIKEN cDNA 1110018H23 gene
549	1434441_at	1110018J18Rik	RIKEN cDNA 1110018J18 gene
550	1436213_a_at	1110028C15Rik	RIKEN cDNA 1110028C15 gene
551	1455219_at	1110030E23Rik	RIKEN cDNA 1110030E23 gene
552	1437617_x_at	1110034G24Rik	RIKEN cDNA 1110034G24 gene
553	1424805_a_at	1110039B18Rik	RIKEN cDNA 1110039B18 gene
554	1457779_at	1110046J04Rik	RIKEN cDNA 1110046J04 gene
555	1441757_at	1190002F15Rik	RIKEN cDNA 1190002F15 gene
556	1429286_at	1190003M12Rik	RIKEN cDNA 1190003M12 gene
557	1424524_at	1200002N14Rik	RIKEN cDNA 1200002N14 gene
558	1451238_at	1200003C05Rik	RIKEN cDNA 1200003C05 gene
559	1454998_at	1200011I18Rik	RIKEN cDNA 1200011I18 gene
560	1435137_s_at	1200015M12Rik /// 1200016E24Rik /// A130040M12Rik /// E430024C06Rik	RIKEN cDNA 1200015M12 gene /// RIKEN cDNA 1200016E24 gene /// RIKEN cDNA A130040M12 gene /// RIKEN cDNA E430024C06 gene
561	1451082_at	1300018I05Rik	RIKEN cDNA 1300018I05 gene
562	1442992_at	130004C03	hypothetical LOC403343
563	1435062_at	1500001A10Rik	RIKEN cDNA 1500001A10 gene
564	1453850_at	1500002I01Rik	RIKEN cDNA 1500002I01 gene
565	1436176_at	1500004A13Rik	RIKEN cDNA 1500004A13 gene
566	1452827_at	1500009C09Rik	RIKEN cDNA 1500009C09 gene
567	1428370_at	1500011B03Rik	RIKEN cDNA 1500011B03 gene
568	1423261_at	1500015O10Rik	RIKEN cDNA 1500015O10 gene
569	1440780_x_at	1500015O10Rik	RIKEN cDNA 1500015O10 gene
570	1452806_at	1500016O10Rik	RIKEN cDNA 1500016O10 gene
571	1452584_at	1500032L24Rik	RIKEN cDNA 1500032L24 gene
572	1447537_at	1500032P08Rik	RIKEN cDNA 1500032P08 gene
573	1453585_at	1600010M07Rik	RIKEN cDNA 1600010M07 gene
574	1428218_a_at	1600012H06Rik	RIKEN cDNA 1600012H06 gene

575	1460618_x_at	1700001J11Rik /// LOC665005 /// LOC677394	RIKEN cDNA 1700001J11 gene /// similar to XY body protein /// similar to RING finger protein 19 (XY body protein) (XYbp) (Gametogenesis expressed protein GEG-154) (UBCM4-interacting protein 117) (UIP117)
576	1447799_x_at	1700001P01Rik	RIKEN cDNA 1700001P01 gene
577	1430266_at	1700003D09Rik	RIKEN cDNA 1700003D09 gene
578	1430901_at	1700003F17Rik	RIKEN cDNA 1700003F17 gene
579	1430121_at	1700006E09Rik	RIKEN cDNA 1700006E09 gene
580	1453339_at	1700008I05Rik	RIKEN cDNA 1700008I05 gene
581	1429181_at	1700009P17Rik	RIKEN cDNA 1700009P17 gene
582	1443840_x_at	1700010H22Rik	RIKEN cDNA 1700010H22 gene
583	1442926_at	1700011B04Rik	RIKEN cDNA 1700011B04 gene
584	1429142_at	1700012A03Rik	RIKEN cDNA 1700012A03 gene
585	1437150_at	1700012H17Rik	RIKEN cDNA 1700012H17 gene
586	1419187_at	1700012L04Rik /// LOC100042927 /// OTTMUSG00000016790	RIKEN cDNA 1700012L04 gene /// predicted gene, OTTMUSG00000016790 /// hypothetical protein LOC100042927
587	1442795_x_at	1700016G05Rik	RIKEN cDNA 1700016G05 gene
588	1438791_at	1700016P04Rik	RIKEN cDNA 1700016P04 gene
589	1429075_a_at	1700018B08Rik	RIKEN cDNA 1700018B08 gene
590	1441861_at	1700018G05Rik	RIKEN cDNA 1700018G05 gene
591	1436669_at	1700019G17Rik	RIKEN cDNA 1700019G17 gene
592	1429803_at	1700021F07Rik	RIKEN cDNA 1700021F07 gene
593	1430006_x_at	1700024B05Rik /// LOC666233	RIKEN cDNA 1700024B05 gene /// similar to Predicted gene, EG434459
594	1460553_at	1700025K23Rik	RIKEN cDNA 1700025K23 gene
595	1428593_at	1700029F09Rik	RIKEN cDNA 1700029F09 gene
596	1429544_at	1700029J11Rik	RIKEN cDNA 1700029J11 gene
597	1453975_a_at	1700029M20Rik	RIKEN cDNA 1700029M20 gene
598	1439559_at	1700040D17Rik	RIKEN cDNA 1700040D17 gene
599	1432290_at	1700040G22Rik	RIKEN cDNA 1700040G22 gene
600	1430593_at	1700041C02Rik	RIKEN cDNA 1700041C02 gene
601	1430638_at	1700041C02Rik	RIKEN cDNA 1700041C02 gene
602	1441431_at	1700041C02Rik	RIKEN cDNA 1700041C02 gene
603	1440520_a_at	1700051A21Rik	RIKEN cDNA 1700051A21 gene
604	1447821_at	1700051K22Rik	RIKEN cDNA 1700051K22 gene
605	1451483_s_at	1700054N08Rik	RIKEN cDNA 1700054N08 gene
606	1432452_at	1700054O19Rik	RIKEN cDNA 1700054O19 gene
607	1430846_at	1700061G19Rik	RIKEN cDNA 1700061G19 gene
608	1432422_at	1700063K16Rik	RIKEN cDNA 1700063K16 gene
609	1434675_at	1700065O13Rik	RIKEN cDNA 1700065O13 gene
610	1439967_at	1700071A11Rik	RIKEN cDNA 1700071A11 gene
611	1430707_s_at	1700081D17Rik	RIKEN cDNA 1700081D17 gene
612	1432319_at	1700085C21Rik	RIKEN cDNA 1700085C21 gene
613	1455085_at	1700086L19Rik	RIKEN cDNA 1700086L19 gene
614	1433425_at	1700101I19Rik	RIKEN cDNA 1700101I19 gene
615	1457006_at	1700106J12Rik	RIKEN cDNA 1700106J12 gene
616	1431988_at	1700112E06Rik	RIKEN cDNA 1700112E06 gene
617	1460107_at	1700129I04Rik	RIKEN cDNA 1700129I04 gene
618	1458909_at	1810010D01Rik /// LOC100040049 /// LOC100048265	RIKEN cDNA 1810010D01 gene /// hypothetical protein LOC100040049 /// hypothetical protein LOC100048265
619	1428358_at	1810010M01Rik	RIKEN cDNA 1810010M01 gene
620	1447594_at	1810012K16Rik	RIKEN cDNA 1810012K16 gene

621	1417174_at	1810021J13Rik	RIKEN cDNA 1810021J13 gene
622	1452009_at	1810054D07Rik	RIKEN cDNA 1810054D07 gene
623	1436339_at	1810058I24Rik	RIKEN cDNA 1810058I24 gene
624	1440283_at	1810059H22Rik	RIKEN cDNA 1810059H22 gene
625	1427294_a_at	1810073N04Rik	RIKEN cDNA 1810073N04 gene
626	1447576_at	2010001K21Rik	RIKEN cDNA 2010001K21 gene
627	1424626_at	2010003K11Rik	RIKEN cDNA 2010003K11 gene
628	1439561_at	2010012O05Rik	RIKEN cDNA 2010012O05 gene
629	1440769_at	2010305A19Rik	RIKEN cDNA 2010305A19 gene
630	1417573_at	2010311D03Rik	RIKEN cDNA 2010311D03 gene
631	1460456_at	2010316F05Rik	RIKEN cDNA 2010316F05 gene
632	1429405_at	2010317E24Rik	RIKEN cDNA 2010317E24 gene
633	1452744_at	2210016F16Rik	RIKEN cDNA 2210016F16 gene
634	1454639_x_at	2210411K19Rik /// Rpl41	ribosomal protein L41 /// RIKEN cDNA 2210411K19 gene
635	1430462_at	2310002L09Rik	RIKEN cDNA 2310002L09 gene
636	1429419_at	2310007A19Rik	RIKEN cDNA 2310007A19 gene
637	1438379_x_at	2310007F21Rik	RIKEN cDNA 2310007F21 gene
638	1432280_at	2310007L24Rik	RIKEN cDNA 2310007L24 gene
639	1429895_at	2310010G23Rik	RIKEN cDNA 2310010G23 gene
640	1424518_at	2310016F22Rik /// BC020489	RIKEN cDNA 2310016F22 gene /// cDNA sequence BC020489
641	1428293_at	2310022M17Rik	RIKEN cDNA 2310022M17 gene
642	1428739_at	2310040A07Rik /// LOC100042420	RIKEN cDNA 2310040A07 gene /// similar to 2310040A07Rik protein
643	1428083_at	2310043N10Rik	RIKEN cDNA 2310043N10 gene
644	1424914_at	2310044G17Rik	RIKEN cDNA 2310044G17 gene
645	1439784_at	2310046O06Rik	RIKEN cDNA 2310046O06 gene
646	1458369_at	2310050B05Rik	RIKEN cDNA 2310050B05 gene
647	1452597_at	2310061C15Rik	RIKEN cDNA 2310061C15 gene
648	1460362_at	2410001C21Rik	RIKEN cDNA 2410001C21 gene
649	1460672_at	2410002F23Rik	RIKEN cDNA 2410002F23 gene
650	1428088_at	2410002I01Rik	RIKEN cDNA 2410002I01 gene
651	1432118_at	2410012E07Rik	RIKEN cDNA 2410012E07 gene
652	1417146_at	2410018C20Rik	RIKEN cDNA 2410018C20 gene
653	1431317_at	2410018L13Rik	RIKEN cDNA 2410018L13 gene
654	1432302_s_at	2410024N13Rik	RIKEN cDNA 2410024N13 gene
655	1442388_at	2410137F16Rik	RIKEN cDNA 2410137F16 gene
656	1430305_at	2500004C02Rik	RIKEN cDNA 2500004C02 gene
657	1447914_x_at	2600010E01Rik	RIKEN cDNA 2600010E01 gene
658	1419690_at	2610002M06Rik	RIKEN cDNA 2610002M06 gene
659	1455135_at	2610014I16Rik	RIKEN cDNA 2610014I16 gene
660	1432013_a_at	2610016C23Rik	RIKEN cDNA 2610016C23 gene
661	1430214_a_at	2610020H08Rik	RIKEN cDNA 2610020H08 gene
662	1442445_at	2610027H17Rik	RIKEN cDNA 2610027H17 gene
663	1451039_at	2610027L16Rik	RIKEN cDNA 2610027L16 gene
664	1428897_at	2610029I01Rik	RIKEN cDNA 2610029I01 gene
665	1452876_x_at	2610044O15Rik /// LOC100044296	RIKEN cDNA 2610044O15 gene /// hypothetical protein LOC100044296
666	1456158_at	2610109H07Rik	RIKEN cDNA 2610109H07 gene
667	1452979_at	2610110G12Rik	RIKEN cDNA 2610110G12 gene
668	1460345_at	2610208M17Rik	RIKEN cDNA 2610208M17 gene
669	1429946_at	2610301F02Rik	RIKEN cDNA 2610301F02 gene
670	1431674_at	2610303G11Rik	RIKEN cDNA 2610303G11 gene
671	1452581_at	2610304G08Rik	RIKEN cDNA 2610304G08 gene

672	1457643_x_at	2610316D01Rik	RIKEN cDNA 2610316D01 gene
673	1430011_at	2610317O13Rik	RIKEN cDNA 2610317O13 gene
674	1453749_at	2610507I01Rik	RIKEN cDNA 2610507I01 gene
675	1460037_at	2610510H03Rik	RIKEN cDNA 2610510H03 gene
676	1453208_at	2700089E24Rik	RIKEN cDNA 2700089E24 gene
677	1443874_at	2810002I04Rik	RIKEN cDNA 2810002I04 gene
678	1424263_at	2810003C17Rik	RIKEN cDNA 2810003C17 gene
679	1451287_s_at	2810003C17Rik	RIKEN cDNA 2810003C17 gene
680	1430951_at	2810011L19Rik	RIKEN cDNA 2810011L19 gene
681	1429767_at	2810013P06Rik	RIKEN cDNA 2810013P06 gene
682	1431364_a_at	2810047C21Rik /// EG665577	RIKEN cDNA 2810047C21 gene /// predicted gene, EG665577
683	1453241_a_at	2810047C21Rik /// EG665577	RIKEN cDNA 2810047C21 gene /// predicted gene, EG665577
684	1453940_at	2810404M03Rik	RIKEN cDNA 2810404M03 gene
685	1454521_at	2810421E14Rik	RIKEN cDNA 2810421E14 gene
686	1427085_at	2810432D09Rik	RIKEN cDNA 2810432D09 gene
687	1441380_at	2810439F02Rik	RIKEN cDNA 2810439F02 gene
688	1428499_at	2810454L23Rik	RIKEN cDNA 2810454L23 gene
689	1452354_at	2810459M11Rik	RIKEN cDNA 2810459M11 gene
690	1453981_at	2900009I07Rik	RIKEN cDNA 2900009I07 gene
691	1445606_a_at	2900009J06Rik	RIKEN cDNA 2900009J06 gene
692	1436810_x_at	2900010M23Rik	RIKEN cDNA 2900010M23 gene
693	1448685_at	2900010M23Rik	RIKEN cDNA 2900010M23 gene
694	1460532_at	2900011F02Rik	RIKEN cDNA 2900011F02 gene
695	1454502_at	2900022B07Rik	RIKEN cDNA 2900022B07 gene
696	1437261_at	2900024O10Rik	RIKEN cDNA 2900024O10 gene
697	1445673_at	2900052N01Rik	RIKEN cDNA 2900052N01 gene
698	1439817_at	2900064A13Rik	RIKEN cDNA 2900064A13 gene
699	1436369_at	2900076A07Rik	RIKEN cDNA 2900076A07 gene
700	1431330_at	3110002H16Rik	RIKEN cDNA 3110002H16 gene
701	1454035_at	3110009E22Rik	RIKEN cDNA 3110009E22 gene
702	1430158_at	3110021A11Rik	RIKEN cDNA 3110021A11 gene
703	1460482_at	3110047P20Rik	RIKEN cDNA 3110047P20 gene
704	1443456_at	3110048L19Rik	RIKEN cDNA 3110048L19 gene
705	1434658_at	3110056O03Rik	RIKEN cDNA 3110056O03 gene
706	1454357_at	3110067C02Rik	RIKEN cDNA 3110067C02 gene
707	1430436_at	3321401G04Rik	RIKEN cDNA 3321401G04 gene
708	1453555_at	3830408D07Rik	RIKEN cDNA 3830408D07 gene
709	1453976_at	4432414F05Rik	RIKEN cDNA 4432414F05 gene
710	1453201_at	4632411J06Rik	RIKEN cDNA 4632411J06 gene
711	1427082_at	4632417N05Rik	RIKEN cDNA 4632417N05 gene
712	1442155_at	4632427E13Rik	RIKEN cDNA 4632427E13 gene
713	1432247_at	4633402D09Rik	RIKEN cDNA 4633402D09 gene
714	1433877_at	4732473B16Rik	RIKEN cDNA 4732473B16 gene
715	1459111_at	4831440E17Rik	RIKEN cDNA 4831440E17 gene
716	1429969_at	4833403J16Rik	RIKEN cDNA 4833403J16 gene
717	1454409_at	4833408G04Rik	RIKEN cDNA 4833408G04 gene
718	1430382_at	4833413G10Rik	RIKEN cDNA 4833413G10 gene
719	1454353_at	4833420D23Rik	RIKEN cDNA 4833420D23 gene
720	1419637_s_at	4833420G17Rik	RIKEN cDNA 4833420G17 gene
721	1430220_at	4833420G17Rik	RIKEN cDNA 4833420G17 gene
722	1429249_at	4833424O15Rik	RIKEN cDNA 4833424O15 gene
723	1434925_at	4833424O15Rik	RIKEN cDNA 4833424O15 gene

724	1435717_at	4833428C12Rik	RIKEN cDNA 4833428C12 gene
725	1453387_at	4833432E10Rik	RIKEN cDNA 4833432E10 gene
726	1435698_at	4921505C17Rik	RIKEN cDNA 4921505C17 gene
727	1460493_at	4921506J03Rik	RIKEN cDNA 4921506J03 gene
728	1453142_at	4921507P07Rik	RIKEN cDNA 4921507P07 gene
729	1453250_at	4921511C04Rik /// LOC100046859	RIKEN cDNA 4921511C04 gene /// hypothetical protein LOC100046859
730	1453494_at	4921513H07Rik	RIKEN cDNA 4921513H07 gene
731	1447836_x_at	4921525O09Rik	RIKEN cDNA 4921525O09 gene
732	1432694_at	4921527H02Rik	RIKEN cDNA 4921527H02 gene
733	1431738_at	4921531P14Rik	RIKEN cDNA 4921531P14 gene
734	1443899_at	4922501C03Rik	RIKEN cDNA 4922501C03 gene
735	1440600_at	4930407I10Rik	RIKEN cDNA 4930407I10 gene
736	1460528_at	4930413G21Rik	RIKEN cDNA 4930413G21 gene
737	1447114_x_at	4930414L22Rik	RIKEN cDNA 4930414L22 gene
738	1456779_a_at	4930414L22Rik	RIKEN cDNA 4930414L22 gene
739	1431866_at	4930425K24Rik	RIKEN cDNA 4930425K24 gene
740	1430143_at	4930426D05Rik	RIKEN cDNA 4930426D05 gene
741	1429915_at	4930426L09Rik	RIKEN cDNA 4930426L09 gene
742	1429682_at	4930431B09Rik	RIKEN cDNA 4930431B09 gene
743	1429885_at	4930431P19Rik	RIKEN cDNA 4930431P19 gene
744	1453965_at	4930432O09Rik	RIKEN cDNA 4930432O09 gene
745	1454407_at	4930435N07Rik	RIKEN cDNA 4930435N07 gene
746	1419335_at	4930441O14Rik	RIKEN cDNA 4930441O14 gene
747	1431915_at	4930442E04Rik	RIKEN cDNA 4930442E04 gene
748	1431450_at	4930444P10Rik	RIKEN cDNA 4930444P10 gene
749	1432451_at	4930445E18Rik	RIKEN cDNA 4930445E18 gene
750	1454054_at	4930459I23Rik	RIKEN cDNA 4930459I23 gene
751	1439671_at	4930466K18Rik	RIKEN cDNA 4930466K18 gene
752	1431639_at	4930468A15Rik	RIKEN cDNA 4930468A15 gene
753	1459046_at	4930473A06Rik	RIKEN cDNA 4930473A06 gene
754	1439969_at	4930500O05Rik	RIKEN cDNA 4930500O05 gene
755	1431185_at	4930503B20Rik	RIKEN cDNA 4930503B20 gene
756	1453903_at	4930503B20Rik	RIKEN cDNA 4930503B20 gene
757	1453835_at	4930505M18Rik	RIKEN cDNA 4930505M18 gene
758	1453909_at	4930505N22Rik	RIKEN cDNA 4930505N22 gene
759	1453719_at	4930506C21Rik	RIKEN cDNA 4930506C21 gene
760	1429157_at	4930507C10Rik	RIKEN cDNA 4930507C10 gene
761	1427360_at	4930507D05Rik	RIKEN cDNA 4930507D05 gene
762	1431565_at	4930511J24Rik	RIKEN cDNA 4930511J24 gene
763	1436130_s_at	4930523C11Rik /// Adam6	RIKEN cDNA 4930523C11 gene /// a disintegrin and metallopeptidase domain 6
764	1432348_at	4930524O07Rik	RIKEN cDNA 4930524O07 gene
765	1432305_at	4930542C16Rik	RIKEN cDNA 4930542C16 gene
766	1432111_at	4930542D17Rik	RIKEN cDNA 4930542D17 gene
767	1432274_at	4930543N07Rik	RIKEN cDNA 4930543N07 gene
768	1444740_at	4930550L11Rik	RIKEN cDNA 4930550L11 gene
769	1432761_at	4930551I15Rik	RIKEN cDNA 4930551I15 gene
770	1430925_at	4930556L07Rik	RIKEN cDNA 4930556L07 gene
771	1429586_at	4930558N01Rik	RIKEN cDNA 4930558N01 gene
772	1430763_at	4930563E22Rik	RIKEN cDNA 4930563E22 gene
773	1433036_at	4930564B12Rik	RIKEN cDNA 4930564B12 gene
774	1428860_at	4930572J05Rik	RIKEN cDNA 4930572J05 gene
775	1454290_at	4930573O21Rik	RIKEN cDNA 4930573O21 gene

776	1457939_at	4930578N16Rik	RIKEN cDNA 4930578N16 gene
777	1453265_at	4930579C15Rik	RIKEN cDNA 4930579C15 gene
778	1430066_at	4930589M24Rik	RIKEN cDNA 4930589M24 gene
779	1431307_at	4930589M24Rik	RIKEN cDNA 4930589M24 gene
780	1454099_at	4930593A02Rik	RIKEN cDNA 4930593A02 gene
781	1453773_at	4931406I20Rik	RIKEN cDNA 4931406I20 gene
782	1429744_at	4931407G18Rik	RIKEN cDNA 4931407G18 gene
783	1433056_at	4931407J08Rik	RIKEN cDNA 4931407J08 gene
784	1454048_a_at	4931408A02Rik /// LOC630876	RIKEN cDNA 4931408A02 gene /// similar to Protein C21orf63 homolog precursor
785	1454287_at	4931428A05Rik	RIKEN cDNA 4931428A05 gene
786	1430094_at	4931440L10Rik	RIKEN cDNA 4931440L10 gene
787	1439914_at	4932416H05Rik	RIKEN cDNA 4932416H05 gene
788	1456987_at	4932418E24Rik	RIKEN cDNA 4932418E24 gene
789	1431617_at	4933405E24Rik	RIKEN cDNA 4933405E24 gene
790	1430431_at	4933407H18Rik	RIKEN cDNA 4933407H18 gene
791	1432917_at	4933408M05Rik	RIKEN cDNA 4933408M05 gene
792	1450076_at	4933411K20Rik	RIKEN cDNA 4933411K20 gene
793	1447711_x_at	4933412E12Rik	RIKEN cDNA 4933412E12 gene
794	1460530_at	4933416A02Rik	RIKEN cDNA 4933416A02 gene
795	1430711_at	4933416E03Rik	RIKEN cDNA 4933416E03 gene
796	1453297_at	4933417O08Rik	RIKEN cDNA 4933417O08 gene
797	1432711_at	4933425M03Rik	RIKEN cDNA 4933425M03 gene
798	1432407_at	4933426D04Rik	RIKEN cDNA 4933426D04 gene
799	1433998_at	4933427D14Rik	RIKEN cDNA 4933427D14 gene
800	1431489_at	4933432K03Rik	RIKEN cDNA 4933432K03 gene
801	1432313_at	4933433F19Rik	RIKEN cDNA 4933433F19 gene
802	1435422_at	4933433P14Rik	RIKEN cDNA 4933433P14 gene
803	1426387_x_at	4933439C20Rik /// LOC100044151 /// LOC236604 /// Pisd	RIKEN cDNA 4933439C20 gene /// phosphatidylserine decarboxylase pseudogene /// phosphatidylserine decarboxylase /// hypothetical protein LOC100044151
804	1429840_at	4933439G12Rik	RIKEN cDNA 4933439G12 gene
805	1442191_at	5033411D12Rik	RIKEN cDNA 5033411D12 gene
806	1460500_at	5033421C21Rik	RIKEN cDNA 5033421C21 gene
807	1439690_at	5133401N09Rik	RIKEN cDNA 5133401N09 gene
808	1430262_at	5330411J11Rik	RIKEN cDNA 5330411J11 gene
809	1442113_at	5330417C22Rik	RIKEN cDNA 5330417C22 gene
810	1454451_at	5330430B06Rik	RIKEN cDNA 5330430B06 gene
811	1430033_at	5330431K02Rik	RIKEN cDNA 5330431K02 gene
812	1432248_at	5430402P08Rik	RIKEN cDNA 5430402P08 gene
813	1446320_at	5430403G19Rik	RIKEN cDNA 5430403G19 gene
814	1430489_at	5430416G10Rik	RIKEN cDNA 5430416G10 gene
815	1460534_at	5530401A10Rik	RIKEN cDNA 5530401A10 gene
816	1430922_at	5530401A14Rik	RIKEN cDNA 5530401A14 gene
817	1430345_at	5530402H23Rik	RIKEN cDNA 5530402H23 gene
818	1448193_at	5730403B10Rik	RIKEN cDNA 5730403B10 gene
819	1460172_at	5730403B10Rik	RIKEN cDNA 5730403B10 gene
820	1454379_at	5730405O12Rik	RIKEN cDNA 5730405O12 gene
821	1432915_at	5730407I07Rik	RIKEN cDNA 5730407I07 gene
822	1430362_at	5730409N24Rik	RIKEN cDNA 5730409N24 gene
823	1454163_at	5730420D15Rik	RIKEN cDNA 5730420D15 gene
824	1444601_at	5730422E09Rik	RIKEN cDNA 5730422E09 gene
825	1453816_at	5730427N09Rik	RIKEN cDNA 5730427N09 gene
826	1453591_at	5730437N04Rik	RIKEN cDNA 5730437N04 gene

827	1454375_at	5730458M16Rik	RIKEN cDNA 5730458M16 gene
828	1443226_at	5730470L24Rik	RIKEN cDNA 5730470L24 gene
829	1430665_at	5730480H06Rik	RIKEN cDNA 5730480H06 gene
830	1457642_at	5730507N06Rik	RIKEN cDNA 5730507N06 gene
831	1436345_at	5730559C18Rik	RIKEN cDNA 5730559C18 gene
832	1439723_at	5730590G19Rik /// LOC100047683	RIKEN cDNA 5730590G19 gene /// hypothetical protein LOC100047683
833	1435497_at	5730590G19Rik /// LOC100047683	RIKEN cDNA 5730590G19 gene /// hypothetical protein LOC100047683
834	1451376_at	5730596K20Rik	RIKEN cDNA 5730596K20 gene
835	1453073_at	5830403F22Rik	RIKEN cDNA 5830403F22 gene
836	1433177_at	5830411G16Rik	RIKEN cDNA 5830411G16 gene
837	1454520_at	5830415B17Rik	RIKEN cDNA 5830415B17 gene
838	1451621_at	5830417C01Rik	RIKEN cDNA 5830417C01 gene
839	1454447_at	5830434F19Rik	RIKEN cDNA 5830434F19 gene
840	1454429_at	5830462O15Rik	RIKEN cDNA 5830462O15 gene
841	1454482_at	5830474E16Rik	RIKEN cDNA 5830474E16 gene
842	1454487_at	5830490A04Rik	RIKEN cDNA 5830490A04 gene
843	1445938_at	5930427L02Rik	RIKEN cDNA 5930427L02 gene
844	1434700_at	6030408C04Rik	RIKEN cDNA 6030408C04 gene
845	1440611_at	6230409E13Rik	RIKEN cDNA 6230409E13 gene
846	1455538_at	6330403M23Rik	RIKEN cDNA 6330403M23 gene
847	1431346_at	6330405D24Rik	RIKEN cDNA 6330405D24 gene
848	1426937_at	6330406I15Rik	RIKEN cDNA 6330406I15 gene
849	1430003_at	6330412A17Rik	RIKEN cDNA 6330412A17 gene
850	1439971_at	6330439K17Rik	RIKEN cDNA 6330439K17 gene
851	1434359_at	6330500D04Rik	RIKEN cDNA 6330500D04 gene
852	1433065_at	6330510M09Rik	RIKEN cDNA 6330510M09 gene
853	1455239_at	6330512M04Rik	RIKEN cDNA 6330512M04 gene
854	1453373_at	6330532G10Rik	RIKEN cDNA 6330532G10 gene
855	1437936_at	6330534C20Rik	RIKEN cDNA 6330534C20 gene
856	1454386_at	6430500D05Rik	RIKEN cDNA 6430500D05 gene
857	1438878_at	6430537K16Rik	RIKEN cDNA 6430537K16 gene
858	1452082_at	6430548M08Rik	RIKEN cDNA 6430548M08 gene
859	1437798_at	6720422M22Rik	RIKEN cDNA 6720422M22 gene
860	1452073_at	6720460F02Rik	RIKEN cDNA 6720460F02 gene
861	1433184_at	6720477C19Rik	RIKEN cDNA 6720477C19 gene
862	1437957_at	7030407O06Rik	RIKEN cDNA 7030407O06 gene
863	1455645_at	8030451F13Rik	RIKEN cDNA 8030451F13 gene
864	1442090_at	8030463A06Rik	RIKEN cDNA 8030463A06 gene
865	1453078_at	8430408J07Rik	RIKEN cDNA 8430408J07 gene
866	1427589_at	8430419L09Rik	RIKEN cDNA 8430419L09 gene
867	1453308_at	8430429K09Rik	RIKEN cDNA 8430429K09 gene
868	1452762_at	8430436O14Rik	RIKEN cDNA 8430436O14 gene
869	1443958_at	9030203C11Rik	RIKEN cDNA 9030203C11 gene
870	1457682_at	9030420J04Rik	RIKEN cDNA 9030420J04 gene
871	1449252_at	9030611O19Rik	RIKEN cDNA 9030611O19 gene
872	1431543_at	9130001E16Rik	RIKEN cDNA 9130001E16 gene
873	1448648_at	9130005N14Rik	RIKEN cDNA 9130005N14 gene
874	1445184_at	9130019O22Rik	RIKEN cDNA 9130019O22 gene
875	1436456_at	9130023D20Rik	RIKEN cDNA 9130023D20 gene
876	1430502_at	9130206N08Rik	RIKEN cDNA 9130206N08 gene
877	1432309_at	9130410C08Rik	RIKEN cDNA 9130410C08 gene
878	1445056_at	9230102K24Rik	RIKEN cDNA 9230102K24 gene

879	1460404_at	9330134C04Rik	RIKEN cDNA 9330134C04 gene
880	1434818_at	9330159K06	hypothetical protein 9330159K06
881	1433308_at	9330159N22Rik	RIKEN cDNA 9330159N22 gene
882	1454542_at	9330179C17Rik	RIKEN cDNA 9330179C17 gene
883	1454526_at	9430014F16Rik	RIKEN cDNA 9430014F16 gene
884	1432258_at	9430014N10Rik	RIKEN cDNA 9430014N10 gene
885	1453458_at	9430019C24Rik	RIKEN cDNA 9430019C24 gene
886	1438112_at	9430021M05Rik	RIKEN cDNA 9430021M05 gene
887	1454232_at	9430027B09Rik	RIKEN cDNA 9430027B09 gene
888	1454513_at	9430031J08Rik	RIKEN cDNA 9430031J08 gene
889	1433262_at	9430052A13Rik	RIKEN cDNA 9430052A13 gene
890	1455331_at	9430067K14Rik	RIKEN cDNA 9430067K14 gene
891	1436407_at	9430069J07Rik	RIKEN cDNA 9430069J07 gene
892	1442352_at	9430091N11Rik	RIKEN cDNA 9430091N11 gene
893	1454363_at	9430099H24Rik	RIKEN cDNA 9430099H24 gene
894	1454364_at	9530025L08Rik	RIKEN cDNA 9530025L08 gene
895	1436172_at	9530028C05	hypothetical protein 9530028C05
896	1417212_at	9530058B02Rik	RIKEN cDNA 9530058B02 gene
897	1454544_at	9530078B04Rik	RIKEN cDNA 9530078B04 gene
898	1441996_at	9530082P21Rik	RIKEN cDNA 9530082P21 gene
899	1446355_at	9530085L11Rik	RIKEN cDNA 9530085L11 gene
900	1459344_at	9630019E01Rik	RIKEN cDNA 9630019E01 gene
901	1442427_at	9630026M06Rik	RIKEN cDNA 9630026M06 gene
902	1446437_at	9630028H03Rik	RIKEN cDNA 9630028H03 gene
903	1438402_at	9630050M13Rik	RIKEN cDNA 9630050M13 gene
904	1440430_at	A130004G07Rik	RIKEN cDNA A130004G07 gene
905	1444670_at	A130004G11Rik	RIKEN cDNA A130004G11 gene
906	1441509_at	A130009I22Rik	RIKEN cDNA A130009I22 gene
907	1456806_at	A130010C12Rik	RIKEN cDNA A130010C12 gene
908	1452405_x_at	A130082M07Rik /// Tcra	T-cell receptor alpha chain /// RIKEN cDNA A130082M07 gene
909	1444734_at	A330001L22Rik	RIKEN cDNA A330001L22 gene
910	1440661_at	A430010J10Rik	RIKEN cDNA A430010J10 gene
911	1443499_at	A430075N02	hypothetical protein A430075N02
912	1439180_at	A430093A21Rik	RIKEN cDNA A430093A21 gene
913	1444137_at	A430108G06Rik	RIKEN cDNA A430108G06 gene
914	1444161_at	A530020G20Rik	RIKEN cDNA A530020G20 gene
915	1443470_at	A530058N18Rik	RIKEN cDNA A530058N18 gene
916	1455536_at	A630023A22Rik	RIKEN cDNA A630023A22 gene
917	1441464_at	A630035D09Rik	RIKEN cDNA A630035D09 gene
918	1436576_at	A630077B13Rik	RIKEN cDNA A630077B13 gene
919	1446731_at	A730016A17	hypothetical LOC330538
920	1442396_at	A730020M07Rik	RIKEN cDNA A730020M07 gene
921	1456142_x_at	A730098P11Rik /// EG627352 /// LOC433598 /// LOC433955 /// LOC626309 /// Morf4I1	mortality factor 4 like 1 /// similar to HSPC008 /// RIKEN cDNA A730098P11 gene /// similar to mortality factor 4 like 1 /// predicted gene, EG627352
922	1443044_at	A830091E24	hypothetical A830091E24
923	1457709_a_at	A930005H10Rik	RIKEN cDNA A930005H10 gene
924	1442196_at	A930006K02Rik	RIKEN cDNA A930006K02 gene
925	1454590_at	A930018O16Rik	RIKEN cDNA A930018O16 gene
926	1432306_at	A930023M06Rik	RIKEN cDNA A930023M06 gene
927	1454629_at	A930037G23Rik	RIKEN cDNA A930037G23 gene
928	1453225_at	A930038C07Rik	RIKEN cDNA A930038C07 gene
929	1440846_at	A930041I02Rik	RIKEN cDNA A930041I02 gene

<b>930</b>	1441497_at	AA388235	expressed sequence AA388235
<b>931</b>	1449750_at	AA407331	expressed sequence AA407331
<b>932</b>	1460417_at	AB041803	cDNA sequence AB041803
<b>933</b>	1425496_at	Abca3	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 3
<b>934</b>	1440879_at	Abca9	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 9
<b>935</b>	1449817_at	Abcb11	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 11
<b>936</b>	1419759_at	Abcb1a	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1A
<b>937</b>	1446701_at	Abcb1b	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1B
<b>938</b>	1428009_a_at	Abcc10	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 10
<b>939</b>	1443870_at	Abcc4	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 4
<b>940</b>	1456812_at	Abcd2	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 2
<b>941</b>	1419572_a_at	Abcd4	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 4
<b>942</b>	1420158_s_at	Abcf1	ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 1
<b>943</b>	1460120_at	Ablim1	actin-binding LIM protein 1
<b>944</b>	1444771_at	Abtb2	ankyrin repeat and BTB (POZ) domain containing 2
<b>945</b>	1453206_at	Acad9	acyl-Coenzyme A dehydrogenase family, member 9
<b>946</b>	1424184_at	Acadvl	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain
<b>947</b>	1456316_a_at	Acbd3	acyl-Coenzyme A binding domain containing 3
<b>948</b>	1453199_at	Acbd6	acyl-Coenzyme A binding domain containing 6
<b>949</b>	1420882_a_at	Acd /// Nsd1	nuclear receptor-binding SET-domain protein 1 /// adrenocortical dysplasia
<b>950</b>	1446315_at	Acly	ATP citrate lyase
<b>951</b>	1449968_s_at	Acot10 /// Acot9	acyl-CoA thioesterase 9 /// acyl-CoA thioesterase 10
<b>952</b>	1422716_a_at	Acp1	acid phosphatase 1, soluble
<b>953</b>	1422717_at	Acp1	acid phosphatase 1, soluble
<b>954</b>	1450721_at	Acp1	acid phosphatase 1, soluble
<b>955</b>	1419832_s_at	Acpp	acid phosphatase, prostate
<b>956</b>	1441975_at	Acpp	acid phosphatase, prostate
<b>957</b>	1433531_at	Acsl4	acyl-CoA synthetase long-chain family member 4
<b>958</b>	1422564_at	Actl6b	actin-like 6B
<b>959</b>	1448460_at	Acvr1	activin A receptor, type 1
<b>960</b>	1416080_at	Adam15	a disintegrin and metallopeptidase domain 15 (metargidin)
<b>961</b>	1425170_a_at	Adam15	a disintegrin and metallopeptidase domain 15 (metargidin)
<b>962</b>	1448329_at	Adam3	a disintegrin and metallopeptidase domain 3 (cyritestin)
<b>963</b>	1446666_at	Adamts12	a disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 12
<b>964</b>	1435990_at	Adamts2	a disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 2
<b>965</b>	1437785_at	Adamts9	a disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 9
<b>966</b>	1430313_at	Adamtsl1	ADAMTS-like 1

967	1436753_at	Adck5	aarF domain containing kinase 5
968	1431076_at	Add2	adducin 2 (beta)
969	1443380_at	Adh5	alcohol dehydrogenase 5 (class III), chi polypeptide
970	1438759_x_at	Adi1	acireductone dioxygenase 1
971	1451311_a_at	Adipor1	adiponectin receptor 1
972	1424312_at	Adipor1	adiponectin receptor 1
973	1435923_at	Ado	2-aminoethanethiol (cysteamine) dioxygenase
974	1435495_at	Adora1	adenosine A1 receptor
975	1427449_a_at	Adprhl2	ADP-ribosylhydrolase like 2
976	1435296_at	Adra2c	adrenergic receptor, alpha 2c
977	1440801_s_at	Adrbk2	adrenergic receptor kinase, beta 2
978	1449383_at	Adssl1	adenylosuccinate synthetase like 1
979	1437743_at	Aebp2	AE binding protein 2
980	1436729_at	Afap1	actin filament associated protein 1
981	1422116_at	Aff2	AF4/FMR2 family, member 2
982	1430435_at	Aff3	AF4/FMR2 family, member 3
983	1420912_at	Aff4	AF4/FMR2 family, member 4
984	1449045_at	Afg3l1	AFG3(ATPase family gene 3)-like 1 (yeast)
985	1454003_at	Afg3l2	AFG3(ATPase family gene 3)-like 2 (yeast)
986	1428885_at	Afmid	arylformamidase
987	1431033_x_at	Agl	amylo-1,6-glucosidase, 4-alpha-glucanotransferase
988	1453257_at	Agpat5	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 5 (lysophosphatidic acid acyltransferase, epsilon)
989	1422841_at	Agpat6	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 6 (lysophosphatidic acid acyltransferase, zeta)
990	1454918_at	Agps	alkylglycerone phosphate synthase
991	1435838_at	Agxt2	alanine-glyoxylate aminotransferase 2
992	1440138_at	Ahdc1	AT hook, DNA binding motif, containing 1
993	1441001_at	AI225934	expressed sequence AI225934
994	1447998_at	AI324046	expressed sequence AI324046
995	1427758_x_at	AI324046 /// Igh /// Igh-6 /// Igh-V7183 /// Ighg /// Ighv14-2 /// LOC100045391 /// LOC641025	immunoglobulin heavy chain 6 (heavy chain of IgM) /// immunoglobulin heavy chain (V7183 family) /// immunoglobulin heavy chain complex /// Immunoglobulin heavy chain (gamma polypeptide) /// expressed sequence AI324046 /// similar to Ig heavy chain V region M315 precursor /// immunoglobulin heavy variable V14-2 /// similar to Ig alpha-chain precursor (V139-D-J1)
996	1460406_at	AI427122	expressed sequence AI427122
997	1455199_at	AI429214	Expressed sequence AI429214
998	1455152_at	AI462493	expressed sequence AI462493
999	1442197_at	AI480624	expressed sequence AI480624
1000	1435617_at	AI480743	expressed sequence AI480743
1001	1442300_at	AI481368	expressed sequence AI481368
1002	1439483_at	AI506816	expressed sequence AI506816
1003	1438719_at	AI585793	expressed sequence AI585793
1004	1444026_at	AI593442	expressed sequence AI593442
1005	1457797_at	AI605517	expressed sequence AI605517
1006	1456935_at	AI606473	expressed sequence AI606473
1007	1425163_at	AI661453	expressed sequence AI661453
1008	1435584_at	AI662791	expressed sequence AI662791
1009	1440156_s_at	AI851523	expressed sequence AI851523
1010	1440838_at	AI852064	Expressed sequence AI852064
1011	1435049_s_at	AI854703	expressed sequence AI854703

1012	1446095_at	Air	antisense Igf2r RNA
1013	1434729_at	AK129302	cDNA sequence AK129302
1014	1449019_at	Akap1	A kinase (PRKA) anchor protein 1
1015	1440392_at	Akap13	A kinase (PRKA) anchor protein 13
1016	1450636_s_at	Akp5	alkaline phosphatase 5
1017	1451030_at	Akr1c21	aldo-keto reductase family 1, member C21
1018	1424480_s_at	Akt2	thymoma viral proto-oncogene 2
1019	1435879_at	Akt3	thymoma viral proto-oncogene 3
1020	1460307_at	Akt3	thymoma viral proto-oncogene 3
1021	1437467_at	Alcam	activated leukocyte cell adhesion molecule
1022	1437410_at	Aldh2	aldehyde dehydrogenase 2, mitochondrial
1023	1448143_at	Aldh2	aldehyde dehydrogenase 2, mitochondrial
1024	1457155_at	Aldh2	aldehyde dehydrogenase 2, mitochondrial
1025	1439375_x_at	Aldoa /// LOC237155	aldolase 1, A isoform /// similar to Fructose-bisphosphate aldolase A (Muscle-type aldolase) (Aldolase 1)
1026	1451461_a_at	Aldoc	aldolase 3, C isoform
1027	1427558_s_at	Alg12	asparagine-linked glycosylation 12 homolog (yeast, alpha-1,6-mannosyltransferase)
1028	1433144_at	Alg2	asparagine-linked glycosylation 2 homolog (yeast, alpha-1,3-mannosyltransferase)
1029	1430420_at	Alg9	asparagine-linked glycosylation 9 homolog (yeast, alpha 1,2 mannosyltransferase)
1030	1455673_at	Alkbh2	alkB, alkylation repair homolog 2 (E. coli)
1031	1452016_at	Alox5ap	arachidonate 5-lipoxygenase activating protein
1032	1431733_at	Alpk1	alpha-kinase 1
1033	1435661_at	Als2cr4	amyotrophic lateral sclerosis 2 (juvenile) chromosome region, candidate 4
1034	1451686_x_at	Amelx	amelogenin X chromosome
1035	1450102_a_at	Amfr /// LOC100046262	autocrine motility factor receptor /// similar to Autocrine motility factor receptor
1036	1459212_at	Anapc11	anaphase promoting complex subunit 11 homolog (yeast)
1037	1440832_at	Ang3 /// Ang4	angiogenin, ribonuclease A family, member 3 /// angiogenin, ribonuclease A family, member 4
1038	1446396_at	Angptl1	Angiopoietin-like 1
1039	1459317_at	Ank2	ankyrin 2, brain
1040	1436597_at	Ankhd1	ankyrin repeat and KH domain containing 1
1041	1447985_s_at	Ankib1	ankyrin repeat and IBR domain containing 1
1042	1458452_at	Ankrd11	Ankyrin repeat domain 11
1043	1454801_at	Ankrd28	ankyrin repeat domain 28
1044	1423580_at	Ankrd36	ankyrin repeat domain 36
1045	1445588_at	Ankrd44	ankyrin repeat domain 44
1046	1451182_s_at	Ankrd54	ankyrin repeat domain 54
1047	1438408_at	Ankrd56	ankyrin repeat domain 56
1048	1438764_at	Anxa7	annexin A7
1049	1426762_s_at	Aof2 /// LOC100046934	amine oxidase (flavin containing) domain 2 /// similar to amine oxidase (flavin containing) domain 2
1050	1442344_at	Ap1gbp1	AP1 gamma subunit binding protein 1
1051	1448309_at	Ap3m1	adaptor-related protein complex 3, mu 1 subunit
1052	1416182_at	Apba3	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family A, member 3
1053	1435199_at	Apc2	adenomatosis polyposis coli 2
1054	1424979_at	Aph1a	anterior pharynx defective 1a homolog (C. elegans)
1055	1416134_at	Appl1	amyloid beta (A4) precursor-like protein 1

1056	1455201_x_at	Apoa1	apolipoprotein A-I
1057	1451755_a_at	Apobec1	apolipoprotein B editing complex 1
1058	1416677_at	Apoh	apolipoprotein H
1059	1446580_at	Apool	apolipoprotein O-like
1060	1418818_at	Aqp5 /// LOC100046616	aquaporin 5 /// similar to aquaporin 5
1061	1430971_a_at	Aqr	aquarius
1062	1426391_at	Arf1 /// LOC545267 /// LOC666676	ADP-ribosylation factor 1 /// similar to Chain A, Human Adp-Ribosylation Factor 1 Complexed With Gdp, Full Length Non-Myristoylated /// similar to ADP-ribosylation factor
1063	1421789_s_at	Arf3	ADP-ribosylation factor 3
1064	1451526_at	Arhgap12	Rho GTPase activating protein 12
1065	1442065_at	Arhgap17	Rho GTPase activating protein 17
1066	1429918_at	Arhgap20	Rho GTPase activating protein 20
1067	1430957_at	Arhgap26	Rho GTPase activating protein 26
1068	1436258_at	Arhgef9	Cdc42 guanine nucleotide exchange factor (GEF) 9
1069	1448709_at	Arid1a /// LOC675933	AT rich interactive domain 1A (Swi1 like) /// similar to AT rich interactive domain 1A isoform a
1070	1451340_at	Arid5a	AT rich interactive domain 5A (Mrf1 like)
1071	1427189_at	Arih1	ariadne ubiquitin-conjugating enzyme E2 binding protein homolog 1 (Drosophila)
1072	1449119_at	Arih2	ariadne homolog 2 (Drosophila)
1073	1430322_at	Arl13b	ADP-ribosylation factor-like 13B
1074	1453590_at	Arl5b	ADP-ribosylation factor-like 5B
1075	1428137_at	Arl8b	ADP-ribosylation factor-like 8B
1076	1429815_at	Armc3	armadillo repeat containing 3
1077	1434951_at	Armc8	armadillo repeat containing 8
1078	1448279_at	Arpc3	actin related protein 2/3 complex, subunit 3
1079	1436421_s_at	Arpc5l	actin related protein 2/3 complex, subunit 5-like
1080	1429789_at	Arpm1	actin related protein M1
1081	1450685_at	Arpp19	cAMP-regulated phosphoprotein 19
1082	1419028_at	Arpp21	cyclic AMP-regulated phosphoprotein, 21
1083	1458281_at	Arsb	Arylsulfatase B
1084	1427508_at	Arsi	arylsulfatase i
1085	1432032_a_at	Artn	artemin
1086	1450726_at	Asah2	N-acylsphingosine amidohydrolase 2
1087	1421496_at	Asah3l	N-acylsphingosine amidohydrolase 3-like
1088	1430632_at	Asb1	ankyrin repeat and SOCS box-containing protein 1
1089	1426116_at	Asb18	ankyrin repeat and SOCS box-containing 18
1090	1427156_s_at	Ascc2	activating signal cointegrator 1 complex subunit 2
1091	1436455_at	Asph	aspartate-beta-hydroxylase
1092	1441520_at	Aspm	asp (abnormal spindle)-like, microcephaly associated (Drosophila)
1093	1431270_a_at	Aste1	asteroid homolog 1 (Drosophila)
1094	1450309_at	Astn2	astrotactin 2
1095	1443229_at	Atad2	ATPase family, AAA domain containing 2
1096	1422461_at	Atad3a	ATPase family, AAA domain containing 3A
1097	1435501_at	Atg2b	ATG2 autophagy related 2 homolog B (S. cerevisiae)
1098	1428610_at	Atg7	autophagy-related 7 (yeast)
1099	1421205_at	Atm	ataxia telangiectasia mutated homolog (human)
1100	1436544_at	Atp10d	ATPase, class V, type 10D
1101	1421167_at	Atp11a /// LOC100045280	ATPase, class VI, type 11A /// similar to mKIAA1021 protein

1102	1428340_s_at	Atp13a2	ATPase type 13A2
1103	1452746_at	Atp13a2	ATPase type 13A2
1104	1443823_s_at	Atp1a2	ATPase, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting, alpha 2 polypeptide
1105	1452969_at	Atp2b1	ATPase, Ca <sup>++</sup> transporting, plasma membrane 1
1106	1449710_s_at	Atp5a1	ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit, isoform 1
1107	1456128_at	Atp5g2 /// LOC100039108 /// LOC100040342 /// LOC100043121 /// LOC100046598 /// LOC100047549	ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F0 complex, subunit c (subunit 9), isoform 2 /// similar to ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F0 complex, subunit c (subunit 9)
1108	1438925_x_at	Atp6v0c /// LOC100039636 /// LOC100046757	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal V0 subunit C /// similar to vacuolar H(+)-ATPase
1109	1444176_at	Atp6v0d2	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal V0 subunit D2
1110	1449712_s_at	Atp6v1e1	VATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal V1 subunit E1
1111	1445522_at	Atp8b4	ATPase, class I, type 8B, member 4
1112	1448770_a_at	Atpif1	ATPase inhibitory factor 1
1113	1445091_at	Atr	ataxia telangiectasia and Rad3 related
1114	1449666_at	Atrnl1	Attractin like 1
1115	1443516_at	Atxn2	Ataxin 2
1116	1441705_at	AU015680	expressed sequence AU015680
1117	1445942_at	AU015858	expressed sequence AU015858
1118	1435154_at	AU018091	expressed sequence AU018091
1119	1446021_at	AU018466	expressed sequence AU018466
1120	1438046_at	AU019823	expressed sequence AU019823
1121	1447184_at	AU021760	expressed sequence AU021760
1122	1445945_at	AU021880	expressed sequence AU021880
1123	1444799_at	AU022054	expressed sequence AU022054
1124	1446901_at	AU022077	expressed sequence AU022077
1125	1459504_at	AU022121	expressed sequence AU022121
1126	1438226_at	AU022252	expressed sequence AU022252
1127	1458993_at	AU022882	expressed sequence AU022882
1128	1446403_at	AU022899	expressed sequence AU022899
1129	1442891_at	AU023386	expressed sequence AU023386
1130	1440277_at	AU041474	expressed sequence AU041474
1131	1442850_at	AU045717	expressed sequence AU045717
1132	1435774_at	AV024533	expressed sequence AV024533
1133	1433898_at	AV025504	Expressed sequence AV025504
1134	1443118_at	AV074028	Expressed sequence AV074028
1135	1456924_at	AW492981	expressed sequence AW492981
1136	1426459_s_at	AW549877	expressed sequence AW549877
1137	1447300_at	AW551984	expressed sequence AW551984
1138	1444408_at	B130040O20Rik	RIKEN cDNA B130040O20 gene
1139	1430510_at	B130050I23Rik	RIKEN cDNA B130050I23 gene
1140	1430293_a_at	B230118G17Rik /// Glp1	RIKEN cDNA B230118G17 gene /// GATA-like 1
1141	1435067_at	B230208H17Rik	RIKEN cDNA B230208H17 gene
1142	1440943_at	B230208H17Rik	RIKEN cDNA B230208H17 gene
1143	1446443_at	B230213L16Rik	RIKEN cDNA B230213L16 gene
1144	1454983_at	B230380D07Rik	RIKEN cDNA B230380D07 gene
1145	1425691_at	B3gat1	beta-1,3-glucuronyltransferase 1 (glucuronosyltransferase P)
1146	1456680_at	B3gnt6	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 6 (core 3 synthase)

1147	1446432_at	B530045E10Rik	RIKEN cDNA B530045E10 gene
1148	1457791_at	B830008H07Rik	RIKEN cDNA B830008H07 gene
1149	1436286_at	B830017H08Rik	RIKEN cDNA B830017H08 gene
1150	1434993_at	B830045N13Rik	RIKEN cDNA B830045N13 gene
1151	1460113_at	B930093H17Rik	RIKEN cDNA B930093H17 gene
1152	1427947_at	B9d2	B9 protein domain 2
1153	1421825_at	Bace1	beta-site APP cleaving enzyme 1
1154	1416582_a_at	Bad	Bcl-associated death promoter
1155	1416583_at	Bad	Bcl-associated death promoter
1156	1451027_at	Baiap2	brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2
1157	1451539_at	Baiap211	BAI1-associated protein 2-like 1
1158	1423753_at	Bambi	BMP and activin membrane-bound inhibitor, homolog ( <i>Xenopus laevis</i> )
1159	1456178_at	Bambi-ps1	BMP and activin membrane-bound inhibitor, pseudogene ( <i>Xenopus laevis</i> )
1160	1421082_s_at	Banf1	barrier to autointegration factor 1
1161	1421761_a_at	Barx2	BarH-like homeobox 2
1162	1432760_at	Bat2d	BAT2 domain containing 1
1163	1438192_s_at	Baz2a	bromodomain adjacent to zinc finger domain, 2A
1164	1424680_at	BB146404	expressed sequence BB146404
1165	1445711_at	BB163080	expressed sequence BB163080
1166	1437956_at	BB220380	expressed sequence BB220380
1167	1434460_at	Bbs4	Bardet-Biedl syndrome 4 homolog (human)
1168	1434276_x_at	BC004004	cDNA sequence BC004004
1169	1444268_at	BC004004	cDNA sequence BC004004
1170	1446957_s_at	BC004022	cDNA sequence BC004022
1171	1455606_at	BC004022	cDNA sequence BC004022
1172	1425108_a_at	BC004728	cDNA sequence BC004728
1173	1424728_at	BC011248	cDNA sequence BC011248
1174	1451549_at	BC016201 /// LOC100038888	cDNA sequence BC016201 /// hypothetical protein LOC100038888
1175	1423678_at	BC017643	cDNA sequence BC017643
1176	1460087_at	BC017643	cDNA sequence BC017643
1177	1449972_s_at	BC018101	cDNA sequence BC018101
1178	1424071_s_at	BC018507	cDNA sequence BC018507
1179	1435600_s_at	BC020535	cDNA sequence BC020535
1180	1451631_at	BC021395	cDNA sequence BC021395
1181	1441213_at	BC021891	cDNA sequence BC021891
1182	1456908_at	BC023202	cDNA sequence BC023202
1183	1460696_at	BC026585	cDNA sequence BC026585
1184	1425633_at	BC026782	cDNA sequence BC026782
1185	1439903_at	BC028663	cDNA sequence BC028663
1186	1438141_at	BC029684	cDNA sequence BC029684
1187	1428442_at	BC029722	cDNA sequence BC029722
1188	1439064_at	BC030046	cDNA sequence BC030046
1189	1436511_at	BC031781	cDNA sequence BC031781
1190	1442096_at	BC031901	cDNA sequence BC031901
1191	1435175_at	BC034090	cDNA sequence BC034090
1192	1436608_at	BC038822	cDNA sequence BC038822
1193	1455157_a_at	BC039210	cDNA sequence BC039210
1194	1435156_at	BC046331	cDNA sequence BC046331
1195	1436503_at	BC048546	cDNA sequence BC048546
1196	1459769_at	BC048609 /// LOC100044982	cDNA sequence BC048609 /// hypothetical protein LOC100044982

1197	1436229_at	BC049806	CDNA sequence BC049806
1198	1434202_a_at	BC055107	cDNA sequence BC055107
1199	1437186_at	BC055324	cDNA sequence BC055324
1200	1458544_at	BC059841	cDNA sequence BC059841
1201	1435279_at	BC059842	cDNA sequence BC059842
1202	1439975_at	BC062109	cDNA sequence BC062109
1203	1451049_at	Bcap31	B-cell receptor-associated protein 31
1204	1443524_x_at	Bcl10	B-cell leukemia/lymphoma 10
1205	1422938_at	Bcl2 /// LOC100046608	B-cell leukemia/lymphoma 2 /// similar to Bcl2-like protein
1206	1450812_at	Bcl2a1a /// Bcl2a1b /// Bcl2a1c /// Bcl2a1d	B-cell leukemia/lymphoma 2 related protein A1a /// B-cell leukemia/lymphoma 2 related protein A1b /// B-cell leukemia/lymphoma 2 related protein A1c /// B-cell leukemia/lymphoma 2 related protein A1d
1207	1419004_s_at	Bcl2a1a /// Bcl2a1b /// Bcl2a1d	B-cell leukemia/lymphoma 2 related protein A1a /// B-cell leukemia/lymphoma 2 related protein A1b /// B-cell leukemia/lymphoma 2 related protein A1d
1208	1430453_a_at	Bcl2l2	Bcl2-like 2
1209	1430454_x_at	Bcl2l2	Bcl2-like 2
1210	1452910_at	Bcor	Bcl6 interacting corepressor
1211	1451541_at	Bcs1l	BCS1-like (yeast)
1212	1455880_s_at	Becn1	beclin 1 (coiled-coil, myosin-like BCL2-interacting protein)
1213	1426490_at	Bfar	bifunctional apoptosis regulator
1214	1450571_a_at	Bfsp1 /// LOC100048638	beaded filament structural protein in lens-CP94 /// similar to lens fiber cell beaded-filament structure protein
1215	1421099_at	Bhlhb3	basic helix-loop-helix domain containing, class B3
1216	1437491_at	Bicd2	bicaudal D homolog 2 (Drosophila)
1217	1425532_a_at	Bin1	bridging integrator 1
1218	1444120_at	Bin1	bridging integrator 1
1219	1426636_a_at	Birc4	baculoviral IAP repeat-containing 4
1220	1419563_at	Birc6	baculoviral IAP repeat-containing 6
1221	1427516_a_at	Boc	biregional cell adhesion molecule-related/down-regulated by oncogenes (Cdon) binding protein
1222	1427517_at	Boc	biregional cell adhesion molecule-related/down-regulated by oncogenes (Cdon) binding protein
1223	1427310_at	Bptf	bromodomain PHD finger transcription factor
1224	1447941_x_at	Braf	Braf transforming gene
1225	1444667_at	Brdt	bromodomain, testis-specific
1226	1446758_at	Bre	brain and reproductive organ-expressed protein
1227	1416924_at	Bri3	brain protein I3
1228	1428743_at	Bri3bp	Bri3 binding protein
1229	1438198_at	Bri3bp	Bri3 binding protein
1230	1455243_at	Brpf3	bromodomain and PHD finger containing, 3
1231	1426929_at	Brunol4 /// LOC100044908	bruno-like 4, RNA binding protein (Drosophila) /// similar to CUG-BP and ETR-3 like factor 4
1232	1429790_at	Brunol6	bruno-like 6, RNA binding protein (Drosophila)
1233	1435969_at	Btbd12	BTB (POZ) domain containing 12
1234	1433140_a_at	Btbd14b /// LOC622481	BTB (POZ) domain containing 14B /// similar to BTB (POZ) domain containing 14B
1235	1442061_at	Btbd7	BTB (POZ) domain containing 7
1236	1434769_at	Btbd9	BTB (POZ) domain containing 9
1237	1451824_at	Btn1a1	butyrophilin, subfamily 1, member A1

1238	1447363_s_at	Bub1b	budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog, beta ( <i>S. cerevisiae</i> )
1239	1428020_at	Bxdc5	brix domain containing 5
1240	1455771_at	Bzrap1	benzodiazapine receptor associated protein 1
1241	1453047_at	Bzrpl1	benzodiazapine receptor, peripheral-like 1
1242	1432378_at	C030004G16Rik	RIKEN cDNA C030004G16 gene
1243	1435095_at	C030009O12Rik	RIKEN cDNA C030009O12 gene
1244	1432254_at	C030013D06Rik	RIKEN cDNA C030013D06 gene
1245	1453897_at	C030014A21Rik	RIKEN cDNA C030014A21 gene
1246	1435894_at	C030014L02	hypothetical protein C030014L02
1247	1432200_at	C030044M21Rik	RIKEN cDNA C030044M21 gene
1248	1454565_at	C030046M01Rik	RIKEN cDNA C030046M01 gene
1249	1425078_x_at	C130026I21Rik /// LOC100041885	RIKEN cDNA C130026I21 gene /// similar to C130026I21Rik protein
1250	1456526_at	C130034I24Rik	RIKEN cDNA C130034I24 gene
1251	1441516_a_at	C130050O18Rik	RIKEN cDNA C130050O18 gene
1252	1441632_at	C130079B09Rik	RIKEN cDNA C130079B09 gene
1253	1445275_at	C130092O11Rik	RIKEN cDNA C130092O11 gene
1254	1446354_at	C130098B18Rik	RIKEN cDNA C130098B18 gene
1255	1448505_at	C1d	nuclear DNA binding protein
1256	1443706_at	C1galt1c1	C1GALT1-specific chaperone 1
1257	1448912_at	C1qtnf1	C1q and tumor necrosis factor related protein 1
1258	1445854_at	C230004F18Rik	RIKEN cDNA C230004F18 gene
1259	1441157_at	C230006B20	hypothetical LOC403344
1260	1427015_at	C230021P08Rik	Riken cDNA C230021P08 gene
1261	1439707_at	C230034O21Rik	RIKEN cDNA C230034O21 gene
1262	1458976_at	C230035I16Rik	RIKEN cDNA C230035I16 gene
1263	1444340_at	C230066G23Rik	RIKEN cDNA C230066G23 gene
1264	1456958_at	C230072F16Rik	RIKEN cDNA C230072F16 gene
1265	1441196_at	C230076A16Rik	RIKEN cDNA C230076A16 gene
1266	1444001_at	C230082I21Rik	RIKEN cDNA C230082I21 gene
1267	1425825_at	C230094A16Rik	RIKEN cDNA C230094A16 gene
1268	1431353_at	C330050A14Rik	RIKEN cDNA C330050A14 gene
1269	1443714_at	C530044N13Rik	RIKEN cDNA C530044N13 gene
1270	1439902_at	C5ar1	complement component 5a receptor 1
1271	1440711_at	C630001G18Rik	RIKEN cDNA C630001G18 gene
1272	1446298_at	C630016I17Rik	RIKEN cDNA C630016I17 gene
1273	1433762_at	C630043F03Rik	RIKEN cDNA C630043F03 gene
1274	1419528_at	C730007P19Rik	RIKEN cDNA C730007P19 gene
1275	1420187_at	C76628	expressed sequence C76628
1276	1442941_at	C77027	expressed sequence C77027
1277	1440910_at	C77370	expressed sequence C77370
1278	1448093_s_at	C77405	expressed sequence C77405
1279	1446776_at	C77581	expressed sequence C77581
1280	1444677_at	C77673	expressed sequence C77673
1281	1446134_at	C78115	expressed sequence C78115
1282	1447981_at	C78441	expressed sequence C78441
1283	1457379_at	C78549	expressed sequence C78549
1284	1442498_at	C78662	EST C78662
1285	1446790_at	C78948	expressed sequence C78948
1286	1442597_at	C79122	expressed sequence C79122
1287	1459652_at	C79356	expressed sequence C79356
1288	1458374_at	C79407	expressed sequence C79407
1289	1444970_at	C79870	expressed sequence C79870

1290	1445910_at	C79999	expressed sequence C79999
1291	1438755_at	C80068	expressed sequence C80068
1292	1445976_at	C80279	expressed sequence C80279
1293	1447267_at	C85319	expressed sequence C85319
1294	1447054_at	C85395	expressed sequence C85395
1295	1433483_s_at	C86187	expressed sequence C86187
1296	1443386_at	C86727	expressed sequence C86727
1297	1441534_at	C86753	expressed sequence C86753
1298	1443417_at	C87122	expressed sequence C87122
1299	1460611_at	C87499	expressed sequence C87499
1300	1435704_at	C920006O11Rik	RIKEN cDNA C920006O11 gene
1301	1456966_at	C920021L13Rik	RIKEN cDNA C920021L13 gene
1302	1446539_at	Cab39l	Calcium binding protein 39-like
1303	1428051_a_at	Cacna1d	calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1D subunit
1304	1423365_at	Cacna1g	calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1G subunit
1305	1441084_at	Cacna2d4	calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 4
1306	1457703_at	Cacna2d4	calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 4
1307	1426108_s_at	Cacnb1	calcium channel, voltage-dependent, beta 1 subunit
1308	1452476_at	Cacnb2	calcium channel, voltage-dependent, beta 2 subunit
1309	1439745_at	Cacng7	calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 7
1310	1456224_x_at	Cage1	cancer antigen 1
1311	1448738_at	Calb1	calbindin-28K
1312	1418608_at	Calml3	calmodulin-like 3
1313	1431255_at	Calr3	calreticulin 3
1314	1437125_at	Camk2a	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha
1315	1435530_at	Camsap1	calmodulin regulated spectrin-associated protein 1
1316	1429044_at	Camsap111	calmodulin regulated spectrin-associated protein 1-like 1
1317	1459385_at	Camsap111	calmodulin regulated spectrin-associated protein 1-like 1
1318	1457956_at	Camta1	calmodulin binding transcription activator 1
1319	1429621_at	Cand2	cullin-associated and neddylation-dissociated 2 (putative)
1320	1426400_a_at	Capns1	calpain, small subunit 1
1321	1448347_a_at	Caprin1	cell cycle associated protein 1
1322	1417259_a_at	Capzb	capping protein (actin filament) muscle Z-line, beta
1323	1449434_at	Car3	carbonic anhydrase 3
1324	1452394_at	Cars	cysteinyl-tRNA synthetase
1325	1437537_at	Casp9	caspase 9
1326	1434757_at	Cbfa2t2	core-binding factor, runt domain, alpha subunit 2, translocated to, 2 (human)
1327	1455082_at	Cblb	Casitas B-lineage lymphoma b
1328	1422666_at	Cblc	Casitas B-lineage lymphoma c
1329	1434779_at	Cbln2	cerebellin 2 precursor protein
1330	1431773_at	Cbx1 /// LOC100047028	chromobox homolog 1 (Drosophila HP1 beta) /// similar to heterochromatin protein 1 beta
1331	1422059_at	Cbx2	chromobox homolog 2 (Drosophila Pc class)

1332	1449713_at	Cbx7	Chromobox homolog 7
1333	1426422_at	Cc2d1a	coiled-coil and C2 domain containing 1A
1334	1427962_at	Ccdc102a	coiled-coil domain containing 102A
1335	1419802_at	Ccdc12 /// LOC667210	coiled-coil domain containing 12 /// similar to Coiled-coil domain containing 12
1336	1452523_a_at	Ccdc130	coiled-coil domain containing 130
1337	1454975_at	Ccdc131	coiled-coil domain containing 131
1338	1424699_at	Ccdc136	coiled-coil domain containing 136
1339	1453600_at	Ccdc18	coiled-coil domain containing 18
1340	1451799_at	Ccdc25	coiled-coil domain containing 25
1341	1430090_at	Ccdc28b	coiled coil domain containing 28B
1342	1441965_at	Ccdc38	coiled-coil domain containing 38
1343	1431755_a_at	Ccdc49	coiled-coil domain containing 49
1344	1452891_at	Ccdc51	coiled-coil domain containing 51
1345	1419986_at	Ccdc69	Coiled-coil domain containing 69
1346	1437362_at	Ccdc76	coiled-coil domain containing 76
1347	1431839_a_at	Ccdc81	coiled-coil domain containing 81
1348	1421383_at	Ccdc82	coiled-coil domain containing 82
1349	1424429_s_at	Ccdc95	coiled-coil domain containing 95
1350	1431604_a_at	Ccdc97	coiled-coil domain containing 97
1351	1438240_at	Ccin	Calicin
1352	1449277_at	Ccl19 /// LOC100039053 /// LOC100039789 /// LOC100039824 /// LOC100039848 /// LOC100039973 /// LOC100040035 /// LOC100043921	chemokine (C-C motif) ligand 19 /// similar to EBI-1 ligand chemokine
1353	1420380_at	Ccl2	chemokine (C-C motif) ligand 2
1354	1418777_at	Ccl25	chemokine (C-C motif) ligand 25
1355	1458277_at	Ccl25	chemokine (C-C motif) ligand 25
1356	1449177_at	Ccna1	cyclin A1
1357	1420745_a_at	CcnDbp1	cyclin D-type binding-protein 1
1358	1443807_x_at	Ccnf	cyclin F
1359	1459978_x_at	Ccnjl	cyclin J-like
1360	1432352_at	Ccny	cyclin Y
1361	1455988_a_at	Cct6a /// LOC100038887	chaperonin subunit 6a (zeta) /// hypothetical protein LOC100038887
1362	1436346_at	Cd109	CD109 antigen
1363	1431527_at	Cd164	CD164 antigen
1364	1424509_at	Cd177	CD177 antigen
1365	1456895_at	Cd209b	CD209b antigen
1366	1426183_a_at	Cd209d	CD209d antigen
1367	1420716_at	Cd247	CD247 antigen
1368	1417224_a_at	Cd2bp2	CD2 antigen (cytoplasmic tail) binding protein 2
1369	1422283_at	Cd40lg	CD40 ligand
1370	1418353_at	Cd5	CD5 antigen
1371	1422875_at	Cd84	CD84 antigen
1372	1425335_at	Cd8a	CD8 antigen, alpha chain
1373	1423966_at	Cd99l2	Cd99 antigen-like 2
1374	1429186_a_at	Cdadc1	cytidine and dCMP deaminase domain containing 1
1375	1436913_at	Cdc14a	CDC14 cell division cycle 14 homolog A (S. cerevisiae)
1376	1425554_a_at	Cdc16	CDC16 cell division cycle 16 homolog (S. cerevisiae)
1377	1422252_a_at	Cdc25c	cell division cycle 25 homolog C (S. pombe)
1378	1416820_at	Cdc37	cell division cycle 37 homolog (S. cerevisiae)

1379	1440886_at	Cdc3711	cell division cycle 37 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )-like 1
1380	1453342_at	Cdc40	cell division cycle 40 homolog (yeast)
1381	1449574_a_at	Cdc42	cell division cycle 42 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )
1382	1460708_s_at	Cdc42	cell division cycle 42 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )
1383	1435220_s_at	Cdc42se2	CDC42 small effector 2
1384	1457838_at	Cdc45l	cell division cycle 45 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )-like
1385	1455983_at	Cdca2	cell division cycle associated 2
1386	1455164_at	Cdgap	Cdc42 GTPase-activating protein
1387	1448906_at	Cdh16	cadherin 16
1388	1449637_at	Cdh4	cadherin 4
1389	1441690_at	Cdh8	cadherin 8
1390	1427618_at	Cdh9	cadherin 9
1391	1421123_at	Cdk5r1	cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit (p35) 1
1392	1421124_at	Cdk5r1	cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit (p35) 1
1393	1423067_at	Cdk5rap3	CDK5 regulatory subunit associated protein 3
1394	1451741_a_at	Cdk7	cyclin-dependent kinase 7 (homolog of <i>Xenopus</i> MO15 cdk-activating kinase)
1395	1448983_at	Cdrt4	CMT1A duplicated region transcript 4
1396	1432229_a_at	Cdyl2	chromodomain protein, Y chromosome-like 2
1397	1431139_at	Cdyl2	chromodomain protein, Y chromosome-like 2
1398	1425675_s_at	Ceacam1	CEA-related cell adhesion molecule 1
1399	1427711_a_at	Ceacam1	CEA-related cell adhesion molecule 1
1400	1450494_x_at	Ceacam1	CEA-related cell adhesion molecule 1
1401	1427712_at	Ceacam1	CEA-related cell adhesion molecule 1
1402	1421348_a_at	Cend1	cell cycle exit and neuronal differentiation 1
1403	1435944_s_at	Cenpb	centromere protein B
1404	1418184_at	Cenpm	centromere protein M
1405	1447407_at	Centd3	centaurin, delta 3
1406	1435433_at	Centg2	centaurin, gamma 2
1407	1430577_at	Cep27	centrosomal protein 27
1408	1453683_a_at	Cep55	centrosomal protein 55
1409	1438409_at	Cep63	centrosomal protein 63
1410	1456121_at	Cep97	centrosomal protein 97
1411	1434034_at	Cerk /// LOC676420	ceramide kinase /// similar to Ceramide kinase (Acylsphingosine kinase) (mCERK)
1412	1421159_at	Cgnl1 /// LOC677485	cingulin-like 1 /// similar to cingulin-like 1 isoform 1
1413	1443861_at	Cgnl1 /// LOC677485	cingulin-like 1 /// similar to cingulin-like 1 isoform 1
1414	1443711_at	Chd8	Chromodomain helicase DNA binding protein 8
1415	1439208_at	Chek1	checkpoint kinase 1 homolog ( <i>S. pombe</i> )
1416	1418149_at	Chga	chromogranin A
1417	1415885_at	Chgb	chromogranin B
1418	1451537_at	Chi3l1	chitinase 3-like 1
1419	1451098_at	Chmp1a	chromatin modifying protein 1A
1420	1428252_at	Chmp2b	chromatin modifying protein 2B
1421	1459859_x_at	Chrac1	chromatin accessibility complex 1
1422	1417304_at	Chrd	chordin
1423	1450299_at	Chrna7	cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 7
1424	1426620_at	Chst10	carbohydrate sulfotransferase 10
1425	1447770_at	Cib2	calcium and integrin binding family member 2
1426	1454248_at	Cib4	calcium and integrin binding family member 4
1427	1455019_x_at	Ckap4	cytoskeleton-associated protein 4
1428	1451823_at	Clca4	chloride channel calcium activated 4

1429	1437932_a_at	Cldn1	claudin 1
1430	1420345_at	Cldn14	claudin 14
1431	1425445_a_at	Cldn18	claudin 18
1432	1449428_at	Cldn18	claudin 18
1433	1426332_a_at	Cldn3	claudin 3
1434	1429954_at	Clec4a3	C-type lectin domain family 4, member a3
1435	1418617_x_at	Clgn	calmegin
1436	1425060_s_at	Clip1	CAP-GLY domain containing linker protein 1
1437	1431382_a_at	Clip4 /// LOC100048376	CAP-GLY domain containing linker protein family, member 4 /// similar to CAP-GLY domain containing linker protein family, member 4
1438	1426124_a_at	Clk1	CDC-like kinase 1
1439	1429166_s_at	Clmn	calmin
1440	1451656_at	Clmn	calmin
1441	1441083_at	Clptm1	cleft lip and palate associated transmembrane protein 1
1442	1423730_at	Clptm1l	CLPTM1-like
1443	1441165_s_at	Clstn2	calsynterin 2
1444	1460740_at	Cltb /// LOC100046457	clathrin, light polypeptide (Lcb) /// similar to Cltb protein
1445	1454626_at	Cltc	clathrin, heavy polypeptide (Hc)
1446	1421014_a_at	Clybl	citrate lyase beta like
1447	1431325_at	Cml3	camello-like 3
1448	1426224_x_at	Cmtm2a	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 2A
1449	1441312_at	Cnnm1	cyclin M1
1450	1443170_at	Cnnm1	cyclin M1
1451	1434251_at	Cnot1	CCR4-NOT transcription complex, subunit 1
1452	1456576_x_at	Cnot2	CCR4-NOT transcription complex, subunit 2
1453	1437341_x_at	Cnp	2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase
1454	1459846_x_at	Cnpy2	canopy 2 homolog (zebrafish)
1455	1419425_at	Cnr1	cannabinoid receptor 1 (brain)
1456	1460321_at	Cntn4	contactin 4
1457	1418237_s_at	Col18a1	collagen, type XVIII, alpha 1
1458	1423669_at	Col1a1	collagen, type I, alpha 1
1459	1455494_at	Col1a1	collagen, type I, alpha 1
1460	1424051_at	Col4a2	collagen, type IV, alpha 2
1461	1420383_a_at	Col4a3bp	collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen) binding protein
1462	1440250_at	Col4a4	collagen, type IV, alpha 4
1463	1425475_at	Col4a5	collagen, type IV, alpha 5
1464	1424121_at	Commd1	COMM domain containing 1
1465	1442321_at	Commd2	COMM domain containing 2
1466	1451369_at	Commd5	COMM domain containing 5
1467	1419527_at	Comp	cartilage oligomeric matrix protein
1468	1452479_at	Copg2as2 /// LOC100044236	coatamer protein complex, subunit gamma 2, antisense 2 /// hypothetical protein LOC100044236
1469	1460171_at	Cops5	COP9 (constitutive photomorphogenic) homolog, subunit 5 (Arabidopsis thaliana)
1470	1426693_x_at	Cox15	COX15 homolog, cytochrome c oxidase assembly protein (yeast)
1471	1448322_a_at	Cox4i1	cytochrome c oxidase subunit IV isoform 1
1472	1416971_at	Cox7a2	cytochrome c oxidase, subunit VIIa 2
1473	1434547_at	Cpd /// LOC100046781	carboxypeptidase D /// similar to carboxypeptidase D

1474	1449931_at	Cpeb4	cytoplasmic polyadenylation element binding protein 4
1475	1419958_at	Cphx /// LOC100039213 /// LOC100039280	cytoplasmic polyadenylated homeobox /// hypothetical protein LOC100039213 /// hypothetical protein LOC100039280
1476	1417747_at	Cplx1	complexin 1
1477	1451590_at	Cplx4	complexin 4
1478	1429413_at	Cpm	carboxypeptidase M
1479	1422493_at	Cpox	coproporphyrinogen oxidase
1480	1437328_x_at	Cpsf3	cleavage and polyadenylation specificity factor 3
1481	1437852_x_at	Cpsf3	cleavage and polyadenylation specificity factor 3
1482	1456042_s_at	Cramp1l	Crn, cramped-like (Drosophila)
1483	1420325_at	Cramp1l	Crn, cramped-like (Drosophila)
1484	1423094_at	Crbn	cereblon
1485	1424740_at	Creb3	cAMP responsive element binding protein 3
1486	1424742_at	Creb3	cAMP responsive element binding protein 3
1487	1435085_at	Crebl2	CAMP responsive element binding protein-like 2
1488	1436850_at	Creg2	cellular repressor of E1A-stimulated genes 2
1489	1452253_at	Crim1	cysteine rich transmembrane BMP regulator 1 (chordin like)
1490	1440955_at	Crim2	cysteine rich BMP regulator 2 (chordin like)
1491	1425855_a_at	Crk	v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)
1492	1434369_a_at	Cryab	crystallin, alpha B
1493	1425286_at	Crygn	crystallin, gamma N
1494	1430547_s_at	Cryz1	crystallin, zeta (quinone reductase)-like 1
1495	1427396_a_at	Csde1	cold shock domain containing E1, RNA binding
1496	1448809_at	Cse1l	chromosome segregation 1-like (S. cerevisiae)
1497	1451497_at	Csnk1a1	casein kinase 1, alpha 1
1498	1449932_at	Csnk1d	casein kinase 1, delta
1499	1416728_at	Csnk2b	casein kinase 2, beta polypeptide
1500	1448471_a_at	Ctla2a	cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2 alpha
1501	1448149_at	Ctnna1	catenin (cadherin associated protein), alpha 1
1502	1456116_at	Ctnnd2 /// LOC100045979	catenin (cadherin associated protein), delta 2 /// similar to arm-repeat protein NPRAP/neurojungin
1503	1448220_at	Ctrb1	chymotrypsinogen B1
1504	1434747_at	Ctrc	chymotrypsin C (caldecrin)
1505	1421313_s_at	Cttn	cortactin
1506	1421314_at	Cttn	cortactin
1507	1431145_a_at	Cuedc2	CUE domain containing 2
1508	1434065_at	Cwf19l1	CWF19-like 1, cell cycle control (S. pombe)
1509	1453688_at	Cwf19l2	CWF19-like 2, cell cycle control (S. pombe)
1510	1450020_at	Cx3cr1	chemokine (C-X3-C) receptor 1
1511	1453282_at	Cxadr	coxsackievirus and adenovirus receptor
1512	1418456_a_at	Cxcl14	chemokine (C-X-C motif) ligand 14
1513	1449195_s_at	Cxcl16	chemokine (C-X-C motif) ligand 16
1514	1454106_a_at	Cxxc1	CXXC finger 1 (PHD domain)
1515	1437351_at	Cxxc4	CXXC finger 4
1516	1438304_at	Cxxc4	CXXC finger 4
1517	1431021_at	Cyb561d1	cytochrome b-561 domain containing 1
1518	1436943_at	Cyb5d2	cytochrome b5 domain containing 2
1519	1459448_at	Cyb5r2	cytochrome b5 reductase 2
1520	1436778_at	Cybb	cytochrome b-245, beta polypeptide
1521	1423630_at	Cygb	cytoglobin
1522	1429617_at	Cyld	cyldromatosis (turban tumor syndrome)

1523	1451787_at	Cyp2b10	cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 10
1524	1419590_at	Cyp2b9 /// LOC100047700	cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 9 /// similar to testosterone 16a-hydroxylase type a
1525	1452501_at	Cyp2c38	cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 38
1526	1424273_at	Cyp2c70	cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 70
1527	1449565_at	Cyp2g1	cytochrome P450, family 2, subfamily g, polypeptide 1
1528	1444960_at	Cyp2u1	cytochrome P450, family 2, subfamily u, polypeptide 1
1529	1449316_at	Cyp4f15	cytochrome P450, family 4, subfamily f, polypeptide 15
1530	1456793_at	Cyt11	cytokine like 1
1531	1441653_at	D030022P06Rik	RIKEN cDNA D030022P06 gene
1532	1450839_at	D0H4S114	DNA segment, human D4S114
1533	1449687_at	D10ErtD610e	DNA segment, Chr 10, ERATO Doi 610, expressed
1534	1446971_at	D10Wsu159e	DNA segment, Chr 10, Wayne State University 159, expressed
1535	1446952_at	D11ErtD506e	DNA segment, Chr 11, ERATO Doi 506, expressed
1536	1452805_at	D11Wsu47e	DNA segment, Chr 11, Wayne State University 47, expressed
1537	1454806_at	D12ErtD553e	DNA segment, Chr 12, ERATO Doi 553, expressed
1538	1437022_at	D130059P03Rik	RIKEN cDNA D130059P03 gene
1539	1420099_at	D13ErtD787e	DNA segment, Chr 13, ERATO Doi 787, expressed
1540	1439980_at	D14ErtD725e	DNA segment, Chr 14, ERATO Doi 725, expressed
1541	1446664_at	D15ErtD154e	DNA segment, Chr 15, ERATO Doi 154, expressed
1542	1442833_at	D15ErtD30e	DNA segment, Chr 15, ERATO Doi 30, expressed
1543	1445772_at	D16ErtD550e	DNA segment, Chr 16, ERATO Doi 550, expressed
1544	1446267_at	D17ErtD657e	DNA segment, Chr 17, ERATO Doi 657, expressed
1545	1434965_at	D19ErtD386e	DNA segment, Chr 19, ERATO Doi 386, expressed
1546	1456978_s_at	D19ErtD652e /// LOC100048534	DNA segment, Chr 19, ERATO Doi 652, expressed /// similar to D19ErtD652e protein
1547	1444218_at	D19ErtD737e	DNA segment, Chr 19, ERATO Doi 737, expressed
1548	1439772_at	D1Bwg0212e	DNA segment, Chr 1, Brigham & Women's Genetics 0212 expressed
1549	1446900_at	D1ErtD218e	DNA segment, Chr 1, ERATO Doi 218, expressed
1550	1437693_at	D1Pas1	DNA segment, Chr 1, Pasteur Institute 1
1551	1428913_at	D2Bwg1335e	DNA segment, Chr 2, Brigham & Women's Genetics 1335 expressed
1552	1435528_at	D2Bwg1335e	DNA segment, Chr 2, Brigham & Women's Genetics 1335 expressed
1553	1445921_at	D2ErtD397e	DNA segment, Chr 2, ERATO Doi 397, expressed
1554	1434428_at	D330028D13Rik	RIKEN cDNA D330028D13 gene
1555	1459424_at	D3ErtD108e	DNA segment, Chr 3, ERATO Doi 108, expressed
1556	1445455_at	D3ErtD270e	DNA segment, Chr 3, ERATO Doi 270, expressed
1557	1443490_at	D3ErtD34e	DNA segment, Chr 3, ERATO Doi 34, expressed

1558	1446110_at	D3Ert711e	DNA segment, Chr 3, ERATO Doi 711, expressed
1559	1428384_at	D4Bwg0951e	DNA segment, Chr 4, Brigham & Women's Genetics 0951 expressed
1560	1452686_s_at	D4Ert196e /// LOC100046421	DNA segment, Chr 4, ERATO Doi 196, expressed /// similar to D4Ert196e protein
1561	1454981_at	D4Ert22e	DNA segment, Chr 4, ERATO Doi 22, expressed
1562	1446870_at	D4Ert510e	DNA segment, Chr 4, ERATO Doi 510, expressed
1563	1442840_at	D4Ert669e	DNA segment, Chr 4, ERATO Doi 669, expressed
1564	1439691_at	D5Ert579e	DNA segment, Chr 5, ERATO Doi 579, expressed
1565	1439880_at	D630023F18Rik	RIKEN cDNA D630023F18 gene
1566	1433588_at	D6Wsu116e	DNA segment, Chr 6, Wayne State University 116, expressed
1567	1425746_at	D730039F16Rik	RIKEN cDNA D730039F16 gene
1568	1433277_at	D730048A03Rik	RIKEN cDNA D730048A03 gene
1569	1446976_at	D7Ert758e	DNA segment, Chr 7, ERATO Doi 758, expressed
1570	1444626_at	D930001B02	hypothetical protein D930001B02
1571	1444452_at	D930002L09Rik	RIKEN cDNA D930002L09 gene
1572	1424860_at	D930016D06Rik	RIKEN cDNA D930016D06 gene
1573	1457484_at	D930050J11	hypothetical D930050J11
1574	1427632_x_at	Daf2	decay accelerating factor 2
1575	1451970_at	Daglb	diacylglycerol lipase, beta
1576	1419542_at	Dazl	deleted in azoospermia-like
1577	1430545_at	Dbf4	DBF4 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )
1578	1441503_at	Dcdc2a	doublecortin domain containing 2a
1579	1441506_at	Dcn	decorin
1580	1458247_s_at	Dctn5	dynactin 5
1581	1436680_s_at	Ddb2	damage specific DNA binding protein 2
1582	1436181_at	Ddef2	development and differentiation enhancing factor 2
1583	1429480_at	Ddi1	DDI1, DNA-damage inducible 1, homolog 1 ( <i>S. cerevisiae</i> )
1584	1459990_at	Ddr1	Discoidin domain receptor family, member 1
1585	1428563_at	Ddx10	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 10
1586	1433809_at	Ddx5	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 5
1587	1433810_x_at	Ddx5	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 5
1588	1434608_at	Ddx52	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 52
1589	1439122_at	Ddx6	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 6
1590	1427780_at	Defb35	defensin beta 35
1591	1419600_at	Defb4	defensin beta 4
1592	1418550_x_at	Defcr-rs1	defensin related sequence cryptdin peptide (paneth cells)
1593	1420598_x_at	Defcr-rs2 /// LOC100044289 /// LOC100044290	defensin related cryptdin, related sequence 2 /// hypothetical protein LOC100044289 /// hypothetical protein LOC100044290
1594	1424549_at	Degs2	degenerative spermatocyte homolog 2 ( <i>Drosophila</i> ), lipid desaturase
1595	1424047_at	Dera	2-deoxyribose-5-phosphate aldolase homolog ( <i>C. elegans</i> )
1596	1426732_at	Des	desmin
1597	1460174_at	Dexi	dexamethasone-induced transcript
1598	1421229_at	Dffb	DNA fragmentation factor, beta subunit
1599	1418295_s_at	Dgat1	diacylglycerol O-acyltransferase 1
1600	1446169_at	Dgcr8	DiGeorge syndrome critical region gene 8
1601	1426738_at	Dgkz	diacylglycerol kinase zeta
1602	1446614_at	Dgkz	Diacylglycerol kinase zeta
1603	1418129_at	Dhcr24	24-dehydrocholesterol reductase

1604	1425520_a_at	Dhdds	dehydrodolichyl diphosphate synthase
1605	1419382_a_at	Dhrs4	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 4
1606	1442661_at	Dhrs7b	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 7B
1607	1434710_at	Dhx29	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 29
1608	1427564_at	Diap2	diaphanous homolog 2 (Drosophila)
1609	1437647_at	Dido1	death inducer-obliterator 1
1610	1446729_at	Disp2	dispatched homolog 2 (Drosophila)
1611	1435404_at	Disp2	dispatched homolog 2 (Drosophila)
1612	1443957_at	Dixdc1	DIX domain containing 1
1613	1437927_at	Dlg2	discs, large homolog 2 (Drosophila)
1614	1419204_at	Dll1	delta-like 1 (Drosophila)
1615	1449819_at	Dmc1	DMC1 dosage suppressor of mck1 homolog, meiosis-specific homologous recombination (yeast)disrupted meiotic cDNA 1
1616	1426005_at	Dmp1	dentin matrix protein 1
1617	1447641_at	Dmwd	dystrophia myotonica-containing WD repeat motif
1618	1442412_at	Dnahc9	dynein, axonemal, heavy chain 9
1619	1437094_x_at	Dnaic1	dynein, axonemal, intermediate chain 1
1620	1416756_at	Dnajb1	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 1
1621	1416755_at	Dnajb1	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 1
1622	1423151_at	Dnajb11	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 11
1623	1420500_at	Dnajc1	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 1
1624	1437547_s_at	Dnajc14	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 14
1625	1460711_at	Dnajc21	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 21
1626	1449372_at	Dnajc3a	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 3A
1627	1419163_s_at	Dnajc3a	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 3A
1628	1418725_at	Dnajc5b	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 5 beta
1629	1455367_at	Dnd1	dead end homolog 1 (zebrafish)
1630	1436624_at	Dnm3	dynamamin 3
1631	1422946_a_at	Dnmt1	DNA methyltransferase (cytosine-5) 1
1632	1460579_at	Dnpep	aspartyl aminopeptidase
1633	1449757_x_at	Dntt	deoxynucleotidyltransferase, terminal
1634	1427881_at	Dnttip2	deoxynucleotidyltransferase, terminal, interacting protein 2
1635	1435343_at	Dock10	dedicator of cytokinesis 10
1636	1449419_at	Dock8	dedicator of cytokinesis 8
1637	1445232_at	Dock9	Dedicator of cytokinesis 9
1638	1436402_at	Dohh	deoxyhypusine hydroxylase/monooxygenase
1639	1416333_at	Dok2	docking protein 2
1640	1435295_at	Dopey1	dopey family member 1
1641	1438370_x_at	Dos	downstream of Stk11
1642	1441659_at	Dpf3	D4, zinc and double PHD fingers, family 3
1643	1433921_s_at	Dph3	DPH3 homolog (KT111, <i>S. cerevisiae</i> )
1644	1451389_at	Dph4	DPH4 homolog (JJJ3, <i>S. cerevisiae</i> )
1645	1452839_at	Dph5	DPH5 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )
1646	1441082_at	Dscam	Down syndrome cell adhesion molecule
1647	1453753_at	Dtl	denticleless homolog (Drosophila)
1648	1449777_at	Dus4l	Dihydrouridine synthase 4-like ( <i>S. cerevisiae</i> )
1649	1454785_at	Dusp11	dual specificity phosphatase 11 (RNA/RNP complex 1-interacting)
1650	1451270_at	Dusp18	dual specificity phosphatase 18
1651	1425848_a_at	Dusp26	dual specificity phosphatase 26 (putative)

1652	1450978_at	Dvl1	dishevelled, dsh homolog 1 (Drosophila)
1653	1428987_at	Dynlrb2	dynein light chain roadblock-type 2
1654	1436354_at	Dzip1l	DAZ interacting protein 1-like
1655	1430386_at	E030024N20Rik	RIKEN cDNA E030024N20 gene
1656	1442156_at	E030030I06Rik	RIKEN cDNA E030030I06 gene
1657	1446270_at	E030042O20Rik	RIKEN cDNA E030042O20 gene
1658	1458371_at	E130006N16Rik	RIKEN cDNA E130006N16 gene
1659	1443977_at	E130014H10Rik	RIKEN cDNA E130014H10 gene
1660	1454170_at	E130101E03Rik	RIKEN cDNA E130101E03 gene
1661	1445717_at	E130108L08Rik	RIKEN cDNA E130108L08 gene
1662	1439531_at	E130311K13Rik	RIKEN cDNA E130311K13 gene
1663	1458724_at	E230008O15Rik	RIKEN cDNA E230008O15 gene
1664	1444637_at	E230016M11Rik	RIKEN cDNA E230016M11 gene
1665	1455790_at	E2f2	E2F transcription factor 2
1666	1460207_s_at	E2f5	E2F transcription factor 5
1667	1437914_at	E2f6	E2F transcription factor 6
1668	1433529_at	E430002G05Rik	RIKEN cDNA E430002G05 gene
1669	1434132_at	E430025E21Rik	RIKEN cDNA E430025E21 gene
1670	1450464_at	E4f1	E4F transcription factor 1
1671	1422120_at	Eaf2	ELL associated factor 2
1672	1424774_s_at	Ears2	glutamyl-tRNA synthetase 2 (mitochondrial)(putative)
1673	1451472_at	Ears2	glutamyl-tRNA synthetase 2 (mitochondrial)(putative)
1674	1449101_at	Ebf2	early B-cell factor 2
1675	1418494_at	Ebf2	early B-cell factor 2
1676	1452751_at	Ebf3	early B-cell factor 3
1677	1439898_at	Ebna1bp2	EBNA1 binding protein 2
1678	1417298_at	Ebpl	emopamil binding protein-like
1679	1458177_at	Ebpl	emopamil binding protein-like
1680	1449524_at	Eda /// LOC100045121	ectodysplasin-A /// similar to EDA-A1
1681	1451218_at	Edem1	ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 1
1682	1440152_x_at	Edf1 /// LOC665181 /// LOC674653	endothelial differentiation-related factor 1 /// similar to endothelial differentiation-related factor 1 /// similar to Endothelial differentiation-related factor 1 (EDF-1) (Multiprotein bridging factor 1) (MBF1) (Calmodulin-associated peptide 19) (CAP-19)
1683	1423571_at	Edg1	endothelial differentiation sphingolipid G-protein-coupled receptor 1
1684	1438696_at	Edn3	endothelin 3
1685	1460513_a_at	Ednra	endothelin receptor type A
1686	1449506_a_at	Eef1d	eukaryotic translation elongation factor 1 delta (guanine nucleotide exchange protein)
1687	1437829_s_at	Eef2k	eukaryotic elongation factor-2 kinase
1688	1448507_at	Efhd1	EF hand domain containing 1
1689	1417521_at	Efna2	ephrin A2
1690	1430333_at	Eftud1	elongation factor Tu GTP binding domain containing 1
1691	1416557_a_at	Eftud2	elongation factor Tu GTP binding domain containing 2
1692	1457737_at	EG215472	predicted gene, EG215472
1693	1456853_at	EG237412	Predicted gene, EG237412
1694	1435124_at	EG328644	predicted gene, EG328644

<b>1695</b>	1458405_at	EG330503	predicted gene, EG330503
<b>1696</b>	1454911_at	EG382106	predicted gene, EG382106
<b>1697</b>	1459002_at	<p>EG382843 /// EG432725 /// EG433125 ///  EG433319 /// EG433387 /// EG545172 ///  EG545226 /// EG627939 /// EG628822 ///  EG631359 /// EG637748 /// EG665251 ///  EG665821 /// EG666340 /// EG666977 ///  EG667610 /// EG668319 ///  LOC100039601 /// LOC100040140 ///  LOC100040508 /// LOC100040678 ///  LOC100040706 /// LOC100041000 ///  LOC100041205 /// LOC100041464 ///  LOC100042190 /// LOC100042650 ///  LOC100042767 /// LOC100043184 ///  LOC100043348 /// LOC100043495 ///  LOC100043498 /// LOC100043646 ///  LOC100043866 /// LOC100044512 ///  LOC100044532 /// LOC100045052 ///  LOC100045194 /// LOC100045259 ///  LOC100045370 /// LOC100045613 ///  LOC100045641 /// LOC100045839 ///  LOC100046478 /// LOC100046941 ///  LOC100047019 /// LOC100047314 ///  LOC100048241 /// LOC100048318 ///  LOC268676 /// LOC432801 ///  LOC433168 /// LOC545423 ///  LOC545572 /// LOC620771 ///  LOC621171 /// LOC626605 ///  LOC634339 /// LOC636187 ///  LOC636855 /// LOC637882 ///  LOC637900 /// LOC640096 ///  LOC640734 /// LOC664880 ///  LOC665235 /// LOC665245 ///  LOC665327 /// LOC666265 ///  LOC666431 /// LOC666543 ///  LOC666622 /// LOC666714 ///  LOC667230 /// LOC667287 ///  LOC667528 /// LOC667842 ///  LOC667919 /// LOC667989 ///  LOC668366 /// LOC668751 ///  LOC668919 /// LOC672610 ///  LOC674403 /// LOC674669 ///  LOC674893 /// LOC675035 ///  LOC675609 /// LOC675980 ///  LOC676253 /// LOC676590 ///  LOC677463 /// LOC677659 ///  mCG_121688 /// Rpl21</p>	<p>ribosomal protein L21 /// similar to ribosomal  protein L21 /// predicted gene, EG382843 ///  predicted gene, EG432725 /// predicted gene,  EG433125 /// predicted gene, EG433319 ///  predicted gene, EG433387 /// predicted gene,  EG545172 /// predicted gene, EG545226 ///  predicted gene, EG627939 /// predicted gene,  EG628822 /// predicted gene, EG631359 ///  predicted gene, EG637748 /// similar to 60S  ribosomal protein L21 /// similar to hCG1642689  /// predicted gene, EG665251 /// similar to  hCG2016451 /// predicted gene, EG665821 ///  predicted gene, EG666340 /// predicted gene,  EG666977 /// hypothetical LOC667287 ///  predicted gene, EG667610 /// predicted gene,  EG668319 /// hypothetical protein LOC672610 ///  ribosomal protein L21 pseudogene</p>
<b>1698</b>	1434623_at	EG383341 /// EG665823 /// RP23-24J10.5 /// Uba52	ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1 /// predicted gene, EG383341 /// predicted gene, EG665823 /// ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1-like
<b>1699</b>	1439865_at	EG432879	Predicted gene, EG432879

1700	1457612_at	<p>EG433184 /// EG433273 /// EG622339 /// Gapdh /// LOC100039214 /// LOC100039229 /// LOC100039556 /// LOC100039762 /// LOC100039827 /// LOC100039840 /// LOC100039959 /// LOC100040001 /// LOC100040053 /// LOC100040109 /// LOC100040634 /// LOC100040898 /// LOC100041006 /// LOC100041204 /// LOC100041236 /// LOC100041245 /// LOC100041325 /// LOC100041342 /// LOC100041399 /// LOC100041720 /// LOC100041831 /// LOC100042025 /// LOC100042148 /// LOC100042349 /// LOC100042427 /// LOC100043349 /// LOC100043659 /// LOC100043724 /// LOC100043797 /// LOC100043853 /// LOC100044454 /// LOC100044628 /// LOC100044707 /// LOC100044715 /// LOC100044861 /// LOC100044933 /// LOC100044981 /// LOC100045120 /// LOC100045141 /// LOC100045230 /// LOC100045395 /// LOC100045908 /// LOC100045954 /// LOC100046067 /// LOC100046224 /// LOC100046806 /// LOC100047129 /// LOC100047232 /// LOC100047303 /// LOC100047352 /// LOC100048117 /// LOC100048253 /// LOC100048291 /// LOC100048329 /// LOC100048438 /// LOC386426 /// LOC435963 /// LOC546736 /// LOC640374 /// LOC665129 /// LOC665233 /// LOC665381 /// LOC665922 /// LOC666835 /// LOC666891 /// LOC667204 /// LOC667354 /// LOC668018 /// LOC668242 /// LOC671215 /// LOC674958 /// LOC675514 /// LOC675787 /// LOC676813 /// LOC676923 /// RP23-403O15.4</p>	<p>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase /// similar to Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase /// predicted gene, EG433184 /// predicted gene, EG433273 /// similar to Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) /// glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase pseudogene /// predicted gene, EG622339 /// similar to uracil DNA glycosylase /// similar to Predicted gene, EG277333</p>
1701	1424269_a_at	<p>EG433297 /// EG667952 /// LOC100043172 /// Myl6</p>	<p>myosin, light polypeptide 6, alkali, smooth muscle and non-muscle /// predicted gene, EG433297 /// predicted gene, EG667952 /// similar to myosin, light polypeptide 6, alkali, smooth muscle and non-muscle</p>
1702	1442812_at	<p>EG433844</p>	<p>predicted gene, EG433844</p>
1703	1454620_x_at	<p>EG434404 /// EG629575 /// EG666577 /// EG667717 /// LOC100043734 /// LOC236932 /// LOC545640 /// LOC624159 /// LOC638497 /// LOC639593 /// LOC666613 /// LOC667739 /// LOC667922 /// Rps6</p>	<p>ribosomal protein S6 /// similar to 40S ribosomal protein S6 /// predicted gene, EG434404 /// similar to Ribosomal protein S6 /// predicted gene, EG629575 /// predicted gene, EG666577 /// predicted gene, EG667717</p>
1704	1419540_at	<p>EG434726 /// EG434727 /// EG434728 /// Fth17 /// RP23-188K22.2</p>	<p>ferritin, heavy polypeptide-like 17 /// predicted gene, EG434726 /// predicted gene, EG434727 /// predicted gene, EG434728 /// Novel protein similar to ferritin, heavy polypeptide-like 17, Fth17</p>
1705	1448217_a_at	<p>EG621100 /// EG622236 /// LOC100039431 /// Rpl27</p>	<p>ribosomal protein L27 /// predicted gene, EG621100 /// predicted gene, EG622236 /// similar to ribosomal protein L27</p>

<b>1706</b>	1423262_a_at	EG623365 /// H3f3a /// LOC100045490 /// LOC625328 /// LOC633468 /// LOC667250 /// LOC668164 /// LOC677395	H3 histone, family 3A /// predicted gene, EG623365 /// similar to H3 histone, family 3A /// similar to H3 histone, family 3B
<b>1707</b>	1444177_at	EG626058	Predicted gene, EG626058
<b>1708</b>	1456471_x_at	EG627427 /// EG666422 /// EG666875 /// EG668771 /// LOC224870 /// LOC382931 /// LOC385344 /// LOC545530 /// LOC630761 /// LOC630896 /// LOC637235 /// LOC665516 /// LOC666036 /// LOC668506 /// LOC668576 /// LOC675010 /// LOC675316 /// LOC675710 /// LOC677380 /// Phgdh	similar to 3-phosphoglycerate dehydrogenase /// 3-phosphoglycerate dehydrogenase /// similar to Phosphoglycerate dehydrogenase /// similar to 3-phosphoglycerate dehydrogenase /// predicted gene, EG627427 /// predicted gene, EG666422 /// predicted gene, EG666875 /// predicted gene, EG668771 /// hypothetical protein LOC675316
<b>1709</b>	1456584_x_at	EG627427 /// EG666422 /// EG666875 /// EG668771 /// LOC224870 /// LOC382931 /// LOC385344 /// LOC545530 /// LOC630761 /// LOC630896 /// LOC637235 /// LOC665516 /// LOC666036 /// LOC668506 /// LOC668576 /// LOC675010 /// LOC675316 /// LOC675710 /// LOC677380 /// Phgdh	similar to 3-phosphoglycerate dehydrogenase /// 3-phosphoglycerate dehydrogenase /// similar to Phosphoglycerate dehydrogenase /// similar to 3-phosphoglycerate dehydrogenase /// predicted gene, EG627427 /// predicted gene, EG666422 /// predicted gene, EG666875 /// predicted gene, EG668771 /// hypothetical protein LOC675316
<b>1710</b>	1428530_x_at	EG629116 /// LOC668041 /// LOC668724 /// LOC677113 /// Rps24	ribosomal protein S24 /// predicted gene, EG629116 /// similar to 40S ribosomal protein S24 /// similar to ribosomal protein S24
<b>1711</b>	1436330_x_at	EG631624	predicted gene, EG631624
<b>1712</b>	1437711_x_at	EG666231 /// EG668343 /// LOC546355 /// LOC627245 /// LOC632337 /// LOC665017 /// LOC676173 /// Odc1	ornithine decarboxylase, structural 1 /// similar to Ornithine decarboxylase (ODC) /// similar to Odc1 protein /// predicted gene, EG666231 /// predicted gene, EG668343
<b>1713</b>	1416719_a_at	EG666274 /// EG668457 /// Rps10	ribosomal protein S10 /// predicted gene, EG666274 /// predicted gene, EG668457
<b>1714</b>	1455348_x_at	EG666642 /// LOC100039782 /// LOC100044494 /// LOC100045312 /// LOC100046734 /// LOC433941 /// LOC622707 /// LOC665032 /// Rpl29	ribosomal protein L29 /// similar to ribosomal protein /// predicted gene, EG666642
<b>1715</b>	1455065_x_at	EG667410 /// Gnpda1	glucosamine-6-phosphate deaminase 1 /// predicted gene, EG667410
<b>1716</b>	1451699_at	EG668468 /// EG668525	predicted gene, EG668468 /// predicted gene, EG668525
<b>1717</b>	1428262_s_at	EG668559 /// Hnrpa3 /// LOC100045099 /// LOC545592 /// LOC630401	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 /// similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 /// predicted gene, EG668559
<b>1718</b>	1437621_x_at	EG668771 /// LOC665516 /// LOC666036 /// LOC675316 /// Phgdh	3-phosphoglycerate dehydrogenase /// similar to 3-phosphoglycerate dehydrogenase /// predicted gene, EG668771 /// hypothetical protein LOC675316
<b>1719</b>	1416533_at	Egln2	EGL nine homolog 2 (C. elegans)
<b>1720</b>	1423798_a_at	Eif1	eukaryotic translation initiation factor 1
<b>1721</b>	1434538_x_at	Eif2b2	eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 2 beta
<b>1722</b>	1445908_at	Eif2b5	Eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 5 epsilon
<b>1723</b>	1453289_at	Eif2c4	eukaryotic translation initiation factor 2C, 4
<b>1724</b>	1417713_at	Eif2s2	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 2 (beta)
<b>1725</b>	1427058_at	Eif4a1	eukaryotic translation initiation factor 4A1

1726	1434985_a_at	Eif4a1	eukaryotic translation initiation factor 4A1
1727	1428363_at	Eif4g2	eukaryotic translation initiation factor 4, gamma 2
1728	1446145_at	Eif4g3	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 3
1729	1422928_at	Ela2	elastase 2, neutrophil
1730	1456202_at	Elfn2	leucine rich repeat and fibronectin type III, extracellular 2
1731	1441928_x_at	Ell	elongation factor RNA polymerase II
1732	1450208_a_at	Elmo1	engulfment and cell motility 1, ced-12 homolog (C. elegans)
1733	1456098_a_at	Elmo2	engulfment and cell motility 2, ced-12 homolog (C. elegans)
1734	1446221_at	Eln	Elastin
1735	1426643_at	Elp3	elongation protein 3 homolog (S. cerevisiae)
1736	1416414_at	Emilin1	elastin microfibril interfacier 1
1737	1429612_at	Eml4	echinoderm microtubule associated protein like 4
1738	1431162_a_at	Enah	enabled homolog (Drosophila)
1739	1442223_at	Enah	Enabled homolog (Drosophila)
1740	1426540_at	Endod1	endonuclease domain containing 1
1741	1426542_at	Endod1	endonuclease domain containing 1
1742	1421097_at	Endog	endonuclease G
1743	1455525_at	Endogl1	endonuclease G-like 1
1744	1436799_at	Enox1	ecto-NOX disulfide-thiol exchanger 1
1745	1452384_at	Enpp3	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3
1746	1436090_at	Enpp6	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 6
1747	1425909_at	ENSMUSG00000042973	predicted gene, ENSMUSG00000042973
1748	1453780_at	ENSMUSG00000043151	predicted gene, ENSMUSG00000043151
1749	1438123_at	ENSMUSG00000057924	Predicted gene, ENSMUSG00000057924
1750	1443684_at	ENSMUSG00000058045	predicted gene, ENSMUSG00000058045
1751	1441508_at	ENSMUSG00000062298	predicted gene, ENSMUSG00000062298
1752	1441139_at	ENSMUSG00000071543	predicted gene, ENSMUSG00000071543
1753	1427627_at	ENSMUSG00000074889	predicted gene, ENSMUSG00000074889
1754	1439480_at	ENSMUSG00000075545	predicted gene, ENSMUSG00000075545
1755	1438177_x_at	Entpd4 /// LOC100048085	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 4 /// similar to ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 4
1756	1449190_a_at	Entpd4 /// LOC100048085	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 4 /// similar to ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 4
1757	1451765_a_at	Entpd5	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 5
1758	1460433_at	Entpd6	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 6
1759	1457758_at	Eny2	enhancer of yellow 2 homolog (Drosophila)
1760	1424092_at	Epb4.1	erythrocyte protein band 4.1
1761	1458807_at	Epb4.1	erythrocyte protein band 4.1
1762	1434575_at	Epb4.111	erythrocyte protein band 4.1-like 1
1763	1433492_at	Epb4.112	erythrocyte protein band 4.1-like 2
1764	1426010_a_at	Epb4.113	erythrocyte protein band 4.1-like 3
1765	1417338_at	Epb4.2	erythrocyte protein band 4.2
1766	1460223_a_at	Epb4.9	erythrocyte protein band 4.9
1767	1460074_x_at	Epdr1	Ependymin related protein 1 (zebrafish)
1768	1455188_at	Ephb1	Eph receptor B1
1769	1421553_at	Epm2a	epilepsy, progressive myoclonic epilepsy, type 2 gene alpha

1770	1439677_at	Epm2a	epilepsy, progressive myoclonic epilepsy, type 2 gene alpha
1771	1427225_at	Epn2	epsin 2
1772	1454303_at	Epn2	epsin 2
1773	1452158_at	Eprs /// LOC633677	glutamyl-prolyl-tRNA synthetase /// similar to Bifunctional aminoacyl-tRNA synthetase
1774	1447848_at	Eps15l1	epidermal growth factor receptor pathway substrate 15-like 1
1775	1432235_at	Epsti1	epithelial stromal interaction 1 (breast)
1776	1451279_at	Erc1	ELKS/RAB6-interacting/CAST family member 1
1777	1444681_at	Erc2	ELKS/RAB6-interacting/CAST family member 2
1778	1437447_s_at	Ercc1	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1
1779	1442253_at	Ercc2	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 2
1780	1424462_at	Ergic2	ERGIC and golgi 2
1781	1421240_at	Ern1	endoplasmic reticulum (ER) to nucleus signalling 1
1782	1460480_at	Erv3	endogenous retroviral sequence 3
1783	1419510_at	Es22	esterase 22
1784	1433862_at	Esp1l	extra spindle poles-like 1 (S. cerevisiae)
1785	1428181_at	Etfb	electron transferring flavoprotein, beta polypeptide
1786	1426630_at	Exosc2	exosome component 2
1787	1424685_at	Exosc4	exosome component 4
1788	1443117_at	Eya1	eyes absent 1 homolog (Drosophila)
1789	1421288_at	F2rl3	coagulation factor II (thrombin) receptor-like 3
1790	1446558_at	F730015K02Rik	RIKEN cDNA F730015K02 gene
1791	1444426_at	F730031O20Rik	RIKEN cDNA F730031O20 gene
1792	1449558_at	F8	coagulation factor VIII
1793	1417556_at	Fabp1	fatty acid binding protein 1, liver
1794	1437780_at	Fancc	Fanconi anemia, complementation group B
1795	1450861_at	Fancc	Fanconi anemia, complementation group C
1796	1442092_at	Fancc2	Fanconi anemia, complementation group D2
1797	1423624_at	Fancl /// LOC100044333	Fanconi anemia, complementation group L /// similar to Fanconi anemia, complementation group L
1798	1445003_at	Farsa	phenylalanyl-tRNA synthetase, alpha subunit
1799	1457135_at	Fat2	FAT tumor suppressor homolog 2 (Drosophila)
1800	1449141_at	Fblim1	filamin binding LIM protein 1
1801	1451119_a_at	Fbln1	fibulin 1
1802	1439688_at	Fbln1	fibulin 1
1803	1460412_at	Fbln7	fibulin 7
1804	1458449_at	Fbxl11	F-box and leucine-rich repeat protein 11
1805	1448420_a_at	Fbxl12	F-box and leucine-rich repeat protein 12
1806	1441561_at	Fbxl3	F-box and leucine-rich repeat protein 3
1807	1439890_at	Fbxl7	F-box and leucine-rich repeat protein 7
1808	1418953_at	Fbxo16	F-box protein 16
1809	1427004_at	Fbxo2	F-box protein 2
1810	1453136_at	Fbxo30	F-box protein 30
1811	1443698_at	Fbxo39	F-box protein 39
1812	1417501_at	Fbxo6	F-box protein 6
1813	1437316_at	Fbxw19	F-box and WD-40 domain protein 19
1814	1417476_at	Fbxw5	F-box and WD-40 domain protein 5
1815	1428120_at	Fbxw9	F-box and WD-40 domain protein 9

1816	1451941_a_at	Fcgr2b	Fc receptor, IgG, low affinity IIb
1817	1416978_at	Fcgrt	Fc receptor, IgG, alpha chain transporter
1818	1442453_at	Fcho2	FCH domain only 2
1819	1455337_at	Fgd4	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 4
1820	1418376_at	Fgf15	fibroblast growth factor 15
1821	1449545_at	Fgf18	fibroblast growth factor 18
1822	1422916_at	Fgf21	fibroblast growth factor 21
1823	1419086_at	Fgfbp1	fibroblast growth factor binding protein 1
1824	1428919_at	Fgfr1op	Fgfr1 oncogene partner
1825	1419184_a_at	Fhl2	four and a half LIM domains 2
1826	1425031_at	Fktn	fukutin
1827	1419538_at	Flt3	FMS-like tyrosine kinase 3
1828	1427671_a_at	Fmn1	formin 1
1829	1422904_at	Fmo2	flavin containing monooxygenase 2
1830	1450332_s_at	Fmo5 /// LOC100046051	flavin containing monooxygenase 5 /// similar to Flavin containing monooxygenase 5
1831	1426642_at	Fn1	fibronectin 1
1832	1419924_at	Fnip1	Folliculin interacting protein 1
1833	1423100_at	Fos	FBJ osteosarcoma oncogene
1834	1431900_a_at	Foxa3	forkhead box A3
1835	1419485_at	Foxc1	forkhead box C1
1836	1422210_at	Foxd3	forkhead box D3
1837	1450508_at	Foxn1	forkhead box N1
1838	1454831_at	Foxn2	forkhead box N2
1839	1438232_at	Foxp2	forkhead box P2
1840	1457082_at	Foxp3	Forkhead box P3
1841	1422735_at	Foxq1	forkhead box Q1
1842	1455220_at	Frat2	frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas 2
1843	1450146_at	Freq	frequenin homolog (Drosophila)
1844	1421362_a_at	Frk	fyn-related kinase
1845	1435956_at	Frmd5	FERM domain containing 5
1846	1446506_at	Frmpd3	FERM and PDZ domain containing 3
1847	1460141_at	Frrs1	Ferric-chelate reductase 1
1848	1444520_at	Fryl	furry homolog-like (Drosophila)
1849	1416515_at	Fscn1	fascin homolog 1, actin bundling protein (Strongylocentrotus purpuratus)
1850	1436800_at	Fstl5	follistatin-like 5
1851	1439904_at	Fstl5	follistatin-like 5
1852	1453369_a_at	Fundc1	FUN14 domain containing 1
1853	1431699_at	Fut4-ps1	fucosyltransferase 4, pseudogene 1
1854	1420756_at	Fut7	fucosyltransferase 7
1855	1460319_at	Fut8	fucosyltransferase 8
1856	1431025_at	Fuz	fuzzy homolog (Drosophila)
1857	1453461_at	Fxc1	fractured callus expressed transcript 1
1858	1452247_at	Fxr1h	fragile X mental retardation gene 1, autosomal homolog
1859	1421374_a_at	Fxyd1	FXYP domain-containing ion transport regulator 1
1860	1419378_a_at	Fxyd2	FXYP domain-containing ion transport regulator 2
1861	1419379_x_at	Fxyd2	FXYP domain-containing ion transport regulator 2
1862	1422985_at	Fzd1	frizzled homolog 1 (Drosophila)
1863	1448662_at	Fzd6	frizzled homolog 6 (Drosophila)
1864	1416418_at	Gabarapl1	gamma-aminobutyric acid (GABA(A)) receptor-associated protein-like 1
1865	1437188_at	Gabbr1	gamma-aminobutyric acid (GABA-B) receptor, 1

1866	1429330_at	Gabra4	gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor, subunit alpha 4
1867	1439717_at	Gabrg3	gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor, subunit gamma 3
1868	1421536_at	Gabrq	gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor, subunit theta
1869	1450300_at	Gabbr1	gamma-aminobutyric acid (GABA-C) receptor, subunit rho 1
1870	1420735_at	Gabbr2	gamma-aminobutyric acid (GABA-C) receptor, subunit rho 2
1871	1426703_at	Gak	cyclin G associated kinase
1872	1424140_at	Gale	galactose-4-epimerase, UDP
1873	1423236_at	Galnt1	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 1
1874	1452232_at	Galnt7	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 7
1875	1450581_at	Galr3	galanin receptor 3
1876	1450187_a_at	Galt	galactose-1-phosphate uridyl transferase
1877	1423537_at	Gap43	growth associated protein 43
1878	1448494_at	Gas1	growth arrest specific 1
1879	1430595_at	Gas2l1	growth arrest-specific 2 like 1
1880	1450333_a_at	Gata2	GATA binding protein 2
1881	1434271_at	Gba2	glucosidase beta 2
1882	1419484_a_at	Gbas	glioblastoma amplified sequence
1883	1438207_at	Gbf1	golgi-specific brefeldin A-resistance factor 1
1884	1450127_a_at	Gcgr	glucagon receptor
1885	1426059_at	Gckr	glucokinase regulatory protein
1886	1430963_at	Gcnt3	glucosaminyl (N-acetyl) transferase 3, mucin type
1887	1450940_at	Gdap1	ganglioside-induced differentiation-associated-protein 1
1888	1435898_x_at	Gdi2	guanosine diphosphate (GDP) dissociation inhibitor 2
1889	1424150_at	Gdpd5	glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 5
1890	1449725_at	Gfpt1	Glutamine fructose-6-phosphate transaminase 1
1891	1425579_at	Gfra2	glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha 2
1892	1459847_x_at	Gfra2	glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha 2
1893	1459863_x_at	Gga1	golgi associated, gamma adaptin ear containing, ARF binding protein 1
1894	1444181_at	Gimap5	GTPase, IMAP family member 5
1895	1422763_at	Gipc1	GIPC PDZ domain containing family, member 1
1896	1416715_at	Gjb3	gap junction protein, beta 3
1897	1426344_at	Gle1	GLE1 RNA export mediator (yeast)
1898	1436070_at	Glo1	glyoxalase 1
1899	1428421_a_at	Glod4	glyoxalase domain containing 4
1900	1437139_at	Glr1 // LOC100044359	glycine receptor, alpha 1 subunit // similar to glycine receptor alpha 1
1901	1434098_at	Glr2	glycine receptor, alpha 2 subunit
1902	1440238_at	Gltscr1	glioma tumor suppressor candidate region gene 1
1903	1423803_s_at	Gltscr2	glioma tumor suppressor candidate region gene 2
1904	1452409_at	Gltscr2	glioma tumor suppressor candidate region gene 2
1905	1451515_s_at	Glyat	glycine-N-acyltransferase
1906	1455558_at	Gm114	gene model 114, (NCBI)
1907	1443287_at	Gm1337	gene model 1337, (NCBI)

<b>1908</b>	1447416_at	Gm239	gene model 239, (NCBI)
<b>1909</b>	1436975_at	Gm24	Gene model 24, (NCBI)
<b>1910</b>	1442652_at	Gm410	gene model 410, (NCBI)
<b>1911</b>	1446246_at	Gm438	gene model 438, (NCBI)
<b>1912</b>	1439570_at	Gm444	gene model 444, (NCBI)
<b>1913</b>	1435282_at	Gm967	gene model 967, (NCBI)
<b>1914</b>	1436445_at	Gm996	gene model 996, (NCBI)
<b>1915</b>	1456232_at	Gmeb1	glucocorticoid modulatory element binding protein 1
<b>1916</b>	1417579_x_at	Gmppa	GDP-mannose pyrophosphorylase A
<b>1917</b>	1435656_at	Gmps	guanine monphosphate synthetase
<b>1918</b>	1420385_at	Gna14	guanine nucleotide binding protein, alpha 14
<b>1919</b>	1417432_a_at	Gnb1	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta 1
<b>1920</b>	1455089_at	Gng12	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 12
<b>1921</b>	1457755_at	Gng8	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 8 subunit
<b>1922</b>	1433656_a_at	Gnl3	guanine nucleotide binding protein-like 3 (nucleolar)
<b>1923</b>	1433546_at	Gns	glucosamine (N-acetyl)-6-sulfatase
<b>1924</b>	1435032_at	Golgb1	golgi autoantigen, golgin subfamily b, macrogolgin 1
<b>1925</b>	1425173_s_at	Golph3l	golgi phosphoprotein 3-like
<b>1926</b>	1425159_at	Golt1a	golgi transport 1 homolog A (S. cerevisiae)
<b>1927</b>	1453221_at	Gopc	golgi associated PDZ and coiled-coil motif containing
<b>1928</b>	1449452_a_at	Gp2	glycoprotein 2 (zymogen granule membrane)
<b>1929</b>	1420394_s_at	Gp49a /// Lilrb4	glycoprotein 49 A /// leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B, member 4
<b>1930</b>	1422817_at	Gp5	glycoprotein 5 (platelet)
<b>1931</b>	1445189_at	Gpatch2	G patch domain containing 2
<b>1932</b>	1423773_at	Gbbp1	GC-rich promoter binding protein 1
<b>1933</b>	1429293_at	Gpc2	glypican 2 (cerebroglycan)
<b>1934</b>	1460123_at	Gpr1	G protein-coupled receptor 1
<b>1935</b>	1457702_at	Gpr12	G-protein coupled receptor 12
<b>1936</b>	1421755_at	Gpr132	G protein-coupled receptor 132
<b>1937</b>	1426973_at	Gpr153	G protein-coupled receptor 153
<b>1938</b>	1459430_at	Gpr158	G protein-coupled receptor 158
<b>1939</b>	1444661_at	Gpr26	G protein-coupled receptor 26
<b>1940</b>	1440148_at	Gpr6	G protein-coupled receptor 6
<b>1941</b>	1440725_at	Gpr63	G protein-coupled receptor 63
<b>1942</b>	1455000_at	Gpr68	G protein-coupled receptor 68
<b>1943</b>	1420591_at	Gpr84	G protein-coupled receptor 84
<b>1944</b>	1450274_at	Gprc2a-rs5	G protein-coupled receptor, family C, group 2, member A, related sequence 5
<b>1945</b>	1416352_s_at	Gpsn2	glycoprotein, synaptic 2
<b>1946</b>	1455007_s_at	Gpt2	glutamic pyruvate transaminase (alanine aminotransferase) 2
<b>1947</b>	1452135_at	Gpx6	glutathione peroxidase 6
<b>1948</b>	1428736_at	Gramd3	GRAM domain containing 3

1949	1420685_at	Grap2 /// LOC674050	GRB2-related adaptor protein 2 /// similar to GRB2-related adaptor protein 2 (GADS protein) (Growth factor receptor binding protein) (GRBLG) (GRB-2-like protein) (GRB2L) (Hematopoietic cell-associated adaptor protein GrpL) (GRB-2-related monocytic adapter protein) (Monocytic adapter...
1950	1425457_a_at	Grb10	growth factor receptor bound protein 10
1951	1416522_a_at	Grc10	gene rich cluster, C10 gene
1952	1439987_at	Grik1	glutamate receptor, ionotropic, kainate 1
1953	1457683_at	Grik2	glutamate receptor, ionotropic, kainate 2 (beta 2)
1954	1421361_at	Grk1 /// LOC100045507	G protein-coupled receptor kinase 1 /// similar to rhodopsin kinase
1955	1425700_at	Grm1 /// LOC100045018	glutamate receptor, metabotropic 1 /// similar to metabotropic glutamate receptor type 1
1956	1443119_at	Grm7	glutamate receptor, metabotropic 7
1957	1449240_at	Gsbs	G substrate
1958	1437001_at	Gsk3b	glycogen synthase kinase 3 beta
1959	1433511_at	Gtf2a1	General transcription factor II A, 1
1960	1418426_at	Gtf2a1l	general transcription factor IIA, 1-like
1961	1426626_at	Gtf2f2	general transcription factor IIF, polypeptide 2
1962	1453169_a_at	Gtf2h1	general transcription factor II H, polypeptide 1
1963	1438425_at	Gtf3c1	general transcription factor III C 1
1964	1434320_at	Gtf3c4	general transcription factor IIIC, polypeptide 4
1965	1416690_at	Gtpbp2	GTP binding protein 2
1966	1445419_at	Gtpbp8	GTP-binding protein 8 (putative)
1967	1416969_at	Gtse1	G two S phase expressed protein 1
1968	1416737_at	Gys1	glycogen synthase 1, muscle
1969	1428348_at	Gzf1	GDNF-inducible zinc finger protein 1
1970	1449580_s_at	H2-DMb1 /// H2-DMb2	histocompatibility 2, class II, locus Mb1 /// histocompatibility 2, class II, locus Mb2
1971	1415744_at	H2-Ke2	H2-K region expressed gene 2
1972	1455725_a_at	H3f3b	H3 histone, family 3B
1973	1432492_a_at	Hao	3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase
1974	1455972_x_at	Hadh	hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase
1975	1418645_at	Hal	histidine ammonia lyase
1976	1422221_at	Hand2 /// LOC100046086	heart and neural crest derivatives expressed transcript 2 /// similar to dHand protein
1977	1431152_at	Hapln3	hyaluronan and proteoglycan link protein 3
1978	1417024_at	Hars	histidyl-tRNA synthetase
1979	1428361_x_at	Hba-a1 /// Hba-a2	hemoglobin alpha, adult chain 1 /// hemoglobin alpha, adult chain 2
1980	1417184_s_at	Hbb-b1 /// Hbb-b2	hemoglobin, beta adult major chain /// hemoglobin, beta adult minor chain
1981	1426437_s_at	Hdac3	histone deacetylase 3
1982	1447470_at	Hdhd2	haloacid dehalogenase-like hydrolase domain containing 2
1983	1438085_at	Heatr5b	HEAT repeat containing 5B
1984	1424687_at	Heatr6	HEAT repeat containing 6
1985	1424686_at	Heatr6	HEAT repeat containing 6
1986	1446415_at	Hebp2	heme binding protein 2
1987	1438039_at	Hectd1	HECT domain containing 1
1988	1446430_at	Hectd2	HECT domain containing 2
1989	1435451_at	Hel308	helicase, mus308-like (Drosophila)
1990	1430139_at	Hells	helicase, lymphoid specific
1991	1434727_at	Hepacam	hepatocyte cell adhesion molecule

1992	1432026_a_at	Herc5	hect domain and RLD 5
1993	1429026_at	Hexim2 /// LOC100044959	hexamethylene bis-acetamide inducible 2 /// similar to hexamethylene bis-acetamide inducible 2
1994	1452986_at	Hgd	homogentisate 1, 2-dioxygenase
1995	1416540_at	Hgs	HGF-regulated tyrosine kinase substrate
1996	1425636_at	Hhat	hedgehog acyltransferase
1997	1451512_s_at	Hibch	3-hydroxyisobutyryl-Coenzyme A hydrolase
1998	1428576_at	Hif1an	hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit inhibitor
1999	1448512_at	Hils1	histone H1-like protein in spermatids 1
2000	1456022_at	Hipk2	homeodomain interacting protein kinase 2
2001	1450049_a_at	Hira	histone cell cycle regulation defective homolog A (S. cerevisiae)
2002	1422948_s_at	Hist1h4a /// Hist1h4b /// Hist1h4c /// Hist1h4h /// Hist1h4i /// Hist1h4j /// Hist1h4k /// Hist1h4m /// LOC100041230	histone cluster 1, H4h /// histone cluster 1, H4c /// histone cluster 1, H4i /// histone cluster 1, H4j /// histone cluster 1, H4k /// histone cluster 1, H4m /// histone cluster 1, H4a /// histone cluster 1, H4b /// similar to histone H4
2003	1426953_at	Hmgb2l1 /// LOC100045749	high mobility group box 2-like 1 /// similar to Hmgb2l1 protein
2004	1427229_at	Hmgcr	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase
2005	1433446_at	Hmgcs1 /// LOC100040592	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 /// similar to Hmgcs1 protein
2006	1425815_a_at	Hmmr	hyaluronan mediated motility receptor (RHAMM)
2007	1428407_at	Hnrnpa0	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0
2008	1423531_a_at	Hnrnpa1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1
2009	1430020_x_at	Hnrnpa1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1
2010	1434047_x_at	Hnrnpa2b1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1
2011	1434391_at	Hnrnpu	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U
2012	1448176_a_at	Hnrpk	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K
2013	1425710_a_at	Homer1	homer homolog 1 (Drosophila)
2014	1424367_a_at	Homer2	homer homolog 2 (Drosophila)
2015	1438018_at	Hook1	hook homolog 1 (Drosophila)
2016	1452412_at	Hoxc8	homeo box C8
2017	1422919_at	Hrasls	HRAS-like suppressor
2018	1449242_s_at	Hrg	histidine-rich glycoprotein
2019	1438494_at	Hrh1 /// LOC100041871	histamine receptor H 1 /// similar to histamine receptor H1
2020	1450366_at	Hrk	harakiri, BCL2 interacting protein (contains only BH3 domain)
2021	1448865_at	Hsd17b7	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 7
2022	1449306_at	Hsf2	heat shock factor 2
2023	1441920_x_at	Htf9c	Hpal1 tiny fragments locus 9c
2024	1457620_at	Htf9c	Hpal1 tiny fragments locus 9c
2025	1460495_s_at	Htra2	HtrA serine peptidase 2
2026	1423510_at	Iapp	islet amyloid polypeptide
2027	1417901_a_at	Ica1	islet cell autoantigen 1
2028	1421930_at	Icos /// LOC100048841	inducible T-cell co-stimulator /// similar to activation-inducible lymphocyte immunomediatory molecule AILIM
2029	1447701_x_at	Idh3a	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) alpha
2030	1440852_at	Idi2	isopentenyl-diphosphate delta isomerase 2
2031	1417612_at	Ier5	immediate early response 5
2032	1419066_at	Ier5l /// LOC100047268	immediate early response 5-like /// similar to Immediate early response 5-like
2033	1421551_s_at	Iifi202b	interferon activated gene 202B

<b>2034</b>	1452348_s_at	Ifi203 /// Ifi204 /// Ifi205 /// LOC100040462 /// LOC100044072 /// LOC100048634 /// LOC192690 /// LOC640890 /// Mnda	interferon activated gene 203 /// interferon activated gene 204 /// similar to interferon activated gene 205 /// interferon activated gene 205 /// myeloid cell nuclear differentiation antigen /// similar to Interferon-activatable protein 205 (IFI-205) (D3 protein) /// similar to interferon-activatable protein /// similar to Interferon-activatable protein 204 (Ifi-204) (Interferon-inducible protein p204)
<b>2035</b>	1422476_at	Ifi30	interferon gamma inducible protein 30
<b>2036</b>	1422403_at	Ifna1 /// Ifna12 /// Ifna14 /// Ifna2 /// Ifna4 /// Ifna5 /// Ifna6 /// Ifna7 /// Ifna9 /// Ifnab /// OTTMUSG00000007655 /// OTTMUSG00000011275	interferon alpha 1 /// interferon alpha 2 /// interferon alpha 4 /// interferon alpha 5 /// interferon alpha 6 /// interferon alpha 7 /// interferon alpha 9 /// interferon alpha B /// predicted gene, OTTMUSG00000011275 /// predicted gene, OTTMUSG00000007655 /// interferon alpha 12 /// interferon, alpha 14
<b>2037</b>	1422404_x_at	Ifna1 /// Ifna12 /// Ifna14 /// Ifna2 /// Ifna4 /// Ifna5 /// Ifna6 /// Ifna7 /// Ifna9 /// Ifnab /// OTTMUSG00000007655 /// OTTMUSG00000011275	interferon alpha 1 /// interferon alpha 2 /// interferon alpha 4 /// interferon alpha 5 /// interferon alpha 6 /// interferon alpha 7 /// interferon alpha 9 /// interferon alpha B /// predicted gene, OTTMUSG00000011275 /// predicted gene, OTTMUSG00000007655 /// interferon alpha 12 /// interferon, alpha 14
<b>2038</b>	1428967_at	Igf1r	insulin-like growth factor I receptor
<b>2039</b>	1437103_at	Igf2bp2	insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 2
<b>2040</b>	1421653_a_at	Igh /// Igh-2 /// Igh-VJ558 /// LOC677563	immunoglobulin heavy chain (J558 family) /// immunoglobulin heavy chain complex /// immunoglobulin heavy chain 2 (serum IgA) /// similar to Ig heavy chain V region VH558 A1/A4 precursor
<b>2041</b>	1452538_at	Igh-6	Immunoglobulin heavy chain 6 (heavy chain of IgM)
<b>2042</b>	1460675_at	Igsf8	immunoglobulin superfamily, member 8
<b>2043</b>	1420518_a_at	Igsf9	immunoglobulin superfamily, member 9
<b>2044</b>	1421303_at	Ikzf1	IKAROS family zinc finger 1
<b>2045</b>	1436312_at	Ikzf1	IKAROS family zinc finger 1
<b>2046</b>	1441088_at	Ikzf3	IKAROS family zinc finger 3
<b>2047</b>	1451775_s_at	Il13ra1	interleukin 13 receptor, alpha 1
<b>2048</b>	1427164_at	Il13ra1	interleukin 13 receptor, alpha 1
<b>2049</b>	1448686_at	Il16	interleukin 16
<b>2050</b>	1420678_a_at	Il17rb	interleukin 17 receptor B
<b>2051</b>	1448950_at	Il1r1	interleukin 1 receptor, type I
<b>2052</b>	1434903_s_at	Il1rl2	interleukin 1 receptor-like 2
<b>2053</b>	1450456_at	Il21r	interleukin 21 receptor
<b>2054</b>	1448759_at	Il2rb	interleukin 2 receptor, beta chain
<b>2055</b>	1419712_at	Il3ra	interleukin 3 receptor, alpha chain
<b>2056</b>	1437303_at	Il6st	interleukin 6 signal transducer
<b>2057</b>	1449942_a_at	Ilk	integrin linked kinase
<b>2058</b>	1442244_at	Inadl	InaD-like (Drosophila)
<b>2059</b>	1448496_a_at	Ing1 /// LOC100045040	inhibitor of growth family, member 1 /// similar to ING1 protein
<b>2060</b>	1451330_a_at	Inpp5b	inositol polyphosphate-5-phosphatase B
<b>2061</b>	1442100_at	Inpp5f	inositol polyphosphate-5-phosphatase F
<b>2062</b>	1453436_at	Insm2	insulinoma-associated 2
<b>2063</b>	1426943_at	Ints1	integrator complex subunit 1
<b>2064</b>	1439481_at	Ipo9	importin 9

2065	1438019_at	lppk	inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase
2066	1432060_at	lqca	IQ motif containing with AAA domain
2067	1437912_at	lqsec3	IQ motif and Sec7 domain 3
2068	1422683_at	lrak1bp1	interleukin-1 receptor-associated kinase 1 binding protein 1
2069	1433527_at	lreb2	iron responsive element binding protein 2
2070	1448452_at	lrf8	interferon regulatory factor 8
2071	1423652_at	lsca1	iron-sulfur cluster assembly 1 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )
2072	1419569_a_at	lsg20	interferon-stimulated protein
2073	1425051_at	lsoc1	isochorismatase domain containing 1
2074	1418537_at	lsoc2b	isochorismatase domain containing 2b
2075	1431922_at	lsx	intestine specific homeobox
2076	1434387_at	ltfg3	integrin alpha FG-GAP repeat containing 3
2077	1440235_at	ltga10 /// LOC100045909	integrin, alpha 10 /// similar to Integrin, alpha 10
2078	1433054_at	ltgb2l	integrin beta 2-like
2079	1421511_at	ltgb3	integrin beta 3
2080	1417618_at	ltih2	inter-alpha trypsin inhibitor, heavy chain 2
2081	1418165_at	ltln1	intelectin 1 (galactofuranose binding)
2082	1454755_at	ltpkc	inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase C
2083	1424834_s_at	ltpr2	inositol 1,4,5-triphosphate receptor 2
2084	1421192_a_at	ltsn1	intersectin 1 (SH3 domain protein 1A)
2085	1451547_at	lyd	iodotyrosine deiodinase
2086	1449408_at	Jam2	junction adhesion molecule 2
2087	1426498_at	Jarid1c	jumonji, AT rich interactive domain 1C (Rbp2 like)
2088	1456150_at	Jhdm1d	jumonji C domain-containing histone demethylase 1 homolog D ( <i>S. cerevisiae</i> )
2089	1440105_at	Jmjd2d	jumonji domain containing 2D
2090	1440346_at	Jmjd3	Jumonji domain containing 3
2091	1454109_a_at	Jmjd6	jumonji domain containing 6
2092	1460676_at	Josd1	Josephin domain containing 1
2093	1452987_at	Josd3	Josephin domain containing 3
2094	1451262_a_at	Jtv1	JTV1 gene
2095	1417409_at	Jun	Jun oncogene
2096	1450350_a_at	Jundm2	Jun dimerization protein 2
2097	1425885_a_at	Kcnab2	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, beta member 2
2098	1421981_at	Kcnc3	potassium voltage gated channel, Shaw-related subfamily, member 3
2099	1421538_at	Kcnd1	potassium voltage-gated channel, Shal-related family, member 1
2100	1447513_at	Kcnd3	potassium voltage-gated channel, Shal-related family, member 3
2101	1459656_at	Kcng1	Potassium voltage-gated channel, subfamily G, member 1
2102	1459107_at	Kcnh3	potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 3
2103	1433156_at	Kcnip1	Kv channel-interacting protein 1
2104	1436275_at	Kcnip2	Kv channel-interacting protein 2
2105	1450370_a_at	Kcnip4	Kv channel interacting protein 4
2106	1451840_at	Kcnip4	Kv channel interacting protein 4
2107	1421468_at	Kcnj3	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 3
2108	1455374_at	Kcnj3	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 3
2109	1421581_at	Kcnj6	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 6

2110	1426115_a_at	Kcnj9	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 9
2111	1435342_at	Kcnk6	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily K, member 6
2112	1421342_at	Kcns2	K <sup>+</sup> voltage-gated channel, subfamily S, 2
2113	1423694_at	Kctd10	potassium channel tetramerisation domain containing 10
2114	1441239_at	Kctd18	potassium channel tetramerisation domain containing 18
2115	1436811_at	Kctd3	potassium channel tetramerisation domain containing 3
2116	1453071_s_at	Kdelc2	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) containing 2
2117	1460211_a_at	Kdelr1	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 1
2118	1450747_at	Keap1	kelch-like ECH-associated protein 1
2119	1416833_at	Keg1	kidney expressed gene 1
2120	1452314_at	Kif11	kinesin family member 11
2121	1455182_at	Kif1b	kinesin family member 1B
2122	1449207_a_at	Kif20a	kinesin family member 20A
2123	1423813_at	Kif22	kinesin family member 22
2124	1449060_at	Kif2c /// LOC631653	kinesin family member 2C /// similar to Kinesin-like protein KIF2C (Mitotic centromere-associated kinesin) (MCAK)
2125	1420987_at	Kif3b	kinesin family member 3B
2126	1450073_at	Kif3b	kinesin family member 3B
2127	1418214_at	Klc2	kinesin light chain 2
2128	1421604_a_at	Klf3 /// LOC100046855	Kruppel-like factor 3 (basic) /// similar to BKLF
2129	1429360_at	Klf3 /// LOC100046855	Kruppel-like factor 3 (basic) /// similar to BKLF
2130	1460678_at	Klhdc2	kelch domain containing 2
2131	1442596_at	Klhdc2	kelch domain containing 2
2132	1455910_at	Klhdc3	kelch domain containing 3
2133	1437897_at	Klhl21	kelch-like 21 (Drosophila)
2134	1451793_at	Klhl24	kelch-like 24 (Drosophila)
2135	1453987_at	Klhl28	kelch-like 28 (Drosophila)
2136	1444486_at	Klhl5	kelch-like 5 (Drosophila)
2137	1433526_at	Klhl8	kelch-like 8 (Drosophila)
2138	1455977_x_at	Klk1 /// Klk1b5	kallikrein 1 /// kallikrein 1-related peptidase b5
2139	1449463_at	Klk1b8	kallikrein 1-related peptidase b8
2140	1422065_at	Klrb1d	killer cell lectin-like receptor subfamily B member 1D
2141	1450495_a_at	Klrk1	killer cell lectin-like receptor subfamily K, member 1
2142	1430321_at	Krba1	KRAB-A domain containing 1
2143	1428084_at	Krr1	KRR1, small subunit (SSU) processome component, homolog (yeast)
2144	1427154_at	Krt2	keratin 2
2145	1418742_at	Krt34	keratin 34
2146	1427365_at	Krt86	keratin 86
2147	1450535_at	Krtap12-1	keratin associated protein 12-1
2148	1429957_at	Krtap26-1	keratin associated protein 26-1
2149	1430625_at	Krtap3-2	keratin associated protein 3-2
2150	1426535_at	Ktelc1	KTEL (Lys-Tyr-Glu-Leu) containing 1
2151	1459614_at	Lama5	laminin, alpha 5
2152	1446180_at	Lamb1-1	laminin B1 subunit 1
2153	1451241_at	Lamb1-1	laminin B1 subunit 1

2154	1437177_at	Larp4 /// LOC627412 /// LOC632684	La ribonucleoprotein domain family, member 4 /// hypothetical LOC627412 /// similar to La-related protein 4 (La ribonucleoprotein domain family member 4)
2155	1435682_at	Lars2	leucyl-tRNA synthetase, mitochondrial
2156	1417782_at	Lass4	longevity assurance homolog 4 ( <i>S. cerevisiae</i> )
2157	1451209_at	Lass5	longevity assurance homolog 5 ( <i>S. cerevisiae</i> )
2158	1427679_at	Lats1	large tumor suppressor
2159	1444165_at	Layn	layilin
2160	1448550_at	Lbp	lipopolysaccharide binding protein
2161	1430340_at	Lca5	Leber congenital amaurosis 5 (human)
2162	1429565_s_at	Lce1m	late cornified envelope 1M
2163	1419317_x_at	Lce3c	late cornified envelope 3C
2164	1419336_at	Lcn5	lipocalin 5
2165	1459928_at	Lcor	ligand dependent nuclear receptor corepressor
2166	1418641_at	Lcp2	lymphocyte cytosolic protein 2
2167	1434247_at	Ldhal6b	lactate dehydrogenase A-like 6B
2168	1423673_at	Ldoc1l	leucine zipper, down-regulated in cancer 1-like
2169	1424326_at	Lemd2	LEM domain containing 2
2170	1435291_at	Lemd3 /// LOC100044466	LEM domain containing 3 /// similar to LEM domain containing 3
2171	1422309_a_at	Lenep	lens epithelial protein
2172	1457997_at	Leng4	leukocyte receptor cluster (LRC) member 4
2173	1455293_at	Leo1	Leo1, Paf1/RNA polymerase II complex component, homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )
2174	1423552_at	Leprotl1	leptin receptor overlapping transcript-like 1
2175	1443076_at	Letm2	leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 2
2176	1437116_at	Letmd1	LETM1 domain containing 1
2177	1449943_at	Lfng	LFNG O-fucosylpeptide 3-beta-N-acetylglucosaminyltransferase
2178	1460546_at	Lgi3	leucine-rich repeat LGI family, member 3
2179	1440968_at	Lgtn	ligatin
2180	1450160_at	Lif	leukemia inhibitory factor
2181	1420464_s_at	Lilrb3 /// LOC100038908 /// LOC100038909 /// LOC100041137 /// LOC100041146 /// LOC100044531 /// LOC675749 /// Pira1 /// Pira11 /// Pira2 /// Pira3 /// Pira4 /// Pira6	paired-Ig-like receptor A1 /// paired-Ig-like receptor A11 /// paired-Ig-like receptor A2 /// paired-Ig-like receptor A3 /// paired-Ig-like receptor A4 /// paired-Ig-like receptor A6 /// leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 3 /// similar to paired-Ig-like receptor A2 /// hypothetical protein LOC100038908 /// hypothetical protein LOC100038909 /// similar to PIRA2 /// similar to Leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 3
2182	1450629_at	Lima1	LIM domain and actin binding 1
2183	1417627_a_at	Limk1	LIM-domain containing, protein kinase
2184	1435805_at	Lin7a	lin-7 homolog A ( <i>C. elegans</i> )
2185	1450937_at	Lin7c	lin-7 homolog C ( <i>C. elegans</i> )
2186	1457026_at	Liph	lipase, member H
2187	1451552_at	Lipt1	lipoyltransferase 1
2188	1448294_at	Litaf	LPS-induced TN factor
2189	1428130_at	Lman1	lectin, mannose-binding, 1
2190	1435475_at	Lman2l	lectin, mannose-binding 2-like
2191	1426272_at	Lmbr1	limb region 1
2192	1428670_at	LOC100034734	hypothetical gene LOC100034734

<b>2193</b>	1435660_at	LOC100039021 /// LOC100041081 /// LOC100041801 /// LOC546061 /// LOC624083 /// LOC664787	similar to RIKEN cDNA 5830484A20 gene /// hypothetical LOC624083 /// similar to Sp110 nuclear body protein
<b>2194</b>	1452590_a_at	LOC100039175 /// LOC100039246 /// Plac9	placenta specific 9 /// similar to Placenta specific 9
<b>2195</b>	1423395_at	LOC100039215 /// LOC100047834 /// Tsnax	translin-associated factor X /// similar to translin associated protein X
<b>2196</b>	1426727_s_at	LOC100039405 /// LOC100044621 /// LOC677319 /// Ppp1r10	protein phosphatase 1, regulatory subunit 10 /// similar to protein phosphatase 1, regulatory subunit 10
<b>2197</b>	1460257_a_at	LOC100039707 /// Mthfs	5, 10-methenyltetrahydrofolate synthetase /// similar to 5, 10-methenyltetrahydrofolate synthetase
<b>2198</b>	1420417_at	LOC100039963 /// LOC100044161 /// LOC100045956 /// Sema3a	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3A /// similar to L41541_1 collapsin/semaphorin III /// hypothetical protein LOC100044161
<b>2199</b>	1458506_at	LOC100040093 /// LOC100046336	hypothetical protein LOC100040093 /// hypothetical protein LOC100046336
<b>2200</b>	1435948_at	LOC100040525 /// LOC100040596 /// Tmem181	transmembrane protein 181 /// similar to G protein-coupled receptor 178
<b>2201</b>	1437027_x_at	LOC100040661 /// LOC100044797 /// Rnps1	ribonucleic acid binding protein S1 /// similar to Rnps1 protein /// hypothetical protein LOC100044797
<b>2202</b>	1446456_at	LOC100040769	Hypothetical protein LOC100040769
<b>2203</b>	1458600_at	LOC100041196 /// LOC100044110 /// LOC100046453	hypothetical protein LOC100041196 /// hypothetical protein LOC100044110 /// hypothetical protein LOC100046453
<b>2204</b>	1419472_s_at	LOC100041237 /// LOC100046391 /// Nudc /// Nudc-ps1	nuclear distribution gene C homolog (Aspergillus) /// nuclear distribution gene C homolog (Aspergillus), pseudogene 1 /// similar to MNUDC protein
<b>2205</b>	1440556_at	LOC100041347 /// LOC100045692	hypothetical protein LOC100041347 /// hypothetical protein LOC100045692
<b>2206</b>	1419444_at	LOC100041953 /// LOC100047209 /// Sap18	Sin3-associated polypeptide 18 /// similar to SAP18
<b>2207</b>	1444491_at	LOC100042150	Similar to NTAK alpha2
<b>2208</b>	1431054_at	LOC100042253 /// LOC100044607 /// LOC100046670 /// Lsm6	LSM6 homolog, U6 small nuclear RNA associated (S. cerevisiae) /// Lsm6 protein pseudogene /// similar to Lsm6 protein
<b>2209</b>	1459905_at	LOC100042277	hypothetical protein LOC100042277
<b>2210</b>	1439444_x_at	LOC100042773 /// LOC634748 /// Tmed10	transmembrane emp24-like trafficking protein 10 (yeast) /// similar to transmembrane trafficking protein /// similar to transmembrane emp24 domain-containing protein 10
<b>2211</b>	1454688_x_at	LOC100042773 /// LOC634748 /// Tmed10	transmembrane emp24-like trafficking protein 10 (yeast) /// similar to transmembrane trafficking protein /// similar to transmembrane emp24 domain-containing protein 10
<b>2212</b>	1429856_at	LOC100042789 /// LOC100048169 /// Tspan18	tetraspanin 18 /// hypothetical protein LOC100042789 /// hypothetical protein LOC100048169
<b>2213</b>	1456373_x_at	LOC100043278 /// LOC100046888 /// Rps20	ribosomal protein S20 /// similar to ribosomal protein S20
<b>2214</b>	1430286_s_at	LOC100043766 /// LOC100044150 /// LOC100048706 /// Ppp1r14c	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14c /// similar to PKC-potentiated PP1 inhibitory protein /// hypothetical protein LOC100044150

<b>2215</b>	1456112_at	LOC100043998 /// Tpr	translocated promoter region /// similar to nuclear pore complex-associated intranuclear coiled-coil protein TPR
<b>2216</b>	1420720_at	LOC100044234 /// Nptx2	neuronal pentraxin 2 /// hypothetical protein LOC100044234
<b>2217</b>	1419229_at	LOC100044313 /// Rhox4a /// Rhox4b /// Rhox4c /// Rhox4d /// Rhox4e /// Rhox4g /// Rhox4h	reproductive homeobox 4B /// reproductive homeobox 4E /// reproductive homeobox 4C /// reproductive homeobox 4H /// reproductive homeobox 4G /// reproductive homeobox 4A /// reproductive homeobox 4D /// hypothetical protein LOC100044313
<b>2218</b>	1432027_a_at	LOC100044325 /// LOC100045928 /// Tbc1d14	TBC1 domain family, member 14 /// similar to mKIAA1322 protein /// similar to TBC1 domain family, member 14
<b>2219</b>	1430200_at	LOC100044513	hypothetical protein LOC100044513
<b>2220</b>	1418594_a_at	LOC100044566 /// Ncoa1	nuclear receptor coactivator 1 /// similar to Nuclear receptor coactivator 1 (NCoA-1) (Steroid receptor coactivator 1) (SRC-1) (Nuclear receptor coactivator protein 1) (mNRC-1)
<b>2221</b>	1450064_at	LOC100044570	similar to formin-2
<b>2222</b>	1449912_at	LOC100044599 /// Ssxb1	synovial sarcoma, X member B, breakpoint 1 /// similar to Ssxb3 protein
<b>2223</b>	1453621_at	LOC100044696	similar to cysteine-rich PAK1inhibitor
<b>2224</b>	1452984_at	LOC100044842	similar to cyclin fold protein 1
<b>2225</b>	1418171_at	LOC100045031 /// Tceal8	transcription elongation factor A (SII)-like 8 /// similar to transcription elongation factor A (SII)-like 8
<b>2226</b>	1436262_x_at	LOC100045117 /// Otud5	OTU domain containing 5 /// similar to Chain A, Crystal Structure Of The Human Pim2 In Complex With A Ruthenium Organometallic Ligand Ru1
<b>2227</b>	1456384_at	LOC100045228 /// Nlgn3	neuroligin 3 /// similar to neuroligin 3
<b>2228</b>	1439660_at	LOC100045240	hypothetical protein LOC100045240
<b>2229</b>	1429046_at	LOC100045522	similar to SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2
<b>2230</b>	1450928_at	LOC100045546	similar to Id4
<b>2231</b>	1449705_x_at	LOC100045677 /// Mcm3	minichromosome maintenance deficient 3 (S. cerevisiae) /// similar to DNA replication licensing factor MCM3 (DNA polymerase alpha holoenzyme-associated protein P1) (P1-MCM3)
<b>2232</b>	1434478_at	LOC100045753	similar to headcase homolog
<b>2233</b>	1431431_a_at	LOC100045796 /// Nfs1	nitrogen fixation gene 1 (S. cerevisiae) /// similar to Nitrogen fixation gene 1 (S. cerevisiae)
<b>2234</b>	1438459_x_at	LOC100045887 /// Sfpq	splicing factor proline/glutamine rich (polypyrimidine tract binding protein associated) /// similar to PTB-associated splicing factor
<b>2235</b>	1429314_at	LOC100045981 /// Syt11	synaptotagmin XI /// similar to synaptotagmin XI
<b>2236</b>	1439270_x_at	LOC100045999 /// LOC640204 /// Ran	RAN, member RAS oncogene family /// similar to RAN, member RAS oncogene family
<b>2237</b>	1424061_at	LOC100046016 /// Manbal	mannosidase, beta A, lysosomal-like /// similar to Manbal protein
<b>2238</b>	1456407_a_at	LOC100046241 /// Tlk1	tousled-like kinase 1 /// similar to tousled-like kinase 1
<b>2239</b>	1449076_x_at	LOC100046254	similar to Adi1 protein
<b>2240</b>	1419380_at	LOC100046333 /// Zfp423	zinc finger protein 423 /// similar to mKIAA0760 protein
<b>2241</b>	1417251_at	LOC100046410 /// Palmd	palmdelphin /// similar to palmdelphin
<b>2242</b>	1455103_at	LOC100046698	similar to Probable ATP-dependent RNA helicase DDX46 (DEAD box protein 46)

2243	1417227_at	LOC100046854 /// Mccc1	methylcrotonoyl-Coenzyme A carboxylase 1 (alpha) /// similar to methylcrotonoyl-Coenzyme A carboxylase 1 (alpha)
2244	1449393_at	LOC100046930 /// Sh2d1a	SH2 domain protein 1A /// similar to T cell signal transduction molecule1 SAP
2245	1453673_at	LOC100046982	hypothetical protein LOC100046982
2246	1433718_a_at	LOC100047028	similar to heterochromatin protein 1 beta
2247	1426040_a_at	LOC100047199 /// Odf2	outer dense fiber of sperm tails 2 /// similar to outer dense fiber of sperm tails 2
2248	1460576_at	LOC100047539	similar to SEC15 homolog
2249	1418316_a_at	LOC100047588 /// Mark3	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3 /// similar to MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3
2250	1451575_a_at	LOC100047647 /// Nudt3	nudix (nucleotide diphosphate linked moiety X)-type motif 3 /// similar to diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase; DIPP
2251	1421133_at	LOC100047693	similar to cell adhesion molecule nectin-3 beta
2252	1423536_at	LOC100047794 /// Strn3	striatin, calmodulin binding protein 3 /// similar to SG2NA beta
2253	1433455_at	LOC100047863	similar to lymphocyte-specific adaptor protein Lnk
2254	1420730_a_at	LOC100048029 /// Tcp11	t-complex protein 11 /// similar to pBS13 precursor polypeptide, testis-specific
2255	1419954_s_at	LOC100048107 /// Zfand3	zinc finger, AN1-type domain 3 /// similar to Zfand3 protein
2256	1448204_at	LOC100048168 /// Sav1	salvador homolog 1 (Drosophila) /// similar to WW45 protein
2257	1416377_at	LOC100048384 /// Pcd7	programmed cell death protein 7 /// similar to programmed cell death protein 7
2258	1421046_a_at	LOC100048654 /// Pabpc4	poly A binding protein, cytoplasmic 4 /// similar to Poly A binding protein, cytoplasmic 4
2259	1440472_at	LOC100048815	similar to PF6
2260	1446360_at	LOC100048866	similar to Ribosomal protein S6
2261	1431442_at	LOC100049077	hypothetical protein LOC100049077
2262	1439392_x_at	LOC240657 /// Psmc1	protease (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase 1 /// similar to peptidase (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase 1
2263	1443441_x_at	LOC380850	hypothetical protein LOC380850
2264	1429527_a_at	LOC433328 /// LOC677340 /// Plscr1	phospholipid scramblase 1 /// similar to phospholipid scramblase 1 /// hypothetical protein LOC677340
2265	1442203_at	LOC552880	hypothetical LOC552880
2266	1440941_at	LOC552912	hypothetical LOC552912
2267	1437481_at	LOC623451	hypothetical LOC623451
2268	1440352_at	LOC625175	region containing RIKEN cDNA 1700028E10 gene; hypothetical protein A630054D14
2269	1446282_at	LOC626082	hypothetical protein LOC626082
2270	1433850_at	LOC627908 /// LOC673151 /// Ppp4r2	protein phosphatase 4, regulatory subunit 2 /// similar to protein phosphatase 4, regulatory subunit 2
2271	1415833_x_at	LOC629957 /// LOC637599 /// Rps29	ribosomal protein S29 /// similar to 40S ribosomal protein S29
2272	1437413_x_at	LOC629957 /// LOC637599 /// Rps29	ribosomal protein S29 /// similar to 40S ribosomal protein S29
2273	1437178_at	LOC631105	similar to fimbriae-associated protein Fap1
2274	1443895_at	LOC633947	hypothetical protein LOC633947
2275	1458245_at	LOC634731	similar to sushi domain containing 1
2276	1421550_a_at	LOC640746 /// Trim34	tripartite motif protein 34 /// similar to Tripartite motif protein 34
2277	1436439_at	LOC666145	hypothetical LOC666145

2278	1446594_at	LOC667874	similar to Eif3s2 protein
2279	1459181_at	LOC667939 /// LOC675715	similar to tubulin, alpha 2 /// similar to tubulin, alpha 1
2280	1439530_a_at	LOC669005 /// Ppp1r13l	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 13 like /// similar to NFkB interacting protein 1
2281	1431056_a_at	LOC669888 /// Lpl	lipoprotein lipase /// similar to Lipoprotein lipase precursor (LPL)
2282	1454974_at	LOC672215 /// Ntn1	netrin 1 /// similar to Netrin-1 precursor
2283	1419277_at	LOC674195 /// Usp48	ubiquitin specific peptidase 48 /// hypothetical protein LOC674195
2284	1448827_s_at	LOC674761 /// Myh6	myosin, heavy polypeptide 6, cardiac muscle, alpha /// similar to myosin, heavy polypeptide 7, cardiac muscle, beta
2285	1439830_at	LOC675366	similar to mitogen activated protein kinase kinase kinase 5
2286	1425383_a_at	LOC676870 /// Pbx1	pre B-cell leukemia transcription factor 1 /// region containing RIKEN cDNA 2310056B04 gene; pre B-cell leukemia transcription factor 1
2287	1435896_at	LOC677143 /// Sfxn2	sideroflexin 2 /// similar to Sideroflexin-2
2288	1449853_at	LOC677143 /// Sfxn2	sideroflexin 2 /// similar to Sideroflexin-2
2289	1429860_at	LOC677447	similar to RIKEN cDNA 5730590G19-like
2290	1453662_at	LOC77413	hypothetical LOC77413
2291	1426221_at	Loh11cr2a	loss of heterozygosity, 11, chromosomal region 2, gene A homolog (human)
2292	1451918_a_at	Loh12cr1	loss of heterozygosity, 12, chromosomal region 1 homolog (human)
2293	1428365_a_at	Lonp1	lon peptidase 1, mitochondrial
2294	1459784_x_at	Lonp2	lon peptidase 2, peroxisomal
2295	1436063_at	Loxl1	lysyl oxidase-like 1
2296	1424459_at	Lpcat1	lysophosphatidylcholine acyltransferase 1
2297	1452836_at	Lpin2	lipin 2
2298	1432467_at	Lrch3	leucine-rich repeats and calponin homology (CH) domain containing 3
2299	1455217_at	Lrig2	leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 2
2300	1429368_at	Lrig3	leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 3
2301	1433864_at	Lrp12	low density lipoprotein-related protein 12
2302	1427133_s_at	Lrp2	low density lipoprotein receptor-related protein 2
2303	1440882_at	Lrp8	low density lipoprotein receptor-related protein 8, apolipoprotein e receptor
2304	1438422_at	Lrrc20	leucine rich repeat containing 20
2305	1439491_at	Lrrc38	leucine rich repeat containing 38
2306	1437201_at	Lrrc4c	leucine rich repeat containing 4C
2307	1432913_at	Lrrc52	leucine rich repeat containing 52
2308	1458101_at	Lrrc56	leucine rich repeat containing 56
2309	1454024_at	Lrrc9	leucine rich repeat containing 9
2310	1451986_s_at	Lrrk1	leucine-rich repeat kinase 1
2311	1434539_at	Lrrn3	leucine rich repeat protein 3, neuronal
2312	1434761_at	Lrrtm3	leucine rich repeat transmembrane neuronal 3
2313	1427998_at	Lsm12	LSM12 homolog (S. cerevisiae)
2314	1428437_at	Lsm14a	LSM14 homolog A (SCD6, S. cerevisiae)
2315	1451884_a_at	Lsm2	LSM2 homolog, U6 small nuclear RNA associated (S. cerevisiae)
2316	1447547_at	Ltbp1	latent transforming growth factor beta binding protein 1
2317	1428255_at	Luc7l	Luc7 homolog (S. cerevisiae)-like

2318	1431181_a_at	Luc7l	Luc7 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )-like
2319	1441952_x_at	Lynx1	Ly6/neurotoxin 1
2320	1457843_at	Lypd6	LY6/PLAUR domain containing 6
2321	1421384_at	Lyst	lysosomal trafficking regulator
2322	1425973_at	Lyst	lysosomal trafficking regulator
2323	1428848_a_at	Macf1	microtubule-actin crosslinking factor 1
2324	1436837_at	Mael	maelstrom homolog ( <i>Drosophila</i> )
2325	1451716_at	Mafb	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein B (avian)
2326	1422423_at	Magea7	melanoma antigen, family A, 7
2327	1422725_at	Mak	male germ cell-associated kinase
2328	1417275_at	Mal	myelin and lymphocyte protein, T-cell differentiation protein
2329	1453152_at	Mamdc2	MAM domain containing 2
2330	1434395_at	Man1a2	mannosidase, alpha, class 1A, member 2
2331	1456534_at	Man1a2	Mannosidase, alpha, class 1A, member 2
2332	1416351_at	Map2k1	mitogen activated protein kinase kinase 1
2333	1436373_at	Map3k10	mitogen activated protein kinase kinase kinase 10
2334	1427376_a_at	Map4k5	mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 5
2335	1449283_a_at	Mapk12	mitogen-activated protein kinase 12
2336	1459617_at	Mapk14	Mitogen activated protein kinase 14
2337	1440856_at	Mapk8	mitogen activated protein kinase 8
2338	1452925_a_at	March5	membrane-associated ring finger (C3HC4) 5
2339	1445928_at	March6	membrane-associated ring finger (C3HC4) 6
2340	1432255_at	Mast1	microtubule associated serine/threonine kinase 1
2341	1451099_at	Mbc2	membrane bound C2 domain containing protein
2342	1437061_at	Mbd1	methyl-CpG binding domain protein 1
2343	1452644_at	Mbd3l2	methyl-CpG binding domain protein 3-like 2
2344	1449490_at	Mbd4	methyl-CpG binding domain protein 4
2345	1455827_at	Mbnl2	muscleblind-like 2
2346	1435323_a_at	Mboat1	membrane bound O-acyltransferase domain containing 1
2347	1451058_at	Mcts2	malignant T cell amplified sequence 2
2348	1449266_at	Mecp2	methyl CpG binding protein 2
2349	1450402_at	Med1	mediator complex subunit 1
2350	1434603_at	Med13l	mediator complex subunit 13-like
2351	1453906_at	Med13l	mediator complex subunit 13-like
2352	1443597_at	Med14	mediator complex subunit 14
2353	1431282_at	Med24	mediator complex subunit 24
2354	1448374_at	Med28	mediator of RNA polymerase II transcription, subunit 28 homolog (yeast)
2355	1424264_at	Med6	mediator of RNA polymerase II transcription, subunit 6 homolog (yeast)
2356	1449747_at	Mepce	Methylphosphate capping enzyme
2357	1426557_at	Mesp1	mesoderm posterior 1
2358	1432384_a_at	Mettl6	methyltransferase like 6
2359	1455529_at	Mex3a	mex3 homolog A ( <i>C. elegans</i> )
2360	1437152_at	Mex3b	mex3 homolog B ( <i>C. elegans</i> )
2361	1417359_at	Mfap2	microfibrillar-associated protein 2
2362	1434746_at	Mga	MAX gene associated
2363	1428644_at	Mgat5	mannoside acetylglucosaminyltransferase 5
2364	1455066_s_at	Mia3	melanoma inhibitory activity 3
2365	1431939_a_at	Mina	myc induced nuclear antigen

2366	1455787_x_at	Minpp1	multiple inositol polyphosphate histidine phosphatase 1
2367	1421039_at	Mip	major intrinsic protein of eye lens fiber
2368	1457030_at	Mirg	miRNA containing gene
2369	1446203_at	Mkln1	muskelin 1, intracellular mediator containing kelch motifs
2370	1449029_at	Mknk2	MAP kinase-interacting serine/threonine kinase 2
2371	1418435_at	Mkrn1	makorin, ring finger protein, 1
2372	1418589_a_at	Mlf1	myeloid leukemia factor 1
2373	1429570_at	Mkl	mixed lineage kinase domain-like
2374	1432601_at	Mll5	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 5
2375	1451685_at	Mllt6	myeloid/lymphoid or mixed lineage-leukemia translocation to 6 homolog (Drosophila)
2376	1425930_a_at	Mlx	MAX-like protein X
2377	1449153_at	Mmp12	matrix metalloproteinase 12
2378	1422273_at	Mmp1b	matrix metalloproteinase 1b (interstitial collagenase)
2379	1452224_at	Morc3	microrchidia 3
2380	1434436_at	Morc4	microrchidia 4
2381	1416766_at	Mosc2	MOCO sulphurase C-terminal domain containing 2
2382	1440924_at	Mphosph1	M-phase phosphoprotein 1
2383	1429080_at	Mphosph10	M-phase phosphoprotein 10 (U3 small nucleolar ribonucleoprotein)
2384	1427524_a_at	Mphosph8	M-phase phosphoprotein 8
2385	1451966_at	Mrap	melanocortin 2 receptor accessory protein
2386	1416748_a_at	Mre11a	meiotic recombination 11 homolog A (S. cerevisiae)
2387	1441990_at	Mre11a	meiotic recombination 11 homolog A (S. cerevisiae)
2388	1417918_at	Mrpl11	mitochondrial ribosomal protein L11
2389	1424204_at	Mrpl13	mitochondrial ribosomal protein L13
2390	1450880_at	Mrpl16	mitochondrial ribosomal protein L16
2391	1456313_x_at	Mrpl28	mitochondrial ribosomal protein L28
2392	1422819_at	Mrpl36	mitochondrial ribosomal protein L36
2393	1430610_at	Mrpl38	mitochondrial ribosomal protein L38
2394	1428589_at	Mrpl41	mitochondrial ribosomal protein L41
2395	1426651_at	Mrpl44	mitochondrial ribosomal protein L44
2396	1423492_at	Mrpl45	mitochondrial ribosomal protein L45
2397	1449004_at	Mrpl46	mitochondrial ribosomal protein L46
2398	1423219_a_at	Mrpl49	mitochondrial ribosomal protein L49
2399	1429453_a_at	Mrpl55	mitochondrial ribosomal protein L55
2400	1456109_a_at	Mrps15	mitochondrial ribosomal protein S15
2401	1427173_a_at	Mrps33	mitochondrial ribosomal protein S33
2402	1422245_a_at	Mrv1	MRV integration site 1
2403	1420572_at	Ms4a3	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 3
2404	1435521_at	Msi2	Musashi homolog 2 (Drosophila)
2405	1453030_at	Msl2l1	male-specific lethal 2-like 1 (Drosophila)
2406	1420461_at	Mst1r	macrophage stimulating 1 receptor (c-met-related tyrosine kinase)
2407	1450645_at	Mt4	metallothionein 4
2408	1441961_at	Mtap9	microtubule-associated protein 9
2409	1455932_at	Mtdh	Metadherin
2410	1418514_at	Mtf2	metal response element binding transcription factor 2

2411	1424519_at	Mtg1	mitochondrial GTPase 1 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )
2412	1415917_at	Mthfd1	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent), methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase, formyltetrahydrofolate synthase
2413	1450498_at	Mthfr	5,10-methylenetetrahydrofolate reductase
2414	1434042_s_at	Mtmr3	myotubularin related protein 3
2415	1434807_s_at	Mtx3	metaxin 3
2416	1451637_a_at	Muc10	mucin 10, submandibular gland salivary mucin
2417	1442960_at	Muc20	mucin 20
2418	1450511_at	Musk	muscle, skeletal, receptor tyrosine kinase
2419	1416838_at	Mut	methylmalonyl-Coenzyme A mutase
2420	1434378_a_at	Mxd4	Max dimerization protein 4
2421	1421317_x_at	Myb	myeloblastosis oncogene
2422	1450194_a_at	Myb	myeloblastosis oncogene
2423	1425349_a_at	Myef2	myelin basic protein expression factor 2, repressor
2424	1448826_at	Myh6	myosin, heavy polypeptide 6, cardiac muscle, alpha
2425	1428608_at	Mylc2b	myosin light chain, regulatory B
2426	1425504_at	Mylk	myosin, light polypeptide kinase
2427	1454731_at	Myo10	myosin X
2428	1451422_at	Myo18a	myosin XVIIIa
2429	1459265_at	Myo19	myosin XIX
2430	1436307_at	Myo9a	myosin IXa
2431	1450468_at	Myoc	myocilin
2432	1429738_at	Myt1l	myelin transcription factor 1-like
2433	1436483_at	Myt1l	myelin transcription factor 1-like
2434	1457068_at	Naaladl1	N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase-like 1
2435	1416249_at	Nadk	NAD kinase
2436	1452444_at	Napb	N-ethylmaleimide sensitive fusion protein attachment protein beta
2437	1451678_at	Narf	nuclear prelamin A recognition factor
2438	1433692_at	Nat10	N-acetyltransferase 10
2439	1436702_at	Nat8l	N-acetyltransferase 8-like
2440	1457395_at	Nav2	neuron navigator 2
2441	1440860_at	Nbea	Neurobeachin
2442	1456881_at	Nbeal2	neurobeachin-like 2
2443	1415771_at	Ncl	nucleolin
2444	1448893_at	Ncor2	nuclear receptor co-repressor 2
2445	1449251_at	Ndph	Norrie disease homolog
2446	1430149_at	Ndufa3	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 3
2447	1417285_a_at	Ndufa5	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 5
2448	1416056_a_at	Ndufb11	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 11
2449	1453354_at	Ndufs1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1
2450	1447885_x_at	Nedd9	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated gene 9
2451	1424060_at	Neil3	nei like 3 ( <i>E. coli</i> )
2452	1438592_at	Nek1	NIMA (never in mitosis gene a)-related expressed kinase 1
2453	1441525_at	Nek11	NIMA (never in mitosis gene a)-related expressed kinase 11

2454	1437580_s_at	Nek2	NIMA (never in mitosis gene a)-related expressed kinase 2
2455	1418947_at	Nek3	NIMA (never in mitosis gene a)-related expressed kinase 3
2456	1427639_a_at	Nek4	NIMA (never in mitosis gene a)-related expressed kinase 4
2457	1436309_at	Neto2	neuropilin (NRP) and tolloid (TLL)-like 2
2458	1420529_at	Neud4	neuronal d4 domain family member
2459	1459357_at	Nfasc	Neurofascin
2460	1416331_a_at	Nfe2l1	nuclear factor, erythroid derived 2,-like 1
2461	1427733_a_at	Nfia	nuclear factor I/A
2462	1416293_at	Nfib	nuclear factor I/B
2463	1434101_at	Nfib	nuclear factor I/B
2464	1429128_x_at	Nfkb2	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2, p49/p100
2465	1449951_at	Nfkbil1	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor-like 1
2466	1448728_a_at	Nfkbiz	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, zeta
2467	1419752_at	Nfx1	nuclear transcription factor, X-box binding 1
2468	1422082_a_at	Nfya	nuclear transcription factor-Y alpha
2469	1419266_at	Nfyb	nuclear transcription factor-Y beta
2470	1421241_at	Ngfr	nerve growth factor receptor (TNFR superfamily, member 16)
2471	1444155_at	Nin	ninein
2472	1448480_at	Nip7	nuclear import 7 homolog (S. cerevisiae)
2473	1419652_s_at	Nkain1	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting ATPase interacting 1
2474	1433273_at	Nkain1	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting ATPase interacting 1
2475	1453329_s_at	Nkain2	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting ATPase interacting 2
2476	1432862_at	Nkx2-4	NK2 transcription factor related, locus 4 (Drosophila)
2477	1431899_at	Nkx6-3	NK6 transcription factor related, locus 3 (Drosophila)
2478	1424981_at	Nln	neurolysin (metallopeptidase M3 family)
2479	1456211_at	Nlrp10	NLR family, pyrin domain containing 10
2480	1448574_at	Nme6	expressed in non-metastatic cells 6, protein
2481	1423581_at	Nmt2	N-myristoyltransferase 2
2482	1438095_x_at	Noc4l	Nucleolar complex associated 4 homolog (S. cerevisiae)
2483	1447268_at	Nol12	nucleolar protein 12
2484	1441447_at	Nol4	nucleolar protein 4
2485	1425629_a_at	Nol6	nucleolar protein family 6 (RNA-associated)
2486	1455330_at	Nol9	nucleolar protein 9
2487	1423210_a_at	Nola3	nucleolar protein family A, member 3
2488	1437485_at	Nos1ap	nitric oxide synthase 1 (neuronal) adaptor protein
2489	1445463_at	Npepps	aminopeptidase puromycin sensitive
2490	1431329_at	Nphp4	nephronophthisis 4 (juvenile) homolog (human)
2491	1449960_at	Nptx2	neuronal pentraxin 2
2492	1419127_at	Npy	neuropeptide Y
2493	1416353_at	Nr1h2	nuclear receptor subfamily 1, group H, member 2
2494	1454851_at	Nr2c2	nuclear receptor subfamily 2, group C, member 2
2495	1436475_at	Nr2f2	nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2
2496	1432603_at	Nrip1	nuclear receptor interacting protein 1
2497	1434384_at	Nrip1	nuclear receptor interacting protein 1
2498	1434640_at	Nrsn2	neurensin 2
2499	1439358_a_at	Nrxn1	neurexin I

2500	1439359_x_at	Nrxn1	neurexin I
2501	1438193_at	Nrxn3	neurexin III
2502	1439629_at	Nrxn3	neurexin III
2503	1435088_at	Nsd1	nuclear receptor-binding SET-domain protein 1
2504	1457205_at	Nsf	N-ethylmaleimide sensitive fusion protein
2505	1455852_at	Nsl1	NSL1, MIND kinetochore complex component, homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )
2506	1425933_a_at	Nt5c2	5'-nucleotidase, cytosolic II
2507	1430559_at	Nt5c3l	5'-nucleotidase, cytosolic III-like
2508	1419433_at	Nthl1	nth (endonuclease III)-like 1 ( <i>E.coli</i> )
2509	1435305_at	Ntrk2	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2
2510	1420838_at	Ntrk2	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2
2511	1435196_at	Ntrk2	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2
2512	1446712_at	Ntrk2	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2
2513	1433825_at	Ntrk3	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 3
2514	1429049_at	Nuak2	NUAK family, SNF1-like kinase, 2
2515	1418905_at	Nubp1	nucleotide binding protein 1
2516	1444952_a_at	Nucks1	nuclear casein kinase and cyclin-dependent kinase substrate 1
2517	1428583_at	Nufip2	nuclear fragile X mental retardation protein interacting protein 2
2518	1423787_at	Nup133	nucleoporin 133
2519	1452176_at	Nup153	nucleoporin 153
2520	1437843_s_at	Nupl1	Nucleoporin like 1
2521	1426130_at	Nxn1l	nucleoredoxin-like 1
2522	1429753_at	Nxph4	neurexophilin 4
2523	1418686_at	Oas1c	2'-5' oligoadenylate synthetase 1C
2524	1453115_at	Oaz3	ornithine decarboxylase antizyme 3
2525	1449889_a_at	Ociad1	O CIA domain containing 1
2526	1451888_a_at	Odz4	odd Oz/ten-m homolog 4 ( <i>Drosophila</i> )
2527	1455993_at	Odz4	odd Oz/ten-m homolog 4 ( <i>Drosophila</i> )
2528	1425125_at	Oit3	oncoprotein induced transcript 3
2529	1460391_at	Ola1	Obg-like ATPase 1
2530	1455743_at	Olfml2a	olfactomedin-like 2A
2531	1423915_at	Olfml2b	olfactomedin-like 2B
2532	1450590_at	Olf159	olfactory receptor 159
2533	1422382_at	Olf16	olfactory receptor 16
2534	1450252_at	Onecut1	one cut domain, family member 1
2535	1435612_at	Opcml	opioid binding protein/cell adhesion molecule-like
2536	1446394_at	Oprk1	opioid receptor, kappa 1
2537	1444442_at	Oraov1	oral cancer overexpressed 1
2538	1422663_at	Orc1l	origin recognition complex, subunit 1-like ( <i>S.cerevisiae</i> )
2539	1418225_at	Orc2l	origin recognition complex, subunit 2-like ( <i>S. cerevisiae</i> )
2540	1418227_at	Orc2l	origin recognition complex, subunit 2-like ( <i>S. cerevisiae</i> )
2541	1451810_at	ORF63	open reading frame 63
2542	1426975_at	Os9	amplified in osteosarcoma
2543	1436027_at	Osbpl11	oxysterol binding protein-like 11
2544	1450964_a_at	Osbpl9	oxysterol binding protein-like 9
2545	1422285_at	Otp	orthopedia homolog ( <i>Drosophila</i> )
2546	1459089_at	OTTMUSG00000004010 /// OTTMUSG00000014862 /// RP23- 292J1.2	hypothetical LOC623272 /// predicted gene, OTTMUSG00000004010 /// predicted gene, OTTMUSG00000014862

2547	1439849_at	OTTMUSG00000008561	predicted gene, OTTMUSG00000008561
2548	1446646_at	OTTMUSG00000011195	predicted gene, OTTMUSG00000011195
2549	1456845_at	Oxa1l	Oxidase assembly 1-like
2550	1456989_at	Oxgr1	oxoglutarate (alpha-ketoglutarate) receptor 1
2551	1447816_x_at	Oxnad1	oxidoreductase NAD-binding domain containing 1
2552	1437465_a_at	P4hb	prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide
2553	1423002_at	Pag1	phosphoprotein associated with glycosphingolipid microdomains 1
2554	1456403_at	Pag1	phosphoprotein associated with glycosphingolipid microdomains 1
2555	1423565_at	Paics	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, phosphoribosylaminoribosylaminoimidazole, succinocarboxamide synthetase
2556	1434250_at	Pak2	p21 (CDKN1A)-activated kinase 2
2557	1437318_at	Pak3	p21 (CDKN1A)-activated kinase 3
2558	1422034_a_at	Palm	paralemmin
2559	1458465_at	Pan3	PAN3 polyA specific ribonuclease subunit homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )
2560	1432592_at	Pappa	pregnancy-associated plasma protein A
2561	1444451_at	Pappa2	pappalysin 2
2562	1415890_at	Papss1	3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 1
2563	1428958_at	Paqr8	progesterone and adiponectin receptor family member VIII
2564	1450025_at	Pard6g	par-6 partitioning defective 6 homolog gamma ( <i>C. elegans</i> )
2565	1420755_a_at	Park2	parkin
2566	1451969_s_at	Parp3	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 3
2567	1416876_at	Parvg	parvin, gamma
2568	1433697_at	Patl1	protein associated with topoisomerase II homolog 1 (yeast)
2569	1440445_at	Pax6os1	Pax6 opposite strand transcript 1
2570	1444596_at	Pax7	paired box gene 7
2571	1433658_x_at	Pcbp4	poly(rC) binding protein 4
2572	1449055_x_at	Pcbp4	poly(rC) binding protein 4
2573	1450969_at	Pccb	propionyl Coenzyme A carboxylase, beta polypeptide
2574	1438134_at	Pcdh10	protocadherin 10
2575	1427592_at	Pcdh7	protocadherin 7
2576	1425017_at	Pcdhac1	protocadherin alpha subfamily C, 1
2577	1421437_x_at	Pcdhb14	protocadherin beta 14
2578	1450216_at	Pcdhb16	protocadherin beta 16
2579	1449583_at	Pcdhb20	protocadherin beta 20
2580	1438106_at	Pcdhb22	protocadherin beta 22
2581	1456489_at	Pcf11	cleavage and polyadenylation factor subunit homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )
2582	1428423_at	Pcgf3	polycomb group ring finger 3
2583	1453636_at	Pcgf5	polycomb group ring finger 5
2584	1439617_s_at	Pck1	phosphoenolpyruvate carboxykinase 1, cytosolic
2585	1416965_at	Pcsk1n	proprotein convertase subtilisin/kexin type 1 inhibitor
2586	1460169_a_at	Pctk1	PCTAIRE-motif protein kinase 1
2587	1420984_at	Pctp	phosphatidylcholine transfer protein
2588	1447277_s_at	Pcyox1	prenylcysteine oxidase 1
2589	1429643_a_at	Pde1c	phosphodiesterase 1C
2590	1423313_at	Pde7a	phosphodiesterase 7A
2591	1438041_at	Pde7a	phosphodiesterase 7A

<b>2592</b>	1428896_at	Pdgfrl	platelet-derived growth factor receptor-like
<b>2593</b>	1449137_at	Pdha1	pyruvate dehydrogenase E1 alpha 1
<b>2594</b>	1423748_at	Pdk1	pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 1
<b>2595</b>	1428319_at	Pdlim7	PDZ and LIM domain 7
<b>2596</b>	1443785_x_at	Pdlim7	PDZ and LIM domain 7
<b>2597</b>	1444085_at	Pdss2	prenyl (solanesyl) diphosphate synthase, subunit 2
<b>2598</b>	1430723_at	Pdss2	prenyl (solanesyl) diphosphate synthase, subunit 2
<b>2599</b>	1436372_a_at	Pdxdc1	pyridoxal-dependent decarboxylase domain containing 1
<b>2600</b>	1445203_at	Pdzd2	PDZ domain containing 2
<b>2601</b>	1443618_at	Pdzd2	PDZ domain containing 2
<b>2602</b>	1427550_at	Peg10	paternally expressed 10
<b>2603</b>	1460662_at	Per3	period homolog 3 (Drosophila)
<b>2604</b>	1422472_at	Pex13	peroxisomal biogenesis factor 13
<b>2605</b>	1422063_a_at	Pex5	peroxisome biogenesis factor 5
<b>2606</b>	1458932_at	Pex5l	peroxisomal biogenesis factor 5-like
<b>2607</b>	1456302_at	Pex6	peroxisomal biogenesis factor 6
<b>2608</b>	1417026_at	Pfdn1	prefoldin 1
<b>2609</b>	1429486_at	Pfkfb2	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 2
<b>2610</b>	1418471_at	Pgf	placental growth factor
<b>2611</b>	1449184_at	Pglyrp1	peptidoglycan recognition protein 1
<b>2612</b>	1417053_at	Phb	prohibitin
<b>2613</b>	1455175_at	Phf13	PHD finger protein 13
<b>2614</b>	1435619_at	Phf21a	PHD finger protein 21A
<b>2615</b>	1429000_at	Phf3	PHD finger protein 3
<b>2616</b>	1428659_at	Phf7	PHD finger protein 7
<b>2617</b>	1443522_s_at	Phip	pleckstrin homology domain interacting protein
<b>2618</b>	1425190_a_at	Phospho2	phosphatase, orphan 2
<b>2619</b>	1418620_at	Phox2a	paired-like homeobox 2a
<b>2620</b>	1454900_s_at	Phr1	pam, highwire, rpm 1
<b>2621</b>	1444559_at	Phtf2	Putative homeodomain transcription factor 2
<b>2622</b>	1455463_at	Phyhip	phytanoyl-CoA hydroxylase interacting protein
<b>2623</b>	1427023_at	Phyhipl	phytanoyl-CoA hydroxylase interacting protein-like
<b>2624</b>	1453839_a_at	Pi16	peptidase inhibitor 16
<b>2625</b>	1418861_at	Pias4	protein inhibitor of activated STAT 4
<b>2626</b>	1430698_a_at	Pibf1	progesterone immunomodulatory binding factor 1
<b>2627</b>	1436738_at	Pif1	PIF1 5'-to-3' DNA helicase homolog (S. cerevisiae)
<b>2628</b>	1448896_at	Pigf	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class F
<b>2629</b>	1415992_at	Pigo	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class O
<b>2630</b>	1437663_at	Pigv	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class V
<b>2631</b>	1416909_at	Pigyl	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class Y-like
<b>2632</b>	1422708_at	Pik3cg	phosphoinositide-3-kinase, catalytic, gamma polypeptide
<b>2633</b>	1451737_at	Pik3r1	phosphatidylinositol 3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 1 (p85 alpha)
<b>2634</b>	1434980_at	Pik3r5	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 5, p101

2635	1435039_a_at	Pip5k1a	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type 1 alpha
2636	1427900_at	Pip5k1l	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase-like 1
2637	1429001_at	Pir	pirin
2638	1460659_at	Pitpnb	Phosphatidylinositol transfer protein, beta
2639	1421258_a_at	Pklr	pyruvate kinase liver and red blood cell
2640	1450172_at	Pknox1	Pbx/knotted 1 homeobox
2641	1449586_at	Pkp1	plakophilin 1
2642	1452209_at	Pkp4	plakophilin 4
2643	1433948_at	Pla2g1b	Phospholipase A2, group IB, pancreas
2644	1417519_at	Plagl2	pleiomorphic adenoma gene-like 2
2645	1452521_a_at	Plaur	plasminogen activator, urokinase receptor
2646	1425781_a_at	Plcb1	phospholipase C, beta 1
2647	1435043_at	Plcb1	phospholipase C, beta 1
2648	1435771_at	Plcb4	phospholipase C, beta 4
2649	1452398_at	Plce1	phospholipase C, epsilon 1
2650	1445723_at	Plcl1	phospholipase C-like 1
2651	1437113_s_at	Pld1	phospholipase D1
2652	1457252_x_at	Pld2	phospholipase D2
2653	1419835_s_at	Plec1	plectin 1
2654	1425867_at	Plekha4	pleckstrin homology domain containing, family A (phosphoinositide binding specific) member 4
2655	1455343_at	Plekha7	pleckstrin homology domain containing, family A member 7
2656	1423861_at	Plekhf2	pleckstrin homology domain containing, family F (with FYVE domain) member 2
2657	1423862_at	Plekhf2	pleckstrin homology domain containing, family F (with FYVE domain) member 2
2658	1460046_at	Plekhg1	Pleckstrin homology domain containing, family G (with RhoGef domain) member 1
2659	1457145_at	Plekhg4	pleckstrin homology domain containing, family G (with RhoGef domain) member 4
2660	1427597_at	Plekhh2	pleckstrin homology domain containing, family H (with MyTH4 domain) member 2
2661	1448282_at	Plrg1	pleiotropic regulator 1, PRL1 homolog (Arabidopsis)
2662	1417963_at	Pltp	phospholipid transfer protein
2663	1418912_at	Plxdc2	plexin domain containing 2
2664	1420996_at	Plxna3	plexin A3
2665	1449804_at	Pnmt	phenylethanolamine-N-methyltransferase
2666	1430693_at	Pnpla5	patatin-like phospholipase domain containing 5
2667	1416186_at	Pnrc2	proline-rich nuclear receptor coactivator 2
2668	1435180_at	Podn	podocan
2669	1450137_at	Pofut1	protein O-fucosyltransferase 1
2670	1455046_a_at	Pogz	pogo transposable element with ZNF domain
2671	1425794_at	Pola2	polymerase (DNA directed), alpha 2
2672	1452743_at	Pole3	polymerase (DNA directed), epsilon 3 (p17 subunit)
2673	1453147_at	Polr3e	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide E
2674	1430328_at	Polr3f	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide F
2675	1420004_s_at	Pom121	nuclear pore membrane protein 121
2676	1433644_at	Pomt2	protein-O-mannosyltransferase 2
2677	1431373_at	Pop5	processing of precursor 5, ribonuclease P/MRP family ( <i>S. cerevisiae</i> )
2678	1416933_at	Por	P450 (cytochrome) oxidoreductase

2679	1427713_x_at	Pou2f2	POU domain, class 2, transcription factor 2
2680	1455119_at	Ppapdc1a	phosphatidic acid phosphatase type 2 domain containing 1A
2681	1437751_at	Ppargc1a	peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 alpha
2682	1456395_at	Ppargc1a	peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 alpha
2683	1434822_at	Pphln1	periphilin 1
2684	1450657_at	Ppie	peptidylprolyl isomerase E (cyclophilin E)
2685	1427506_at	Ppil5	peptidylprolyl isomerase (cyclophilin) like 5
2686	1417221_at	Ppm1a	protein phosphatase 1A, magnesium dependent, alpha isoform
2687	1443903_at	Ppm1a	Protein phosphatase 1A, magnesium dependent, alpha isoform
2688	1438012_at	Ppm1l	protein phosphatase 1 (formerly 2C)-like
2689	1435787_at	Ppm1l	protein phosphatase 1 (formerly 2C)-like
2690	1428351_at	Ppm1m	protein phosphatase 1M
2691	1416618_at	Ppox	protoporphyrinogen oxidase
2692	1437735_at	Ppp1r12a	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 12A
2693	1418086_at	Ppp1r14a	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14A
2694	1417990_at	Ppp1r14d	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14D
2695	1459751_s_at	Ppp1r16a	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 16A
2696	1428473_at	Ppp3cb	protein phosphatase 3, catalytic subunit, beta isoform
2697	1455958_s_at	Pptc7	PTC7 protein phosphatase homolog (S. cerevisiae)
2698	1430747_at	Pqlc1	PQ loop repeat containing 1
2699	1441764_at	Prdm10	PR domain containing 10
2700	1440745_at	Prdm16	PR domain containing 16
2701	1437412_at	Prdx6-rs1	peroxiredoxin 6, related sequence 1
2702	1447715_x_at	Prdx6-rs1	peroxiredoxin 6, related sequence 1
2703	1429639_at	Prei4	preimplantation protein 4
2704	1437953_at	Prei4	preimplantation protein 4
2705	1422873_at	Prg2	proteoglycan 2, bone marrow
2706	1429464_at	Prkaa2	protein kinase, AMP-activated, alpha 2 catalytic subunit
2707	1420610_at	Prkacb	protein kinase, cAMP dependent, catalytic, beta
2708	1431263_at	Prkag2	protein kinase, AMP-activated, gamma 2 non-catalytic subunit
2709	1416754_at	Prkar1b	protein kinase, cAMP dependent regulatory, type I beta
2710	1428783_at	Prkar2a	protein kinase, cAMP dependent regulatory, type II alpha
2711	1442256_at	Prkcd	protein kinase C, delta
2712	1422673_at	Prkcm	protein kinase C, mu
2713	1427760_s_at	Prl2c2 /// Prl2c3 /// Prl2c4	prolactin family 2, subfamily c, member 2 /// prolactin family 2, subfamily c, member 3 /// prolactin family 2, subfamily c, member 4
2714	1429826_at	Prl7b1	prolactin family 7, subfamily b, member 1
2715	1415955_x_at	Prm1	protamine 1
2716	1426749_at	Prmt3	protein arginine N-methyltransferase 3
2717	1427439_s_at	Prmt5	protein arginine N-methyltransferase 5
2718	1426176_a_at	Prok2	prokineticin 2

2719	1453005_at	Prpf31	PRP31 pre-mRNA processing factor 31 homolog (yeast)
2720	1443282_at	Prpf38a	PRP38 pre-mRNA processing factor 38 (yeast) domain containing A
2721	1450035_a_at	Prpf40a	PRP40 pre-mRNA processing factor 40 homolog A (yeast)
2722	1451561_at	Prr12	proline rich 12
2723	1460349_at	Prr14	proline rich 14
2724	1428706_at	Prr6	proline-rich polypeptide 6
2725	1423563_at	Prrt1	proline-rich transmembrane protein 1
2726	1443919_at	Prrt3	proline-rich transmembrane protein 3
2727	1437671_x_at	Prss23	protease, serine, 23
2728	1450802_at	Prss28	protease, serine, 28
2729	1454267_a_at	Prss32	protease, serine, 32
2730	1419669_at	Prtn3	proteinase 3
2731	1427727_x_at	Psg19	pregnancy specific glycoprotein 19
2732	1460403_at	Psp1	PC4 and SFRS1 interacting protein 1
2733	1448206_at	Pσμα2	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 2
2734	1448262_at	Pσmb2	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 2
2735	1422962_a_at	Pσmb8	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 8 (large multifunctional peptidase 7)
2736	1444619_x_at	Pσmb8	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 8 (large multifunctional peptidase 7)
2737	1437220_x_at	Pσmd13	Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 13
2738	1425859_a_at	Pσmd4	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 4
2739	1450375_at	Pspn	persephin
2740	1421410_a_at	Pstpip2	proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 2
2741	1427872_at	Ptafr	platelet-activating factor receptor
2742	1443152_at	Ptcd3	pentatricopeptide repeat domain 3
2743	1453164_a_at	Ptdss2	phosphatidylserine synthase 2
2744	1450655_at	Pten	phosphatase and tensin homolog
2745	1423860_at	Ptgds	prostaglandin D2 synthase (brain)
2746	1443384_at	Ptk2	PTK2 protein tyrosine kinase 2
2747	1454726_s_at	Ptpdc1	protein tyrosine phosphatase domain containing 1
2748	1451225_at	Ptpn11	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11
2749	1419054_a_at	Ptpn21	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 21
2750	1421330_at	Ptpn4	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 4
2751	1446638_at	Ptpru	protein tyrosine phosphatase, receptor type, U
2752	1450660_at	Pts	6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase
2753	1423117_at	Pum1	pumilio 1 (Drosophila)
2754	1441448_at	Pum2	Pumilio 2 (Drosophila)
2755	1418491_a_at	Pus3	pseudouridine synthase 3
2756	1431352_s_at	Pvt1	plasmacytoma variant translocation 1
2757	1455438_at	Pxmp4	peroxisomal membrane protein 4
2758	1417347_at	Pycard	PYD and CARD domain containing
2759	1424556_at	Pycr1	pyrroline-5-carboxylate reductase 1
2760	1448315_a_at	Pycr2	pyrroline-5-carboxylate reductase family, member 2
2761	1428249_at	Pygo2	pygopus 2
2762	1426289_at	Qrich1	glutamine-rich 1

<b>2763</b>	1457336_at	R3hdm1	R3H domain 1 (binds single-stranded nucleic acids)
<b>2764</b>	1447264_at	Rab11fip1	RAB11 family interacting protein 1 (class I)
<b>2765</b>	1450516_a_at	Rab17	RAB17, member RAS oncogene family
<b>2766</b>	1416527_at	Rab32	RAB32, member RAS oncogene family
<b>2767</b>	1439628_x_at	Rab38	Rab38, member of RAS oncogene family
<b>2768</b>	1449259_at	Rab3d	RAB3D, member RAS oncogene family
<b>2769</b>	1434306_at	Rab3ip	RAB3A interacting protein
<b>2770</b>	1460617_s_at	Rab6b	RAB6B, member RAS oncogene family
<b>2771</b>	1451362_at	Rab7l1	RAB7, member RAS oncogene family-like 1
<b>2772</b>	1424648_at	Rabl4	RAB, member of RAS oncogene family-like 4
<b>2773</b>	1434299_x_at	Rabl4	RAB, member of RAS oncogene family-like 4
<b>2774</b>	1416162_at	Rad21	RAD21 homolog (S. pombe)
<b>2775</b>	1441030_at	Rai14	retinoic acid induced 14
<b>2776</b>	1417248_at	Ralbp1	ralA binding protein 1
<b>2777</b>	1454715_at	Raly1	RALY RNA binding protein-like
<b>2778</b>	1417481_at	Ramp1	receptor (calcitonin) activity modifying protein 1
<b>2779</b>	1435167_at	Ranbp6	RAN binding protein 6
<b>2780</b>	1427412_s_at	Rapgef6	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 6
<b>2781</b>	1434509_at	Rapgef6	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 6
<b>2782</b>	1429316_at	Rasgef1a	RasGEF domain family, member 1A
<b>2783</b>	1417804_at	Rasgrp2	RAS, guanyl releasing protein 2
<b>2784</b>	1427111_s_at	Raver1	ribonucleoprotein, PTB-binding 1
<b>2785</b>	1418558_at	Rax	retina and anterior neural fold homeobox
<b>2786</b>	1458765_at	Rbm10	RNA binding motif protein 10
<b>2787</b>	1437032_x_at	Rbm14	RNA binding motif protein 14
<b>2788</b>	1438419_at	Rbm16	RNA binding motif protein 16
<b>2789</b>	1455310_at	Rbm16	RNA binding motif protein 16
<b>2790</b>	1443988_at	Rbm39	RNA binding motif protein 39
<b>2791</b>	1416920_at	Rbm4	RNA binding motif protein 4
<b>2792</b>	1440319_at	Rbm44	RNA binding motif protein 44
<b>2793</b>	1433979_at	Rbms2	RNA binding motif, single stranded interacting protein 2
<b>2794</b>	1416177_at	Rbmxrt	RNA binding motif protein, X chromosome retrogene
<b>2795</b>	1429359_s_at	Rbpms	RNA binding protein gene with multiple splicing
<b>2796</b>	1447793_x_at	Rbx1	Ring-box 1
<b>2797</b>	1416601_a_at	Rcan1	regulator of calcineurin 1
<b>2798</b>	1416962_at	Rcc1	regulator of chromosome condensation 1
<b>2799</b>	1418779_at	Rce1	RCE1 homolog, prenyl protein peptidase (S. cerevisiae)
<b>2800</b>	1424382_at	Rcn3	reticulocalbin 3, EF-hand calcium binding domain
<b>2801</b>	1416180_a_at	Rdx	radixin
<b>2802</b>	1447198_at	Recql	RecQ protein-like
<b>2803</b>	1422922_at	Recql4	RecQ protein-like 4
<b>2804</b>	1449662_at	Reep1	Receptor accessory protein 1
<b>2805</b>	1424009_at	Reg3d	regenerating islet-derived 3 delta
<b>2806</b>	1448860_at	Rem2	rad and gem related GTP binding protein 2
<b>2807</b>	1425535_at	Repin1	replication initiator 1
<b>2808</b>	1460660_x_at	Rer1	RER1 retention in endoplasmic reticulum 1 homolog (S. cerevisiae)
<b>2809</b>	1424715_at	Retsat	retinol saturase (all trans retinol 13,14 reductase)
<b>2810</b>	1432053_at	Rfx4	regulatory factor X, 4 (influences HLA class II expression)

<b>2811</b>	1449124_at	Rgl1	ral guanine nucleotide dissociation stimulator,-like 1
<b>2812</b>	1443694_at	Rgs20	regulator of G-protein signaling 20
<b>2813</b>	1425701_a_at	Rgs3	regulator of G-protein signaling 3
<b>2814</b>	1425172_at	Rho	rhodopsin
<b>2815</b>	1434794_at	Rhof	ras homolog gene family, member f
<b>2816</b>	1422572_at	Rhog	ras homolog gene family, member G
<b>2817</b>	1426822_at	Rhot2	ras homolog gene family, member T2
<b>2818</b>	1424976_at	Rhov	ras homolog gene family, member V
<b>2819</b>	1424819_a_at	Ric8	resistance to inhibitors of cholinesterase 8 homolog (C. elegans)
<b>2820</b>	1435667_at	Rims1	regulating synaptic membrane exocytosis 1
<b>2821</b>	1438305_at	Rims1	regulating synaptic membrane exocytosis 1
<b>2822</b>	1443215_at	Rims2	regulating synaptic membrane exocytosis 2
<b>2823</b>	1440893_at	Riok1	RIO kinase 1 (yeast)
<b>2824</b>	1436301_at	Ripk5	receptor interacting protein kinase 5
<b>2825</b>	1443063_at	Rlbp1l2	retinaldehyde binding protein 1-like 2
<b>2826</b>	1456696_x_at	Rmi1	RMI1, RecQ mediated genome instability 1, homolog (S. cerevisiae)
<b>2827</b>	1459209_at	Rnf10	Ring finger protein 10
<b>2828</b>	1442048_at	Rnf11	ring finger protein 11
<b>2829</b>	1440850_at	Rnf12	ring finger protein 12
<b>2830</b>	1443407_at	Rnf13	ring finger protein 13
<b>2831</b>	1455586_at	Rnf168	ring finger protein 168
<b>2832</b>	1434207_at	Rnf169	ring finger protein 169
<b>2833</b>	1434208_at	Rnf169	ring finger protein 169
<b>2834</b>	1417509_at	Rnf19a	ring finger protein 19A
<b>2835</b>	1424873_at	Rnf2	ring finger protein 2
<b>2836</b>	1436101_at	Rnf24	ring finger protein 24
<b>2837</b>	1453929_at	Rnf24	ring finger protein 24
<b>2838</b>	1441793_at	Rnf39	Ring finger protein 39
<b>2839</b>	1424589_s_at	Rnpc3	RNA-binding region (RNP1, RRM) containing 3
<b>2840</b>	1457926_at	Rnpepl1	arginyl aminopeptidase (aminopeptidase B)-like 1
<b>2841</b>	1422543_at	Ropn1	ropporin, rophilin associated protein 1
<b>2842</b>	1443443_at	Rora	RAR-related orphan receptor alpha
<b>2843</b>	1457622_at	Rp1l1	retinitis pigmentosa 1 homolog (human)-like 1
<b>2844</b>	1420706_at	RP23-157O10.7	P140 gene
<b>2845</b>	1416706_at	Rpe	ribulose-5-phosphate-3-epimerase
<b>2846</b>	1434635_at	Rph3a	rabphilin 3A
<b>2847</b>	1417608_a_at	Rpl13a	ribosomal protein L13a
<b>2848</b>	1455001_x_at	Rpl13a	ribosomal protein L13a
<b>2849</b>	1433688_x_at	Rpl14	ribosomal protein L14
<b>2850</b>	1436688_x_at	Rpl14	ribosomal protein L14
<b>2851</b>	1438507_x_at	Rpl14	ribosomal protein L14
<b>2852</b>	1427452_at	Rpl7	ribosomal protein L7
<b>2853</b>	1447598_x_at	Rpo1-4	RNA polymerase 1-4
<b>2854</b>	1447597_at	Rpo1-4	RNA polymerase 1-4
<b>2855</b>	1449021_at	Rpp21	ribonuclease P 21 subunit (human)
<b>2856</b>	1430288_x_at	Rps21	ribosomal protein S21
<b>2857</b>	1453466_at	Rps6	ribosomal protein S6
<b>2858</b>	1427299_at	Rps6ka3	ribosomal protein S6 kinase polypeptide 3
<b>2859</b>	1452383_at	Rps6ka3	ribosomal protein S6 kinase polypeptide 3
<b>2860</b>	1440343_at	Rps6ka5	ribosomal protein S6 kinase, polypeptide 5
<b>2861</b>	1453138_at	Rpsud2	RNA pseudouridylate synthase domain containing 2

2862	1434626_at	Rpusd3	RNA pseudouridylate synthase domain containing 3
2863	1431164_at	Rragd	Ras-related GTP binding D
2864	1450280_a_at	Rrh	retinal pigment epithelium derived rhodopsin homolog
2865	1440073_at	Rrm1	ribonucleotide reductase M1
2866	1437476_at	Rrm2b	ribonucleotide reductase M2 B (TP53 inducible)
2867	1421084_at	Rs1	retinoschisis (X-linked, juvenile) 1 (human)
2868	1421085_at	Rs1	retinoschisis (X-linked, juvenile) 1 (human)
2869	1444270_at	Rshl3	radial spokehead-like 3
2870	1445726_at	Rsl1	regulator of sex limited protein 1
2871	1448584_at	Rsrc1	arginine/serine-rich coiled-coil 1
2872	1435516_x_at	Rtel1	regulator of telomere elongation helicase 1
2873	1425601_a_at	Rtkn	rhotekin
2874	1460110_at	Rttn	rotatin
2875	1452631_at	Rufy2	RUN and FYVE domain-containing 2
2876	1455605_at	Rufy3	RUN and FYVE domain containing 3
2877	1449246_at	Rundc3a	RUN domain containing 3A
2878	1427847_at	Runx1	Runt related transcription factor 1
2879	1444615_x_at	Runx1t1	runt-related transcription factor 1; translocated to, 1 (cyclin D-related)
2880	1437784_at	Runx1t1	runt-related transcription factor 1; translocated to, 1 (cyclin D-related)
2881	1425389_a_at	Runx2	runt related transcription factor 2
2882	1422482_at	Ruvbl2	RuvB-like protein 2
2883	1418782_at	Rxrg	retinoid X receptor gamma
2884	1421126_at	Ryr2	ryanodine receptor 2, cardiac
2885	1425560_a_at	S100a16	S100 calcium binding protein A16
2886	1449326_x_at	Saa2	serum amyloid A 2
2887	1452386_at	Sall3	sal-like 3 (Drosophila)
2888	1425056_s_at	Saps2	SAPS domain family, member 2
2889	1416662_at	Sardh	sarcosine dehydrogenase
2890	1426257_a_at	Sars	seryl-aminoacyl-tRNA synthetase
2891	1456902_at	Satb1	Special AT-rich sequence binding protein 1
2892	1427017_at	Satb2	special AT-rich sequence binding protein 2
2893	1434612_s_at	Sbno1	sno, strawberry notch homolog 1 (Drosophila)
2894	1427417_at	Scml4	sex comb on midleg-like 4 (Drosophila)
2895	1450120_at	Scn1a	sodium channel, voltage-gated, type I, alpha
2896	1422194_at	Scn5a	sodium channel, voltage-gated, type V, alpha
2897	1442208_at	Scn8a	Sodium channel, voltage-gated, type VIII, alpha
2898	1442810_x_at	Scn9a	sodium channel, voltage-gated, type IX, alpha
2899	1457819_at	Scn9a	sodium channel, voltage-gated, type IX, alpha
2900	1426219_at	Scp2	sterol carrier protein 2, liver
2901	1436573_at	Scrn3	secernin 3
2902	1446986_at	Scrt2	scratch homolog 2, zinc finger protein (Drosophila)
2903	1418805_at	Sct	secretin
2904	1452960_at	Scyl3	SCY1-like 3 (S. cerevisiae)
2905	1436482_a_at	Sdc3	syndecan 3
2906	1431203_at	Sdccag8	serologically defined colon cancer antigen 8
2907	1426688_at	Sdha	succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)
2908	1457333_at	Sdk2	sidekick homolog 2 (chicken)
2909	1430785_at	Sdro	orphan short chain dehydrogenase/reductase

<b>2910</b>	1416320_at	Sec22a	SEC22 vesicle trafficking protein-like A ( <i>S. cerevisiae</i> )
<b>2911</b>	1423347_at	Sec23a	SEC23A ( <i>S. cerevisiae</i> )
<b>2912</b>	1419819_s_at	Sec63	SEC63-like ( <i>S. cerevisiae</i> )
<b>2913</b>	1449624_at	Sel112	sel-1 suppressor of lin-12-like 2 ( <i>C. elegans</i> )
<b>2914</b>	1435361_at	Sema3g	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3G
<b>2915</b>	1455678_at	Sema4b	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4B
<b>2916</b>	1422146_at	Sema5b	sema domain, seven thrombospondin repeats (type 1 and type 1-like), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 5B
<b>2917</b>	1451898_a_at	Sema6c	sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6C
<b>2918</b>	1448060_at	Sema6d	sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6D
<b>2919</b>	1446536_at	Sema6d	sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6D
<b>2920</b>	1459318_at	Sema6d	sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6D
<b>2921</b>	1448866_at	Senp3	SUMO/sentrin specific peptidase 3
<b>2922</b>	1434291_a_at	Serf1	small EDRK-rich factor 1
<b>2923</b>	1454908_x_at	Serf1	small EDRK-rich factor 1
<b>2924</b>	1455236_x_at	Serf2	small EDRK-rich factor 2
<b>2925</b>	1448847_at	Serinc3	serine incorporator 3
<b>2926</b>	1455550_x_at	Serinc3	serine incorporator 3
<b>2927</b>	1421091_at	Serpina12	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 12
<b>2928</b>	1438856_x_at	Serpib5	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 5
<b>2929</b>	1417909_at	Serpinc1	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade C (antithrombin), member 1
<b>2930</b>	1419149_at	Serpine1	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1
<b>2931</b>	1417406_at	Sertad1	SERTA domain containing 1
<b>2932</b>	1421076_at	Sertad3	SERTA domain containing 3
<b>2933</b>	1444006_at	Setd2	SET domain containing 2
<b>2934</b>	1460373_a_at	Setd4	SET domain containing 4
<b>2935</b>	1445719_at	Sf3a1	Splicing factor 3a, subunit 1
<b>2936</b>	1418562_at	Sf3b1	splicing factor 3b, subunit 1
<b>2937</b>	1429362_a_at	Sf3b2	splicing factor 3b, subunit 2
<b>2938</b>	1459836_x_at	Sf3b2	splicing factor 3b, subunit 2
<b>2939</b>	1422894_at	Sfmbt1	Scm-like with four mbt domains 1
<b>2940</b>	1439058_at	Sfpq	splicing factor proline/glutamine rich (polypyrimidine tract binding protein associated)
<b>2941</b>	1451031_at	Sfrp4	secreted frizzled-related protein 4
<b>2942</b>	1448778_at	Sfrs4	splicing factor, arginine/serine-rich 4 (SRp75)
<b>2943</b>	1425026_at	Sft2d2	SFT2 domain containing 2
<b>2944</b>	1435141_at	Sft2d2	SFT2 domain containing 2
<b>2945</b>	1422334_a_at	Sftpa1	surfactant associated protein A1
<b>2946</b>	1417560_at	Sfxn1	sideroflexin 1
<b>2947</b>	1420688_a_at	Sgce	sarcoglycan, epsilon
<b>2948</b>	1442079_at	Sgms1	sphingomyelin synthase 1
<b>2949</b>	1429029_at	Sgms2	sphingomyelin synthase 2
<b>2950</b>	1447979_at	Sgsm1	small G protein signaling modulator 1

<b>2951</b>	1429820_at	Sgsm1	small G protein signaling modulator 1
<b>2952</b>	1449105_at	Sh2d2a	SH2 domain protein 2A
<b>2953</b>	1436997_x_at	Sh3bgrl	SH3-binding domain glutamic acid-rich protein like
<b>2954</b>	1455149_at	Sh3rf1	SH3 domain containing ring finger 1
<b>2955</b>	1436167_at	Shf	Src homology 2 domain containing F
<b>2956</b>	1422198_a_at	Shmt1	serine hydroxymethyltransferase 1 (soluble)
<b>2957</b>	1438042_at	Shox2	short stature homeobox 2
<b>2958</b>	1426550_at	Sidt1	SID1 transmembrane family, member 1
<b>2959</b>	1449163_at	Sigirr	single immunoglobulin and toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain
<b>2960</b>	1416985_at	Sirpa	signal-regulatory protein alpha
<b>2961</b>	1418377_a_at	Siva1	SIVA1, apoptosis-inducing factor
<b>2962</b>	1427277_at	Six1	sine oculis-related homeobox 1 homolog (Drosophila)
<b>2963</b>	1427436_at	Six2	sine oculis-related homeobox 2 homolog (Drosophila)
<b>2964</b>	1427024_at	Slain2	SLAIN motif family, member 2
<b>2965</b>	1420659_at	Slamf6	SLAM family member 6
<b>2966</b>	1436302_at	Slc10a7	solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family), member 7
<b>2967</b>	1449011_at	Slc12a7	solute carrier family 12, member 7
<b>2968</b>	1433734_at	Slc13a4	solute carrier family 13 (sodium/sulfate symporters), member 4
<b>2969</b>	1428114_at	Slc14a1	solute carrier family 14 (urea transporter), member 1
<b>2970</b>	1430629_at	Slc16a14	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 14
<b>2971</b>	1439661_at	Slc16a14	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 14
<b>2972</b>	1417280_at	Slc17a1	solute carrier family 17 (sodium phosphate), member 1
<b>2973</b>	1438824_at	Slc20a1	solute carrier family 20, member 1
<b>2974</b>	1451768_a_at	Slc20a2	solute carrier family 20, member 2
<b>2975</b>	1422897_at	Slc22a12	solute carrier family 22 (organic anion/cation transporter), member 12
<b>2976</b>	1440058_at	Slc22a14	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 14
<b>2977</b>	1417330_at	Slc23a2	solute carrier family 23 (nucleobase transporters), member 2
<b>2978</b>	1460042_at	Slc23a3	solute carrier family 23 (nucleobase transporters), member 3
<b>2979</b>	1417811_at	Slc24a6	solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger), member 6
<b>2980</b>	1416954_at	Slc25a10	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, dicarboxylate transporter), member 10
<b>2981</b>	1449481_at	Slc25a13	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, adenine nucleotide translocator), member 13
<b>2982</b>	1434996_at	Slc25a16	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, Graves disease autoantigen), member 16
<b>2983</b>	1435483_x_at	Slc25a32	solute carrier family 25, member 32
<b>2984</b>	1424211_at	Slc25a33	solute carrier family 25, member 33
<b>2985</b>	1451239_a_at	Slc26a1	solute carrier family 26 (sulfate transporter), member 1
<b>2986</b>	1421145_at	Slc26a2	solute carrier family 26 (sulfate transporter), member 2

<b>2987</b>	1455501_at	Slc2a12	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 12
<b>2988</b>	1450628_at	Slc2a8	solute carrier family 2, (facilitated glucose transporter), member 8
<b>2989</b>	1439934_at	Slc30a10	solute carrier family 30, member 10
<b>2990</b>	1447574_s_at	Slc32a1	Solute carrier family 32 (GABA vesicular transporter), member 1
<b>2991</b>	1423458_at	Slc35a5	solute carrier family 35, member A5
<b>2992</b>	1445629_at	Slc35d1	Solute carrier family 35 (UDP-glucuronic acid/UDP-N-acetylgalactosamine dual transporter), member D1
<b>2993</b>	1453300_at	Slc35d2	solute carrier family 35, member D2
<b>2994</b>	1426722_at	Slc38a2	solute carrier family 38, member 2
<b>2995</b>	1446013_at	Slc38a3	solute carrier family 38, member 3
<b>2996</b>	1454622_at	Slc38a5	solute carrier family 38, member 5
<b>2997</b>	1437430_at	Slc45a2	solute carrier family 45, member 2
<b>2998</b>	1451055_at	Slc45a2	solute carrier family 45, member 2
<b>2999</b>	1416637_at	Slc4a2	solute carrier family 4 (anion exchanger), member 2
<b>3000</b>	1423443_at	Slc4a8	solute carrier family 4 (anion exchanger), member 8
<b>3001</b>	1419166_at	Slc5a2	solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 2
<b>3002</b>	1435484_at	Slc5a3	solute carrier family 5 (inositol transporters), member 3
<b>3003</b>	1435860_at	Slc5a6	solute carrier family 5 (sodium-dependent vitamin transporter), member 6
<b>3004</b>	1426634_at	Slc5a9	solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 9
<b>3005</b>	1447186_at	Slc6a16	solute carrier family 6, member 16
<b>3006</b>	1442449_at	Slc6a2	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, noradrenalin), member 2
<b>3007</b>	1422899_at	Slc6a20	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 20
<b>3008</b>	1417415_at	Slc6a3	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, dopamine), member 3
<b>3009</b>	1449751_at	Slc6a6	Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, taurine), member 6
<b>3010</b>	1421533_at	Slc7a1	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y <sup>+</sup> system), member 1
<b>3011</b>	1443536_at	Slc7a11	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y <sup>+</sup> system), member 11
<b>3012</b>	1428054_at	Slc8a2	solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger), member 2
<b>3013</b>	1450311_at	Slc8a3	solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger), member 3
<b>3014</b>	1417397_at	Slc9a1	solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 1
<b>3015</b>	1452569_at	Slco1b2	solute carrier organic anion transporter family, member 1b2
<b>3016</b>	1420913_at	Slco2a1	solute carrier organic anion transporter family, member 2a1
<b>3017</b>	1454777_at	Slco2b1	solute carrier organic anion transporter family, member 2b1
<b>3018</b>	1459092_at	Slco6c1	Solute carrier organic anion transporter family, member 6c1
<b>3019</b>	1429718_at	Slitrk5	SLIT and NTRK-like family, member 5
<b>3020</b>	1449336_a_at	Slk	STE20-like kinase (yeast)
<b>3021</b>	1433999_at	Slk	STE20-like kinase (yeast)

3022	1420883_at	Sln	sarcophilin
3023	1443426_at	Sltm	SAFB-like, transcription modulator
3024	1452333_at	Smarca2	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 2
3025	1426805_at	Smarca4	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4
3026	1439142_at	Smarcal1	Swi/SNF related matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a-like 1
3027	1430822_at	Smarce1	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily e, member 1
3028	1452197_at	Smc4	structural maintenance of chromosomes 4
3029	1442497_at	Smchd1	SMC hinge domain containing 1
3030	1442215_at	Smo	smoothed homolog (Drosophila)
3031	1420492_s_at	Smr1	submaxillary gland androgen regulated protein 1
3032	1452469_a_at	Smtn	smoothelin
3033	1428395_at	Smurf1	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1
3034	1456796_at	Snai3	snail homolog 3 (Drosophila)
3035	1437817_at	Snap91	synaptosomal-associated protein 91
3036	1448726_at	Snapc2	small nuclear RNA activating complex, polypeptide 2
3037	1426578_s_at	Snapin	SNAP-associated protein
3038	1435603_at	Sned1	sushi, nidogen and EGF-like domains 1
3039	1419766_at	Snf1lk	SNF1-like kinase
3040	1425678_a_at	Snrk	SNF related kinase
3041	1429009_at	Snrp70	U1 small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A
3042	1417274_at	Snrpa	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A
3043	1415896_x_at	Snrpn /// Snurf	small nuclear ribonucleoprotein N /// SNRPN upstream reading frame
3044	1451938_a_at	Sntb1	syntrophin, basic 1
3045	1424276_at	Snx16	sorting nexin 16
3046	1416396_at	Snx4	sorting nexin 4
3047	1451602_at	Snx6	sorting nexin 6
3048	1440222_at	Sod1	Superoxide dismutase 1, soluble
3049	1456630_x_at	Son	Son cell proliferation protein
3050	1440311_at	Sorbs1	sorbin and SH3 domain containing 1
3051	1441624_at	Sorbs2	sorbin and SH3 domain containing 2
3052	1436662_at	Sorcs1	VPS10 domain receptor protein SORCS 1
3053	1423362_at	Sort1	sortilin 1
3054	1429051_s_at	Sox11	SRY-box containing gene 11
3055	1450191_a_at	Sox13	SRY-box containing gene 13
3056	1450485_at	Sox3	SRY-box containing gene 3
3057	1419156_at	Sox4	SRY-box containing gene 4
3058	1455867_at	Sox4	SRY-box containing gene 4
3059	1421504_at	Sp4	trans-acting transcription factor 4
3060	1427786_at	Sp6	Trans-acting transcription factor 6
3061	1417528_at	Spag6	sperm associated antigen 6
3062	1430742_a_at	Spata16	spermatogenesis associated 16
3063	1453213_at	Spata9	spermatogenesis associated 9
3064	1450907_at	Spcs2	signal peptidase complex subunit 2 homolog (S. cerevisiae)
3065	1432185_a_at	Spdyb	speedy homolog B (Drosophila)
3066	1438444_at	Spink10	serine peptidase inhibitor, Kazal type 10

3067	1451601_a_at	Spns2	spinster homolog 2 (Drosophila)
3068	1432372_a_at	Spr	sepiapterin reductase
3069	1436892_at	Spred2	sprouty-related, EVH1 domain containing 2
3070	1449833_at	Sprr2f	small proline-rich protein 2F
3071	1438073_at	Spry3	sprouty homolog 3 (Drosophila)
3072	1428472_at	Spsb1	splA/ryanodine receptor domain and SOCS box containing 1
3073	1417891_at	Spsb3	splA/ryanodine receptor domain and SOCS box containing 3
3074	1435937_at	Sptlc2	serine palmitoyltransferase, long chain base subunit 2
3075	1417426_at	Srgn	serglycin
3076	1428877_at	Srp72	signal recognition particle 72
3077	1450089_a_at	Srprb	signal recognition particle receptor, B subunit
3078	1437638_at	Srrm2	serine/arginine repetitive matrix 2
3079	1451680_at	Srxn1	sulfiredoxin 1 homolog (S. cerevisiae)
3080	1416421_a_at	Ssb	Sjogren syndrome antigen B
3081	1455854_a_at	Ssh1	slingshot homolog 1 (Drosophila)
3082	1455078_at	Ssh2	slingshot homolog 2 (Drosophila)
3083	1456153_at	Ssh2	slingshot homolog 2 (Drosophila)
3084	1457887_at	Sspo	SCO-spondin
3085	1441327_a_at	Ssr1	signal sequence receptor, alpha
3086	1448524_s_at	Ssr4	signal sequence receptor, delta
3087	1436113_a_at	St13	suppression of tumorigenicity 13
3088	1441216_at	St3gal1	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 1
3089	1421891_at	St3gal2	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 2
3090	1443581_at	St6gal1	Beta galactoside alpha 2,6 sialyltransferase 1
3091	1417616_at	St6galnac2	ST6 (alpha-N-acetyl-neuraminy-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 2
3092	1451008_at	St8sia3	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 3
3093	1450199_a_at	Stab1	stabilin 1
3094	1457828_at	Stam	signal transducing adaptor molecule (SH3 domain and ITAM motif) 1
3095	1416975_at	Stam2	signal transducing adaptor molecule (SH3 domain and ITAM motif) 2
3096	1426587_a_at	Stat3	signal transducer and activator of transcription 3
3097	1429502_at	Stch	stress 70 protein chaperone, microsome-associated, human homolog
3098	1453172_at	Stch	stress 70 protein chaperone, microsome-associated, human homolog
3099	1430026_at	Stch	stress 70 protein chaperone, microsome-associated, human homolog
3100	1460197_a_at	Steap4	STEAP family member 4
3101	1418644_a_at	Stk11	serine/threonine kinase 11
3102	1418513_at	Stk3	serine/threonine kinase 3 (Ste20, yeast homolog)
3103	1456818_at	Stk32a	serine/threonine kinase 32A
3104	1434733_at	Stk36	serine/threonine kinase 36 (fused homolog, Drosophila)
3105	1419550_a_at	Stk39	serine/threonine kinase 39, STE20/SPS1 homolog (yeast)
3106	1459153_at	Ston2	stonin 2
3107	1429401_at	Stox2	storkhead box 2
3108	1455156_at	Strn	striatin, calmodulin binding protein

3109	1441266_at	Strn3	Striatin, calmodulin binding protein 3
3110	1453228_at	Stx11	syntaxin 11
3111	1450349_at	Stx1b1	syntaxin 1B1
3112	1451573_a_at	Stx4a	syntaxin 4A (placental)
3113	1423038_at	Stx6	syntaxin 6
3114	1437048_x_at	Stxbp2	syntaxin binding protein 2
3115	1430301_at	Stxbp5	syntaxin binding protein 5 (tomosyn)
3116	1438200_at	Sulf1	sulfatase 1
3117	1449816_at	Sult5a1	sulfotransferase family 5A, member 1
3118	1456349_x_at	Sumo1	SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 1 (yeast)
3119	1451339_at	Suox	sulfite oxidase
3120	1419741_at	Supt16h	suppressor of Ty 16 homolog (S. cerevisiae)
3121	1436797_a_at	Surf4	surfeit gene 4
3122	1455822_x_at	Surf4	surfeit gene 4
3123	1452364_at	Suz12	suppressor of zeste 12 homolog (Drosophila)
3124	1460694_s_at	Svil	supervillin
3125	1428546_at	Syncrip	synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA interacting protein
3126	1438585_at	Syne2	synaptic nuclear envelope 2
3127	1450828_at	Synpo2	synaptopodin 2
3128	1456249_x_at	Syp	Synaptophysin
3129	1425998_at	Sytl4	synaptotagmin-like 4
3130	1421558_at	T2	brachyury 2
3131	1447899_x_at	Tacstd1	tumor-associated calcium signal transducer 1
3132	1448784_at	Taf10	TAF10 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor
3133	1423398_at	Taf12	TAF12 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor
3134	1435474_at	Taf5	TAF5 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor
3135	1436513_at	Tanc2	tetratricopeptide repeat, ankyrin repeat and coiled-coil containing 2
3136	1436318_at	Tardbp	TAR DNA binding protein
3137	1420778_at	Tas1r3	taste receptor, type 1, member 3
3138	1444644_x_at	Tatdn1	TatD DNase domain containing 1
3139	1424082_at	Tbc1d13	TBC1 domain family, member 13
3140	1448028_at	Tbc1d24	TBC1 domain family, member 24
3141	1455903_at	Tbc1d4	TBC1 domain family, member 4
3142	1424644_at	Tbcc	tubulin-specific chaperone c
3143	1436752_at	Tbccd1	TBCC domain containing 1
3144	1455801_x_at	Tbcd	tubulin-specific chaperone d
3145	1428282_at	Tbce	tubulin-specific chaperone e
3146	1434224_at	Tbl2	transducin (beta)-like 2
3147	1415750_at	Tbl3	transducin (beta)-like 3
3148	1447660_at	Tbl3	transducin (beta)-like 3
3149	1439045_x_at	Tc2n	tandem C2 domains, nuclear
3150	1459240_at	Tcf25	Transcription factor 25 (basic helix-loop-helix)
3151	1426639_a_at	Tcf7l2	transcription factor 7-like 2, T-cell specific, HMG-box
3152	1421995_at	Tcfap2a	transcription factor AP-2, alpha
3153	1421996_at	Tcfap2a	transcription factor AP-2, alpha
3154	1425443_at	Tcfap2d	transcription factor AP-2, delta
3155	1460715_x_at	Tcfcp2l1	Transcription factor CP2-like 1
3156	1439595_at	Tcra	T-cell receptor alpha chain
3157	1427656_at	Tcrb-V8.2	T-cell receptor beta, variable 8.2

3158	1436653_at	Tctex1d4	Tctex1 domain containing 4
3159	1449337_at	Tdo2	tryptophan 2,3-dioxygenase
3160	1425375_at	Tdpoz1	TD and POZ domain containing 1
3161	1429355_at	Tekt5	tektin 5
3162	1434317_s_at	Tex10	testis expressed gene 10
3163	1438053_at	Tfg	Trk-fused gene
3164	1438964_x_at	Tfpt	TCF3 (E2A) fusion partner
3165	1452661_at	Tfrc	transferrin receptor
3166	1450790_at	Tg	thyroglobulin
3167	1456250_x_at	Tgfb1	transforming growth factor, beta induced
3168	1422286_a_at	Tgif1	TG interacting factor 1
3169	1416198_at	Th1l	TH1-like homolog (Drosophila)
3170	1458185_at	Thap4	THAP domain containing 4
3171	1426429_at	Thap7	THAP domain containing 7
3172	1450663_at	Thbs2	thrombospondin 2
3173	1425244_a_at	Theg	testicular haploid expressed gene
3174	1448907_at	Thop1	thimet oligopeptidase 1
3175	1428003_s_at	Thtpa /// Zfhx2as	thiamine triphosphatase /// zinc finger homeobox 2, antisense
3176	1454061_at	Thumpd3	THUMP domain containing 3
3177	1440377_at	Tigd5	tigger transposable element derived 5
3178	1417587_at	Timeless	timeless homolog (Drosophila)
3179	1438656_x_at	Timm17b	translocase of inner mitochondrial membrane 17b
3180	1439371_x_at	Timm44	translocase of inner mitochondrial membrane 44
3181	1431665_a_at	Timm8b	translocase of inner mitochondrial membrane 8 homolog b (yeast)
3182	1433662_s_at	Timp2	tissue inhibitor of metalloproteinase 2
3183	1430084_at	Tlcd1	TLC domain containing 1
3184	1448402_at	Tln1	taln 1
3185	1429111_at	Tln2	taln 2
3186	1444811_at	Tloc1	translocation protein 1
3187	1445244_at	Tm2d1	TM2 domain containing 1
3188	1448069_at	Tm4sf1	transmembrane 4 superfamily member 1
3189	1451353_at	Tm6sf1	transmembrane 6 superfamily member 1
3190	1440384_at	Tmcc1	transmembrane and coiled coil domains 1
3191	1441598_at	Tmeff2	transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains 2
3192	1451315_at	Tmem101	transmembrane protein 101
3193	1429495_at	Tmem107	transmembrane protein 107
3194	1416033_at	Tmem109	transmembrane protein 109
3195	1438693_at	Tmem110	transmembrane protein 110
3196	1437569_at	Tmem132e	transmembrane protein 132E
3197	1436556_at	Tmem139	transmembrane protein 139
3198	1424354_at	Tmem140	transmembrane protein 140
3199	1428465_at	Tmem147	transmembrane protein 147
3200	1441880_x_at	Tmem149 /// U2af114	transmembrane protein 149 /// U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1-like 4
3201	1433802_at	Tmem151a	transmembrane protein 151A
3202	1437750_at	Tmem158	Transmembrane protein 158
3203	1423208_at	Tmem167	transmembrane protein 167
3204	1454151_at	Tmem167	transmembrane protein 167
3205	1432311_at	Tmem168	transmembrane protein 168
3206	1447621_s_at	Tmem173	transmembrane protein 173
3207	1418004_a_at	Tmem176b	transmembrane protein 176B

<b>3208</b>	1428956_at	Tmem177	transmembrane protein 177
<b>3209</b>	1428957_at	Tmem177	transmembrane protein 177
<b>3210</b>	1429175_at	Tmem178	transmembrane protein 178
<b>3211</b>	1427059_at	Tmem184b	transmembrane protein 184b
<b>3212</b>	1439726_at	Tmem186	transmembrane protein 186
<b>3213</b>	1443049_at	Tmem19	Transmembrane protein 19
<b>3214</b>	1449770_x_at	Tmem191c	transmembrane protein 191C
<b>3215</b>	1438010_at	Tmem201	transmembrane protein 201
<b>3216</b>	1416710_at	Tmem35	transmembrane protein 35
<b>3217</b>	1424177_at	Tmem38a	transmembrane protein 38A
<b>3218</b>	1424700_at	Tmem38b	transmembrane protein 38B
<b>3219</b>	1437402_x_at	Tmem41b	transmembrane protein 41B
<b>3220</b>	1460353_at	Tmem48	transmembrane protein 48
<b>3221</b>	1433813_at	Tmem48	Transmembrane protein 48
<b>3222</b>	1460451_at	Tmem52	transmembrane protein 52
<b>3223</b>	1428884_at	Tmem57	transmembrane protein 57
<b>3224</b>	1430418_at	Tmem57	transmembrane protein 57
<b>3225</b>	1446460_at	Tmem61	transmembrane protein 61
<b>3226</b>	1452942_at	Tmem65	transmembrane protein 65
<b>3227</b>	1447967_at	Tmem69	transmembrane protein 69
<b>3228</b>	1438472_at	Tmem8	transmembrane protein 8 (five membrane-spanning domains)
<b>3229</b>	1451528_at	Tmem82	transmembrane protein 82
<b>3230</b>	1432008_at	Tmem86b	transmembrane protein 86B
<b>3231</b>	1438355_at	Tmem90a	transmembrane protein 90a
<b>3232</b>	1436629_at	Tmem91	transmembrane protein 91
<b>3233</b>	1426302_at	Tmprss4	transmembrane protease, serine 4
<b>3234</b>	1418959_at	Tmprss5	transmembrane protease, serine 5 (spinesin)
<b>3235</b>	1440894_at	Tmtc3	transmembrane and tetratricopeptide repeat containing 3
<b>3236</b>	1417865_at	Tnfaip1	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 1 (endothelial)
<b>3237</b>	1442753_at	Tnfaip8	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8
<b>3238</b>	1430259_at	Tnfrsf11a	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11a
<b>3239</b>	1448951_at	Tnfrsf1b	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1b
<b>3240</b>	1422038_a_at	Tnfrsf22	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 22
<b>3241</b>	1421649_at	Tnfrsf8	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 8
<b>3242</b>	1439680_at	Tnfsf10	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
<b>3243</b>	1451944_a_at	Tnfsf11	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11
<b>3244</b>	1445251_at	Tnfsf13b	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b
<b>3245</b>	1458047_at	Tnfsf13b	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b
<b>3246</b>	1452772_at	Tnks2	tankyrase, TRF1-interacting ankyrin-related ADP-ribose polymerase 2
<b>3247</b>	1418370_at	Tnnc1	troponin C, cardiac/slow skeletal
<b>3248</b>	1438632_x_at	Tnp1	transition protein 1
<b>3249</b>	1425592_at	Tnp2	transportin 2 (importin 3, karyopherin beta 2b)
<b>3250</b>	1425593_at	Tnp2	transportin 2 (importin 3, karyopherin beta 2b)
<b>3251</b>	1440997_at	Tnrc6c	trinucleotide repeat containing 6C

<b>3252</b>	1444254_at	Tns4	tensin 4
<b>3253</b>	1434385_at	Tom112	target of myb1-like 2 (chicken)
<b>3254</b>	1428215_x_at	Tomm7	translocase of outer mitochondrial membrane 7 homolog (yeast)
<b>3255</b>	1442454_at	Top2a	topoisomerase (DNA) II alpha
<b>3256</b>	1458032_at	Tpd52l2	Tumor protein D52-like 2
<b>3257</b>	1419524_at	Tph1	tryptophan hydroxylase 1
<b>3258</b>	1452927_x_at	Tpi1	triosephosphate isomerase 1
<b>3259</b>	1430889_a_at	Tpmt	thiopurine methyltransferase
<b>3260</b>	1419121_at	Tpmt	thiopurine methyltransferase
<b>3261</b>	1456651_a_at	Tpr	translocated promoter region
<b>3262</b>	1425410_at	Tprkb	Tp53rk binding protein
<b>3263</b>	1445452_at	Traf1	Tnf receptor-associated factor 1
<b>3264</b>	1439539_at	Tram2	translocating chain-associating membrane protein 2
<b>3265</b>	1437379_x_at	Trap1	TNF receptor-associated protein 1
<b>3266</b>	1426142_a_at	Trdn	triadin
<b>3267</b>	1426134_at	Trdn	triadin
<b>3268</b>	1441487_at	Trim2	tripartite motif protein 2
<b>3269</b>	1448101_s_at	Trim27	tripartite motif protein 27
<b>3270</b>	1455837_at	Trim36	tripartite motif-containing 36
<b>3271</b>	1457253_at	Trim40	tripartite motif-containing 40
<b>3272</b>	1436701_at	Trim61	tripartite motif-containing 61
<b>3273</b>	1452650_at	Trim62	tripartite motif-containing 62
<b>3274</b>	1422857_at	Trip4	thyroid hormone receptor interactor 4
<b>3275</b>	1436535_at	Trove2	TROVE domain family, member 2
<b>3276</b>	1459780_at	Trp53	transformation related protein 53
<b>3277</b>	1433937_at	Trp53bp2	transformation related protein 53 binding protein 2
<b>3278</b>	1460720_at	Trpc4ap	transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 4 associated protein
<b>3279</b>	1440241_at	Trpm1	Transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 1
<b>3280</b>	1439111_at	Tsc22d1	TSC22 domain family, member 1
<b>3281</b>	1447360_at	Tsc22d1	TSC22 domain family, member 1
<b>3282</b>	1426588_at	Tspan10	tetraspanin 10
<b>3283</b>	1424649_a_at	Tspan8	tetraspanin 8
<b>3284</b>	1428197_at	Tspan9	tetraspanin 9
<b>3285</b>	1433826_at	Tspyl3	TSPY-like 3
<b>3286</b>	1458937_at	Tspyl4	TSPY-like 4
<b>3287</b>	1433502_s_at	Tsr1	TSR1, 20S rRNA accumulation, homolog (yeast)
<b>3288</b>	1438486_at	Tssk4	testis-specific serine kinase 4
<b>3289</b>	1435211_at	Ttc12	tetratricopeptide repeat domain 12
<b>3290</b>	1437709_x_at	Ttc13	tetratricopeptide repeat domain 13
<b>3291</b>	1437877_at	Ttc14	tetratricopeptide repeat domain 14
<b>3292</b>	1452926_at	Ttc14	tetratricopeptide repeat domain 14
<b>3293</b>	1428932_at	Ttc21a	tetratricopeptide repeat domain 21A
<b>3294</b>	1429130_at	Ttc25	tetratricopeptide repeat domain 25
<b>3295</b>	1448361_at	Ttc3	tetratricopeptide repeat domain 3
<b>3296</b>	1460079_at	Ttc5	tetratricopeptide repeat domain 5
<b>3297</b>	1442594_at	Ttk	Ttk protein kinase
<b>3298</b>	1440829_x_at	Ttll11	tubulin tyrosine ligase-like family, member 11
<b>3299</b>	1452964_at	Ttll11	tubulin tyrosine ligase-like family, member 11
<b>3300</b>	1452890_at	Ttll5	tubulin tyrosine ligase-like family, member 5
<b>3301</b>	1444083_at	Ttn	titin
<b>3302</b>	1455913_x_at	Ttr	transthyretin

3303	1443481_at	Tube1	epsilon-tubulin 1
3304	1439924_x_at	Tubgcp5	tubulin, gamma complex associated protein 5
3305	1449673_s_at	Tufm	Tu translation elongation factor, mitochondrial
3306	1448782_at	Txndc11	thioredoxin domain containing 11
3307	1423035_s_at	Txndc17	thioredoxin domain containing 17
3308	1439184_s_at	Txndc17	thioredoxin domain containing 17
3309	1431871_at	Txndc3	thioredoxin domain containing 3 (spermatzoa)
3310	1424512_a_at	Txndc9	thioredoxin domain containing 9
3311	1436108_at	Txndc9	thioredoxin domain containing 9
3312	1436947_a_at	Txn11	thioredoxin-like 1
3313	1450792_at	Tyrobp	TYRO protein tyrosine kinase binding protein
3314	1419762_at	Ubd	ubiquitin D
3315	1437317_at	Ube1l	ubiquitin-activating enzyme E1-like
3316	1450858_a_at	Ube2d3	ubiquitin-conjugating enzyme E2D 3 (UBC4/5 homolog, yeast)
3317	1455480_s_at	Ube2d3	ubiquitin-conjugating enzyme E2D 3 (UBC4/5 homolog, yeast)
3318	1451272_a_at	Ube2f	ubiquitin-conjugating enzyme E2F (putative)
3319	1438971_x_at	Ube2h	ubiquitin-conjugating enzyme E2H
3320	1417187_at	Ube2k	ubiquitin-conjugating enzyme E2K (UBC1 homolog, yeast)
3321	1429132_at	Ube2v2	ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2
3322	1445727_at	Ube3a	ubiquitin protein ligase E3A
3323	1457242_at	Ubox5	U box domain containing 5
3324	1458033_at	Ubr1	Ubiquitin protein ligase E3 component n-recogin 1
3325	1453097_a_at	Ubtf	upstream binding transcription factor, RNA polymerase I
3326	1417557_at	Ubx1	UBX domain containing 1
3327	1435912_at	Ubx7	UBX domain containing 7
3328	1418197_at	Ucp1	uncoupling protein 1 (mitochondrial, proton carrier)
3329	1449890_at	Ugt2b37	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B37
3330	1439591_at	Ulk2	Unc-51 like kinase 2 (C. elegans)
3331	1445777_at	Upf2	UPF2 regulator of nonsense transcripts homolog (yeast)
3332	1421781_at	Upk2	uroplakin 2
3333	1452613_at	Uqcrq	ubiquinol-cytochrome c reductase, complex III subunit VII
3334	1417206_at	Urod	uroporphyrinogen decarboxylase
3335	1423482_at	Uros	uroporphyrinogen III synthase
3336	1451080_at	Usp1	ubiquitin specific peptidase 1
3337	1454034_a_at	Usp21	ubiquitin specific peptidase 21
3338	1430403_at	Usp32	ubiquitin specific peptidase 32
3339	1417583_a_at	Utp3	UTP3, small subunit (SSU) processome component, homolog (S. cerevisiae)
3340	1450595_at	V1rc1 /// V1rc30	vomer nasal 1 receptor, C1 /// vomer nasal 1 receptor, C30
3341	1450343_at	V1rd1	vomer nasal 1 receptor, D1
3342	1416231_at	Vac14	Vac14 homolog (S. cerevisiae)
3343	1421862_a_at	Vamp1	vesicle-associated membrane protein 1
3344	1430522_a_at	Vamp5	vesicle-associated membrane protein 5
3345	1449993_at	Vamp5	vesicle-associated membrane protein 5
3346	1423726_at	Vat1	vesicle amine transport protein 1 homolog (T californica)
3347	1422932_a_at	Vav1	vav 1 oncogene

3348	1421774_at	Vax1	ventral anterior homeobox containing gene 1
3349	1440739_at	Vegfc	vascular endothelial growth factor C
3350	1453593_at	Vgll3	vestigial like 3 (Drosophila)
3351	1453083_at	Vmn2r29	vomeronasal 2, receptor 29
3352	1440482_at	Vps13a	vacuolar protein sorting 13A (yeast)
3353	1446855_at	Vps13d	vacuolar protein sorting 13 D (yeast)
3354	1453742_at	Vps33a	vacuolar protein sorting 33A (yeast)
3355	1424380_at	Vps37b	vacuolar protein sorting 37B (yeast)
3356	1442699_at	Vps54	vacuolar protein sorting 54 (yeast)
3357	1441646_at	Vta1	Vps20-associated 1 homolog (S. cerevisiae)
3358	1435273_at	Wars2	tryptophanyl tRNA synthetase 2 (mitochondrial)
3359	1419374_at	Wbp4	WW domain binding protein 4
3360	1452916_at	Wbp7	WW domain binding protein 7
3361	1453426_a_at	Wdfy1	WD repeat and FYVE domain containing 1
3362	1445109_at	Wdr4	WD repeat domain 4
3363	1429392_at	Wdr40a	WD repeat domain 40A
3364	1430059_at	Wdr40a	WD repeat domain 40A
3365	1424786_s_at	Wdr45	WD repeat domain 45
3366	1426723_at	Wdr48	WD repeat domain 48
3367	1425980_at	Wdr54	WD repeat domain 54
3368	1431376_at	Wdr62	WD repeat domain 62
3369	1429385_at	Wdr68	WD repeat domain 68
3370	1454922_at	Wdr92	WD repeat domain 92
3371	1435442_at	Wdsf1	WD repeats and SOF domain containing 1
3372	1453113_at	Wdsub1	WD repeat, SAM and U-box domain containing 1
3373	1449191_at	Wfdc12	WAP four-disulfide core domain 12
3374	1424351_at	Wfdc2	WAP four-disulfide core domain 2
3375	1425418_at	Wfdc5	WAP four-disulfide core domain 5
3376	1442507_at	Whrn	whirlin
3377	1427248_at	Whsc2	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 2 (human)
3378	1439060_s_at	Wipi1	WD repeat domain, phosphoinositide interacting 1
3379	1452392_a_at	Wipi1	WD repeat domain, phosphoinositide interacting 1
3380	1448593_at	Wisp1	WNT1 inducible signaling pathway protein 1
3381	1448594_at	Wisp1	WNT1 inducible signaling pathway protein 1
3382	1439373_x_at	Wnt5b	wingless-related MMTV integration site 5B
3383	1421439_at	Wnt8b	wingless related MMTV integration site 8b
3384	1417195_at	Wwc2	WW, C2 and coiled-coil domain containing 2
3385	1437281_x_at	Xab2	XPA binding protein 2
3386	1454281_at	Xpo7	exportin 7
3387	1416587_a_at	Xrcc1	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1
3388	1451968_at	Xrcc5	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5
3389	1450308_a_at	Xrn1	5'-3' exoribonuclease 1
3390	1423105_a_at	Yeats4	YEATS domain containing 4
3391	1449090_a_at	Yes1	Yamaguchi sarcoma viral (v-yes) oncogene homolog 1
3392	1450418_a_at	Yipf4	Yip1 domain family, member 4
3393	1443773_at	Ylpm1	YLP motif containing 1
3394	1453414_at	Ypel2	yippee-like 2 (Drosophila)
3395	1433593_at	Ypel5	yippee-like 5 (Drosophila)
3396	1437357_at	Ythdc2	YTH domain containing 2
3397	1450012_x_at	Ywhag	3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, gamma polypeptide

3398	1436981_a_at	Ywhaz	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide
3399	1453848_s_at	Zbed3	zinc finger, BED domain containing 3
3400	1419604_at	Zbp1	Z-DNA binding protein 1
3401	1436067_at	Zbtb10	zinc finger and BTB domain containing 10
3402	1422064_a_at	Zbtb20	zinc finger and BTB domain containing 20
3403	1432459_a_at	Zbtb32	zinc finger and BTB domain containing 32
3404	1418006_at	Zc3h18	zinc finger CCCH-type containing 18
3405	1435949_at	Zc3h3	zinc finger CCCH type containing 3
3406	1428682_at	Zc3h6	zinc finger CCCH type containing 6
3407	1418495_at	Zc3h8	zinc finger CCCH type containing 8
3408	1439631_at	Zcchc11	zinc finger, CCHC domain containing 11
3409	1454097_at	Zcwpw2	zinc finger, CW type with PWWP domain 2
3410	1458363_at	Zdhhc17	zinc finger, DHHC domain containing 17
3411	1432136_s_at	Zdhhc4	zinc finger, DHHC domain containing 4
3412	1423300_at	Zdhhc6	zinc finger, DHHC domain containing 6
3413	1458142_at	Zdhhc9	zinc finger, DHHC domain containing 9
3414	1443005_at	Zeb1	zinc finger E-box binding homeobox 1
3415	1424521_at	Zfand2b	zinc finger, AN1 type domain 2B
3416	1453267_at	Zfhx3	zinc finger homeobox 3
3417	1458523_at	Zfml	zinc finger, matrin-like
3418	1437023_at	Zfp12	zinc finger protein 12
3419	1449068_at	Zfp148	zinc finger protein 148
3420	1420864_at	Zfp161	zinc finger protein 161
3421	1430650_at	Zfp191	zinc finger protein 191
3422	1430651_s_at	Zfp191	zinc finger protein 191
3423	1423545_a_at	Zfp207	zinc finger protein 207
3424	1451292_at	Zfp212	Zinc finger protein 212
3425	1452045_at	Zfp281	zinc finger protein 281
3426	1449813_at	Zfp30	zinc finger protein 30
3427	1439008_at	Zfp319	zinc finger protein 319
3428	1452374_at	Zfp322a	zinc finger protein 322a
3429	1422094_a_at	Zfp329	zinc finger protein 329
3430	1418684_at	Zfp33b	zinc finger protein 33B
3431	1448581_at	Zfp346	zinc finger protein 346
3432	1459785_at	Zfp383	Zinc finger protein 383
3433	1439979_at	Zfp398	zinc finger protein 398
3434	1451150_at	Zfp410	zinc finger protein 410
3435	1456350_at	Zfp451	zinc finger protein 451
3436	1445824_at	Zfp458	zinc finger protein 458
3437	1421169_at	Zfp46	zinc finger protein 46
3438	1458026_at	Zfp462	zinc finger protein 462
3439	1451059_at	Zfp474	zinc finger protein 474
3440	1460572_a_at	Zfp511	zinc finger protein 511
3441	1452689_at	Zfp512	zinc finger protein 512
3442	1456093_at	Zfp536	zinc finger protein 536
3443	1430973_at	Zfp558	zinc finger protein 558
3444	1429799_at	Zfp606	zinc finger protein 606
3445	1447775_x_at	Zfp622	zinc finger protein 622
3446	1434720_at	Zfp652	zinc finger protein 652
3447	1456912_at	Zfp691	zinc finger protein 691
3448	1451323_at	Zfp7	zinc finger protein 7
3449	1451518_at	Zfp709	zinc finger protein 709

3450	1435243_at	Zfp746	zinc finger protein 746
3451	1452623_at	Zfp759	zinc finger protein 759
3452	1424506_at	Zfp768	zinc finger protein 768
3453	1449552_at	Zfr	zinc finger RNA binding protein
3454	1420759_s_at	Zfy1 /// Zfy2	zinc finger protein 1, Y linked /// zinc finger protein 2, Y linked
3455	1435072_at	Zfyve1	zinc finger, FYVE domain containing 1
3456	1435093_at	Zfyve20	zinc finger, FYVE domain containing 20
3457	1456754_at	Zfyve20	zinc finger, FYVE domain containing 20
3458	1429118_a_at	Zh2c2	zinc finger, H2C2 domain containing
3459	1429728_at	Zh2c2	zinc finger, H2C2 domain containing
3460	1429152_at	Zkscan1	zinc finger with KRAB and SCAN domains 1
3461	1440771_at	Zkscan1	zinc finger with KRAB and SCAN domains 1
3462	1437892_at	Zkscan3	zinc finger with KRAB and SCAN domains 3
3463	1446079_at	Zmat2	zinc finger, matrin type 2
3464	1455984_at	Zmiz1	zinc finger, MIZ-type containing 1
3465	1428941_at	Zmym2	zinc finger, MYM-type 2
3466	1445543_at	Zmym5	zinc finger, MYM-type 5
3467	1422750_a_at	Zmynd10	zinc finger, MYND domain containing 10
3468	1444461_at	Zmynd11	Zinc finger, MYND domain containing 11
3469	1419522_at	Zmynd19	zinc finger, MYND domain containing 19
3470	1427091_at	Znfx1	zinc finger, NFX1-type containing 1
3471	1425531_at	Znhit1	zinc finger, HIT domain containing 1
3472	1455727_at	Zrsr2	zinc finger (CCCH type), RNA binding motif and serine/arginine rich 2
3473	1450514_at	Zscan2	zinc finger and SCAN domain containing 2
3474	1423724_at	Zwint	ZW10 interactor
3475	1427540_at	Zwinta	ZW10a interactor
3476	1446244_at	Zyg11b	zyg-II homolog B (C. elegans)

## **Ich danke von ganzem Herzen.....**

### **Prof. Dr. Dr. Thomas Braun**

Für die Chance ein wundervolles Projekt bearbeiten zu können, für die Gewissheit stets eine offene Tür und ein offenes Ohr für Schwierigkeiten jeglicher Art vorzufinden, für Geduld, Vertrauen und größtmögliche Unterstützung.

### **Prof. Dr. Adriaan Dorresteijn**

Für die Übernahme meiner Betreuung, für die konstruktive Diskussion meiner Arbeit und für die sehr hilfreichen, aufmunternden Worte.

### **Meiner Freundin und Kollegin Sandra**

Für die vielen schönen Stunden in und außerhalb des Labors, für die tollen Diskussionen unserer Ergebnisse in den Raucherpausen und darüber hinaus, für Käse, Weintrauben und Wein....

### **Dem Bioinformatik-Club**

Für die mehr als nur hilfreiche Unterstützung – ohne Mario und Ludmila wäre eine vernünftige Auswertung nicht möglich gewesen!!!!!! Ihr seid prima!

### **Meinen Eltern**

Für das unendliche Vertrauen in meine Fähigkeiten, für die uneingeschränkte Unterstützung und Verständnis. Für Verlässlichkeit und Hilfsbereitschaft in allen Lebenslagen.

### **Carsten**

Für Liebe und Zuversicht auch in schlechten Zeiten. Für bedingungsloses Vertrauen. Für das Gefühl endlich angekommen zu sein.

## EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich versichere, dass ich diese Dissertation gemäß der Promotionsordnung selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

---

Stefanie Köhler-Bachmann

Bad Nauheim, der 22.3.2011